

dc_308_11

AKADÉMIAI DOKTORI ÉRTEKEZÉS

A humorális immunválasz coeliakiában



Dr Korponay-Szabó Ilma Rita

Debreceni Egyetem
Orvos- és Egészségtudományi Centrum
Gyermekegészségügyi Intézet és
Heim Pál Gyermekkórház, Budapest
Coeliakia Centrum

2012

Tartalomjegyzék

1. BEVEZETÉS.....	5
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	6
2.1. A coeliakia előfordulása, klinikai megjelenés.....	6
2.2. Patomechanizmus.....	7
2.2.1. Genetikai hajlamossító tényezők.....	7
2.2.2. A gliadinra kialakuló T-sejtes és velünk született immunválasz.....	8
2.2.3. Antitestek.....	11
2.2.4. A szöveti (2-es típusú) transzglutamináz szerkezete és kapcsolata a coeliakiával.....	17
2.2.5. A coeliakia állatmodelljei.....	19
2.3. Diagnózis és kezelés.....	19
2.3.1. Diagnosztikus kritériumok.....	20
2.3.2. Esetfelismerési stratégia.....	22
2.3.3. Kezelés.....	22
3. CÉLKITŰZÉSEK.....	24
4. BETEGEK ÉS MÓDSZEREK.....	26
4.1. Betegek.....	26
4.2. Antitestek	28
4.3. Rekombináns transzglutamináz 2 proteinek és mutánsok készítése, tesztelése.....	28
4.3.1. A transzglutamináz és GTP-áz aktivitás mérése.....	29
4.3.2. Molekuláris modellezés.....	29
4.4. ELISA mérések.....	29
4.5. Immunfluoreszcens vizsgálatok.....	30
4.6. Szövettani vizsgálatok.....	31
4.7. Sejtes vizsgálatok.....	31
4.8. Genetikai polimorfizmusok vizsgálata.....	31
4.9. Statisztikai értékelés.....	31
5. EREDMÉNYEK.....	32
5.1. A szöveti antitestek és a transzglutamináz antitestek azonossága	32
5.2. Transzglutamináz-alapú diagnosztikus antitest vizsgálatok kifejlesztése és értékelése.....	35
5.2.1. Diagnosztikusan alkalmazható ELISA teszt kifejlesztése tengerimalac TG2 antigénnel.....	35
5.2.2. Természetes humán TG2 antigén alkalmazása a diagnosztikus vizsgálatokban	37
5.2.3. Rekombináns humán TG2 antigén alkalmazása és az IgG anti-TG2 antitestek mérése IgA hiányos személyeknél.....	38
5.2.4. A humán transzglutamináz alapú ELISA antitest kimutatás és a szövettani értékelés összehasonlítása.....	39
5.2.5. A transzglutamináz antigén szerkezetének hatása a coeliakiás autoantitestek mérésének hatékonyságára.....	40
5.2.6. A beteg saját TG2 autoantigénjének felhasználása neminvaszív diagnosztikus eljárások tervezésére.....	40
5.2.7. Ágymelletti gyorseszteszt kifejlesztése a coeliakia antitestek kimutatására.....	41
5.2.8. A Nunc-Immunostickbe épített első gyorseszteszt klinikai felhasználása.....	42
5.2.9. Kereskedelmi coeliakia gyorseszteszt működésének értékelése klinikai betegekben, klinikai döntéshozatal támogatás.....	43
5.2.10. A coeliakia gyorseszteszt alkalmazása szűrővizsgálatokban.....	45
5.2.10.1. A coeliakia előfordulása a magyar gyermekpopulációban.....	46
5.2.10.2. A coeliakia előfordulása magyar serdülőkben és felnőttekben.....	47
5.2.10.3. A coeliakia szűrési stratégia és hatékonyság javítása.....	48
5.3. A coeliakia antitestek in vivo kötődésének vizsgálata.....	49
5.3.1. Transzglutamináz-specifikus autoantitestek kimutatása a betegek vékonybelében.....	49
5.3.2. Transzglutamináz-specifikus antitestek az emésztőrendszer más részein.....	51
5.3.3. Transzglutamináz-specifikus antitestek az emésztőrendszeren kívüli szövetekben.....	51

5.3.3.1 TG2-specifikus antitestek az agyban.....	52
5.3.3.2 TG2-specifikus antitestek a placentában.....	54
5.3.4. Transzglutamináz-specifikus antitestek IgA hiányos betegekben.....	55
5.3.5. A betegek szöveteiben lerakódott transzglutamináz-specifikus antitestek klinikai és diagnosztikus jelentősége.....	56
5.4. A coeliakiában termelődő transzglutamináz autoantitestek epitópjának azonosítása.....	61
5.4.1. A korábbi adatok kritikai értékelése, epitóptérképezési stratégia.....	61
5.4.2. A coeliakia antitestek kötőhelye a transzglutamináz egyik Ca^{2+} kötőhelyével kapcsolatos, de a Ca^{2+} nem része az epitópnak.....	63
5.4.3. A core doménen kívüli részek szerepe egy összetett epitóp felépítésében.....	64
5.4.4. Több domént érintő összetett coeliakiás TG2 epitóp modellezése és kísérletes vizsgálata	66
5.4.5. Az összetett epitóp horgonyzópontjainak relatív szerepe az extracelluláris matrixban	
5.4.6. Az összetett TG2 epitóphoz való direkt antitestkötődés vizsgálata.....	69
5.4.7. Az egyes betegek antitestjeinek epitópspecificitása, kompetíció, betegségspecificitás.....	71
5.5. A coeliakia autoantitestek biológiai hatásainak vizsgálata.....	76
5.5.1. A coeliakia autoantitestek hatása a transzglutamináz enzimatis mőködéseire.....	76
5.5.2. A coeliakia autoantitestek hatása a hámsejteken át történő gliadin transzportra.....	79
5.5.3. A coeliakia autoantitestek hatása az angiogenesisre.....	80
5.5.4. A coeliakia antitestek biológiai hatásának szelektív gátlása <i>in vitro</i>	84
5.5.5. Passzív autoantitest transzfer hatása kísérleti állatokban.....	86
5.5.6. Passzív autoantitest transzfer hatása coeliakiás anyák újszülöttjeiben.....	87
5.6. A coeliakia autoantitestek keletkezési mechanizmusának és a coeliakia korai eltéréseinek kutatása.....	91
5.6.1. A deamidált gliadin peptidek szerepe a coeliakia antitestek keletkezésében.....	91
5.6.2. A deamidált gliadin peptidek és a TG2 szerkezeti hasonlóságának vizsgálata.....	93
5.6.3. A deamidált gliadin peptidek bejutása és prezentációja.....	94
5.6.4. A gliadin prezentációjának hatása egyéb immunológiai folyamatokra.....	95
5.6.5. A coeliakia kapcsolata a velünk született immunitással és gyulladásos faktorokkal.....	96
5.7. A coeliakia genetikai hátterének és genetikai markerek diagnosztikus alkalmazásának kutatása.....	98
5.7.1. A HLA markerek vizsgálata.....	98
5.7.2. Non-HLA coeliakia gének kutatása.....	100
5.8. A coeliakia új diagnosztikus kritériumai és terápiás lehetőségei.....	109
5.8.1. A boholykárosodás előrejelzése a szérum antitest értékek alapján.....	109
5.8.2. Az antitestvizsgálatok megbízhatóságának meta-analízise.....	111
5.8.3. A coeliakia antitestvizsgálatok eredményeinek standardizálási lehetőségei.....	113
5.8.4. A coeliakia gyermekkori diagnózisára vonatkozó 2011-es ESPGHAN irányelv kidolgozásában részvétel, diagnosztikus score kidolgozása.....	115
5.8.5. A coeliakia új kezelési lehetőségeinek vizsgálata.....	119
6. MEGBESZÉLÉS.....	120
6.1. A transzglutamináz antitestek kimutatása és összehasonlítása.....	120
6.2. A transzglutamináz coeliakia epitópja.....	123
6.3. A coeliakiás antitestek keletkezése és biológiai hatásai.....	127
6.4. Az antitestvizsgálatok szerepe a coeliakia új diagnosztikus kritériumainak kidolgozásában.....	130
7. Új megállapítások	133
8. Irodalomjegyzék.....	135
9.1 Az értekezés alapjául szolgáló in extenso közlemények.....	151
9.2 Egyéb in extenso közlemények	156
10. Köszönetnyilvánítás	158
11. Mellékletek.....	160

Gyakrabban használt rövidítések jegyzéke

AGA gliadin-ellenes ellenanyag

ARA reticulin-ellenes ellenanyag

CD coeliakia (ábrákon, táblázatokban, mellékelt közleményekben)

DGP deamidált gliadin peptid

DH dermatitis herpetiformis

DOR diagnostic odds ratio

FITC fluoreszcein izotiocianát

ELISA enzyme-linked immunosorbent assay

EMA endomysium-ellenes ellenanyag

ESPGHAN European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition

GWAS teljes genomra kiterjedő asszociációs vizsgálat

IEL intraepiteliális limfociták

JEA jejunum-ellenes ellenanyag

LR+ positive likelihood ratio

LR- negative likelihood ratio

mtsai munkatársai

POCT point-of-care teszt

ROC receiver operated characteristics curve

Rho ras homolog gene family member

SNP single nukleotid polimorfizmus

TG2 2-es típusú (szöveti, celluláris, erythrocyta) transzglutamináz enzim

TG3 3-as típusú (epidermális) transzglutamináz enzim

TLR toll-like receptor

TRITC rodamin

1. BEVEZETÉS

A coeliakia az európai népesség egyik leggyakoribb krónikus megbetegedése, mely a lakosság legalább 1 %-át érinti és incidenciája az utóbbi évtizedekben növekvő tendenciát mutat (Bingley és mtsai 1999, Berti és mtsai 2006, Lohi és mtsai 2007). A betegség autoimmun jellegű patomechanizmussal jön létre, gyakran kombinálódik más autoimmun betegségekkel, és fokozza további autoimmun kórképek kialakulásának és egyes daganatos betegségek kifejlődésének a kockázatát.

A betegségre jellemző klinikai tünetek lényegében nincsenek, a klasszikus malabszorpciós tünetcsoport helyett ma a betegek többsége egyéb emésztőrendszeri vagy nem emésztőrendszeri tünetekkel jelentkezik, vagy egy ideig tünetmentes. Gyakori, hogy a diagnózist csak a felnőttkorban vagy egyáltalán nem állítják fel (Ravikumara és mtsai 2007) és hogy a betegek egy részét más diagnózisokkal kezelik. Ezért egyre fontosabb olyan vizsgálómódszerek alkalmazása, melyek magát a betegségre jellemző immunreakciót mutatják ki. A vérből neminvaszívan elvégezhető autoantitest vizsgálatok ugrásszerűen megnövelték a felismert betegek számát és további ismeretek összegyűjtését tették lehetővé a betegség változatos megjelenési formáiról valamint kórlefolyásáról. Az antitest vizsgálatok sikere nagyrészt a transzglutamináz (TG2) elleni autoantitestek felismerésének köszönhető (Dieterich és mtsai 1997). Bár ezeket már korábban is kimutatták, valódi célmolekulájuk nem volt ismert, és az is kérdés volt, hogy vajon hányféle autoantitestről van szó (Hällström és mtsai 1989, Mäki 1995). A TG2 autoantigén szerepének felfedezése óta is az egyes autoantitest reakciók kissé eltérő szenzitivitási és specificitási értékeket mutatnak, így ez azt a látszatot kelti, hogy ezek az antitestek különbözők is lehetnek (Lock és mtsai 1999). Munkám kezdeti célja ennek a kérdésnek a vizsgálata volt és olyan egyszerűen használható antitest kimutatási eljárásoknak a kidolgozása, melyek laboratóriumi jártasság nélkül, a betegellátás helyszínén is gyorsan elvégezhetők. A későbbiekben az antitest vizsgálatok egyre szélesebb körű elterjedése révén a betegség számos korai jelensége vált ismertté, melyek a betegség hagyományos definícióját és diagnosztikus kritériumait is megkérdőjelezik. Ezért mindinkább hangsúlyt kap az antitestek keletkezésének és biológiai hatásuknak a vizsgálata, valamint az, hogy szolgálhatnak-e új diagnosztikus kritériumok alapjául. Az antitest hatások megértéséhez fontos 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 betegségi tünetekben 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.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A gluten-érzékenység (coeliakia, gluten-enteropathia, nem trópusi sprue, lisztérzékenység) multifaktoriális betegség, mely az immunrendszer kóros reakciója miatt jön létre és autoimmun jellegű kórfolyamat. A patológiai eltéréseket és betegségi tüneteket környezeti faktor, a kalászos gabonafélékkel (búza, árpa, rozs) fogyasztott gluten és annak alkotórészei, a gliadin és ritkábban a gluteninek váltják ki HLA-DQ2 vagy DQ8 genetikai tulajdonsággal rendelkezőknél. A glutenfogyasztás hatására reaktív T-sejtek jelennek meg és autoantitestek keletkeznek a 2-es típusú transzglutamináz enzim (TG2) ellen. Az immunreakció következtében a vékonybél szerkezete átépül, gyulladás és boholyatrófia alakul ki, valamint autoimmun jellegű kórképek fejlődhetnek ki egyéb szervekben is (Green és Jabri 2003). A betegség glutenmentes diétával kezelhető és a gluten oki szerepére utal, hogy tartós diéta mellett a betegeknek kóros eltérések nem mutathatók ki. A coeliakia diagnosztizálásában döntő jelentőségűek a diéta megkezdése előtt végzett vizsgálatok, mert ezek az információk később nem vagy csak részlegesen pótolhatók.

2.1. Előfordulás és klinikai megjelenési formák

A coeliakia elsősorban az indoeurópai eredetű népességben fordul elő, ennek megfelelően gyakori Európában, a mediterrán területeken, az arab világban, Indiában, valamint Észak- és Dél-Amerika, Ausztrália és Dél-Afrika fehér eredetű lakosságában. A tünetszegény formák gyakorisága miatt a pontos előfordulási adatokat csak szűrővizsgálatokkal lehet feltárni (Mustalahti és mtsai 2010). Ezeken a területeken 1-2% körüli prevalenciát találtak (Lionetti és Catassi 2011) és az elmúlt évtizedben növekedési tendencia észlelhető (Vilppula mtsai 2009). Még jelenleg is nagyon ritka a coeliakia az ázsiai és fekete afrikai népességben, Japánban és Kínában, feltehetően a HLA-DQ allélek különbsége és az alacsonyabb glutenbevitel miatt, amely azonban jelenleg változóban van, és így nemrégiben ezekből az országokból is közöltek eseteket (Wang X és mtsai 2011).

A betegség leggyakrabban változó súlyosságú emésztőszervi és nem emésztőszervi tünetek kombinációjaként jelenik meg (Green és Cellier 2007). Jellemző a vashiány és a boholykárosodás miatt kialakuló szekunder laktóz emésztési zavar, valamint gyakoriak az olyan emésztőszervi panaszok is, melyekkel a betegek sokáig nem fordulnak orvoshoz (puffadás, hasi diszkomfort, időszakos hasmenés vagy székrekedés), vagy amelyeket gyakran hosszú ideig funkcionálisnak tartanak. Felszívódási zavar klinikai vagy laboratóriumi jelei nem minden betegnél mutathatók ki, sőt emésztőszervi tünetek sem mindig vannak jelen. A vezető tünetek izolált anaemia, viszkető bőrbetegség (dermatitis herpetiformis), lassú növekedési ütem, meddőség, csonttrikulás, májbetegség, vesebetegség, cardiomyopathia is

lehetnek. Ezek az extraintesztinális tünetek általában javulást mutatnak glutenmentes diéta hatására. A coeliakia fokozza cerebelláris ataxia, dementia, rosszindulatú daganatok és további autoimmun betegségek (diabetes mellitus, pajzsmirigybetegségek) kialakulásának kockázatát is, amelyeket a glutenmentes diéta önmagában visszafordítani már nem képes (Collin és mtsai 2002, Di Mario és mtsai 1992, Galli-Tsinopoulou és mtsai 1999, Hadithi és mtsai 2007).

Ezek a szövődmények gyakran hosszú, látszólag tünetmentes időszak után lépnek fel, mert a betegek többségénél a vékonybélkárosodást és a már zajló autoimmun reakciót nem ismerik fel időben (Fasano és mtsai 2003). Jellemző a malabszorpciós tünetegyüttes kibontakozása fokozott testi igénybevétel után (pl. fiatal nőknél szülés után a 1-2 hónappal a szoptatás kapcsán) vagy a vékonybelet még tovább károsító bélrendszeri fertőzések, pl. trópusi utazás után. Szűrési adatok arra utalnak, hogy ilyenkor nem újonnan alakul ki a vékonybélkárosodás, hanem egy látszólag tünetmentes állapotból dekompenzálódik (Mäki és mtsai 2003). A coeliakia egyéb maradandó szövődményeket is okozhat, mint májelégtelenség, törpenövés, kompressziós csigolyatörések, fogzománc rendellenesség, valamint felnőtteknél az arc arányainak megváltozása (Ciacci és mtsai 2004).

2.2. Patomechanizmus

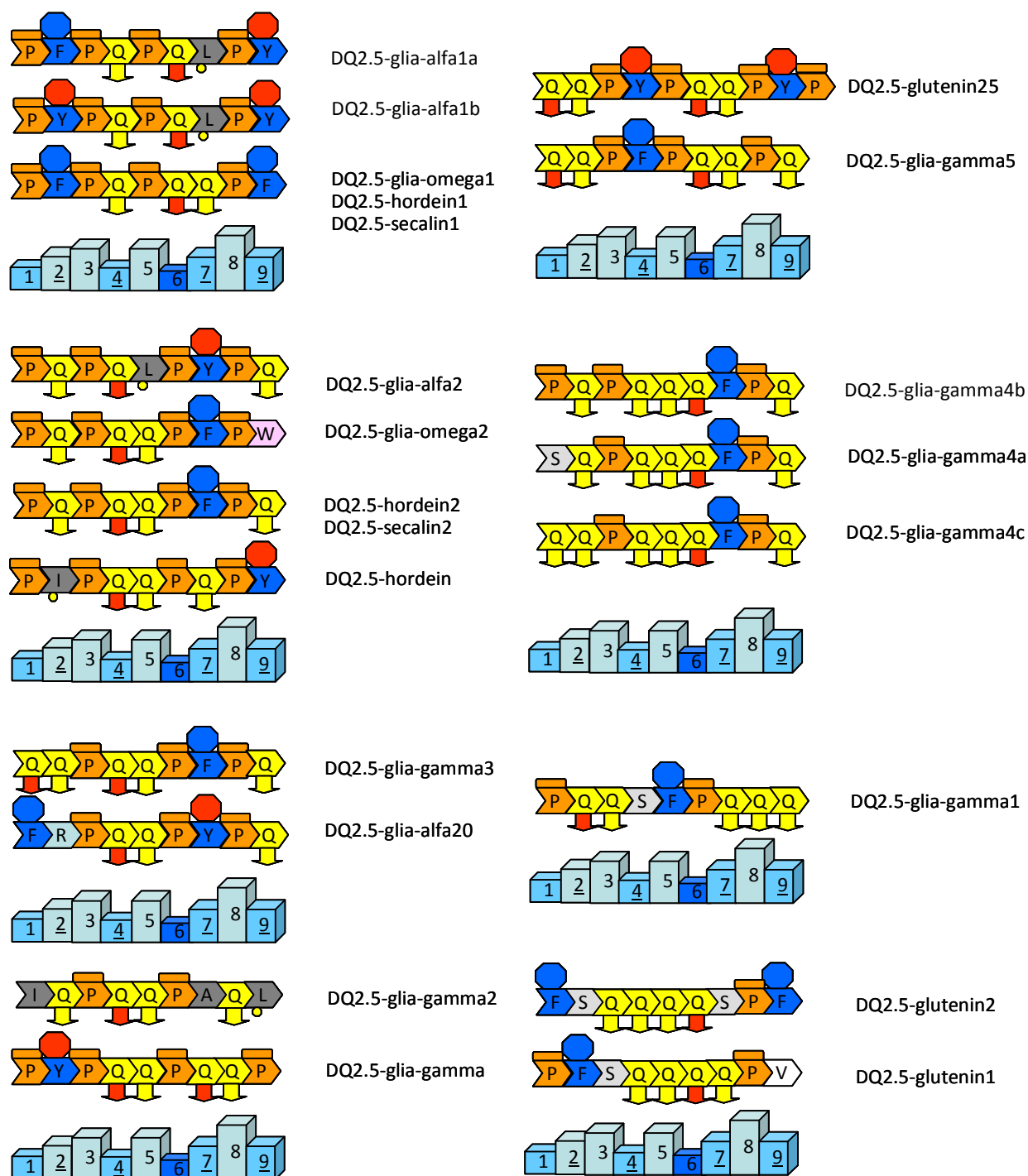
2.2.1. Genetikai hajlamosító tényezők

A glutennel szemben normál egyéneknél az élet első éveiben tolerancia alakul ki. Egyelőre nem ismert, hogy a coeliakiás betegekben a gluten-intolerancia primer módon, a tolerancia kialakulásának hiánya miatt vagy egy korábbi tolerancia kóros elvesztése folytán keletkezik-e. Mivel a tolerancia megszerzése aktív immunfolyamat, az ebben szerepet játszó celluláris és humorális immunmechanizmusok defektusa közrejátszhat a betegség kialakulásában. A már kialakult gluten-intolerancia coeliakia esetén tartós, és igen ritka kivételektől eltekintve az élet folyamán mindvégig fennmarad. Ez a tény és a betegség családi halmozódása (Mäki, és mtsai 1991, Korponay-Szabó és mtsai 1998) arra utal, hogy a betegségre örökletes tényezők hajlamosítanak. A legfontosabb ilyen tulajdonság a HLA DQ2 vagy DQ8 hordozás, mely a betegség kialakulásának szükséges, de nem elegendő feltétele. Kimutatták ugyanis, hogy a gliadin peptideket a T-limfociták csak akkor tudják felismerni, ha azokat DQ2 vagy DQ8 allélekkel rendelkező antigén prezentáló sejtek mutatják be nekik (Abadie és mtsai 2011, Sollid és Jabri 2011). A DQ2 heterodimereknek két formája van, ezek közül a DQ2.5 hordozás magas, a DQ2.2 hordozás alacsony kockázatot jelent a coeliakia szempontjából. A magyar népesség 20-25%-a hordozza DQ2 vagy DQ8 allélt (Dezsőfi és mtsai 2008), de csak 1-2% betegszik meg coeliakiában. Ez további non-HLA gének oki szerepére utal. A coeliakia kialakulásáért felelős gént még nem sikerült azonosítani, mert az érintett családokban az

öröklésment heterogén (nem Mendeli), a penetrancia változó. Egypetűjű ikreknél legalább 80% kezdeti konkordancia van (Nistico 2006), amely az élet folyamán megközelíti 100%-ot, valamint a betegek csaknem kétharmada nő. Családokban végzett asszociációs vizsgálatok több közös krómoszóma szakaszt valamint single nukleotid polimorfizmust (SNP) azonosítottak, melyek egy részét teljes genomra terjedő asszociációs vizsgálatok (GWAS) is megerősítették (van Heel és mtsai 2007, Hunt és mtsai 2008). A főbb polimorfizmusok főként immunrendszerrel kapcsolatos géneket vagy motoros fehérjéket érintenek. Ezek a polimorfizmusok azonban jelentős részben közösek más gyulladásos betegségekre (asthma, colitis ulcerosa, psoriasis) hajlamosító adottságokkal (Festen és mtsai 2009, Abadie és mtsai 2011) és a legtöbbnek a funkcionális kihatása még nem tisztázott, talán más gének expressziójában okoznak különbségeket (Dubois és mtsai 2010). Az eddig azonosított SNP markerek egyenként csak néhány százalék kockázatnövekedésért tehetők felelőssé. Mérhető prediktív értéket csak akkor találtak, ha nagyobb számú (egy vizsgálatban 13-nál több) ilyen marker együttesen volt jelen (Romanos és mtsai 2009).

2.2.2. A gliadinra adott T-sejtes és velünk született immunválasz

A gluten alkotórészei közül elsősorban az alkoholban oldódó gliadin frakciója vált ki immunológiai aktivitást coeliakiásokban. A coeliakiát provokáló gliadin peptidek heterogének, de jellemző magas prolin (P) és glutamin (Q) tartalmuk, melyek ismétlődő motívumokba rendeződnek. A jellegzetes motívumok PQQPFP, PQQPLPY és QXP szekvenciák, ahol X bármely aminosav lehet. Ezek a peptidek főként az alfa gliadinra jellemzők, de a gamma és omega gliadin frakciók hasonló peptidjei is immunogének lehetnek és hasonló felszínt mutathatnak a T sejtek számára (1.ábra). Kimutatták, hogy a nagymolekulasúlyú, alkoholban oldhatatlan gluteninekre is kialakulhat immunreakció. A coeliakiában immunogén peptideket a közelmúltban foglalták egységes nomenklatúrába (Camarca és mtsai 2012). Az antigenitást fokozza egyes glutamin gyökök deamidálása. Ennek következtében a negatív töltésű aminosavak jobban illeszkednek a HLA-DQ molekulákba és jobban prezentálódnak. A HLA DQ2.5 molekulák számára a P4, P6 és P7 kötőhelyen, a DQ8 esetén P1 és P9 kötőhelyen jelen lévő negatív töltések fontosak a stabil kötődéshez (Sollid és Jabri 2011). A HLADQ2.2 peptidkötő helye hasonló HLA2.5 kötőhelyhez, de a DQ2.5-re jól kötődő peptidek kötődése a DQ2.2 molekulához kinetikailag instabil és így a T limfociták aktivációja kevésbé effektív (Fallang és mtsai 2009). Kimutatták viszont, hogy a HLADQ2.2 mellett kialakuló coeliakia esetén a betegek T sejtjei olyan peptidekkel reagálnak, melyek stabilan kötődnek a DQ2.2 molekulához és nem azonosak a DQ2.5 molekulához kötődő peptidekkel (Bodd és mtsai 2012).



1. ábra. A coeliakiában DQ2-n keresztül bemutatott T limfocita epitópokat képező gliadin peptidek. A: alanin, F: fenilalanin, P: prolin, Q: glutamin, R: arginin, S: szerin, Y: tirozin, V: valin, W: triptofán. A pirossal jelölt glutamin gyökök a TG2 segítségével deamidálódhatnak. 1-9: a DQ2 peptidet befogadó kötőhelyei

A deamidálás savanyú közegben (pl. a gyomornedvben) spontán is létrejöhet (Sjöström 1998) vagy a TG2 enzimműködése folytán. A TG2 elsődlegesen fehérjék vagy peptidek glutamin oldalláncai és lizinek vagy primer aminok közötti keresztkötéseket képez, miközben egy molekula ammónia szabadul fel. Az enzimreakció első lépéseként a glutamin szubsztrát tioészter kötással az enzim aktív centrumában lévő ciszteinhez kapcsolódik, majd

a második lépésben az amin szubsztráthoz. A reakció első lépése után az enzimről a szubsztrát keresztkötés nélkül is leválhat, ekkor deamidált termék keletkezik. A gliadint a TG2 enzim keresztkötésekre is jól fel tudja használni (Szabolcs és mtsai 1987). A TG2 általi deamidálás irányított és a QXP motívumokra specifikus, nem az összes glutamin gyök alakul át glutaminsavvá. Az alacsony pH és a QXP motívumok kedveznek a deamidálásnak a transzamidálással szemben. Egyes T sejt klónok csak a deamidált peptideket ismerik fel, mások a natív és a deamidált formát egyaránt, és néha többféle hasonló peptidet is. A DQ8 esetén a natív peptideknek is jelentős immunogenitása lehet (Camarca és mtsai 2012), valamint kimutatták, hogy kisgyermekkorban a coeliakiás betegek T sejtjei döntően a natív peptidekkel reagálnak (Stepniak és Koning 2006). A megfelelően stabil DQ-peptid-T-sejt receptor komplex úgy is kialakulhat, hogy a negatív töltés a T-sejt receptoron van (Hovhannisyan és mtsai 2008). A deamidált gliadin peptidek T sejteket serkentő hatását *in vivo* glutenterheléssel betegeken is megerősítették (Anderson és mtsai 2000). A korábbi tanulmányokban főként részlegesen bontott, pepszinnel-tripszinnel emésztett gliadint, vagy nem deamidált peptideket használtak. Az évtizedekkel ezelőtti kísérletekben egy másik natív peptid is toxikus hatást váltott ki (31-43 alfa-gliadin peptid), mely a vékonybélbiopsziás mintákból készült szövettényezetekben IL15 termelést, CD25 felszaporodást és komplex immunaktivációt okoz (Londei és mtsai 2005). Ezt a peptidet az immunogén peptidektől való megkülönböztetés érdekében ún. toxikus peptidnek nevezik. A 31-43 peptid Caco2 (nem coeliakiás) tumor hámsejteken sejt kultúrában különféle biológiai hatásokat okoz, például fokozza a permeabilitást.

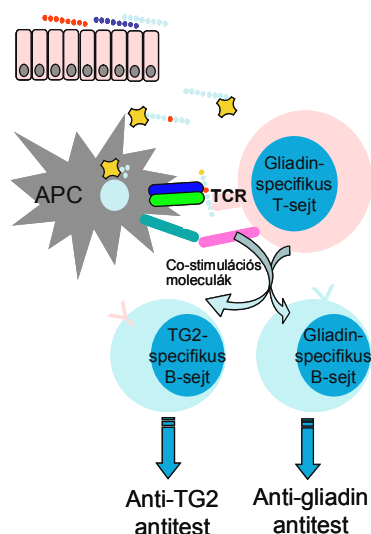
A gliadin peptidek hatását jelentős mértékben meghatározza a vékonybélben lévő emésztőenzimek proteolízisével szembeni rezisztenciájuk és átjutásuk a vékonybél hámsejteken. Egy 33 aminosavból álló és a PQPQLPY motívumot 3 példányban is tartalmazó nagyon immunogén alfa-gliadin peptid alig degradálódik az emésztés során (Shan és mtsai 2002). A rövidebb peptidek jelentős része a lebomlik a hámsejteken, de a főbb toxikus és immunodomináns peptidek a hámsejt bazális oldalán is megjelenhetnek (Matysiak-Budnik és mtsai 2005, 2008). A gliadin peptidek a zonulin révén fokozhatják a paracelluláris permeabilitást is (Fasano és mtsai 2000). Az egyelőre vitatott, hogy a TG2 általi deamidáció hol történik. A hámsejt bazális membránja alatt jelentős mennyiségű TG2 van a kötőszövetben (Belkin 2011), valamint az immunsejt felszínén is leírtak TG2 antigént (Raki és mtsai 2007), bár ezeket a vizsgálatokat később megkérdőjelezték, mert a használt antitest nem csak a TG2-vel, hanem CD 44 antigénnel is képes reagálni. A T sejtek aktivációjának hatására a vékonybél nyálkahártyában gyulladásos citokinek, főként interferon-gamma, tumor nekrosis faktor alfa, IL2, IL4, IL18 és metalloproteinázok aktiválódnak (Nilsen és mtsai 1998), mely szövetkárosodáshoz vezet. A coeliakiára jellemző eltérések hasonlítanak a graft versus host reakcióban látottakra (Neild 1981, Radojevic és

mtsai 1999), ezért a T sejtek szerepe valószínűleg igen jelentős. A T limfociták mellett a velünk született immunrendszer aktiválódása is megfigyelhető, amely a folyamat még T-sejtes immunválaszt megelőző, bevezető jelensége is lehet (Stepniak és Koning 2006). Ennek legfőbb jelenségei a fokozott IL15 termelés, a CD83 pozitív plazmocitoid dendritikus sejtek aktivációja (Maiuri és mtsai 2003) és az intraepiteliális limfociták (IEL) felszaporodása. Utóbbiak, különösen a CD8 $\alpha\alpha$ receptorral rendelkező gamma-delta sejt alcsoportba tartozók, a korábbi nézettel ellentétben nem az adaptív, hanem a velünk született immunitás részei. Kezdetben úgy gondolták, hogy a magas gamma-delta IEL szám a coeliakia állandó jelensége, mely glutenmentes diéta mellett is fennmarad és vizsgálata a korai látens fázisban vagy diéta mellett diagnosztikusan hasznosítható (Savilahti és mtsai 1990, Mäki és mtsai 1991). A későbbi vizsgálatok azonban azt mutatják, hogy a gamma-delta sejtek száma aktivitásfüggő marker és a glutenmegvonás után csökken valamint a szűréssel felfedezett, klinikai tüneteket nem mutató coeliakiás betegeknél nem mindig magas (Iltanen és mtsai 1999a). Az intraepiteliális limfociták a NKG2D receptorokon keresztül a hámsejtek MIC-A expresszióját és ezzel a hámréteg épségét monitorizálják és a sérült sejtekre citotoxikus hatást fejtenek ki (Martín-Pagola és mtsai 2003, Meresse és mtsai 2004). Ez a mechanizmus valószínűleg szintén fontos a vékonybélkárosodás, boholyatrófia kialakulásában (Hüe és mtsai 2004). A coeliakiában a toll-like receptorok (Zanoni és mtsai 2006, Szebeni és mtsai 2007) és különféle hősokk fehérjék aktivációja is megfigyelhető (Iltanen és mtsai 1999b).

2.2.3. Antitestek

Coeliakiában jellegzetes autoantitestek mutathatók ki, melyek célpontja a TG2 fehérje. A TG2 enzim összetett működésű, legalább 5 enzimreakcióra képes (transzamidálás, GTP-áz, ATP-áz, difoszfoizomeráz és kináz aktivitás) valamint egyben struktúrális és adhézis protein is. A TG2-specifikus autoantitestek a vékonybél nyálkahártyájában termelődnek, míg a gliadin ellenes antitesteket termelő sejteket a perifériás vérből is sikerült kimutatni (Marzari és mtsai 2001). Elsősorban IgA anti-TG2 termelődik, de a betegek egy részében IgG is. Termelésük a klinikai tünetek a vékonybél károsodását évekkal is megelőzheti (Mäki 1991). Az anti-TG2 antitestek termelése a gluten megvonása után leáll. Ez arra utal, hogy tartós termelődésükhöz aktív T-helper limfocita működés szükséges. Az anti-TG2 autoantitestek keletkezésének pontos részletei nem tisztázottak. Leginkább elfogadott nézet a haptén-carrier mechanizmus (Sollid 1997). E feltételezés szerint a TG2 és a gliadin kapcsolódása az enzimeakció alatt és után azt eredményezheti, hogy a gliadin carrierként szolgál és az antigénprezentáló sejtek (APC) felszínén a gliadin mellett TG2 részek is megjelenhetnek. Amennyiben vannak olyan gliadin-specifikus T-limfociták, melyek T-sejt receptora megfelel a bemutatott peptidnek, ezek a T-sejtek nemcsak a gliadin-specifikus B-limfocitáknak, hanem a TG2-specifikus B limfocitáknak is helper működést biztosítanak (2. ábra). A deamidált

gliadin peptidek erősebben aktiválják a T-sejteket, ezért az antitestek termelésére is főként a deamidált peptidekre specifikus B limfociták kapnak stimulusokat.



2. ábra. A deamidált gliadin és transzglutamináz (TG2) ellen termelődő antitestek keletkezési mechanizmusa a haptén-carrier elmélet (Sollid 1997) szerint.

Mivel a coeliakia megjelenését néha vírus- vagy baktériumfertőzések után észlelték, már a TG2 autoantigén szerepének felismerése előtt megjelent egy molekuláris mimikri elmélet is, hogy a gliadin-DQ kötés és reakció egy molekuláris szuperantigénnel kapcsolatos immunreakciót utánozhat (Barbeau és mtsai 1997). Az adenovírusok feltételezett szerepét (Kagnoff és mtsai 1984) a későbbi vizsgálatok nem igazolták. A coeliakia antitestek keresztreakciót mutatnak a calreticulinnal (Tuckova és mtsai 1997), a rotavírus VP-7 peptiddel és számos más bakteriális és humán fehérjével is, köztük a 4-es típusú toll-like receptorral, a desmoglein 1-gyel és a hősokk 60 proteinnel is (Zanoni és mtsai 2006).

Az TG2 antitestek biológiai hatásának pontos mibenléte jelenleg nem tisztázott és attól is függhet, hogy az egyes betegek autoantitestjei azonos epitópokat ismernek-e fel a TG2 felszínén. Az eddigi adatok alapján az autoantitestek *in vitro* csökkentik a TG2 keresztköti működését, de teljesen nem gátolják meg (Dieterich és mtsai 2003). Biológiai rendszerekben ennél komplexebb hatás várható, mert a megkötődött antitestek nemcsak a TG2 enzimatisz működéseit, hanem a TG2 protein-protein interakciókban játszott szerepét is zavarhatják. A TG2 elleni antitestek önálló szerepe a patomechanizmusban vitatott, mivel *in vivo* bizonyítékok nincsenek. Az utóbbi években azonban *in vitro* kísérletekben igazolták, hogy a coeliakiás anti-TG2 antitestek befolyásolják a sejtproliferációt (Barone és mtsai 2007), apoptosist válthatnak ki (Cervio és mtsai 2007), csökkentik a hámsejtek differenciálódását (Halttunen és Mäki 1999) és az angiogenezist (Myrsky és mtsai 2008).

A TG2 mellett további nyolc rokon szerkezetű és működésű transzglutamináz fehérje ismert, ezek egy részének pontos funkciója és lokalizációja ma még nem teljesen tisztázott. A coeliakiában minor autoantigén a TG3 (Sárdy és mtsai 2002). A hozzá kötődött bőrben

lerakódó IgA autoantitestek okozzák a gluten-enteropátia bőrtüneteit, a dermatitis herpetiformist, mely egérbe ültetett humán bőrön kísérletesen is létrehozható (Zone és mtsai 2011). A többi transzglutamináz is szerepet játszhat speciális szervi manifesztációkban pl. az idegrendszerben vagy a csontokban. A TG6 ellen az agyi folyamatok és szövődmények (cerebelláris ataxia, demencia, neuropátia) miatt vizsgált coeliakiás betegekben találtak antitesteket (Hajdivassiliou és mtsai 2008). Ezekből a betegekből klónozott antitestek kísérleti állatokban átmeneti ataxiát váltottak ki (Boscolo és mtsai 2010). A TG3 elleni és TG6 elleni antitestek *in vivo* biológiai hatásáról több bizonyíték áll rendelkezésre, mint a csupán TG2 fehérjével kapcsoló antitestekéről. Megjegyzendő azonban, hogy a TG3 és TG6 fehérjékkel reagáló antitestek gyakran a TG2 enzimet is felismerik.

A coeliakia-specifikus antitestek kimutatásának jelenleg elsősorban klinikai jelentősége van, mert az aktív coeliakiás immunreakciót jelzik és nagyon specifikusak (Rostom és mtsai 2004, 2006). Alkalmassak tünetesegény betegek felismerésére (Hin és mtsai 1999, Hopper és mtsai 2007) és a diétás válasz monitorizálására is (Bürgin-Wolff és mtsai 2002, Carlsson és mtsai 2006, Sategna-Guidetti és mtsai 1996). A betegség során korán jelennek meg, így szerepük lehet a betegség előrejelzésében és a diagnózis felállításában (Simell és mtsai 2007).

A coeliakiában nemcsak TG2 elleni antitestek, hanem számos más egyéb antitest is kimutatható (Alaedini és mtsai 2002, Lerner és mtsai 1998, Ferrara és mtsai 2007, 2010). Az antitestek nomenklatúrája nem egységes. Lényegében 3 nagy fő csoportba sorolhatók (1. táblázat).

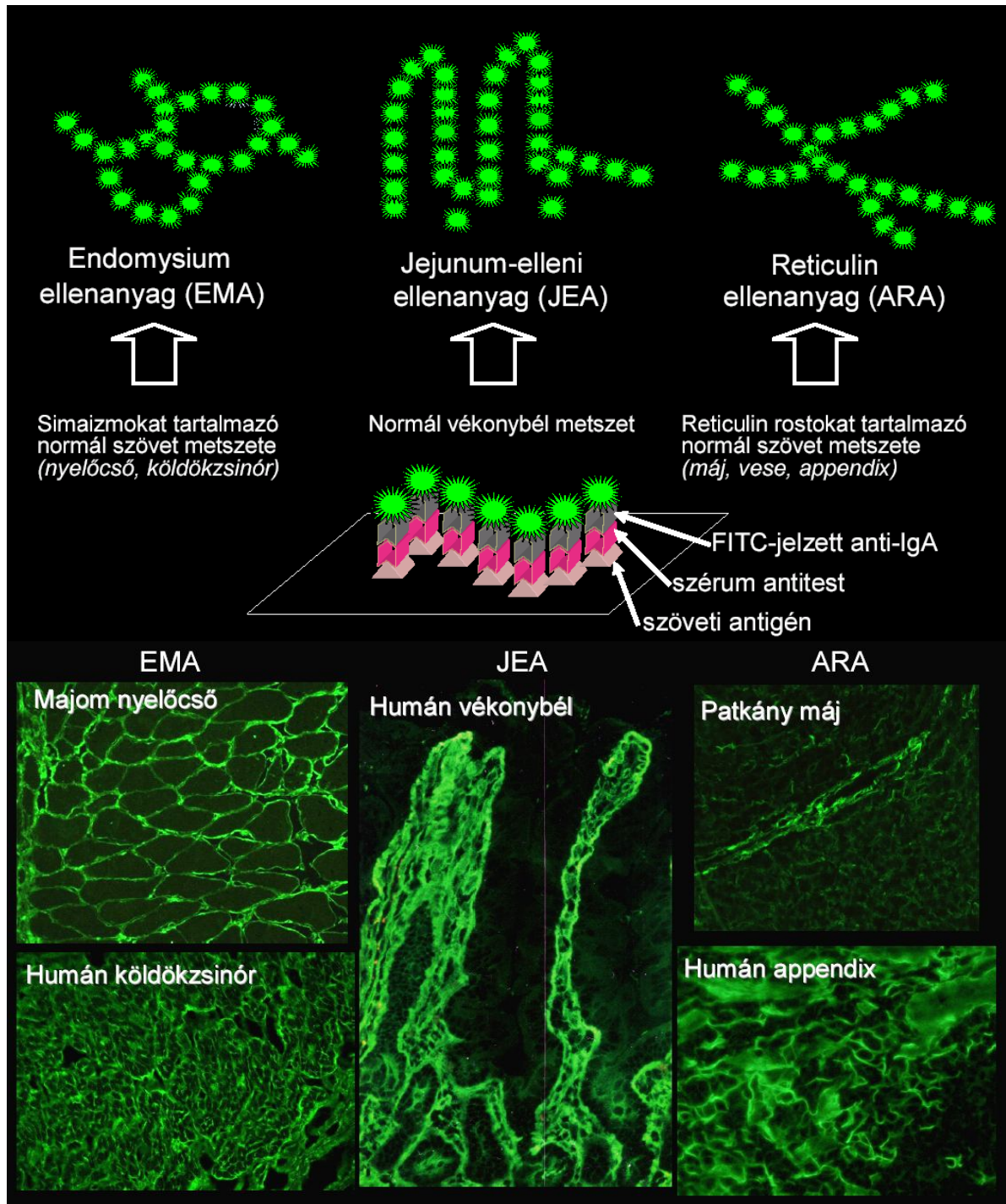
1. táblázat. A coeliakiában észlelhető antitestek csoportosítása

Coeliakia markerek	Szövetkárosodás markerek	Asszociált betegségek vagy szövődmények markerei
TG2 antitestek	aktin antitestek	pancreas-ellenes antitestek, GAD, ICA
endomysium antitest (EMA)	anti-DNS antitest	thyroidea antitestek (TPO, thyroglobulin)
reticulin antitest (ARA)	anti-immunglobulin antitestek	TG3 antitestek
jejunalis antitest (JEA)	anti-vimentin, anti-cytoskeleton antitestek	Purkinje-sejt antitestek TG6 antitestek gangliozid antitestek
deamidált gliadin peptid antitestek (DGP)	gliadin antitestek	calreticulin antitestek

A betegség-specifikus antitestek coeliakia markerek, gluten-dependensek és csak HLA-DQ2 vagy DQ8 hordozó személyeknél termelődnek (Kaukinen és mtsai 2002, Kapitány és mtsai 2006). Ide tartoznak az anti-TG2 antitestek, a kezdetben szöveteken immunfluoreszcens vizsgálatok alapján leírt antitestek (endomysium, reticulin, jejunalis autoantitestek), és talán a deamidált gliadin peptidekkel (DGP) reagáló antitestek is (Kaukinen és mtsai 2006). Az anti-DGP antitestek specifitása valamivel alacsonyabb, mint az anti-TG2 antitesteké (Lewis és Scott 2010) és HLA-DQ2 vagy DQ8 függőségüket még nem igazolták. Más antitestek, pl. az aktin-ellenes vagy anti-DNS antitestek, inkább a szövetkárosodás mértékével és nem specifikusan a coeliakia fennállásával korrelálnak (Clemente és mtsai 2000, Fabbro 2008). A natív gliadin elleni antitestek is többé-kevésbé a szövetkárosodás mértékével arányosan mutathatók ki. Izolált pozitivitásuk nem jelent coeliakiát, és az emésztőszervi tüneteket nem mutató betegeknél gyakran negatívak (Kaukinen és mtsai 2000, 2006). A pancreas, thyreoidea és idegsejtek ellenes antitesteknek speciális szervi manifesztációkban lehet jelentősége (Hadithi és mtsai 2007, Hadjivassiliou és mtsai 2002, Di Mario és mtsai 1992).

A coeliakiára jellemző marker antitesteket kezdetben empirikus módon írták le, elsőként a reticulin antitesteket (Seah és mtsai 1971). A vizsgálatot rágcsáló máj és vese fagyasztott metszetein végezték, és IgG antitesteket mutattak ki. A kötődési mintázat az ezüstözéssel jelölhető rácsrostokat követte, ezért az antitestet R₁-reticulin antitestnek nevezték el (ARA). Több szerv metszetének együttes alkalmazásával (összetett blokk) és az IgG mellett IgA antitestek felismerésével a módszer jelentősen javítható volt. Alkalmazásának fénykorában, a nyolcvanas évek közepén az ARA kimutatás 90-97%-os szenzitivitást és 98% specifitást ért el a coeliakiás betegek felismerésében és kontrolloktól való elkülönítésében (Mäki és mtsai 1984, Mäki és mtsai 1995).

Az endomysium antitestet 1983-ben Chorzelski (Chorzelski és mtsai 1983) írta le, aki egy jól bevált, bőrgyógyászatban használatos szubsztrátot, majom nyelvcső metszeteket alkalmazott, amelyen az izomsejtek kontúrához kötődő IgA festődést figyelt meg dermatitis herpetiformisban szenvedő betegeknél. Ezt a megfigyelését később coeliakiás betegeknél is megerősítette. Hasonló reakciót lehetett látni emberi köldökszinór erein is, mely jóval könnyebben elérhető és olcsóbb volt (Ladinser és mtsai 1994), mint a majom szövetek. Az endomysium antitest reakció (EMA) közel 100%-ban specifikus a coeliakiára, és tünetmentes betegeknél is nagyon szenzitív is (90-100%), ha a boholykárosodás már fennáll. Az ARA és EMA reakció jó klinikai használhatóságát számos régi tanulmány alátámasztotta (2.táblázat). Az EMA kimutatás általában specifikusabb és érzékenyebb volt, valószínűleg azért, mert főemlős vagy humán szöveteken történt. Amikor az ARA kimutatást is humán májon végezték (Hällström 1989), az ARA és EMA eredmények között nem volt különbség.



3. ábra. Az endomysium (EMA), reticulin (ARA) és jejunális (JEA) antitestek kimutatása indirekt immunfluoreszcens eljárással, a leggyakrabban alkalmazott szubsztrát szövetek és az azokon észlelhető jellegzetes kötődési mintázatok IgA antitestek kimutatásakor. Az EMA jellemzően az izomrostok körül, a JEA a vékonybél érhalózata mentén, az ARA rácsrostokon mentén kötődik. Nagyítás 200x.

A jejunális antitestet Kárpáti Sarolta írta le 1990-ben (Kárpáti és mtsai 1990), amikor dermatitis herpetiformisban illetve coeliakiában szenvedő, EMA pozitív betegek savómintáit normál fagyasztott vékonybélmetseteken inkubálta és a megkötődött IgA antitesteket értékelte. Hasonló reakciót a betegek vékonybelében Margot Shiner már 1972-ban megfigyelt, de akkor még nem gondolták, hogy a bélben lerakódott IgA specifikus targethez kötődik (Shiner és mtsai 1972). A három antitest kimutatási módszerrel a kutatók igen

hasznos, de általában nem teljesen azonos eredményeket kaptak, melyet elsősorban annak lehetett tulajdonítani, hogy a rágcsáló szövetekben lévő antigén nem teljesen azonos a valódi humán autoantigénnel (Lock és mtsai 1999).

2. táblázat. Az endomysium és reticulín antitestek kimutatásának szenzitivitása és specifitása coeliakia klinikai tünetei miatt vizsgált felnőttekben és gyermekekben

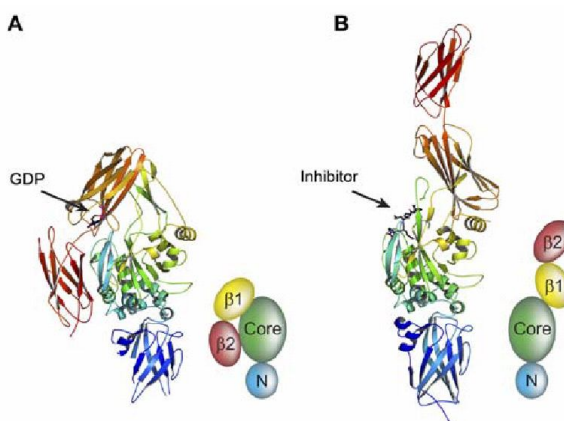
Gyermekek		Betegek száma	Kontrollok száma	IgA reticulín antitestek (ARA)		IgA endomysium antitestek (EMA)	
				Szenzitivitás	Specifitás	Szenzitivitás	Specifitás%
Bottaro	1997	50	25	74	100	96	96
Hällström	1989	14	24	100	100	100	100
Kolho	1997	53	114	96	92	94	100
Lerner	1994	34	41	65	100	97	98
Mäki	1984	29	245	97	98		
Sacchetti	1996	32	42	94	100	97	100
Volta	1991	29	20	52	100	90	100
Felnőttek							
Ferreira	1992	21	160	90	99	100	99
Hällström	1989	35	145	91	100	91	100
Mäki	1991	13	109	92	95	92	95
Sategna-Guidetti	1997	104	94			95	100
Valdimarsson	1996	19	125			74	100
Volta	1991	41	20	44	100	85	100

1997-ben Dieterich és munkatársai kimutatták, hogy a coeliakiás betegek savója reagál a TG2 fehérjével, és ezt követően a coeliakiás antitesteket ELISA eljárással is mérni lehetett (Dieterich és mtsai 1997). Ez jelentős előrelépés volt, mivel az immunfluoreszcens vizsgálatok munkaigényesek, speciális felszerelést és gyakorlott értékelőt igényelnek. A kezdeti biztató eredmények (Sulkanen és mtsai 1998, Sblattero és mtsai 2001, Bürgin-Wolff és mtsai 2002) ellenére a gyakorlatban azonban nem mindig megfelelő az anti-TG2 ELISA specifitása és a prediktív értéke; ez a klinikai rutinvizsgálatok során ma is problémát okoz. Míg az EMA igen specifikus, a TG2 ELISA eredmények pozitív prediktív értékei egyes intézményekben csak 30-50% körül mozognak (Hopper és mtsai 2007, Lock és mtsai 2004, Villalta és mtsai 2005), és ezért megnehezítették a TG2 antitest valódi patomechanikai szerepének megértését. Úgy tűnik, hogy magas specifitása miatt az EMA mégsem nélkülözhető, jóllehet kimutatásának biztonsága az értékelő gyakorlától függ és nem mindenhol hozzáférhető immunfluoreszcens felszerelést kíván (Sulkanen és mtsai 1998). A coeliakia antitest kimutatás szélesebb körű alkalmazására volna igény (Agardh és mtsai 2004), mivel egyértelmű, hogy segítségével több tünetszegény beteg ismerhető fel, mint korábban (Bingley és mtsai 2004, Ravikumara és mtsai 2007). A diagnózis felállítására azonban továbbra is vékonybél szövettani vizsgálata használatos (Agardh és mtsai 2005). Ugyanakkor egyre több adat gyűlt össze, hogy a TG2 antitestek jelenléte sokkal érzékenyebben és korábban jelzi a gluten-érzékenységet, mint a klinikai tünetek vagy a szövettani eltérések (Kaukinen és mtsai 2000, 2001). Az enyhe szövettani eltérések (Marsh I

és II) azonban nem specifikusak, és csak 10%-ban coeliakia eredetűek. Az extraintesztinális manifesztációk is megnehezítik a hagyományos értékelést, mert a betegek egy részének súlyosabb tünetei lehetnek egy másik szervben, mint a vékonybélben.

2.2.4 A szöveti (2-es típusú) transzglutamináz szerkezete és kapcsolata a coeliakiával

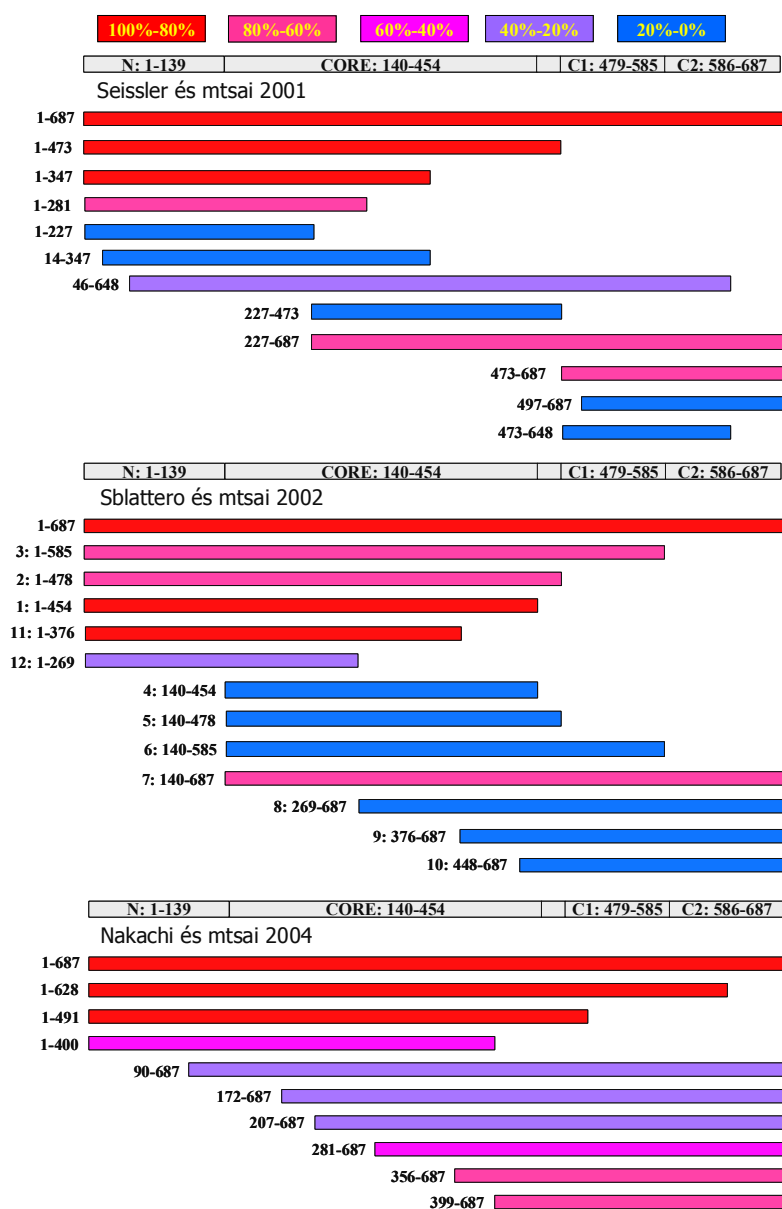
A TG2-specifikus antitestek kötődési helyeinek pontos azonosítása segíthetne keletkezési mechanizmusuk és biológiai hatásuk pontosabb felderítésében és ezzel a betegség következményeinek megértésében. Az emberi TG2 enzim 687 aminosavból és négy szerkezeti részből, egy N-terminális beta-redő doménből (I), egy számos hélixet tartalmazó központi core doménből (II) valamint két C-terminális, hordó szerkezetű doménből (III és IV) áll (Fésüs és Piacentini 2002). A TG2 fehérje transzamidáló (kereszt kötő) aktív centruma a core doménon, nyugalmi állapotban rejtve helyezkedik el és 3 aminosav (a 277-es cisztein, a 335-ös hisztidin és 358-as aszparaginsav) alkotja. Az enzimreakcióhoz kalcium jelenléte szükséges. A TG2 fehérje 6 molekula kalciumot köt meg, ezek közül egy kötőhely nagy affinitású, a többi alacsony affinitású (Király és mtsai 2009). A TG2 kereszt kötő működését a kalciumon kívül GDP és GTP is szabályozza, melyek a transzamidálást gátolják. A GDP a 173, 174, 478, 479 és 580-as aminosavakhoz kötődik és egy kompakt, csukott szerkezetet tart fenn (Liu és mtsai 2002), melyben az 516-os tirozin és a környezetében lévő aminosavak mintegy fedőt képezve az aktív hely hozzáférhetőségét gátolják (pdb kristályszerkezet: 1KV3). Kalcium jelenlétében a GDP gátló hatása megszűnik, de az aktív helyet még takarja a 241-es triptofán is, melyet a szubsztrát megkötése mozdít el. Egy szubsztrát analóg inhibitorral kristályosított forma (Pinkas és mtsai 2007) azt mutatja, az enzimreakció közben a TG2 nyitott formát vesz fel, de hogy ez normál szubsztrát esetén meddig tart és milyen mértékű, nem ismert. A TG2 kalciummal kristályosított szerkezete még nem áll rendelkezésre, ugyanis az enzim stabilitása ebben formában csökken, érzékenyebbé válik proteolitikus és oxidatív hatásokra, és ezek következtében a kereszt kötő aktivitás hamar lecsökken (Stanmaes és munkatársai 2010).



4. ábra. A 2-es típusú transzglutamináz (TG2) csukott és nyitott kristályszerkezete (Pinkas 2007). Az I.domén kék, a II.domén zöld, a III.domén sárga, a IV. domén piros.

Intracellulárisan, ahol a kalcium koncentráció alacsony, a TG2 GDP-kötött formában fordul elő és GTP-áz működést végez, mint az adrenerg 1_B receptorokhoz kapcsolt G-protein. Az extracelluláris térben a TG2 a fibronectinnel, integrinokkal és proteoglikánokkal (syndecan 4) komplexet képez a sejtfelületen és segíti a sejtek adhézióját (Wang és Griffin 2012a). A fibronectinhez való kötődésért az első 7 aminosav valamint a 94-es és 97-es aszparaginsav felelős. A TG2 nem a szokásos szekretoros úton kerül ki a sejtekből, hanem feltehetően a fibronectinhez vagy a syndecan 4 –hez kötődve (Belkin 2011, Wang Z és mtsai 2012b).

Az eddig végzett, TG2 fragmenteket használó 3 nagyobb epitóptérképezési tanulmány (Seissler és mtsai 2001, Sblattero és mtsai 2002, Nakachi és mtsai 2004) lényegében hasonló eredményt adott: nem találtak kitüntetett epitópot, a coeliakiás betegségek több, néha egymáshoz képest komplementer szakaszt is felismertek (5. ábra).



5. ábra. A coeliakiás anti-TG2 antitestek kötődése rekombináns TG2 fragmentekhez. A színskála a kötődés csökkenését jelzi. Domének: I:1-139, II:140-454, III:479-585, IV:586-687. A 456-478 egy összekötő szakasz.

Ezek a vizsgálati eredmények a molekula N-terminális végén és a C-terminális végén is mutatnak fontos kötőhelyeket, ugyanakkor a core domain és annak szerkezeti épsége is fontosnak látszik. Egy másik közleményben (Byrne és mtsai 2007) a coeliakiás IgA antitestek kötődésének csökkenését észlelték az enzim aktív helyét alkotó 3 aminosav alaninra történő cseréje után. További mutánsokkal végzett vizsgálatokban a felnőtt és gyermek coeliakiás betegek mintái a molekula különböző helyeivel mutattak antitest reaktivitást (Tiberti és mtsai 2003, Comerford és mtsai 2012). Az eredmények kétféleképpen interpretálhatók: vagy több kötőhely van, vagy az epitópok konformációsak. Utóbbi mellett szól az, hogy a coeliakia antitestek rosszul kötődnek, ha az enzimet denaturáljuk (Sulkanen és mtsai 2008, Ni Niro és mtsai 2005). Ezért a fő epitópokat még érdemes tovább keresni.

2.2.4. A coeliakia állatmodelljei

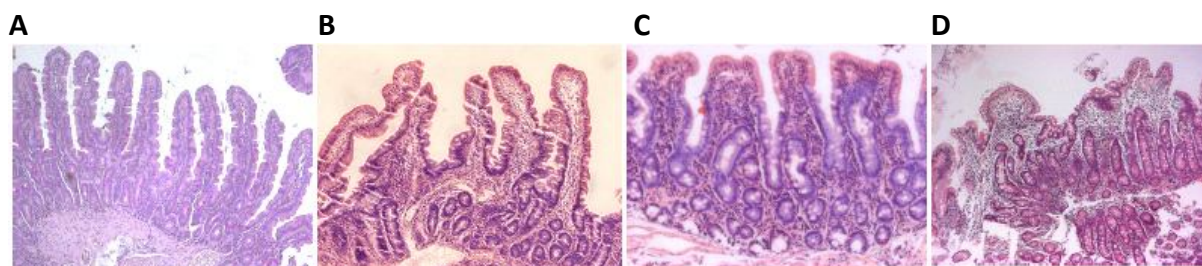
Klinikai gluten-érzékenységet többféle modellben is megfigyeltek vagy létrehoztak, például ír szetter kutyákon (Batt és mtsai 1992) gliadinnal immunizált egerekben (Troncone és Ferguson, 1991), Rhesus majmokon (Bethune és mtsai 2008). Azonban a coeliakiára jellemző fontos tényezők közül egyesek hiányoztak és a jellegzetes boholyatrófia és az anti-TG2 antitestek együttes termelése egyiknél sem jött létre. A kutyáknak nem voltak jellegzetes DQ markerei és csak enyhén rövidült volt a boholyszerkezet, az egerekben nem alakult ki boholykárosodás, a majmoknál főként csak gliadin antitestek voltak jelen IgG típusban, a TG2 fehérjével pedig nem volt meggyőző a reakció. Egy humán DQ8 transzgén NOD egereken kialakított dermatitis herpetiformis modellben létrejöttek gluten-dependens TG3 elleni keringő antitestek, melyek a bőrben lerakódtak, de a vékonybélben boholyatrófia nem alakult ki (Marietta és mtsai 2004). Nem lehetett létrehozni boholyatrófiát DQ2 transzgén egereken gliadin-specifikus CD4 pozitív sejtek passzív bevitelével sem (de Kauwe 2009). Coeliakiához hasonló boholyszerkezeti eltérések mérsékelt formáját észlelték olyan modellekben, ahol a gluten mellett gyulláskeltő ingereket vagy fokozott IL15 expressziót hoztak létre (D'Arienzo és mtsai 2009, Freitag és mtsai 2009, De Paolo és mtsai 2009). Egerekben megpróbálták vektorokkal coeliakia antitestek közvetlenül termeltetni, de ez anti-idiotipikus választ okozott, mely eliminálta a vérből az antitesteket (Di Niro és mtsai 2008). Ezért eddig nem sikerült olyan állatmodellt létrehozni, melyben a coeliakiára jellemző anti-TG2 antitestek termelése és hatásai tanulmányozhatók lennének.

2.3. Diagnózis és kezelés

A diagnózis felállításának szokásos rendje manapság a betegek első vizsgálata az antitestek kimutatásával, majd a pozitív antitest eredményű betegeknél a vékonybél szövettani vizsgálat elvégzése és a vékonybélben lévő boholykárosodás igazolása (Hill és mtsai 2005). Az esetek mintegy 90%-ában a diagnózis egyszerű. A malabszorpcióban szenvedő betegeknél

az antitest eredményektől függetlenül vékonybélbiopsziát célszerű végezni. Mivel a diagnózis és a kezelési javaslat életre szól, a diagnózis felállítása nagy körültekintést igényel. Az IgA hiány vizsgálandó, és ha fennáll, az antitest tesztek értékelésénél ezt figyelembe kell venni (Husby és mtsai 2012). Nagyon fontos, hogy a beteg ne kezdjen glutenmentes diétát a diagnosztikus folyamat lezárása előtt. Az antitest vizsgálatok nagyszámú olyan beteg felismerését teszik lehetővé, akiknél nincsenek súlyos tünetek, és a boholyszerekezet sem teljesen ellapult. Normál vékonybél szerkezet és antitest pozitívitas esetén a betegeket követni kell, mert az állapot progrediálhat (Kurppa és mtsai 2009).

A szövettani vizsgálatnál fontos a minta megfelelő orientációja és felszín a tagoltságának megfigyelése. Ma általában a Marsh stádiumok használatát javasolják (Husby és mtsai 2012). Korai jel lehet a kripták megnyúlása, míg az intraepiteliális limfociták felszaporodása ($>25/100$ hámsejt) boholykárosodás esetén sincs mindig jelen. Újabb vizsgálatok úgy találták, hogy a boholycsúcsban számolt $18/100$ hámsejt határérték jobban alkalmas megőrzött struktúra esetén a gluten-érzékenyek és HLA-DQ2 és DQ8 negatív kontrollok elkülönítésére (Pellegrino és mtsai 2011).



6. ábra. A vékonybél szerkezeti átépülésének fokozatai. Marsh I: normál struktúra, fokozott intraepiteliális limfocitaszám (A), Marsh II: megtartott hosszúságú bolyhok, meghosszabbodott kripták, boholy/kripta arány 1.5-2 (B), Marsh IIIA: megrövidült bolyhok, boholy/kripta arány 1 körüli (C), Marsh IIIB: alacsony kiemelkedések, megnyúlt kripták, a boholy/kripta arány 0.5 alatt, subtotalis boholyatrófia (D).

2.3.1. Diagnosztikus kritériumok

Az coeliakia első diagnosztikus kritériumait az Európai Gyermekegastroenterológiai és Táplálkozástudományi Társaság (ESPGAN, 1997-től ESPGHAN a Hepatológia csatlakozása folytán) interlakeni kongresszusán állapították meg (Meeuwisse 1969). Ez a kritériumrendszer a súlyos boholyatrófia szövettani kimutatását és glutenfüggőségének igazolását írta elő legalább 3 vékonybélbiopszia elvégzésével (kezdeti kóros, glutenmentes diéta után regeneráció, újabb glutenfogyasztási időszak után szövettani relapszus). A kritériumok nagy újítása volt, hogy a coeliakiát életre szóló gluten-intoleranciaként definiálta és a diagnózist teljesen hisztológiai alapokra helyezte, azaz egyáltalán nem szerepeltette benne klinikai tüneteket. Abban az időben csak olyanokat vizsgáltak ki coeliakia irányában, akiknek egyértelmű felszívódási zavara volt, a betegek túlnyomó többsége 2 év körüli kisgyermek volt, akiknél viszont más felszívódási zavart okozó kórképek (tehentej-enteropátia, giardia fertőzés) is gyakoriak voltak (közel 30%). A coeliakia autoantitesteket és a DQ szerepét ekkor még nem ismerték. Jogos volt ezért a gluten

provokáló hatását és az intolerancia permanens voltának igazolását megkövetelni a diagnózis véglegesítéséhez, melyet az egész életre szóló diétás javaslat követett. Az interlakeni diagnosztikus kritériumok 20 évig voltak használatban. Megbízhatóságukat sosem kérdőjelezték meg, de egyáltalán nem lehetett őket teljesíteni, ha a beteg diétás együttműködésének hiányában a szövettani remisszió nem jött létre. A glutenterhelés is gyakran elhúzódott, mert a coeliakiát csak két vagy több év szabad étkezés utáni vizsgálattal lehetett kizárni. A reticulin antitestek bevezetése, a coeliakia megjelenésének későbbi életkorra tolódása, a javuló higiénés viszonyok, a korszerű csecsemőtápszerek használata és a tejallergia javuló megelőzése jelentősen lecsökkentette a nem coeliakia eredetű felszívódási zavar előfordulását. Ezért a súlyos boholyatrófiával 2 éves életkor felett jelentkező betegek közel 95%-a valóban coeliakiás volt és a glutenterhelés során visszaesett. Ezért 1990-től az ESPGHAN a kritériumokat úgy módosította, hogy elegendő a kezdeti, egyértelmű boholyatrófia szövettani igazolása, ha a beteg 2 évesnél idősebb, más differenciáldiagnosztikai probléma nem merül fel és a glutenmentes diéta mellett a tünetek megszűnnek. Továbbra is el kellett végezni a diéta melletti második biopsziát, ha nem voltak kezdetben tünetek, (például szerológiai vizsgálattal kiszűrt családtagoknál) illetve az egyéb betegségek kizárására a glutenterhelést, ha a beteg két évesnél fiatalabb volt. A szeropozitivitás nem volt a kritériumok része, mert ebben az időszakban főként az alacsony megbízhatóságú gliadin antitestek álltak rendelkezésre és csak kevés centrum tudott ARA-t vagy EMA-t vizsgálni. A reform így nem az antitestek nagyobb megbízhatóságán, hanem epidemiológiai megfontolásokon nyugodott. Magyarországon az eredeti interlaken folyamat 1995-ig kötelező volt, amíg az EMA típusú vizsgálatok elterjedtek. Az 1990-es ESPGHAN kritériumokat vette át az Észak-Amerikai Gyermekgasztroenterológiai Társaság (NASPGHAN, Hill és mtsai 2005) valamint alapjaiban a felnőtt ellátás is, azzal a különbséggel, hogy már nem csak az ún. flat mucosát (Marsh IIIB tekintette meggyőző szövettani leletnek, hanem a parciális boholyatrófiát (Marsh IIIA) is. Napjainkban az antitestvizsgálatok folytán lényegesen enyhébb tünetekkel diagnosztizálunk betegeket. Bár nagy többségüknél a legalább Marsh III fokozatú károsodás jelen van a vékonybélben, egyes betegeknél a vékonybéleltérések foltosak, vagy a bolyhok bizonyos ideig megtartottak. Kiderült viszont, hogy ezeknek a betegeknek döntően extraintesztinális manifesztációja is lehet (dermatitis herpetiformis, ataxia) vagy olyan gasztrointesztinális tünetei, melyek glutenmentes diétára reagálhatnak (Kaukinen és mtsai 2001). Erre többnyire a vérben kimutatható anti-TG2 antitestek hívják fel a figyelmet. Az antitesteknek viszont lehetnek fals pozitív és fals negatív eredményei, de fény derült arra is, hogy a patológiai értékelés is variábilis, a metszetek rossz orientációja miatt tévedhet és gyenge az egyes vizsgálók között egyezés (Corazza 2005).

Ezért szükségesnek látszik a coeliakia definíciójának bővítése, mely felé az első lépést az ESPGHAN 2011 decemberében azzal tette, hogy coeliakiát olyan gluten által provokált immunfolyamatként definiálta, mely gluten-dependens klinikai tünetek, TG2 elleni antitestválasz, kompatibilis HLA DQ markerek és enteropátia változó kombinációjaként jön létre. Az ESPGHAN új, 2011-es ajánlása szerint (Husby és mtsai 2012) a diagnózisban a szövettani vizsgálat és a specifikus antitestek pozitivitása (EMA, anti-TG2 és DGP) egyformán fontos szerepet játszik, és a szeronegatív vagy DQ2 és DQ8 negatív betegeknél szükség lehet hagyományos glutenterhelésre. Szövettani vizsgálatot kell továbbra is végezni a diagnózis felállításához, ha csak szeropozitivitás van, de nincsenek coeliakiának tulajdonítható tünetek vagy egyéb klinikai jelek, vagy ha az antitestek szérumszintje alacsony. Mivel a magas anti-TG2 antitest szintek és EMA pozitivitás együttes prediktív ereje nagyon magas (Husby és mtsai 2012, Giersiepen és mtsai 2012), ezek együttes fennállása és coeliakiának tulajdonítható klinikai tünetek vagy jelek esetén a gyermekgasztroenterológus a családdal való megbeszélést követően vékonybélbiopszia és szövettani vizsgálat nélkül is felállíthatja a coeliakia diagnózisát. Ezekben az esetekben ajánlott a diagnózis alátámasztására a HLA-DQ markerek tipizálása is. Az új diagnosztikus javaslat életbe lépett, de működése további, lehetőleg prospektív vizsgálatot igényel.

2.3.2. Esetfelismerési stratégia

A coeliakia felismerését illetve diagnosztizáltságát döntően az szabja meg, hogy gondolnak-e rá és sor kerül-e antitestkimutatásra. Ha a társadalomban a coeliakia ismertsége javul, a diagnózisok száma jelentősen emelkedik (Virta és mtsai 2009). Az emésztőszervi tünetek miatt jelentkezők, családtagok, autoimmun betegségekben (1-es típusú diabetes, pajzsmirigybetegek) aktív szűrése javasolt (Husby és mtsai 2012). Az elsőfokú rokonok szisztematikus szűrésevel a felismert betegek száma 15-20%-al is növelhető (Korponay-Szabó és mtsai 1998). Az átlagnépesség szűrésének indokoltsága vitatott, mert a globális mortalitás és morbitás emelkedettség a fel nem ismert coeliakiások körében az új vizsgálatok szerint alacsonyabb, mint azt korábban gondolták (Tio és mtsai 2011). Elképzelhető azonban, hogy krónikus betegséget fenntartó szervi manifesztációk esetén (vese, máj, idegrendszeri) a betegek jelentős részénél a coeliakia diagnózis nem születik meg, és ezért az ilyen irányú adatokban nem szerepelnek.

2.3.3. Kezelés

A coeliakia egyetlen bizonyítottan hatásos kezelése a glutenmentes diéta, melyet a betegnek egész életében tartania kell. A diéta betartása nem könnyű, a betegek rendszeres gondozást, monitorizálást igényelnek. Ha ez elmarad, gyakori a diéta abbahagyása vagy hullámzó mértékű betartása, mely többnyire tünetmentességgel jár. Az ilyen betegeknél a

vékonybélben gyakran ismét kialakul a boholyatrófia, és szérumban is megjelenhetnek az anti-TG2 antitestek. A szérum antitest vizsgálatok azonban nem elég érzékenyek az alkalmi diétahibák felderítésére, mert az immunfolyamat a bélben zajlik és az antitestek nem azonnal jutnak a keringésbe.

A diéta betartásának nehézségei miatt egyéb attraktív kezelés eljárások kipróbálása és értékelése folyik (Rashtak és mtsai 2012). Egyrészt a nem jól emésztődő gliadin peptidek további bontására javasoltak microbiális enzimeket (Shan és mtsai 2002) vagy probiotikus baktériumtörzseket (D'Arienzo és mtsai 2009). Egy másik lehetőség a DQ2 kötőhelyeinek blokkolása nagy affinitással kötődő, de a T-sejtek számára közömos peptidekkel (Jüse és mtsai 2011).

3. CÉLKITÚZÉSEK

Általános megfontolások

Munkám során a coeliakia autoantitestek különleges sajátosságaiból kiindulva a betegségben betöltött szerepüket komplex módon, a transzglutamináz és a sejtes alapkutatástól a klinikai ellátáson keresztül a diagnosztikus követelmények értékeléséig kívántam vizsgálni. Mivel ezek az antitestek coeliakia esetén gyakorlatilag minden betegnél kialakulnak és mindig főként a transzglutamináz ellen irányulnak, keletkezésük és hatásmechanizmusuk megértése kulcsfontosságú nemcsak a betegségről alkotott kép helyes kialakításához, hanem ahhoz is, hogy a betegekben zajló folyamatokat klinikai célból jobban monitorizálni tudjuk, esetleg kedvezőbb terápiás lehetőségeket alakítsunk ki. A gluten-érzékenységet illetve a boholatrófiát okozó alapvető eltérés, az eredendő ok még mindig nem ismert, habár joggal gondolhatjuk, hogy a folyamat genetikai alapokon nyugszik és a T sejtes immunválaszon dől el. Ezeken a területeken az elmúlt években nagy horderejű eredmények születtek egy rendkívül kompetitív, számos nagy és neves kutatócsoport részvételével zajló kutatásban, viszont úgy érzem, hogy még mindig kevésbé kerültek felhasználásra az antitestekre vonatkozó megfigyelések, melyek betegközelből évtizedek óta nyilvánvalóak. Ezért elsődleges célom az antitestekre vonatkozó alapvető kérdések vizsgálata és tisztázása volt, valamint ezeknek az eredményeknek az integrálása a transzglutaminázzal kapcsolatos molekuláris biológiai és élettani ismeretekbe, abban a reményben, hogy azok később a közvetlen gliadinnal és genetikával kapcsolatos kutatásban is alkalmazhatók lesznek. Másik irányban viszont az volt a célom, hogy ezek az ismeretek a klinikai felhasználókhoz is eljussanak, mivel a coeliakia abban is különleges, hogy az antitestek „látása” sokkal több klinikai információtartalmat hordoz, mint a szokásos orvos-beteg kapcsolatban kiderülő anamnesztikus adatok vagy a fizikális vizsgálati jelek. Az antitestek vizsgálatával kapcsolatos technikai kérdések megfelelő uralása ezért nagyon fontos a betegellátás effektivitása számára is. Kiemelten fontos azt is kutatni, hogy van-e lehetőség arra, hogy a diagnosztikus folyamatot meggyorsítsuk és invazivitását redukáljuk. Ma a betegeink jelentékeny része (amennyiben az antitesteket tényleg jól használjuk) egyre fiatalabb életkorú gyermek, akiknél a minél egyszerűbb, kíméletesebb, de időtálló és megbízható diagnózisra kell törekedni.

Specifikus célkitűzések

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 MÓDSZEREK

4.1 Betegek

Coeliakia gyanúja miatt jelentkező klinikai betegeket, családtagokat és más autoimmun betegség miatt veszélyeztetett betegeket, valamint normál populációt vizsgáltunk. Az egyes tanulmányokban szereplő betegek számát és fontosabb adatait a 3. táblázatban foglaltam össze. A prospektív tanulmányokban magyar és finn betegek vettek részt.

A coeliakia diagnózisát minden esetben vékonybélbiopsziával és szövettani vizsgálattal állítottuk fel. Dermatitis herpetiformis diagnózisát a bőr direkt immunfluoreszcens vizsgálatával állapítottuk meg, granuláris IgA csapadék jelenléte alapján a dermális papillákban. A diagnosztikus vizsgálatok értékelésénél olyan kontrollcsoportokat alkalmaztunk (az IgA hiányosok egy részét kivéve), akiknek normál vékonybél szövettani lelete volt vagy átmeneti boholykárosodása, ami diéta nélkül is megszűnt. Latens coeliakia diagnózisát akkor állapítottuk meg, ha a betegnek az első vizsgálat idején nem volt boholyatrófiája, de az a későbbiekben kialakult.

3. táblázat. A tanulmányokban szereplő betegek áttekintése

Tanulmány	CD	Kontroll	Egyéb/ megjegyzés	Életkor	Populáció
Sulkanen 1998	136 (*38)	207		gyermek+ felnőtt	finn
Korponay-Szabó 1999	[5]	–	427 populáció	gyermek (3–5 év)	magyar
Korponay-Szabó 2001	261 (*696)	–	csak pozitív vérminták	gyermek	magyar
Karell 2002	334	25	CD/DH testvérek	<i>genetikai vizsgálat</i>	magyar, finn
Korponay-Szabó 2003a	61	34	40 DH	gyermek+ felnőtt	magyar
Korponay-Szabó 2003b	78	73	174 IgA hiányos vérado	gyermek+ felnőtt	Magyar (és finn vérado)
Korponay-Szabó 2004	21	12	latens és DH	gyermek	magyar
Korponay-Szabó 2005	137 (*263)	65	84 családtag	gyermek+ felnőtt	magyar
Collin 2005	144	127		gyermek+ felnőtt	9 ország
Kaukinen 2005	18	34	41 magas IEL eset	felnőtt	finn
Hadjivassiliou 2006	9	7	gluten ataxia	felnőtt	angol
Király 2006	25	3	enzimmérések	gyermek+ felnőtt	magyar
Raivio 2006	121 (*106)	107		gyermek+ felnőtt	magyar, finn

dc_308_11

Salmi 2006a	[17]	[30]	75 prospektív	gyermek+felőtt	finn
Salmi 2006b	177	20		felőtt	finn
Kapitány 2006	[43]	[27]	70 prospektív	serdülő	magyar
Raivio 2007	51(*48)	36		felőtt	finn
Korponay-Szabó 2007	[32]	–	2690 populáció	gyermek (6 éves)	magyar
Korponay-Szabó 2008	74	65		gyermek+felőtt	magyar
Nemes 2008	128	113		serdülő	magyar
Papp 2008	712	384		gyermek+felőtt	magyar
Dezsőfi 2008	147	2080	80 T1DM	gyermek	magyar
Koskinen L 2008	1259	897		<i>genetikai vizsgálat</i>	magyar, finn
Koskinen O 2008	13+[28]	42	48 prospektív		finn
Stenman 2008	5(*20)	6	szövetkultúra	felőtt	finn
Raivio 2008	150	107		gyermek+felőtt	magyar, finn
Haimila 2009	1473	678	360 IgA/CVID	<i>genetikai vizsgálat</i>	magyar, finn, olasz, svéd
Koskinen L 2009a	1638	1385		<i>genetikai vizsgálat</i>	magyar, finn, holland
Sareneva 2009	1347	1383		<i>genetikai vizsgálat</i>	magyar, finn, olasz
Einarsdottir 2009	1787	2409	803 IBD, 385 psoriasis	<i>genetikai vizsgálat</i>	magyar, finn, olasz, svéd
Koskinen L 2009b	1290	1637		<i>genetikai vizsgálat</i>	magyar, finn, olasz
Koskinen L 2009c	923	579		<i>genetikai vizsgálat</i>	magyar, finn
Koskinen O 2009	33	–	glutenterhelés	gyermek	finn
Papp 2009	190 (*30)	48	100 egészséges	felőtt	magyar
Dahlbom 2010	170 (*20)	131	134 DH	gyermek+felőtt	magyar
Dubois 2010	9451	16434		<i>genetikai vizsgálat</i>	9 ország
Einarsdottir 2011a	1661	1471		<i>genetikai vizsgálat</i>	magyar, finn, holland
Einarsdottir 2011b	884	838		<i>genetikai vizsgálat</i>	magyar, finn
Korponay-Szabó 2011	3872	1061		gyermek+felőtt	magyar
Simon-Vecsei 2012	216 (*22)	56		gyermek+felőtt	magyar
Giersiepen 2012	1876	1234		gyermek	metaanalízis

CD:coeliakia,*kezelt, DH: dermatitis herpetiformis, IBD: gyulladásos bélbetegég, IgA/CVID: IgA hiány és common variable immunodeficiency. Szögletes zárójelben a propektív tanulmányokban diagnosztizált, kiszűrt betegek

A diétát és terápiás készítményt vizsgáló tanulmányokban a betegekkel a fogyasztott ételekről naplót írtunk. Az iskolai védőoltás után non-responder serdülőknek Engerix™ újraoltást adtunk. A helyszíni gyorseszteket a rendelőben vagy a szűrésnél az óvodában ujjbegyből vett vérből végeztük el.

4.2 Antitestek

A vizsgálatokban szérummintákat, friss és fagyasztva tárolt (-20 és -70C) teljes vért, tisztított antitest frakciókat (össz IgA, IgG), TG2 antigénnel tisztított IgA és IgG, valamint fágban kifejezett egyláncú antitesteket használtunk.

A felhasznált egér monoklonális anti-TG2 antitestek leírását a 4. táblázat tartalmazza.

4. táblázat. A tanulmányokban használt monoklonális anti-TG2 antitestek áttekintése

Klón	Immunogén	Epitóp (aminosavak)	Forrás
CUB7402	Tengerimalac TG2	447–478	NeoMarkers, Fremont, USA
TG100	Tengerimalac TG2	447–538	
G92.1.2	Tengerimalac TG2	1–14	Laszlo Lorand, Northwestern University Feinberg Medical School, Chicago, USA
H23.1.2	Humán vörösvérsejt TG2	433–438	
885	Humán rekombináns TG2	153	Phadia, Uppsala, Sweden
890	Human rekombináns TG2	II. domén	
895	Human rekombináns TG2	649–687	
896	Human rekombináns TG2	649–687	
901	Human rekombináns TG2	II. domén	
925	Human rekombináns TG2	II. domén	
3.3.1	Human rekombináns TG2	III.domén	In-Gyu Kim, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea
4E1	Human rekombináns TG2	637–648	Fernando Chirido, University of La Plata, Argentina
6B9	Humán T limfocita	I.domén	Thomas Issekutz, Dalhousie University, Halifax, NS, Canada
4G3	Human rekombináns TG2	1–165	Alexey Belkin, Baltimore, USA

Az egyláncú antitesteket (ScFvs) antitest könyvtárból Daniele Sblattero és munkatársai készítették (Trieszti Egyetem) vékonybélbiopsziás minták teljes RNS mintáját cDNS-re átírva (Marzari 2001), majd a variábilis immunglobulin régiókat (V) specifikus primerekkel felszorozva és egyláncú antitestté összeállítva. Az anti-TG2 specifikus antitestek szelekcióját fág display technikával végeztük.

4.3 Rekombináns transzglutamináz 2 proteinek és mutánsok készítése, tesztelése

Teljes hosszúságú (1-687 aminosav) TG2 fehérjét N-terminális His-taggal és GST fúziós formában készítettünk Rosetta 2 E. coli sejtekben (Novagen, Darmstadt, Germany). A pGEX-2T-TG2 DNS-t (Ambrus és mtsai 2001) specifikus primerekkel (primer 1, 5'-gac gacgacaagatgagaatt cag accatggcc

gag gagctg g – 3', and primer 2, 5'- gag gagaag ccc ggtgaattcggttaggcggggccaat gat gac – 3') amplifikáltunk és a pET-30 Ek/LIC Vectorba klónoztuk őket. A TG2 mutánsokat QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kittel készítettük (Stratagene, Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA), a domén mutánsokat pcDNA 3.1/myc-His mammalian expression vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) felhasználásával fejeztük ki az alábbiak szerint: A/ I+II+III (aa 1-584), B/ I+II+IV (aa 1-471 and 585-687), C/ II+III+IV (aa 139-687), D/ I+III+IV (aa 1-138 and 472-687), and E/ csak His-tag. A templátokat Soichi Kojima professzortól kaptuk (Molecular Cellular Pathology Research Unit, RIKEN, Wako, Saitama, Japan). A mutánsok DNS szekvenciáját ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzeren ellenőriztük. A rekombináns fehérjék termelését 5 órán át 20°C fokon 0.3 mM isopropyl D-beta-thiogalactosid mellett indukáltuk. A sejteket kötő puffer + 10% (v/v) glycerol, 1% (v/v) Triton X-100 és 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) (kötő puffer: 50 mM Na-foszfát (pH 7.8), 500 mM NaCl, 20 mM imidazol, 20 mM beta-mercaptoethanol) jelenlétében tártuk fel, majd ProBond Ni-NTA resin (Invitrogene) oszlopon tisztítottuk. Imidazol eluálást követően AmiconCentricon-YM 50 MW (Millipore, Billerica, MA, USA) membránon koncentráltuk, majd 20 mM Tris-HCl, pH 7.2, with 150 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol (DTT), 1 mM EDTA + 10% (v/v) glycerol pufferben -70°C fokon tároltuk. A mutánsok minőségét standard Western blottal és enzimaktivitás méréssel ellenőriztük.

4.3.1. Transzglutamináz és GTP-áz aktivitás mérése

A transzglutamináz aktivitást mikrotitráló lemezen 5-(biotinamido) pentylamin (Invitrogen) N,N-dimetilkazeinbe történő beépítésével, folyadékfázisú esszével és putreszcinn inkorporációval mértük 5 mM CaCl₂ jelenlétében 10 és 30 perc között. A GTPáz aktivitást a charcoal módszerrel mértük (Király és mtsai 2006).

4.3.2. Molekuláris modellezés

A TG2 (PDB code: 1KV3) és a TG3 (PDB code: 1VJJ) ismert kristályszerkezetét felhasználva teljes hosszú TG2 modellt építettünk fel (Bagossi Péter). Az 1KV3 szerkezetből hiányzanak az 1-14, 44-55 és 123-132 aminosavat, ezeket a TG3 hasonló részeiből illesztettük be a Modeller program (Sali és Blundell 1993) a multiple templát módszerrel. A grafikus méréseket Silicon Graphics Fuel és Sybyl és VMD programcsomaggal végeztük (Tripos International, St. Louis, MO, USA illetve Humphrey és mtsai 1996).

4.4. ELISA mérések

Anti-TG2 ELISA

A vizsgálatokhoz Maxisorp felszínű mikrotitráló lemezeket használtunk (Maxisorp, Nunc, Thermo Fisher Scientific, Fremont, CA, USA). A TG2 antigén felkötött mennyisége 0.2 ug-0.6 ug/vájuvat között változott, 5 mM CaCl₂ tartalmú (pH 7.4) tris pufferben (TBS). (Ca-TBS). A TG2 denaturálásának vizsgálatakor 8 M ureát vagy 6 M Guanidine-HCl-t adtunk a lemezhez, a nyitott forma elérésére 200 umol R281 vagy R283 inhibitort a kötés alatt. A lemezek blokkolására 0.1% (v/v) Tween20 és 10 mM EDTA (TTBS+EDTA) oldatot és mosásokat használtunk. A szérumminták és monoklonális egér antitestek hígítása a klinikai vizsgálatokban 1:101, a kutatási vizsgálatokban 1:20-1:2000 között volt. Az egyláncú antitesteket bakteriális felülúszó vagy tisztított formában használtuk és 30-60 percig inkubáltuk. A második antitestek tormaperoxidázzal jelölt anti-IgA, anti-IgG, anti-egér, anti-nyúl

antitestek voltak, a vizsgált antitestek típusától függően (1:4000; DAKO AS, Glostrup, Denmark). A színreakciót a kezdeti vizsgálatoknál 100 µL orto-feniléndiaminnal (OPD), a későbbiekben 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB) szubsztráttal hívtuk elő és 10-30 perc után 50 µL 1 N H₂SO₄ hozzáadásával állítottuk le. Az abszorbanciát TMB esetén 450 nm-n, OPD esetén 480 nm-n olvastuk le.

Megfelelő antitestekből (TG100 monoklonális anti-TG2, klinikai vizsgálatoknál betegsavó vagy gyári IgA standard, Celikey™, Phadia GmbH, Freiburg, Németország, Quanta Lite, Inova, San Diego, USA) standard hígításokat és kalibrációs görbét készítettünk és a mért abszorbancia értékeket 4 paraméteres illesztéssel relatív koncentrációra számoltuk át, amit a standard %-ában adtunk meg. A klinikai vizsgálatokban a köszöbértéket coeliakiás és kontroll betegek mintáival készített receiver operated characteristics (ROC) görbével határoztuk meg.

Indirekt ELISA, fibronectin-TG2 és gelatin-TG2 ELISA

A mikrotitráló lemezre bicarbonát pufferben 0.3 µg humán fibronectint vagy gelatint kötöttünk szobahőn 1 óra hosszat, majd mosás után 0.6-0.8 µg TG2 fehérjét adtunk hozzá 5 mM CaCl₂ és 0.1% (v/v) Tween 20 tartalmú oldatban. Az ELISA-t a TG2 ELISA leírásnak megfelelően folytattuk. A vörösvérsejt TG2 megkötésére a mikrotitráló lemezt bicarbonát pufferben 1:2000-5000 hígított IgA hiányos coeliakiás savóval vagy IgA hiányos savóból tisztított IgG anti-TG2 antitesttel inkubáltuk, majd TTBS+EDTA mosás után a lemezhez 100 µl hypotoniás oldattal lizált vvs koncentrátumot (fehérvérsejt és vérlemezke szegény CPD oldatban, helyi vérellátóból) adtunk 1:100 hígításban 30 percig 2.5 mM CaCl₂ és 0.1% (v/v) Tween 20 tartalmú oldatban, majd az ELISA eljárást az TG2 ELISA szerint folytattuk.

Kompetíciós vizsgálatok

A mikrotitráló lemezre kötött vad típusú vagy mutáns rekombináns TG2 antigént a vizsgálandó antitesttel inkubáltuk oldatban lévő különböző koncentrációjú kompetitor jelenlétében. Az egyláncú antitestek kompetíciójához M13 fággal kifejezett antitesteket használtunk és a fág részt ismertük fel tormaperoxidázal jelölt anti-M13 antitesttel. Az IgA hiányos minták leszorítás útján történő mérésére az 1:100 hígításban használt betegsavókat 1:500 hígítású ismert IgA coeliakiás antitestet (tracert) tartalmazó TTBS+EDTA oldatban hígítottuk és együtt adtuk a lemezhez. A tracer IgA antitest kötődését mértük. A vizsgálandó minta nélküli értéket 0% gátlásként definiáltuk. A gátlás mértékét a 100-(ODtracer -ODsample /ODtracer) képlettel számítottuk ki.

4.5. Immunfluoreszcens vizsgálatok

A vizsgálatokhoz 5 µm vastag fixálatlan vagy acetonnal fixált fagyasztott metszeteket használtunk. A mosásokat és az antitest hígításokat foszfát (PBS) vagy TBS pufferben készítettük el. A kettős festéseknél a primer és szekunder antitestekkel külön inkubáltuk a metszeteket, a szekunder antitest specificitását figyelembe vevő sorrendben. A keresztreakciók lehetőségét primer antitest nélküli kontrollokkal ellenőriztük a festés optimalizálása során. A humán IgA jelölésére általában FITC anti-IgA-t (DAKO, 1:40-1:160 hígítás) használtunk, az egyéb, anti-TG2 monoklonális, anti-FBN, laminin illetve más primer antitesteket TRITC vagy Alexa-Fluor594 konjugált szekunder antitesttel (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) jelöltük. Egyes kísérletekben a festés előtt vagy után a metszeteket

4M KSCN oldattal vagy 0.25% klóracetáttal (Fluka Chemic AG, Buchs, Switzerland) kezeltük, a kompetíciós vizsgálatoknál az inkubáló oldatot visszaszívtuk, anti-egér IgG mágneses gyönggyel (Dynabeads, Invitrogen) tisztítottuk és antitesttartalmát ELISA-val mértük. A szövetekről leoldott antitesteket 10K membránon (Microsep, Pall Corporation, Ann Harbor, Michigan, USA) koncentráltuk.

4.6. Szövettani vizsgálatok

A vékonybélbiopsziás mintákat felső endoszkópia során a duodenum leszálló szárából és a bulbusból vettük. Kisgyermeknél egy mintavétel történt a duodenojejunális határról Watson kapszulával röntgen képerősítő alatt. iv. Dormicum előkészítés után. A paraffinba ágyazott metszeteket hematoxin-eozin festés után a Marsh stádiumok és hagyományos Fontain-Navarro beosztás szerint (Kuitunen és mtsai 1982) értékeltük.

4.7. Sejtes kísérletek

Köldökszinór véna endotél sejteket (HUVEC) Palatka és mtsai 2006 szerint preparáltunk és tenyésztettünk. A sejteket az angiogenesis kísérletekhez Matrigelbe kevertük (BD Biosciences Franklin Lakes, NJ, USA) és 24-es lemezen (50.000 cells/vájuvat) EGM1 (Lonza, Basel, Switzerland) tápfolyadékban 2% fetalis borjúsérummal (FBS) tenyésztettük. A kísérletekben 1 ug/vájuvat MAb885 vagy tisztított coeliakiás és kontroll IgA-t illetve ScFv-t 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. A Caco2 sejteket 20% FBS tartalmú MEM oldatban tenyésztettük, a gliadin peptideket transzwell lemezen adtuk hozzájuk (Rauhavirta és mtsai 2011).

4.8. Genetikai polimorfizmusok vizsgálata

A HLA-alléleket szekvencia-specifikus primerekkel (Olerup SSP AB, Saltsjöbaden, Sweden), restrikciós fragmenthossz analízissel vagy automatizált rendszerekben (Illumina) SNP tipizálással határoztuk meg. A non-HLA gének SNP variációt TaqMan és On Demand Assay-vel Applied Biosystems (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA, 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.

4.9. Statisztikai értékelés

Az ELISA eredményeket GraphPad Prism Software és STATISTICA szoftverekkel értékeltük. Az antitestek kötődését ANOVA one-way analízissel, majd Dunnett's Multiple és Tukey's post-tesztel vagy Kruskal-Wallis tesztel és Dunn's multiple comparison tesztel értékeltük. $P < 0.05$ alatti értéket tekintettünk szignifikánsnak.

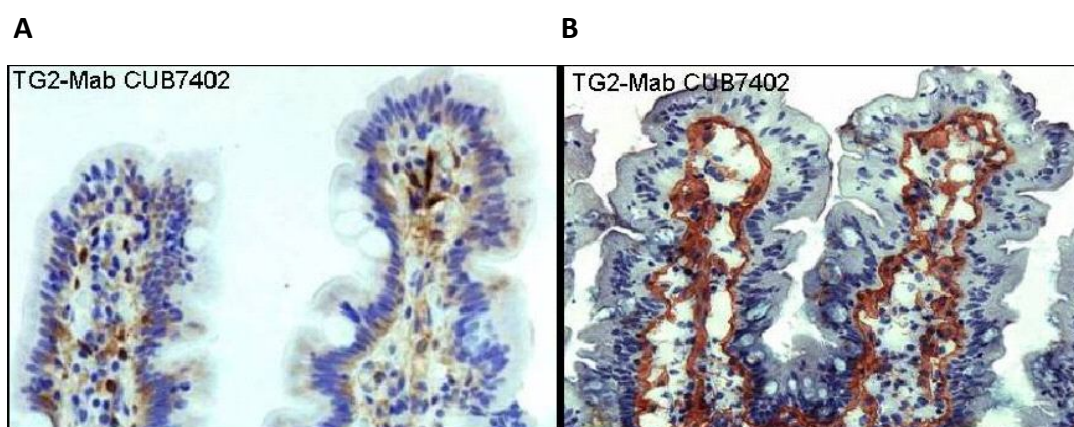
5. EREDMÉNYEK

5.1. A szöveti antitestek és a transzglutamináz antitestek azonossága

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 coeliac disease-specific autoantibodies. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000;31:520-527.

Korponay-Szabó IR, Laurila K, Szondy Zs, Halttunen T, Szalai Zs, Rantala I, B.Kovács J, Fésüs L, Mäki M. Missing endomysial and reticulin binding of coeliac antibodies in transglutaminase 2 knockout tissues. *Gut* 2003;52:199-204.

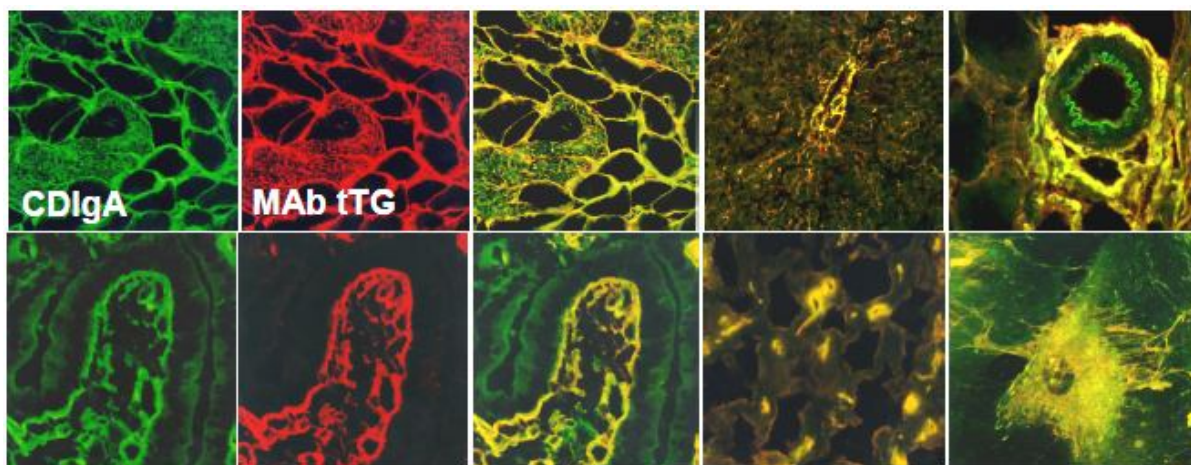
A TG2 intracelluláris enzim, ezért Dieterich első leírása, hogy ez lehet az endomysium antitestek célpontja (Dieterich és mtsai 1997), kezdetben nehezen összeegyeztethetőnek tűnt a coeliakia autoantitestekről már ismert tényekkel. A TG2-t az addig rendelkezésre álló immunhisztokémiai vizsgálatok (Thomázy és Fésüs 1989) más lokalizációban mutatták a vékonybélben és az egyéb szövetekben, mint a coeliakia antitestek megszokott kötődési mintázata. A vizsgálatokat azonban más körülmények között, előzetesen fixált és paraffinba ágyazott metszeteken végezték, melyekről már ismert volt, hogy nem alkalmasak a coeliakia antitestek klinikai felismerésére. Amikor viszont a festéseket a coeliakia diagnosztikában használatos fixálatlan, fagyasztott metszeteken végeztük, a monoklonális egér TG2-specifikus antitestek a coeliakiás betegséggel azonos mintázatban kötődtek (7. ábra).



7. ábra. Normál vékonybél formalinnal fixált és paraffinba ágyazott (A) illetve fixálatlan, fagyasztott metszetein (B) végzett immunhisztokémiai reakció CUB7402 monoklonális anti-TG2 primer antitesttel és tormaperoxidázzal jelölt anti-egér immunoglobulin másodík antitesttel. A paraffinos metszeten csak az intracelluláris TG2 jelölődik, míg a fagyasztott metszeten az extracelluláris TG2 is a coeliakiára jellemző kötőhelyeken. Nagyítás:200x

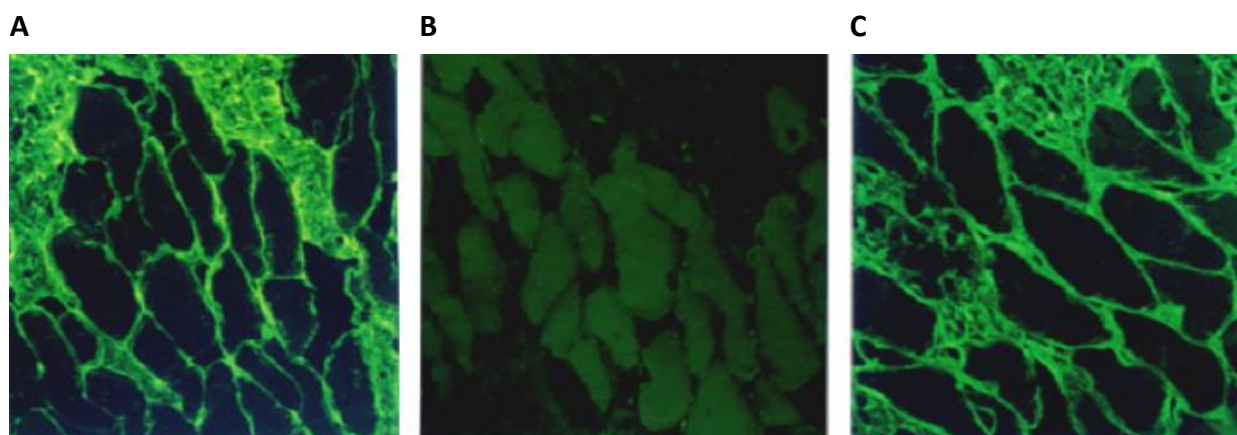
A CUB7402 és a TG100 monoklonális antitestekkel majom nyelőcsővön végzett festésnél a jellegzetes endomysium reakció minden komponense (simaizom rostok körüli, subepiteliális, kötőszöveti) látható volt, és ugyanezekkel az antitestekkel a rágcsáló szöveteken (patkány máj, vese, szívizom, gyomor) típusos reticulin antitest (ARA) kötődési mintázatot kaptunk. A monoklonális antitestek kötőhelyeinek és a coeliakiás antitestek kötőhelyeinek azonos lokalizációját kettős immunfluoreszcens jelöléssel is igazoltuk, melynek során a zölddel (FITC) jelölt coeliakiás antitest és a pirossal (TRITC) jelölt monoklonális TG2 antitest megfelelő szűrők alkalmazásával együttesen sárga jelként mutatkozott (8. ábra). Hasonló

vizsgálati eredményt kaptunk a másik klasszikus EMA szubsztrát, a humán köldökzsínór alkalmazásakor is (8. ábra és Sulkanen és mtsai 1998), valamint humán vékonybél metszeteken is (anti-jejunum ellenanyag, JEA kimutatás). Ezzel igazolható volt, hogy TG2 jelen van a korábban ismert immunreakcióknak megfelelő extracelluláris kötődési helyeken, valamint jelentős mennyiségű TG2-t mutattunk ki Wharton-kocsonyából izolált köldökzsínór eredetű fibroblaszt jellegű mesenchymális sejtek citoplazmájában is. A fibroblasztok magas coeliakia antigén tartalma már régen ismert volt (Mäki 1995).



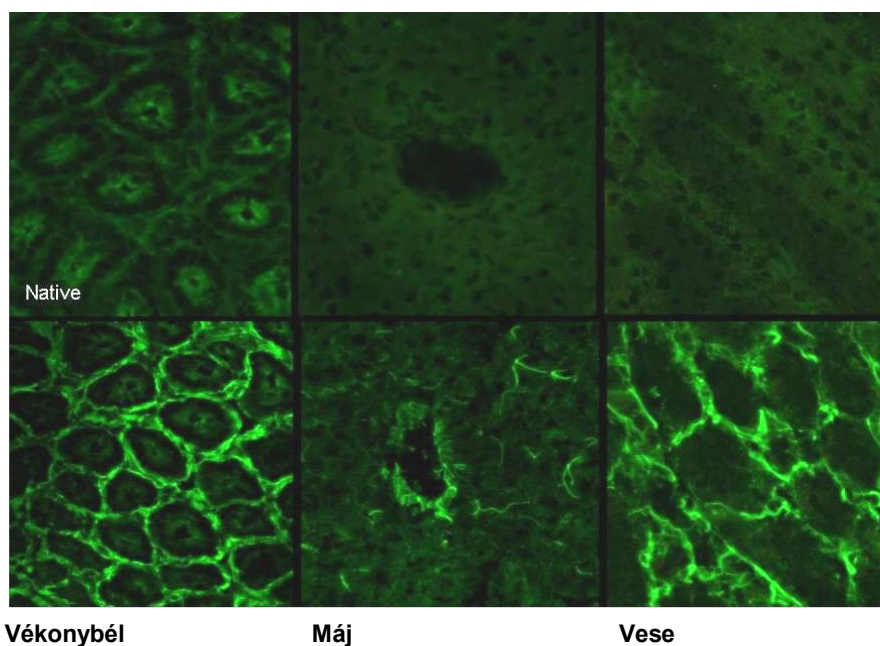
8. ábra. Coeliakia antitestek (zöld) és monoklonális CUB7402 anti-TG2 antitest (piros) kötődése majom nyelőcső, patkány máj és vese (felső sor) illetve humán jejunum, köldökzsínór metszetekhez és tenyésztett fibroblaszt sejtekhez (alsó sor). A sárga képek a coeliakiás autoantigén és a TG2 azonos lokalizációját mutatják a zöld és piros kép kombinációja esetén.

A TG2 célpont szerepének igazolására a szövetmetszetekből a TG2-t kálium-tiocianáttal (KSCN) kioldottuk; az így előkezelt metszeteken sem a monoklonális, sem a coeliakiás antitestek nem mutattak kötődést. A KSCN a fibronectin-TG2 kötődést választja szét (Upchurch és mtsai 1991), és ezzel kimutattuk, hogy az extracelluláris térben a TG2 a fibronectinhez lehorgonyozva található. A TG2 antigén szerepét azzal is bizonyítani lehetett, hogy ha a KSCN-nel előkezelt metszetekhez tengerimalac májból tisztított TG2 készítményt adtunk, ezzel az coeliakia antigén is helyreállítható volt (9. ábra).



9. ábra. A coeliakiás IgA antitestek (zöld) kötődnek natív majom nyelőcső metszethez (A), nem kötődnek a TG2 eltávolítása (KSCN kezelés) után (B), kötődnek KSCN után tisztított tengerimalac TG2-t hozzáadva (C)

A betegsavók endomysium, reticulin és jejunalis antitest kötődéséért további vizsgálataink szerint (Korponay-Szabó 2003a) más antitestek nem voltak felelősek, mert TG2 hiányos (TG2^{-/-}) egerek szövetmetszeteihez a vizsgált 101 betegmintából (61 coeliakiás, 40 dermatitis herpetiformisban szenvedő beteg mintája) egy sem kötődött a jellegzetes mintázatban (10. ábra). Kimutathatók voltak viszont aktin elleni antitestek, melyek nem függtek össze a jellegzetes endomysium reakcióval. Az endomysium, reticulin és jejunalis antitest-kötődés egyaránt helyreállítható volt, ha a TG2^{-/-} egér metszeteket előzetesen humán rekombináns TG2 fehérjével inkubáltuk, és ezzel a TG2 antigént mesterségesen rákötöttük az endomysium felszínére.



10. ábra. TG2 hiányos (TG2^{-/-}) egér szövetei (felső sor) nem tartalmazzák a coeliakiás IgA antitestek (zöld) kötődéséhez szükséges antigént. A kötődés azonban a szövetmetszetek humán rekombináns TG2 fehérjével történő előkezelése (fibronectinre való rákötése) után ugyanazokkal a savókkal létrehozható.

A TG2^{-/-} szövetek normál mennyiségben tartalmaztak fibronectint, vagyis ezzel igazolni lehetett, hogy nem a fibronectin az endomysium antigén. A vizsgálatoknál nemcsak IgA, hanem IgG coeliakiás antitestekkel (IgA hiányos coeliakiás betegek mintái) is hasonló eredmény adódott.

A vizsgálatok arra is rámutattak, hogy a rágcsáló TG2 antigén nem annyira megfelelő antigén, mint a humán TG2, mert a normál kontroll (vad) egér szöveteihez a vizsgált 101 betegmintából csak 96 tudott kötődni, míg az TG2^{-/-} egér szövetekhez hozzáadott humán TG2 fehérjét mind felismerte. A vizsgálatoknál a rekombináns TG2 mellett természetes, vörösvérsejtekből preparált humán TG2 alkalmazásával is azonos eredményeket kaptunk. Ezzel igazolható volt, hogy a coeliakiás betegsavókra jellemző endomysium, reticulin és jejunalis antigén kötődésért azonos, TG2 elleni antitestek a felelősek, és ezek a kimutatási módszerek ekvivalensnek tekinthetők.

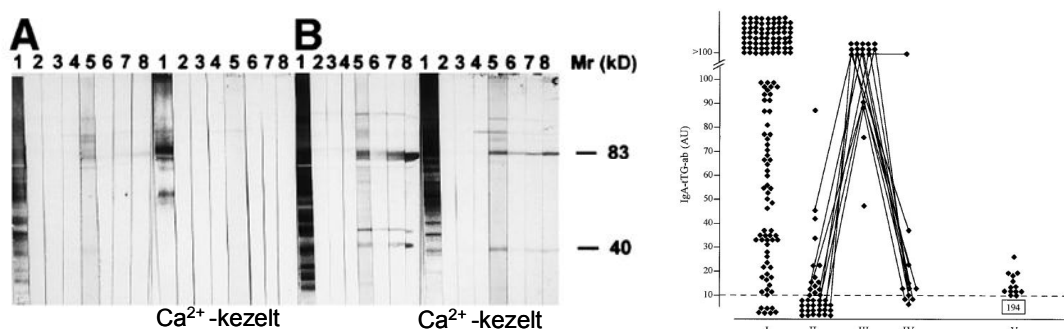
5.2. Transzglutamináz-alapú diagnosztikus antitest vizsgálatok kifejlesztése és értékelése

5.2.1. Diagnosztikusan alkalmazható ELISA teszt kifejlesztése tengerimalac TG2 antigénnel

Sulkanen S, Halttunen T, Laurila K, Kolho K-L, Korponay-Szabó IR, Sarnesto A, Savilahti E, Collin P, Mäki M. Tissue transglutaminase autoantibody enzyme-linked immunosorbent assay in detecting celiac disease. *Gastroenterology* 1998;115:1322-1328.

Bár a TG2 jelentős antigén szerepét az immunhisztokémiai vizsgálatok alátámasztották, klinikai alkalmazásának felmérésekor kezdetben ellentmondásos eredmények születtek. Ezért szükségesnek mutatkozott annak tanulmányozása, hogy milyen feltételek között legjobb a coeliakia antitestek reakciója a TG2 antigénnel, és ezt alapul véve hogyan lehet a klinikai diagnosztikában is alkalmazható ELISA eljárást kifejleszteni.

A transzglutamináz antigén szerepét eredetileg Dieterich és munkatársai immunprecipitációs és immunblot eljárással fedezték fel (Dieterich és mtsai 1997). Az általuk leírt, tengerimalac májból tisztított TG2 (Sigma) antigént tartalmazó konvencionális ELISA magasabb eredményeket mutatott coeliakiás betegektől származó savómintákban, mint a kontrollokban. Amikor azonban ezt a módszert nagyobb számú betegen értékeltük, az eredmények nem bizonyultak specifikusnak: hasonló különbséget mértünk a coeliakiás és a nem beteg csoport között akkor is, ha nem is volt TG2 antigén az ELISA lemezre kötve. Ez valószínűleg abból adódott, hogy a coeliakiás betegekből származó IgA kóros, könnyebben tapad magához a felülethez vagy a blokkoláshoz használt bovin szérum albuminhoz. A coeliakiás betegekből többsége immunblot eljárásnál sem reagált a TG2-vel, míg azonos körülmények között TG2-specifikus monoklonális antitestekkel (CUB7402, TG100) jó reakciót kaptunk. Mivel a szokványos immunblot eljárás során az antigén fehérje denaturálódik és oxidálódik, az eredmények arra utaltak, hogy a TG2 intakt térszerkezete fontos lehet a coeliakiás antitestek számára az antigénhez való kötődésben. Ennek alapján a blot vizsgálatot redukáló és nem denaturáló körülmények között végezve sokkal jobb jelet kaptunk, mely tovább fokozható volt, ha kalciumot is adtunk a vizsgálathoz (11. ábra).



11. ábra. Monoklonális CUB7402 (1), nem coeliakiás kontroll (2-4) és coeliakiás (5-8) IgA antitestek kötődése tengerimalac TG2 antigénhez (78kD) nem redukáló (A) és redukáló (B) módon végzett immunblot vizsgálatnál és ELISA vizsgálatnál (jobb panel). I: kezeletlen, II,IV: kezelt, III: glutenterhelésnél vizsgált coeliakiás, V: kontroll betegek

A TG2 az aktív enzimkonformációt csak kalcium jelenlétében veszi fel, és így sokkal jobb antigénnek bizonyult a betegsavók számára. A kalciummal aktivált TG2 antigénnel az ELISA vizsgálatban is jelentősen magasabb és specifikus jelet észleltünk, és a diagnosztikus vizsgálatokban az így végzett ELISA a coeliakiás betegek 95%-át felismerte, míg a kontrollok közül csak 6% volt pozitív (5. táblázat). A kalcium szerepét az a kísérlet is bizonyította, melynek során kimutattuk, hogy coeliakiás savók kötődését a TG2 antigént tartalmazó ELISA lemezhez a kalciummal aktivált oldott TG2 jelenlétében jól lehetett blokkolni, de ugyanezt a gátló hatást csak tízszeres mennyiségű kalciummal nem aktivált TG2 hozzáadásával lehetett elérni.

5. táblázat. Kalciummal aktivált tengerimalac TG2 antigénnel végzett ELISA és a hagyományos antitest vizsgálati eljárások diagnosztikus hatékonyságának összehasonlítása 136 coeliakiás és 207 normál vékonybél szerkezettel rendelkező kontroll beteg savójának alkalmazásával

	anti-TG2 IgA	EMA IgA	ARA IgA	anti-gliadin IgA	anti-gliadin IgG
Szenzitivitás (%)	95	93	92	85	69
Specifititás (%)	92	99.5	96	82	63

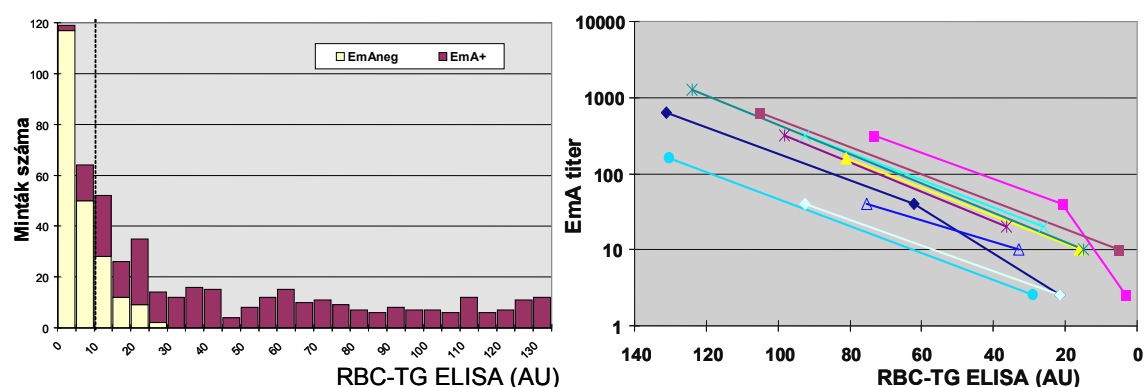
A kalcium jelenlétében végzett IgA ELISA diagnosztikus effektivitása a vizsgált 136 coeliakiás betegben és 207 kontroll betegben ugyanolyan magas volt (5. táblázat). A TG2-ELISA eredmények jelentősen kedvezőbbek voltak, mint a gliadin antitest eredmények. A TG2 antitestek titere párhuzamosan változott az EMA titerekkel, és mindkettő jól követte a kezeltségi állapotot, azaz csökkent a glutenmentes diéta mellett, de újra emelkedett glutenterhelés során (11. ábra). A közleményben leírt módszerrel később számos független munkacsoport végzett hasonló méréseket, melyek az IgA TG2-ELISA jó klinikai használhatóságát alátámasztották. Mindaddig a gliadin antitest ELISA kimutatást tartották a technikailag legnagyobb hatékonysággal végezhető eljárásnak, amely azonban mégsem adott kellően hasznosítható eredményeket. A TG2 alapú ELISA bevezetése megnyitotta az utat a coeliakia diagnosztika decentralizálása és a nagy léptékű szűrővizsgálatok előtt.

A kezdeti vizsgálatoknál csak az IgA antitestek kimutatása volt hatékony; az IgG mérése nem működött megfelelően. A coeliakiás és kontroll betegeket nem lehetett elkülöníteni és az IgA hiányos betegeknek csupán egy része adott emelkedett (bár igen magas) értékeket. Mint később kiderült, ennek az volt az oka, hogy 100 U megadására használt coeliakiás standard (pozitív kontroll, melyet a Helsinki Egyetem bocsátott rendelkezésre és felnőtt betegek savójának keveréke volt) alig tartalmazott IgG anti-TG2 antitesteket. A másik ok valószínűleg az volt, hogy kezdetben csak a Sigma által készített TG2 állt rendelkezésre, mely csupán 70% tisztaságú, TG2 mellett más májfehérjéket is tartalmaz. A humán savókban gyakoriak a kötőszöveti fehérjékkel reagáló IgG antitestek, melyek a kontrollokban is magas háttérrel okozhattak.

5.2.2. Természetes humán TG2 antigén alkalmazása a diagnosztikus vizsgálatokban

Korponay-Szabó IR, Halttunen T, Lőrincz M, Szalai Zs, B.Kovács J, Mäki M. Transzglutaminase-alapú coeliakia diagnosztikus vizsgálatok hazai eredményei. *Gyermekegyógyászat* 2001;52:254-259

A tengerimalac TG2 kiváló, de nem tökéletes antigén volt a coeliakiás TG2 antitestek kimutatására, főként a rágcsáló és a humán TG2 közötti epitóp különbségek miatt (Korponay-Szabó és mtsai 2003a), de azért is, mert a kereskedelmi forgalomban kapható készítmények nem voltak elég tiszták, más kötőszöveti fehérjéket is tartalmaztak. Az ebből adódó nonspecifikus háttérreakciók számos betegségben gyakoriak voltak (Shamaly és mtsai 2007). A természetes humán TG2 nagy mennyiségben jelen van az emberi vörösvérsejtekben is (Bergamini és mtsai 1999), amelyekből egyszerű hemolízissel felszabadítható, olcsón előállítható. Véradók vörösvérsejtjeiből preparált TG2 felhasználásával végzett ELISA vizsgálataink ugyanolyan jó diagnosztikus hatásfokot mutattak, mint korábban a tisztított tengerimalac TG2 antigénnel végzett vizsgálatok és lényeges reagensköltség nélkül hazai keretek között is nagy méretekben alkalmazhatók voltak. Előzetes optimalizálást követően egy olyan szendvics ELISA vizsgálatot találtunk a legmegfelelőbbnek, melyben a TG2 antigént monoklonális anti-TG2 vagy humán IgG anti-TG2 (IgA hiányos coeliakiás betegből származó antitest) segítségével kötöttük rá az ELISA lapra, mely egy további tisztítási lépést jelent. Ezzel a módszerrel 2000.01.01-12.31 között egymást követően vizsgált 670 gluten-érzékeny beteg összesen 957 savómintájából végeztünk párhuzamosan IgA EMA és anti-TG2 antitestmérést. 261 mintát a kezletlen állapotban, 696 mintát változó hosszúságú diéta után vizsgáltunk. A két módszer pozitivitása közötti egyezés 90% volt, a kezelt (diétázó) eseteket is figyelembe véve, ahol az alacsony antitest szintek gyakoriak voltak (12. ábra). Anti-TG2 antitest a minták 58.5%-ában, EMA a minták 53.7%-ában volt kimutatható, a mennyiség meghatározás jól korreláló értékeket mutatott. Az anti-TG2 antitest érzékenyebben jelezte a diétahibákat, mint az EMA vizsgálat.



12. ábra. Természetes vörösvérsejt transzglutaminázzal (RBC-TG) végzett ELISA eredmények és az EMA pozitívak hányadának összehasonlítása 507 betegnél (bal panel) és az értékek alakulása glutenmentes diéta mellett (jobb panel). Azonos beteg mintáiban (azonos színnel jelölve) az antitestek csökkenése párhuzamos volt a kezdeti és a későbbi időpontokban

A vörösvérsejt TG2 megkötésére alkalmazott IgG TG2 alsó capture antitest miatt ez a vizsgálati rendszer nem volt alkalmas az IgG TG2 antitestek direkt mérésére. Ezért az IgG

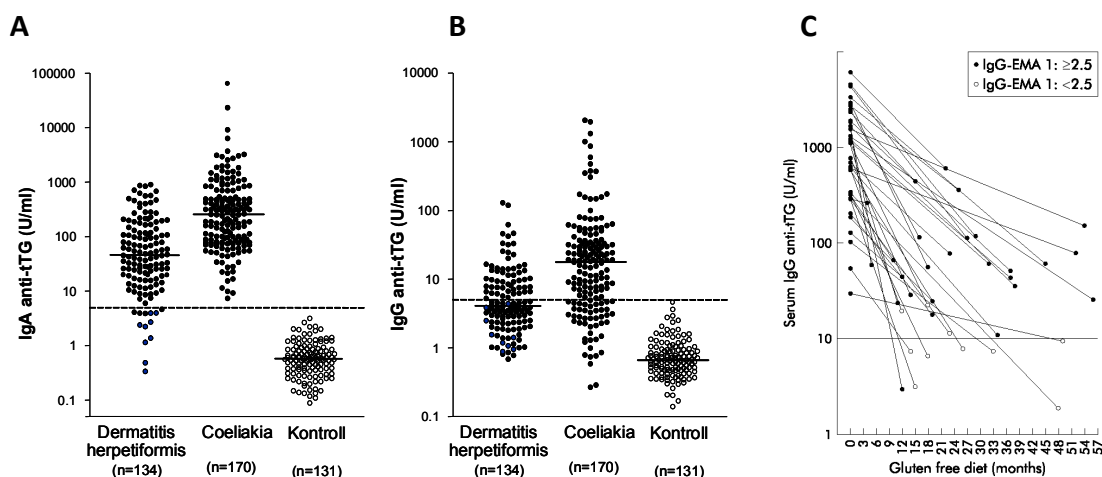
TG2 antitestek detektálását az IgA hiányos betegeknél kompetíciós vizsgálattal végeztük, és egy indikátor IgA TG2 antitest leszorítását mértük a vizsgálni kívánt betegsavó hozzáadása után. Az IgA hiányos coeliakiás betegek ezzel a módszerrel 97% hatékonysággal felismerhetők voltak akár vörösvérsejt TG2 antigént használtunk, akár rekombináns TG2-t (2. melléklet S4. ábra). A kiegészítő mérések arra utaltak, hogy egyes betegeknél a leszorítás mértékéért nem az IgG TG2, hanem IgM osztályú TG2 antitest volt a felelős.

5.2.3 Rekombináns humán TG2 antigén alkalmazása és az IgG anti-TG2 antitestek mérése IgA hiányos személyeknél

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. Gut 2003;52:1567-1571.

Dahlbom I, Korponay-Szabó IR (megosztott első szerző), 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. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2010 Feb;50(2):140-6.

A molekuláris biológiai módszerekkel gyártott rekombináns humán TG2 fehérjéből nagy tisztaságú készítmények állíthatók elő és alkalmazhatók az ELISA vizsgálatokban (Ambrus és Fésüs 2001), ezért joggal remélhető volt, hogy ezek az IgG anti-TG2 antitestek direkt mérésére is alkalmasak lesznek. A Pharmacia cég (Phadia) TG2 ELISA kitjeivel végeztünk méréseket kezdetben 170 normál IgA szintű coeliakiás és 131 kontroll betegnél, ahol a két betegcsoport teljesen elkülönült, és a különbség az IgG antitesteknél is mérhető volt (13. ábra). A vizsgálatban 134 dermatitis herpetiformisban szenvedő beteg is részt vett, akiknek a coeliakiásoknál alacsonyabb anti-TG2 szintje volt, gyakori IgG anti-TG2 negativitással.



13. ábra. Humán rekombináns TG2 antigénnel végzett ELISA normál IgA szintű betegeknél IgA (A) és IgG (B) antitestek kimutatására. C. IgA hiányos coeliakiás betegek kezdeti és diéta után IgG anti-TG2 antitest szintje azonos módszerrel mérve.

A biztató eredmények alapján vizsgálatainkat kiterjesztettük 325 IgA hiányos betegre is, akik közül 78 IgA hiányos coeliakiás beteg, 73 IgA hiányos vagy alacsony szérum IgA szintű nem coeliakiás klinikai beteg, 174 pedig IgA hiányos véradó volt (Korponay-Szabó és mtsai 2003b). A klinikai betegek az enterális tüneteket illetően nem különböztek a coeliakiás

betegektől és emiatt jelentős részükénél (63%) klinikai indikációval vékonybélbiopszia is történt, amely azonban coeliakiát nem igazolt. A 78 coeliakiás beteg közül 76-nál (97.4%) lehetett IgG EMA-t, 77-nél pedig IgG TG2 antitestet kimutatni (98.7%), míg az összes kontrollnál az IgG EMA negatív volt. Az IgG TG2 antitest vizsgálat specifitása 98.6% volt. A coeliakiás betegekénél az IgG EMA több évig perzisztált a glutenmentes diéta elkezdése után, az IgG TG2 antitest quantitativ mérésével azonban az antitest szintek csökkenése az idő függvényében jól kimutatható volt (13. ábra).

Az alkalmazott IgG TG2-ELISA az IgA hiányos finn véradók (n=174) között is hatékonyan felismerte az IgG EMA pozitív eseteket, vagyis populációsűrésre is alkalmasnak bizonyult.

5.2.4. A humán transzglutamináz alapú ELISA antitest kimutatás és a szövettani értékelés összehasonlítása

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. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2005;17:85-91.

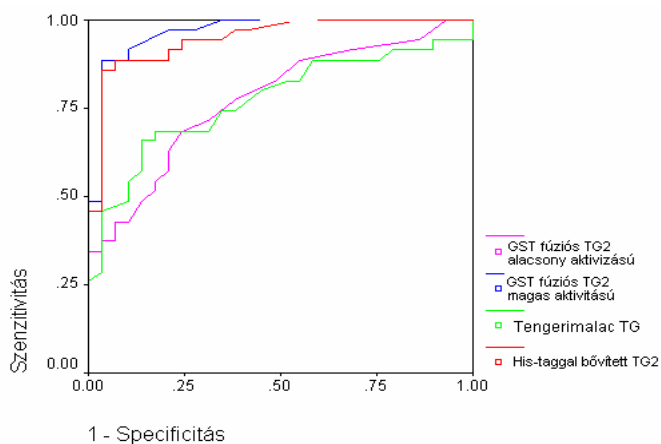
A coeliakia diagnosztikában rövid idő alatt számos különböző TG2 antigént tartalmazó gyári kit jelent meg; a többségnél humán rekombináns antigént alkalmaztak. Ennek ellenére a kapott eredmények a különböző tanulmányokban nagy szórást mutattak, melynek számos oka lehetett. Az egyik nyilvánvaló ok az alkalmazott antigének különbözősége vagy különböző minősége volt, a másik az is lehetett, hogy a klinikai és szövettani értékelést gyakran nem függetlenül végezték. Annak elbírálására, hogy a TG2 antitest megbízhatósága összemérhető-e a szövettani vizsgálat megbízhatóságával, multicentrikus vizsgálat részeként Európa 9 országából, 13 klinikai centrumból származó savó és szövetmintákat értékeltünk. Az EMA és TG2 antitest mérését, valamint a hisztológiai értékelést egymástól függetlenül, a klinikai körülményeket illetve a szerológiai leleteket nem ismerve végeztük 271 beteg (144 coeliakiás és 127 különböző emésztőszervi tünetekkel jelentkezett kontroll beteg) eredeti vékonybél szövettani metszetei alapján és a TG2 antitestnek a Celikey™ (Pharmacia) ELISA kittel történő mérésével. A szövettani metszeteket a klinikai diagnózist nem ismerő vizsgálók értékelték és sorolták be coeliakia és nem coeliakia csoportba, a boholy/kripta arány morfológiai meghatározása és az intraepiteliális limfocitaszám mérése alapján. Az így képzett csoportokban az EMA pozitivitás szenzitivitása 89%, a TG2 antitest ELISA szenzitivitása 94% volt. Az EMA 98%, az TG2 antitest ELISA 99% specifitást mutatott. A tanulmány során mindkét antitest eredmény megbízhatóbbnak adódott, mint a helyi szövettani eredmények, mert a szövettani metszetek rossz minősége miatt a betegek 10.7%-át nem lehetett megfelelően besorolni egyik csoportba sem. Ennek oka elsősorban a metszetek rossz orientációja vagy sérült volta volt. A tanulmány felhívta a figyelmet a szövettani értékelés buktatóira is, valamint arra, hogy a pusztán morfológiai alapon végzett értékelés nem mindig helytálló, és ezért a coeliakia diagnosztikájában nem lehet egyedül

meghatározó. Az első, a beküldő klinikusok által felállított diagnózis és a második, vakon értékelt szövettani diagnózis a 271 beteg közül 9-nél eltért egymástól, azonban az antitest eredmények jobban korreláltak a klinikai kimenetellel, mint a kezdeti szövettani eredmény.

5.2.5. A transzglutamináz antigén szerkezetének hatása a coeliakiás autoantitestek mérésének hatékonyságára

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.

A szövettani leletek és a TG2 antitest mérési eredmények eltérése klinikailag főként akkor jelentős, ha a vékonybélben észlelhető szövettani károsodások ellenére nem mérhetők a vérben TG2-specifikus antitestek. 40 EMA pozitív és 20 EMA negatív savóminta 5 különböző TG2 antigénnel végzett összehasonlító ELISA méréseivel megállapítottuk, hogy a TG2 intakt térszerkezete szükséges a specifikus antitest kötődés érzékeny méréséhez, melyet az eredmények ROC analízise is alátámasztott. Jó antigénnek bizonyult a természetes eredetű vörösvérsejt TG2 valamint az a két rekombináns TG2 fehérje, melynek magas keresztkötő enzimaktivitása és jó térszerkezete volt. A termelt rekombináns fehérjék egy része csak alacsony enzimaktivitással rendelkezett és ezek sokkal kevésbé érzékeny és specifikus antigének voltak. A legalacsonyabb érzékenysége a tengerimalac TG2 antigénnek volt, ezzel mind a kezeletlen, mind a kezelt betegek mintáiban rosszabb hatásfokkal lehetett a TG2 antitesteket kimutatni (14. ábra).



14. ábra. Különböző TG2 antigénnel végzett anti-TG2 IgA ELISA vizsgálati eredmények analízise 40 EMA pozitív és 20 EMA negatív savóminta alapján receiver operated characteristics curve (ROC) segítségével.

5.2.6. A beteg saját TG2 autoantigénjének felhasználása neminvazív diagnosztikus eljárások tervezésére

Mäki M, Korponay-Szabó IR. Method and means for detecting gluten-induced diseases. PCT/FI02/00340 WO02/086509 A19, közzététel 2001, USA szabadalom 7,361,480 B2, Európai szabadalom EP 1 390 753 B1

Az emberi vörösvérsejtekben található természetes TG2 igen jó antigén a TG2-specifikus antitestek kimutatására. Bár *in vivo* körülmények között a plazmában keringő antitestek nem tudnak a vörösvérsejtek belsejében lévő TG2 autoantigénhez kötődni (hemolízis

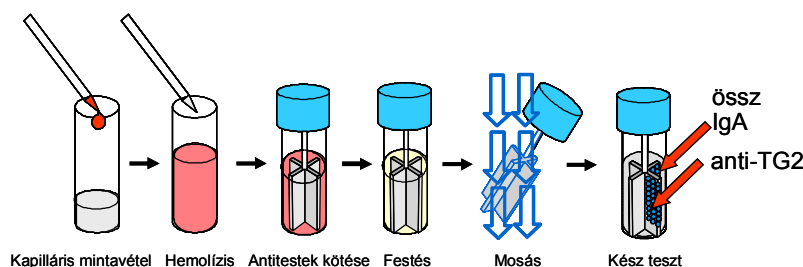
általában nem szerepel a coeliakia tünetei között), laboratóriumi vérmintákból a TG2 antigén könnyen felszabadítható fagyasztással vagy ozmótikusan aktív oldatokkal, detergenssekkel. ELISA mérésekkel kimutattuk, hogy kapilláris vérmintákban (10-20 µl) is elegendő TG2 van ahhoz, hogy azzal mérhető jelet kapjunk, ha a beteg plazmájában anti-TG2 antitestek mutathatók ki. Csak a hematokrit érték étellel össze nem egyeztethető mértékű csökkenése esetén csökkent a TG2 mennyisége kritikus érték alá. A vörösvérsejt TG2 antigén a rekombináns fehérjékhez képest relative sokkal stabilabb volt, és jó antigén sajátosságát a mérések alatt is végig megtartotta. A módszer optimalizálásához a vörösvérsejt TG2-autoantitest komplexek kimutatására különféle capture rendszereket próbáltunk ki, hogy a komplexeket olyan felülethez kössük, ahol színreakcióval kimutathatók. Erre TG2-specifikus antitesteket vagy más, TG2-t megkötni képest fehérjepartnereket (heparin, fibronectin, gelatin) találtunk alkalmasnak, melyekkel specifikus jelet kaptunk, ha a plazmában volt TG2 antitest. Az eredmények jól korreláltak a korábban már bevált szendvics ELISA mintájára végzett méréssel, amikor a vörösvérsejt TG2 antigént és a plazmamintát egymást követően adtuk a mérési rendszerhez. Az egylépcsős kimutatási módszer, melyben a hemolízis során keletkezett TG2-antitest komplexet közvetlenül mutattuk ki színreakcióval, alkalmasnak bizonyult mind IgA, mind IgG TG2-specifikus antitestek mérésére. A vizsgálati eljárásra európai és USA szabadalmat kaptunk, az eljárás kereskedelmi alkalmazásra került.

5.2.7. Ágymelletti gyors teszt kifejlesztése a coeliakia antitestek kimutatására

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 monitoring by point-of-care testing. *Aliment Pharmacol Ther.* 2005;22:729-37.

A beteg vérmintájában lévő vörösvérsejt TG2-t az egylépcsős TG2 antitest kimutatási módszer segítségével diagnosztikus gyors teszt létrehozására használtuk fel. A TG2 alapú laboratóriumi antitestkimutatás, széles elterjedtsége ellenére, időigényes, drága, és az eredmények nem állnak azonnal az orvos rendelkezésére. Gyakran a vérmintákat speciális laboratóriumokba kell küldeni. A klinikai diagnosztikában, különösen a súlyos állapotú betegeknel, gyors döntésekre van szükség. Jóllehet a coeliakia krónikus állapot, számos más, súlyos betegséget utánozhat. Ha coeliakiáról van szó, más irányú költséges vagy invazív vizsgálatok feleslegesek; a beteget megkímélhetjük ezektől, ha gyorsan rendelkezésre áll a coeliakia autoantitest pozitív eredmény. Ugyancsak fontos a gyors információ az antitestek kimutathatóságáról a diéta ellenőrzése során, hogy a compliance-ről a beteggel érdemi megbeszélést lehessen folytatni és intervencióval a diétahibák csökkentését elérjük. A gyors antitest kimutatási kezdetben a Nunc-Immunostick (Nunc) alkalmazásával történt, mely az ELISA lapokhoz hasonló Maxisorp® felülettel rendelkezik és kereskedelmi forgalomban beszerezhető. A stick felületéhez kötöttük a TG2 antigént megkötni proteint, és ezt inkubáltuk a beteg hemolizált vérmintájával. Az eljárás mindössze egy, csapvízzel történő

mosást igényelt (a színreakció elindítása előtt), azaz laboratóriumi feltételek nélkül is végrehajtható volt mintegy 10-15 perc alatt (15. ábra).



15. ábra. A Nunc Immunostick-kel végzett gyors anti-TG2 kimutatás lépései. A teszt 10-15 perc alatt specifikus coeliakia antitestet és plazma össz IgA-t mutat ki.

A színreakció specifikus volt és TG2 függő. Igazoltuk, hogy a coeliakiás vérminták nem adnak reakciót, ha nincs TG2 jelen, pl. a savókat TG2/- egér vörösvérsejtjeivel keverjük össze. Ugyanebben a rendszerben a vad (TG2+/+) egér vörösvérsejtjei viszont elegendő antigénnek bizonyultak az antitestek kimutatására. A Nunc-Immunostick felülettel végzett gyors teszt 99 kezeletlen coeliakiás beteg és 65 nem coeliakiás, ép vékonybél szerkezettel rendelkező kontroll klinikai beteg fagyasztva tárolt archív vérmintáiban 97% szenzitivitással és 96.9% specificitással ismerte fel a coeliakiás betegeket, és az eredményeket 94%-ban, azaz megbízhatóan reprodukálni lehetett. Az interobserver variáció alacsony volt és a vérminták még több éves tárolás (-20°C) után is megfelelő színreakciót adtak.

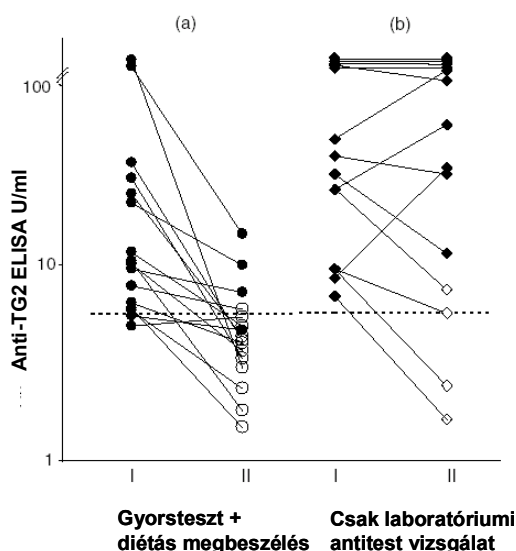
5.2.8. A Nunc-Immunostickbe épített első gyors teszt klinikai felhasználása

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 monitoring by point-of-care testing. *Aliment Pharmacol Ther.* 2005;22:729-37.

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. *Dig Liver Dis.* 2007;39:1057-63.

A gyors teszt klinikai felhasználásához még egy adatra volt szükség: a beteg össz IgA szintjének ismeretére, hogy ennek mérésére ne legyen szükség további laboratóriumi vizsgálatokra. Mivel az első gyors teszt csak IgA antitesteket mutatott ki, az IgA hiány felderítése minden negatív eredmény esetén fontos volt. Ezért a Nunc-Immunostick 4 szárnyát úgy használtuk fel, hogy ebből kettő a TG2-antitest komplexeket kösse meg, egy legyen egy üres negatív kontroll vonal és egyet pedig anti-IgA reagenssel vontunk be a normál plazma IgA kimutatására (15. ábra). Ezzel a módszerrel elkülöníthetők voltak negatív TG2 antitest eredmény esetén a normál IgA szintű és IgA hiányos vérminták. Az eljárás klinikai tesztelését 165 prospektíven vizsgált új betegnél és 263 ismert coeliakiás, glutenmentes diétát folytató betegnél végeztük. A gyors tesztet az orvos vagy nővér a betegvizsgálat idején, helyszíni „point-of-care” tesztként (POCT) végezte el. A 165 új beteg közül 120-nál került sor vékonybél szövettani vizsgálatra. A POCT 97.4% szenzitivitással és

97.6% specificitással ismerte fel a coeliakiában szenvedőket már az első (helyszíni) vizsgálat során, valamint egy betegnél kimutatta azt, hogy IgA hiányos. A diétázó betegeknél is magas egyezést mutattak a POCT eredmények az ugyanakkor levett vérmintákból mért EMA és laboratóriumi TG2 ELISA meghatározással (93% és 92%). Az EMA és TG2-ELISA mérési eredmények egymással 95%-ben egyeztek; mindhárom eredmény megegyezően pozitív vagy negatív volt a minták 91%-ában. A POCT hatásosan kimutatta a diétahibákat, és ennek tudatában azonnal diétás konzultációt folytattunk a betegekkal és visszarendeltük őket 3-6 hónap múlva kontrollvizsgálatra. Az így ellátott betegeknél a visszarendeléskor minden esetben a szérum TG2-ELISA értékek csökkenését regisztráltuk (16. ábra) és 75%-uknál a POCT a visszarendeléskor már negatív volt. Összehasonlítva az eredményeket egy olyan csoporttal, ahol diétahiba esetén nem volt POCT ellenőrzés és megbeszélés, az intervenció nélküli csoportban a második vizsgálatnál a TG2-ELISA eredmények nem mutattak csökkenést és negatív POCT reakció is csak 28.6%-ban adódott.



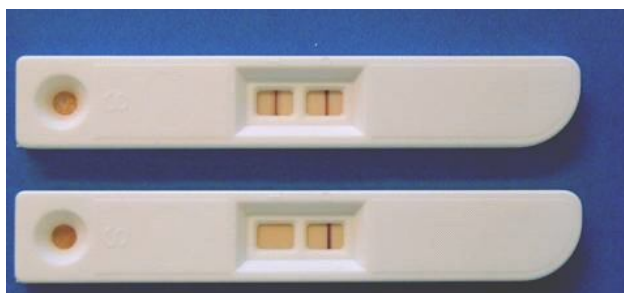
16. ábra. A coeliakiás betegek diétás magatartásának alakulása az I. időpontban végzett POCT, diétás tanácsadás és laboratóriumi vizsgálatok (a) vagy csak laboratóriumi antitest vizsgálatok (b) elrendelése esetén

Vizsgáltuk még a helyszíni teszt értékét olyan felnőtt coeliakiás betegeken is, akiknél a hagyományos szerológiai vizsgálatok közül egy vagy több negatív volt. Az EMA alacsony szenzitivitása (80%) mellett azonban a beteg saját TG2 antigénjével végzett kimutatás néhány esetben mégis kimutatta az anti-TG2 antitestek jelenlétét (szenzitivitás 82%), bár a laboratóriumi anti-TG2 meghatározás érzékenyebb volt (88%).

5.2.9. Kereskedelmi coeliakia gyorseszt működésének értékelése klinikai betegeken, klinikai döntéshozatal támogatás

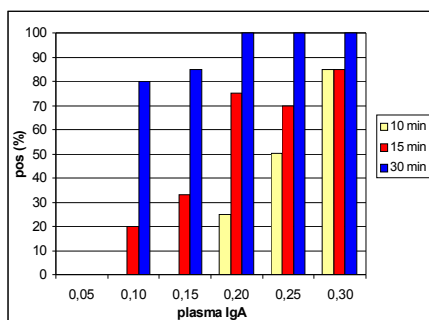
A gyorseszt használatának további egyszerűsítésére lateral flow eljárásan alapuló immun-kromatográfiás teszt (Biocard Celiac Disease Test, Ani-Biotech, Vantaa, Finnország) került kifejlesztésre, amely még a Nunc-Immunostickhez képest is egyszerűbben kezelhető. A

további vizsgálatokat ezzel végeztük. A vérmintákat egy 10 µl kapacitású kapillárisba ujjbegyből vettük, a mellékelt pufferben hemolizáltuk, majd a teszt kazettán baloldalt elhelyezkedő vájulatba cseppentettük. A kazettában a vérminta a kapilláris erő hatására oldalirányban halad. Ha a vérben van TG2 antitest, akkor az a hemolízis során felszabadult saját TG2 antigénnel komplexet képez és reagál a kazettában lévő, kolloidális arannyal jelölt anti-IgA reagenssel. A tovahaladás során a komplexet egy TG2-vel reagáló csík megköti és így a rákötődött IgA és anti-IgA reagens egy lila vonal formájában jelenik meg (teszt vonal). Ha nincs a vérben TG2-specifikus antitest, akkor csak a vörösvérsejt TG2 kötődik meg a vonal mentén, de mivel nincs rajta IgA antitest és anti-IgA reagens, nem látható. A teszt tartalmaz egy disztálisan elhelyezkedő kontroll vonalat is, mely az anti-IgA reagenst közvetlenül köti meg és jelzi, hogy a vérminta megfelelően végighaladt a tesztútvonalon. Az eredmény pozitív, ha mindkét vonal (a bal tesztvonal és a jobb kontroll vonal is) látszik, negatív, ha csak a kontroll vonal látszik és nem értékelhető, ha nincs kontrollvonal (17. ábra).



17. ábra. Biocard Celiac Disease Tesztel végzett coeliakia antitest kimutatás 10 perc után. Felül a pozitív, alul a negatív eredmény. T: tesztvonal (bal), C: kontroll vonal (jobb)

A második generációs Biocard kitben a jobboldali (kontroll) vonal a beteg vérében lévő összes IgA-t ismeri fel, így ugyanúgy alkalmas az IgA hiány felfedezésére, mint a Nunc-Immunostickbe épített kimutatás. Az IgA kimutatás érzékenységét 0-6 hónapos, fiziológiásan alacsony IgA szintű (de nem IgA hiányos) csecsemők (n=68) tesztelésével vizsgáltuk, és azt találtuk, hogy a gyors teszt már a 0.2 g/l körüli szérums IgA értékeknél látható vonalat ad. A halvány reakciók jobban láthatóvá váltak 15-30 perc múlva.



18. ábra. A Biocard Celiac Disease Teszt összes IgA-t is kimutató változatának tesztelése alacsony szérums IgA szintű csecsemőkben. A jobboldali képek 15 perc után készültek.

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. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006;24:147-54.

A Biocard teszt 121 kezeletlen coeliakiás és 107 nem coeliakiás betegnél 96.7% szenzitivitást és 93.5% specificitást mutatott, azaz hasonlóan jól működött, mint a laboratóriumi antitestmérési eljárások és a prototípus gyorseszteszt. Egy év diéta után a kezeletlen állapotban vizsgált 15 coeliakiás beteg közül 13 negatív volt a Biocard tesztrel, a két még pozitív személy pedig határérték TG2-ELISA eredményt mutatott. A vizsgálat második részében prospektív vizsgálatokat végeztünk és a coeliakia felismerését nemcsak a gasztroenterológiai rendelésen tünetekkel jelentkező, hanem a családszűrésre érkező betegekre és a kórházi osztályon fekvő betegekre is kiterjesztettük. Az eredmények hasonlóak voltak az EMA és TG2 antitest eredményekhez (96.7% egyezés), a betegek közül csak a pozitívaknál történt vékonybélbiopszia. A magyarországi vizsgálatokban 211 személyt értékeltünk. Biocard pozitivitás a kifejezett klinikai gyanú miatt érkező betegek 70%-ánál, az egyéb klinikai betegek 31%-ánál és a rizikócsoport (családtagok) 11.5%-ánál volt jelen, mely jól egyezett az EMA és anti-TG2 ELISA eredményekkel. A Biocard pozitív betegeknél elvégzett 47 vékonybélbiopszia 46 esetben súlyos boholyatrófia jelenlétét igazolta (97.8%), egy betegnél enyhe boholykárosodás volt a TG2-specifikus antitest in situ jelenlétével a vékonybélben. A Biocard tesztrel vizsgált csoportban szignifikánsabb rövidebb idő ($p=0.009$) telt el az első jelentkezés és a vékonybélbiopszia elvégzése között, mint az ugyanabban az időszakban csak laboratóriumi értékeléssel kivizsgált újonnan diagnosztizált coeliakiás betegeknél. Az elvégzett egyéb irányú invazív vagy költséges vizsgálatok (colonoscopia, exploratív laparotomia, CR, MR, hormontesztek) száma is kevesebb volt (nem szignifikáns eredmény). Az eredmények azt igazolják, hogy a coeliakia antitestek gyors kimutatása eredményesen alkalmazható a klinikai diagnosztikában. Jelenleg a Biocard gyorseszteszt mind professzionális, mind otthoni használatra kereskedelmi forgalomban van Magyarországon és folyamatosan növekszik az így felderített betegek száma. Egy közelmúltban végzett klinikai felmérés során úgy találtuk, hogy a 2006-2011 között diagnosztizált mintegy 2000 új coeliakiás beteg 9.6%-ánál a Biocard pozitivitás volt az első coeliakiára irányuló vizsgálat, melynek alapján a további kivizsgálást megkezdték (nem publikált adat).

5.2.10. A coeliakia gyorseszteszt alkalmazása szűrővizsgálatokban

A gyorsesztesztek egyszerű kivitelezése, mely laboratóriumi jártasságot nem igényel, szélesíti a coeliakia szerológiai vizsgálatok indikációinak körét és növeli azok potenciálját. A családtagok közül az elsőfokú rokonok kockázata 10% körüli, ezért szűrésük mindenképp indokolt. A szűrés megvalósítása azonban nem mindig könnyű; a kisgyermeket nem szívesen vetik alá vénás vérvételnek, ami gyakran technikailag sem könnyű. A felnőtt családtagok, főként férfiak egy része is idegenkedik a laboratóriumi szűréstől. Másrészt a

2007-ben bevezetett beutalási korlátozások is nehezítik a családszűrés végrehajtását. Vizsgálatainkkal kimutattuk, hogy az ujjbegyből a gyorseszteszt alkalmazásával végzett coeliakia szűrés effektív és megbízható (Raivio és mtsai 2006).

5.2.10.1. A coeliakia előfordulása a magyar gyermekpopulációban

Korponay-Szabó IR, Szabados K, Pusztai J, Uhrin K, Ludmány E, Nemes E, Kaukinen K, apitány 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. *British Medical J.* 2007;335:1244-7.

Ez a tanulmány az első reprezentatív felmérés a coeliakia magyarországi előfordulásáról. Mivel a glutenfogyasztás immunológiai hatásainak kifejlődéséhez idő kell és jelenleg csak az aktív immunfolyamat ismerhető fel megbízhatóan, 6 éves korú gyermekeket vizsgáltunk a kötelező beiskolázási gyermekgyógyászati ellenőrzésnél. A szűrésben Jász-Nagykun-Szolnok megye összes 6 éves korú lakosságának 76%-a, 2676 fő vett részt. A szűrést ujjbegy vérből a helyi védőnők a Biocard Celiac Disease Teszttel végezték; a pozitív eredményű gyermekeknél vékonybélbiopsziával igazoltuk a diagnózist. A védőnők által gyűjtött összes kapilláris vérmintából laboratóriumi EMA és anti-TG2 ELISA (Celikey™) méréssel ellenőriztük a szűrőteszt hatékonyságát és a védőnői értékelés megbízhatóságát.

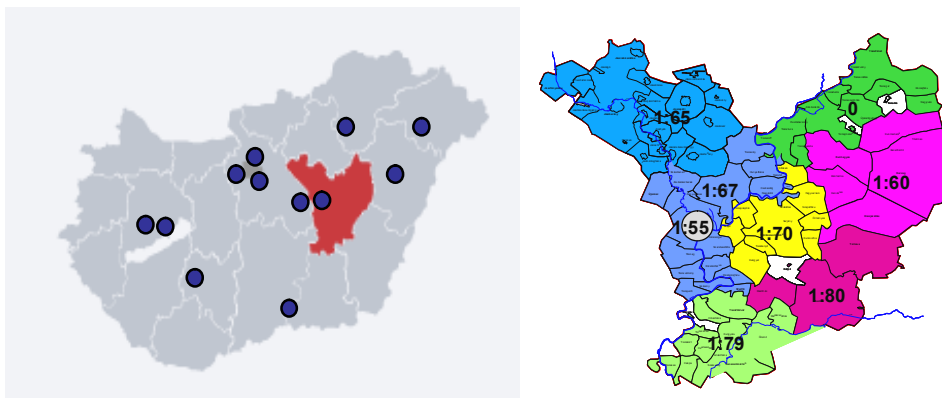
A vizsgálat alapján a vékonybél szövettani vizsgálattal igazolt coeliakia prevalenciája 1.38% (1:73) a 6 éves magyar gyermekeknél, a coeliakia antitest pozitivitás előfordulása 1.79%. Ezek az értékek közel azonosak az 1996-ben végzett sokkal kisebb (n=427) felméréssel (Korponay-Szabó és mtsai 1999), amikor 1:85 előfordulási arányt találtunk 3-5 éves, egészségesnek látszó óvodás gyermek körében szérumból végzett IgA+IgG EMA szűréssel.

A gyorseszteszt működése megfelelő volt és a védőnői értékelés 99.4%-ban egyezett a laboratóriumi eredménnyel, annak ellenére, hogy a védőnők az alacsony antitest koncentrációjú betegek egy részét (14 gyermek) nem ismerték fel. Ez arra hívja fel a figyelmet, hogy a gyorseszteszt megítélése ilyen esetekben bizonyos gyakorlatot igényel (a védőnők ekkor végeztek életükben először antitestkimutatást). Mivel a gyorseszteszt ezeknél halvány reakciót adott és a védőnők a vizsgálati protokollnak megfelelően közvetlenül küldték biopsziára a kiszűrt gyermekeket, az elképzelhető, hogy a halvány reakció esetén nem minden esetben merték ennek a döntésnek a súlyát felvállalni. Az alacsony antitest szintű gyermekek egyharnadánál nem volt boholyatrófia, de a vékonybélben jelen volt a kóros immunreakció (emelkedett gamma-delta IEL, lerakódott coeliakia antitestek).

A populációból kiszűrt coeliakiás gyermekek kisebbek voltak kortársaiknál és egy validált Child Health Questionnaire kérdőív alacsonyabb életminőséget mutatott, mely a kezelés (glutenmentes diéta) hatására javult. Minor tünetek vagy anaemia a kiszűrt gyermekek 85%-ánál észlelhető volt, de ezekkel a szülők még nem fordultak orvoshoz.

A 2005-ös szűrésben alkalmazott első generációs gyorseszteszt csak IgA antitesteket vizsgál. Ennek megfelelően a helyszíni szűrés egy IgA hiányos coeliakiás gyermeknél álnegatív

eredményt adott. Azóta második generációs teszt jelent meg, melynek kontroll vonala a vérben lévő össz IgA-t mutatja ki, így jelzi az IgA hiányos állapotot. Ezzel a második generációs teszttel több, önkormányzatok által szponzorált szűrés történt 2006-2011 között Magyarország néhány településén szintén 6 éves korú gyermekeknél (19. ábra).



19. ábra. A Biocard Celiac Disease Teszt alkalmazásával végzett coeliakia népszerűszűrés Magyarországon. A piros terület a 2005-ös szűrést mutatja, jobboldalt a részletes prevalencia adatokkal.

Ezek a szűrések hasonló, 1.5% körüli prevalenciát állapítottak meg (6. táblázat). Az IgA hiány előfordulása 0.8%-nak adódott, mely az európai értékeknél (1:400) magasabb.

6. táblázat. A Biocard Celiac Disease Teszt alkalmazásával végzett coeliakia népszerűszűrések eredményei

Hely	Év	Szűrés szám	Életkor	Ismert coeliakia	Szűréssel felfedezett	Összesített prevalencia
Jász-Nagy-Szolnok megye	2005	2676	6 évesek	5	33	1.38 %
Helyi alapellátás*	2006- 2011	1846	6 évesek	4	24	1.51 %
Budapest	2010- 2011	2205	15-18 évesek	3	27	1.36 %
Debrecen/ Nyíregyháza	2010- 2011	658	Terhes nők	5	4	1.36 %

*Ajka, Balatonfüred (évente), Budaörs, Háromfa, Kunhegyes, Miskolc, Szolnok város, Pomáz, Újszász, Tiszafüred

5.2.10.2. A coeliakia előfordulása magyar serdülőkben és felnőttekben

2010-ben szűrővizsgálatot indítottunk Budapesten 15-18 éves fiatalok körében a „Tiszta lappal” szűrőprogram keretében. Ennek során 2205 középiskolás fiatalot szűrtünk a Heim Pál Gyermekkorházban. A coeliakia előfordulása 1.36% volt. A felnőtt lakosság szűrése nehezebb, mivel kevés a lakosság ismerete a betegségről és a kampányszerű szűrések esetén a panaszos személyek túljelentkezése miatt a valós értéknél magasabbat mérhetünk. Ezért egy olyan keresztmetszeti vizsgálatot terveztünk, melyekben a szűrésre alkalmas adó egészségügyi ténykedés a panaszoktól független volt és ezért a szűrt népesség válogatás nélkülinek tekinthető. A kötelező terhesgondozáson sorban jelentkező terhes nőket szűrtük

a 32-36. gesztációs hét között Debrecenben és Nyíregyházán 2010-ben. Pozitív esetben a szüléskor megvizsgáltuk a placentát, az újszülött állapotát és az anyai antitestek transzmisszióját, valamint endoszkópos vizsgálatot és vékonybélbiopsziát ajánlottunk fel az anyának. A szűrésben 658 fő vett részt, köztük 4 új coeliakia antitest pozitív anyát (0.6%) találtunk. További 5 ismert, már kezelt coeliakiás beteg szült ugyanebben az időszakban, akinek lakóhelye a vizsgált földrajzi területen van, így a teljes prevalencia hasonló a gyermekekhez és fiatal felnőttekhez (1.36%). A magzatokban szülészeti szövődményt nem találtunk, mindnyájan érett súllyal születtek (a korai terhességi veszteség és a kisebb súlyú koraszülöttek felmérésére a vizsgálat nem alkalmas, mivel a szűrés a 32. héten vagy utána történt). Az újszülöttekbe nem jutottak át az erősen patogén IgA típusú anyai coeliakia antitestek, a köldökszinór vérben azonban változó koncentrációban IgG anyai coeliakia antitestek kimutathatók voltak (5.5.6. fejezet).

5.2.10.3. A coeliakia szűrési stratégia és hatékonyság javítása

A szűrési tapasztalatok alapján úgy látszik, hogy a 6 éves életkor a legalkalmasabb a szűrésre. A kamaszoknál és a felnőtteknél sokkal nehezebb a technikai szervezés és a diéta későbbi betartása. Érdekes módon a népességszűrésnél nemritkán olyanokat szűrtünk ki, akiknek másodfokú vagy távolabbi rokonságában van coeliakia. Ezért a családtagok követésével vizsgáltuk, hogy mely életkorban jelennek meg az anti-TG2 antitestek.

Korponay-Szabó IR, Kapitány A, B Kovács J, Lőrincz M, Opre J, Nemes É, Tumpek J, Sipka S. Is coeliac disease a dominantly inherited disorder? J Pediatr Gastr Nutr 2005;40:638. (absztrakt)

Elsőfokú rokonok vizsgálatával úgy találtuk, hogy a három éves korban végzett szűrés eredménye még nem végleges, 3-6 éves kor között még gyakran jelennek meg addig negatív személyeknél is antitestek, így populációs szinten feltehetően nem érdemes a 6 éves életkornál előbbre hozni általános szűrővizsgálatok tervezését.

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 disease assays. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2008;47:562-7.

A hagyományos szerológiai vizsgálatokra épülő coeliakia szűrővizsgálatok munka- és költségigényesek. A korábban általunk kifejlesztett helyszíni gyorsteszt alkalmazásával a szűrés meggyorsítható, számszerűen mérhető objektív eredmények azonban csökkenthetnék azokat az interpretációs nehézségeket, melyeket az alacsony antitest koncentrációból fakadó halvány tesztvonalak okoznak. Másrészt automatizálható rendszerek elősegítenék nagy átbocsátó képességű mérés létrehozását. Ezért a gyorsteszt elvén működő ELISA eljárást fejlesztettünk ki, mellyel az antitestek teljes vérből automatizált rendszerrel is kvantitatívan mérhetők. Ilyen automaták helyszíni mérésekre felszerelt szűrőkocsikba telepíthetők.

5.3. A coeliakia antitestek *in vivo* kötődésének vizsgálata

5.3.1 Transzglutamináz-specifikus autoantitestek kimutatása a betegek vékonybelében

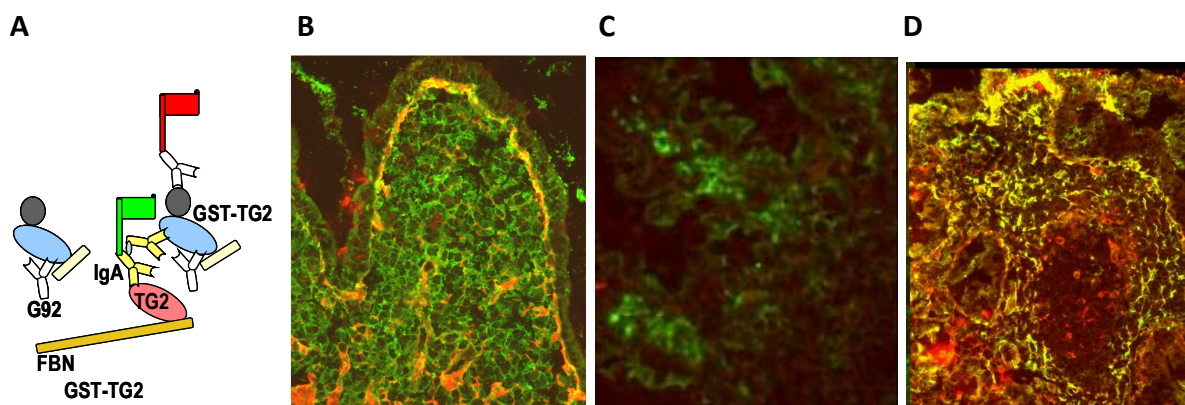
A TG2 enzim a vékonybél extracelluláris matrixában szabadon hozzáférhető, ezért várható volt, hogy magas szérumszintű anti-TG2 mellett, az autoantitestek a TG2 felszínén a betegek szöveteiben is megtalálhatók lesznek. Számos irodalmi adat utalt már a 1970-es évektől arra, hogy a vékonybélben coeliakia illetve dermatitis herpetiformis esetén specifikus IgA lerakódás van (Shiner és mtsai 1972, Kárpáti és mtsai 1988), de ennek autoimmun jellege vitatott volt. Akkoriban az autoantigén még nem volt ismert és csak morfológiai jeleket lehetett értékelni. Nagyfokban nehezítette viszont a megítélést, hogy a kórosan átalakult struktúrájú, atrófiás vékonybél nyálkahártyában észlelhető IgA elrendeződést nem lehetett biztonsággal összehasonlítani a normál szövetekhez történő EMA, ARA, JEA kötődési mintázatokkal. Ugyancsak zavaró volt a normálhoz képest fokozott számban jelen lévő IgA plazmasejtekből adódó magas háttérfestődés. Miután a normál metszeten igazoltuk, hogy a CUB7402 monoklonális anti-TG2 antitest fagyasztott metszeteken a coeliakiás IgA-val azonos eloszlásban kötődik, ennek segítségével vizsgáltuk a vékonybél mintákat is.

Korponay-Szabó IR, Halttunen T, Szalai Z, Laurila K, Király R, B.Kovács J, Fésüs M, Mäki M. In vivo targeting of intestinal and extraintestinal transglutaminase 2 by coeliac autoantibodies. *Gut* 2004;53:641-8. (1.melléklet)

Kettős festés alkalmazásával igazoltuk, hogy az *in vivo* IgA lerakódás az extracelluláris TG2 mentén jön létre és már a boholyatrófia kialakulása előtt, a betegség látens fázisában kimutatható (1. melléklet 1. ábra). A vizsgálatok nemcsak a TG2 antigénnel, hanem a TG2 keresztkötő enzimaktivitásával azonos lokalizációt is igazolták. Egyes esetekben a bélben észlelhető immunreakció időben megelőzte a savóban megjelenő anti-TG2 reaktivitást. Az IgA antitestek kioldásával és normál szubsztátokon történő indirekt immunfluoreszcens vizsgálattal igazoltuk, hogy az EMA, ARA és JEA reakcióért felelős antitestek találhatóak meg a bélben lerakódva is. A coeliakiás antitesteket csak a TG2 antigén eltávolításával lehetett a szövetekből teljesen extrahálni. Ehhez az indirekt vizsgálatoknál alkalmazott KSCN-n kívül chloroacetát alkalmazására is szükség volt, mely erőteljesebben bontja szét a TG2-fibronectin kötődést, de nem befolyásolja a szöveti plazmasejtekből látható intracelluláris IgA felismerhetőségét. Az extrahált IgA antitestekről bizonyítottuk, hogy TG2-re specifikusak, ELISA módszerrel rekombináns TG2 antigénnel mérhetők és normál szövetekhez hozzáadva, azokhoz jellegzetes endomysium és reticulin típusú reakcióval kötődnek (1. melléklet 4. ábra). A coeliakiás szövetekből TG2-specifikus antitestek alacsony pH alkalmazásával is kinyerhetők, de ezzel a szöveti kötődés teljesen nem tűnik el. Valószínűleg ebben nemcsak a kötődött antitestek magas aviditása, hanem a TG2 keresztkötő enzimaktivitása folytán az enzimhez való részleges keresztkötöttségük is szerepet játszik.

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. *Gut* 2006;55:1746-53.

A szövetekben lerakódott hasonló IgA antitesteket 25 olyan IgA kompetens felnőtt betegnél is vizsgáltuk (medián életkor 55 év, tartomány 20-79 év), akiknek coeliakiára jellemző boholyatrófiája volt, de a szérumban az EMA vizsgálat negatív volt. Ezek a betegek az azonos időszak alatt diagnosztizált coeliakiás betegek 15%-át tették ki. Közülük a klinikai lefolyás, a glutenmentes diétára adott válasz és HLA-DQ2 (vagy DQ8) hordozás alapján 22-nél coeliakiát lehetett megállapítani; 2 esetben később enteropátia-asszociált lymphoma alakult ki. Három betegnél autoimmun enteropátiát diagnosztizáltak, ezek mind HLA-DQ2 és DQ8 negatívak voltak. Vékonybélminta fagyasztott metszete közülük 18 EMA-negatív coeliakiás betegnél állt rendelkezésre és mindnél ki tudtuk mutatni a szöveti TG2 felszínén megkötődött jellegzetes IgA antitesteket, míg a 3 autoimmun enteropátiában szenvedő beteg közül egyiknél nem volt IgA lerakódás. A lerakódott IgA TG2-specifitását további kísérletekkel is megerősítettük, mivel a vékonybélben található IgA specifikusan megkötött egy kívülről hozzáadott, GST-vel jelölt humán rekombináns TG2 fehérjét (20. ábra A-C).



20. ábra. A coeliakiás IgA autoantitestek szöveti TG2 fehérjéhez való *in vivo* kötődésének bizonyítása. A-B. A szövetekhez kötődött dimer IgA-t zöld festéssel (FITC anti-IgA) jelöltük, majd másik kötőhelyéhez GST-vel jelölt, tisztított humán rekombináns TG2-t adtunk, és ezt anti-GST antitesttel szelektíven ismertük fel (piros); a két marker kolokalizációja esetén sárga szín jött létre (B) a jellegzetes subepiteliális szalagszerű elrendeződés formájában. A GST-TG2 fibronectinhez (FBN) való kötődését feleslegben adott oldott fibronectin fragmenttel és a TG2 fibronectin kötőhelyéhez kötődő monoklonális antitesttel (G92) gátoltuk meg. Nem coeliakiás kontroll metszetekhez a GST-TG2 nem kötődött (C). Plasminogén hiányban szenvedő coeliakiás beteg kórosan egyenetlen TG2 expressziója esetén az IgA autoantitestek is ebben a kóros mintázatban kötődtek (D).

A szeronegatív coeliakiás betegek IgA antitestjeinek kivonása a szövetekből hosszabb időt és töményebb reagenseket igényelt. Ez arra utal, hogy ezek nagy aviditással kötődnek szövetekhez és talán ezért is alacsony a szérumszintjük. Érdekes módon a legintenzívebb szöveti IgA lerakódás a lymphomás betegeknél volt, így ez a megfigyelés felveti annak a lehetőségét, hogy az IgA tartós jelenléte szövődmények kialakulására hajlamosít.

Veres G, Korponay-Szabó IR (megosztott első szerző), Maka E, Glasz T, Mamula P, Papp M, Dezsőfi A, Arató A. Duodenal ulceration in a celiac patient with plasminogen I deficiency: coincidence or cofactors? *Pediatrics*. 2011 Nov;128:e1302-6.

A coeliakia antitestek TG2-specifikus *in vivo* kötődését egy sajátos esetismertetéssel is alátámasztottuk: ha a TG2 szöveti eloszlása kóros, akkor a coeliakia antitestek is a megváltozott elhelyezkedésű TG2 felszínének megfelelően kötődnek. Az ismertetett betegnek a coeliakia mellett veleszületett plazminogén I. hiányt okozó homozigóta mutációja is volt. Ennek következtében nagymennyiségű fibrin rakódott le a hám alatt, mely a TG2-t hordozó kötőszöveti rostok diszlokációját és felrostozódását okozta. A coeliakia során termelődő IgA autoantitestek szintén ebben a bizarr elrendeződésben rakódtak le (20. ábra D), igazolván, hogy ez a kötődés *in vitro* megtörténik és nem a metszés vagy festés körüli műtermék.

5.3.2 Transzglutamináz-specifikus antitestek az emésztőrendszer más részein

Korponay-Szabó IR, B Kovács J, Lőrincz M, Körmendy M, Katona M, Sashegyi J. *In vivo* anti-endomysium antibody (EmA) like deposits in the oesophagus of patients with coeliac disease and GOR. Gut 1995;37:(Suppl 2) p. A222. (absztrakt)

A vékonybélnyálkahártya mellett *in vivo* kötődött IgA antitesteket mutattunk ki a nyelőcső, gyomor illetve a vastagbél nyálkahártyájában is. A nyelőcsőben lerakódott IgA jellegzetes EMA elrendeződést mutatott és kompetitív módon akadályozta kívülről hozzáadott más coeliakiás antitestek kötődését. A minták olyan betegektől származtak, akiknek a coeliakia mellett kóros gastro-oesophagealis refluxa illetve colitise is volt, amely azonban a coeliakia diétás kezelése után enyhült. Az előző megfigyelésekkel egybehangzóan mindez arra utalt, hogy az antitestek jelenléte kóros helyi folyamatokat indíthat el vagy súlyosbíthat.

5.3.3 Transzglutamináz-specifikus antitestek az emésztőrendszeren kívüli szövetekben

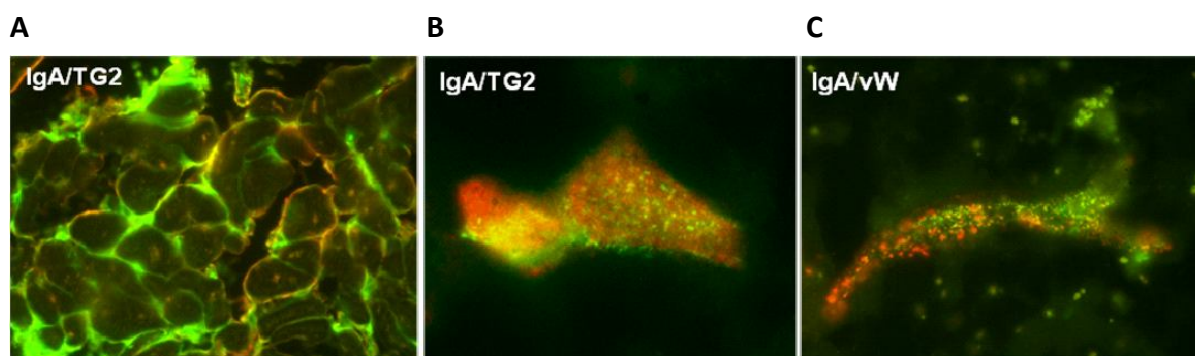
Korponay-Szabó IR, Halttunen T, Szalai Z, Laurila K, Király R, B.Kovács J, Fésüs M, Mäki M. *In vivo* targeting of intestinal and extraintestinal transglutaminase 2 by coeliac autoantibodies. Gut 2004;53:641-8.

Hadjivassiliou M, Mäki M, Sanders DS, Williamson CA, Grunewald RA, Woodroffe NM, Korponay-Szabó IR. Autoantibody targeting of brain and intestinal transglutaminase in gluten ataxia. Neurology. 2006;66:373-7.

TG2-specifikus antitestek jelenlétét igazoltuk immunhisztokémiai és molekuláris biológiai vizsgálatokkal coeliakiás betegek májában, veséjében, izmaiban, nyirokcsomóiban, appendixében és agyában is. Az appendix kivételével a többi szerv biopsziás vizsgálatára társuló lokális betegségi jelek (májelézió, proteinuria, myopathia, lymphadenopathia) miatt diagnosztikus célból került sor, a rutin szövettani és immunhisztokémiai vizsgálatok azonban strukturális eltérést vagy egyéb kórfolyamatot nem igazoltak. Az appendixet egy más indikációval végzett laparoszkópos vizsgálatnál, technikai okok miatt távolították el. Az agy minta postmortem anyag volt. Két klinikai esetben a coeliakia diagnózisa az extraintesztinális biopszia idején nem volt még ismert és a vizsgálatokat eredetileg here illetve hasi nyirokcsomó megnagyobbodás miatt, tumor gyanújának tisztázására végezték (1. melléklet). Mindkét betegnél később, a jelentős anaemia, vashiány miatt végzett EMA

vizsgálat pozitivitása illetve a vékonybélbiopszia alapján igazolódott a coeliakia fennállása, majd a glutenmentes diéta mellett a nyirokcsomók mérete is normalizálódott. Ezeknél a betegeknél a korábbi fagyasztott nyirokcsomó biopsziás mintákból végeztük el a kombinált anti-IgA/TG2 festést. A különféle szövetekben megkötődött IgA (IgA hiányos betegeknél IgG) antitestek kötődési mintázata egyezett a normál szöveteken már jól ismert endomysium illetve reticulín kötődési mintázattal (1. melléklet 2-3. ábra). A pontosabb értékelés érdekében itt is kivontuk az antitesteket a szövetekből és indirekt immunfluoreszcens eljárással bizonyítottuk kötődésüket a klasszikus EMA, ARA és JEA szubsztrátokhoz (majom nyelőcső, humán köldökzsín és appendix). Azt is igazoltuk, hogy nem kötődnek TG2 hiányos (TG2-/-) eger szövethez, csak akkor, ha ahhoz előzetesen humán TG2 fehérjét adunk (1. melléklet 4. ábra). Ezekkel a kísérletekkel megállapítható volt, hogy a szövetekben lerakódott IgA kizárólag a TG2 fehérjét ismeri fel, más szöveti alkotórészeket nem. Külön kiemelendő, hogy szemben a korábban savóval végzett vizsgálatokkal (34. oldal), a szövetekből tisztított coeliakiás IgA nem tartalmazott aktínnal reagáló antitesteket, és így TG2-specifikus affinitás-tisztított antitestnek tekinthető.

A további vizsgálatokban TG2 antigén és a lerakódott IgA pontosabb lokalizációját vizsgálva megállapítottuk, hogy azok a laminin extracelluláris oldalán helyezkednek el, elsősorban a kiserek felszínén (1. melléklet 1. ábra). A vizsgálatok arra is felhívták a figyelmet, hogy a reticulín rostok mentén kötődő antitestek megtalálhatók a coeliakia során megnagyobbodott nyirokcsomókban, amelyek gyakran diagnosztikus nehézséget okoznak. A coeliakiában ez a manifesztáció korábban nem volt ismert. Ugyancsak elsőként észleltünk TG2-specifikus antitest lerakódást szívelégtelenség miatt kezelt coeliakiás fiatal felnőtt szívizom rostjai körül (21A. ábra).



21. ábra. *In vivo* lerakódott IgA autoantitestek (zöld) coeliakiás beteg szívizom biopsziás mintájában (A) és gluten ataxiás beteg kisagyi ereinek felszínén (B-C). Az IgA kolokalizációt mutat a CUB7402 monoklonális antitesttel (piros) jelölt szöveti TG2 fehérjével (A-B) és a kiserekkel (C), von Willebrand faktor festés (piros) alapján.

Az *in vivo* IgA lerakódás vizsgálata szempontjából különösen két szervet találtunk érdekesnek: az agyat és a placentát. Ezek coeliakiában játszott szerepéről addig az eredmények erősen ellentmondásosak voltak.

5.3.3.1 TG2-specifikus antitestek az agyban

Ismert, hogy a coeliakia szövődményeként idősebb korban kisagyi atrófia és cerebelláris ataxia alakulhat ki, de cerebelláris ataxiát gyakran olyan betegeknél is észleltek, akiknél a vékonybél boholszerkezete nem volt károsodott, és ezért a coeliakia hagyományos diagnosztikus kritériumainak nem feleltek meg. Ezek egy részénél a szérumban voltak TG2 elleni vagy EMA antitestek, de másik részükénél csak gliadin antitestek. Ezért kétséges volt, hogy ez a 'gluten ataxiának' nevezett kórkép (Hadjivassiliou és mtsai 1998, 2002) a coeliakia formakörbe tartozik vagy nem. Korai stádiumban glutenmentes diéta ilyen betegeknél az ataxia stagnálásához vagy némi javulásához vezethet, de a gliadin antitestek nem specifikusak, örökletes, glutentől független ataxiás betegeknél is mértek emelkedett értékeket. Tisztázatlan volt az is, hogy az agyi folyamat, ha az coeliakia eredetű, milyen mechanizmussal alakul ki. A szövettani eltérésekben a Purkinje-sejtek pusztulása, az agy sorvadása és a kiserek körül limfocitás beszűrődés dominál, így elsősorban immunológiai mechanizmus lehetősége merült fel. Vizsgálatainkhoz Marios Hadjivassiliou csoportjával együttműködve vékonybélbiopsziás mintákat kaptunk klinikailag gluten-ataxiában (n=11) és más eredetű, elsősorban örökletes ataxiában szenvedő (n=8), glutenmentes diétára klinikai választ nem mutató betegektől és azokat a klinikai adatok ismerete nélkül értékeltük. A vékonybélminták többsége normál boholszerkezetű volt, de a gluten ataxiás betegekben egy kivétellel a jellegzetes IgA lerakódás megfigyelhető volt, míg minden kontroll ataxiás beteg negatív volt (7. táblázat).

7. táblázat. Immunológiai eredmények a vizsgált cerebelláris ataxiában szenvedő betegeknél

	Gluten ataxia N=11	Egyéb ataxia* N=8
Gliadin antitestek a szérumban	10	7
EMA vagy anti-TG2 a szérumban	3	1
Partialis boholyatrófia	4	0
IgA lerakódás a vékonybélben a TG2 felszínén	10	0

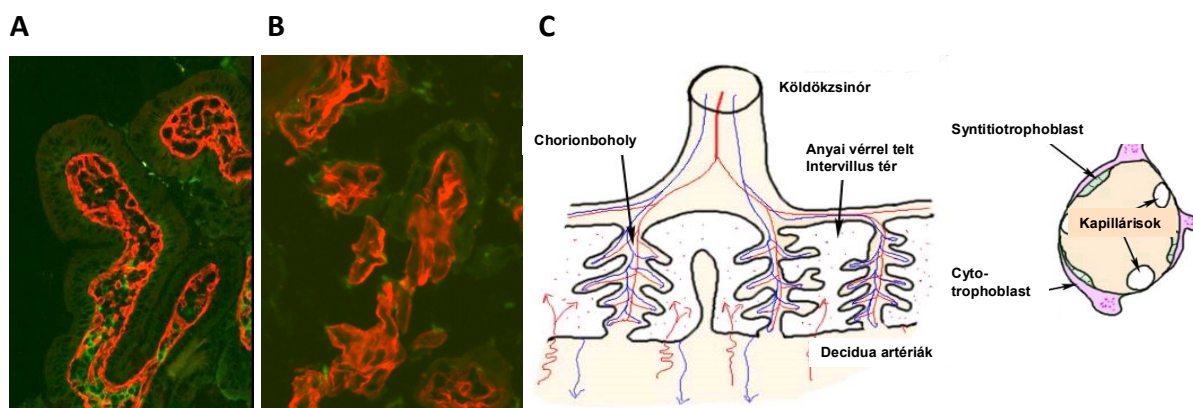
**klinikai diagnózisok: sclerosis multiplex (n=1), hereditær spasticus paraplegia (n=1), multiplex system atrófia (n=2), spinocerebellaris ataxia 6-os típus (n=3), alkoholos eredet (n=1).*

Ugyanebben a vizsgálatban egy agymintát is módunk nyílt vizsgálni egy gluten ataxiában elhunyt betegtől, akinek nem volt vékonybélmanifesztációja (boholyatrófiája), és a szérumban sem voltak kimutathatók az anti-TG2 antitestek. Az erek mentén történő IgA lerakódás különösen jellegzetes volt az agyban. Az agyalapon és a felszínén lévő artériák és vénák a szokásos endomysium típusú IgA kötődést mutatták, de az agy állományában belüli kiserek felszínéhez az IgA granuláris mintázatban kötődött (21. ábra B-C). Ebben valószínűleg a vér-agy gát speciális felépítése is szerepet játszhatott, amely az IgA számára korlátozottan átjárható. A TG2 antitestek jelenléte gluten ataxiában alátámasztja, hogy ez a coeliakia egyik manifesztációja. A TG2 autoantitestek lehetséges patogenetikai szerepét a

későbbiekben mások állatkísérletekben is kimutatták, mivel egereknél intrathecalisan beadott TG2-specifikus monoklonális és beteg antitestekkel átmeneti ataxiát lehetett kiváltani (Boscolo és mtsai 2010).

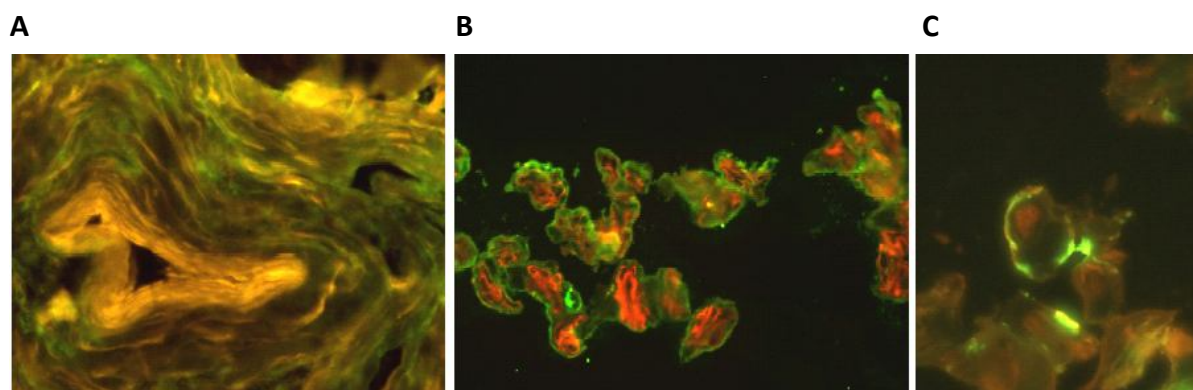
5.3.3.2 TG2-specifikus antitestek a placentában

A coeliakiás nőkben gyakoribb az infertilitás és a szülés körüli szövődmények (Freeman 2010), valamint egyes vizsgálatokban az újszülöttek alacsonyabb súlyát észlelték (Martinelli és mtsai 2000), azonban ezt nagyobb felmérésekkel nem tudták megerősíteni (Greco és mtsai 2004). A placenta nagy mennyiségben tartalmaz TG2 antigént az erekben, mind az anyai, mind a magzati részekben (22. ábra). A chorionbolyhok általános szerkezete és funkcionális szerepe analóg a vékonybélbolyhokéval, azzal a különbséggel, hogy két dimenzió helyett három dimenzióban képeznek bolyhozott felszínt. Az egyrétegű syntitiotrophoblast borítás alatt a TG2 hasonlóan megtalálható, mint a vékonybélben.



22. ábra. TG2 expresszió (piros) normál vékonybélbolyhban, (A) chorionbolyhban (B). IgA (zöld) a bélben csak a plazmasejteken belül fordul elő, a placentában normálisan nem található. C. A humán placenta szerkezete.

Aktív betegségben szenvedő coeliakiás anyák placenta szövetét vizsgáltuk, melyre egy terhesség alatti szerológiai szűrés (5.2.10.2. fejezet) adott lehetőséget. Jelentős mennyiségű IgA lerakódását észleltük a deciduális erekben, mely a CUB7402 monoklonális antitesttel végzett jelöléssel azonos lokalizációt mutatott (23A. ábra, sárga). A magzati bolyhok felszínére is kötődött az anyai IgA, de a belsejükben lévő TG2 antigént nem érte el (B-C).

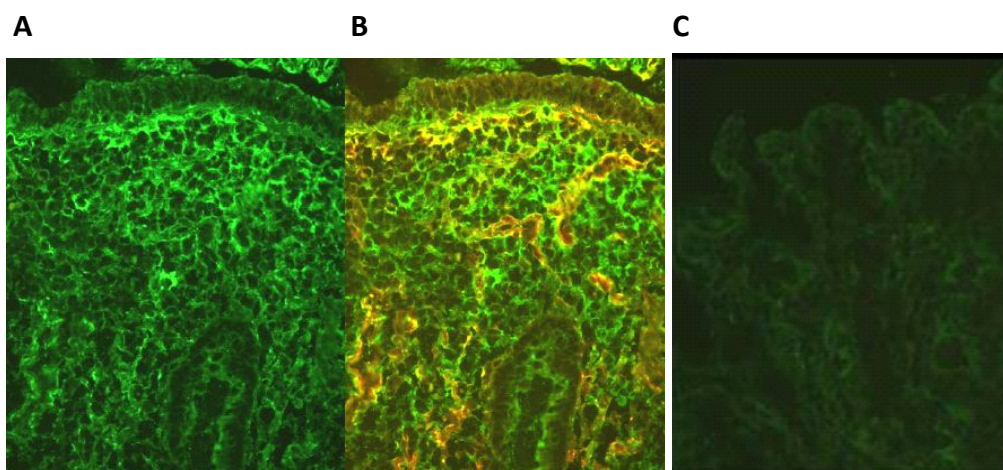


23. ábra. *In vivo* IgA lerakódás (zöld) coeliakiás anya placentájában az anyai erek falában (A) és a magzati bolyhok felszínén (B), mely a magzati TG2 antigént (piros, CUB7402) a bolyhok belsejében nem éri el. A felszínen lerakódott IgA a felszíni TG2 (piros, TG100 festés) mentén kötődik (C).

Mivel a CUB7402 antitest a felszíni (surface) TG2-t nem képes felismerni, kiegészítő vizsgálatokat végeztünk a felszíni TG2 jelölésre alkalmas TG100 monoklonális antitesttel, melynél a chorionbolyhok felszínén is igazolható volt a TG2 jelenléte és az anyai antitesttel azonos lokalizáció (23. ábra C, sárga). Ennek alapján megállapítható, hogy a coeliakiás IgA a normál IgA-hoz hasonlóan nem jut át a magzatba, de a bolyhok felszínén vagy a placenta károsításával zavarhatja a tápanyagok felszívódást. A gyermekeknél észlelt hatások leírása a 5.5.6. fejezetben található.

5.3.4 Traszglutamináz-specifikus antitestek IgA hiányos betegekben

A TG2 elleni lokális és szisztémás autoimmun reakció klinikai jelentősége sokáig vitatott volt, mivel IgA hiányos betegekben az IgA antitestek hiányoztak, boholyatrófiát azonban leírtak. Az IgA hiányos betegekben a savóban nagymennyiségű IgG anti-TG2 antitest van jelen. Kimutattuk, hogy IgA hiányos coeliakiás betegekben a májban leakódnak a TG2-specifikus IgG antitestek (1. melléklet 3. ábra), azaz az IgG autoantitestek is képesek kötődni a beteg szöveteihez. A bélben azonban az IgG mellett elsősorban IgM osztályú TG2 antitesteket találtunk (24. ábra), melyek viszont nem kerültek be a keringésbe. Egyidejűleg az IgA tartalmú plazmasejtek száma is felszaporodott. Összességében a plazmasejtekben lévő és a lerakódott IgM antitestek megjelenése azonos volt az IgA kompetens coeliakiás betegekben megszokott IgA festődés jellegével (24. ábra). Ez megfelel annak az immunológiai ténynek, hogy a mukozális immunrendszerben IgA hiány esetén az IgA szerepét az IgM veszi át.



24. ábra. *In vivo* IgM lerakódás (zöld) IgA hiányos coeliakiás beteg vékonybelében (A) és annak kolokalizációja a pirossal jelölt szöveti TG2 antigénnel (B), mely sárga jelet ad. Jelentős mennyiségű IgM plazmasejt is látható, de itt nincs kolokalizáció. A metszethez hozzáadott további coeliakiás IgA antitest már tud kötődni (C, IgA festés).

Az IgA hiányos betegek mintái lehetőséget adtak annak bizonyítására is, hogy a nyálkahártyában lerakódott antitestek a TG2 gyakorlatilag minden kötőhelyét lefedik. Az IgM-t tartalmazó mintákhoz tisztított coeliakiás IgA-t hozzáadva, már további kötődést nem lehetett elérni, holott az alkalmazott IgA nem coeliakiás, lerakódott autoantitestet nem tartalmazó vékonybélmeteszetekhez a szokott JEA mintázattal jól kötődött (24C. ábra).

5.3.5 A betegek szöveteiben lerakódott transzglutamináz-specifikus antitestek klinikai és diagnosztikus jelentősége

A coeliakiás betegeknek az extraintesztinális tünetek javultak glutenmentes diéta hatására, mely arra utal, hogy a coeliakia számos extraintesztinális manifesztációja közül egyesekben TG2 autoantitest-mediált mechanizmusok is szerepet játszhatnak. A mukozális TG2-specifikus IgA és IgM antitestek bizonyítása érzékenyebb diagnosztikus eszköznek bizonyult, mint a savóból végzett vizsgálatok. A vérben a felnőtt coeliakiás betegek mintegy 10-15%-ánál nem lehet EMA vagy anti-TG2 antitesteket kimutatni. Az előzőekben bemutatott immunfluoreszcens vizsgálatokkal 18 ilyen EMA negatív felnőtt coeliakiás betegnél igazoltuk (Salmi és mtsai 2006b), hogy a TG2 antigénhez kötődött antitestek viszont minden esetben jelen voltak a vékonybélből vett biopsziás mintákban, melynek kimutatása a diagnózist megkönnyítheti. A mukozális TG2-specifikus antitestek kimutatásának azoknál a betegeknek is jelentősége lehet, akik a betegség korai szakaszában vannak és szeropozitivitás ellenére még nincs boholykárosodásuk vagy az enyhe béleltérések mellett szeronegatívak. Ezekben az esetekben a coeliakiás betegségkörhöz való tartozás önmagában is kétséges lehet, és korábban ezeknél a személyeknél a vékonybél rutin fénymikroszkópos vizsgálatával – ha a boholyszerkezet struktúráisan normális volt – a coeliakia lehetőségét egyszerűen kizárták tekintették. A klinikai követés során azonban egyeseknél manifeszt coeliakia alakult ki (Kaukinen és mtsai 2001), és nemritkán az ilyen betegeknek a normál boholyszerkezet ellenére gluten-dependens tünetei voltak.

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. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006;24:541-52.

Tanulmányunkban ezért arra kerestünk választ, hogy a TG2 antitestek jelenléte a vékonybélben előre jelezheti-e azt, hogy kinél alakul ki majd a későbbiekben coeliakia. A vizsgálatban 75 olyan beteget követtünk, akiknél kezdetben coeliakia gyanúja miatt vékonybélbiopsziás vizsgálat történt, de az nem mutatott jellemző boholyszerkezeti eltérést és ezért nem javasoltak nekik kezelést, glutenmentes diétát. 25 betegnél az EMA a savóban kimutatható volt, 50 betegnél nem. Az 50 beteg közül 25-nél a vékonybélben fokozott intraepitheliális limfocitaszámot mértek (Marsh 1 fokozatú eltérés), míg 25-nél a bélben ép boholyszerkezet volt gyulladásos jelek nélkül (Marsh 0). 6-9 éves követés során az EMA pozitív csoportból 13, az EMA negatív Marsh 1 csoportból 3, a Marsh 0 csoportból pedig 1 betegnél alakult ki coeliakia és boholyatrófia. A kezdeti vékonybél szövetmintákban a TG2-specifikus autoantitest jelenléte 93%-ban kimutatható volt, és az eltérés 93% specificitással utalt a későbbi manifeszt megbetegedés jelenlétére. Ezek a szenzitivitási és specificitási értékek magasabbak voltak, mint a szérumban kimutatható EMA/TG2 antitest pozitivitás, de magasabbak voltak a konvencionálisan a latens coeliakia markereként számon tartott CD3

intraepithelialis limfocita szám vagy gamma-delta T sejtszám diagnosztikus értékénél is (8. táblázat).

8. táblázat. Diagnosztikusan felhasználható eltérések értékelése

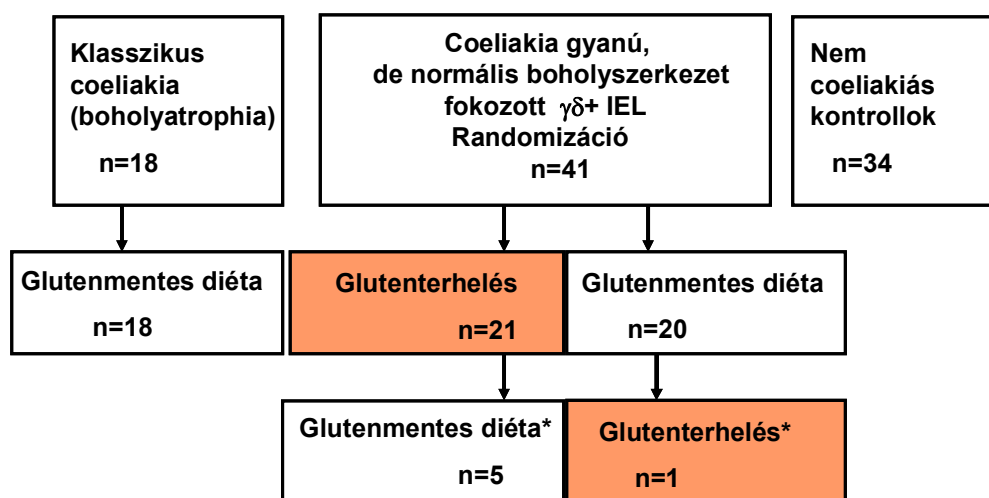
	Szenzitivitás (95%CI)	Specificitás (95% CI)
Vékonybélbe lerakódott TG2-specifikus antitestek	93% (70–99%)	93% (69–99%)
Szérum IgA coeliakiás antitestek (EMA, anti-TG2)	76% (53–90%)	83% (66–93%)
Fokozott IEL a boholycsúcsban	88% (64–97%)	71% (53–85%)
Fokozott gamma-delta IEL	76% (53–90%)	60% (42–75%)
Fokozott CD3 IEL szám (Marsh1)	59% (36–78%)	57% (39–73%)
HLA DQ2 vagy DQ8 jelenléte	100% (76–100%)	66% (47–80%)

IEL: intraepiteliális limfociták

Ezek az adatok rámutatnak arra, hogy nem minden Marsh 1 stádiumú eltérés jelent coeliakiát és ez önmagában – főként a szérum antitestek negativitása mellett – nem tekinthető elegendőnek a coeliakia diagnózishoz. A vizsgálat alátámasztja azt is, hogy a coeliakia természetes lefolyása során a vékonybélben az autoantitestek előbb jelennek meg, mint a boholyatrófia kifejlődése és a savóban észlelhető EMA/TG2 antitest már előre jelezheti a későbbi romlást. Az adatok jelentősek a coeliakia fogalomkörének, definíciójának kibővítéséhez is.

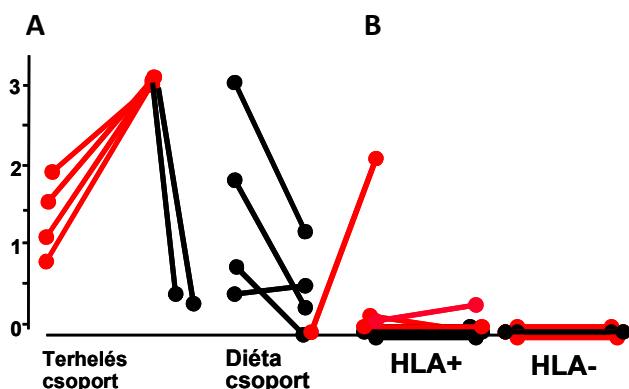
Kaukinen K, Peraaho M, Collin P, Partanen J, Woolley N, Kaartinen T, Nuutinen T, Halttunen T, Mäki M, Korponay-Szabó IR. Small-bowel mucosal transglutaminase 2-specific IgA deposits in coeliac disease without villous atrophy: a prospective and randomized clinical study. Scand J Gastroenterol. 2005;40:564-72.

A mukozális TG2-specifikus antitestek gluten-dependenciájának igazolására 41 betegnél prospektív, randomizált vizsgálatot végeztünk, akiknek emésztőszervi panaszai voltak, de a vékonybélbiopszia nem mutatott boholyszerkezeti eltérést. Közülük 21-nek glutenmentes diétát, 20-nak fokozott glutenbevitelt javasoltunk 6 hónapig. Ezt követően újabb vékonybélbiopsziás vizsgálattal és a vizsgálat céljára kifejlesztett klinikai score alapján értékeltük őket. A randomizált 41 beteg adatait 18 típusos vékonybél szövettani károsodással rendelkező coeliakiás beteg klinikai válaszával és 34 kontroll adataival hasonlítottuk össze (25. ábra). A coeliakiás betegeket glutenmentes diétán követtük, a kontrolloknál csak első értékelés történt meg, intervencióban nem részesültek.



25. ábra. Vizsgálati protokoll (Kaukinen és mtsai 2005), *cross-over a betegek hajlandósága alapján

A 41 randomizált betegből 11-nél változott a klinikai állapot és a tünetek az intervenció hatására, ők mind HLA-DQ2 vagy DQ8 genetikai adottsággal rendelkeztek. Öt betegnél a gluten hatására romlást lehetett észlelni, de klasszikus boholyatrófia egynél sem alakult ki. Hat beteg glutenmentes diéta hatására klinikailag javult. További 20 DQ2 vagy DQ8 pozitív beteg nem jelzett állapotváltozást. A kezdeti állapotban azoknál a betegeknél lehetett a vékonybélben TG2-specifikus antitesteket kimutatni, akiknek az állapota változott a glutenbevitel változására, és akik DQ2 vagy DQ8-t hordoztak. A gluten hatására – a tünetekkel párhuzamosan – fokozódott az IgA lerakódás intenzitása a vékonybélben, a diéta mellett pedig csökkent (26. ábra).

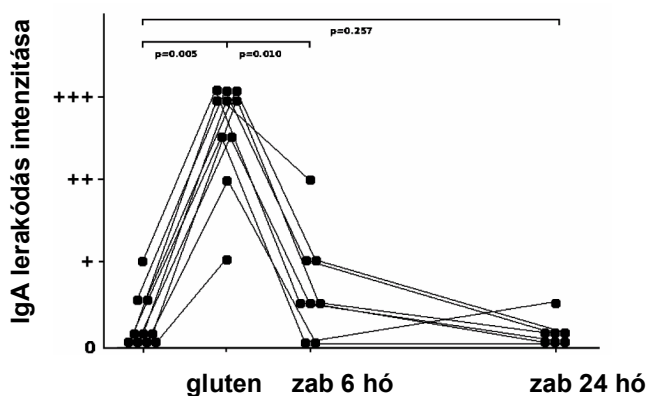


26. ábra. A vékonybélben lerakódott IgA antitestek festődési intenzitása (1-3) a glutenbevitel változására klinikailag reagáló (A) és nem reagáló (B) randomizált betegekben. Minden reagáló betegnél volt DQ2 vagy DQ8.

Ezt a változást a vizsgálat második periódusában cross-over intervencióval 6 betegnél még jobban meg lehetett erősíteni, viszont a klinikailag nem reagáló betegek többségénél (18/20) nem voltak kimutathatók TG2-specifikus mukozális antitestek, a két pozitív betegnél pedig halványak voltak és gluten hatására nem változtak. A HLA-DQ2 és DQ8 negatív betegeknél (n=10) sem a kezdeti időszakban, sem később nem lehetett a bélben TG2-specifikus antitesteket kimutatni.

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;48:559-65.

Egy következő randomizált, prospektív tanulmányban azt is megállapítottuk, hogy a vékonybélben történő IgA autoantitest lerakódás csak a coeliakiások számára toxikus gabonafélék (búza, rozs, árpa) fogyasztásával mutat összefüggést, zab fogyasztásakor sem klinikai relapsus, sem autoantitest nem provokálódik és a vékonybélben sem jelennek meg autoantitestek vagy boholyatrófia. A zabban található avenin hasonló a glutenhez, és ezért korábban ennek fogyasztását is tiltották a coeliakiásoknak. A 2000-es évek elejétől azonban több megfigyelés arra utalt, hogy az avenin a legtöbb coeliakiás számára hosszú távon is tolerálható (Janatuinen és mtsai 2002), bár a klinikai adatok néha ellentmondásosak voltak. A tanulmányokban észlelt reakciók egy részéért a búza eredetű szennyezések is felelősek lehettek, másrészt egyes felnőtt betegeknél, akik gasztrointesztinális tünetekkel reagáltak a zabkészítményekre, avenin-reaktív T-limfocitákat (Arentz-Hansen és mtsai 2004) és esetenként boholyatrófiát találtak. Saját vizsgálatunk célja a zab hatására coeliakiás gyermekekben kialakuló immunológiai aktiváció vizsgálata volt. 23 résztvevőt gluten- illetve zabterhelési csoportba randomizáltunk, szerológiai és vékonybél szövettani vizsgálatokkal követtünk. Amennyiben gluten hatására relapsus alakult ki, a betegek a glutent kiiktatták az étrendből, de folytatták a zab fogyasztását. A vizsgálat kezdetén minden gyermek szeronegatív volt, de 7-nél a vékonybélben hálvány IgA lerakódás megfigyelhető volt, amely azonban a zab fogyasztása mellett inkább csökkent. A glutenfogyasztás az IgA lerakódás fokozódását provokálta és boholyatrófia alakult ki, amely azonban megszűnt a glutenmentes diétán akkor is, ha a betegek tovább fogyasztották a zabot (27. ábra).



27. ábra. A vékonybélben lerakódott IgA antitestek festődési intenzitása gyermekek glutenterhelése illetve hosszantartó zab fogyasztása után

Két betegnél a zab elkezdése után panaszok jelentkeztek, de egyikükénél sem jelentek meg anti-TG2 antitestek sem a vékonybélben, sem a szérumban. Így azt a következtetést lehet levonni, hogy zab iránti intolerancia coeliakiás betegnél más mechanizmussal alakul ki, mint az alapbetegség. Emellett ez a vizsgálat is azt mutatta, hogy a vékonybélben kimutatható immunreakció érzékenyebb aktivitási jel, mint a szeropozitivitás.

Koskinen O, Collin P, Korponay-Szabó I, Salmi T, Iltaanen 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. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2008;47:436-42.

Mivel a szándékos glutenterhelés nem reprezentálja kellőképp a coeliakia természetes lefolyását, olyan betegek hosszabbtávú követésével igyekeztünk a vékonybélben kimutatható IgA antitestek diagnosztikus és prediktív értékét tovább vizsgálni, akiknél a későbbiekben a betegség spontán boholyatrófia kialakulásába progrediált. A vizsgált 26 beteg közül immunfluoreszcens vizsgálattal 25-nél (96%) lehetett a vékonybélbe lerakódott anti-TG2 IgA antitesteket kimutatni már az első, még nem kóros eredményű szövettani vizsgálat idején is. A klinikai, szerológiai és immunhisztokémiai eredmények hasonlóak voltak további 20 olyan betegnél is, akiknél szeropozitivitás ellenére a vékonybél szerkezete normális volt, de akik panaszai miatt glutenmentes diétát kezdtek és klinikai javulást tapasztaltak. A szeropozitív, de a konvencionális szövettani vizsgálattal kóros eltérést nem mutató betegeknél mindig felmerül egy esetleges fals pozitív antitest eredmény lehetősége. Ezeknél a betegnél a vékonybélhez kötött antitestek jelenléte támogatja a gluten-érzékenység tényét.

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;9:6.

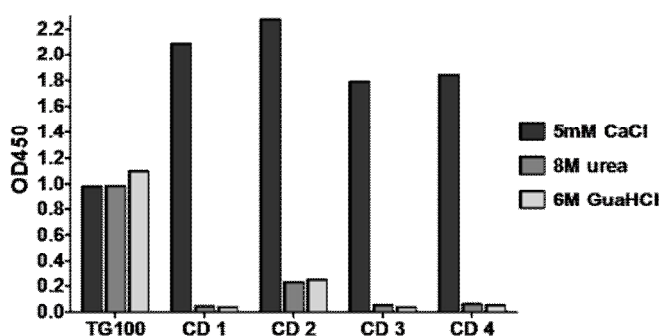
A vékonybélhez kötődött antitestek kinetikájának megállapítására azt is vizsgáltuk, hogy jól betartott glutenmentes diéta során meddig találhatók meg a vékonybélben az antitestek és ezek hogyan befolyásolják a glutenre adott lokális választ. Mivel a már diétát folytató betegeknél a szérum antitestek negatívak és a vékonybélbolyhok is regenerálódnak, a diagnózis igazolása, ha az a kezelés előtt nem történt meg, igen nehéz lehet. An *in vivo* glutenterhelés elkerülésére ezért *in vitro* glutenre adott reakciót vizsgáló szövettenyésztési eljárások ismertek és ezek egy részében a biopsziás mintából a médiumba szekretált anti-TG2/EMA antitesteket mérik (Picarelli és mtsai 1996). Egy ilyen szövetkultúra módszert vizsgáltunk, és megállapítottuk, hogy a gluten hatására kialakuló eltérések (CD25 sejtek számának emelkedése, a hámsejtek magasságának csökkenése, antitestek megjelenése a médiumban) többnyire csak akkor jönnek létre, ha a szövetmintában még megtalálhatók a szövethez kötött TG2-specifikus antitestek. Hosszú diéta után, amikor ezek már kiürültek, a gluten provokáció már nem okoz mérhető antitesttermelést a felülúszóban. Mindezek miatt inkább az a valószínű, hogy valójában a szövetekben lévő antitestek mobilizálásáról van szó és nem újonnan történő termelésükről. Az eredményekből egyelőre nem dönthető el, hogy maguk az antitestek hozzájárulnak-e az immunológiai aktiváció fokozásához. Az is lehetséges, hogy azoknál a betegeknél, akik még több éves diéta után is antitest pozitívak a szövetekben, a diéta betartása nem annyira tökéletes és ezért a glutenre adott anamnesztikus válasz a gyakori trigger miatt intenzívebb. Ebben az esetben az antitestek jelenléte is inkább csak egyfajta aktivitási marker.

5.4. A coeliakiában termelődő transzglutamináz autoantitestek kötődési epitópjának azonosítása

Simon-Vecsei Z, Király R, Bagossi P, Tóth B, Dahlbom I, Caja S, Csősz E, Lindfors K, Sblattero D, Nemes É, Mäki 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.

5.4.1. A korábbi adatok kritikai értékelése, epitóptérképezési stratégia

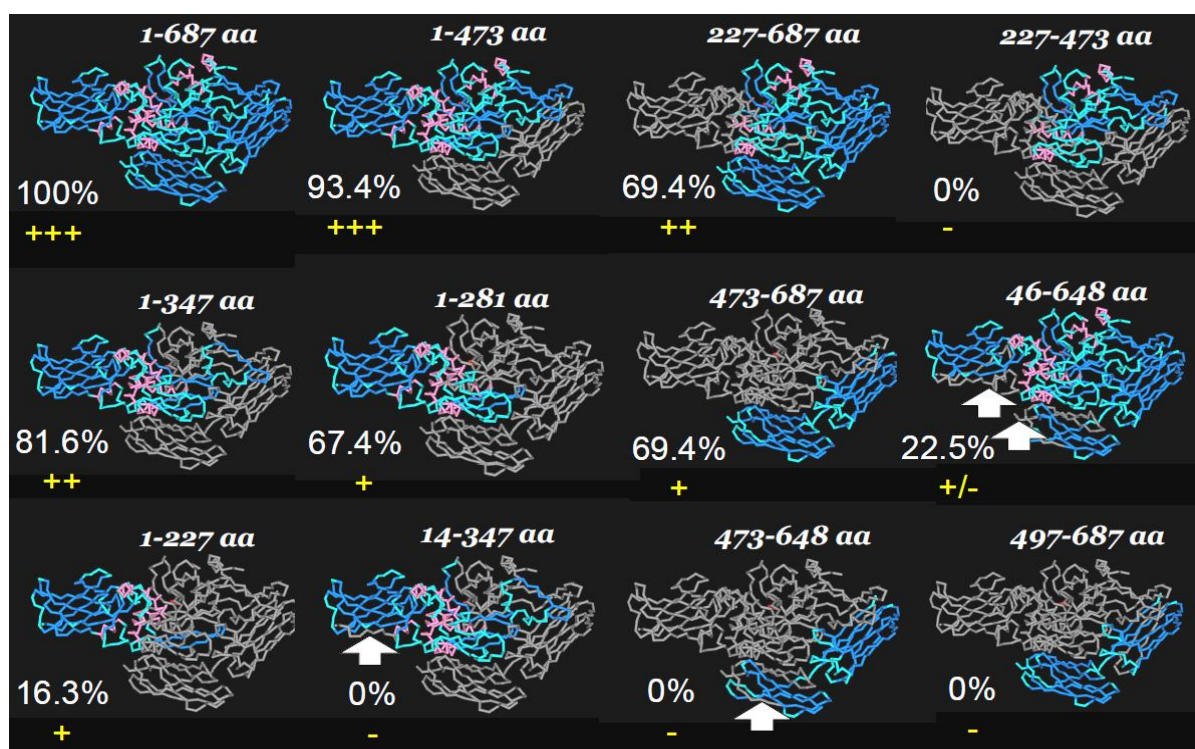
A bevezető részben részletesen ismertetett irodalmi adatok a coeliakiás betegek szérum antitestjeinek kötődését heterogénnek írkák le és ezt többnyire a betegminták poliklonális jellegével magyarázzák. Kimutatták, hogy az egyes betegmintákban lévő antitestek a TG2 komplementer fragmenseihez is kötődni tudnak és a betegminták mintegy 20%-ában az N-terminális, középső és C-terminális részt külön-külön is felismerték, habár csökkent jelet adva a teljes TG2 fehérjéhez képest (Seissler és mtsai 2001). Viszont korábbi, indirekt capture ELISA eljárással végzett vizsgálataink arra utaltak, hogy ha a TG2 ELISA lapra kötéséhez egy másik coeliakiás antitestet (pl. IgG-t) használunk, akkor a betegminták között mérhető kompetíció áll fenn (Korponay-Szabó és mtsai 2001). További megfigyelés, hogy a C-terminális (IV.domén) vagy az N-terminális rész (I.domén) hiánya önmagában alig csökkentette a kötődést, de ha mindkettő hiányzott, a betegsavók egyáltalán nem tudtak kötődni (Sblattero és mtsai 2002). A II. (core) doménen lévő katalitikus centrum 3 fő aminosavának alaninra történő cseréje is jelentősen csökkentette a kötődést (Byrne és mtsai 2004), annak ellenére, hogy a N-terminálison és C-terminálison nem változtattak. Mivel a TG2 nagyfokban érzékeny a térszerkezeti változásokra és transzamidáló működéséhez kalciumionok jelenléte és megtartott konformáció kell, ezek az adatok azt sugallták, hogy a térszerkezetnek a coeliakiás epitópokat illetően is jelentősége lehet. Ezért első lépésben azt vizsgáltuk, hogy a coeliakia epitópok mennyiben konformációs jellegűek. Az ELISA lapra kötött TG2 antigént 8M urea vagy 6M GuanidinHCl előkezelés után, mely a feltekeredett térszerkezetet megszünteti, inkubáltuk a coeliakiás antitestekkel és kontroll monoklonális egér anti-TG2 antitestekkel (TG100), melyek egy lineáris epitópot (447-538. aminosav) ismernek fel (28. ábra).



28. ábra. TG100 monoklonális anti-TG2 antitestek és coeliakiás IgA szérum antitestek (CD1-4) kötődése ELISA vizsgálatban kalciummal illetve térszerkezetet befolyásoló kémiai anyagokkal kezelt TG2 antigénhez

A TG100 antitest a natív és a kezelt TG2 antigént egyformán felismerte, de a coeliakiás antitestek szinte egyáltalán nem ismerték fel az elrontott térszerkezetű antigént, bizonyítva, hogy a coeliakiás antitestek nagyrészt konformációs epitópokhoz kötődnek és nem lineáris TG2 szakaszokat ismernek fel.

A konformációs epitópok azonosítását nehezíti az a tény, hogy a kalciummal aktivált TG2 kristályszerkezete jelenleg nem ismert, és a rendelkezésre álló GDP-kötött modellek nem adnak biztos információt a lehetséges kötőhelyekről. A korábbi három vizsgálat (Seissler és mtsai 2001, Sblattero és mtsai 2002, Nakachi és mtsai 2004) adatai arra utalnak, hogy a molekula N-terminális és C-terminális része is fontos a kötésben, de ezeket egyenként eltávolítva, a kötés még létrehozható. A korábbi irodalmi adatokat háromdimenziós modelleken ábrázolva kitűnt, hogy az antitestek kötődését legjobban a TG2 molekula egymáshoz közeli felszíneit érintő változások befolyásolják (29. ábra) és hogy valójában az N- és C-terminális térben egymáshoz igen közel helyezkedik el. A core domain szerepe is fontosnak látszik, de az önmagában vagy nem elegendő a kötéshez, vagy a két terminális domain hiányában nem tud megfelelő térszerkezetet felvenni. Ezért a továbbiakban olyan felszíni struktúrákat kerestünk, melyek a core domén többi doménrel határos szakaszának közelében vannak.

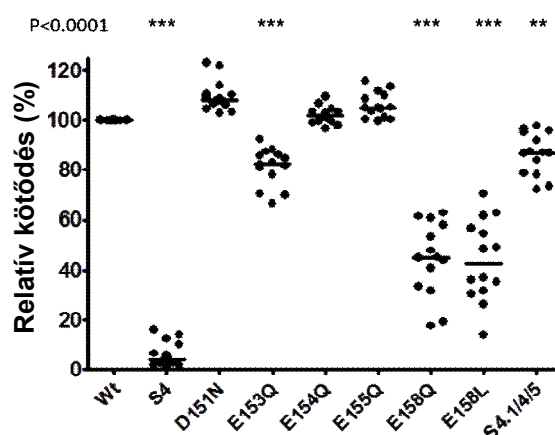
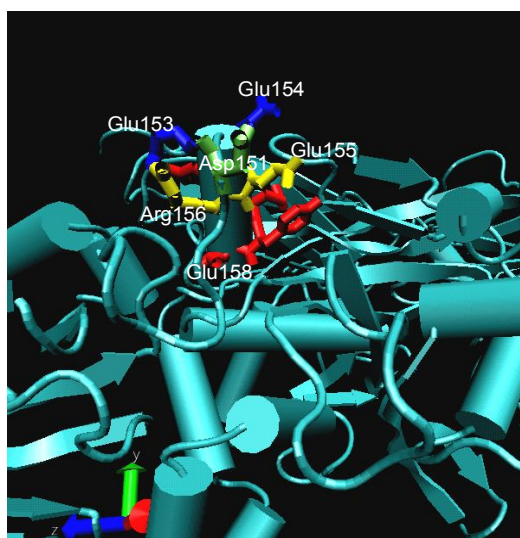


29. ábra. A TG2 antigén trunkációjának hatása a coeliakiás autoantitestek kötődésére. Seissler és munkatársai (Seissler és mtsai 2001) adatai szerint a kötődési jel erőssége (sárga) és a vizsgált betegsávók közül a kötődők százalékos aránya. A hiányzó fehérjerészeket a háromdimenziós modelleken szürke jelöli, aa: aminosav.

5.4.2. A coeliakia antitestek kötőhelye a transzglutamináz egyik Ca^{2+} kötőhelyével kapcsolatos, de a Ca^{2+} nem része az epitópnak

Munkacsoportunk a TG2 Ca^{2+} kötő tulajdonságainak vizsgálata során 2 új Ca^{2+} kötőhelyet (S4 és S5) azonosított (Király és mtsai 2009). A S4 kötőhely a 151-158 közötti aminosavakat foglalja magában és egy savanyú felszíni töltésű hélixet alkot, mely a core domén elején, a N-terminálisához közel helyezkedik el. Az S4 savanyú aminosavainak multiplex mutációja (D151N-E153Q-E154Q-E155Q-E158Q) a megkötött Ca^{2+} molekulák számát 6-ról 3-ra csökkentette és ehhez a mutánshoz a coeliakiás antitestek is rosszul kötődtek (64 minta vizsgálatával $11.6 \pm 8.5\%$). A közeli felszínen lévő S5 kötőhely (433-438-as aminosavak) mutációi is befolyásolták a coeliakiás antitestek kötődését, de kisebb mértékben ($51.3 \pm 16.0\%$ -ra csökkent kötődés). Ezért a coeliakia kötőhely további elemzéséhez elkészítettük az S4 kötőhely egyes mutációt, hogy a kötődésért felelős fő aminosavakat azonosítsuk. A mutánsokhoz való kötődést ELISA vizsgálatokkal elemeztük, melyekben a TG100 monoklonális antitestből készített kalibrációs görbéhez viszonyítottuk a betegek szérum IgA antitestjeinek kötődésével kapott abszorbancia jelet. A kötődést a megkötődött TG100 antitestek százalékában fejeztük ki.

A D151N, E154Q és E155Q mutációk és ezek kombinációi számottevően nem befolyásolták az IgA kötődést. Az E153Q mutáció szignifikáns ($p < 0.001$), de nem túl drámai csökkenést okozott a coeliakiás IgA antitestek kötődésében, míg az E158Q és E158L mutációk esetén a kötődés gyakorlatilag eltűnt (30. ábra). A 158-as aminosav azonban nem a felszínen van, hanem a hélix belsejében, és mutációja indirekt módon, a hélix elbillentésével változtathatja meg a felszínt vagy egyéb módon befolyásolhatja a fehérje konformációját.



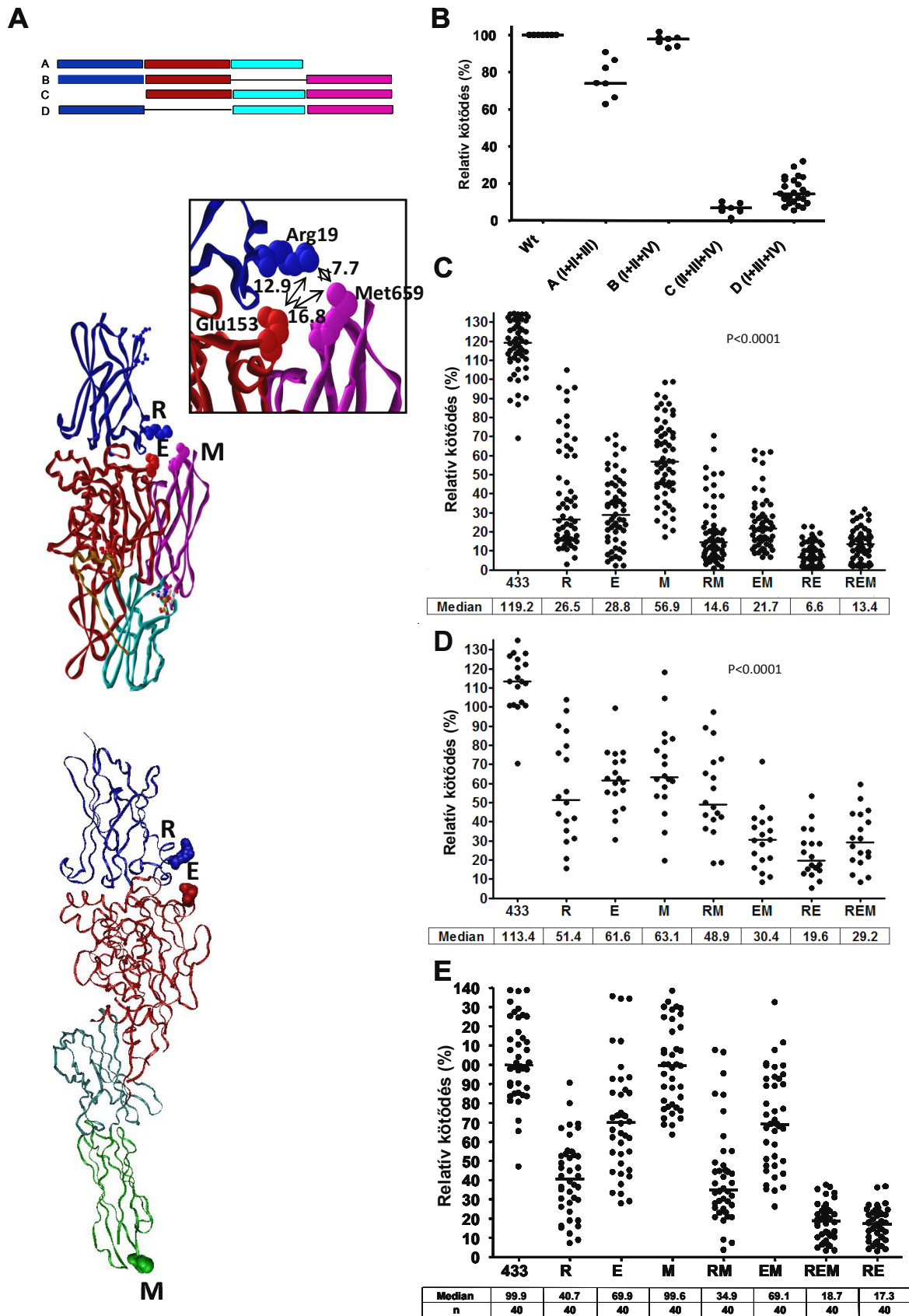
30. ábra. A TG2 core doménjének első alfa-hélice az S4 kalciumkötőhelyet alkotó aminosavakkal és azok mutációjának hatása a coeliakiás betegek szérum IgA antitestjeinek kötődésére. S4=D151N-E153Q-E154Q-E155Q-E158Q, S4.1/4/5= D151N-E154Q-E155Q mutáció. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$

Az S5 kötőhelyen egy, a két felszíni töltéssel rendelkező aminosavat érintő mutációt készítettünk (R433S-E435S), mely azonban hasonlóan jól kötötte a coeliakiás antitesteket, mint a vad TG2. Egy erre a helyre specifikus monoklonális antitesttel (H23) is igazoltuk, hogy nincs kompetíció ezért az epitópért a coeliakiás betegséggel. A H23 szövetmetszeteken nem képes EMA kötődésre, így ez is igazolja, hogy az S5 hely nem a primer coeliakia epitóp.

Mivel az S4 vagy S5 hely felszíni aminosavai közül egyik sem volt önmagában felelőssé tehető a coeliakiás antitestek kötődéséért, felmerült az a kérdés, hogy maguk a Ca^{2+} ionok is szükségesek-e az epitóp felépítéséhez. A kezdeti ELISA vizsgálatoknál ugyanis (Sulkanen 1998) azt tapasztaltuk, hogy tengerimalac TG2 antigén esetében a kötődés csak a fehérje kálciummal történt előkezelése után megfelelő. A mutánsokat ezért EDTA dialízis után vizsgáltuk, különösen azt a mutánst (S1), mely a TG2 egyetlen erős Ca^{2+} kötőhelyét (229-233) érinti, és amelyről a Ca^{2+} ionok dialízissel teljes mértékben eltávolíthatók (normál S1 esetén nem lehet dialízissel minden Ca^{2+} atomot eltávolítani, Király és mtsai 2009). Az S1 mutáns azonban Ca^{2+} ionok jelenléte nélkül is ugyanolyan jó antigén volt, mint a vad típusú TG2 fehérje, és ezt azt bizonyította, hogy az S4 kötőhely intakt aminosavai a humán TG2-ben a Ca^{2+} ionok strukturális szerepe nélkül is megfelelő epitópot képeznek. A katalitikus centrum irodalomban felvetett antigén szerepe miatt készítettünk egy C277S mutánst is, amely azonban normál coeliakia antitestkötő képességű volt (Király 2009).

5.4.3. A core doménen kívüli részek szerepe egy összetett epitóp felépítésében

Mivel 153-as aminosav annak a TG2 felszínnek a része, amely a korábbi modellezés alapján fontosnak látszott, de önmagában nem volt felelős a coeliakia antitestek kötődéséért, doménhiányos mutánsokkal próbáltuk megállapítani, hogy molekula melyik másika területe alkothat vele közös epitópot. Ez a megközelítés jobban megőrzi a molekula térszerkezetét, mint a korábbi vizsgálatokban alkalmazott feldarabolás, mivel több irodalmi adat bizonyította, hogy legalábbis az I., III. és IV. domén önmagában is kellő térszerkezetet vesz fel (Hang és mtsai 2005, Pinkas és mtsai 2007). A doménhiányos mutánsokat az ELISA vizsgálatoknál ekvimoláris mennyiségben használtuk, relatív molekulatömegük figyelembe vételével. Az így végzett vizsgálatokban a III. domént nem tartalmazó TG2 molekulával ugyanolyan jó kötődési jelet kaptunk, mint a teljes TG2 molekulával. A IV. domén hiánya mérsékelten (74%-ra) csökkentette a coeliakia antitestek kötődését, mely az I. vagy II. domén hiánya esetén viszont teljesen megszűnt (31A. ábra). Bár ezen a módon igazolni lehetett, hogy az N-terminális és a C-terminális domén is fontos a kötődéshez, a legfontosabb információt a domén-mutánsok abban szolgáltatják, hogy ezek az N-terminális és C-terminális részek önmagukban nem képeznek független epitópot, ha a core domén nincs jelen (D mutáns).



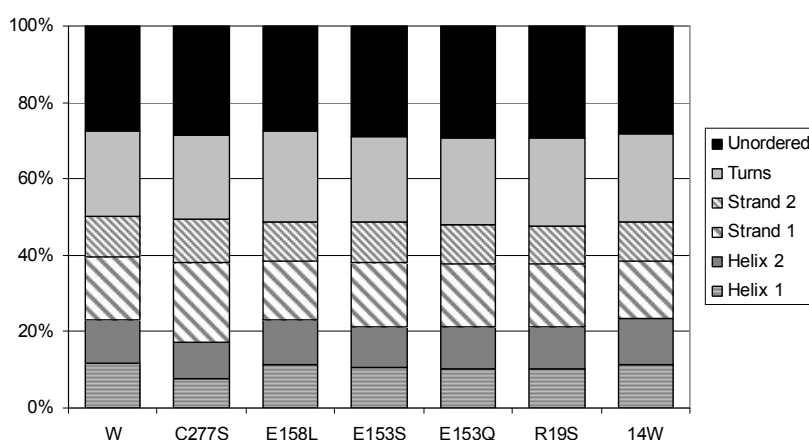
31. ábra. A coeliakia antitestek kötődése az I-II-IV. domén részvételével kialakuló összetett TG2 epitóp mutánsaihoz (R=R19S, E=E153S, M=M659S, RM=R19S-M659S, RE=R19S-E153S, EM= E153S-M659S, REM= R19S-E153S-M659S, 433=R433S-E435S). A. A TG2 domének lineáris és térbeli ábrázolása, közepén a csukott, alul a nyitott forma; a keretben az összetett epitóp. A coeliakia antitestek kötődése a doménhiányos mutánsokhoz (B, n=7-28 savóminta), ELISA lemezre kötött pontmutánsokhoz (C, n=58 coeliakiás gyermek

savómintája, D, n=18 coeliakiás felnőtt savómintája) és fibronectinre kötött pontmutásokhoz (E, n=25 gyermek és 15 felnőtt savómintája). p: szignifikáns különbség ANOVA teszttel.

5.4.4. Több domént érintő összetett coeliakiás TG2 epitóp modellezése és kísérletes vizsgálata

A coeliakia epitóp további modellezéséhez a következő irodalmi és saját kísérletes adatokat használtuk fel: 1/ a kompetíció alapján valószínűleg létezik egy domináns epitóp, mely tartalmazza valamilyen formában a core domén első részét, 2/ a kötődésben részt vesz az N-terminális és C-terminális domén is, de nem alkot önálló epitópokat, 3/ a 153-as aminosav része az epitópnak vagy befolyásolja az epitópot alkotó felszínt. Számításba vettük továbbá azt is, hogy az autoimmun folyamat hosszas fennállása esetén epitope spreading miatt járulékos epitópok is megjelenhetnek. A modellezéshez a TG2 két ismert kristályszerkezetét (PDB kód: 1KV3 [csukott] és 2Q3Z [nyitott]) és a TG3 erősen homológ szerkezeti adatait (PDB kód: 1VJJ) használtuk fel. A 153-as glutaminsav a TG2 csukott konformációjában legközelebb az N-terminálison lévő 19-es argininhez (12.9 Å) és a C-terminálison lévő 659-es metioninhoz (16.8 Å) van, valamint a 19-es és a 659-es aminosavak maguk is olyan közel vannak egymáshoz (7.7 Å), amely lehetővé teszi egy közös epitóp kialakítását. A nyitott szerkezetben (2Q3Z) a 19-es és 153-as aminosavak egymáshoz való helyzete (12.9 Å) nem változik, de a 659-es aminosav a IV.doménnel együtt elmozdul. Mindezek alapján kísérleteinkben helyspecifikus mutagenézis felhasználásával olyan mutáns TG2 fehérjét készítettünk és tisztítottunk, melyek a fenti felszíni aminosavak szerinre történő cseréjét tartalmazták külön-külön illetve különféle kombinációkban: R=R19S, E=E153S, M=M659S, RM=R19S-M659S, RE=R19S-E153S, EM=E153S-M659S, REM=R19S-E153S-M659S, 154K=E154K, RKM=R19S-E154K-M659S. Kontrollként az S5 Ca^{2+} -kötő helyet érintő, hasonló módon előállított mutánst (433=R433S-E435S) használtuk, melyről a korábbiakban kimutattuk, hogy a vad TG2 fehérjéhez hasonló jó antigén. A mutagenézisnél a korábbi kalcium-kötő mutánsokkal ellentétben, ahol a savanyú glutaminsavat glutaminra illetve az aszparaginsavat aszparaginra cseréltük a negatív töltés megszüntetése és a lehető legkonzervatívabb csere érdekében, a coeliakia epitóp vizsgálatához a cél aminosavakat szerinre cseréltük. A korábbi irodalmi adatoktól eltérően (Byrne és mtsai 2006) nem alaninra történő cserét alkalmaztunk, mivel a fehérje konformációs érzékenysége miatt egy hidrofób oldallánc bevitele folding és térszerkezeti változásokat okozhat. A cserélendő aminosavakat elsősorban a térbeli helyzet alapján választottuk ki, de azt is ellenőriztük, hogy molekula felszínén lévő hidrogénkötések a cserék folytán lehetőleg ne változzanak meg. A mutánsokat N-terminális polihisztidin taggal kapcsolt formában E.coliban fejeztük ki. Az elkészített mutánsok helyes méretét, általános antigenitását és enzimátikus működéseit biokémiai vizsgálatokkal ellenőriztük, ezeket részletesen a 2. melléklet (Simon-Vecsei és mtsai 2012) tartalmazza. A tisztított TG2 mutánsokat különböző, N-terminális, core, III. domén és IV. doménbeli TG2 epitópokat felismerő monoklonális egér anti-TG2 antitestek jól

felismerték (CUB7402 epitóp: 447-478; TG100 epitóp 447-538; 895 epitóp: 649-687; 4G3 epitóp: 1-165 [Akimov és mtsai 2001]; G92 epitóp:1-14 [Trejo-Skalli és mtsai 1995]; H23 epitóp: 433-438 aminosavak) és mindegyik mutáns jól kötődött fibronectinhez (2. melléklet, S2 ábra). Az R és 433-as mutáns a vad TG2 enzimhez hasonló fehérje keresztkötő enzimaktivitással rendelkezik. A 153-as aminosavat tartalmazó mutánsok (E, EM, RE, REM) csökkent, de mérhető transzamidáló képességet mutattak (21-86%), ahogy ez az S4 kombinált mutáns viselkedése és annak alapján várható volt, hogy a 153-as hely egy Ca^{2+} -kötő helyen található. A mutánsok megfelelő GTP-áz működéssel is rendelkeztek, sőt a 659-es metionint érintő kombinált mutációk esetén (RM, EM, REM) a GTP-áz aktivitás a vad enziménél magasabb volt. Mivel a transzamidáló és GTP-áz működés a TG2 intakt térszerkezetéhez kötött, ezek az eredmények azt igazolták, hogy elkészített mutánsaink felvették az enzimre jellemző konformációt. A főbb mutánsoknál a rekombináns fehérjék térszerkezetét cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópiával is megvizsgáltuk. Az E158L, E153Q, E153S és R19S fehérjékben a hélixek és béta-redők aránya hasonló volt a vad TG2 fehérjében mért értékekhez, a nem rendezett részek aránya nem mutatott növekedést. A TG2 aktív helyén lévő ciszteint érintő mutáció (C277S) viszont befolyásolta az enzim térszerkezetét és csökkentette a hélixek arányát, annak ellenére, hogy coeliakia antitestek kötődése megtartott volt (32. ábra).



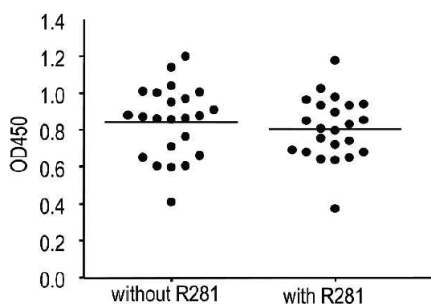
32. ábra. A coeliakia antitest-kötőhelyeket érintő TG2 mutánsok térszerkezetének vizsgálata CD spektroszkópiával. Az y tengelyen az egyes szerkezeti elemek százalékos arányát ábrázoltuk. W = intakt TG2, C277S = aktív hely mutáns (jó antigén kontroll), 14W = az első 14 aminosavat nem tartalmazó mutáns (nem jó antigén kontroll).

Az összetett epitópot érintő mutánsokat 76 egymást követően diagnosztizált coeliakiás beteg (58 gyermek, 18 felnőtt) kezeletlen állapotban vett savómintáival teszteltük. Negatív kontrollként a 433-as mutánst használtuk. Az R, E, M mutáció külön-külön 26.5%, 28.8% illetve 56.9%-ra csökkentette a coeliakiás IgA antitestek kötődését, ha azt a TG100 kötődésével készült standard görbéhez viszonyítottuk, amit 100%-nal tekintettünk (31. ábra C,D). Az EM mutáns 21.7%, az RM 14.6%, a hármas mutáns REM 13.4% reziduális kötődést mutatott. A legnagyobb csökkenést az RE mutáns esetén mértük, ahol a medián IgA kötődés

6.6%-ra csökkent (határértékek 1.1-22.7%). A gyermekek mintáinál nagyobb csökkenés volt minden mutánsnál, mint a felnőtteknél, de a felnőttek mintái hasonló kötődési mintázatot mutattak. Annak ellenére, hogy felnőttkorban epitope spreadingre számítottunk, az RE és REM mutánsokhoz egyetlen esetben sem kötődtek a minták azonos mértékben, mint a vad enzimhez, a legmagasabb kötődés is maximum 50% volt, ami az REM hely domináns epitóp szerepét mutatja. Az REM összetett epitóp domináns voltát a coeliakiás betegek követése során is igazoltuk: a kezdeti és a glutenterhelés során vett savók azonos epitóp kötődési mintázatot mutattak. Vizsgáltuk olyan betegek vérmintáit is, akik hosszú éveken keresztül nem diétáztak, és azt találtuk, hogy a REM összetett epitóp még 5-17 év elteltével is domináns maradt (2. melléklet S5. ábra).

5.4.5. Az összetett epitóp horgonyzópontjainak relatív szerepe az extracelluláris matrixban

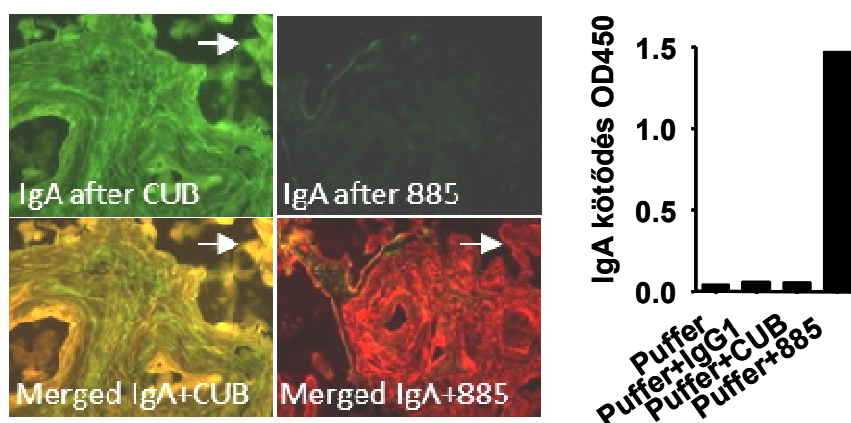
A TG2 enzimatisz működése során jelentős konformációváltozásokat végez az extracelluláris matrixban, ahol fibronectinhez kötött formában található. A nyitott formában a C-terminális domén eltávolodik, és így a 659-as aminosav is, ezért azt vizsgáltuk, hogy a coeliakia antitestek hogyan ismerik fel a fibronectinhez kötött enzimet. Ha a mutáns TG2 fehérjét fibronectinnel fedett ELISA laphoz adtuk, majd így ismertettük fel a coeliakiás antitestekkel, a coeliakiás antitestek jól kötődtek az M mutánsához is, azaz az epitóp C-terminálison lévő része ilyen körülmények között nem okvetlen fontos a kötődéshez. Ennek megfelelően az RE és REM mutáns között nem volt mérhető különbség (31. ábra E), és a vizsgálatok azt igazolják, hogy a coeliakia antitestek az enzim nyitott formájában is kötődhetnek, megkötődve maradhatnak. Ennek közvetlen ellenőrzésére 20 savóminta és 3 affinitás-tisztított TG2-specifikus coeliakiás IgA antitest kötődését vizsgáltuk fibronectinhez kötött vad TG2 enzimmel R281 inhibitor jelenlétében, mely bekötődése után a nyitott konformációban kimerevíti az enzimet. A kötődésben nem volt különbség (33. ábra).



33. ábra. Coeliakiás IgA antitestek (20 savóminta és 3 affinitás-tisztított TG2-specifikus IgA) kötődése a TG2 zárt és nyitott konformációjához. A nyitott TG2 konformációt R281 aktív hely specifikus inhibitorral állítottuk elő, majd az enzimet ennek jelenlétében adtuk fibronectinnel fedett ELISA laphoz. Az inhibitor jelenlétében a fibronectinhez történő kötődés azonos hatásfokú volt, mint nélküle.

Annak vizsgálatára, hogy a 19-es és 153-as aminosav a betegségfolyamatban közvetlenül részt vevő antitestek számára is fontos-e, a coeliakiás szövetekből kinyert IgA antitestekkel

végeztünk kötődési vizsgálatokat. A szövetekben lerakódott antitestekről az előzőekben kimutattuk, hogy azok az extracelluláris TG2 antigénhez kötődnek és azzal együtt, a fibronectin-TG2 kapcsolat szétválasztásával ható kémiai anyagokkal (KSCN, klóracetát) kioldhatók. Két aktív coeliakiában szenvedő nő placenta szövete elegendő mennyiségben állt rendelkezésre a kísérletekhez. Ezekből a lerakódott IgA antitesteket megtisztítottuk és a szérumban lévő antitestekhez hasonlóan elvégeztük a mutánsokkal az epitóptérképezést. A szöveti antitestek a szérumban lévő antitestekhez hasonlóan nem tudtak az RE és REM mutánsokhoz kötődni (2. melléklet 6. ábra). Kimutattuk továbbá, hogy egy olyan monoklonális egér anti-TG2 antitest, melynek epitópját a 153-as glutaminsavra lokalizáltuk (MAb 885), képes volt a coeliakiás szövetben megkötődött IgA antitesteket önmagában is leválasztani a placenta metszetekről, és a TG2-specifikus IgA antitestek az inkubációs pufferben is megjelentek (Simon-Vecsei és mtsai 2012). Az IgA kimutatást a mosófolyadékából az egér antitestek Protein G-konjugált mágneses gyöngyökkel való eltávolítása után, ELISA lemezre kötött vad típusú TG2 antigénnel végeztük. A kompetíciós hatást más epitópspecifitású (CUB7402) anti-TG2 vagy izotípus kontroll monoklonális antitestekkel nem lehetett létrehozni (34. ábra). Ezek a vizsgálatok azt igazolták, hogy az azonosított összetett coeliakia epitóp az antitestek in vivo, betegségfolyamat alatti kötődésében is meghatározó jellegű.

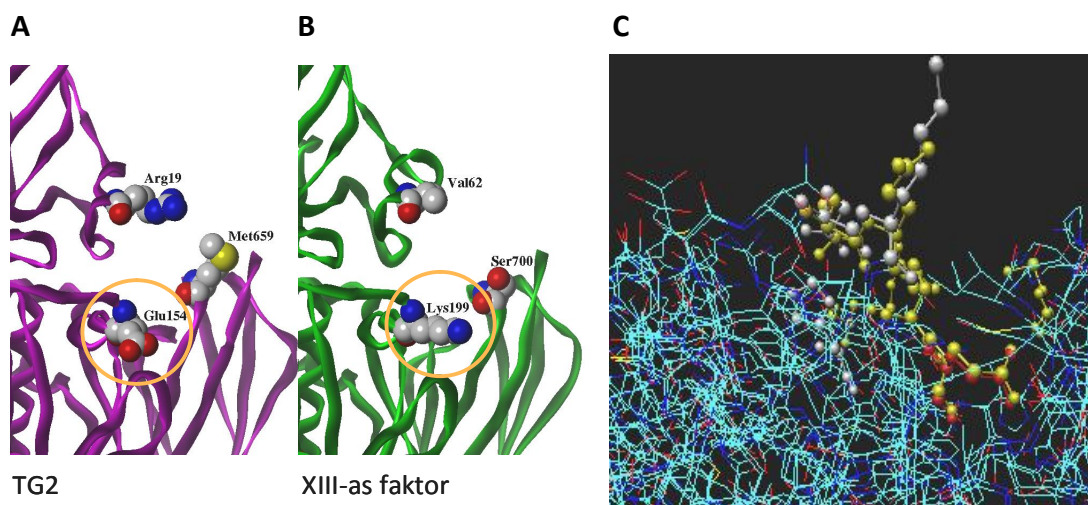


34. ábra. Coeliakiás placenta szövetben lerakódott IgA antitestek (zöld) CUB7402 vagy MAb 885 monoklonális egér anti-TG2 antitestek (piros) hozzáadása után. FITC-jelölt antihuman IgA festés és AlexaFluor594-jelölt anti-egér immunglobulin festés, jobboldalt ELISA mérés rekombináns vad TG2 enzimmel a mosófolyadékból. A nyílak a magzati chorionbolyhokon megkötődött anyai IgA antitesteket jelölik.

5.4.6. Az összetett TG2 epitóphoz való direkt antitestkötődés vizsgálata

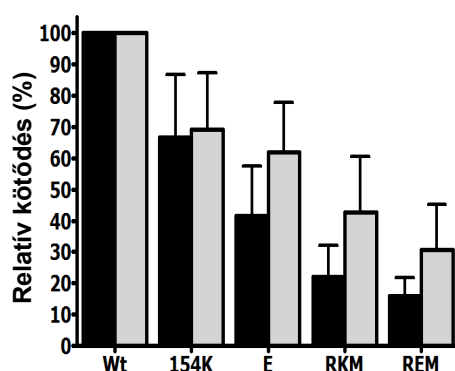
Mivel a coeliakiás antitestek kötődésének csökkenése többféle mutációval is elérhető volt valamint a saját vizsgálatainkkal párhuzamosan különféle ellentmondó irodalmi közlések is megjelentek, melyek a coeliakia kötőhelyét a molekula épp ellenkező oldalán sejtették (Byrne és mtsai 2006, Teesalu és mtsai 2011, Wang Z és mtsai 2012b), fontosnak tartottuk azt megállapítani, hogy a REM mutáció valóban az antitestek kötőhelyét érinti, és nem

indirekt módon, a térszerkezet deformálásával változtatja meg egy távoli kötőhely konformációját. Vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy az aktív helyet érintő legcsekélyebb változás is, amely még nem okoz csökkenést az antigenicitásban (C277S mutáció), már szerkezeti eltéréshez vezet a hélixek arányában (32. ábra), így az aktív hely mindhárom aminosavának cseréje (Byrne és mtsai 2006) nagy valószínűséggel indirekt módon, a konformáció torzításával okozta a coeliakiás antitestek kötődésének elvesztését. Habár a CD spekroszkópia a mi mutánsainknál nem mutatott ilyen eltérést, hasonló mechanizmus a mi mutánsainknál is előfordulhatott. A R19S mutáció megtartott transzamidáló képességgel jár, amellettenek az aminosavnak a cseréje önmagában nem minden betegsavó kötődésének csökkenésével járt (31. ábra C és D), így nem valószínű, hogy térszerkezeti deformitást okozna. Hasonlóan, a M659 mutáció egyedül még jó kötődést tesz lehetővé, ha a TG2 fehérje fibronectin felszínéhez van kötve. Ezért a továbbiakban azt vizsgáltuk, hogyan igazolható, hogy a coeliakia antitestek tényleg a core doménen lévő fő horgonyzópont, a 153-as aminosav közelében kötődnek. A core doménnek ez a területe az állati TG2 fehérjékben nagyfokú homológiát mutat azokban a fajokban, melyekből készített antigénekkal (tengerimalac, patkány, majom) jó hatásfokkal fel lehet ismerni a coeliakiás antitesteket ELISA vagy immunfluoreszcens vizsgálatokkal. Ugyancsak hasonló a TG6 szerkezete is, de a gyenge antigenitású transzglutamináz fehérjékben (TG1, TG3, Band 4.2 fehérje) eltérnek az aminosavak (2. melléklet S1 táblázat). A legfontosabbnak látszó eltérés a XIII-as faktorban található, amely a TG2 154-es glutaminsavának megfelelő 199-es helyen egy bázikus lizint tartalmaz, és amelyet a coeliakiás antitestek nem ismernek fel (Sjöber 2002). A XIII-as faktor kristályszerkezete ismert és azt a TG2 kristályszerkezetével összehasonlítva (35. ábra) azt mutatja, hogy felszínnek ez a része a két oldallánc különbözőségétől eltekintve lényegében azonos, és hogy ezt a két oldalláncot nem kötik hidrogénkötések más felszíni szerkezethez.



35. ábra. A humán TG2 (A) és XIII-as faktor (B) szerkezetének összehasonlítása. Az egymásra vetített kristályszerkezeti ábrán (C) a TG2 coeliakia epitóp körüli felszínét sárga, a XIII-as faktort fehér gömb-pálcika modell jelöli.

A korábban létrehozott E154Q mutáns, mint azt az előzőekben bemutattuk, megtartott antigenitással rendelkezik. Ez azt bizonyítja, hogy az eredetileg savanyú glutaminsav oldallánc semleges glutaminra való cseréje nem jár szerkezeti változással. Az E154Q mutáns transzamidáló képessége is megtartott. Amikor azonban ezt az oldalláncot a XIII-as faktorra jellemző lizinre cseréltük (E154K), az E153S cseréhez hasonló, jól mérhető csökkenés jött létre a coeliakia antitestek kötődésében is, és ez tovább fokozható volt, ha a mutációt az R19S és M659S cserével is kombináltuk (RKM, 36. ábra). Ez az eredmény arra utal, hogy a core domén első héixének tetejét képező 153-as és 154-es aminosavak valóban a kötőhely részét képezik.

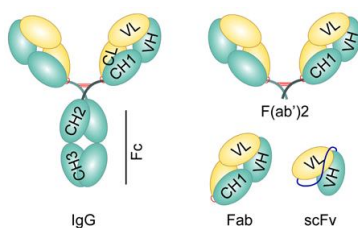


36. ábra. A coeliakia IgA antitestek (n= 20 gyermek savó, fekete oszlopok, 18 felnőtt savó, szürke oszlopok) kötődése a XIII faktor homológ TG2 mutánsokhoz. 154K = E154K, E = E153S, RKM = R19S-E154K-M659S, REM = R19S-E153S-M659S.

5.4.7. Az egyes betegek antitestjeinek epitópspecifitása, kompetíció, betegségsspecifitás

A betegségfolyamatban részt vevő antitestek poliklonálisak és többféle alosztályban (IgA, IgG, IgM) is megjelennek. Egyes korábbi vizsgálatok (Sulkanen 1998, Byrne 2006, Teesalu 2011) az IgG antitestekkel nem tudtak ugyanolyan kötődést kimutatni, mint az IgA antitestekkel. A Sulkanen vizsgálatnál mi magunk észleltük később, hogy ennek az volt az oka, hogy a pozitívnak gondolt standard minta felnőtt coeliakiás savók keveréke volt és nem tartalmazott elegendő mennyiségű specifikus IgG antitestet. Későbbi vizsgálatainkban (Korponay-Szabó 2003b, Simon-Vecsei 2012) azt észleltük, hogy az IgA hiányos coeliakiás betegekből származó IgG antitestek kompetícióba vonhatók más betegek IgA antitestjeivel. Ennek további vizsgálatára IgA kompetens betegek szérumból tisztított IgA és IgG antitestekkel is megismételtük a vizsgálatokat és bizonyítottuk a kompetíciót (2. melléklet S4 ábra). Az egyes epitópspecifitások finomabb vizsgálata azonban monospecifikus antitestek alkalmazását kívánta. Ehhez felnőtt coeliakiás betegek vékonybélbiopsziás mintáiból fág-szelekcióval előállított monospecifikus egyláncú antitesteket (ScFv) használtunk (Marzari 2001). Ezekben a klónozott variábilis V_L és V_H részeket egy kapcsoló régió köti össze, de nem tartalmazzák a CL, CH1, CH2, CH3 részeket.

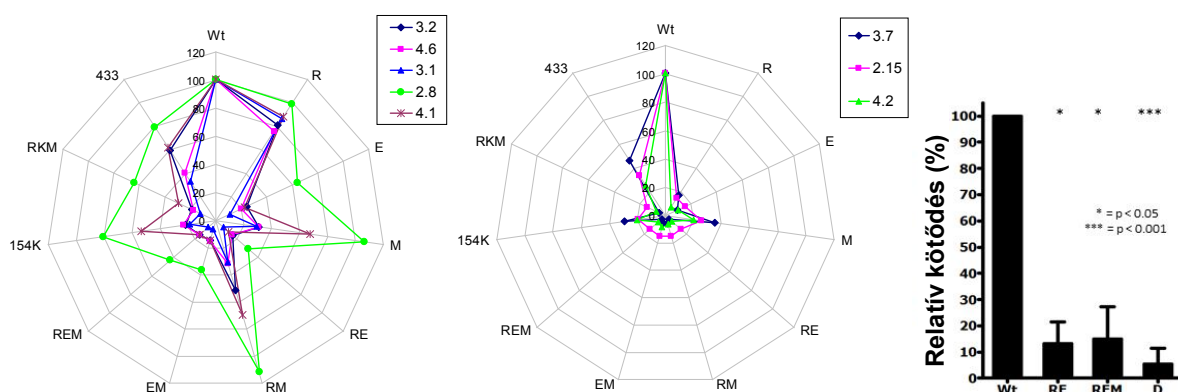
dc_308_11



	2.6	2.8	2.15	2.16	2.18	3.2	3.7	4.1	4.2	4.6	3.1
R433S	98,5	89,3	77,1	87,7	96,5	140,3	93,8	95,8	99,6	87,5	99
E155Q	106	95,3	91,1	81,1	78,3	104,4	95,2	125,4	97,9	103,3	104
E154Q	81,9	71,1	110,5	96,2	98,0	59,7	64,5	71,7	93,2	55,5	69,6
D151N	121	96,3	128,9	111,7	114,2	136,8	105,7	130	102,6	128,1	157,3
151/154/155Q	42,2	75,8	47,7	45,8	56,7	12,1	70,2	57,3	76,6	33,2	64,8
R19S	24,5	68,5	22,7	24,6	20,2	18	20	32,9	9,8	10	29,5
E153S	26,8	66,5	35,3	49,5	60	28,4	60,9	38,8	65	20,8	39,6
E153Q	41,8	78,8	38,3	61,4	61	40,5	61,1	55,8	72,2	33,7	75
19/153S	11,3	40,9	14,1	23,9	21,1	11,4	10,7	13,8	8,3	6	30,7
19/153/659S	2,4	14,1	24,8	26,2	17,2	6,3	4,3	2,6	7,8	2,3	0
RE648	3,3	18,1	59,3	23,3	47	6,7	14,5	17,4	8,6	1,1	17
E158Q	0,6	7,1	45,6	22,5	58,6	5,1	37,2	12,8	44	0,4	18

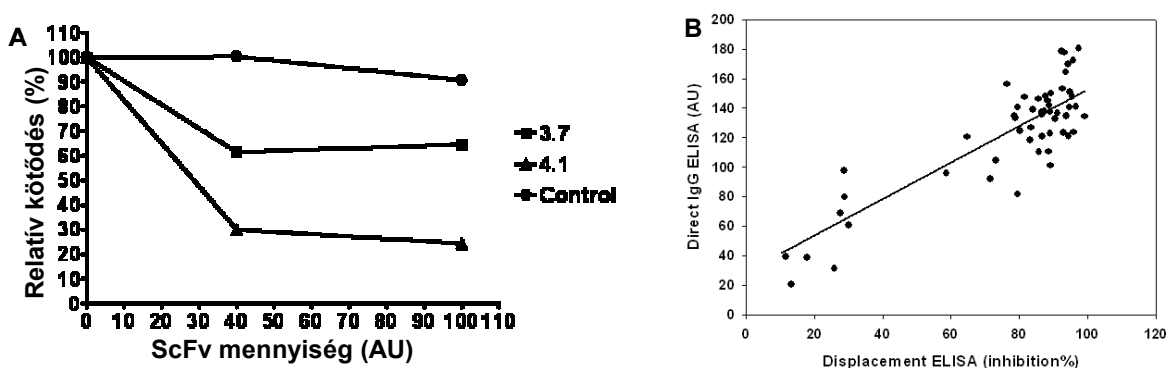
37. ábra. Az egyláncú antitestek (ScFv) szerkezete és az olasz coeliakiás betegekből készített klónok reakciója a coeliakia kötőhely mutánsokkal. RE648 = az 1-648-as aminosav fragmentum az RE mutációval. Sötétkék: 80-100%, világoskék: 60-80%, lila: 40-60%, rózsaszín: 20-40%, piros 10-20%, narancs: <10% kötődési OD arány

Az előzetes tesztelésben részt vevő 11 antitest klón (37. ábra) mindegyike különböző kötődési mintázatot adott, ezzel bizonyítva a klónok egyediségét. A klónok eredetileg 3 olasz felnőtt coeliakiás betegből származtak (2: 5 klón, 3: 3 klón, 4: 3 klón), a mintákat a trieszti kutatócsoporttal folytatott TÉT kollaboráció keretében kaptuk meg vizsgálatra. A monoklonális antitestek kifejezettebb csökkenést mutattak az összetett REM epitóp egy aminosav cserét tartalmazó mutánsaira (R19S, E153E, E153Q), mint a poliklonális betegsavók. Sötét mérhetővé vált csökkenés a core domén első alfa-hélixének tetején lévő 3 aminosav együttes cseréje esetén (D151N-E154Q-E155Q: átlagosan 52.9% kötődés) és néhány klón esetén az E154Q cserénél is, alátámasztva ezzel a XIII-as faktor homológ mutánsokkal kapott eredményeket és a mutált felszínhez való direkt kötődést. A további teszteléshez 8 monoklonális egyláncú antitestből állt rendelkezésre elegendő mennyiség, és ez azt mutatta, hogy kötődési mintázatuk két csoportba sorolható (38. ábra).



38. ábra. Az egyláncú miniantitestek (ScFv) TG100 kalibrációs görbével megállapított relatív kötődési értékei a coeliakia TG2 epitóp mutánsaihoz és az egymáshoz viszonyított mintázat

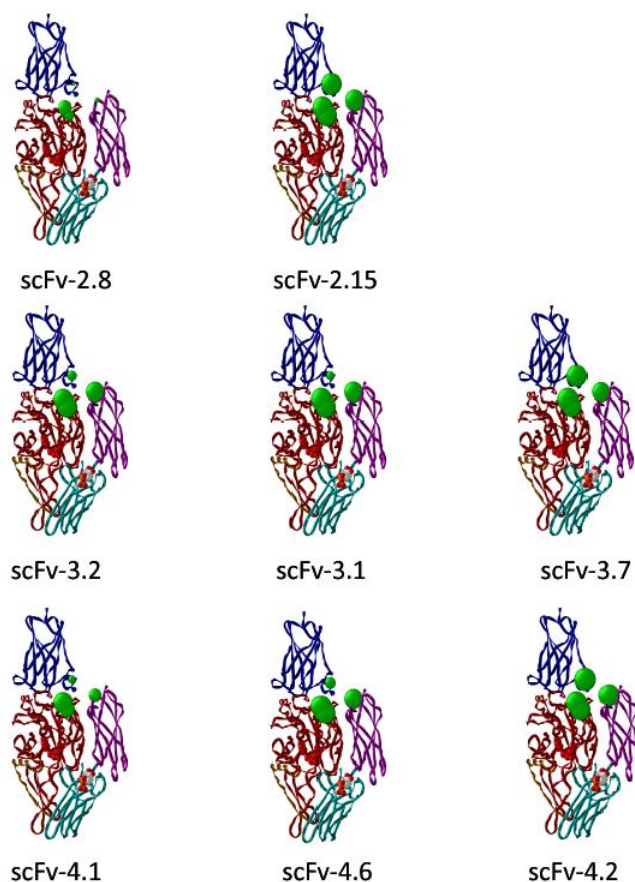
A két csoport lényegében az R19S felismerésében tér el egymástól, a 2.15, 3.7 és 4.2 klónok (2. csoport) nem ismerik fel ezt a mutánst, míg a többi (1. csoport) igen, amelyek számára a core domén egy szűkebb területe látszik elsődlegesen fontos kötőhelynek és az M hely sem olyan jelentős. Ez a variabilitás a magyar betegekből is megfigyelhető (31. ábra C). Az 154K és 433-as fehérjékkel adott alacsony reakció alapján a 2. csoport kötőhelye sokkal nagyobb, ami talán epitope spreading eredménye. Érdekes, hogy ugyanazon betegben mind a két csoportba tartozó klónok előfordultak, de az 1. csoportba tartozók voltak többségben. A kombinált RE és REM mutánshoz azonban minden monoklonális antitest egyformán rosszul kötődött, így megállapítható, hogy ez az összetett epitóp minden coeliakiás betegekre jellemző. Azt, hogy az 1. és 2. csoport antitestjei azonos felszínhez kötődnek, kompetíciós vizsgálatokkal igazoltuk. Az egyik 1. csoportba tartozó ScFv antitestet fág felszínéhez kötött formában is megtermeltük, így a fág rész alapján kötődését szelektíven tudtuk felismerni. A fághoz kötött antitest kötődését a vad TG2 fehérjéhez mind a feleslegben adott 1. csoportú, mind a 2. csoportú monoklonális antitestek zavarták (72% illetve 41% csökkenés, 39A. ábra). A korábbi vizsgálatokban IgA hiányos coeliakiás betegek IgG antitestjeit sikerrel mutattuk ki egy IgA coeliakiás antitest kötődésének a gátlása, kompetíciós hatásuk alapján. További mérésekkel igazoltuk, hogy ez a kompetíciós hatás dóziszfüggő, arányos az IgG antitest szérumszintjével (39B. ábra).



39. ábra. Coeliakiás antitestek kompetíciós vizsgálatai. A. Fághoz kötött egyláncú antitest (ScFv) kötődése ELISA lemezre kötött vad TG2 fehérjéhez oldatban lévő coeliakiás ScFv antitestek (3.7 vagy 4.1) és kontroll ScFv jelenlétében. B. IgA coeliakia antitest kötődése IgA hiányos coeliakiás betegek IgG antitestjeinek jelenlétében az IgA hiányos mintákban lévő TG2-specifikus IgG antitestek mennyiségének függvényében.

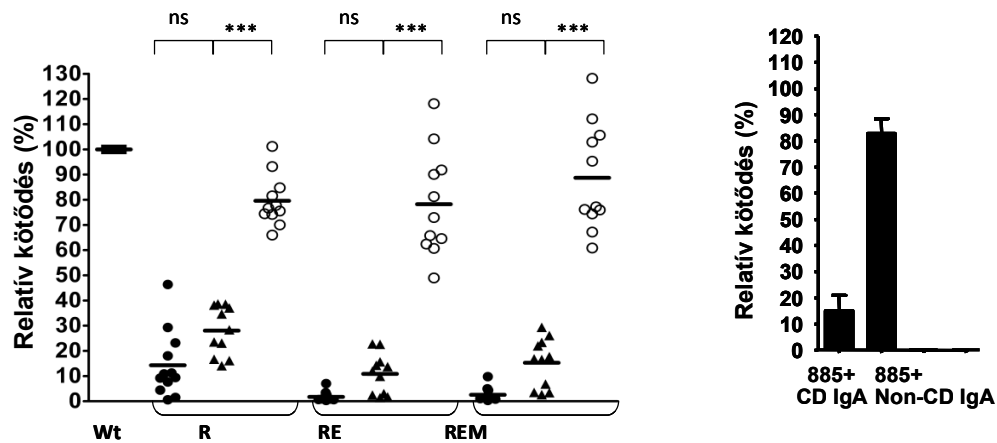
Mindezek alapján az következtetés vonható le, hogy különböző típusú természetes coeliakia antitestek és a molekuláris biológiai eszközökkel előállított miniantitestek különbözőségük ellenére a TG2 azonos felszínének részletéhez kötődnek és ez arra utal, hogy a gluten hatására kialakuló immunreakció határozott szabályok szerint, a TG2 egy kitüntetett epitópja elleni antitestképzést provokál. A betegség folyamán termelődő antitestek epitópspecifitása szűkebb vagy kiterjedtebb lehet, mely bizonyos mértékű epitope-spreading eredménye lehet. Ennek alapján az azonos betegből izolált egyláncú antitestek sorrendbe

állíthatók, valószínűsítve azt, hogy kezdetben a kisebb felületre kötődők provokálódnak (40. ábra).



40. ábra. Egyedi betegekből (2,3,4) preparált egyláncú anti-TG2 monoklonális antitestek epitópjainak összehasonlítása. A zöld gömbök mérete a REM epitópot alkotó 19,153,154,659-es aminosavak relatív fontosságát jelöli a kötődésben.

Annak eldöntésére, hogy ezek a TG2 antitestek csak a coeliakiára jellemzők-e, olyan TG2 antitest tartalmú betegsávókat kerestünk, melyek nem coeliakiás más betegségek esetén jöttek léte. Nagyszámú klinikai minta tesztelése után 11 olyan mintát találtunk, amelyben a TG2 elleni reakció legalább 2 különféle TG2 fehérjével is mérhető volt, de a betegeknek más betegsége volt; coeliakia, vékonybél boholyatrófia nem igazolódott. A végleges klinikai diagnózis 3 esetben SLE, 2 esetben rheumatoid arthritis, 6 esetben Sjögren szindróma volt. A savóminták sem deamidált gliadin peptid elleni antitesteket, sem EMA antitesteket nem tartalmaztak. A fő epitóp mutánsokkal végzett mérés ezeknél a savóknál azt mutatta, hogy a TG2 fehérjéhez való kötődés nem az összetett REM epitóppal kapcsolatos. Viszont azoknál a később coeliakiássá vált betegeknél, akiknél a TG2 antitest pozitivitást a boholyatrófia előtt észleltük (latens coeliakia), a TG2 kötődése az RE és REM mutáns esetén ugyanolyan vagy még nagyobb mértékben csökkent, mint a manifest boholyatrófia idején (41. ábra). Nagyobb számú minta összehasonlításakor azonban a latens és a típusos coeliakia esetek között a különbség nem volt szignifikáns.



41. ábra. Latens (tele körök) és manifeszt (háromszög) coeliakiás betegek valamint nem coeliakiában szenvedő autoimmun betegek (üres körök) szérumban IgA antitestjeinek kötődése A. ELISA lapra kötött vad típusú (Wt) és mutáns TG2 fehérjékhez és B. epitópspecifikus kompetitor (MAb885) jelenlétében vad TG2 enzimhez.

Ezek az eredmények azt igazolják, hogy coeliakiában a betegségre jellemző epitópspecifitású antitestek termelődnek a TG2 ellen már a korai, még boholyatrófiával nem járó időszakban is. Az epitóp különbözősége azzal is alátámasztható volt, hogy a coeliakiás antitestek kötődését a MAb885 kompetitor monoklonális antitest szelektíven gátolta, míg az egyéb anti-TG2 antitesteket nem. E vizsgálatok alapján a coeliakiás anti-TG2 antitestek epitóp kötődési mintázatuk alapján diagnosztikus céllal is elkülöníthetők a más betegségekben termelődő TG2 elleni antitestektől.

5.5. A coeliakia autoantitestek biológiai hatásainak vizsgálata

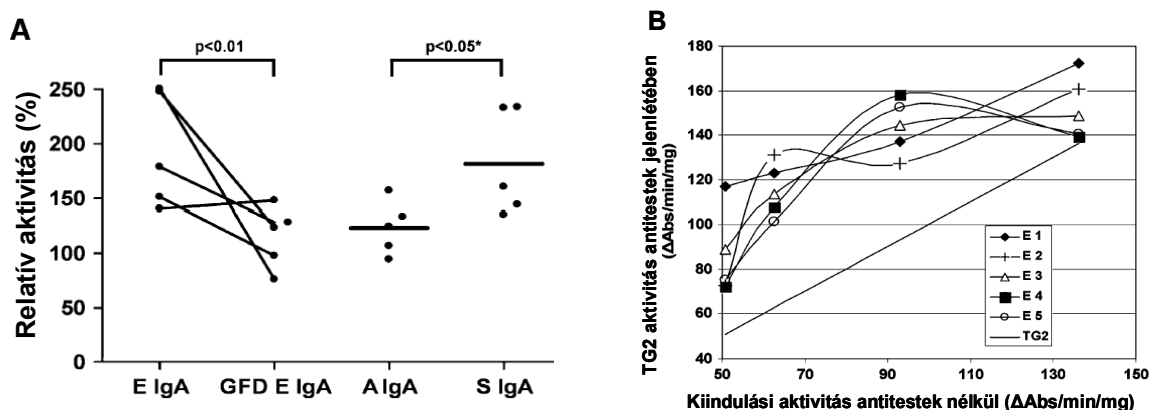
A TG2 enzim sokféle élettani működése, többféle enzimaktivitása és bonyolult szöveti eloszlása alapján többféle hatás is várható, ezek egy része a TG2 nem enzimátikus működéseit is érintheti. Az észlelt hatást befolyásolhatja az aktuálisan jelen lévő TG2 mennyisége, konformációja, a rendelkezésre álló szubsztrátok jellege, mennyisége, a kölcsönható szöveti partnerek jelenléte, valamint a gyulladásos környezet is. A mért hatás az antitestek kötődési aviditása, epitópspecifitása, alosztálya, valamint a mérésre alkalmazott kísérleti rendszer szerint is eltérhet. Azt is számításba kell venni, hogy a coeliakiás betegeknél a TG2-specifikus antitesteken kívül egyéb autoantitesteket (pl. aktin, dezmin, Purkinje sejtek elleni antitesteket) is tartalmazhatnak, és azt sem tudjuk, hogy a gliadin elleni antitesteknek van-e módosító hatása. Ezért nem meglepő, hogy a coeliakia antitestek hatásáról sokféle és néha látszólag egymásnak ellentmondó irodalmi adat található. A TG2 nem állandóan aktív és az extracelluláris környezetben hamar degradálódhat. Az sem ismert, hogy a coeliakia antitestek transzlokálódhatnak-e intracelluláris kompartmentekbe és ott fejthetnek-e ki hatást. A molekuláris biológiai módszerekkel klónozott antitestek nem tartalmazzák az természetes IgA ill. IgG oldalláncait és hatásuk emiatt is eltérhet. A sejtes rendszerekben észlelt hatások különbözhetnek a betegekben létrejövő folyamatoktól és az antitestek hatásának vizsgálatát az is nehezíti, hogy a coeliakiának nincs megfelelő állatmodellje, melyben szövetekhez kötődni képes TG2 elleni antitestek termelődnének. Saját vizsgálatainkban ezért először biokémiai módszerekkel igyekeztünk tisztázni a TG2 enzimátikus működéseire gyakorolt közvetlen hatást, majd sejtes modellekben vizsgáltunk egyes alapvető sejtfunkciókat. Ezen kívül a coeliakiás anyák újszülöttjeiben létrejövő hatásokat tanulmányoztuk.

5.5.1. A coeliakia autoantitestek hatása a transzglutamináz enzimátikus működéseire

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. *J Autoimmun.* 2006;26:278-287.

A korai közlemények (Esposito 2002, Schuppan 2003) alapján kezdetben az a nézet uralkodott, hogy a coeliakiás antitestek a CUB7401 monoklonális egér antitesthez hasonlóan a TG2 protein-kereszt-kötő aktivitását gátolják. Ezeket a vizsgálatokat teljes IgA és IgG frakciókkal vagy egyláncú antitestekkel és sejtlyázumban történő TG2 aktivitásméréssel nyerték. Saját vizsgálatunkban ezért azt tűztük ki célul, hogy 1/ tisztított enzimen mérjük a hatást, 2/többféle reakciót és szubsztrátot vizsgálunk meg, 3/ a betegminták TG2-specifikus antitesttartalmára normalizáljuk az eredményeket, 4/affinitástisztított antitesteket is értékelünk különböző klinikai manifestációval jelentkező betegcsoportokban. A vizsgálatokat korai malabszorpcióval jelentkező coeliakiás gyermekek (n=5), enterális

tünetek nélkül dermatitis herpetiformis miatt diagnosztizált gyermekek (n=5), súlyos tünetekkel (n=5) vagy családszűréssel (n=5) diagnosztizált felnőttek és IgA hiányos betegek (n=5) valamint normál kontrollok (n=3) alkalmazásával végeztük. Az enzimreakciót ELISA-lapon immobilizált dimetil-kazeinbe történő amin-beépítéssel, ammónia felszabadulását mérő folyékony fázisú esszével és radioaktív putrescin beépítés vizsgálatával egyaránt mértük. Esposito vizsgálataihoz hasonló körülmények között, NB4 sejtekben expresszált TG2-tartalmazó sejtlyázumhoz putrescint adva, mi is többnyire mérsékelt gátlást észleltünk a coeliakiás antitestek jelenlétében, de ha rekombináns TG2 enzimet vagy magával az enzimmel tisztított antitestfrakciókat használtunk, jól reprodukálhatóan fokozott TG2 aktivitást lehetett mérni többféle mérési eljárással is. A legkifejezettebb aktiváló hatást (125-242%) a súlyos felszívódási zavarral a korai gyermekkorban manifesztálódó betegek antitestjeinél észleltük, mely arányos volt a specifikus antitestek koncentrációjával, diéta mellett eltűnt és mind a folyékony fázisú mérési rendszerben, mind ELISA lapra kötött dimetil-kazein szubsztrát alkalmazásával mérhető volt. Ez az aktiváló hatás jellemző volt a súlyos tünetekkel jelentkező felnőttekre is, szemben azokkal, akiknél enyhe tünetek vagy családszűrés folytán derült ki a coeliakia fennállása (42. ábra).



42. ábra. A. Súlyos klinikai tünetekkel jelentkező coeliakiás gyermekek (E IgA) és felnőttek (S IgA) valamint családszűréssel diagnosztizált felnőttek (A IgA) tisztított TG2-specifikus antitestjeinek hatása a fibronectin felszínére kötött rekombináns TG2 enzim transzamidáló hatására. Az aktiváló hatás glutenmentes diéta után már nem mérhető. B. Az E csoport antitestjeinek aktiváló hatása az enzim bazális aktivitásának függvényében.

A totál IgA (IgG) frakcióval történő méréseknél kimutattuk, hogy az abszolút immunglobulin érték helyett a tisztított frakció TG2-specifikus antitest tartalmára normalizált eredmények adnak csak összehasonlítható értékeket: ilyen körülmények között az enyhe klinikai tünetekkel diagnosztizált idősebb gyermekek és felnőttek, valamint az IgA hiányos betegek antitestjeivel is homogén aktiváló hatást mutattunk ki, míg a CUB7401 antitest minden mérési szituációban szinte teljes mértékben gátolta a TG2 aktivitást. Későbbi vizsgálataink igazolták, hogy a vizsgált betegminták mind a TG2 összetett (REM) epitópjára voltak specifikusak, míg a CUB7401 más TG2 epitópot ismer fel.

Az enzimre gyakorolt aktiváló hatás biokémiai vizsgálata során különböző szubsztrátok alkalmazásával kimutattuk, hogy a coeliakiás antitestek az enzimreakció mindkét fázisát, a

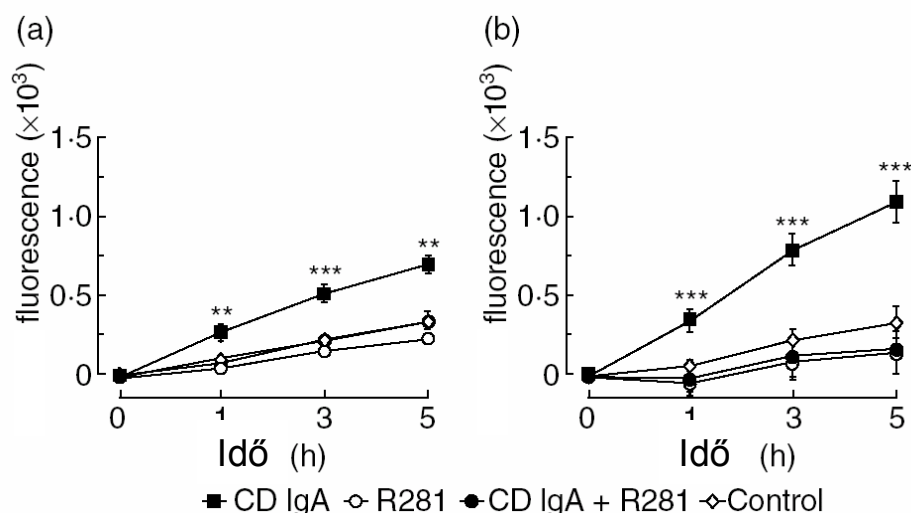
tioészter képződést és a keresztkötés kialakulását is gyorsítják, vagy megfelelő amin acceptor hiányában a deamidálást fokozzák. Az enzimaktivitás „fokozásának” mibenléte érdekes kérdés volt. A kiegészítő vizsgálatok arra utaltak, hogy ez valószínűleg a szerkezet stabilizálásából adódik. Az enzim igen érzékeny, hosszabb inkubálási idő után fokozatosan elveszti aktivitását, míg az antitestek jelenlétében tovább képes dolgozni. Ez a stabilizáló hatás függ az enzim eredeti állapotától: ha az aktivitás eleve magas, azt az antitestek már nem tudják tovább fokozni, de a közepes vagy gyengébb aktivitású enzimet stabilizálhatják (42. ábra). Mivel az ismételtén igazolható volt, hogy a TG2 a megkötött antitestek jelenlétében is folyamatosan felhasználja a szubsztátokat és tovább gyártja a reakcióterméket, ezek a vizsgálatok még a coeliakia epitóp azonosítása előtt jelezték, hogy a coeliakia antitestek primer kötőhelye nem lehet az enzim aktív centruma. Annak igazolását, hogy az antitestek valóban kötve vannak az enzimhez a reakció alatt, úgy végeztük, hogy TG2 enzimet fibronectinnel fedett ELISA laphoz adtuk, mely az extracelluláris viszonyokat utánozza. Ezután inkubáltuk az enzimet az antitestekkel és az enzimreakció indítása előtt kimostuk a meg nem kötődött nonspecifikus IgA/IgG-t. Hasonló rendszerben igazoltuk, hogy a coeliakia antitestek nem csak a rekombináns TG2 fehérjét képesek aktiválni, hanem NB4 sejtek lizátumából a fibronectines lemezen megkötődött és így tisztított természetes TG2 enzimet is. Ezért az antitestek jelenlétében kialakuló csökkent enzimaktivitásért a sejtizátumban jelen levő egyéb sejt-komponensek vagy fehérjék lehetnek felelősek. Az intakt sejt rendszerben a TG2 meghatározott kompartmentekben van jelen és főként az extracelluláris matrixban a fibronectin felszínén aktív. A fibronectinhez kötött enzimmel kapott eredmények az *in vivo* viszonyokra nézve sokkal relevánsabbnak látszanak, mint a szétroncsolt sejt-tartalommal való mérések. Folyékony fázisban történő enzimreakció esetén nonspecifikus csökkenés vagy fokozódás is előfordulhat, a konkrét kötődési partnerektől függően. Ezek az eredmények összhangban vannak azokkal a korábbi megfigyelésekkel, hogy a vékonybélben a coeliakia aktív fázisában fokozódik a TG2 expressziója és aktivitása (Esposito és mtsai 2001), és magunk is szövetmetszeten végzett immunfluoreszcens vizsgálatokkal a primer aminok beépülésének fokozódását tudtuk kimutatni. A későbbiekben mások is kimutatták, a mi általunk alkalmazottól eltérő körülmények között is, hogy az antitestek kötődése nem gátolja meg a keresztkötések létrejöttét (Dieterich 2003), így nem valószínű, hogy a coeliakia antitestek primeren a TG2 gátlásával fejtenék ki hatásukat. Az enzim működésének fokozódását a továbbiakban leírt sejt-es modellek vizsgálatokor is észleltük (Myrsky és mtsai 2009b, Caja és mtsai 2010, Martucciello és mtsai 2012).

Méréseinkben a coeliakia antitestek más hatásaként a GTP-áz működés mérsékelt csökkenését észleltük (67-73.4%-ra). Ennek *in vivo* relevanciája még nem eldöntött, mivel nem biztos, hogy az autoantitestek a sejten belüli TG2 fehérjéhez kapcsolódni tudnak.

5.5.2. A coeliakia autoantitestek hatása a hámsejteken át történő gliadin transzportra

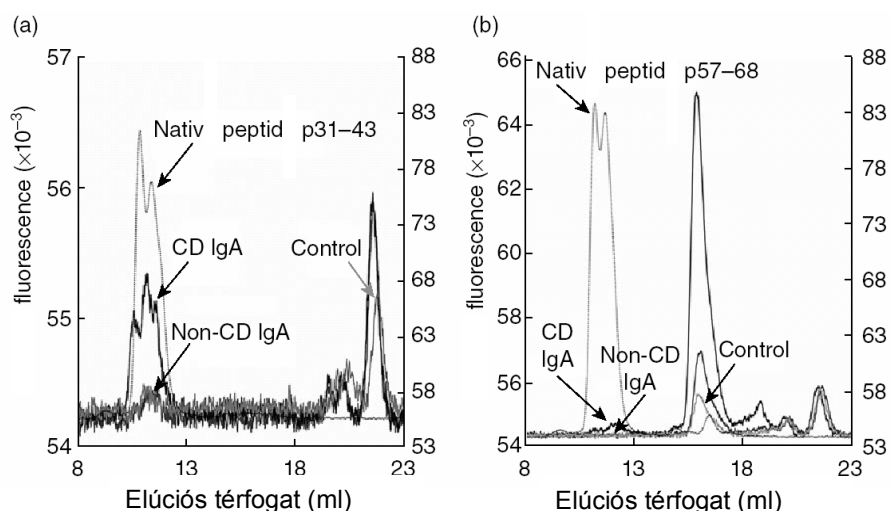
Rauhavirta T, Qiao SW, Jiang Z, Myrsky E, Loponen J, Korponay-Szabó IR, Salovaara H, Garcia-Horsman JA, Venäläinen J, Männistö PT, Collighan R, Mongeot A, Griffin M, Mäki M, Kaukinen K, Lindfors K. Epithelial transport and deamidation of gliadin peptides: a role for coeliac disease patient immunoglobulin A. Clin Exp Immunol. 2011;164:127-136.

A hámsejtek képezik az első védelmi vonalat a gliadin belépésekor és a hámsejtek alatti rétegben, a TG2 felszínén rakódnak le *in vivo* az antitestek. A TG2 antitestek kiválasztódnak a bélnedvbe (Mawhinney 1975), így a lumen felől is elérhetik a hámsejteket és ezért hatásuk a patomechanizmus szempontjából releváns lehet. Munkacsoportunk korábbi vizsgálataiban (Halttunen 1998) kimutatta, hogy a coeliakia antitestek *in vitro* gátolják a hámsejtek differenciálódását és növelik proliferációjukat. Vizsgálatainkat Caco2, konfluens réteget képező colon carcinoma sejteken végeztük, melyek vékonybél jellegű differenciálódásra és barrierképzésre képesek. A vizsgálatokhoz lissamine-nal jelölt gliadin peptideket használtunk, az alfa-gliadin 31-43. aminosavait reprezentáló klasszikus „toxikus” peptidet (LGQQQPFPPQQPY) valamint és 57-68. aminosavakat reprezentáló ún. „immunogén” peptidet (QLQPFPPQLPY), natív és deamidált formában. Kontrollként egy irreleváns peptidet alkalmaztunk. A peptidek apikális és bazális koncentrációját a lissamine fluoreszcencia mérésével, az áthaladó peptidek méretét HPLC-vel vizsgáltuk. A peptidek immunogén tulajdonságait egy, a deamidált gliadin peptidre specifikus coeliakiás betegből származó T-sejt klónra gyakorolt aktiváló hatás alapján állapítottuk meg, radioaktív timidin jelöléssel. Coeliakiás betegek (n=11) szérumból tisztított IgA antitestek mindkét peptid áthaladását megnövelték a transwell lemezekon növesztett Caco2 sejtrétegen, de nem befolyásolták a gliadin peptidek paracelluláris barrierre kifejtett hatását. A coeliakiás IgA hatása aktív hely-specifikus TG2 inhibitor (R281) alkalmazásával megszüntethető volt, ez arra utal, hogy a folyamat során a TG2 aktivációjára kerül sor (43. ábra).



43. ábra. Fluoreszcens lissamine jelölésű 31-43 gliadin peptid (a) és 57-68 gliadin peptid (b) konfluens Caco2 hámsejtrétegen át történő transzportja coeliakiás antitestek (CD IgA) és TG2 inhibitor (R281) jelenlétében **p<0.01, ***p<0.001 az R281 jelenlétében történő áthaladáshoz viszonyítva

A fokozott TG2 aktivitást a Caco2 sejtekkel végzett ELISA vizsgálattal is igazoltuk. A tanulmányban azt is vizsgáltuk, hogy a jelölt peptidek degradálódnak-e a hámsejteken való áthaladás során. A 31-43 peptid jelentős része bontatlan formában megtalálható volt sejtréteg bazális oldalán. A 57-68 peptid nagyobb fokú degradációt mutatott, de a bazális oldalon megjelenő rövidebb peptid még hatásosan aktiválta a gliadin-specifikus T-sejteket. Érdekes viszont az, hogy az 57-68 peptid már a hámsejtek apikális oldalán nagyrészt deamidálódott és így a coeliakia-specifikus T-sejtekre nagyobb aktiváló hatást gyakorolt, mint a natív peptid. Ez támogatja azt a nézetet, hogy már a béllumennel határos sejtfelszíneken jelentős TG2 aktivitással kell számolni, mely a deamidációt még a hámsejtbe való belépés előtt lehetővé teszi (44. ábra).



44. ábra. Transwell membránra helyezett Caco2 sejtréteg basalis médiumából HPLC kromatográfiával meghatározott peptidek fluoreszcens lissamine jelölésű 31-43 gliadin peptid (a) és 57-68 gliadin peptid (b) apikális alkalmazása után (bal y-tengely). Halványszürke vonal a kontrollként közvetlenül hozzáadott natív peptid elúciós helyzetét (jobb y-tengely). Control: IgA hozzáadása nélküli kísérlet.

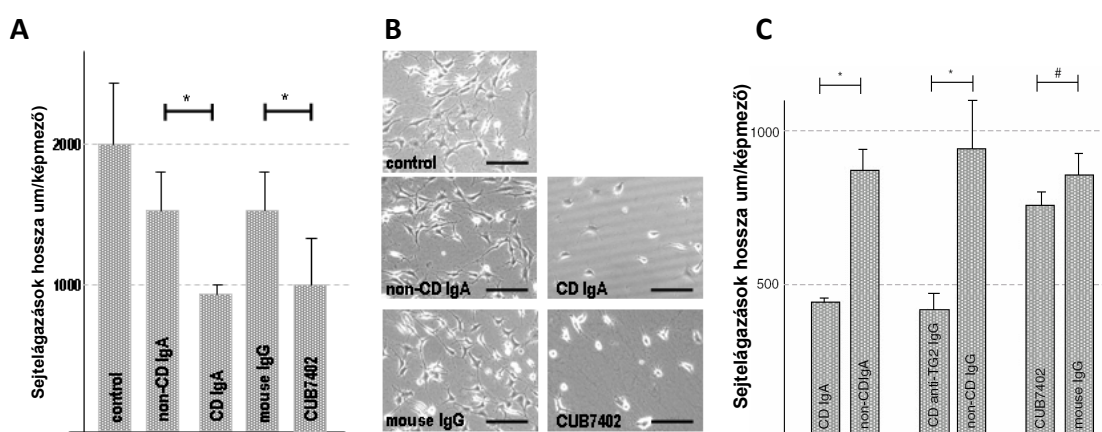
5.5.3. A coeliakia autoantitestek hatása az angiogenesisre

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;152:111-119.

A coeliakia antitestek a szövetekben a kiserek mentén kötődnek és a TG2 szerepet játszik az angiogenesisben (Haroon és mtsai 1999), így az endotél sejtekre gyakorolt biológiai hatás vizsgálata is relevánsnak látszik a coeliakia megértéséhez. Kezdeti tájékozódó vizsgálatunk során kimutattuk, hogy a súlyosan atrófiás coeliakiás vékonybél nyálkahártya érhalózata rendellenes: a kapillárisok száma megkevesbedett és lefutásuk eltér a szokásostól. Azt is kimutattuk, hogy az endothel sejtekhez képest kevesebb a simaizom sejtek aránya ezekben a kiserekben (Myrsky és mtsai 2009a). Ezért *in vitro* is vizsgáltuk normál endotél sejtek (human umbilical cord vein endothelial cells, HUVEC) differenciálódását (Myrsky 2009b). A sejteket kereskedelmi forrásból (Lonza) szereztük be vagy Palatka és munkatársai szerint (Palatka és mtsai 2006) normál újszülött köldözsínórból preparáltuk. A HUVEC sejtek I-es

típusú kollagénnel bevont tenyésztő edényekben megnyúlnak és 24-72 óra alatt elágazódó érszerű képződményeket kezdenek építeni. Kollagén I. gélben vagy komplex kötőszöveti és bazálmembrán alapanyagokat tartalmazó gélben (Matrigel, BD Laboratories) szuszpendálva pedig háromdimenziós, hexagonális elrendeződésű értubulusokat hoznak létre.

Kísérleteinkben a tubulusképzést coeliakiás és kontroll antitestek (anti-TG2 CUB7402, izotípus kontroll) jelenlétében vizsgáltuk. A coeliakiás betegsavókból totál IgA frakciót és egy IgA hiányos coeliakiás beteg szérumból affinitás-tisztított TG2-specifikus coeliakiás IgG antitesteket preparáltunk (az IgA tisztítás technikai nehézségei miatt). Mindkét fajta coeliakiás antitest egyformán lecsökkentette az endotél sejtek valamint a képzett érszerű formációk hosszát (45. ábra), gátolta a sejtek migrációját és az aktin citoskeleton deformálódását okozta, míg a CUB7402 antitest ezeknek a tulajdonságoknak csak egy részét (migráció) befolyásolta hasonló mértékben. A humán endotél sejtek és egér embrionális mesenchymális sejtek (C3H/10T1/2) együtt tenyésztése során mind a coeliakiás antitestek, mind a CUB7402 mellett csökkent az angiogenesis.

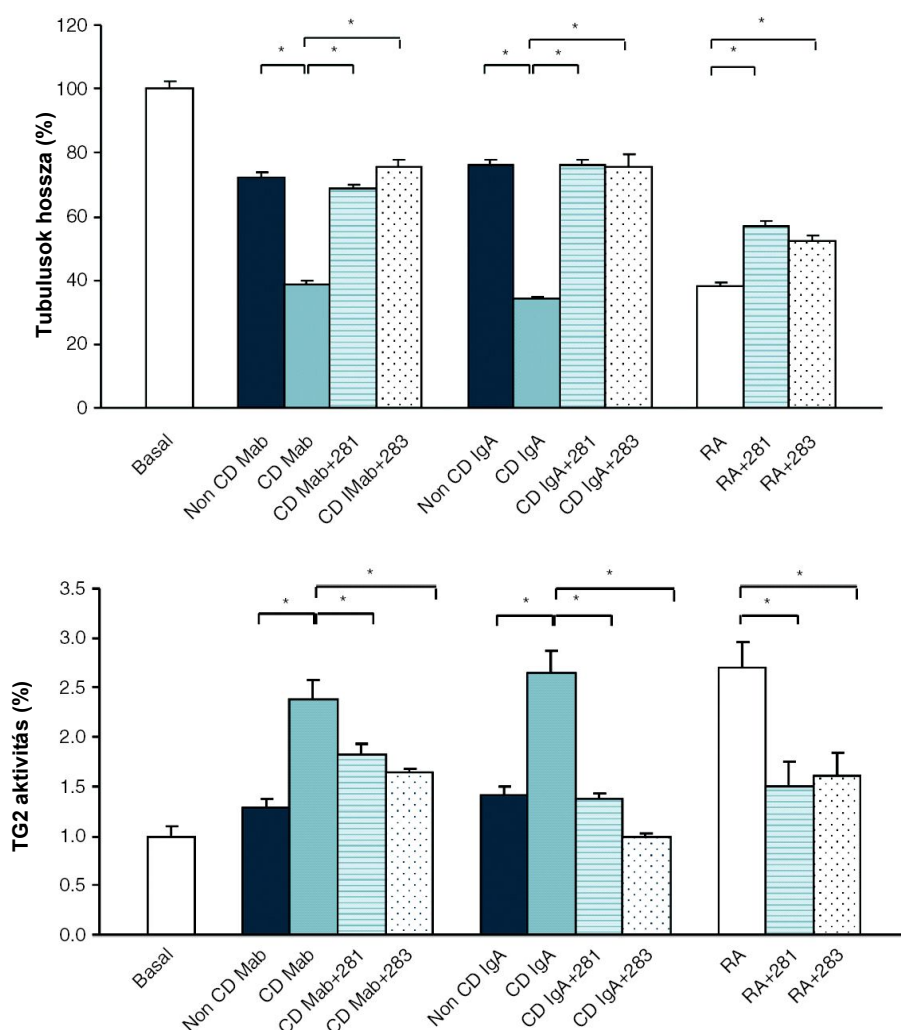


45. ábra. A coeliakia-specifikus IgA, IgG antitestek és egér monoklonális anti-TG2 antitestek (CUB7402) hatása endotél-mesenchymális sejtek együttes (A,B) tenyésztése során a képzett érformációk hosszára (A), a sejtek migrációjára (B) és csak endotél sejtekből álló tenyészet érképzésére (C). A CUB7402 hatása a kísérleti körülményektől függően változó, a coeliakiás IgA és affinitástisztított TG2-specifikus coeliakiás IgG hatása mindkét kísérleti rendszerben gátló volt.

Ezek a kísérletek arra hívták fel a figyelmet, hogy a coeliakia antitestek hatása sokkal komplexebb, mint a TG2 egyszerű gátlása. Felmerült az a kérdés is, hogy a coeliakiás szérumokban lévő egyéb (gliadin vagy aktin elleni) antitestek mennyiben felelősek ezekért a hatásokért. A TG2 antigénnel tisztított coeliakiás IgG antitestek hatása azonban egyezett a teljes IgA frakcióval nyert eredményekkel, így ez arra utal, hogy a fő hatásért a TG2 elleni antitestek felelősek. Az antitesttisztítás nehézségei miatt a további kísérletekben a teljes IgA mellett a hatás TG2 függőségének ellenőrzésére fág display segítségével klónozott monoklonális TG2 elleni egyláncú antitesteket alkalmaztunk.

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. *Scand J Gastroenterol.* 2010;45:421-7.

A HUVEC vizsgálatok érdekesnek tűntek az angiogenesisre gyakorolt hatás további részletes vizsgálatára és a kezdetben bonyolult kiértékelést egyszerűsítve és jobban standardizálva nagyobb számú független, finn és magyar coeliakiás betegsávból tisztított antitest készítménnyel is sikerült a korábban észlelt hatást stabilan reprodukálni mind a kollagénes, mind a matrigeles rendszerben. A fágban kifejezett egyláncú antitestek közül (CD Mab) legmegfelelőbbnek a 4.1 klónt találtuk, ezzel az azonos TG2 epitópra kötődést független vizsgálatokkal is kimutattuk (72. oldal). A 4.1 klónnal végzett kiegészítő kísérletekben igazolni lehetett, hogy hatása és a coeliakiás IgA frakció hatása azonos és a TG2 fokozott extracelluláris aktivitásával jár. Az angiogenesisre gyakorolt hatást TG2 inhibitor (R283) gátolta. A gátlás a sejtekbe be nem hatoló R281 alkalmazásával is kiváltható volt. A sejtek össz TG2 tartalma Western blot szerint nem változott, így a TG2 enzimátikus működését fokozó antitesthatás elsősorban az extracelluláris térben látszik jelentősnek (46. ábra).

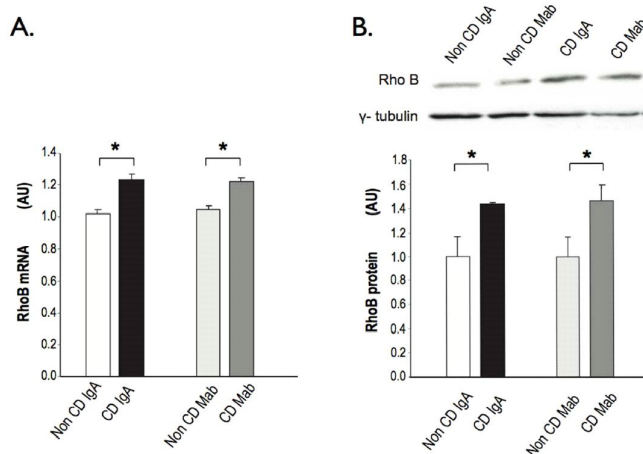


46. ábra. A coeliakiás IgA és egyláncú monoklonális coeliakia antitestek (CD Mab) hatása az angiogenesisre és a TG2 aktivitására endotél sejtkultúrában TG2 inhibitorok (R281, R283) jelenlétében, * $p < 0.001$.

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;66:3375-3385.

Martucciello S, Lavric M, Tóth B, Korponay-Szabó IR, Nadalutti C, Myrsky E, Rauhavirta 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 (Berl)*. 2012 Jan 6. Epub

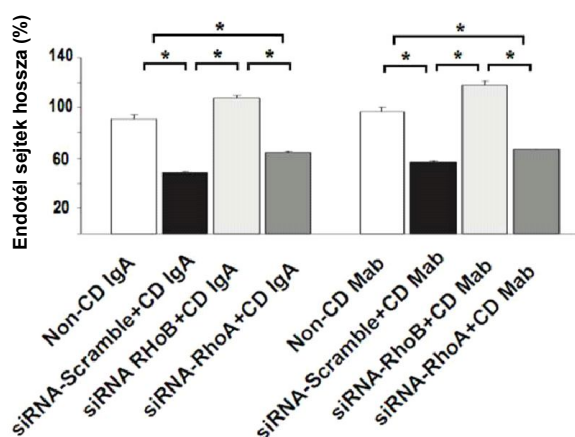
A további két közleményben a fokozott TG2 aktivitás következményeit és az antitestek hatásának jelátviteli útjait vizsgáltuk. Egyrészt kimutattuk, hogy az endotél sejtek működésében más zavarok is kimutathatók: a coeliakiás antitestek hatására fokozódik a paracelluláris érpermeabilitás, a limfociták adhéziója és transzendoteliális migrációja és fokozódik az E-selectin expresszió. Ezek a hatások is fokozott extracelluláris TG2 enzimatis aktivitással jártak, blokkolhatók voltak R281 TG2 inhibitorral és nem jöttek létre a TG2 aktivitást gátló CUB7402 antitest jelenlétében. A érbarriert károsító hatás jelentős lehet in vivo körülmények között és a vékonybélben zajló gyulladás fokozódásához vezethet. A vaszkuláris hyperpermeabilitás alapján a ras homolog gene family member (Rho) jelátviteli rendszer aktiválódását valószínűsítettük. A fokozott RhoA aktivitás gyári kittel is mérhető volt és C3 transzferáz endotoxin előkezeléssel, mely a Rho fehérjét gátolja, a coeliakiás antitestek hatásai csökkenthetők voltak. A sejtfiziológiai ismeretek alapján elsősorban a RhoA aktivitásának fokozódása látszott valószínűnek, a második cikkben azonban kimutattuk, hogy az antitestek angiogenesisis gátló fő hatásának hátterében inkább a RhoB anyagcsereút állhat. A C3 transzferáz mindkét Rho fehérjét gátolja, és az RhoA aktivitás mérésére forgalmazott kit a RhoB aktivitást is méri. A RhoB szerepére az endotél sejtekkel végzett RNS microarray vizsgálat hívta fel a figyelmet, ahol a RhoB fokozott expresszióját észleltük a fibronectin fokozódásával párhuzamosan és az integrin 1β csökkenés mellett. A RhoB fehérje mennyisége blot és immunfluoreszcens festés alapján is magasabb volt a coeliakiás antitestek jelenlétében az in vitro endotel modellben illetve egér bőre alá beültetett matrigelben, melyben kívülről bevitt humán endotel sejtekkel angiogenesisis indukáltunk (47. ábra).



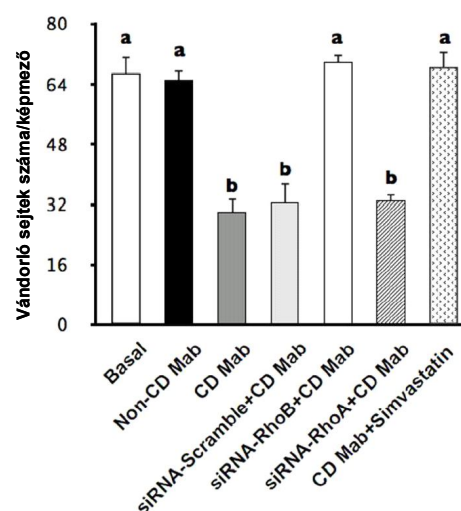
47. ábra. A Rho B mérése mRNS (A) és fehérjeszinten (B) az endotél modellben coeliakiás IgA antitestek illetve egyláncú monoklonális 4.1 coeliakiás (CD Mab) antitest jelenlétében, * $p < 0.05$.

A RhoB termelés csendesítése interferáló RNS segítségével jelentősen mérsékelte a coeliakia antitestek jelenlétében észlelt differenciálódási és sejtmigrációs zavart, akár IgA frakciót, akár coeliakiás betegekből preparált egyláncú monoklonális 4.1 antitesteket használtunk, a RhoA csendesítése azonban nem. Ugyancsak kompenzálta a coeliakiás antitestek angiogenezist csökkentő hatását simvastatin hozzáadása, mely a RhoB megfelelő működéséhez szükséges poszttranszlációs módosítást (farneziláció) gátolja (48. ábra). Mivel a simvastatin általánosan használt gyógyszer a koleszterinszint csökkentésére, ígéretesnek látszik további vizsgálata, hogy képes-e mérsékelni a coeliakiával kapcsolatos vékonybél boholykárosodást.

A



B



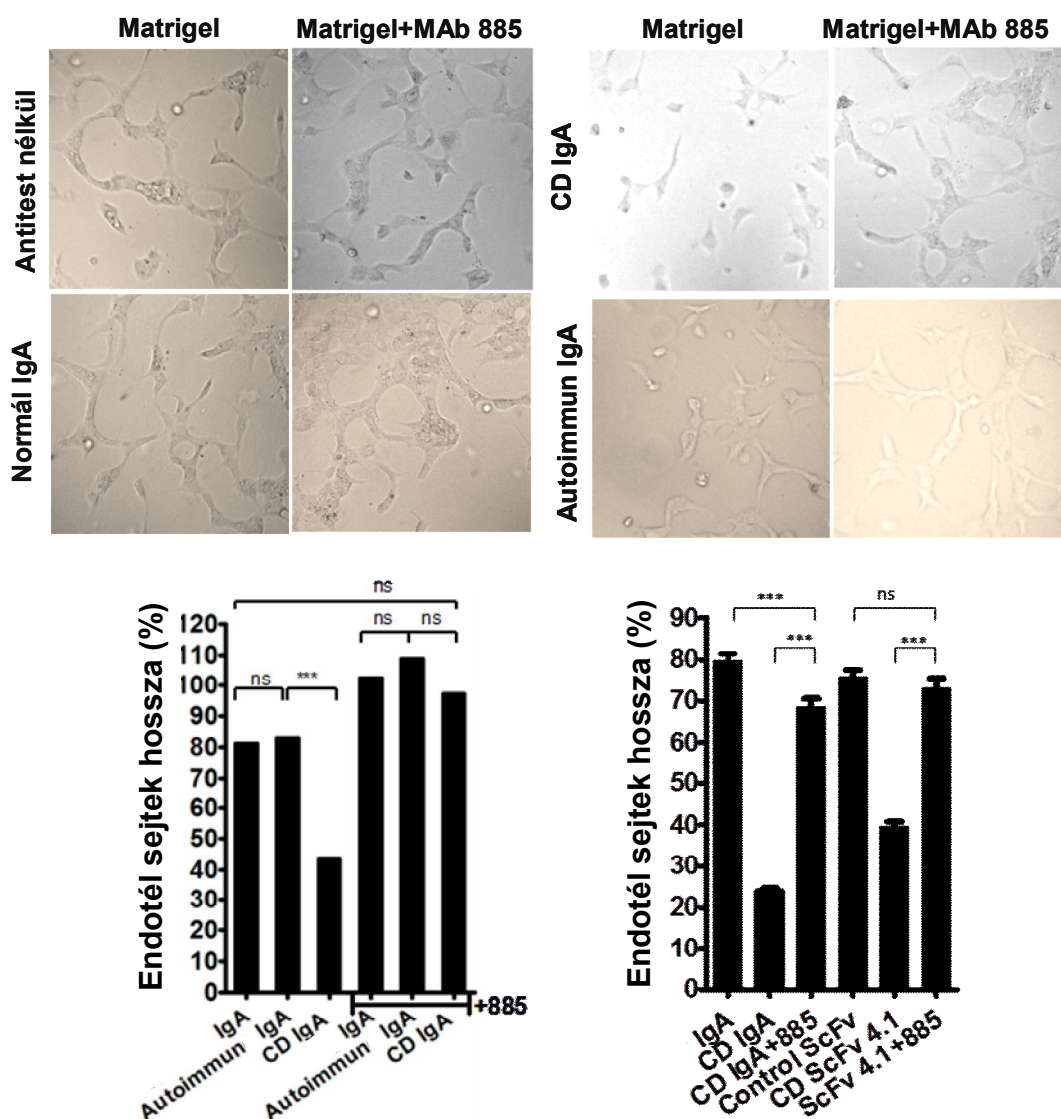
48. ábra. A coeliakiás IgA és egyláncú monoklonális coeliakia antitestek (CD Mab) hatása az angiogenezisre (A) és az endotél sejtek vándorlására (B) Rho fehérjét csendesítő RNS és kontroll (scramble) RNS jelenlétében, * $p < 0.0001$, illetve a és b között a B panelen.

5.5.4. A coeliakia antitestek biológiai hatásának szelektív gátlása *in vitro*

Simon-Vecsei Z, Király R, Bagossi P, Tóth B, Dahlbom I, Caja S, Csősz E, Lindfors K, Sblattero D, Nemes É, Mäki M, Fésűs 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.

Az 5.4. fejezetben leírt vizsgálatok alapján igazoltuk, hogy a természetes coeliakia antitestek és a klónozott 4.1 egyláncú antitestek a TG2 azonos konformációs epitópjához kötődnek, míg az egyéb betegségekben keletkező anti-TG2 antitestek más epitópot ismernek fel. Ezért további vizsgálatainkkal azt kívántuk megállapítani, hogy melyik epitóp releváns az *in vitro* modellekben észlelt hatások közvetítésében. Ezért az endotél sejtek differenciálódását a fentiek szerinti matrigelben rendszerben normál szérumból preparált IgA, coeliakiás IgA és nem-coeliakiás betegek savójából tisztított anti-TG2 antitesteket tartalmazó IgA jelenlétében vizsgáltuk, majd ezekben a vizsgálatokban az antitesteket egy kompetitor monoklonális egér antitesttel (Mab885) együtt alkalmaztuk, mely a coeliakiás epitóp egyik

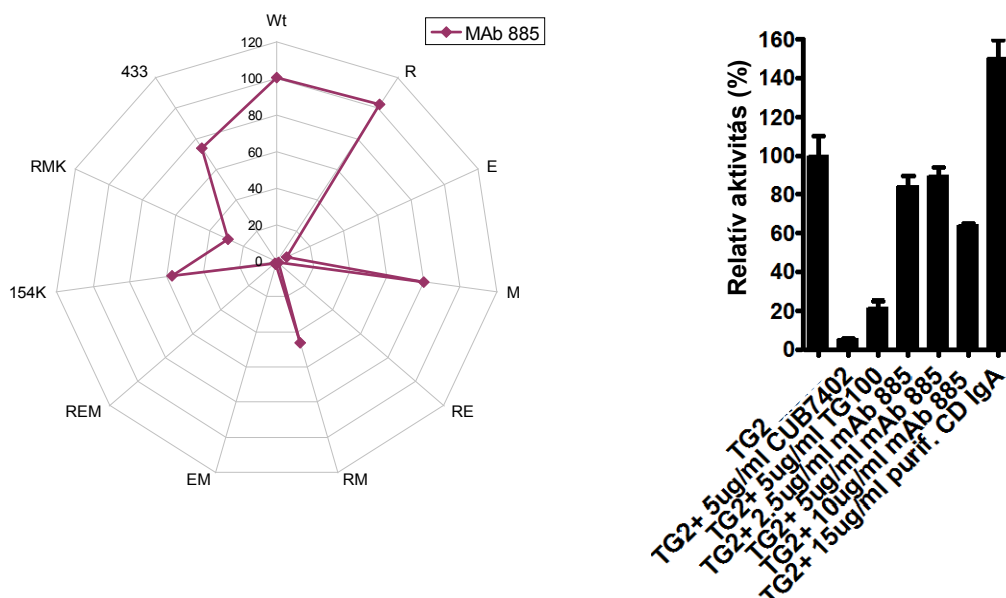
fő aminosavához, a 153-as glutaminsavhoz kötődik és ELISA rendszerben interferál a coeliakiás antitestek kötődésével. Ebben a modellben a MAb885 megakadályozta a coeliakiás IgA és a 4.1 monoklonális coeliakiás antitest angiogenesisis gátló hatását is. A nem-coeliakiás autoimmun IgA csak nonspecifikus hatással rendelkezett, mely a normál IgA hatásától nem tért el, és erre a MAb885 szelektív hatást nem gyakorolt (49. ábra). Ezek az eredmények igazolják, hogy az endotél-sejtes kísérleti rendszer a fő coeliakia TG2 epitóp közvetítésével kialakuló biológiai hatást mér.



49. ábra. Normál (IgA), autoimmun és coeliakiás betegekből preparált IgA és egyláncú monoklonális coeliakiás antitest (ScFv) hatása az angiogenesisre a MAb885 antitest jelenlétében, *** $p < 0.001$.

Érdekes eredmény volt, hogy a MAb885 hatása ellentétes volt a coeliakiás IgA hatásával, annak ellenére, hogy azonos epitópon valósul meg. Ennek oka a TG2 mutánsokkal végzett epitóptérképezés alapján feltehetően az, hogy a MAb885 csak az epitóp core doménen lévő részéhez kötődik (50. ábra). Ezért részletesebben is megvizsgáltuk a MAb885 TG2

enzimaktivitásra gyakorolt hatását. A MAb885 nem gátolta a transzamidálást még a CUB7402-nél négyszer nagyobb adagban sem, és nem is fokozta, ahogy a coeliakiás IgA antitestek (50. ábra). A MAb885 ezért egy lehetséges terápiás eszköznek látszik a coeliakiás antitestek biológiai hatásainak gátlásában, és előnyös az, hogy káros hatást nem gyakorol a TG2 működésére. Hatását komplexebb rendszerekben tovább fogjuk vizsgálni. Gyógyítási és diagnosztikus alkalmazására a Debreceni Egyetem a fenti eredmények alapján szabadalmi bejelentést nyújtott be (Korponay-Szabó IR és mtsai, PCT WO 2010/116196 A2).



50. ábra. A 885 monoklonális anti-TG2 antitest epitópspecifitása és hatása a TG2 transzamidációs működésére immobilizált szubsztátot tartalmazó mérési rendszerben, melyben a CUB7402 és TG100 antitestek gátlást, a coeliakiás IgA antitestek aktivitásfokozódást váltanak ki.

5.5.5. Passzív autoantitest transzfer hatása kísérleti állatokban

Kalliokoski S, Caja S, Korponay-Szabó IR, Frias R, Koskinen O, Mäki M, Kaukinen K, Lindfors K. Features of early developing coeliac disease can be induced in mice by passive transfer of patient serum. International Coeliac Disease Symposium, Oslo, 2011 (absztrakt)

Annak vizsgálata, hogy a coeliakia antitestek tényleg szerepet játszanak-e a boholyatrófia kialakulásában, a sejtes rendszereknél komplexebb vizsgálati rendszert kíván. Korai vizsgálatunkban (Korponay-Szabó és mtsai 2000) egerek TG2-vel történő immunizációja során sikeresen indukáltunk magas titerű szérumban is megjelenő IgG anti-TG2 antitesttermelést, de ezek az antitestek nem rakódtak le a szövetekben, mivel feltehetően a beadott TG2-re voltak specifikusak és nem reagáltak az egerek saját TG2 fehérjével. Di Niro vizsgálataiban (Di Niro és mtsai 2008) a coeliakiás betegekből származó egyláncú fág monoklonális antitestek egérben történő expressziója sem járt eredménnyel, mivel az egerekben rövid időn belül anti-idiotipus antitestek termelése indult be, mely hatásukat közömbösítette, sőt teljesen el is tűntek a szérumból. Ezért kísérleteinkhez athymikus nude egereket választottunk, melyek saját antitestek termelésére képtelenek. A nude egerek bőre

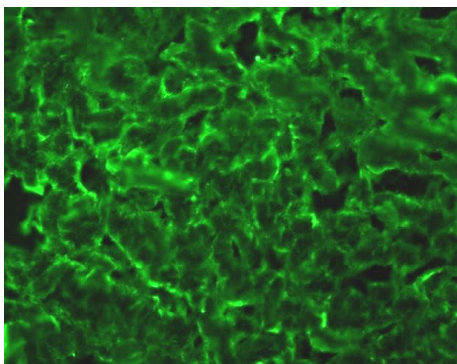
alá matrigelben beoltott endotél sejtekkel komplexebb módon lehet modellezni az érképződést. Ebben a rendszerben a coeliakiás antitestek hasonlóan csökkentették az érképződést, mint az *in vitro* vizsgálatokban (Martucciello és mtsai 2012).

Fiatal nude egerekbe intraperitoneálisan bejuttatott humán antitestek hatását is vizsgáltuk. Az IgA antitestek azonban nem kerültek be az egerek keringésébe, feltehetően azért, mert nincs megfelelő IgA receptoruk. IgA hiányos betegek szérumát használva, amely magas titerben tartalmazott IgG anti-TG2 antitesteket, magas szérum anti-TG2 koncentrációt sikerült kialakítani. Az IgG antitestek kötődtek minden klasszikus *in vivo* kötőhelyen, a vékonybélhámsejtek alatti basalis területen, az endomysiumokon, a máj és a vese reticulín rostjain. A kezdeti időszakban boholyatrófia nem volt, de kísérletet 4 hétre kiterjesztve, bizonyos felszíncsökkenés a bélben bekövetkezett és az állatok súlyfejlődése elmaradt a kontroll, antitest negatív IgA hiányos humán szérumot kapó vagy nem injektált kontroll állatokhoz viszonyítva. Mivel más kutatócsoportok kimutatták, hogy a vékonybélkárosodás jelentősen fokozódik gyulladásos szignálok hozzáadása esetén, ezért jelenleg a kísérleteket ilyen irányban folytatjuk a teljes közlemény elkészítéséhez.

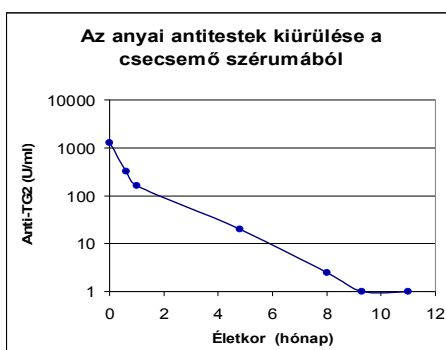
5.5.6. Passzív autoantitest transzfer hatása coeliakiás anyák újszülöttjeiben

Tekintettel az állatkísérleti modell létrehozásának nehézségeire, az antitestek hatására kialakult jelenségeket humán újszülötteken is figyelemmel kísértük. Mivel az anyai IgG akadálytalanul átjut a magzatba, a gyermekben az anyai T-sejtek hatásától független antitesthatás tanulmányozható. A vizsgálatokat egy klinikai eset megfigyelése indította el, amikor egy IgA hiányos, a diétát nem tartó, ismert és erősen szeropozitív coeliakiás anya szülése után a gyermeknél hasmenést és májkárosodást diagnosztizáltunk, melynek hátterében egyéb okot nem találtunk. Az újszülött időre, de alacsony súllyal született (2660 g). Vérében születéskor rendkívül magas IgG anti-TG2 és deamidált gliadin elleni antitest szintet mértünk (51. ábra), és HLA tipizálás szerint DQ2 allélje van.

A



B



51. ábra. *In vivo* kialakult EMA reakció képében megjelenő anyai IgG lerakódás aktív coeliakiában szenvedő IgA hiányos anya újszülöttjének köldökzsinórjában direkt immunfluoreszcens vizsgálattal (A), csak szekunder anti-IgG antitest hozzáadása után. Az antitestek mérése ELISA segítségével a gyermek szérumában (B).

Nagymennyiségű IgG lerakódását észleltük a gyermek köldökzsín szöveiben is az endomysium felszínén (Simon-Vecsei és mtsai PNAS 2012). Mindez azt jelzi, hogy a többi szövet, köztük a vékonyél és a máj is feltehetően tartalmazott antitesteket, bár ennek közvetlen bizonyítására nem volt módunk, mivel a szülők vékonybélbiopszia elvégzéséhez nem járultak hozzá. A szérumból az anyai coeliakiás antitestek 9 hónapos korra ürültek ki. A gyermek követése 4 éves korig coeliakia manifesztálódását eddig nem mutatta. Ezen adatok alapján prospektív neminvazív vizsgálatokat végeztünk az ismert coeliakiás anyák újszülöttjeiben. A vizsgálatokra az adott lehetőséget, hogy 2007-től részt vettünk egy nemzetközi, még jelenleg is folyó tanulmányban (www.preventcoeliacdisease.com), mely a coeliakia megelőzési lehetőségeit vizsgálja és a születés előtt válogatott be olyan gyermekeket, akik coeliakiás betegek elsőfokú rokonai. A gyermekektől köldökzsín vért tettünk félre, melyből meghatároztuk a HLA-DQ genotípust és a coeliakiás antitestek szérum szintjét, valamint vizsgáltuk az antitestek jelenlétét placentában és a köldökzsín szöveiben. A gyermekek egy részénél a köldökzsínből HUVEC sejteket tenyésztettünk. A gyermekek születési súlyát és hosszát összehasonlítottuk az ugyanabban az időszakban az adott területen született egészséges újszülöttek (n=650) adataival, akiknek édesanyja résztvett az 5.2.10.2. fejezetben leírt terhességi coeliakia szűrésben és antitest negatív volt (48. oldal). Összesen 197 olyan gyermek adatait sikerült összegyűjteni, akiknek legalább egy elsőfokú rokona ismert coeliakiában szenvedett, ez 135 esetben az anya, 29 esetben az apa, 3 esetben mindkét szülő, 30 esetben egy testvér volt. Az aktív coeliakiában szenvedő anyák újszülöttjeinek születési súlya alacsonyabb volt, mint a nem coeliakiás anyák vagy a diétát jól betartó coeliakiás anyák gyermekeié. A szignifikáns különbség az adatok tisztítása után is megmaradt, miután az ikrek és koraszülöttek adatait kizártuk a számításokból (9. táblázat).

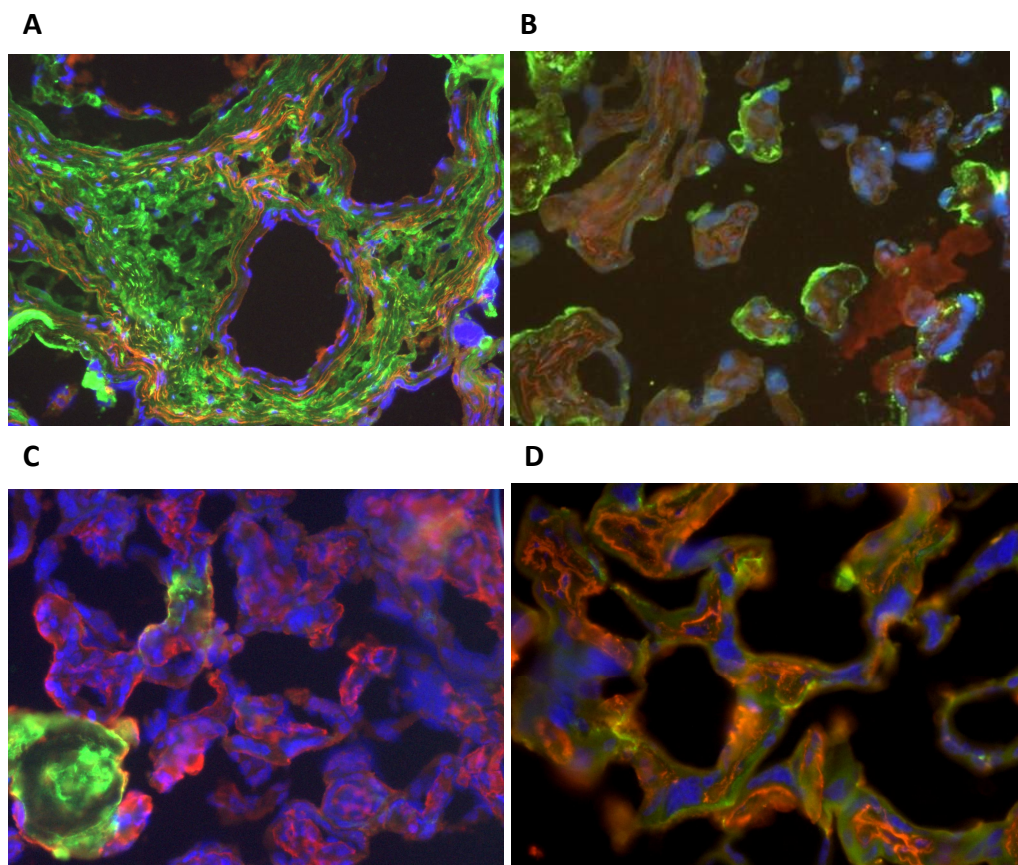
9. táblázat. Coeliakiás családok újszülöttjeinek születési súlya (g) azonos időszakban, szeronegatív egészséges magyar anyáktól született újszülöttekkel összehasonlítva. CD: coeliakia, CI: konfidencia intervallum, *a szüléskor még antitest pozitív, de már diétázó anyák (rövid ideje vagy részlegesen kezelt állapot).

	Vizsgált csoportok	N	Átlag	Medián	95% CI	p érték
1	Anya CD	131	3263	3340	3175–3351	0.02 vs 2
	a. Kezeletlen	15	2855	2790	2607–3103	<0.001 vs 1c,2,3,4,5
	b. Terhességben diagnosztizált*	4	3553	3520	3376–3729	0.61 vs 2,5
	c. Tartós, jó diéta melletti terhesség	112	3315	3360	3326–3405	0.066 vs 2
2	Apa CD	29	3493	3540	3354–3633	0.50 vs 5
3	Testvér CD	30	3362	3440	3179–3546	0.39 vs 5
4	CD rizikó, de egészséges anya (2+3)	59	3427	3480	3313–3540	0.88 vs 5
5	Nem rizikó újszülöttek (populáció)	650	3435	3430	3400–3471	

A kezeletlen anyáknál a coeliakia a terhességi szűrés során illetve a szülés után 3 hónapon belül manifesztálódó malabszorpció miatt derült ki, vagy a coeliakia ugyan ismert volt, de nem tartottak diétát.

Korponay-Szabó IR, Király R, Nemes E, Tóth B, Vecsei Z, Juuti-Uusitalo K, Fésüs L, Mäki M. Passive transfer model of coeliac autoimmunity in newborns from mothers with coeliac disease and transglutaminase antibodies. Gut 2009;58:(Suppl 2) p. A411. (Absztrakt)

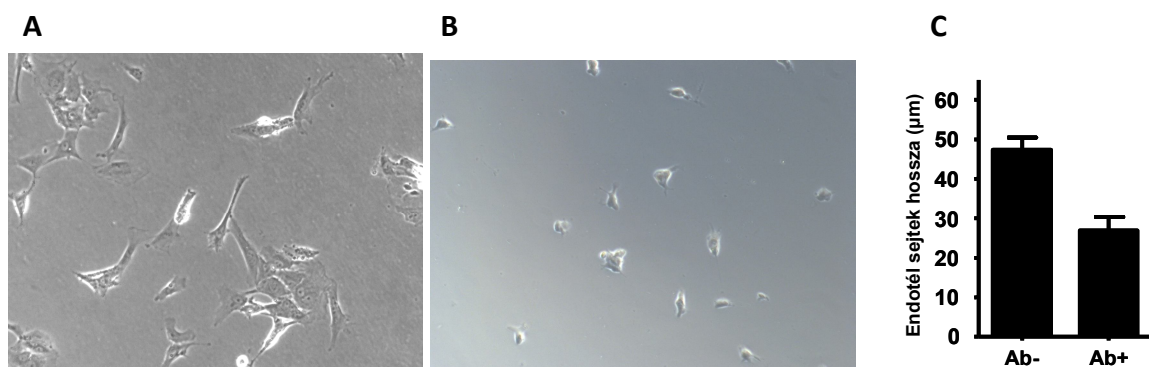
Öt szeropozitív anyánál sikerült a placentát megvizsgálni, mely nagymennyiségű IgA lerakódást tartalmazott az erek falában valamint a chorionbolyhok felszínén, ahol a TG2 is kimutatható volt (5.3.3.2 fejezet, 54. oldal és 52. ábra A-B). Sorozatmetszetekben végzett képanalízis (Image J program) alapján a boholyszerkezetek szignifikánsan ($p < 0.01$) kevesebb területet reprezentáltak, mint a normál vagy antitest negatív anyák kontroll placentájában (52. ábra C-D). Ez egy vékonybélboholyszerkezet-atrófiával analóg patológiai folyamatot jelez, mely a magzat csökkent tápanyagellátását okozhatja, és amelynek további vizsgálata indokolt.



52. ábra. Anyai IgA lerakódás (zöld) coeliakiás anya placentájában a deciduális erek falában (A) és a chorionbolyhok felszínén (B). A normál placentában csak egy vérrögben mutatható ki IgA, a chorionbolyhokban nem (C), a bolyhok tagoltabbak és az általuk elfoglalt terület nagyobb mint az aktív coeliakiában szenvedő anya placentájában. Piros festés: A-B: CD44, C-D: TG2 CUB7402 antitesttel, mely csak a bolyhok belső érhalozatában lévő TG2 antigént ismeri fel, a felszíni TG2 antigént nem.

Ahogy az várható volt, az IgA antitestek nem kerültek át az újszülöttek vérébe, azaz a placenta alapvető barrier-szerkeze ebben a tekintetben megtartott volt, de mind az 5 gyermek savójában kimutathatók voltak az anyai IgG anti-TG2 antitestek. A köldökzsinórból

izolált endotél (HUVEC) sejtek felszínén is igazoltuk az anti-TG2 antitestek jelenlétét (Simon-Vecsei és mtsai 2012) az aktív coeliakiás terhességeknél, valamint azt is, hogy a gyermekbe átkerült anyai antitestek is a fő, előzőekben azonosított TG2 epitópra specifikusak. Az anti-TG2 antitest pozitivitással született gyermekek HUVEC sejtjei morfológiai eltéréseket is mutattak, nem jól tapadtak meg, nem tudtak az érképzéshez megnyúlni és nem vándoroltak megfelelően. A sejtek hossza az angiogenesis vizsgálatokban szignifikánsan alacsonyabb volt, mint az antitest negatív (diétázó) coeliakiás anyák gyermeiből preparált HUVEC sejteké (53. ábra), valamint rövidebb ideig sikerült őket tenyészteni. Ezek a mérési eredmények hasonlóak voltak azokhoz, melyeket normál HUVEC sejtekhez adott coeliakiás antitestekkel a korábbi *in vitro* sejt kísérletek során (5.5.3. és 5.5.4. fejezet) kaptunk. Egy antitest pozitív anya újszülöttjétől származó sejtvonalat már a korai passzázsok során elvesztettünk, ennél a gyermeknél az anyai antitestek kiürülését és szeronegativitást követően 3 éves korban coeliakia alakult ki. Az eddigi eredmények összességükben azt mutatják, hogy a passzív transzferrel átkerült anyai antitestek a TG2 fehérjéhez kötődés folytán káros biológiai hatásokat fejtenek ki a magzatban. A klinikailag észlelt fejlődési zavarhoz még a placentában megrekedt IgA antitestek is hozzájárulhatnak a magzati bolyhok károsításával. Ezek a „természet kísérletének” is tekinthető adatok első ízben szolgáltatnak a coeliakia autoantitestek patogenetikai szerepét alátámasztó *in vivo* eredményeket.



53. ábra. Antitest negatív (glutenmentes diétát folytató) coeliakiás anya (A) és antitest pozitív (nem diétázó) coeliakiás anya (B) újszülöttjének köldökszinórijából preparált endotél sejtek 14 nappal az izolálás után. C. HUVEC sejtek hossza (medián±standard hiba).

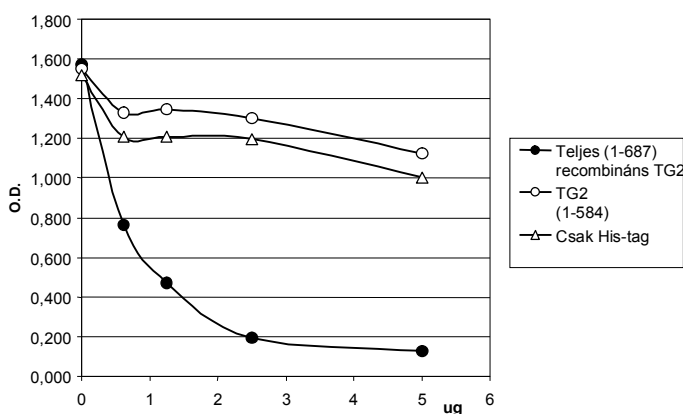
5.6. A coeliakia autoantitestek keletkezési mechanizmusának és a coeliakia korai eltéréseinek kutatása

5.6.1. A deamidált gliadin peptidek szerepe a coeliakia antitestek keletkezésében

A coeliakia antitestek keletkezése gluten-függő, de a natív gliadin peptidek elleni humorális immunválasz sok évtizedes klinikai tapasztalat alapján nem specifikus a betegségre, nem HLA-DQ függő (Kaukinen 2000), sőt az izoláltan előforduló gliadin antitest pozitívitás diagnosztikus szempontból inkább megtévesztő. Mivel a közelmúltban kimutatták, hogy deamidált gliadin peptidekkel a coeliakiás betegek savói sokkal specifikusabban reagálnak (Schwertz és mtsai 2004, Sugai és mtsai 2006, Prince 2006, Kaukinen és mtsai 2007), vizsgálatainkban strukturális hasonlóságot kerestünk a gliadin peptidek és a TG2 között.

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;46:253-61.

A tanulmányban 74 újonnan diagnosztizált coeliakiás betegnél és 65 kontroll, ép vékonybél szerkezettel rendelkező betegnél egy kereskedelmi forgalomban kapható, deamidált gliadin elleni IgA+IgG antitesteket mérő kittel (Inova Quanta Lite™ Celiac DGP Screen) a TG2 ELISA eredményekhez igen hasonló szenzitivitást (100%) és specificitást (98.5%) figyeltünk meg. Egy 13 monoklonális TG2-specifikus antitestből álló panellel történt vizsgálattal pedig azt tapasztaltuk, hogy három különböző TG2-specifikus monoklonális antitest is felismerte az ELISA-lapon lévő peptideket. A monoklonális antitestek kísérleti egér antitestek voltak, nem coeliakiás betegekből származtak. Közülük kettő a TG2 C-terminális (IV.) doménjét, egy pedig a core (II.) domént ismeri fel. Kötődésüket specifikusan és dóziszfüggő jelleggel gátolni lehetett humán rekombináns TG2 antigénnel, annak a monoklonális antitestek specifikus epitópjait tartalmazó fragmentumaival és coeliakiás betegek savójával (54. ábra), de a kötődés nem változott, ha csak a His-tag konstrukciót vagy olyan TG2 fragmentumot alkalmaztunk, mely az adott MAb epitópját nem tartalmazza.



54. ábra. Oldatban alkalmazott rekombináns TG2 és fragmentumainak kompetíciója C-terminálisra specifikus (648-687 aminosav) monoklonális TG2 antitest (Mab3) deamidált gliadin peptidekhez történő kötődésével

A monoklonális antitestek kötődését TG2 antigénhez oldatban alkalmazott deamidált peptidek kompetitíven csökkentették. A coeliakiás betegsávk deamidált peptidekhez való kötődését azonban ezekben a kísérletekben sem a TG2 antigénnel, sem monoklonális egér TG2 antitestekkel nem lehetett meggátolni, így azokban más, TG2 antigénnel nem keresztreagáló anti-DGP antitestek is vannak. Ha azonban a coeliakiás betegsávkból a mágneses gyöngyökhöz kötött deamidált peptidekkel antitesteket tisztítottunk, azoknak egy része a TG2 antigént is felismerte (10. táblázat). Ezzel arányosan csökkent az átfolyóban maradt TG2 elleni reaktivitás, míg kontroll gyöngyök alkalmazásánál ezt nem észleltük. A tisztított antitest frakcióban és az átfolyóban maradt anti-TG2 antitestek reakciójának összege nagyjából megfelelt az eredeti savóban mért reaktivitásnak. Ezek a kísérletek azt is jelezték, hogy az anti-TG2 reaktivitásnak is csak egy része kapcsolatos a DGP antitestekkel. A keresztreakció tényét azonban coeliakiás betegekéből készített monoklonális egyláncú antitestekkel is igazolni lehetett, mivel DGP-vel szelektált fág antitestek ELISA vizsgálatban a rekombináns TG2 antitestet is felismertek (nem publikált adatok).

10. táblázat. Deamidált gliadin peptidekkel affinitástisztított coeliakiás IgA antitestek reakciója TG2 antigénnel.

	Kor (év)	Eredeti betegszérum			Átfolyó szérum			DGP-gyöngyökkel tisztított IgA		
		DGP- ELISA (U)	EMA titer	TG2- ELISA (U)	DGP- ELISA (U)	EMA titer	TG2- ELISA (U)	DGP- ELISA (U)	EMA titer	TG2- ELISA (U)
1 M	6.8	225.0	1280	99.4	2.8	1280	62.7	164.9	<2.5	35.4
2 M	14.6	190.5	640	69.4	14.3	320	50.1	151.4	<2.5	12.1
3 M	14.8	141.8	40	35.8	9.2	20	29.9	114.0	<2.5	14.1
4 F	1.7	211.3	80	37.0	103.5	80	17.5	224.2	<2.5	13.8

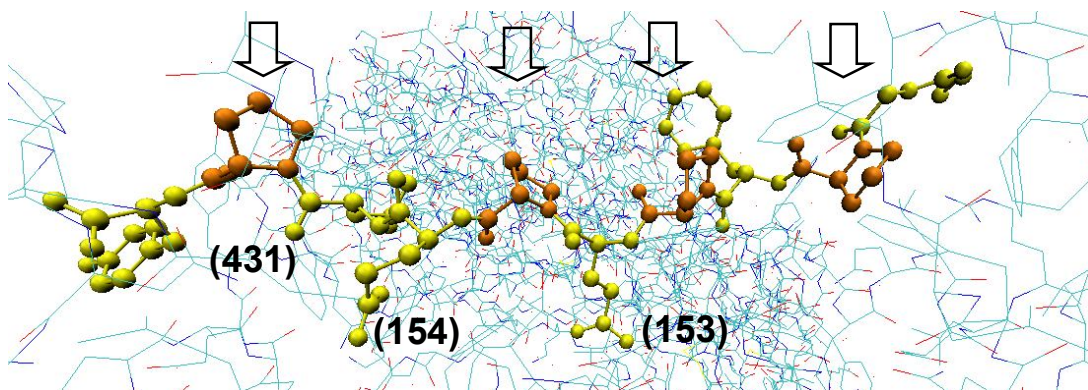
M: fiú, F: lány

A vizsgálati eredmények strukturális hasonlóságra utalnak a TG2 felszíne és peptidek megjelenése között, bár a lineáris aminosav-szekvenciában a gyártó információi szerint nem volt egyezés. Ennek alapján feltehetően felszíni azonosságot mutató mimotópokról van szó. Sajnos a pontos epitópokat lokalizálni nem lehetett, mivel a peptidek pontos szerkezetét csak a gyártó ismeri. Az egyik DGP-vel keresztreagáló monoklonális anti-TG2 antitest (4E1) lineáris kötődési motívuma ismert (De Niro és mtsai 2005). Ez a humán TG2-ben a ⁶³⁷EIPDPVEAGEEV⁶⁴⁸ rész, a tengerimalac enzimben pedig EVPDPVEAGEQA, mely tartalmazza a EQ motívumot, a coeliakiában immunreaktív deamidált peptidek jellegzetes részét. Mivel a klinikai vizsgálatokban alkalmazott DGP lineáris formában nem jó antigén, valószínűleg a TG2 felszínének több része szükséges egy effektív kötődéshez.

5.6.2. A deamidált gliadin peptidek és a transzglutamináz 2 szerkezeti hasonlóságának vizsgálata

Simon-Vecsei Z, Király R, Bagossi P, Tóth B, Dahlbom I, Caja S, Csősz E, Lindfors K, Sblattero D, Nemes É, Mäki 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.

A coeliakiás anti-TG2 antitestek kötődési epitópjának lokalizálásakor kiegészítő vizsgálatokat végeztünk gliadin és DGP peptidekkel. A REM TG2 epitóp egy részét felismerő MAb 885 (50. ábra) nem ismerte fel azokat a DGP antigéneket, melyeket az ELISA lapon a másik 3 anti-TG2 MAb felismert, azonban a MAb 885 más funkcionális vizsgálatokban is eltérően viselkedett, mint a coeliakiás antitestek. A TG2 kristályszerkezetének elemzésekor azonban megfigyeltük, hogy az epitóp központjában két glutaminsav (153 és 154) kulcsfontosságú az anti-TG2 antitestek kötődéséhez és a kötődés akkor is zavartalanul létrejön, ha az egyiket glutaminra cseréljük (30. ábra). Ez valójában egy EQ motívumot hoz létre a TG2 felszínén. A 4E1 lineáris MAb fent tárgyalt kötődési adatai azt mutatják, hogy a humán TG2-ben az eredeti EE szakasz is azonos epitópot adhat egy antitest számára. A rövid gliadin peptidek térbeli szerkezete nem rögzített, azonban amikor bekötődnek a HLA-DQ2 vájulatába, adott helyzetben fixálódnak. Az LQFPQPELPY immunogén gliadin peptid HLA-DQ2-ba bekötődött szerkezetét (pdb: 1S9V) elemeztük és összehasonlítottuk a TG2 ismert kristályszerkezeteivel (1KV3 és 2Q3Z). A deamidált gliadin peptid Gln6 és Glu8 oldalláncának távolsága (9.84Å) és helyzete nagy hasonlóságot mutat a TG2 153-es és 154-es glutaminsav oldalláncainak távolságával (9.36 Å) és helyzetével. A Glu8 és Leu9 távolság is hasonló a TG2 felszínén mérhető Glu154 - Val431 közötti távolsággal (2. melléklet S8 ábra). A gliadin peptidben ezek az oldalláncok nem egymás melletti aminosavakat reprezentálnak, de éppen a köztük lévő prolin rigid szerkezete teszi lehetővé, hogy ezt az alakzatot felvegyék (55. ábra). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a DQ2 restrikció olyan szerkezeti módon valósul meg, mely elősegíti a TG2 antigén felszínéhez hasonló peptidek kötődését, és a klasszikus haptén-carrier elmélet mellett a molekuláris mimikri lehetőségét is megteremtheti. A vizsgált peptid T-sejt felé tekintő felszínén 4 prolingyűrű van, és ez jellemző szinte az összes, coeliakiában aktív immunogén gliadin peptidre (55. és 1. ábra).



55. ábra. A HLA-DQ2 molekulába (lent) beilleszkedő LQFPQPELPY deamidált gliadin peptid szerkezete. A zárójelben szereplő számok a TG2 hasonló elhelyezkedésű aminosavait jelölik, a nyilak pedig a prolin gyűrűket.

A prolingyűrűk közötti távolság változó az egyes peptidekben (1. ábra) és ez szerepet játszhat a különböző T-sejt klónok szelekciójában. Azonban a DQ2 felé néző gyökökben kevesebb variáció van, azok főként vagy a 4-es, vagy a 6-os pozícióban helyezkednek el és nagyrészt jellemző rájuk az (P)EQ motívum, mely a DGP antitestek jellegzetes kötőhelye. A peptidek jelentős hányadában azonban ez kiegészül egy QPE résszel is, elsősorban az alfa-gliadinokban, néha a gamma és omega gliadinokban, sőt a hordeinben is. Ez a REM epitóppal homológ alakot vehet fel és így keresztreakáló anti-TG2 képződését segítheti. A peptidek szerkezete magyarázatot adhat arra, hogy miért termelődnek TG2-specifikus és azzal nem reagáló DGP antitest is. Ezek az eredmények és a korábbi fejezetekben a coeliakiás epitóppal kapcsolatban leírt eredmények arra is utalnak, hogy nagyon szűk specifikitású T-sejtek aktiválódnak. Az eredményeink azt sugallják, hogy a B-sejtek szerepe is meghatározó és elsősorban azok aktiválódnak, melyek a TG2 egy meghatározott, bizonyos fokban a gliadin peptidhez hasonló felszínére specifikusak. Amennyiben egy gliadin peptid ezek felszíni immunglobulin kötőhelyére beillik, akkor ezek a B-sejtek a T-helper sejtektől preferenciális serkentést kaphatnak és proliferálnak. Ez a lehetőség harmonizál azzal a ténnyel, hogy a gliadin megvonása után már többé nem termelődnek TG2 elleni antitestek, és azokkal a friss adatokkal is (Di Niro és mtsai 2012), hogy a coeliakiás B-sejt klónok által termelt antitestek alig mutatnak szomatikus hipermutációt, ami egy külső antigén ellen irányuló immunválasz érésére utalna. Inkább úgy tűnik, hogy egy már meglévő immunválasz lehetőséget aktivál a gliadin peptidek bevitele.

5.6.3. A deamidált gliadin peptidek bejutása és prezentációja

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. Scand J Gastroenterol. 2007;42:562-71.

A gliadin peptidek pontos útja az emésztőrendszerből az antigénre reagáló T-sejtekig még nem minden tekintetben tisztázott és az sem eldöntött kérdés, hogy a deamidáció hol történik. Az emberi emésztőtraktus enzimeit nem képesek a kalászos gabonákból származó egyes gliadin peptideket teljesen lebontani. Egy 33 aminosavból álló, prolinokban gazdag immunogén peptid különösen rezisztens és átjuthat a vékonybél hámsejteken. Ezért a coeliakia kezelésére exogén, bakteriális eredetű prolin-oligoendopeptidázokat (POP) javasoltak USA kutatók (Shan és mtsai 2002). Érdekes módon a POP típusú enzimek emberben is előfordulnak, ezért megvizsgáltuk ezek szubsztrátspecifitását és bélrendszeri előfordulását. A humán POP a vékonybél hámsejtek citoplazmájában megtalálható, de nem kerül be a keféselegébe, mint az egyéb dipeptidázok. Az emberi vékonybélhámsejtek kivonata nem tudta a 33 aminosavból álló peptidet megfelelően bontani, bár érdekes módon az aktív coeliakiás betegekből származó minták esetén kevesebb (83%) eredeti hosszúságú peptid maradt meg, mint a kezelt vagy normál vékonybél minták (94%) esetén.

A tisztított rekombináns humán POP enzim *in vitro* sem képes a gliadin peptideket megfelelően bontani, sőt a 33 aminosavas peptid gátolja a POP aktivitását. A tisztított enzimmel és a vékonybélmintákkal végzett mérések eltérő eredménye arra utal, hogy más dipeptidázok is bonthatják a gliadint, főként a 12 és 19 aminosav hosszúságú immunogén illetve ún. toxikus peptidet, habár a 33-as peptid lebomlása nem megfelelő. Vizsgálatunk szerint a POP enzimnek ezért kevés szerepe lehet a coeliakia patomechanizmusában.

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. Immunol Lett. 2010;130:74-81.

A gliadin peptidek deamidációját tekintik a legfontosabb lépésnek, melyben a TG2 kapcsolatba kerül a peptidekkel és azok TG2 deamidációs működése révén válnak negatív töltésűvé és illeszkednek be a HLA-DQ2 vagy DQ8 molekula antigén-prezentáló részébe. Az azonban nem világos, hogy ez a folyamat pontosan hol megy végbe, a sejteken belül, a lamina propriában vagy az antigénprezentáló sejtek felszínén. Az extracelluláris matrixban lévő TG2 nem vagy nem állandóan aktív (Siegel és mtsai 2008). A jelen munkában azonban a humán dendritikus sejtek és makrofágok felszínén aktív TG2 jelenlétét igazoltuk. Kimutattuk azt is, hogy a TG100 anti-TG2 antitestek képesek felismerni a sejtfelszíni TG2 fehérjét, de annak aktivitását nem gátolják hasonló mértékben, mint az oldatban lévő TG2 keresztkötő aktivitását. A TG100 nem ismerte fel a CD44-t, melyről korábban feltételezték, hogy az anti-TG2 antitestek keresztreakciót mutatnak vele. A coeliakiás IgA antitestek nem kötődtek jól a makrofágokhoz, bár változó mértékű kötődés a dendritikus sejtek felszínéhez megfigyelhető volt. Az eredmények alapján azt a következtetést vontuk le, hogy a tunica propriában lévő immunprezentáló sejtek felszínén effektív TG2-közvetítette deamidáció lehetséges. Hasonló eredményt adtak Caco2 hámsejtekkel végzett kísérleteink is (Rauhavirta és mtsai, 2011), ahol a hámsejtek felszínéről nyert oldatban HPLC kromatográfiával deamidált gliadin peptideket tudtunk kimutatni a natív peptiddel történő inkubálás után.

5.6.4. A gliadin prezentációjának hatása egyéb immunológiai folyamatokra

Nemes É, Lefler É, Szegedi L, Kapitány A, B.Kovács J, 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, Pediatrics 2008,121:e1570-6.

A gliadin a DQ2 vagy DQ8 molekulákon keresztül prezentálódik. A DQ vagy DR molekulák más peptidek bemutatásában is jelentősek lehetnek, pl. egyes oltások antigénjének feldolgozásakor. A coeliakia kórfolyamata a rendszeres gabonafogyasztás, gliadin bevitel hatására már a korai életszakaszban megindul, de a tünetek megjelenése változó és a diagnózis felállítása késhet. A szubklinikai coeliakia által okozott rendellenességek kutatására megvizsgáltuk, hogy a coeliakiás betegek hogyan reagálnak a diagnózis előtt adott védőoltásokra. A Magyarországon 14 éves korban adott kötelező hepatitis B oltás után a coeliakiásoknál 74.1%-ban hiányzott a protektív antitestek megjelenése, ha az oltást

a diagnózis felállítása előtt kapták. A glutenmentes diétát jól betartó ismert és DQ2 pozitív betegeknel viszont az egészségesekhez hasonló reaktivitás alakult ki (95.5%). A hepatitis B peptidek prezentálása részben a HLA-DR3 és DQ2 molekulákon keresztül történik. A gluten jelenlétében a nem kezelt coeliakiás betegeknel elsősorban a gliadin peptidek prezentálódnak és ezzel ronthatják az oltás hatékonyságát. Ezt a feltételezést támogatja az az eredményünk, hogy a diéta melletti immunizálás hasonló eredménnyel járt, mint az egészséges populáció oltása, és a non-responder coeliakiás fiatalokat újraoltva szintén jó szerológiai immunválasz (97.3%) alakul ki.

5.6.5. A coeliakia kapcsolata a velünk született immunitással és gyulladásos faktorokkal

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. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2007;45:187-93.

Mivel a coeliakia kialakulását kapcsolatba hozták esetleges vírusok vagy baktériumok okozta fertőzésekkel, vizsgáltuk a Toll-like receptorok expresszióját a vékonybélben. A TLR2 és TLR4 fehérje és mRNS magasabb volt a kezeletlen coeliakiásokban, mint az egészségesekben. Érdekes módon a TLR2 és 4 magasabb volt a kezelt coeliakiás csoportban is, mint a kontrollokban, bár ennek interpretációját nehezíti, hogy a kezelt betegek kezelés előtti mintája nem állt rendelkezésre. A TLR3 mRNS csak a kezelt coeliakiásokban volt kimutatható. Ezek az eredmények felvetik annak a lehetőségét, hogy TLR2 és TLR4 még a gyulladásos reakció előtt emelkedik meg vagy eleve magasabb. Ezért egy kapcsolódó tanulmányban (Dezsőfi és mtsai 2008) megvizsgáltuk a TLR4 A⁺⁸⁹⁶G és CD14 C⁻²⁶⁰T polimorfizmusokat, de ezekben a coeliakiás betegek nem mutattak eltérést a kontrollokhoz képest. További tanulmányokban kimutattuk, hogy a mintázatfelismerő receptorokon kívül a 72-es hőszokk fehérje, HSP72 (Sziksz és mtsai 2010), a hipoxia-indukált faktor 1 α (HIF-1 α , Vannay és mtsai 2010) és a SGK-1 (Szebeni és mtsai 2010) szintje is megemelkedik a vékonybél nyálkahártyában. Ezek az eltérések összefüggést mutattak a glutenbevitellel, diéta mellett csökkentek.

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;15:3891-900.

Mivel a bélflóra szerepet játszhat gyulladásos folyamatok elindításában, 190 egymást követően diagnosztizált coeliakiás feknőtnél és 148 kontrollnál meghatároztuk mikrobiális anyagok és sejtfal komponensek elleni antitestek (ASCA, anti-saccharomyces cerevisiae, ALCA, anti-laminaribiosid, ACCA, anti-chitobiosid, AMCA, anti-mannobiosid és OMP, *E.coli* anti-outer membrán porin C transzport protein) előfordulását a szérumban, valamint a főbb NOD2/CARD15 mutációkat. 30 betegnél glutenmentes diéta melletti minta is rendelkezésre állt. A kezeletlen állapotban a coeliakiás betegek 65.9%-ánál, az egészséges kontrollok 29%-ánál lehetett legalább egy antitestet kimutatni, a súlyos malabszorpcióval jelentkezőknél

dc_308_11

gyakran többet is, az antitestek szintje korrelált az EMA/anti-TG2 szintekkel. Az egyes antitest mérési eredmények szenzitivitása azonban alacsony volt (35-39%). A betegek között (14%) és a kontrollcsoportban (16%) azonos arányban fordultak elő a NOD2/CARD15 mutációk. A vizsgálatok alapján ezek az antitestek inkább másodlagos jelenségnek látszanak, mely az aktív coeliakiában a vékonybél barrier funkció csökkenésére utal.

5.7. A coeliakia genetikai hátterének és genetikai markerek diagnosztikus alkalmazásának kutatása

A coeliakia családi halmozódása azt jelzi, hogy a genetikai tényezők szerepe meghatározó. Ezt támogatja az a tény is, hogy a populációszűrésekkel a coeliakiás családok távolabbi rokonságában találhatunk újabb betegeket. Az antitestválasz szabályossága és a molekuláris mimikrire utaló eredmények is egy közös patomechanizmust támogatnak, de hogy ez milyen defektusból adódik, még egyelőre ismeretlen. A pontos öröklésmenet sem tisztázott. A coeliakia leggyakrabban egymást követő generációkban jelenik meg és nőkben gyakoribb, mint általában az autoimmun kórfolyamatok. A klinikai betegség kialakulásának feltétele a gliadin immunológiai prezentációja, mely a HLA-DQ2 vagy DQ8 típusú heterodimerek jelenléte esetén valósul csak meg. A HLA-DQ molekulák tipizálása már régóta alkalmazott klinikai vizsgálati eljárás, de költséges volta és a társadalombiztosítási finanszírozás megoldatlansága miatt a coeliakia vizsgálatára Magyarországon még nem terjedt el. Diagnosztikai helyének megállapítását az is nehezíti, hogy az egészséges magyar népesség 25%-a is hordoz DQ2-t vagy DQ8-t, így a HLA markerek magukban nem tekinthetők a coeliakia bizonyítékának és a genetikai rizikóért biztosan felelősek egyéb, non-HLA gének is.

5.7.1. A HLA markerek vizsgálata

Kapitány A, Tóth L, Tumpek J, Csipő 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, *Aliment Pharmacol Ther*. 2006;24:1395-402.

A coeliakia hagyományosan a vékonybél szövettani vizsgálatával diagnosztizálható, a szövettani eltérések (gyulladás, a bélbolyhok változó fokú atrófiája) azonban nem specifikusak és a coeliakiára jellemző anti-TG2 antitestek hiányában gyakori a diagnosztikus bizonytalanság. A tanulmányban vizsgált 70 egymást követően jelentkező beteget vizsgáltunk, akiknél a diagnózist 2-25 évvel korábban antitestvizsgálatok nélkül állították fel, és akik a diétát sem mindig követték pontosan. A HLA-DQ2 vagy DQ8 hiánya helyesen jelezte a korábbi coeliakia diagnózis megalapozatlanságát és jól korrelált a prospektíven végrehajtott diagnosztikus gluten terhelés negatív eredményével. Megállapítottuk azt is, hogy az anti-TG2 és EMA antitestek 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. Ebben a tanulmány megjelenése (2006) óta jelentős előrelépés történt, sőt a HLA-DQ tipizálás a coeliakia új diagnosztikus kritériumrendszerében (Husby és mtsai 2012) is helyet kapott.

Dezsőfi A, Szebeni B, Hermann CS, Kapitány A, Veres G, Sipka S, Körner A, Madácsy L, Korponay-Szabó IR, 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;47:283-7.

További vizsgálataink során a HLA DQ2 és DQ8 megoszlásában összefüggést találtunk a klinikai manifesztációval 100 hosszán követett coeliakiás, 80 diabetesben szenvedő és 47 coeliakiás+diabeteses gyermek HLA tipizálásával. 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 tanulmányban a toll-like receptor (TLR) 4 funkcionális polimorfizmusa (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 betegeknél a T allél és a TT genotípus a normál népességhez képest ritkábban fordult elő, míg coeliakia esetén nem tért el a normál megoszlástól. Diabeteses betegeknél a TT előfordulása azonban hajlamosított a coeliakia együttes előfordulására. A HLA-DQ szerepét tovább vizsgálva nem találtunk különbséget a DQ típusok megoszlásában a coeliakia enterális megjelenése és dermatitis herpetiformisszal kombinálódó formája között (Koskinen L és mtsai 2002).

Koskinen L, Romanos J, Kaukinen K, Mustalahti K, Korponay-Szabó I, Barisani D, Bardella MT, Ziberna 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;61:247-56.

Tekintettel arra, hogy a HLA-DQ allélek részletes tipizálása a jelenleg általánosan használatos szekvenciaspecifikus 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 alléleknél nem megbízható és ezért nem ajánlott. Mindenképp genetikai meghatározás indokolt azért is, hogy a HLA-DQ2 altípusokat elkülönítsük, mert a HLA DQB1*0201 (DQ2.5 haplotípus) és *0202 (DQ2.2 haplotípus) különböző kockázati tényezőt jelent. Ezért azt vizsgáltuk, hogy a coeliakia szempontjából fontos allélek meghatározhatók-e a bennük található jellegzetes single nukleotid polimorfizmusok (SNP) tipizálása alapján. Erre elvileg az ad lehetőséget, hogy a DR, DQA1 és DQB1 allélek linkage disequilibrium miatt határozott haplotípus blokkokban öröklődnek. A vizsgálatban összesen 1284 ismert, szövettani vizsgálattal bizonyított coeliakiás beteg 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 (rs7454108) 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 (*0505) 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; nem volt olyan beteg, aki mindkettőre negatív lett volna. 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 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 elvégezni. Az SNP meghatározáson alapuló HLA-DQ tesztelésnek azonban sok előnye van. Nemcsak olcsóbb, hanem alkalmas nagylétszámú szűrővizsgálat elvégzésére is automatizált rendszerekben. A vizsgálat megerősítette azon korábbi eredményt, hogy a DQ2.5 homozigotás a DQ2.5 heterozigotákhoz képest 5.5-szörösre emeli a coeliakia kockázatát, míg a DQ2.2 jelenléte a DQ2.5 mellett 3.1-szoros rizikót jelent. A veszélyeztetett családok utódait korai életkorban vizsgálva megállapítottuk, hogy 85% hordozza a HLA DQ2 vagy DQ8 alléleket, ezért a betegség előrejelzéséhez feltétlen szükség van más genetikai marker keresésére.

5.7.2 Non-HLA coeliakia gének kutatása

Tekintettel arra, hogy a HLA-DQ2 vagy DQ8 a normál európai és magyar népesség 25-30%-ánál előfordul, jelenlétük szükséges feltétel, de nem elegendő a coeliakia megjelenéséhez 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 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 családtaggal rendelkező családokban validáltuk. A legnagyobb ilyen magyar családban 10 érintett beteg volt. Ezt követően az érintettnek látszó kromoszóma szakaszokon sűrűbb SNP analízissel szűkítettünk azt vizsgálva, hogy mely gén(ek)ben vagy

haplotípusban van a közös tulajdonság, és ezeket transzmissziós disequilibrium analízisnek (TDT) vetettük alá. Ennek során a betegeket és szüleiket (triókat) 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 (genomra terjedő asszociációs vizsgálat, GWAS).

A kutatási idő alatt 1540 egységes gyakorlat szerint diagnosztizált magyar 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 (n=1067) Dr Ádány Róza professzor (Debreceni Egyetem, Népegészségügyi Iskola) bocsátotta 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 és nemzetközi kollaborációval igyekeztünk elérni.

Koskinen LL, Korponay-Szabó 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;45:222-7.

Az érintett magyar testvérpárokban jelentős egyezést találtunk (LOD score:3.76) a 19-es kromoszóma egy korábban már azonosított szakaszán (van Belzen és mtsai 2003, Monsuur és mtsai 2005) a myosin IXb gén mellett és annak egyik intronális szakaszán. A gluten-szenzitivitás dermatitis herpetiformisként megjelenő formájában nemcsak linkage-t, hanem asszociációt is kimutattunk a minor alléllal, ahol az AGAA rizikó-haplotípus a TDT elemzés szerint preferenciálisan öröklődött. A IX-es myosin egy ritka motoros protein, melynek a transcellularis 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.

Papp M, Földi I, Nemes É, Udvardy M, Hársfalvi J, Altorjay I, Máté I, Dinya T, Várvolgyi C, Barta Z, Veres G, Lakatos PL, Tumpek J, Toth L, Szathmári E, Kapitány A, Gyetvai A, Korponay-Szabó IR. Haptoglobin polymorphism: a novel genetic risk factor for celiac disease development and its clinical manifestations. Clin Chem. 2008;54:697-704.

Új asszociációt írtunk le a haptoglobin polimorfizmussal. 712 biopsziával igazolt magyar 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 gyulladáscsökkentő és immunmoduláló hatással is rendelkezik. A 2-2 genotípus 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 malabszorpció. A 2-1 heterozigótáság viszont jelentős asszociációt mutat a coeliakia megjelenésével, mely az enyhe tünetekkel és silent formában megjelenő coeliakiára is jellemző. Érdekes, hogy miért jelenthet egy heterozigótáság más kockázatot, mint a két komponensre vonatkozó homozigótáság. 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 heterozigótáknál alfa1 és alfa2 is termelődik, a komplexek bonyolult elágazódó, lineáris szerkezetet vesznek fel. Ezeknek a molekuláknak a biológiai tulajdonságai eltérők. A haptoglobin elősegíti a T-helper 1 túlsúlyt, valamint a CD163-n keresztül IL-10 képződést vált ki, 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 a coeliakia kezdetén jelentősen fokozódó expressziójú zonulin azonos a pre-haptoglobin 2 molekulával (Tripathi és mtsai 2009), és így a genetikai eredmény coeliakiára vonatkozó relevanciáját alátámasztotta.

Koskinen LL, Einarsdottir E, Dukes E, Heap GA, Dubois P, Korponay-Szabó IR, Kaukinen K, Kurppa K, Ziberna F, Vatta S, Not T, Ventura A, Sistonen P, Ádány 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;18:1148-55.

Jelentős asszociáció és linkage igazolódott a magyar betegekben 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 elemezve 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 nem is lehetett az asszociációt igazolni, ami arra hívja fel a figyelmet, egyes országokban a genetikai hajlamosító tényezők eltérést mutathatnak (11. táblázat). 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 (Dubois és mtsai 2010), ahol 9451 coeliakiás beteget és 16434 kontrollt vizsgáltunk, az IL18RAP locus nagyon szignifikáns asszociációt mutatott ($p=2.98 \times 10^{-28}$). Ez mégis megerősíti az IL18RAP jelentőségét, mely feltehetően az immunválasz modulálása révén valósul meg. Ebben a vizsgálatban is magas volt a magyar alcsoportban az elemszámmal arányos asszociáció ($p=10^{-6}$).

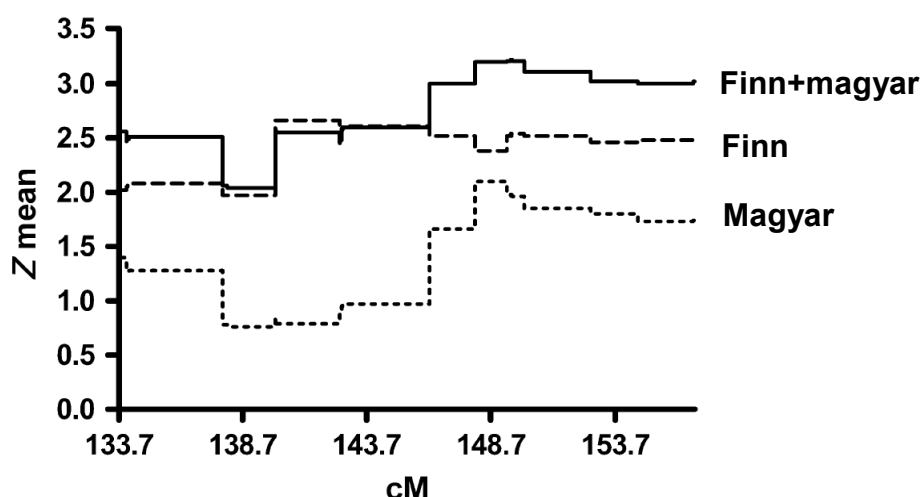
11. táblázat. Az IL18RAP asszociáció meta-analízise különböző népeiségekben

Ország	Közlemény	Betegszám	p érték
Egyesült Királyság ¹	Van Heel 2007	2189	9.1×10^{-5}
Egyesült Királyság ²	Hunt 2008	2275	0.0048
Hollandia	Hunt 2008	1396	3.63×10^{-6}
Írország	Hunt 2008	1369	0.55
Olaszország	Romanos 2008	1062	0.35
Olaszország*	Koskinen L 2009	424	0.78
Finnország*	Koskinen L 2009	1534	0.092
Magyarország*	Koskinen L 2009	1036	0.0011
Összesített értékek		11285	1.89×10^{-11}

1: első genom-asszociációs vizsgálat, 2: második genom-asszociációs vizsgálat, *saját tanulmány

Koskinen LL, Einarsdottir E, Korponay-Szabó IR, Kurppa K, Kaukinen K, Sistonen P, Pocsai Z, Széles G, Ádány 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;74:408-16.

A magyar testvérpárok analízise alapján a 19p13 szakasz után az 5q31-33 adta a legmagasabb linkage értékeket, ezért ezt a szakaszt részletesebben is megvizsgáltuk 374 magyar és 277 finn családban. Az 5q szakaszokkal korábban olasz, skandináv és ír betegekben 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 finnekben (FGF1, STK32A, SLC36A2) mint a magyarokban (IL3 és TGFBI, 56. ábra). Az 5q 31-33 régió számos immunreakcióval kapcsolatos gént tartalmaz és más tanulmányokban asszociációt mutatott más olyan gyulladásos és immunológiai betegségekkel is, 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.



56. ábra. Az 5q 31-33 régió vizsgált asszociációinak eloszlása a finn és magyar multiplex családokban eltérő

Haimila K, Einarsdottir E, de Kauwe A, Koskinen LL, Pan-Hammarström Q, Kaartinen T, Kurppa K, Ziberna 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;10:151-61.

Einarsdottir E, Bevova MR, Zhernakova 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. *Eur J Hum Genet.* 2011;19:682-6

Einarsdottir E, Koskinen LL, Dukes E, Kainu K, Suomela S, Lappalainen M, Ziberna F, Korponay-Szabó IR, Kurppa K, Kaukinen K, Adány R, Pocsai 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. *BMC Med Genet.* 2009;10:8.

Sareneva I, Koskinen LL, Korponay-Szabó IR, Kaukinen K, Kurppa K, Ziberna F, Vatta S, Not T, Ventura A, Adány R, Pocsai Z, Széles G, Mäki M, Saavalainen P, Einarsdottir E. Linkage and association study of FcγR polymorphisms in celiac disease. *Tissue Antigens.* 2009;73:54-8.

További kiegészítő vizsgálatokban is nagyszámú magyar beteget és érintett családot vizsgáltunk (>400 család), de a 2q33 régióban, ahol további antigénprezentációban immunológiailag 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 FcγR receptorról polimorfizmussal pedig egyik vizsgált országban (Svédország, Finnország, Magyarország, Olaszország) sem volt kapcsolat. Vizsgáltuk még a calreticulin gént, de nem volt eltérés.

Dubois PC, Trynka G, Franke L, Hunt KA, Romanos J, Curtotti A, Zhernakova A, Heap GA, Adány R, Aromaa A, Bardella MT, van den Berg LH, Bockett NA, de la Concha EG, Demma 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, Sperandeo 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. *Nat Genet.* 2010;42:295-302.

Mivel feltehető volt, hogy egyes finomabb hajlamosító gének identifikálására a nagy esetszámok ellenére nincs megfelelő statisztikai power az egyes nemzeti mintakollektciókban, újabb coeliakia gének felismeréséhez nemzetközi kollaborációban még egy, van Heel és mtsai 2007, Hunt és mtsai 2008 után a sorrendben harmadik coeliakiára irányuló nagyvolumenű teljes genomra kiterjedő asszociációs tanulmányra (GWAS) is sor került; 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. A vizsgált magyarok mind egymástól független családokból származtak, a multiplex érintettségű családokból csak egy-egy beteg vett részt. Illumina 670-QuadCustom_v1 és Golden Gate automatizált tesztrendszerrel előbb 292387, majd újabb 231362 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. GWAS eredménye megerősítette a HLA-DQ szerepét és 13 korábban már leírt hely/géncsoport jelentőségét (RGS1, IL12A, LPP, REL/AHS, IL18RAP, ITGA4, CTLA/ICOS, CCR3/CCR1,2,5,9, IL2/IL21, TNFAIP3, TAGAP, SH2B3, PTPN2). A magyaroknál a legjelentősebb kapcsolat az IL12A és LPP génekkel volt (12. táblázat).

Mindezek mellett 13 új szignifikáns ($<5 \times 10^{-8}$) génasszociációt találtunk: TNFRSF14/MMEL1, RUNX3, PLEK, CCR4, CD80, KTELC1, BACH2/MAP3K7, PTPRK, THEMIS, ZMIZ1, ICOSLG, ETS1, CIITA/SOCS1/CLEC16A valamint 2, egyelőre nem azonosított génhez kötődő hely. További 13 hely 10^{-6} körüli szignifikanciát mutatott, köztük a CD247, FASLG/TNFSF18/TNFSF4, IRF4, TLR7/TLR8, TNFRSF9 and YDJC.

Ezek közül a magyaroknál a BACH2/MAP3K7 hely adta a legmagasabb asszociációs értéket. Az újonnan felismert hajlamosító gének jelentős része az immunrendszer működését illetve a T limfociták érési folyamatait befolyásolja. Ezek közül kiemelkedően fontosnak látszik a coeliakia szempontjából a THEMIS és a RUNX. Más polimorfizmusok a vírus DNS-ek felismerését végző toll-like receptorok működését (TLR7 és TLR8), a T- és B limfociták kooperációját (TNFRSF14, TNFRSF9, TNFSF4, CD80, ICOSLG, CTLA4/ICOS/CD28) illetve cytokineket (CCR4) érintik. A BACH2 a B-limfocitákban az immunglobulin class-switch során játszik szerepet, mint transzkripció faktor. A magyaroknál az elemszámhoz képesti jóval kifejezettebb statisztikai szignifikancia talán abból adódik, hogy az összes magyar

dc_308_11

coeliakiás résztvevő EMA/anti-TG2 antitest pozitív volt, míg a többi országban csupán a vékonybélbiopszia lelete alapján is kerültek be betegek a vizsgálatba.

12. táblázat. A genom-asszociációs vizsgálatban szignifikánsnak talált SNP asszociációk a magyar népességben kromoszómák szerinti sorrendben (az újonnan leírt genetikai markerek vastag szedéssel)

Kr	Pozíció	SNP	Minor allél	Minor allél	p Kombinált GWAS	p Magyarok	Gén-asszociáció
				Frekv.	9451CD, 16434 kontroll	965CD, 1067 kontroll	
1	190803436	rs2816316	C	0.160	2.20×10^{-17}	0.1	RGS1
2	61040333	rs13003464	G	0.401	3.71×10^{-13}	0.003	REL, AHS2
2	102437000	rs917997	A	0.236	1.11×10^{-15}	0.00025	IL18RAP, IL18R1, IL1RL1, IL1RL2
2	181704290	rs13010713	G	0.448	4.74×10^{-11}	0.05	ITGA4, UBE2E3
2	204510823	rs4675374	A	0.223	5.79×10^{-9}	0.01	CTLA4, ICOS, CD28
3	46210205	rs13098911	A	0.097	3.26×10^{-17}	0.00011	CCR1, CCR2, CCRL2, CCR3, CCR5, CCR9
3	161147744	rs17810546	G	0.125	3.98×10^{-28}	10^{-6}	IL12A
3	189595248	rs1464510	A	0.485	2.98×10^{-40}	0.00022	LPP
4	123334952	rs13151961	G	0.142	2.18×10^{-27}	0.01	IL2, IL21
6	32713862	rs2187668	A	0.258	$<10^{-50}$	10^{-149}	HLA-DQA1, DQB1
6	138014761	rs2327832	G	0.216	4.46×10^{-19}	0.05	TNFAIP3
6	159385965	rs1738074	A	0.434	2.94×10^{-15}	0.004	TAGAP
12	110492139	rs653178	G	0.495	7.15×10^{-21}	0.12	SH2B3
18	12799340	rs1893217	G	0.165	2.52×10^{-10}	0.06	PTPN2
1	2516606	rs3748816	G	0.339	3.28×10^{-9}	0.25	TNFRSF14, MMEL1
1	25176163	rs10903122	A	0.480	1.73×10^{-10}	0.06	RUNX3
1	199158760	rs296547	A	0.357	4.11×10^{-9}	0.006	?
2	68452459	rs17035378	G	0.278	7.79×10^{-9}	0.009	PLEK
3	32990473	rs13314993	C	0.464	3.27×10^{-9}	0.003	CCR4
3	120601486	rs11712165	C	0.394	8.03×10^{-9}	0.34	CD80, KTELC1
6	90983333	rs10806425	A	0.397	3.89×10^{-10}	5×10^{-5}	BACH2, MAP3K7
6	128320491	rs802734	G	0.311	2.62×10^{-14}	0.009	PTPRK, THEMIS
8	129333771	rs9792269	G	0.238	3.28×10^{-9}	0.16	?
10	80728033	rs1250552	G	0.466	9.09×10^{-10}	0.25	ZMIZ1
11	127886184	rs11221332	A	0.237	5.28×10^{-16}	0.009	ETS1
16	11311394	rs12928822	A	0.161	3.12×10^{-8}	0.029	CIITA, SOCS1, CLEC16A
21	44471849	rs4819388	A	0.280	2.46×10^{-9}	0.10	ICOSLG

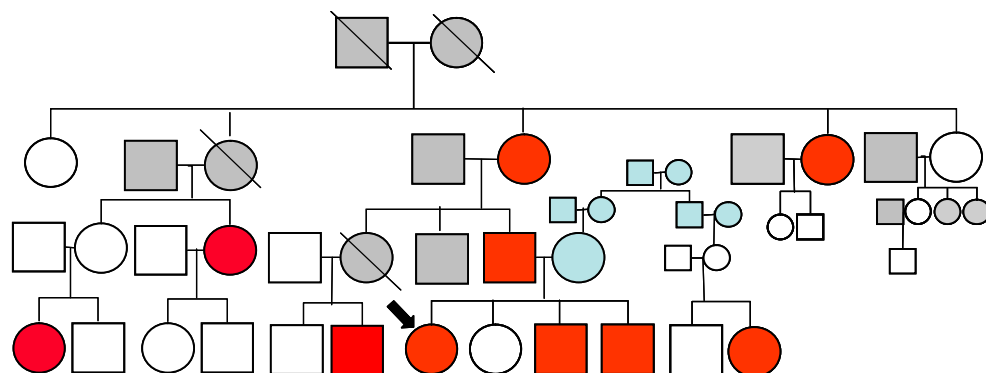
Odds ratio: HLA-DQ 6.23, IL12A 1.36, LPP 1.29, a többi gén 0.80-1.23 között

A 39 génszakasz jelentős részének asszociációját más immunmediált betegségekben is leírták. Jelenleg a CCR4, CD80, ITGA4, LPP, PLEK, RUNX3 and THEMIS génvariációk azonban csak a coeliakiához kapcsolódónak látszanak.

Mivel a kimutatott polimorfizmusok csak 4 esetben jártak aminosavcserével a megfelelő fehérjében (rs3748816/MMEL1, rs3816281/PLEK, rs196432/RUNX3, rs3184504/SH2B3), további vizsgálatok szükségesek annak eldöntésére, hogy a génvariációk hatása hogyan valósul meg. Egyik lehetséges hatásuk a génexpresszió változása lehet. Genome-wide leukocytá-expressziós adatok kvantitatív értékelése alapján (eQTL) a variációk közel felénél kimutatható a környező gének expressziójában változás. A polimorfizmusok önmagukban csak kevésbé emelték meg a coeliakia kockázatát (odds: 0.8-1.36) között, sőt összességben is talán a genetikai rizikó mintegy 20%-áért lehetnek felelősek. Ez arra hívja fel a figyelmet, hogy a coeliakiát vagy elsősorban környezeti tényezők provokálják vagy a még ismeretlen genetikai eltérés a SNP-k közötti területen van és csak szekvenálással található meg. Valójában a monogén betegségek többségének okát néhány reprezentatív családfa alapján azonosították, a coeliakia esetén azonban komplikálja a helyzetet, hogy legalább két (DQ+egyéb) vagy több gén okozhatja az eltérést. Az is lehetséges, hogy egyes családokban más és más gének felelősek a betegség megjelenéséért, ezért ezek a nagy esetszámú vizsgálatokban kiegyenlíthetik egymást.

Einarsdottir E, Koskinen LL, de Kauwe AL, Dukes E, Mustalahti K, Balogh M, Korponay-Szabó IR, Kaukinen K, Kurppa K, Adány R, Pocsai Z, Széles G, Mäki M, Kere J, Saavalainen P. Genome-wide analysis of extended pedigrees confirms IL2-IL21 linkage and shows additional regions of interest potentially influencing coeliac disease risk. Tissue Antigens. 2011;78:428-37.

Ezért jobb eredményt adhat néhány nagy reprezentatív család vizsgálata, ahol több generációban sok érintett személy van. Ezért egy népes finn és egy magyar család (57. ábra) részletes, genom-asszociációs vizsgálatát végeztük el 50K Affymetrix GeneChip (58960 marker), majd a jellemző kromoszóma szakaszokon egy erre a célra egyedileg kialakított Illumina Infinium ImmunoChip segítségével, mely 196514 marker vizsgálatát foglalta magában.



57. ábra. A genom-asszociációs vizsgálatokhoz használt magyar család. Piros jelöli a biopsziával diagnosztizált coeliakiás betegeket, fehér a vérvizsgálat alapján negatívakat. A szürke (a másik családban kék) színnel jelölt személyek fenotípusa nem ismert. A coeliakiás betegek mind pozitívak voltak EMA és anti-TG2 ellenanyagokra.

Mindkét családban 10 coeliakiás beteg volt, a magyar családban ezek közül egy az index betegnek (nyíl) csak anyai ágon rokona (őt nem vizsgálták). Az 50K chip adatai közül 40978, az immunochip adatai közül 178898 génpolimorfizmust lehetett értékelni, az azonos haploblokkban lévő kizárása után 10281 marker illetve 36333 marker adatait analizáltuk linkage és asszociáció szempontjából. A finn családban a HLA-DQ régió asszociációt mutatott, a magyarban – annak ellenére, hogy minden érintett családtag hordozott legalább egy DQ2 allélt – nem volt asszociáció. Ennek oka az lehet, hogy a magyar családban több HLA-DQ2 allél is előfordult, melyek különbözőképpen szegregálódtak az érintett betegekben. A 4q régió, mely a KIA1109/TENR/IL2/IL21 géneket tartalmazza kapcsolatot mutatott a coeliakiával mindkét családban, ezért az első GWAS (van Heel és mtsai 2007) során itt már felismert 4 SNP-t nagyobb eset-kontroll anyagon is megvizsgáltuk (467 finn coeliakiás, 388 finn kontroll, 395 magyar coeliakiás, 450 magyar kontroll), valamint megmértük perifériás limfociták IL2 és IL21 termelését a jellegzetes haplotípusokban. Az IL21 termelés magasabb volt a coeliakiásokban, de az IL2 termelés nem, és egyiknél sem volt összefüggés az IL szint és a 4 eredeti SNP genotípus között. Viszont a finn családban egy ritka haplotípus fordult elő, mely minden érintettben megjelent (részben az eredeti rizikó haplotípus mellett), míg a magyaroknál mindenki a rizikó haplotípust mutatta homozigóta formában. A 6q, 7p és 17q kromoszóma szakaszokon is voltak egymást átfedő asszociációk az 50K vizsgálatnál, de ezek közül a 7p szakaszt az immunchip vizsgálattal nem lehetett megerősíteni. A 17q egy része az immunchip vizsgálatnál is asszociációt mutatott, de főként a finneknél. A vizsgálat adatait további magyar családokon tovább vizsgáljuk.

Genetikai vizsgálataink 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 polimorfizmus magyarázhatja a coeliakia tüneteinek sokszínűségét, melyek az életveszélyes malabszorpciótól a tünetmentes állapotig terjedhetnek, és előfordulhat számos különböző egyéb szervrendszer érintettsége is. Ugyanezeket a genetikai markereket és a későbbi klinikai manifesztációt a 2007-ban indult coeliakia prevenciós vizsgálatban születéstől követett 1344 európai (186 magyar) gyermekben is vizsgáltuk, ahol hasonló eredményt kaptunk. A vizsgálat prospektív, a végleges eredmények 2013-ban, 4-6 éves korban várhatók, mert ebben az életkorban legvalószínűbb a coeliakia kialakulása.

5.8. A coeliakia új diagnosztikus kritériumai és terápiás lehetőségei

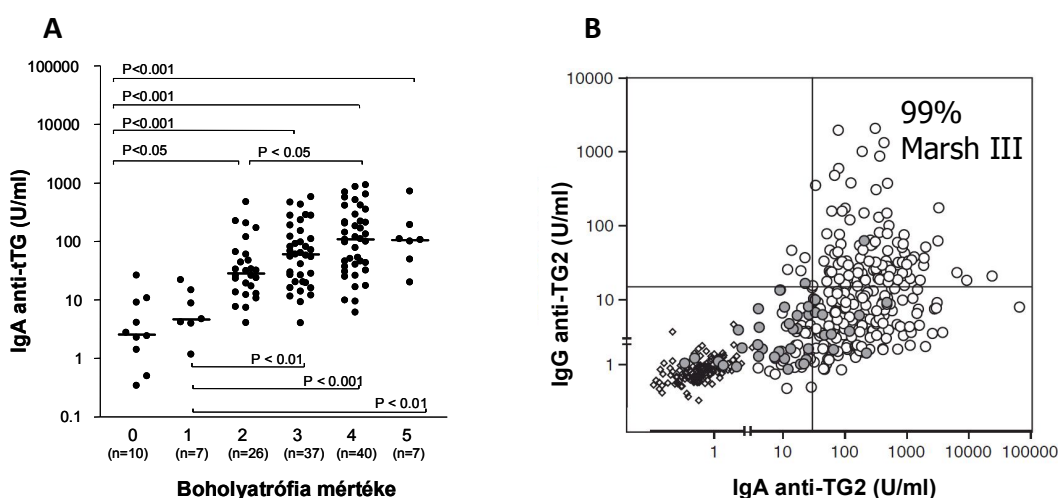
A coeliakia diagnosztikus kritériumai az ESGPHAN által 1990-ben megfogalmazott formában több mint 20 évig változatlanok voltak (Walker-Smith és mtsai 1990) és csak akkor lehetett kimondani a diagnózist, ha szövettani vizsgálat történt és az igazolta vékonybélbolyhok súlyos morfológiai károsodását. Az antitest vizsgálatok sikere, javuló technikai feltételei és megbízhatósága azonban az utóbbi években megkérdőjelezte az invazív biopsziás vizsgálat szükségességét, főként a gyermekeknél, mert az endoszkópia elvégzése általában altatást, kórházi körülményeket igényel. Ugyanakkor számos tanulmány arról is beszámolt, hogy a szövettani értékelés nem mentes technikai nehézségektől és tévedésektől (Collin és mtsai 2005, Corazza és mtsai 2007) és hogy a látszólag negatív vékonybél szövettani eredmény ellenére is lehetnek gluten-dependens klinikai tünetek (Kaukinen és mtsai 2001), más szervekben lehet betegség (Hadjivassiliou és mtsai 1998, 2002) vagy később mégis vékonybélkárosodás alakulhat ki (Kurppa és mtsai 2009).

5.8.1. A boholykárosodás előrejelzése a szérum antitest értékek alapján

Dahlbom I, Korponay-Szabó IR (megosztott első szerző), 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. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2010;50:140-6.

Mivel a szérumban jelen lévő anti-TG2 nem minden esetben társul manifest vékonybélkárosodással, azt vizsgáltuk 304 gluten-érzékeny és 131 kontroll betegnél, hogy a vékonybél boholyszerkezetének átépülése mutat-e összefüggést az antitestek szérumkoncentrációjával. A vizsgálatban különböző klinikai megjelenési formákkal jelentkező betegek (korai malabszorpció, enyhe gyermekkori tünetek, felnőttkori diagnózis, bőrmanifestáció) vettek részt, akiknek a szérum össz IgA szintje normális volt. A pontosabb elemzés érdekében 134 dermatitis herpetiformisban szenvedő beteget vizsgáltunk, akiknél a diagnózist a vékonybél szövettani eredménytől független pozitív bőrbopsziás vizsgálat (IgA csapadék a dermális papillákban) biztosította, és a diagnózis akkor is felállítható volt, ha a vékonybél szerkezet megtartott vagy csak enyhén károsodott volt (coeliakia esetén ilyenkor nem lehet a diagnózist véglegesíteni). A vizsgálat során megmértük a szérum IgA és IgG EMA titereket, és az anti-TG2 antitestek szérumszintjét a Celikey™ teszt és 6 pontos kalibrációs görbe alkalmazásával, mely a koncentrációval arányos értékeket eredményez. Megállapítottuk, hogy a gyártó javaslatával ellentétben (5-8 U/ml) a teszt optimális diagnosztikus cut-off értéke alacsonyabb, 2-3 U/ml között van, és itt már észlelhető lehet EMA pozitivitás is. A szérumszintek mind az IgA, mind az IgG anti-TG2 esetén korrelációt mutattak a boholyatrófia súlyosságával, a boholy/kripta aránnyal és a szérum EMA szintekkel. Az IgG anti-TG2 értékek korrelációt mutattak a klinikai állapot súlyosságával is: magas szérum antitest szintek gyakrabban fordultak elő a korai gyermekkorban, súlyos malabszorpció képeiben megjelenő kórformánál. Tekintettel arra, hogy felnőtteknél (Hill és

mtsai 2008) azt találták, hogy a Celikey teszt 30 U/ml feletti eredményei gyakorlatilag minden esetben Marsh II vagy annál súlyosabb boholykárosodással járnak, eredményeinket ennél az értéknél is elemeztük. Saját vizsgálatunkban azonban a Marsh IIIA-C károsodásra vonatkozó korrelációt vettük figyelembe, mivel a tanulmány idején érvényes diagnosztikus kritériumok legalább Marsh III (A-C) vékonybélkárosodást tekintettek csak diagnosztikus értékűnek. A magas IgA (>30 U/ml) és IgG (>15 U/ml) szérumban anti-TG2 szint együttes fennállása 99% pozitív prediktív értéket mutatott a Marsh III vékonybélkárosodás fennállására (58. ábra). Vizsgálataink alapján a szérumban antitestek quantitativ mérése megkönnyítheti a coeliakia neminvaszív diagnózisának bevezetését, különösen akkor, ha az IgG antitestek mérése is megtörténik.



58. ábra. A szérumban IgA anti-TG2 szint összefüggése a boholyatrófia mértékével 127 dermatitis herpetiformisban szenvedő betegnél (A) és az IgA-IgG antitestmérési eredmények pozitív prediktív értéke 304 gluten-érzékeny és 131 kontroll betegnél (B). A B ábrán az üres körök a Marsh III károsodást, a tömör körök az ennél enyhébb vagy normális szövettani eredményeket jelölik. 0-5: a szövettani károsodás beosztása a boholy/kripta arány alapján (0: 3 felett, 1: 1.5-3, 2: 1-1.5, 3: 0.3-1, 4: 0.1-0.3, 5: 0.1 alatt).

2007-ben az ESPGHAN egy munkacsoportot hozott létre annak vizsgálatára, hogy a publikált bizonyítékok elegendők-e a diagnosztikus kritériumok reformjához a gyermekkorú betegeknek. A munkacsoport 14, a coeliakiával kapcsolatos kérdésekben jártas európai gyermekgasztroenterológus szakértőből állt, akiknek munkáját 2 epidemiológus valamint az európai coeliakia egyesületek szövetsége által delegált képviselő segítette. A munkacsoport munkájában az antitest vizsgálatok értékeléséért felelősként vettem részt. Az ESPGHAN munkacsoport elemezte az irodalmat, mely a 2004-ben végzett, National Institute of Health által készített (ARHQ) felmérés óta összegyűlt, valamint kérdőíves felmérést készített az európai gyermek-gasztroenterológusok jelen diagnosztikus gyakorlatáról. Ezt követően konszenzus és szavazás útján a diagnosztikus eszközökre (klinikai jelek, HLA tipizálás, antitestek, szövettani vizsgálat) vonatkozó megállapítások és ajánlások kialakításával új diagnosztikus irányelveket javasolt, melyek 2011 decemberében jelentek meg.

5.8.2. Az antitestvizsgálatok megbízhatóságának meta-analízise

Giersiepen K, Lelgemann M, Stuhldreher N, Ronfani L, Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabó IR; ESPGHAN Working Group on Coeliac Disease Diagnosis. Accuracy of diagnostic antibody tests for coeliac disease in children: summary of an evidence report. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2012;54:229-41

Szisztematikus kereséssel összegyűjtöttük a 2004. január 1. – 2009. szeptember 30. között megjelent irodalmi adatokat és azokat metaanalízissel értékeltük. A vizsgálatban a különféle coeliakia szérum antitest eredmények (hagyományos gladin antitest, deamidált gliadin elleni antitest, anti-TG2 és a hagyományos ún. anti-endomysium antitest) diagnosztikus prediktív értékét elemeztük, olyan tanulmányok alapján, ahol a coeliakia diagnózisát klinikai tünetek miatt vizsgált gyermekeknél a vékonybél szövettani vizsgálatával állították fel. Egy háromlépcsős keresési algoritmus szerint kizártuk azokat a tanulmányokat, ahol a betegeknél nem volt szövettani vizsgálat vagy annak eredményét részletesen nem adták meg, és ahol a diagnózisban az antitestek valamelyikének pozitivitását is figyelembe vették. Kizárásra kerültek továbbá nem angol nyelvű vagy teljes szöveggént hozzá nem férhető cikkek, a csak felnőttekről szóló közlemények, azok, ahol nem tünetes vagy már kezelt betegeket vizsgáltak (szűrés) vagy a vizsgálat célja nem a diagnózis volt, és ahol csak házi, kereskedelembe nem kapható módszerekkel határozták meg az antitesteket. Azokat a tanulmányokat is ki kellett zárni, ahol nem lehetett az adatok hiánya miatt kiszámítani a vizsgált antitest eljárás szenzitivitását, specificitását, pozitív és negatív prediktív értékét és a valószínűségi hányadosokat (LR+ és LR- pozitív és negatív likelihood ratio, DOR = LR+/LR-, diagnosztikus odds ratio). Az első keresést a MEDLINE és EMBASE adatbázisokban a Trieszti és Odense-i Egyetemen végezték. A kezdetben azonosított 2598 absztraktból 316-nél nézték át a teljes szöveget és 87 került részletes vizsgálatra. A kizárási feltételek teljesülése után 80 antitestvizsgálati adatsort tudtunk részletesen elemezni (16 közlemény), mely 3110 beteg (1876 biopsziával igazolt coeliakiás és 1234 nem coeliakiás) adatait foglalta magában. A diagnózis szempontjából legjelentősebb paraméter, a specificitás tekintetében az endomysium antitest volt a legmegbízhatóbb (98.2%), mely az anti-TG2 antitestek speciálisan coeliakiára jellemző formáját mutatja ki. Az anti-TG2 értékek is jó diagnosztikus mutatókkal rendelkeztek, de itt nehézséget okozott, hogy az adatok statisztikai heterogenitása miatt összesített értéket nem minden paraméterre lehetett statisztikai helyesen megadni. Az anti-TG2 vizsgálat megbízhatósága magasabb volt, ha csak a humán rekombináns antigént használó vizsgálatokat összesítettük és itt a statisztikai heterogenitás is kisebb volt. Szintén megfelelő klinikai biztonságot jelent a deamidált gliadin peptidekkel végzett antitestvizsgálat, míg a hagyományos gliadin antitest vizsgálat napjainkban egyáltalán nem megbízható (13. táblázat). A helyszíni tesztek magas specificitást mutattak, de mind a 4 megjelent cikk kezdeti leírás volt és válogatott, nem problémás betegcsoportokon végezték őket. Ezért az eredményeket némi fenntartással kell fogadni.

13. táblázat. A metaanalízisben résztvevő coeliakia antitest vizsgálatok diagnosztikus mutatóinak összesítése

Teszt	Vizsgálat szám	CD betegek	NonCD- betegek	Para- méter	Tartomány	Becsült átlag	95% Konfidencia	Heterogenitás	
								p	I ²
IgA-AGA	6	859	511	Sens.	60.9-96.0%	heterogén	heterogén	0.000	93.7%
Blesa-Baviera, Ferre-López, Lagerqvist, Llorente, Prause, Yachha				Spec.	79.4-93.8%	89.9%	86.9-92.3%	0.076	49.1%
				LR+	3.6-15.5	(7.3)	4.5-11.8	0.01	66.9%
				LR-	0.04-0.44	(0.186)	0.095-0.362	0.000	92.7%
				DOR	11-366	(40.6)	14.1-117.1	0.000	86.9%
IgA-anti-TG2	15	1,694	1,138	Sens.	73.9-100%	heterogén	heterogén	0.000	86.0%
Csak ELISA: minden vizsgálat kivéve Bazzigaluppi, Bonamico				Spec.	77.8-100%	heterogén	heterogén	0.000	73.5%
				LR+	4.3-160	(22.4)	12.1-41.4	0.000	74.3%
				LR-	0.01-0.28	(0.06)	0.03-0.10	0.000	85.6%
				DOR	64-19,397	(508)	247-1,042	0.007	54.1%
IgA-anti-TG2	3	255	146	Sens.	89,0%-100%	heterogén	heterogén	0.016	75.7%
Csaak RIA: Agardh 2005 Bazzigaluppi, Bonamico				Spec.	94,0%-100%	95.9%	91.3%-98.5%	0.21	36.2%
				LR+	14.8-65.2	19.2	9.1-40.6	0.6	0%
				LR-	0.013-0.18	(0.06)	0.022-0.165	0.059	64.7%
				DOR	127-5,135	347	79-1,529	0.15	47.8%
IgG-anti-TG2	4	477	331	Sens.	12.6%-99.3%	heterogén	heterogén	0.000	99.1%
ELISA és RIA Agardh 2005, Agardh 2007, Bazzigaluppi, Prause 2009				Spec.	86.3-100%	heterogén	heterogén	0.001	82.2%
				LR+	4.6-21.2	8.3	3.98-17.4	0.12	49.4%
				LR-	0.007-0.88	(0.22)	0.048-0.97	0.000	99.5%
				DOR	5.9-2,887	(53.3)	6.9-411	0.000	86.6%
IgA-TG2 POCT	5	470	399	Sens.	94.7-98.8%	96.4%	94.3%-97.9%	0.56	0.0%
Blesa-Baviera, Ferre-López, Korponay-Szabó (2 független betegcsoport), Raivio				Spec.	96.6-98.6%	97.7%	95.8%-99.0%	0.91	0.0%
				LR+	29.1-68.7	40.6	21.3-77.4	0.92	0.0%
				LR-	0.013-0.054	0.04	0.025-0.64	0.65	0.0%
				DOR	1,008-2,280	1,343	547.4-3,294	0.95	0.0%
IgA-EMA	11	1,034	558	Sens.	82.6-100%	heterogén	heterogén	0.000	79.0%
Agardh 2005, Bazzigaluppi, Bonamico, Collin, Korponay-Szabó (2 betegcsoport), Lagerqvist, Llorente, Poddar, Raivio, Yachha				Spec.	94.7-100%	98.2%	96.7%-99.1%	0.23	21.9%
				LR+	10.2-160	31.8	19-893	0.86	0.0%
				LR-	0.006-0.18	(0.067)	0.038-0.118	0.000	73.3%
				DOR	64-19,397	553.6	219-1,402	0.067	42.4%
IgA-DGP	3	422	346	Sens.	80.7-95.1%	heterogén	heterogén	0.000	81.6%
Agardh 2007, Basso, Prause				Spec.	86.3-93.1%	90.7%	87.8%-93.1%	0.14	45.0%
				LR+	6.9-12.7	9.4	6.8-13.1	0.26	25.3%
				LR-	0.06-0.21	(0.121)	0.072-0.203	0.003	78.5%
				DOR	56-93	86.1	55.9-132.7	0.6	0.0%
IgG-DGP	3	422	346	Sens.	80.1-98.6%	heterogén	heterogén	0.000	94.4%
Agardh 2007, Basso, Prause				Spec.	86.0-96.9%	heterogén	heterogén	0.063	59.0%
				LR+	6.8-25.8	(13.6)	8.1-22.8	0.078	55.9%
				LR-	0.02-0.21	(0.061)	0.017-0.22	0.000	92.3%
				DOR	115-948	(234)	100-547	0.092	53.4%

A p-érték χ^2 teszttel MetaDiSc (Zamora és mtsai 2006) elemzés alapján. A tesztekénél a szenzitivitást, specifitást, pozitív (LR+) és negatív (LR-) likelihood valamint a diagnosztikus odds (DOR) hányadost adjuk meg 95% konfidencia intervallummal és inkonzisztencia (I^2) értékkel. Ha az I^2 50% felett volt, átlagolt adatokat nem tüntettünk fel.

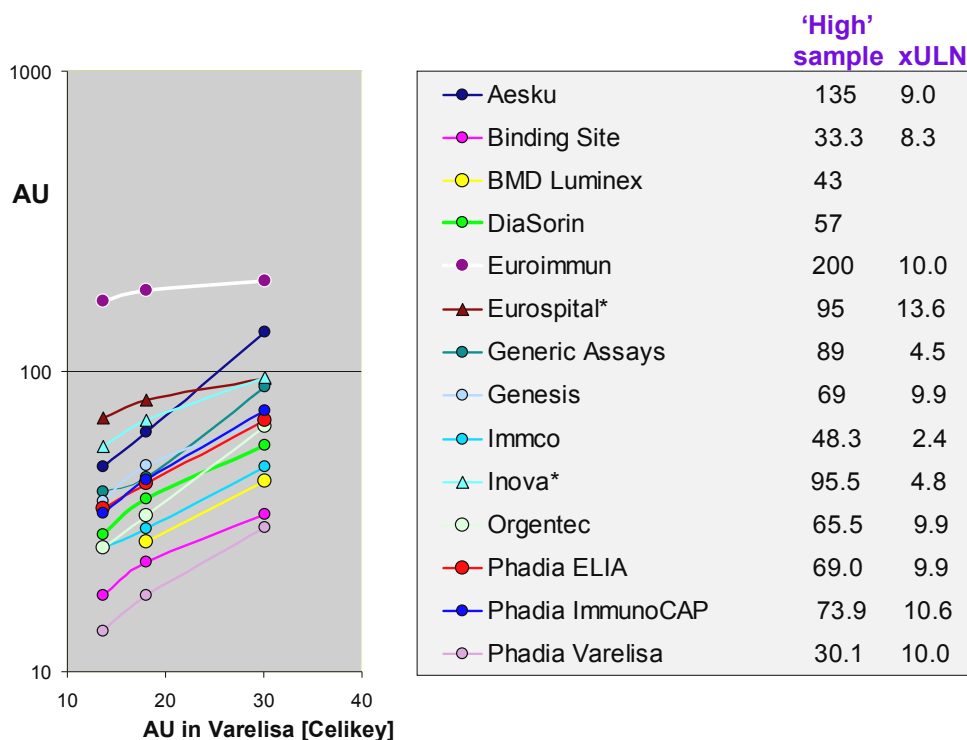
Megjegyzendő, hogy ugyanazokban a vizsgálatokban a laboratóriumi anti-TG2 és az EMA vizsgálatok a helyszíni tesztekénél még magasabb eredményeket adtak. Egyes tanulmányok azt is vizsgálták, hogy a diagnosztikus küszöbérték hányszorosánál van nagyobb találati valószínűsége annak, hogy a szövettani vizsgálat coeliakiára jellemző boholykárosodást igazol. Az elemzés azt mutatta, hogy az antitestvizsgálati eredmények és ezek a biztonsági határértékek erősen tesztfüggők lehetnek, bár az egyes közlemények közötti különbség inkább a betegcsoportok különbségéből adódott. Az összesített eredmények szerint az antitestek önmagukban nem adnak 100%-os teljesítményt, de azt megközelítik gondosan összeállított vizsgálati feltételek közt, a magas antitest értékek prediktív értéke pedig igen magas. Az egyes tanulmányok minőségét a QUADAS (Quality Assessment of Studies of Diagnostic Accuracy System) alapján képzett score segítségével értékeltük. Ez összefüggést mutatott az antitestek teljesítményével. Az elemzés során mindvégig a szövettani eredményt tekintettük referencia standardnak, annak ellenére, hogy annak megbízhatósága éppoly kétséges, mint az antitestvizsgálatoké. Azonban bármely antitest bevonása a referenciaértékek közé lehetetlenné tette volna a független értékelést, mivel az egyes antitestek kimutathatósága egyazon betegnél kapcsolatban van egymással. A 3110 beteg globális értékelése azt mutatta, hogy bár az 1876 coeliakiás beteg közül 153 (11%) szeronegatív volt, az összes szeropozitív beteg (n=1781) közül csupán 3.8%-nál nem állítottak fel coeliakia diagnózist, függetlenül a vizsgált antitest típusától. Tehát lényegében a szeropozitív betegek 96.2%-át feleslegesen tették ki az invazív biopsziás vizsgálatnak.

5.8.3. A coeliakia antitestvizsgálatok eredményeinek standardizálási lehetőségei

Ezek az eredmények az ESPGHAN Working Group on Coeliac Disease Diagnosis által javasolt diagnosztikus irányelvek I. függelékében jelentek meg (J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2012;54:155-6.)

A metaanalízis és egyéb (részben felnőtt) irodalmi eredmények alapján (Hill és mtsai 2008, Vivas és mtsai 2009, Dahlbom és mtsai 2010) az antitest eredmények prediktív értéke magas szérumszintnél erősen megközelíti a 100%-ot, mivel a boholyatrófiát nem mutató látens eseteknél többnyire alacsony koncentrációban vannak jelen antitestek a keringésben. A Hill, Vivas és Dahlbom vizsgálat egyaránt a Celikey™ tesztel történt és a 30U/ml feletti értékeket tekintette „magas” antitest szinteknek, mely a kutatási vizsgálatoknál megállapított diagnosztikus határérték (upper limit of normal – ULN) tízszerese. Azt azonban nem lehetett tudni, hogy más tesztekénél mi felel ennek az értéknek, és ennek megállapítása azért is nehéz, mert a tesztek egy része kalibrátor sort és ezzel lineáris értékeket, más része viszonyt küszöbhányados százalékot ad meg, amely logaritmikus típusú adat. Ezért egyszerű matematikai számításokkal az egyes teszteredmények között konverzió nem készíthető. A kereskedelmi tesztek numerikus összehasonlításáról nem találtunk tudományosan publikált adatokat. Az ESPGHAN irányelvek kialakításához ezért az egyik európai minőségbiztosítási hálózat (UKNEQAS, United Kingdom External Quality Assessment Service) által évente 6 alkalommal rendszeresen végzett körtesztek adatait kaptuk meg elemzésre, melyért ezúton

is köszönetet mondok az UKNEQAS-nak. Ezek során mintegy 400 európai laboratórium méri le ugyanazokat a szétküldött savómintákat az általa alkalmazott kereskedelmi teszttel. A 2009-es tesztavók közül három egymást követően kiküldött minta a Celikey™ teszttel 30.1, 18 és 13.6 U/ml átlagos értéket (10x, 6x, 4x ULN) adott. Ezeknek a savóknak a többi teszttel, összesen 309 laboratóriumban mért adatait elemeztük. A vizsgálatoknál a medián jobban összehasonlítható értékeket adott, mivel ezt egyes extrém értékek nem befolyásolták. Megállapítható volt, hogy az Európában 2009-ben leggyakrabban alkalmazott 14 kereskedelmi anti-TG2 teszt többsége nagyon szabályosan működik (59.ábra). A lineáris elven számított értékek görbéi csaknem párhuzamosan futnak a különböző antitest pozitivitási szintek esetén és a tesztek jelentős részénél a „magas érték” a 10xULN körül vagy alatta van. Ennek alapján az a 10xULN biztonságos küszöbértéknek látszik a coeliakia neminvaszív diagnózisának támogatására. Figyelemmel kell viszont lenni a nem-lineáris (logaritmikusan) módon számított értékekre, ahol ez a szabály nem érvényes. 2009-ben két ilyen teszt volt, az egyiket az Eurospital gyártotta és a magas érték az ULN 13.6-szerese volt, a másik az Inova kit, melynél a magas érték az ULN-nek csak kb. ötszöröse. Az Eurospital az ezt követő évtől már lineáris tesztet forgalmazott.



59. ábra. Az Európában 2009-ben 14 leggyakrabban használt anti-TG2 teszttel mért értékek mediánjai azonos pozitív minta esetén, melyk antitest szintje különbözött. A táblázat a „magas” antitest tartalmú savó medián eredményeinek viszonyát mutatja a diagnosztikus küszöbértékhez. *logaritmikus értékeket adó tesztek. A hiányzó ULN értékek a gyártó többféle tesztje miatt nem adhatók meg egyértelműen.

5.8.4. A coeliakia gyermekkori diagnózisára vonatkozó 2011-es ESPGHAN irányelv kidolgozásában részvétel, diagnosztikus score kidolgozása

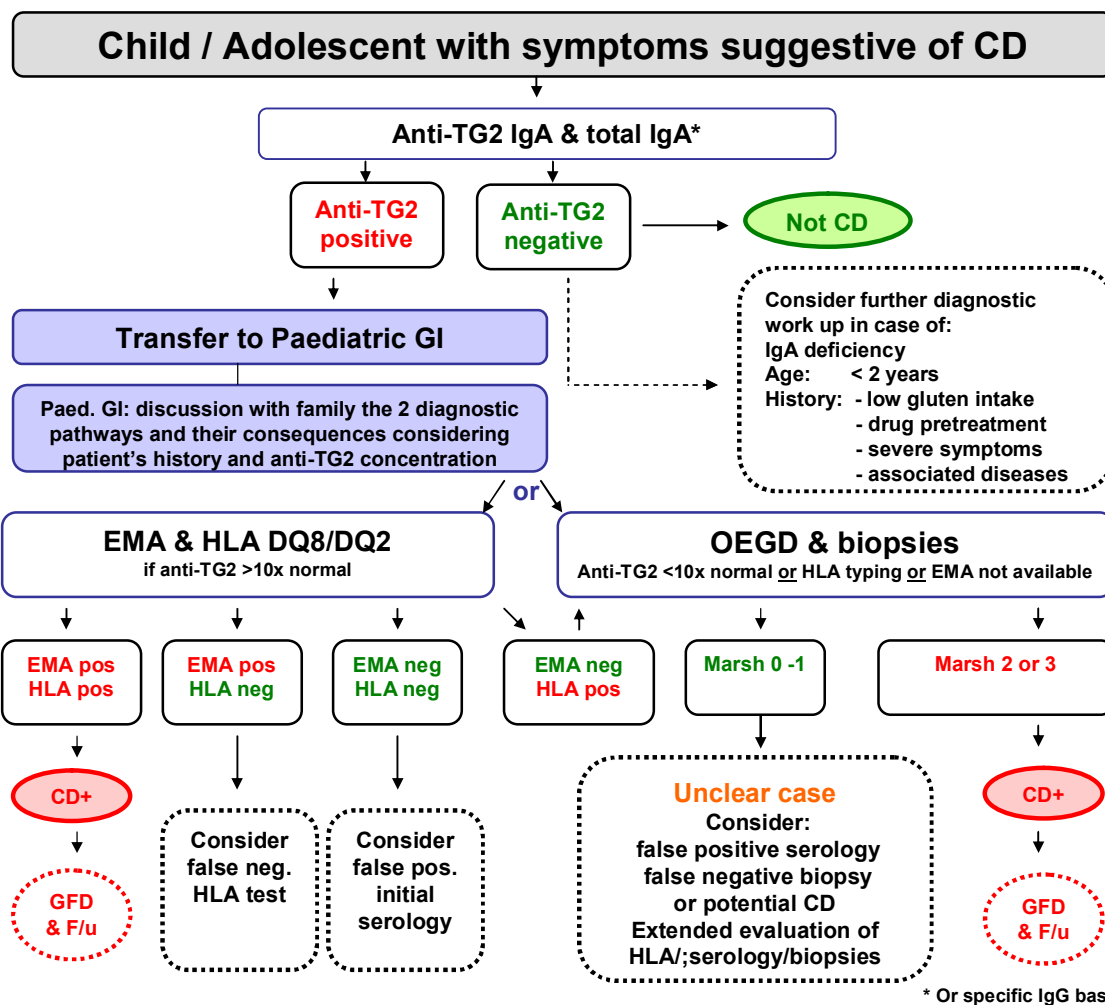
Ribes-Koninckx C, Mearin ML, Korponay-Szabó IR, Shamir R, Husby S, Ventura A, Branski D, Catassi C, Koletzko S, Mäki M, Troncone R, Zimmer KP; ESPGHAN Working Group on Coeliac Disease Diagnosis. Coeliac disease diagnosis: ESPGHAN 1990 criteria or need for a change? Results of a questionnaire. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2012;54:15-9.

Az ESPGHAN tagjaihoz intézett kérdőív értékelése azt mutatta, hogy a szakemberek 89.5%-a mai is követi az 1990-es irányelvek lényegét, azaz a coeliakia diagnózist vékonybélbiopszia és szövettani vizsgálat segítségével állítja fel, 10.5% már most sem használja a biopsziát. A többség (88%) viszont már nem alkalmazza az eredeti ajánlásban differenciáldiagnosztikai célból előírt glutenterhelést a diagnózis idején két éves vagy fiatalabb gyermekeknél, ha azok EMA vagy anti-TG2 antitest pozitívak. Az összes válaszoló 90%-a változást szeretne. A szakorvosok 53%-a szeretné a vékonybélbiopszia szükségességének elhagyását a klinikai tünetek miatt vizsgált betegeknél, ha az anti-TG2 antitestek pozitívak és 31%-uk a tünetmentes betegeknél sem tartaná szükségesnek a szövettani vizsgálatot. Az is kiderült, hogy jelenleg Európa jelentős részében alkalmazzák a HLA-DQ tipizálást, legalábbis a kétséges esetek elbírálására.

Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabó IR (megosztott első szerző), 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; ESPGHAN Working Group on Coeliac Disease Diagnosis; ESPGHAN Gastroenterology Committee. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2012;54:136-60.

Az irodalmi adatok áttekintése és a fenti tanulmányok után az ESPGHAN munkacsoport új diagnosztikus irányelveket dolgozott ki, mely 31 megállapítást és 45 ajánlást tartalmaz az evidenciaszintek megadásával. Ennek során a munkacsoport a coeliakia új definícióját is megfogalmazta (21. oldal), mely a coeliakiát a gluten-dependens klinikai tünetek, anti-TG2 pozitivitás, HLA haplotípus és enteropátia változó kombinációjának tekinti. Amennyiben a betegség jellegzetes tüneteinek jelenlétében az anti-TG2 antitestek szintje a vérben magas (>10xULN), az EMA vizsgálat is pozitív, és a beteg hordozza a HLA-DQ2 vagy DQ8 tulajdonságot, a jövőben a coeliakia diagnózisa gyermekeknél vékonybélbiopsziás szövettani vizsgálat nélkül is kimondható (60. ábra).

Bár az ajánlás hangsúlyozza, hogy a teljesen tünetmentes, csupán antitestvizsgálattal kiszűrt személyeknél a betegség igazolására továbbra is minden esetben szövettani vizsgálatot kell végezni és a neminvazív diagnózisnak feltétele a jóminőségű antitestvizsgálati lehetőség, a biopszia elhagyása vagy az enyhe szövettani eltérésekre (pl. Marsh I) épített vélemény egyes esetekben túldiagnózishoz vezethet. Ezért a coeliakia diagnózisának végleges kimondáshoz célszerű bizonyos minimumfeltételek vizsgálata. Ennek elemzése során az egyes diagnosztikus komponensek relatív szerepét értékeltük és egy Symptom – Antibody – Genetics - Endoscopic Histology (SAGE) score-t dolgoztunk ki (61. ábra), mely az ESPGHAN irányelvek II. függelékében jelent meg.



60. ábra. Az ESPGHAN 2011-ben javasolt diagnosztikus algoritmus a coeliakiára utaló klinikai tünetek esetén. CD: coeliakia, GFD&F/u: glutenmentes diéta és követés, Paed.GI: gyermek-gastroenterológus

Score	Tünet	Antitestek*	Szövettan	HLA-DQ
2	Klasszikus malabszorpció	EMA+ és/vagy anti-TG2+ >10xULN	Marsh IIIb, IIIc	
1	Kompatibilis tünet vagy elsőfokú rokon vagy T1DM	Anti-TG2+ <10xULN vagy anti-DGP+	Marsh II, IIIa vagy Marsh 0-I és depositum+	DQ2 és/vagy DQ8
0	Tünetmentes	Nem vizsgálták	Marsh 0-I vagy nem volt	Nem vizsgálták
-1		Vizsgálták, mind negatív*		Sem DQ2, sem DQ8 nincs

*IgA hiány esetén IgG antitestek is

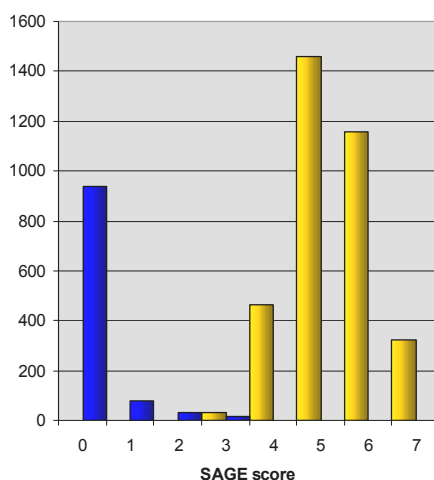
61. ábra. SAGE (Symptom-Antibody-Genetics-Endoscopic histology) score. Mind a 4 komponens egyszer vehető figyelembe, a coeliakia diagnózisának felállításához SAGE≥4 pont szükséges.

Korponay-Szabó IR, Gyimesi J, Tumpek J, Nemes É, Mäki M, B.Kovács J. Development and validation of a simple diagnostic score for coeliac disease (SAGE) based on symptoms, antibodies, HLA genotypes and biopsy results. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2011, 52:Suppl2:E35 (absztrakt)

Korponay-Szabó IR, Gyimesi J, Castillejo G, Hogen Esch C, Troncone R, Koletzko S, Mearin L on behalf of the Prevent CD Study Group. Prospective evaluation of a Symptom-Antibody-Genetics-Endoscopy (SAGE) score for coeliac disease diagnosis in a risk cohort. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2011, 52:Suppl2:E34-35 (absztrakt)

Korponay-Szabó IR, Tumpek J, Gyimesi J, Nemes É, B Kovács J, Mäki M. Using a Symptom-Antibody-Genetics-Endoscopy (SAGE) score to predict coeliac disease in patients without villous atrophy. Gut 2011, 60:Suppl 3, A391 (absztrakt)

A score értékelését eddig 3872 magyar coeliakiás betegen és egy nemzetközi coeliakia prevenciós vizsgálatban (www.preventceliacdisease.com) részt vevő elsőfokú rokonként coeliakiára veszélyeztetett gyermekekben végeztük el. Vizsgáltunk továbbá 268 olyan szeropozitív beteget, akiknél az első vékonybélbiopszia lelete negatív volt. Kontrollként 1061 olyan beteg adatait használtuk fel, akiknél vékonybélbiopszia történt és a végleges diagnózis nem coeliakia volt. Az 5 vagy magasabb SAGE score értékek pozitív prediktív értéke 100% volt, a SAGE=4 értéké 99.9%, a SAGE=3 értéké 41.2%. A 4-es határérték jól különválasztotta a coeliakiás és kontroll csoportot (62. ábra). Az összes coeliakiaként diagnosztizált beteg 98.6%-a ért el 4 vagy afeletti SAGE értéket. A 4 alatti értékek főként annak voltak tulajdoníthatók, hogy a régi diagnózisok idején nem történt antitestmérés, így releváns szerológiai eredmény nem állt rendelkezésre vagy a betegnek csak bőrtünetekkel járó dermatitis herpetiformis manifesztációja volt boholyatrófia nélkül. A kontrollok közül az első vizsgálat idején 2 beteg (1.8 ezrelék) ért el 4 pontot, akiknek malabszorpciója, súlyos boholyatrófiája és HLA-DQ2 illetve DQ8 allélje volt, de az antitestek a vérben negatívak voltak. Ezeket a betegeket az 1990-es ESPGHAN kritériumok szerint coeliakiásnak lehetne véleményezni. Az egyik beteg nem javult a glutenmentes diétára, majd T-limfocita defektus igazolódott. A másik betegnél veleszületett szukráz-izomaltáz hiányt találtunk, mely súlyos tehéntej-enteropátiához vezetett és ez okozta a malabszorpciót és vékonybélkárosodását. Glutenterhelés és évekig tartó követés után a vékonybél szerkezet normális maradt.



62. ábra. A coeliakia diagnózisához ajánlott score (SAGE) értékek megoszlása (betegek száma) 3872 coeliakiás és 1061 (esetenként glutenterheléssel kombinált) vékonybél szövettan alapján nem coeliakiás betegnél

A coeliakia prevenciós vizsgálatban összesen 1348 elsőfokú rokont követtünk a születéstől, a vizsgálat még folyik, közülük 921 hordoz HLA-DQ2 vagy DQ8 tulajdonságot. Mivel a monitorizálás során már a korai eltérések is kimutathatók, ebben a betegcsoportban a diagnózis igen nehéz lehet. A követés során eddig klinikai tünetek vagy coeliakia antitest pozitívitás (anti-TG2 vagy gliadin antitest) kialakulása miatt 49 gyermeknél történt vékonybélbiopszia és a SAGE értékeket prospektíven állapítottuk meg. Marsh III eltérés 32 betegnél volt, Marsh II eltérés 2 betegnél, Marsh 0-I eltérés 15 esetben volt. Utóbbiak közül 5 gyermek további követése szükséges az antitestek pozitívitás, potenciális coeliakia lehetősége miatt és egyiküknél a vékonybélben az anti-TG2 antitestek lerakódása is kimutatható volt. A Marsh II eltéréssel rendelkező egyik gyermek a gluten fogyasztásának folytatása utáni második biopsziában már normál boholszerkezetet mutatott. A gyermekek adatait értékelve a SAGE score 4 vagy afeletti eredménye 96.8% szenzitivitást és 96.3% specificitást mutatott, azaz a score alapján nem kell számolni túldiagnózissal.

A harmadik tanulmányban azokat a betegeket vizsgáltuk, akiknél az antitestek jelenléte ellenére az első szövettani vizsgálatnál nem volt boholyatrófia. A szövettani metszeteket újrakonzultáltuk a patológusokkal, és ha az orientáció nem volt megfelelő, új metszeteket készítettünk. A betegeket prospektíven követtük, extraintesztinális manifesztációkat vizsgáltunk és családszűrést végeztünk elsőfokú rokonaik között az anti-TG2 és EMA vizsgálattal. A 268 beteg közül 21 (7.8%) betegnél dermatitis herpetiformis állt fenn, melyet a bőr immunfluoreszcens vizsgálatával igazolni lehetett, és ezzel a gluten-érzékenység diagnózisa is igazoltnak vehető. 58 (21.6%) betegnél a kiterjesztett szövettani vizsgálatok legalább parciális II boholyatrófiát vagy Marsh IIIA eltérést mutattak, így náluk végül mégis igazolódott a coeliakia fennállása. 49 betegnél (18.3%) a követés során boholyatrófia alakult ki egy későbbi időpontban. 32 (11.9%) betegnél extraintesztinális manifesztáció vagy y elsőfokú rokonaiknál később lege artis igazolódott coeliakia alapján nagy valószínűséggel fennáll a gluten-érzékenység, végül 108 beteg (40%) egyelőre romlást nem mutatott. A kezdeti SAGE értékek szignifikánsan magasabbak voltak azokban a csoportokban, ahol a coeliakia hagyományos diagnózisát igazolni lehetett (14. táblázat).

14. táblázat. A coeliakia diagnózisára javasolt SAGE score értékei diagnosztikus problémát okozó betegeknél (n=268), akiknél az első vizsgálatkor a vékonybélben nem volt boholyatrófia.

Kimenetel	Betegszám	Kezdeti SAGE (átlag)	SAGE (átlag) a követés után	P
Később boholyatrófia	49	4.24 ± 0.90	5.32 ± 0.80	
Valószínűleg CD	32	4.21 ± 0.70	4.28 ± 0.72	
Még nem ismert	108	3.01 ± 0.80	3.11 ± 0.81	***
Fals negatív szövettan	58	3.93 ± 1.04 (revízió előtt)	4.68 ± 0.82 (revízió után)	
Dermatitis herpetiformis	21	2.66 ± 1.59	–	**

***<0.001 egyéb csoportokhoz képest, **p=0.01 még nem ismert csoportokhoz képest

5.8.5. A coeliakia új kezelési lehetőségeinek vizsgálata

Korponay-Szabó IR, Tumpek J, Gyimesi J, Laurila K, Papp M, Maki M, Khosla C. Food-grade gluten degrading enzymes to treat dietary transgressions in coeliac adolescents. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 2010;50:E68 (absztrakt)

A coeliakia eddig elfogadott egyedüli hatásos kezelése a tartósan, egész élet folyamán betartott glutenmentes diéta. Mivel betartása egyes betegek számára nehéz, a gliadin immunológiai hatásának megakadályozására annak mikrobiális enzimekkel történő lebontását javasolták (Shan és mtsai, 2002). Glutenbontó aktivitással rendelkező proteáz enzimek baktériumokból vagy gombákból nyerhetők, sőt ilyenek étrendi kiegészítőkben is találhatóak. Tanulmányunkban a Stanford Egyetemmel (USA) közös vizsgálatban a STAN1 készítmény (*Aspergillus niger* aspergillopepszin és *Aspergillus oryzae* dipeptidil-peptidáz IV) hatását vizsgáltuk kettős vak, placebo kontrollált, randomizált prospektív vizsgálatban. A STAN1 laboratóriumi körülmények között kapszulánként kb. 1 g glutent képes lebontani (Ehren és mtsai 2009). Vizsgálatunkban 38 serdülő és fiatal felnőtt coeliakiás beteg (medián kor 17 év, mind 12 év feletti) vett részt, akik több mint egy év eltelte után is alacsony szeropozitivitást (a kezdeti érték 20%-a alatt) mutattak, melynek oka bevallott diétahiba volt. Az IgA hiányos betegeket és a terheseket kizártuk, valamint azokat is, akik egyáltalán nem folytattak diétát. Az első 4 hétben a compliance megítélésére mindnyájan placebot kaptak (3-4 kapszula naponta), majd ezt követően 12 hétig aktív enzimet vagy placebot. 12 hét után az addig placebot kapók aktív enzimet, az aktív enzimet kapók pedig az aktív enzim mellé placebo kontrollált kapszulás formában napi 1 g glutent kaptak. A betegektől azt kértük, hogy a vizsgálat előtti étkezési szokásaikat folytassák, a bevallott glutenbevitelről naplót írtunk. A vizsgálat előtt és a vizsgálat alatt 2 hetente mértük a szérum antitest szinteket, a vizsgálat előtt és végén vékonybélbiopsziával vizsgáltuk a vékonybél állapotát. 35 beteg került randomizálásra. A betegek jól tűrték az enzim adagolását (csak egyéni jelentkezett hányinger és szédülés, de ennek kapcsolata a STAN1-gyel nem volt egyértelmű), a vizsgálatot azonban csak 26-an fejezték be. 20 betegnél volt mód a vizsgálat végén is szövettani ellenőrzésre. A többiek elsősorban a compliance hiánya miatt maradtak ki. A vizsgálat kezdetén a 38 betegből 33-nál súlyos boholyatrófia állt fenn tünetek nélkül. Az első 4 hétben a szérum antitest szintek nem változtak jelentősen, ezt követően azonban a betegek egyharmadánál jelentős emelkedést észleltünk. Az antitest szintek nem mutattak összefüggést az aktív készítmény illetve placebo fogyasztásával vagy a hozzáadott napi 1 g glutennel. A vékonybélkárosodás is változatlan volt a kezelés végén vett mintákban. A vizsgálatban a STAN1 hatásosságát nem tudtuk igazolni. Az eredmények arra utalnak, hogy a betegek jóval több mint napi 1 g glutent fogyasztottak, és a vizsgálat második fázisában biztonságérzetük megnőtt és még több diétahibát követtek el. A vizsgálat hasznos tanulságokkal szolgált az enzimterápiás tanulmányok tervezéséhez, és többek között arra is felhívta a figyelmet, hogy a compliance mellett az időfaktornak is szerepe van.

6. MEGBESZÉLÉS

6.1. A transzglutamináz antitestek kimutatása és összehasonlítása

A coeliakia a hagyományos tankönyvekben enteropátiaként szerepel, a szövettani eltérések azonban nem specifikusak (Pallav és mtsai 2012), 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, reticulin, jejunális 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 tartalmazzák a szöveti környezetben, így humán szövet esetén nagyon specifikusak és tulajdonképpen olyan antigént ajánlanak fel, mint amilyennel az autoantitest *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. Vizsgálatainkban a gyenge enzimaktivitású enzimekhez való rosszabb antitestkötődés (Tumpek és mtsai 2004) arról árulkodik, hogy ezeknek a fehérjéknek a térszerkezete nem volt megfelelő, a transzglutamináz aktivitás feltétele ugyanis egy megfelelő térbeli alakzat felvétele. Érdekes módon ez a probléma nemcsak érzéketlenebbé teszi a vizsgálati eljárást, hanem a specificitás is csökkenhet, mert a szérum antitestek nonspecifikusan is megtapadhatnak az „összegyűrődött” vagy aggregált rossz szerkezetű fehérjén. Ez az anti-TG2 mérések kezdeti időszakában jellegzetes probléma volt, és még ma is magyarázhat bizonyos eltéréseket az egyes gyári anti-TG2 kimutatási kit-ek között (Giersiepen és mtsai 2012). Az antitestkötődési tulajdonságok javíthatók, ha nem közvetlenül, hanem egy másik fehérje vagy antitest segítségével, egy megfelelően orientált helyzetben, valamely természetes kötőhelyénél fogva rögzítjük a TG2 antigént a lemezre. Ez az eljárás nemcsak a specificitást, hanem az érzékenységet és az epitóp hozzáférhetőségét is javíthatja (El Alaoui és mtsai 2006), és ez a magyarázata a radioizotópos kimutatás nagyobb érzékenységének is (Giersiepen és mtsai 2012). Itt ugyanis az antitest kimutatása immunprecipitációval történik, ami azt jelenti, hogy az antigén és az antitest folyadék fázisban kapcsolódik össze: a kapcsolat erősebb, kevésbé vannak a kötődési partnerek deformációnak kitéve. A folyadékfázisú kimutatási rendszerek magas érzékenységét főként a glutenmentes diéta ellenőrzése kapcsán lehet kihasználni: sokkal tovább mutatják az antitest pozitivitást, mint a szokásos ELISA mérési eljárások (Candon és mtsai 2012). Az EMA és az anti-TG2 azonosságát a gyakorlatban jobban kellene hangsúlyozni, mert ez rámutat

arra, hogy az anti-TG2 kimutatásokat technikailag éppoly specifikussá kell fejleszteni, mint amilyen az EMA. Paradox módon ez a mikroszkópos értékelést kívánó eljárás jelenleg a legmagasabb specificitású. A coeliakia antitestek nagy mennyiségben vannak jelen a vérben a coeliakia kezeletlen állapotában, így egy viszonylag egyszerű fluoreszcens eljárással is könnyen láthatóvá tehetők. A jellegzetes EMA mintázat látványa még halvány reakció esetén is nagyon meggyőző. A TG2-/- szövetekkel kapott eredményeink pedig azt mutatják, hogy a mintázatot más, TG2-től független specificitású antitestek nem utánozzák (Korponay-Szabó és mtsai 2003a). Az ELISA eredményeket csak egy számként látjuk, ahol nehéz a háttérreakciókat elkülöníteni és ezért az alacsony antitest szintet jelző eredmények diagnosztikusan sokkal kevésbé hasznosíthatók (Hopper és mtsai 2007, Kurppa és mtsai 2012). Meg kell azonban jegyezni, hogy a valóban jó minőségű antigént tartalmazó gyári ELISA-k, mint a CelikeyTM teszt, az alacsony pozitív értékeknél is nagyon specifikusak.

A TG2-alapú diagnosztikus ELISA eljárások továbbfejlesztése jelentős számú új beteg felismerését tette lehetővé, mivel a coeliakia szerodiagnosztikája a korábbiaknál nagyobb méreteken, 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. Ennek jó eszköze lehet a coeliakiás TG2 epitóra specifikus MAb885 felhasználása, mely lehetőséget adna a különböző klinikai kit-ek standarizálására is. 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 kit felszínére, 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 (Crovella és mtsai 2007, Demirçeken és mtsai 2008, Kotze és mtsai 2009, Laadhar és mtsai 2011).

Az általunk készített gyorsteszttel egyidőben más gyors anti-TG2 kimutatási eljárások is megjelentek (Ferre-Lopez és mtsai 2004, Nemec és mtsai 2006). Alkalmazásuk egyszerűsége megnövelte a vizsgálható betegek számát és hasznosnak bizonyult a klinikai esetfelismerésben és a szűrővizsgálatok gyors kivitelezésében (Demirçeken és mtsai 2008,

Alarida és mtsai 2011). A laboratóriumokban végzett népességszűrési tanulmányokban jelentős költséget, időt és szervezést igényel a minták begyűjtése, szállítása és feldolgozása. Az egyik legnehezebb feladat a kiszűrt pozitívok visszahívása, ami több hónap után már kevésbé effektív. Hónapok alatt a glutenbevitel is változhat, nehezebbé válhat a diagnózis igazolása (Hogen Esch és mtsai 2010). A 2005-ös szolnoki szűrővizsgálatban a helyszíni pozitivitás után már 3-4 nappal megtörténtek a vékonybélbiopsziás vizsgálatok és ezért jó volt a betegek részvétele a megerősítő vizsgálatokban is (Korponay-Szabó és mtsai 2007). A coeliakia gyors teszt segítségével az eredmények nemcsak gyorsabban állnak a vizsgáló orvos rendelkezésére, hanem a szűrő jellegű első vizsgálat nemcsak orvos vagy egészségügyi személyzet, hanem 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 (Korponay-Szabó és mtsai 2005), valamint lehetővé teszi a családtagok minimálisan invazív szűrését (Raivio és mtsai 2006). Bár az antitest mérések működésének metaanalízise során a gyors tesztek jó működési tulajdonságokat mutattak, sok országban a laikusok által történő használatot az orvosok ellenzik. Ez attól is függ, hogy a felhasználó milyen információkat kap a teendőkről egy pozitív teszt eredmény esetén. Nagyon fontos, és a teszt utasításában ki kell hangsúlyozni, hogy diétát a szakszerű orvosi kivizsgálás megtörténteig nem szabad elkezdni.

Az anti-TG2 antitest meghatározások ma már napi rutinná váltak, de még mindig nehéz az IgA hiányos betegek számára megfelelő teszteket választani. 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. Az IgG TG2 antitestek gluten-dependens jellege szintén igazolható volt. Ez alátámasztja azt, hogy az IgA hiányos coeliakiás betegeknek ugyanannak a betegségnek a spektrumát látjuk, csupán technikailag nehezebb a diagnózis. Mivel elvi különbség nincs, 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. Az IgA és IgG TG2 antitest vizsgálat együttes alkalmazhatóságát populációszűrési vizsgálatok során is bizonyították (Tomassini és mtsai, 2004). Az IgG vizsgálatok terjedése és hatékonysága nevelő hatással is volt, mert korábban a rutin IgA antitestmérések mellett nem mindig történt meg a szérum IgA szint mérése sem a klinikai gyakorlatban, sem szűrővizsgálatoknál. Az IgA hiány felismerése kritikus a gyors teszttel végzett antitest kimutatásnál, ezért kezdettől arra törekedtünk, hogy a coeliakia antitest és az össz IgA kimutatást egyszerre végezzük. A kereskedelembe kapható teszt ezt az igényt lassabban követte, de a második generációs formában már mindkét kimutatási lehetőség

rendelkezésre áll. Más gyorstesztokban az IgA és IgG anti-TG2 kimutatás kombinációját alkalmazták (Ferre-Lopez és mtsai 2004). Az IgA és IgG anti-TG2 kimutatás magas specificitása miatt a sokkal gyengébb specificitású hagyományos gliadin antitest vizsgálatok fokozatosan kiszorultak a klinikai diagnosztikából. A deamidált peptidek elleni antitesteknél viszont még normál szérumban is az IgG anti-DGP eredmények érzékenyebbek és specifikusabbak (Giersiepen és mtsai 2012), mint az IgA anti-DGP antitest eredmények. Ez arra hívja fel a figyelmet, hogy keletkezésükben a mukozális immunrendszer másképp vesz részt, mint az anti-TG2 és EMA antitestek termelésében.

A szérumból történő antitestvizsgálatokat kiegészítik a vékonybélből vagy más szervekből végezhető antitestvizsgálatok, melyek közvetlenül a szövetekhez kötött antitesteket mutatják ki. Ez főként akkor jelentős, ha a szérumban az antitestek nem mutathatók ki (Salmi és mtsai 2006b). Egy másik alkalmazás a coeliakia korai eltéréseinek értékelése, ahol a szövetekbe lerakódott IgA már előbb kimutatható volt, mint a boholyatrófia. Tanulmányunkban 48 betegen azt vizsgáltuk, hogy az első klinikai kivizsgáláskor látszólag normál vékonybél boholyszerkezetű betegeknél milyen a későbbi kimenetel. Ezeknél a betegeknél a vérben nem vagy csak alacsony koncentrációban voltak jelen anti-TG2 antitestek. A vékonybélbe lerakódott anti-TG2 antitestek jelenléte esetén több év után nagy valószínűséggel jelent meg klasszikus boholyatrófia, így ezek az eltérések prediktív értékűek (Koskinen és mtsai 2008a). A bélrendszeren kívüli szövetekben a TG2-specifikus antitestek jelenléte feltárhatja e szervek részvételét a gluten-szenzitív betegségekben és lehetőséget ad addig ismeretlen eredetű és emiatt nem gyógyítható szervi manifesztációk (májbetegség, szívbetegség, lymphadenopathia) hatékony kezelésére a gluten eliminációjával.

6.2. A transzglutamináz coeliakia epitópja

A coeliakiás anti-TG2 antitestek konformáció-dependens kötődést mutatnak. Molekuláris modellezéssel és irányított mutagenesis segítségével egy összetett TG2 epitópot azonosítottunk, mely konformációs és 3 domén részvételével alakul ki. Az epitóp központja a 153-154-es glutaminsavak körüli felszín, melyhez közel van a 19-es arginin és a 659-es metionin is. Eredményeink alapján e két utóbbinak is szerepe van a kötődésben, bár a 153-as és a 19-es aminosav együttes részvétele látszik a legfontosabbnak és önmagában elegendő. Emiatt az antitestek a molekula kinyílása és az enzimreakció során is kötve maradhatnak. A bázikus argininek gyakran részei felszíni epitópoknak, és kombinációjuk ellentétes töltésű savanyú aminosavakkal, mint például a 153-as vagy 154-es glutaminsavval, energetikai szempontból kedvező kötőhelyet képezhet. Kimutatták, hogy a kötődés erőssége úgy is modellezhető, hogy az antitest megkötődése révén a molekula mekkora felszíne válik rejtetté, azaz a kötés mekkora változást okoz az oldattal érintkező felszínben (Rajamani és mtsai 2004). Az 19-153-154-es aminosavak részvétele esetén ez

jelentős, amit a 659-es lefedése még tovább fokoz. Az N-terminális rész vagy a C-terminális rész alternatív módon is elegendő a coeliakia antitestek kötődéséhez, míg a core domén területén levő aminosavak szerepe obligát. A coeliakia antitestek egy részénél és a MAb885 esetén a 19-es aminosav egyedüli cseréje nem okozott változást a kötődésben, de kompetíciós vizsgálatokban ezek is versengtek a másik csoporttal, ahol a 19-es aminosav cseréje esetén a kötődése csökkent. A betegekből készített monoklonális antitestek esetén jól követhető volt, hogy ugyanazon betegben megtalálhatók azok az antitestek is, melyek reagálnak és azok is, amelyek nem reagálnak az R19S mutánssal, de minden monoklonális antitest kötődése megszűnt az R19S-E153S kettős mutáció esetén. A két csoport közötti versengést mind a monoklonális antitestekkel, mint természetes betegsavókkal és az azokból tisztított IgA és IgG frakciókkal is igazolni lehetett. Ezek a vizsgálatok azt is bizonyítják, hogy a coeliakiában termelődő IgG antitestek azonos epitópot ismernek fel, mint az IgA antitestek, így alátámasztják azt, hogy az IgG antitestek diagnosztikus jelentősége hasonló.

Egy korábbi vizsgálat során aTG2 katalitikus triádjának megváltoztatása (Byrne és mtsai 2004) is csökkentette a coeliakiás antitestek kötődését. Ez a terület nem része a miáltalunk azonosított epitópnak, sőt a molekula épp ellentétes felszínén található. A Byrne vizsgálatban a mutagenesis során a kiválasztott aminosavakat alaninra cserélték, mely azonban hidrofób felszínt és stabilitási problémákat eredményezhet, különösen azt is figyelembe véve, hogy a 277-es cisztein a molekula vázát merevítő egyik legnagyobb hélixének végén található. Ezért lehetséges, hogy az aktív hely módosítása a konformációs epitóp torzulását okozta. Saját vizsgálataink során (Király és mtsai 2009) a 277-es cisztein szerinre történő cseréje nem csökkentette a coeliakiára vonatkozó antigenitást. Azt is kimutattuk, hogy a coeliakiás antitestek a működő enzim felszínén megkötődve maradnak. Ez nehezen képzelhető el, ha épp a katalitikus centrum volna a kötőhely, mivel az antitestek jelenlétében folyamatosan termelődnek a keresztkötött termékek, míg az antitestet magát az enzim nem használja szubsztrátként (Király és mtsai 2006). A coeliakia antitestek egy aktív helyre kötődő gliadin-analóg inihibitor jelenlétében is jól kötődtek (Myrsky és mtsai 2009b), ez gyakorlatilag kizárja azt, hogy maga az aktív hely lenne a fő epitóp. Eredményeink viszont összhangban vannak a többi korábbi epitóptérképezési vizsgálat eredményeivel, annak ellenére, hogy azokban a következtetések gyakran mások voltak. Úgy tűnt, hogy független epitópokról van szó a molekula több szerkezeti egységén. Sblattero és munkatársai viszont kimutatták, hogy az N-terminális domént és a core domén első részét tartalmazó fragment a legfontosabb a kötődésben (Sblattero és mtsai 2002). Ez megfelel annak, hogy az összetett epitóp centruma a 153-154-es aminosavak körül van. Az előző vizsgálatok igazolták azt is, hogy az N-terminális és C-terminális rész is részt vesz a coeliakia antitestek kötődésében. Ezek olyan közel vannak egymáshoz a csukott formában, hogy

önmagukban is közös epitópot alkothatnának, bár az I-III-IV domén mutánssal kapott eredményeink azt jelzik, hogy a core domén részvétele nélkül effektív kötőhely nem jön létre (Simon-Vecsei és mtsai 2012). A coeliakia antitestek kötődését gátló MAb885 kötőhelye is a core doménen van, az N-terminális és C-terminális mutációi nem befolyásolják (50. ábra), így az utóbbiakhoz történő kötődés semmiképp sem független a molekula középső részének részvételétől. Érdekes kérdés azonban az, hogy hogyan kötődhetnek a coeliakia antitestek a Seissler vizsgálatban olyan fragmentekre is, mint a 227-687-es darab, mely az epitópnak sem N-terminális (19), sem a core doménen lévő fő aminosavait (153-154) nem tartalmazza (Seissler és mtsai 2001). Valószínű, hogy a vizsgálatban alkalmazott folyadékfázisú kötődés (immunprecipitáció) közben ez a fragmentum is kedvező alakot vehetett fel, habár a reakció csak a savók 69%-ánál marad meg és a kötődési jel is jelentős csökkenést mutatott. A 659-es aminosav körüli felszín ebben a mutánsban jelen volt és annak core doménnel határos részét a 400 körüli aminosavak stabilizálhatták, így az epitóp mintegy fele lényegében rendelkezésre állt. Saját vizsgálatainkban eddig nem készítettünk 431-es mutációt (ezen a helyen egy valin helyezkedik el, mely neutrális töltésű), bár a modellezés szerint a 431-es valin az S4 és S5 kalciumkötőhely közötti felszínen van és oldallánca hasonlíthat a PQPQLPY motívumot tartalmazó gliadin peptidekben lévő leucin oldalláncára.

Az epitóp szerkezetével kapcsolatban felmerülő másik lényeges kérdés az volt, hogy a konformációs epitópok mellett vannak-e lineáris kötőhelyek is. Az urea és guanidin jelenlétében végzett kötődési vizsgálatok azt mutatták, hogy jelentős lineáris kötőhely nincs, a kötődés konformációs epitópot kíván. Ezért további kísérletekre volt szükség annak elbírálására, hogy az általunk készített mutációk hatása ténylegesen azokon az aminosavakon keresztüli kötést rontotta el, amelyeket megváltoztattunk, vagy indirekt módon egy másik, távoli kötőhely felszínét deformálta. Erre jó példa volt kísérleteink kezdetén a 158-as glutaminsav pontmutációja, mely nem is a felszínen, hanem a core domén első alfa-hélixének belsejében, annak bázisa körül helyezkedik el (30. ábra). A kristályszerkezeteken végzett mérések szerint ez a mutáció úgy vezetett a kötődés csökkenéséhez, hogy a hélix dőlési szögét billenthette el. Ez a hatás megváltoztatja a hélix tetején lévő 153-as és 154-es aminosavak relatív helyzetét az N-terminális domén első hélixén lévő 19-es argininhez képest, és nagy valószínűséggel így teszi tönkre a konformációs epitópot akkor is, ha magukat a felszíni aminosavakat nem is cseréltük ki. Ezért olyan mutációk készítésére törekedtünk, melyek hatása az ismert kristályszerkezetek alapján jobban megítélhető és a felszíni aminosavak cseréje nem vezet a hidrogénkötések megváltozásához sem. A 154-glutaminsavnak megfelelő 199-es helyen a XIII-as véralvadási faktorban egy bázikus lizin van, de egyébként a core domén felszíne a két fehérje kristályszerkezetében nagyon hasonló és ez egy szabad mobilis oldallánc, jelentős

hidrogénkötések nélkül. A XIII-as faktor egy szerkezetileg homológ transzglutamináz, de a coeliakiás antitestek számára nem jó antigén. Ha a TG2 fehérjében a 154-es aminosavat glutaminra cseréltük, sem a katalitikus aktivitás, sem a coeliakiás antitestek kötődése nem csökkent, azaz ennek a szabad oldalláncnak a mutációja nem okozott konformációváltozást. Ezért a kísérleteinkben a 154-es aminosavat lizinre is kicseréltük. Ez az E154K mutáns viszont hasonló antigén volt, mint az E153S mutáns. Az R19S-E154K-M659S hármas mutáció ugyanúgy megszüntette a coeliakia antitestek kötődését, mint a R19S-E153S-M659S hármas mutáció. Kimutattuk továbbá, hogy a MAb885 antitest kötődését is befolyásolta az E154K mutáció (50. ábra), bár kisebb mértékben, mint a betegből származó monoklonális egyláncú antitestek kötődését (38. ábra). Ezek az eredmények együttesen azt támasztják alá, hogy az általunk létrehozott mutációk a coeliakia antitestek kötődését nem indirekt módon a fehérje konformációjának elrontása révén, hanem valóban a horgonyzópontok cseréjével változtatják meg. A főbb mutánsoknál vizsgáltuk a CD spektrumot is, melyben számottevő eltérés nem volt. A TG2 enzimműködései is az intakt térszerkezethez kötöttek. A R19S mutáns transzamidáló aktivitása megtartott volt. A 153-as helyet érintő mutánsok is rendelkeztek keresztkötő aktivitással, bár ez annak megfelelően alacsonyabb volt, hogy ez az aminosav egyben a katalitikus aktivitáshoz szükséges kalcium megkötésére szolgáló egyik kötőhely része és a mutáció a kalcium megkötésének zavarával is jár (Király és mtsai 2009). Ezek a mutások viszont GTP-áz aktivitást mutattak (Simon-Vecsei és mtsai 2012).

Egy másik vizsgálatban (Teesalu és mtsai 2011) azt észlelték, hogy heparin hozzáadása csökkenti a coeliakiás antitestek kötődését. A közelmúltban a TG2 heparánszulfát kötőhelyét a 202-222 aminosavak körüli felszínre lokalizálták (Wang Z és mtsai 2012b). Saját vizsgálatunkban a gyors teszt kifejlesztése során azt észleltük, hogy a heparin valóban nem annyira jól köti a TG2-antitest komplexeket, mint a gelatin, az eredmények azonban nagyon heterogének voltak. A kész, kereskedelmi gyors tesztnél a vért heparinos kapillárisba veszik, és ez nem okoz csökkent jelet. Lehetséges, hogy ez a mennyiség még nem interferál a kötődéssel, vagy valószínűbb az, hogy a TG2 a hemolízis során aggregálódhat és így elegendő kötőhelye van arra, hogy a coeliakia antitesteket és a heparint is megkösse. Saját vizsgálatainkban a S1 kalciumkötőhely mutánsa, mely a 228-233 között aminosavak komplex mutációját tartalmazta, ugyanolyan jól kötötte a coeliakiás antitesteket, mint a vad TG2 fehérje. Meg kell azt is jegyezni, hogy a Wang vizsgálatban nem tisztított rekombináns fehérjével vizsgálták a heparánszulfátok kötődését, hanem sejtlízátumokkal különböző TG2 konstrukciók kifejezése után, így a kötődésben már sejtkomponensek is interferenciát okozhattak.

Betegsavóból származó és betegekből készített monoklonális 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. Hosszan követett betegeinknél is hasonló maradt az antitestek epitópspecifitása. Ez azt jelenti, hogy az anti-TG2 antitestek képződése szabályos, adott felszín ellen irányul és nem véletlenszerűen a TG2 ellen. Az autoimmun betegségekben általában gyakori az intramolekuláris epitope spreading, azaz fokozatosan az autoantigén egyre több epitópja ellen immunválasz keletkezik (Schlosser és mtsai 2005), és hasonló a coeliakiában minor autoantigén, a calreticulin esetében is kimutatható (Sanchez és mtsai 2003). Ezzel szemben a coeliakia antitesteknél alig van szomatikus hipermutáció, ami az antitest epitóp-érésére (affinity maturation) utalna (Di Niro és mtsai 2012). A felnőtt betegeknél ugyan kisebb volt a kötődés csökkenése a fő mutánsoknál, mely lehet másodlagos epitópspecifitások következménye, de ezek mértéke csekély volt és a fő epitóp dominanciája végig megmaradt. 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 coeliával 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 boholyatrophia és általában az EMA vizsgálati eredmény sem pozitív. Az 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 coeliakia antitestek jellegzetes velejárói az aktív coeliakia betegségnek, de nem coeliakiásoknál nem fordulnak elő. A gliadin bevitel provokálja a deamidált peptidek elleni antitestek termelését, de az anti-TG2 keletkezése nem tisztázott; megjelenését a haptén-carrier elv alapján magyarázzák. A T-sejt epitópok általában lineárisak és nem azonosak a B-sejt illetve antitest epitópokkal. A TG2 coeliakia epitópja az antitestek számára az aktív betegség alatt illetve fagyasztott metszetekben jól hozzáférhető, ezt bizonyítja az *in vivo* kötődés és az EMA típusú diagnosztikus reakció. Tanulmányainkban kimutattuk, hogy monoklonális nem coeliakia eredetű anti-TG2 antitestek a deamidált gliadin peptideket is felismerik. A keresztreakció többféle kompetíciós vizsgálattal és coeliakiás tisztított páciens antitestekkel is alátámasztható. Mivel a peptidek primer aminosav szerkezete nem egyezik a TG2 szekvenciával, a jelenség háromdimenziós hasonlóságon alapul. Ezt a hasonlóságot alátámasztja az is, hogy a molekuláris modellezés és kristályszerkezeti mérések szerint a gliadin peptidek bizonyos pozíciójában gyakori EPQL (a PQPQLPY deamidált változatában) motívum a HLA-DQ2 molekulába kötődéskor a fő coeliakiás epitóp 153-as és 154-es (és 431-es) aminosavának térbeli szerkezetére hasonlíthat, míg a kísérletesen igazolt EQ homológia

a TG2 más C-terminális területeivel is keresztreakcióhoz vezet. Ezen eredmények alapján a coeliakia antitestek megjelenésében a molekuláris mimikri is szerepet játszhat. Ez nem jelenti azt, hogy a haptén-carrier elmélet nem érvényesülhet, a kettő egymással kombinálódhat. Mindkét elméletben kulcsfontosságú szerep jut a TG2-specifikus B-sejteknek, mint a gliadint bemutató és ennek eredményeként a T-sejt által aktiválható nem professzionális antigénbemutató sejteknek. Ha a B-sejt specifikitása 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. Ennek megfelelően a bemutatott gliadinok szelekciója nem csak a DQ2/8 szintjén, hanem már a B-sejtbe való bekerüléskor is irányított lehet. A B-sejt (DQ) felé néző gliadin gyökök T-sejt válasszal kapcsolatos antigenitását megszabó jellegzetes elrendeződését (1.ábra) már kiterjedten vizsgálták, ezért sokkal érdekesebb, hogy a peptidekből a T-sejtek milyen motívumokat látnak. Ebből a szempontból a prolinagyűrűk látszanak fontosnak, és a legtöbb erősen immunogén peptidben ezekből 4 vagy 3 is található, tipikus távolságra. Ezért úgy tűnik, hogy maguk a T-sejtek is valamely szabályos szelekció vagy suppressziós hiány eredményei lehetnek. A korábbi genomikai vizsgálatok számos olyan humán gént azonosítottak, melyek a gliadinnal részben homológ szerkezetű részeket is kódolhatnak (Kumar és mtsai 2000). Ezek további kutatása indokoltnak látszik.

A coeliakia autoantitestek megkötődnek a célszervekben lévő TG2 felszínén. A tisztított coeliakiás anti-DGP antitestekkel azonban nem észleltünk sem EMA típusú, sem más jellegzetes festődést immunfluoreszcens vizsgálatainkban. Lehetséges, hogy ezek a vizsgálatok nem voltak technikailag elég érzékenyek, de az eddigi adatokból úgy tűnik, hogy az anti-DGP önálló biológiai aktivitása egyelőre nem igazolható. A tisztított teljes IgA frakcióval végzett vizsgálatokban észlelt hatások TG2-specifikus tisztított vagy monoklonális coeliakiás antitesttel is létrehozhatók voltak. Az anti-TG2 IgA (IgA hiány esetén IgM) antitestek lerakódása a szövetekben viszont minden coeliakiás betegre jellemző és kimutatása diagnosztikusan hasznosítható. Ez támogatja azt a nézetet, hogy az EMA típusú anti-TG2 antitestek közrejátszhatnak a coeliakia patológiai jelenségeinek kialakulásában. Mivel a vékonybélben kívüli szövetekből ritkábban vesznek biopsziát és azt is csak nagyon jelentős klinikai manifesztációk esetén, nem meglepő, hogy az egyéb szövetekben megkötődött antitestek kimutatásakor e szervek betegsége is fennállt. Érdekes módon a placenta bolyhok a vékonybéllel analóg felszíncsökkenést mutattak, amely új megfigyelés. Cerebelláris ataxiás betegeknél már korábbi vizsgálatokból ismert, hogy a legfontosabb eltérés a hipoxiára nagyon érzékeny Purkinje sejtek pusztulása és az erek körül kialakuló gyulladás (Hadjivassiliou és mtsai 1998, 2002). Saját antitest vizsgálatainkban pedig az

agyban is az anti-TG2 antitestek kisereken történő lerakódását észleltük (Hadjivassiliou és mtsai 2006).

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. Cadaver vizsgálatokból régóta ismert, hogy aktív coeliakiában a vékonybélben lévő erek száma kevesebb, elrendeződése kóros és kimutattuk, hogy falukban kevesebb izomelem található (Myrsky és mtsai 2009a). A sejtkultúrákban végzett kísérletekben a coeliakiás antitestek gátolták az angiogenezist és az endotél sejtek mozgását, mely az értubulusok képzéséhez fontos. Az értubulusok képződésének csökkenése jól reprodukálható volt a különféle vizsgálati rendszerekben és a TG2 fokozott katalitikus aktivitásával járt, mely megfelel az antitestek biokémiai hatásának. Vizsgálatainkban a coeliakiás antitestek hasonló mechanizmussal *in vitro* fokozták a gliadin áthaladását a hámsejteken (Rauhavirta és mtsai 2011). A vaszkuláris permeabilitás is megnőtt, (Myrsky és mtsai 2009b), mely közrejátszhat gyulladásos folyamatos megindulásában. A vékonybél hipoxiás állapotát jelzi a hypoxia-indukált faktor 1 alfa (HIF1alfa) fokozott expressziója is (Vannay és mtsai 2010). Bár az érképződés egyes lépéseit más TG2 gátló antitestek is befolyásolták, ezek nem hozták létre az összes coeliakiára jellemző eltérést. További kísérletekkel igazoltuk, hogy a coeliakiás betegek antitestjei úgy kötődnek az enzimhez, hogy annak aktivitását fokozzák, és hogy ez a fokozódás elsősorban az extracelluláris TG2 működésére vonatkozik. Kimutattuk továbbá, hogy a megnövekedett TG2 hatására a RhoA anyagcsereút aktiválódik. Korábbi irodalmi adatok szerint az aktív RhoA hatására hasonló sejtkárosodás és motilitási zavar következik be, mint azt a kísérletekben észleltük. A konstitucionálisan aktív RhoA csökkenti a sejtproliferációt és a motilitást (Morin és mtsai 2009) valamint gátolja az endotél sejtek megfelelő polarizációjának kialakulását (Philippova és mtsai 2005).

Ezek az eredmények, összevetve azzal, hogy anti-TG2 antitestek gyakorlatilag minden coeliakiás betegben kimutathatók, a coeliakia antitestek fontos patogenetikai szerepét alátámasztják. A súlyos boholyatrófia kialakulásában betöltött direkt szerepük azonban további igazolásra szorul. Ennek kimutatása jelenleg nehéz, mivel nincs megfelelő állatmodell. Egy nude egereken végzett vizsgálatunk kezdeti eredményei azonban biztatók. Megfigyeltük továbbá, hogy az anyai IgG coeliakiás antitestek passzív transzportja esetén az újszülöttnél magas antitest szint és a szövetekben IgG anti-TG2 lerakódás alakul ki. Az átkerült antitestek epitópspecifitása azonos volt az anya szérumában lévő antitestekével. Egyes gyermekekben ezzel párhuzamosan klinikai tüneteket (hasmenés, májkárosodás) is megfigyeltünk, valamint az aktív coeliakiában szenvedő és szeropozitív anyák gyermekeinek születési súlya alacsonyabb volt. Direkt bizonyítékot azonban arra, hogy boholykárosodás is

létrejött volna, nem sikerült szerezni. A további kutatás szempontjából az látszik fontosnak, hogy az antitestekkel *in vivo* rendszerben is elérjünk valamilyen biológiai hatást, mivel már vannak specifikus inhibitoraink, melyekkel aztán eldönthető, hogy ez a hatás TG2 fehérjén keresztül jön-e létre illetve coeliakia jellegű-e. A simvastatinnal specifikusan gátolható a RhoA aktivációja, a MAb885 pedig magát az antitestkötődést tudja specifikusan gátolni. A MAb885 hatása érdekes, mert bár ugyanarra az epitópra kötődik, sem a TG2 enzimaktivitását nem befolyásolja, sem a tubulusképzést. A MAb885 és a coeliakiás antitestek együttes adásakor nem jön létre endotél sejteken a coeliakiás antitestek hatása. Valószínűleg ez azzal magyarázható, hogy kötődési epitópja csak részlegesen egyezik meg a coeliakiás antitestek kötőhelyével, bár ez elegendő a kompetícióhoz. A MAb885 a coeliakiás szövetekről is képes leválasztani az oda *in vivo* megkötődött IgA antitesteket, így bizonyos terápiás potenciál is remélhető. Ennek elbírálásához azonban szükség van a sejtekenél komplexebb biológiai rendszerekben való vizsgálatára.

Az a törekvésünk, hogy az anti-TG2 keletkezésének okaként valamely egyértelmű örökletes defektust találjunk, egyelőre nem járt eredménnyel, azonban ezek a vizsgálatok tovább folynak. Megállapítható, hogy a coeliakiás betegeknek olyan adottságai vannak, melyek fokozott T-sejtes válaszra vagy gyulladásra hajlamosítják őket. Azt, hogy a gliadinon kívül milyen egyéb triggerek lehetségesek, pontosan nem tudjuk, a toll-like receptorok fokozott primer expressziója bármilyen külső mikroba ellen fokozottabb reakcióval járhat. Érdekes, hogy ezeknek hajlamosító tényezőknek és genetikai variációknak a megoszlása populációnként változik. Ez arra utal, hogy magával a kórfolyamattal csak laza kapcsolatban vannak. A genetikai variációk közül három nem primeren immunsejtekkel kapcsolatos gén kiemelendő, mely általános sejtbiológiai jelentősége miatt érdekes lehet. Az integrin 4 alfa (ITGA4) és az 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, amit többet között a Rho fehérjék is befolyásolnak. A sejtés kísérletekben a motilitási és adhéziós funkcióknak a változását észleltük coeliakiás antitestek jelenlétében, így ezeknek az anyagcsere folyamatoknak a további vizsgálatát tervezzük a családi rizikóval született gyermekek köldökzsínójából preparált sejteken.

6.4. Az antitestvizsgálatok szerepe a coeliakia új diagnosztikus kritériumainak kidolgozásában

A legutóbbi évtizedben a coeliakiáról alkotott ismereteink jelentősen fejlődtek. Korai életkorban kialakuló malabszorpció esetén vagy később nyilvánvaló gasztrointesztinális manifesztációnál viszonylag egyszerűen megtörténik a coeliakia diagnosztizálása és kezelést írnak elő. Ezért a betegség hosszabb távú szövődményeire azoknál kell számítani, akiknél az

emésztőrendszeri manifesztáció szerény vagy hiányzik, esetleg a vékonybél szerkezete alapján nem lehet egyértelmű diagnózist megállapítani (foltos eltérések, szerény strukturális károsodások). A szövettani vizsgálat néha aluldiagnosztizálja a coeliakiát, ha a metszetek orientációja nem megfelelő. Ez a saját 268 szeropozitív betegünk közül 58-nál (22%), meglepően magas arányban fordult el. Néhány irreverzibilis károsodás hosszabb távon ennek ellenére kialakulhat, például májkárosodás, csontikulás vagy idegrendszeri eltérések. A demenciával és cerebellaris ataxia jelentkező betegeknél általában nincsenek gyomor-bélrendszeri tünetek. Sok szeropozitív családtagnál is nehéz lehet a diagnózis, mert szűréssel a szérumban antitesteket sokkal korábban is ki lehet mutatni, mint a tünetek megjelenése. Ilyen esetekben a vékonybélben megkötődött antitestek jelenlétének vagy a szérumban antitestek jellegzetes epitóspecifitásának igazolása segíthet annak eldöntésében, hogy fals pozitív antitest leletről vagy a coeliakia korai eltéréseiről van-e szó.

A betegek száma ma jelentősen magasabb, mint korábban. Ezért indokolt lenne a coeliakia diagnosztika egyszerűsítése. A hagyományos kritériumok szerint a diagnózis kimondásához vékonybél szövettani vizsgálat szükséges, azaz invazív vizsgálat elvégzése, mely gyermekeknél többnyire altatást is igényel. Tekintettel arra, hogy magas szérumban antitest szintek esetén igen magas az esély arra, hogy a vékonybélben már van atrófia, az ESPGHAN új diagnosztikus kritériumai - egyértelműen coeliakiára jellemző klinikai tünetek és HLA-DQ2 pozitivitás esetén - ma már megengedik a biopszia nélküli diagnózist, ha az antitest pozitivitás megerősíthető az átlagos anti-TG2 vizsgálatnál specifikusabb EMA vizsgálattal is. Ennek az új koncepciónak a gyakorlati alkalmazása azonban még számos tisztázatlan kérdést felvet. Nehéz definiálni, hogy mi tekinthető magas antitest szintnek azokkal az ELISA vagy más anti-TG2 kimutatásokkal (például Luminex assay), melyeket eddig kutatási vizsgálatokban nem tanulmányoztak. A kit-ek sokfélék és különbözőképp számítják ki a számszerű antitest értékeket, így nemcsak az antigén különbsége, hanem a mérési eljárás is eltérhet. A NEQAS körkontroll adatai alapján azonban a legtöbb kalibrációs sorral mérő ELISA esetén a normál határát tízszeresen meghaladó értékek ($>10 \times \text{ULN}$) tényleg magas szérumszintet jeleznek. Ez a határérték azonban nem minden kereskedelmi kitre általánosítható, a meglévőket és az újabbakat is tovább kell vizsgálni. A mérések ugyanannál a kit-nél is laboratóriumonként eltérhetnek, mely további hibaforrás lehet. Az azonban elvárható, hogy a laboratóriumok többsége a magas értékeket valóban a kitnek megfelelő magas tartományban mérje.

Az új ESPGHAN kritériumok másik jelentős kezdeményezése, hogy a coeliakiát már nem csupán enteropátiaként, hanem annál komplexebb módon definiálja. Az antitest eredmények, a HLA-DQ markerek és a tünetek is szerepet játszanak a diagnózis felállításában. Ez lehetővé teszi a korai eltérések értékelését is, azonban ilyenkor óvatosság szükséges a túldiagnózis elkerülésére. A coeliakia diagnózis véglegesítése az orvos és a

beteg számára is kényes és fontos lépés, hiszen egy életre szóló diagnózisról van szó. Ezért a diagnosztikus komponensek súlyozásával olyan pontrendszert alakítottunk ki, melyben a coeliakia ellen szóló vizsgálati eredmények (nincs HLA-DQ2 vagy DQ8, negatív szérumban antitestek) negatív súlyszámot kapnak. A coeliakiára igen jellemző eltéréseket (EMA, Marsh IIb és C) viszont pozitív súlyszámokkal vettük figyelembe. Nehéz a szövettani eredmények közül az enyhe léziók besorolása, mivel Marsh I eltérést sok más betegség is okozhat. Ezért erre nem adtunk külön pontot, csak akkor, ha a nyálkahártyában az *in vivo* kötődött coeliakia antitestek is megtalálhatók voltak. Az így 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 boholatrófiája, de az a követés során 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 beilleszhetők.

Összefoglalásul azt mondhatjuk, hogy a transzglutamináz-ellenes antitestek tanulmányozása sok új információval gyarapította a coeliakiáról alkotott képet, felismerésük és kimutatásuk diagnosztikusan fontos és jelenlétük magyarázhatja a coeliakia egyes klinikai jelenségeit. Az antitestek biológiai hatásának további kutatása elvezethet a coeliakia igazi kórokának feltárásához.

7. Új megállapítások

1. Munkatársaimmal igazoltuk, hogy a coeliakiában észlelhető endomysium, reticulín 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 népszégszűrést helyszíni gyorsesztest alkalmazásával.
14. Elsőként végeztünk coeliakia népszégszűrést Magyarországon és megállapítottuk, hogy 6 éves korban az előfordulás 1.4%.
15. Elsőként végeztünk coeliakia népszégszűrést 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 sejt kultúrában a coeliakiás antitestek hatására a RhoA anyagcsere útvonal aktiválódik.

19. Elsőként írtunk le klinikai és immunológiai jelenségeket anyából az űjszülöttbe 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).

8. IRODALOM

Abadie V, Sollid LM, Barreiro LB, Jabri B (2011). Integration of genetic and immunological insights into a model of celiac disease pathogenesis. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:493-525.

Agardh D, Carlsson A, Lynch K, Axelsson I, Lemmark A, Ivarsson SA (2004). Using radioligand-binding assays to measure tissue transglutaminase autoantibodies in young children. *Acta Paediatr*. 2004;93:1046-1051.

Agardh D, Dahlbom I, Daniels T, Lorinc E, Ivarsson SA, Lernmark A, Hansson T (2005). Autoantibodies against soluble and immobilized human recombinant tissue transglutaminase in children with celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2005;41:322-327.

Akimov SS and Belkin AM. (2001) Cell-surface transglutaminase promotes fibronectin assembly via interaction with the gelatin-binding domain of fibronectin: a role in TGFbeta-dependent matrix deposition. *J Cell Sci* 2001;114:2989-3000

Alaedini A, Green PH, Sander HW, Hays AP, Gamboa ET, Fasano A, Sonnenberg M, Lewis LD, Latov N (2002). Ganglioside reactive antibodies in the neuropathy associated with celiac disease. *J Neuroimmunol*. 2002;127:145-148.

Alarida K, Harown J, Ahmida A, Marinelli L, Venturini C, Kodermaz G, Tozzoli R, Mandolesi A, Bearzi I, Catassi C (2011). Coeliac disease in Libyan children: a screening study based on the rapid determination of anti-transglutaminase antibodies. *Dig Liver Dis*. 2011;43:688-91.

Ambrus A, Fésüs L (2001). Polyethylene glycol enhanced refolding of the recombinant human tissue transglutaminase. *Prep Biochem Biotechnol*. 2001;31:59-70.

Anderson RP, Degano P, Godkin AJ, Jewell DP, Hill AV (2000). In vivo antigen challenge in celiac disease identifies a single transglutaminase-modified peptide as the dominant A-gliadin T-cell epitope. *Nat Med*. 2000;6:337-42.

Arentz-Hansen H, Fleckenstein B, Molberg Ø, Scott H, Koning F, Jung G, Roepstorff P, Lundin KE, Sollid LM (2004). The molecular basis for oat intolerance in patients with celiac disease. *PLoS Med*. 2004;1:e1.

Arguelles-Grande C, Tennyson CA, Lewis SK, Green PH, Bhagat G (2012). Variability in small bowel histopathology reporting between different pathology practice settings: impact on the diagnosis of coeliac disease. *J Clin Pathol*. 2012;65:242-7.

B.Kovács J, Kovács L, Lőrincz M, Lapis K (1982). Kis dóziséú glutenterhelés eredményei a gyermekkori coeliakia megállapításában. *Orv. Hetil* 1982;123:2589-2594.

Babron MC, Nilsson S, Adamovic S, Naluai AT, Wahlstrom J, Ascher H, Ciclitira PJ, Sollid LM, Partanen J, Greco L, Clerget-Darpoux F; European Genetics Cluster on Coeliac Disease (2003). Meta and pooled analysis of European coeliac disease data. *Eur J Hum Genet*. 2003;11:828-834.

Barone MV, Caputo I, Ribecco MT, Maglio M, Marzari R, Sblattero D, Troncone R, Auricchio S, Esposito C (2007). Humoral immune response to tissue transglutaminase is related to epithelial cell proliferation in celiac disease. *Gastroenterology*. 2007;132:1245-53.

Baldas V, Tommasini A, Trevisiol C, Berti I, Fasano A, Sblattero D, Bradbury A, Marzari R, Barillari G, Ventura A, Not T (2000). Development of a novel rapid non-invasive screening test for coeliac disease. *Gut*. 2000;47:628-631.

Barbeau WE, Novascone MA, Elgert KD (1997). Is celiac disease due to molecular mimicry between gliadin peptide-HLA class II molecule-T cell interactions and those of some unidentified superantigen? *Mol Immunol* 1997;34:535-41.

Belkin AM (2011). Extracellular TG2: emerging functions and regulation. *FEBS J*. 2011;278:4704-16.

- Bergamini CM**, Dean M, Matteucci G, Hanau S, Tanfani F, Ferrari C, Boggian M, Scatturin A (1999). Conformational stability of human erythrocyte transglutaminase. Patterns of thermal unfolding at acid and alkaline pH. *Eur J Biochem* 1999;266:575-582.
- Berti I**, Della Vedova R, Paduano R, Devetta M, Caradonna M, Villanacci V, Not T, Martellosi S, Tamburlini G, Ventura A (2006). Coeliac disease in primary care: evaluation of a case-finding strategy. *Dig Liver Dis* 2006 ;38:461–467.
- Bethune MT**, Borda JT, Ribka E, Liu MX, Phillippi-Falkenstein K, Jandacek RJ, Doxiadis GG, Gray GM, Khosla C, Sestak K (2008). A non-human primate model for gluten sensitivity. *PLoS One*. 2008;3:e1614.
- Bingley PJ**, Williams AJ, Norcross AJ, Unsworth DJ, Lock RJ, Ness AR, Jones RW (2004) Undiagnosed coeliac disease at age seven: population based prospective birth cohort study. *BMJ* 2004;328(7435):322-323.
- Bodd M**, Kim CY, Lundin KE, Sollid LM (2012). T-cell response to gluten in patients with HLA-DQ2.2 reveals requirement of peptide-MHC stability in celiac disease. *Gastroenterology*. 2012;142:552-61.
- Boscolo S**, Lorenzon A, Sblattero D, Florian F, Stebel M, Marzari R, Not T, Aeschlimann D, Ventura A, Hadjivassiliou M, Tongiorgi E (2010). Anti transglutaminase antibodies cause ataxia in mice. *PLoS One*. 2010 15;5:e9698
- Bürgin-Wolff A**, Dahlbom I, Hadziselimovic F, Petersson CJ (2002). Antibodies against human tissue transglutaminase and endomysium in diagnosing and monitoring coeliac disease. *Scand J Gastroenterol*. 2002;37:685-691.
- Byrne G**, Ryan F, Jackson J, Feighery C, Kelly J (2007). Mutagenesis of the catalytic triad of tissue transglutaminase abrogates coeliac disease serum IgA autoantibody binding. *Gut*. 2007;56:336-41.
- 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 (2010). Inhibition of transglutaminase 2 enzymatic activity ameliorates the anti-angiogenic effects of coeliac disease autoantibodies. *Scand J Gastroenterol*. 2010;45:421-7.
- Camarca A**, Del Mastro A, Gianfrani C. Repertoire of gluten peptides active in celiac disease patients: Perspectives for translational therapeutic applications (2012). *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2012 Mar 5. [Epub ahead of print]
- Cammarota G**, Cesaro P, Martino A, Zuccala G, Cianci R, Nista E, Larocca LM, Vecchio FM, Gasbarrini A, Gasbarrini G (2006). High accuracy and cost-effectiveness of a biopsy-avoiding endoscopic approach in diagnosing coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2006;23:61-69.
- Candon S**, Mauvais FX, Garnier-Lengliné H, Chatenoud L, Schmitz J (2012). Monitoring of anti-transglutaminase autoantibodies in pediatric celiac disease using a sensitive radiobinding assay. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2012;54(3):392-6.
- Carlsson A**, Agardh D, Borulf S, Grodzinsky E, Axelsson I, Ivarsson SA (2006). Prevalence of celiac disease: before and after a national change in feeding recommendations. *Scand J Gastroenterol*. 2006;41:553-558.
- Cervio E**, Volta U, Verri M, Boschi F, Pastoris O, Granito A, Barbara G, Parisi C, Felicani C, Tonini M, De Giorgio R (2007). Sera of patients with celiac disease and neurologic disorders evoke a mitochondrial-dependent apoptosis in vitro. *Gastroenterology*. 2007;133:195-206.
- Chorzelski TP**, Sulej J, Tchorzewska H, Jablonska S, Beutner EH, Kumar V (1983). IgA class endomysium antibodies in dermatitis herpetiformis and coeliac disease. *Ann N Y Acad Sci*. 1983;420:325-34.
- Clemente MG**, Musu MP, Frau F, Brusco G, Sole G, Corazza GR, De Virgiliis S (2000). Immune reaction against the cytoskeleton in coeliac disease. *Gut*. 2000;47:520-526.

Comerford R, Byrne G, Feighery C, Kelly J (2012). The binding of autoantibodies to the core region of tissue transglutaminase is a feature of paediatric coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2012 Feb 29. [Epub ahead of print]

Collin P, Kaukinen K, ValiMäki M, Salmi J (2002). Endocrinological disorders and celiac disease. *Endocr Rev.* 2002;23:464-483. Review.

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 (2005). Antiendomysial and antihuman recombinant tissue transglutaminase antibodies in the diagnosis of coeliac disease: a biopsy-proven European multicentre study. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2005;17:85-91

Collin P, Huhtala H, Virta L, Kekkonen L, Reunala T (2007). Diagnosis of celiac disease in clinical practice: physician's alertness to the condition essential. *J Clin Gastroenterol.* 2007;41:152-6.

Corazza GR, Villanacci V (2005). Coeliac disease. *J Clin Pathol* 2005 Jun;58(6):573-4.

Crovella S, Brandao L, Guimaraes R, Filho JL, Arraes LC, Ventura A, Not T (2007). Speeding up coeliac disease diagnosis in the developing countries. *Dig Liver Dis.* 2007;39:900-2.

D'Arienzo R, Stefanile R, Maurano F, Luongo D, Bergamo P, Mazzarella G, Troncone R, Auricchio S, David C, Rossi M (2009). A deregulated immune response to gliadin causes a decreased villus height in DQ8 transgenic mice. *Eur J Immunol.* 2009;39:3552-61.

D'Arienzo R, Maurano F, Lavermicocca P, Ricca E, Rossi M (2009). Modulation of the immune response by probiotic strains in a mouse model of gluten sensitivity. *Cytokine.* 2009 ;48:254-9.

de Kauwe AL, Chen Z, Anderson RP, Keech CL, Price JD, Wijburg O, Jackson DC, Ladhams J, Allison J, McCluskey J (2009). Resistance to celiac disease in humanized HLA-DR3-DQ2-transgenic mice expressing specific anti-gliadin CD4+ T cells. *J Immunol.* 2009;182:7440-50.

Demirçeken FG, Kansu A, Kuloğlu Z, Girgin N, Güriz H, Ensari A (2008). Human tissue transglutaminase antibody screening by immunochromatographic line immunoassay for early diagnosis of celiac disease in Turkish children. *Turk J Gastroenterol.* 2008;19:14-21.

DePaolo RW, Abadie V, Tang F, Fehlner-Peach H, Hall JA, Wang W, Marietta EV, Kasarda DD, Waldmann TA, Murray JA, Semrad C, Kupfer SS, Belkaid Y, Guandalini S and Jabri B. (2011) Co-adjuvant effects of retinoic acid and IL-15 induce inflammatory immunity to dietary antigens. *Nature* 2011;471:220-4.

Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U, Riecken EO, Schuppan D (1997). Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med.* 1997;3:797-801.

Dieterich W, Trapp D, Esslinger B, Leidenberger M, Piper J, Hahn E, Schuppan D (2003). Autoantibodies of patients with coeliac disease are insufficient to block tissue transglutaminase activity. *Gut.* 2003;52:1562-6.

Di Mario U, Anastasi E, Mariani P, Ballati G, Perfetti R, Triglione P, Morellini M, Bonamico M (1992). Diabetes-related autoantibodies do appear in children with coeliac disease. *Acta Paediatr.* 1992;81:593-7.

Di Niro R, Ferrara F, Not T, Bradbury AR, Chirido F, Marzari R, Sblattero D (2005). Characterizing monoclonal antibody epitopes by filtered gene fragment phage display. *Biochem J.* 2005;388:889-94.

Di Niro R, Sblattero D, Florian F, Stebel M, Zentilin L, Giacca M, Villanacci V, Galletti A, Not T, Ventura A, Marzari R (2008). Anti-idiotypic response in mice expressing human autoantibodies. *Mol Immunol.* 2008; 45:1782-91.

Di Niro R, Mesin L, Zheng NY, Stamnaes J, Morrissey M, Lee JH, Huang M, Iversen R, du Pré MF, Qiao SW, Lundin KE, Wilson PC, Sollid LM (2012). High abundance of plasma cells secreting transglutaminase 2-specific IgA autoantibodies with limited somatic hypermutation in celiac disease intestinal lesions. *Nat Med.* 2012;18:441-5.

Di Sabatino A, Vanoli A, Giuffrida P, Luinetti O, Solcia E, Corazza GR (2012). The function of tissue transglutaminase in celiac disease. *Autoimmun Rev.* 2012 Feb 3. [Epub ahead of print]

Diraimondo TR, Klöck C, Khosla C (2012). Interferon- γ Activates Transglutaminase 2 via a Phosphatidylinositol-3-Kinase-Dependent Pathway: Implications for Celiac Sprue Therapy. *J Pharmacol Exp Ther.* 2012;341:104-14.

El Alaoui S, Gresti C (2006). Development of an immunocapture method for measuring IgA antibodies to tissue transglutaminase in the sera of patients with coeliac disease. *Clin Exp Immunol.* 2006;144:101-9.

Ehren J, Morón B, Martin E, Bethune MT, Gray GM, Khosla C (2009). A food-grade enzyme preparation with modest gluten detoxification properties. *PLoS One.* 2009;4:e6313.

Einarsdottir E, Koskinen LL, Dukes E, Kainu K, Suomela S, Lappalainen M, Zibera F, Korponay-Szabó IR, Kurppa K, Kaukinen K, Adány R, Pocsai 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 (2009). IL23R in the Swedish, Finnish, Hungarian and Italian populations: association with IBD and psoriasis, and linkage to celiac disease. *BMC Med Genet.* 2009 Jan 28;10:8.

Einarsdottir E, Bevoa MR, Zhernakova 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 (2011a). Multiple independent variants in 6q21-22 associated with susceptibility to celiac disease in the Dutch, Finnish and Hungarian populations. *Eur J Hum Genet.* 2011;19:682-6.

Einarsdottir E, Koskinen L, de Kauwe A, Dukes E, Mustalahti K, Balogh M, Korponay-Szabó IR, Kaukinen K, Kurppa K, Adány R, Pocsai Z, Széles G, Mäki M, Kere J, Saavalainen P (2011b). 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.

Esposito C, Paparo F, Caputo I, Rossi M, Maglio M, Sblattero D, Not T, Porta R, Auricchio S, Marzari R, Troncone R (2002). Anti-tissue transglutaminase antibodies from coeliac patients inhibit transglutaminase activity both in vitro and in situ. *Gut.* 2002;51:177-81.

Fabbro E, Rubert L, Quaglia S, Ferrara F, Kiren V, Ventura A, Not T (2008). Uselessness of anti-actin antibody in celiac disease screening. *Clin Chim Acta.* 2008;390:134-7.

Fallang LE, Bergseng E, Hotta K, Berg-Larsen A, Kim CY, Sollid LM (2009). Differences in the risk of celiac disease associated with HLA-DQ2.5 or HLA-DQ2.2 are related to sustained gluten antigen presentation. *Nat Immunol.* 2009;10:1096-101.

Fasano A, Not T, Wang W, Uzzau S, Berti I, Tommasini A, Goldblum SE (2000). Zonulin, a newly discovered modulator of intestinal permeability, and its expression in coeliac disease. *Lancet.* 2000;355:1518-9.

Fasano A, Berti I, Gerarduzzi T, Not T, Colletti RB, Drago S, Elitsur Y, Green PH, Guandalini S, Hill ID, Pietzak M, Ventura A, Thorpe M, Kryszak D, Fornaroli F, Wasserman SS, Murray JA, Horvath K (2003). Prevalence of celiac disease in at-risk and not-at-risk groups in the United States: a large multicenter study. *Arch Intern Med.* 2003;163:286-92.

Ferrara F, Dal Bo S, Quaglia S (2007). Protective role of anti-idiotypic network in celiac disease-prone subjects. 40th Annual Meeting of ESPGHAN 2007, abstract

Ferrara F, Quaglia S, Caputo I, Esposito C, Lepretti M, Pastore S, Giorgi R, Martellosi S, Dal Molin G, Di Toro N, Ventura A, Not T (2010). Anti-transglutaminase antibodies in non-coeliac children suffering from infectious diseases. *Clin Exp Immunol.* 2010;159:217-23.

- Ferre-Lopez S**, Ribes-Koninckx C, Genzor C, Gamen S, Peña L, Ortigosa L, Méndez E (2004). Immunochromatographic sticks for tissue transglutaminase and antigliadin antibody screening in celiac disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2004;2:480-4.
- Festen EA**, Szperl AM, Weersma RK, Wijmenga C, Wapenaar MC (2009). Inflammatory bowel disease and celiac disease: overlaps in the pathology and genetics, and their potential drug targets. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2009;9:199-218.
- Fésüs L**, Piacentini M (2002). Transglutaminase 2: an enigmatic enzyme with diverse functions. *Trends Biochem Sci*. 2002 Oct;27(10):534-9.
- Finizio M**, Quaremba G, Mazzacca G, Ciacci C (2005). Large forehead: a novel sign of undiagnosed coeliac disease. *Dig Liver Dis*. 2005;37:659-664
- Fontain JL**, Navarro J (1975). Small intestinal biopsy in cow's milk protein allergy in infancy. *Arch Dis Child* 1975;50:357-362.
- Freeman HJ** (2012). Reproductive changes associated with celiac disease. *World J Gastroenterol*; 16(46):5810-4.
- Freitag TL**, Rietdijk S, Junker Y, Popov Y, Bhan AK, Kelly CP, Terhorst C and Schuppan D. (2009) Gliadin-primed CD4+CD45RB^{low}CD25⁻ T cells drive gluten-dependent small intestinal damage after adoptive transfer into lymphopenic mice. *Gut* 2009;58:1597-605
- Galli-Tsinopoulou A**, Nousia-Arvanitakis S, Dracoulacos D, Xefteri M, Karamouzis M (1999). Autoantibodies predicting diabetes mellitus type I in celiac disease. *Horm Res*. 1999;52:119-24.
- Greco L**, Veneziano A, Di Donato L, Zampella C, Pecoraro M, Paladini D, Paparo F, Vollaro A, Martinelli P (2004). Undiagnosed coeliac disease does not appear to be associated with unfavourable outcome of pregnancy. *Gut*. 2004;53:149-51.
- Green PH**, Jabri B (2003). Coeliac disease. *Lancet*. 2003;362(9381):383-91.
- Green PH**, Rostami K, Marsh MN (2005). Diagnosis of coeliac disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2005;19:389-400.
- Green PH**, Cellier C (2007). Celiac disease. *N Engl J Med*. 2007;357:1731-43.
- Hadithi M**, de Boer H, Meijer JW, Willekens F, Kerckhaert JA, Heijmans R, Peña AS, Stehouwer CD, Mulder CJ (2007). Coeliac disease in Dutch patients with Hashimoto's thyroiditis and vice versa.
- Hadjivassiliou M**, Grünewald RA, Chattopadhyay AK, Davies-Jones GA, Gibson A, Jarratt JA, Kandler RH, Lobo A, Powell T, Smith CM (1998). Clinical, radiological, neurophysiological, and neuropathological characteristics of gluten ataxia. *Lancet*. 1998 Nov 14;352(9140):1582-5.
- Hadjivassiliou M**, Boscolo S, Davies-Jones GA, Grünewald RA, Not T, Sanders DS, Simpson JE, Tongiorgi E, Williamson CA, Woodroffe NM (2002). The humoral response in the pathogenesis of gluten ataxia. *Neurology*. 2002;58:1221-6.
- Hadjivassiliou M**, Mäki M, Sanders DS, Williamson CA, Grunewald RA, Woodroffe NM, Korponay-Szabó IR (2006). Autoantibody targeting of brain and intestinal transglutaminase in gluten ataxia. *Neurology*. 2006;66:373-7.
- Hadjivassiliou M**, Aeschlimann P, Strigun A, Sanders DS, Woodroffe N, Aeschlimann D (2008). Autoantibodies in gluten ataxia recognize a novel neuronal transglutaminase. *Ann Neurol*. 2008;64:332-43.
- Hall EJ**, Batt RM (1992). Dietary modulation of gluten sensitivity in a naturally occurring enteropathy of Irish setter dogs. *Gut*. 1992 Feb;33(2):198-205.
- Hällström O** (1989). Comparison of IgA-class reticulin and endomysium antibodies in coeliac disease and dermatitis herpetiformis. *Gut* 1989;30:1225-32.

Halttunen T, Mäki M (1999) Serum immunoglobulin A from patients with celiac disease inhibits human T84 intestinal crypt epithelial cell differentiation. *Gastroenterology* 1999;116:566-572.

Hansson T, Dahlbom I, Hall J, Holtz A, Elfman L, Dannaeus A, Klareskog L (2000). Antibody reactivity against human and guinea pig tissue transglutaminase in children with celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2000;30:379-84.

Haroon ZA, Hettasch JM, Lai TS, Dewhirst MW, Greenberg CS (1999). Tissue transglutaminase is expressed, active, and directly involved in rat dermal wound healing and angiogenesis. *FASEB J* 1999;13:1787-95.

Hill ID, Bhatnagar S, Cameron DJ, De Rosa S, Mäki M, Russell GJ, Troncone R (2002). Celiac disease: Working Group Report of the First World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2002;35 Suppl 2:S78-88.

Hill ID, Dirks MH, Liptak GS, Colletti RB, Fasano A, Guandalini S, Hoffenberg EJ, Horvath K, Murray JA, Pivor M, Seidman EG (2005). North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Guideline for the diagnosis and treatment of celiac disease in children: recommendations of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2005;40:1-19.

Hill PG, Holmes GK. Coeliac disease: a biopsy is not always necessary for diagnosis (2008). *Aliment Pharmacol Ther.* 2008;27:572-7.

Hin H, Bird G, Fisher P, Mahy N, Jewell D (1999). Coeliac disease in primary care: case finding study. *BMJ* 1999;318:164-167.

Hogen Esch CE, Csizmadia GD, van Hoogstraten IM, Schreurs MW, Mearin ML, von Blomberg BM (2010). Childhood coeliac disease: towards an improved serological mass screening strategy. *Aliment Pharmacol Ther.* 2010;31:760-6.

Hopper AD, Cross SS, Hurlstone DP, McAlindon ME, Lobo AJ, Hadjivassiliou M, Sloan ME, Dixon S, Sanders DS (2007). Pre-endoscopy serological testing for coeliac disease: evaluation of a clinical decision tool. *BMJ.* 2007;334:729.

Hovhannisyan Z, Weiss A, Martin A, Wiesner M, Tollefsen S, Yoshida K, Ciszewski C, Curran SA, Murray JA, David CS, Sollid LM, Koning F, Teyton L, Jabri B (2008). The role of HLA-DQ8 beta57 polymorphism in the anti-gluten T-cell response in coeliac disease. *Nature.* 2008;456(7221):534-8.

Hunt KA, Zhernakova A, Turner G, Heap GA, Franke L, Bruinenberg M, Romanos J, Dinesen LC, Ryan AW, Panesar D, Gwilliam R, Takeuchi F, McLaren WM, Holmes GK, Howdle PD, Walters JR, Sanders DS, Playford RJ, Trynka G, Mulder CJ, Mearin ML, Verbeek WH, Trimble V, Stevens FM, O'Morain C, Kennedy NP, Kelleher D, Pennington DJ, Strachan DP, McArdle WL, Mein CA, Wapenaar MC, Deloukas P, McGinnis R, McManus R, Wijmenga C, van Heel DA (2008) . Newly identified genetic risk variants for celiac disease related to the immune response. *Nat Genet.* 2008;40:395-402.

Hüe S, Mention JJ, Monteiro RC, Zhang S, Cellier C, Schmitz J, Verkarre V, Fodil N, Bahram S, Cerf-Bensussan N, Caillat-Zucman S (2004). A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease. *Immunity.* 2004;21:367-77.

Iltanen S, Holm K, Ashorn M, Ruuska T, Laippala P, Mäki M (1999a). Changing jejunal gamma delta T cell receptor (TCR)-bearing intraepithelial lymphocyte density in coeliac disease. *Clin Exp Immunol.* 1999;117:51-5.

Iltanen S, Rantala I, Laippala P, Holm K, Partanen J, Maki M (1999b). Expression of HSP-65 in jejunal epithelial cells in patients clinically suspected of coeliac disease. *Autoimmunity.* 1999;31:125-32.

Izzo V, Pinelli M, Tinto N, Esposito MV, Cola A, Sperandeo MP, Tucci F, Coccozza S, Greco L, Sacchetti L (2011). Improving the estimation of celiac disease sibling risk by non-HLA genes. *PLoS One.* 2011;6:e26920.

Jabri B, Kasarda DD, Green PH (2005). Innate and adaptive immunity: the yin and yang of celiac disease. *Immunol Rev.* 2005;206:219-31.

Janatuinen EK, Kempainen TA, Julkunen RJ, Kosma VM, Mäki M, Heikkinen M, Uusitupa MI (2002). No harm from five year ingestion of oats in coeliac disease. *Gut.* 2002;50:332-5.

Jin X, Stamnaes J, Klöck C, DiRaimondo TR, Sollid LM, Khosla C (2011). Activation of extracellular transglutaminase 2 by thioredoxin. *J Biol Chem.* 2011;286:37866-73.

Jüse U, Arntzen M, Højrup P, Fleckenstein B, Sollid LM (2011). Assessing high affinity binding to HLA-DQ2.5 by a novel peptide library based approach. *Bioorg Med Chem.* 2011;19:2470-7.

Kagnoff MF, Austin RK, Hubert JJ, Bernardin JE, Kasarda DD (1984). Possible role for a human adenovirus in the pathogenesis of celiac disease. *J Exp Med.* 1984;160:1544-57.

Kapitány A, Tóth L, Tumpek J, Csipő I, Sipos E, Woolley N, Partanen J, Szegedi G, Oláh É, Sipka S, Korponay-Szabó IR (2006). Diagnostic significance of HLA-DQ typing in patients with previous coeliac disease diagnosis based on histology alone. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006;24:1395-402.

Karell K, Korponay-Szabó I, Szalai Z, Holopainen P, Mustalahti K, Collin P, Mäki M, Partanen J (2002). Genetic dissection between coeliac disease and dermatitis herpetiformis in sib pairs. *Ann Hum Genet.* 2002;66:387-92.

Kárpáti S, Kósnai I, Török E, Kovács JB (1988). Immunoglobulin A deposition in jejunal mucosa of children with dermatitis herpetiformis. *J Invest Dermatol.* 1988;91:336-9.

Kárpáti S, Bürgin-Wolff A, Krieg T, Meurer M, Stolz W, Braun-Falco O (1990). Binding to human jejunum of serum IgA antibody from children with coeliac disease. *Lancet.* 1990;336:1335-8.

Khashan AS, Henriksen TB, Mortensen PB, McNamee R, McCarthy FP, Pedersen MG, Kenny LC (2010) The impact of maternal celiac disease on birthweight and preterm birth: a Danish population-based cohort study. *Hum Reprod* 2010;25:528-534.

Kaukinen K, Turjanmaa K, Mäki M, Partanen J, Venalainen R, Reunala T, Collin P (2000). Intolerance to cereals is not specific for coeliac disease. *Scand J Gastroenterol.* 2000;35:942-6.

Kaukinen K, Mäki M, Partanen J, Sievanen H, Collin P (2001). Celiac disease without villous atrophy: revision of criteria called for. *Dig Dis Sci.* 2001;46:879-87.

Kaukinen K, Partanen J, Mäki M, Collin P (2002). HLA-DQ typing in the diagnosis of celiac disease. *Am J Gastroenterol.* 2002;97:695-9.

Kaukinen K, Peraaho M, Collin P, Partanen J, Woolley N, Kaartinen T, Nuutinen T, Halttunen T, Mäki M, Korponay-Szabó I (2005). Small-bowel mucosal transglutaminase 2-specific IgA deposits in coeliac disease without villous atrophy: a prospective and randomized clinical study. *Scand J Gastroenterol.* 2005;40:564-572.

Kaukinen K, Collin P, Laurila K, Kaartinen T, Partanen J, Mäki M (2007). Resurrection of gliadin antibodies in coeliac disease. Deamidated gliadin peptide antibody test provides additional diagnostic benefit. *Scand J Gastroenterol.* 2007;42:1428-33.

Korponay-Szabó IR, Kovács JB, Lőrincz M, Gorács G, Szabados K, Balogh M (1997a). Prospective significance of antiendomysium antibody positivity in subsequently verified celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1997;25:56-63.

Korponay-Szabó IR, B.Kovács J, Lőrincz M, Török E, Gorács G, Csitary F (1997b). The human appendix: a composite substrate for anti-endomysium, anti-reticulin and anti-bowel antibody testing in coeliac disease. *Med Sci Monit* 1997;3:285-289.

Korponay-Szabó IR, Kovács J, Lőrincz M, Török É, Gorács G (1998). Families with multiple cases of gluten-sensitive enteropathy. *Z Gastroenterol.* 1998;36:553-8.

Korponay-Szabó IR, Sulkanen S, Halttunen T, Maurano F, Rossi M, Mazzarella G, Laurila K, Troncone R, Mäki M (2000). Tissue transglutaminase is the target in both rodent and primate tissues for celiac disease-specific autoantibodies. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2000;31:520-7.

Korponay-Szabó IR, Laurila K, Szondy Z, Halttunen T, Szalai Z, Dahlbom I, Rantala I, Kovács JB, Fésüs L, Mäki M (2003a). Missing endomysial and reticulin binding of coeliac antibodies in transglutaminase 2 knockout tissues. *Gut.* 2003;52:199-204.

Korponay-Szabó IR, Dahlbom I, Laurila K, Koskinen S, Woolley N, Partanen J, Kovács JB, Mäki M, Hansson T (2003b). Elevation of IgG antibodies against tissue transglutaminase as a diagnostic tool for coeliac disease in selective IgA deficiency. *Gut* 2003;52:1567-71.

Korponay-Szabó IR, Halttunen T, Szalai Z, Laurila K, Király R, Kovács JB, Fésüs L, Mäki M (2004). In vivo targeting of intestinal and extraintestinal transglutaminase 2 by coeliac autoantibodies. *Gut.* 2004;53:641-8.

Koskinen L, Korponay-Szabó 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 (2008). Myosin IXB gene region and gluten intolerance: linkage to coeliac disease and a putative dermatitis herpetiformis association. *J Med Genet.* 2008;45:222-7.

Koskinen L, Einarsdottir E, Dukes E, Heap GA, Dubois P, Korponay-Szabó IR, Kaukinen K, Kurppa K, Ziberna 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 (2009a). Association study of the IL18RAP locus in three European populations with coeliac disease. *Hum Mol Genet.* 2009;18:1148-55.

Koskinen L, Romanos J, Kaukinen K, Mustalahti K, Korponay-Szabó I, Barisani D, Bardella MT, Ziberna 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 (2009b). Cost-effective HLA typing with tagging SNPs predicts celiac disease risk haplotypes in the Finnish, Hungarian, and Italian populations. *Immunogenetics.* 2009;61:247-56.

Koskinen L, 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 (2009c). *Tissue Antigens.* 2009;74:408-16.

Koskinen O, Collin P, Korponay-Szabó I, Salmi T, Iltanen S, Haimila K, Partanen J, Mäki M, Kaukinen K (2008a). Gluten-dependent small bowel mucosal transglutaminase 2-specific IgA deposits in overt and mild enteropathy coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2008;47:436-42.

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 (2008b). *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2009;48:559-65.

Kotze LM, Brambila Rodrigues AP, Kotze LR, Nishihara RM (2009). A Brazilian experience of the self transglutaminase-based test for celiac disease case finding and diet monitoring. *World J Gastroenterol.* 2009;15:4423-8.

Kuitunen P, Kósnai I, Savilahti E (1982). Morphometric study of the jejunal mucosa in various childhood enteropathies with special reference to intraepithelial lymphocytes. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1982;1:525-531.

Kumar R, Lumsden A, Ciclitira PJ, Ellis HJ, Laurie GW (2000). Human genome search in celiac disease using gliadin cDNA as probe. *J Mol Biol.* 2000;300:1155-67.

Kurppa K, Salminen J, Ukkola A, Saavalainen P, Löytynoja K, Laurila K, Collin P, Mäki M, Kaukinen K. (2012) Utility of the new ESPGHAN criteria for the diagnosis of celiac disease in at-risk groups. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2012;54:387-91.

Kurppa K, Collin P, Viljamaa M, Haimila K, Saavalainen P, Partanen J, Laurila K, Huhtala H, Paasikivi K, Mäki M, Kaukinen K (2009). Diagnosing mild enteropathy celiac disease: a randomized, controlled clinical study. *Gastroenterology.* 2009;136:816-23.

- Laadhar L**, Kallel-Sellami M, Zitouni M, Mehrezi A, Makni S, Ben Hariz M (2011). Is the rapid whole blood test useful for diagnosis and monitoring celiac disease in children? *Tunis Med.* 2011;89:16-7.
- Ladinser B**, Rossipal E, Pittschieler K (1994). Endomysium antibodies in coeliac disease: an improved method. *Gut.* 1994;35:776-8.
- Lerner A**, Blank M, Lahat N, Shoenfeld Y (1998). Increased prevalence of autoantibodies in celiac disease. *Dig Dis Sci.* 1998;43:723-726.
- Lewis NR**, Scott BB (2010). Meta-analysis: deamidated gliadin peptide antibody and tissue transglutaminase antibody compared as screening tests for coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2010;31:73-81.
- Lionetti E**, Catassi C (2011). New clues in celiac disease epidemiology, pathogenesis, clinical manifestations, and treatment. *Int Rev Immunol.* 2011;30:219-31.
- Liu S**, Cerione RA, Clardy J (2002) Structural basis for the guanine nucleotide-binding activity of tissue transglutaminase and its regulation of transamidation activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:2743-2747.
- Lock RJ**, Gilmour JE, Unsworth DJ (1999). Anti-tissue transglutaminase, anti-endomysium and anti-R1-reticulin autoantibodies-the antibody trinity of coeliac disease. *Clin Exp Immunol.* 1999;116:258-262.
- Lock RJ**, Stevens S, Pitcher MC, Unsworth DJ (2004). Is immunoglobulin A anti-tissue transglutaminase antibody a reliable serological marker of coeliac disease? *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2004;16:467-470.
- Lohi S**, Mustalahti K, Kaukinen K, Laurila K, Collin P, Rissanen H, Lohi O, Bravi E, Gasparin M, Reunanen A, Mäki M (2007). Increasing prevalence of coeliac disease over time. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007;26:1217-25.
- Ludvigsson JF**, Leffler DA, Bai JC, Biagi F, Fasano A, Green PH, Hadjivassiliou M, Kaukinen K, Kelly CP, Leonard JN, Lundin KE, Murray JA, Sanders DS, Walker MM, Zingone F, Ciacci C (2012). The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut.* 2012 Feb 16. [Epub ahead of print]
- Londei M**, Ciacci C, Ricciardelli I, Vacca L, Quarantino S, Maiuri L (2005). Gliadin as a stimulator of innate responses in celiac disease. *Mol Immunol.* 2005;42:913-8.
- Maiuri L**, Ciacci C, Ricciardelli I, Vacca L, Raia V, Auricchio S, Picard J, Osman M, Quarantino S, Londei M (2003). Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in coeliac disease. *Lancet.* 2003;362(9377):30-7.
- Mäki M**, Holm K, Lipsanen V, Hällström O, Viander M, Collin P, Savilahti E, Koskimies S (1991). Serological markers and HLA genes among healthy first-degree relatives of patients with coeliac disease. *Lancet.* 1991;338:1350-3.
- Mäki M**, Hällström O, Vesikari T, Visakorpi JK (1984). Evaluation of a serum IgA-class reticulin antibody test for the detection of childhood celiac disease. *J Pediatr.* 1984;105:901-5.
- Mäki M**, Holm K, Collin P, Savilahti E (1991). Increase in gamma/delta T cell receptor bearing lymphocytes in normal small bowel mucosa in latent coeliac disease. *Gut.* 1991 32:1412-4.
- Mäki M** (1995). The humoral immune system in coeliac disease. *Baillières Clin Gastroenterol.* 1995;9:231-49.
- Mäki M**, Mustalahti K, Kokkonen J, Kulmala P, Haapalahti M, Karttunen T, Ilonen J, Laurila K, Dahlbom I, Hansson T, Höpfl P, Knip M (2003) Prevalence of celiac disease among children in Finland. *N Engl J Med* 2003;348:2517–2524.

Marietta E, Black K, Camilleri M, Krause P, Rogers RS 3rd, David C, Pittelkow MR, Murray JA (2004). A new model for dermatitis herpetiformis that uses HLA-DQ8 transgenic NOD mice. *J Clin Invest.* 2004 ;114:1090-7.

Martín-Pagola A, Ortiz L, Pérez de Nanclares G, Vitoria JC, Castaño L, Bilbao JR (2003). Analysis of the expression of MICA in small intestinal mucosa of patients with celiac disease. *J Clin Immunol.* 2003; 23:498-503.

Martinelli P, Troncone R, Paparo F, Torre P, Trapanese E, Fasano C, Lamberti A, Budillon G, Nardone G, Greco L (2000). Coeliac disease and unfavourable outcome of pregnancy. *Gut.* 2000 ;46:332-5.

Martucciello S, Lavric M, Toth B, Korponay-Szabó I, Nadalutti C, Myrsky E, Rauhavirta T, Esposito C, Sulic AM, Sblattero D, Marzari R, Mäki M, Kaukinen K, Lindfors K, Caja S (2012). RhoB is associated with the anti-angiogenic effects of celiac patient transglutaminase 2-targeted autoantibodies. *J Mol Med Epub* 2012 Jan 6.

Matysiak-Budnik T, Candalh C, Cellier C, Dugave C, Namane A, Vidal-Martinez T, Cerf-Bensussan N, Heyman M (2005). Limited efficiency of prolyl-endopeptidase in the detoxification of gliadin peptides in celiac disease. *Gastroenterology.* 2005;129:786-96.

Matysiak-Budnik T, Moura IC, Arcos-Fajardo M, Lebreton C, Ménard S, Candalh C, Ben-Khalifa K, Dugave C, Tamouza H, van Niel G, Bouhnik Y, Lamarque D, Chaussade S, Malamut G, Cellier C, Cerf-Bensussan N, Monteiro RC, Heyman M (2008). Secretory IgA mediates retrotranscytosis of intact gliadin peptides via the transferrin receptor in celiac disease. *J Exp Med.* 2008;205:143-54.

Marzari R, Sblattero D, Florian F, Tongiorgi E, Not T, Tommasini A, Ventura A, Bradbury A (2001). Molecular dissection of the tissue transglutaminase autoantibody response in celiac disease. *J Immunol.* 2001;166:4170-6.

Mawhinney H, Love AH (1975). Anti-reticulin antibody in jejunal juice in coeliac disease. *Clin Exp Immunol* 1975; 21:394–8.

McCrae WM, Eastwood MA, Martin MR, Sircus W (1975). Neglected coeliac disease. *Lancet.* 1975 1(7900):187-90.

Meeuwisse GW (1970). Diagnostic criteria in coeliac disease. *Acta Paediatr Scand.* 1970;59:461-3

Meresse B, Chen Z, Ciszewski C, Tretiakova M, Bhagat G, Krausz TN, Raulet DH, Lanier LL, Groh V, Spies T, Ebert EC, Green PH, Jabri B (2004). Coordinated induction by IL15 of a TCR-independent NKG2D signaling pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease. *Immunity.* 2004;21:357-66.

Monsuur AJ, de Bakker PI, Alizadeh BZ, Zhernakova A, Bevova MR, Strengman E, Franke L, van't Slot R, van Belzen MJ, Lavrijsen IC, Diosdado B, Daly MJ, Mulder CJ, Mearin ML, Meijer JW, Meijer GA, van Oort E, Wapenaar MC, Koeleman BP, Wijmenga C (2005). Myosin IXB variant increases the risk of celiac disease and points toward a primary intestinal barrier defect. *Nat Genet.* 2005;37:1341-4.

Morin P, Flors C, Olson MF (2009). Constitutively active RhoA inhibits proliferation by retarding G(1) to S phase cell cycle progression and impairing cytokinesis. *Eur J Cell Biol.* 2009 Sep;88(9):495-507.

Mustalahti K, Catassi C, Reunanen A, Fabiani E, Heier M, McMillan S, Murray L, Metzger MH, Gasparin M, Bravi E, Mäki M; Coeliac EU Cluster, Project Epidemiology (2010). The prevalence of celiac disease in Europe: results of a centralized, international mass screening project. *Ann Med.* 2010;42:587-95.

Myrsky E, Kaukinen K, Syrjänen M, Korponay-Szabó IR, Mäki M, Lindfors K (2008). Coeliac disease-specific autoantibodies targeted against transglutaminase 2 disturb angiogenesis. *Clin Exp Immunol.* 2008;152:111-119.

Myrsky E, Syrjänen M, Korponay-Szabó IR, Mäki M, Kaukinen K, Lindfors K (2009a). Altered small-bowel mucosal vascular network in untreated coeliac disease. *Scand J Gastroenterol.* 2009;44:162-167.

Myrsky E, Caja S, Simon-Vecsei Z, Korponay-Szabó IR, Nadalutti C, Collighan R, Mongeot A, Griffin M, Mäki M, Kaukinen K, Lindfors K (2009b). Celiac disease IgA modulates vascular permeability in vitro through the activity of transglutaminase 2 and RhoA. *Cell Mol Life Sci.* 2009;66:3375-3385.

Nadalutti C, Viiri KM, Kaukinen K, Mäki M, Lindfors K (2011). Extracellular transglutaminase 2 has a role in cell adhesion, whereas intracellular transglutaminase 2 is involved in regulation of endothelial cell proliferation and apoptosis. *Cell Prolif.* 2011;44:49-58.

Nakachi K, Powell M, Swift G, Amoroso MA, Ananieva-Jordanova R, Arnold C, Sanders J, Furmaniak J, Rees Smith B (2004). Epitopes recognised by tissue transglutaminase antibodies in coeliac disease. *J Autoimmun.* 2004;22:53-63.

Neild GH (1981). Coeliac disease: a graft-versus-host-like reaction localised to the small bowel wall? *Lancet.* 1981;1(8224):811-2.

Nemec G, Ventura A, Stefano M, Di Leo G, Baldas V, Tommasini A, Ferrara F, Taddio A, Città A, Sblattero D, Marzari R, Not T (2006) Looking for celiac disease: diagnostic accuracy of two rapid commercial assays. *Am J Gastroenterol* 2006;101:1597–1600.

NIH Consensus Development Conference on Celiac Disease 2004.

<http://consensus.nih.gov/2004/2004CeliacDisease118html.htm>

Nilsen EM, Jahnsen FL, Lundin KE, Johansen FE, Fausa O, Sollid LM, Jahnsen J, Scott H, Brandtzaeg P (1998). Gluten induces an intestinal cytokine response strongly dominated by interferon gamma in patients with celiac disease. *Gastroenterology.* 1998;115:551-63.

Nisticò L, Fagnani C, Coto I, Percopo S, Cotichini R, Limongelli MG, Paparo F, D'Alfonso S, Giordano M, Sferlazzas C, Magazzù G, Momigliano-Richiardi P, Greco L, Stazi MA (2006). Concordance, disease progression, and heritability of coeliac disease in Italian twins. *Gut.* 2006;55:803-8.

O'Connell JR, Weeks DE (1998) PedCheck: a program for identification of genotype incompatibilities in linkage analysis. *Am J Hum Genet* 1998;63:259–266.

Palatka K, Serfőző Z, Veréb Z, Bátori R, Lontay B, Hargitay Z, Nemes Z, Udvardy M, Erdődi F, Altorjay I (2006) Effect of IBD sera on expression of inducible and endothelial nitric oxide synthase in human umbilical vein endothelial cells. *World J Gastroenterol.* 2006;12:1730-1738

Pallav K, Leffler DA, Tariq S, Kabbani T, Hansen J, Peer A, Bhansali A, Najarian R, Kelly CP (2012). Noncoeliac enteropathy: the differential diagnosis of villous atrophy in contemporary clinical practice. *Aliment Pharmacol Ther.* 2012;35:380-90.

Pellegrino S, Villanacci V, Sansotta N, Scarfi R, Bassotti G, Vieni G, Princiotta A, Sferlazzas C, Magazzù G, Tuccari G (2011). Redefining the intraepithelial lymphocytes threshold to diagnose gluten sensitivity in patients with architecturally normal duodenal histology. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011;33:697-706.

Peracchi M, Trovato C, Longhi M, Gasparin M, Conte D, Tarantino C, Prati D, Bardella MT (2002). Tissue transglutaminase antibodies in patients with end-stage heart failure. *Am J Gastroenterol.* 2002;97:2850-4.

Picarelli A, Maiuri L, Frate A, Greco M, Auricchio S, Londei M (1996). Production of antiendomysial antibodies after in-vitro gliadin challenge of small intestine biopsy samples from patients with coeliac disease. *Lancet.* 1996;348(9034):1065-7.

Philippova M, Ivanov D, Allenspach R, Takuwa Y, Erne P, Resink T (2005). RhoA and Rac mediate endothelial cell polarization and detachment induced by T-cadherin. *FASEB J.* 2005;19:588-90.

Pinkas DM, Strop P, Brunger AT, Khosla C (2007). Transglutaminase 2 undergoes a large conformational change upon activation. *PLoS Biol.* 2007;5:e327.

Prince HE (2006). Evaluation of the INOVA diagnostics enzyme-linked immunosorbent assay kits for measuring serum immunoglobulin G (IgG) and IgA to deamidated gliadin peptides. *Clin Vaccine Immunol.* 2006;13:150-151.

Radojevic N, McKay DM, Merger M, Vallance BA, Collins SM, Croitoru K (1999). Characterization of enteric functional changes evoked by in vivo anti-CD3 T cell activation. *Am J Physiol.* 1999;276:R715-23.

Raivio T, Kaukinen K, Nemes E, Laurila K, Collin P, Kovács JB, Mäki M, Korponay-Szabó IR (2006). Self transglutaminase-based rapid coeliac disease antibody detection by a lateral flow method. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006;24:147-54.

Raivio T, Korponay-Szabó I, Collin P, Laurila K, Huhtala H, Kaartinen T, Partanen J, Mäki M, Kaukinen K (2007). Performance of a new rapid whole blood coeliac test in adult patients with low prevalence of endomysial antibodies. *Dig Liver Dis.* 2007;39:1057-63.

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 (2008). Comparison of a novel whole blood transglutaminase-based ELISA with a whole blood rapid antibody test and established conventional serological celiac disease assays. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2008;47:562-7.

Ráki M, Schjetne KW, Stamnaes J, Molberg Ø, Jahnsen FL, Issekutz TB, Bogen B, Sollid LM (2007). Surface expression of transglutaminase 2 by dendritic cells and its potential role for uptake and presentation of gluten peptides to T cells. *Scand J Immunol.* 2007;65:213-20.

Rashtak S, Murray JA (2012). Review article: coeliac disease, new approaches to therapy. *Aliment Pharmacol Ther.* 2012;35:768-81.

Ravikumara M, Nootigattu VK, Sandhu BK (2007). Ninety percent of celiac disease is being missed. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2007;45:497-9.

Romanos J, van Diemen CC, Nolte IM, Trynka G, Zhernakova A, Fu J, Bardella MT, Barisani D, McManus R, van Heel DA, Wijmenga C (2009). Analysis of HLA and non-HLA alleles can identify individuals at high risk for celiac disease. *Gastroenterology.* 2009;137:834-40.

Rostom A, Dubé C, Cranney A, Saloojee N, Sy R, Garritty C, Sampson M, Zhang L, Yazdi F, Mamaladze V, Pan I, McNeil J, Moher D, Mack D, Patel D (2004). Celiac Disease. Evidence Report/Technology Assessment No. 104. (Prepared by the University of Ottawa Evidence-based Practice Center, under Contract No. 290-02-0021.) AHRQ Publication No. 04-E029-2. Rockville, MD: Agency for Healthcare Research and Quality. July 2004.

Rostom A, Murray JA, Kagnoff MF (2006). American Gastroenterological Association (AGA) Institute technical review on the diagnosis and management of celiac disease. *Gastroenterology.* 2006;131:1981-2002.

Salmi TT, Collin P, Järvinen O, Haimila K, Partanen J, Laurila K, Korponay-Szabó IR, Huhtala H, Reunala T, Mäki M, Kaukinen K (2006a). Immunoglobulin A autoantibodies against transglutaminase 2 in the small intestinal mucosa predict forthcoming coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006;24:541-52.

Salmi TT, Collin P, Korponay-Szabó IR, Laurila K, Partanen J, Huhtala H, Király R, Lorand L, Reunala T, Mäki M, Kaukinen K. (2006b) Endomysial antibody-negative coeliac disease: clinical characteristics and intestinal autoantibody deposits. *Gut* 2006;55:1746-53.

Sánchez D, Tucková L, Sebo P, Michalak M, Whelan A, Sterzl I, Jelínková L, Havrdová E, Imramovská M, Benes Z, Krupicková S, Tlaskalová-Hogenová H (2000). Occurrence of IgA and IgG autoantibodies to calreticulin in coeliac disease and various autoimmune diseases. *J Autoimmun.* 2000;15:441-449.

Sánchez D, Tucková L, Mothes T, Kreisel W, Benes Z, Tlaskalová-Hogenová H (2003). Epitopes of calreticulin recognised by IgA autoantibodies from patients with hepatic and coeliac disease. *J Autoimmun.* 2003;21:383-92.

Sárdy M, Kárpáti S, Merkl B, Paulsson M, Smyth N (2002). Epidermal transglutaminase (TGase 3) is the autoantigen of dermatitis herpetiformis. *J Exp Med.* 2002;195:747-757.

Sárdy M, Csikos M, Geisen C, Preisz K, Kornseé Z, Tomsits E, Töx U, Hunzelmann N, Wieslander J, Kárpáti S, Paulsson M, Smyth N (2007) Tissue transglutaminase ELISA positivity in autoimmune disease independent of gluten-sensitive disease. *Clin Chim Acta.* 2007;376:126-35.

Sategna-Guidetti C, Grosso S, Bruno M, Grosso SB (1996). Reliability of immunologic markers of celiac sprue in the assessment of mucosal recovery after gluten withdrawal. *J Clin Gastroenterol.* 1996;23:101-4.

Savilahti E, Arato A, Verkasalo M (1990). Intestinal gamma/delta receptor-bearing T lymphocytes in celiac disease and inflammatory bowel diseases in children. Constant increase in celiac disease. *Pediatr Res.* 1990;28:579-81.

Sblattero D, Berti I, Trevisiol C, Marzari R, Tommasini A, Bradbury A, Fasano A, Ventura A, Not T (2000). Human recombinant tissue transglutaminase ELISA: an innovative diagnostic assay for celiac disease. *Am J Gastroenterol.* 2000;95:1253-7.

Sblattero D, Florian F, Azzoni E, Zyla T, Park M, Baldas V, Not T, Ventura A, Bradbury A, Marzari R (2002). The analysis of the fine specificity of celiac disease antibodies using tissue transglutaminase fragments. *Eur J Biochem.* 2002;269:5175-5181.

Schlosser M, Banga JP, Madec AM, Binder KA, Strebelow M, Rjasanowski I, Wassmuth R, Gilliam LK, Luo D, Hampe CS (2005). Dynamic changes of GAD65 autoantibody epitope specificities in individuals at risk of developing type 1 diabetes. *Diabetologia.* 2005;48:922-30.

Schwartz E, Kahlenberg F, Sack U, Richter T, Stern M, Conrad K, Zimmer KP, Mothes T (2004). Serologic assay based on gliadin-related nonapeptides as a highly sensitive and specific diagnostic aid in celiac disease. *Clin Chem.* 2004;50:2370-2375.

Seah PP, Fry L, Hoffbrand AV, Holborow EJ (1971a). Tissue antibodies in dermatitis herpetiformis and adult coeliac disease. *Lancet.* 1971;1(7704):834-6.

Seah PP, Fry L, Rossiter MA, Hoffbrand AV, Holborow EJ (1971b). Anti-reticulin antibodies in childhood coeliac disease. *Lancet.* 1971;2(7726):681-2.

Shan L, Molberg Ø, Parrot I, Hausch F, Filiz F, Gray GM, Sollid LM, Khosla C (2002). Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science.* 2002;297(5590):2275-9.

Seissler J, Wohlrab U, Wuensche C, Scherbaum WA, Boehm BO (2001). Autoantibodies from patients with coeliac disease recognize distinct functional domains of the autoantigen tissue transglutaminase. *Clin Exp Immunol* 2001;125:216-221.

Shamaly H, Hartman C, Pollack S, Hujerat M, Katz R, Gideoni O, Shamir R (2007). Tissue transglutaminase antibodies are a useful serological marker for the diagnosis of celiac disease in patients with Down syndrome. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2007;44:583-586.

Shiner M, Ballard J (1972). Antigen-antibody reactions in jejunal mucosa in childhood coeliac disease after gluten challenge. *Lancet.* 1972;1(7762):1202-1205.

Siegel M, Strnad P, Watts RE, Choi K, Jabri B, Omary MB, Khosla C (2008). Extracellular transglutaminase 2 is catalytically inactive, but is transiently activated upon tissue injury. *PLoS One.* 2008;3:e1861.

Simell S, Hoppu S, Hekkala A, Simell T, Ståhlberg MR, Viander M, Yrjänäinen H, Grönlund J, Markula P, Simell V, Knip M, Ilonen J, Hyöty H, Simell O (2007). Fate of five celiac disease-associated antibodies during normal diet in genetically at-risk children observed from birth in a natural history study. *Am J Gastroenterol.* 2007;102:2026-35.

Simon-Vecsei Z, Király R, Bagossi P, Tóth B, Dahlbom I, Caja S, Csősz É, Lindfors K, Sblattero D, Nemes É, Mäki M, Fésüs L, Korponay-Szabó IR (2012). 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;109:431-6.

Sjöber K, Eriksson S, Tenngart B, Roth EB, Leffler H, Stenberg P (2002) Factor XIII and tissue transglutaminase antibodies in coeliac and inflammatory bowel disease. *Autoimmunity* 2002;35:357-364.

Sjöström H, Lundin KE, Molberg O, Körner R, McAdam SN, Anthonsen D, Quarsten H, Norén O, Roepstorff P, Thorsby E, Sollid LM (1998). Identification of a gliadin T-cell epitope in coeliac disease: general importance of gliadin deamidation for intestinal T-cell recognition. *Scand J Immunol*. 1998;48:111-5.

Sollid LM, Jabri B (2011). Celiac disease and transglutaminase 2: a model for posttranslational modification of antigens and HLA association in the pathogenesis of autoimmune disorders. *Curr Opin Immunol*. 2011;23:732-8.

Sorell L, Garrote JA, Acevedo B, Arranz E (2002). One-step immunochromatographic assay for screening of coeliac disease. *Lancet*. 2002;359(9310):945-946.

Szondy Z, Korponay-Szabó I, Király R, Fésüs L (2011). Transglutaminase 2 dysfunctions in the development of autoimmune disorders: celiac disease and TG2-/- mouse. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*. 2011;78:295-345.

Stamnaes J, Pinkas DM, Fleckenstein B, Khosla C, Sollid LM (2010). Redox regulation of transglutaminase 2 activity. *J Biol Chem*. 2010 ;285:25402-9.

Stenhammar L, Hogberg L, Danielsson L, Ascher H, Dannaeus A, Hernell O, Ivarsson A, Lindberg E, Lindquist B, Nivenius K (2006). How do Swedish paediatric clinics diagnose coeliac disease? Results of a nationwide questionnaire study. *Acta Paediatr*. 2006;95:1495-1497.

Stepniak D, Koning F (2006). Celiac disease--sandwiched between innate and adaptive immunity. *Hum Immunol*. 2006;67:460-8.

Sugai E, Vazquez H, Nachman F, Moreno ML, Mazure R, Smecuol E, Niveloni S, Cabanne A, Kogan Z, Gomez JC, Maurino E, Bai JC (2006). Accuracy of testing for antibodies to synthetic gliadin-related peptides in celiac disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2006;4:1112-1117.

Sulkanen S, Halttunen T, Laurila K, Kolho KL, Korponay-Szabó IR, Sarnesto A, Savilahti E, Collin P, Mäki M (1998). Tissue transglutaminase autoantibody enzyme-linked immunosorbent assay in detecting celiac disease. *Gastroenterology*. 1998;115:1322-1328.

Szabolcs M, Sipka S, Csorba S (1987). In vitro cross-linking of gluten into high-molecular-weight polymers with transglutaminase. *Acta Paediatr Hung*. 1987;28:215-27.

Szebeni B, Veres G, Dezsőfi A, Rusai K, Vannay A, Bokodi G, Vásárhelyi B, Korponay-Szabó IR, Tulassay T, Arató A (2007). Increased mucosal expression of Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2007;45:187-93.

Szebeni B, Veres G, Dezsőfi A, Rusai K, Vannay A, Mraz M, Majorova E, Arató A (2008). Increased expression of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the colonic mucosa of children with inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol*. 2008;151:34-41.

Szebeni B, Vannay A, Sziksz E, Prókai A, Cseh A, Veres G, Dezsőfi A, Győrffy H, Korponay-Szabó IR, Arató A (2010). Increased expression of serum- and glucocorticoid-regulated kinase-1 in the duodenal mucosa of children with coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2010 ;50:147-53.

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 (2010). Increased heat shock protein 72 expression in celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2010;51:573-8.

Teesalu K, Uibo O, Kalkkinen N, Janmey P, Uibo R (2001). Increased levels of IgA antibodies against desmin in children with coeliac disease. *Int Arch Allergy Immunol*. 2001;126:157-166.

Teesalu K, Panarina M, Uiibo O, Uiibo R, Utt M (2012). Autoantibodies from patients with celiac disease inhibit transglutaminase 2 binding to heparin/heparan sulfate and interfere with intestinal epithelial cell adhesion. *Amino Acids*. 2012;42:1055-64.

Thomázy V, Fésüs L (1989). Differential expression of tissue transglutaminase in human cells. An immunohistochemical study. *Cell Tissue Res*. 1989;255:215-224.

Tiberti C, Bao F, Bonamico M, Verrienti A, Picarelli A, Di Tola M, Ferri M, Vecci E, Dotta F, Eisenbarth GS, Di Mario U (2003). Celiac disease-associated transglutaminase autoantibody target domains at diagnosis are age and sex dependent. *Clin Immunol*. 2003;109:318-24.

Tio M, Cox MR, Eslick GD (2012). Meta-analysis: coeliac disease and the risk of all-cause mortality, any malignancy and lymphoid malignancy. *Aliment Pharmacol Ther*. 2012;35:540-51.

Troncone R, Ferguson A (1991). Animal model of gluten induced enteropathy in mice. *Gut*. 1991;32:871-5.

Tommasini A, Not T, Kiren V, Baldas V, Santon D, Trevisiol C, Berti I, Neri E, Gerarduzzi T, Bruno I, Lenhardt A, Zamuner E, Spano A, Crovella S, Martellosi S, Torre G, Sblattero D, Marzari R, Bradbury A, Tamburlini G, Ventura A (2004). Mass screening for coeliac disease using antihuman transglutaminase antibody assay. *Arch Dis Child*. 2004;89:512-5.

Trejo-Skalli AV, Velasco PT, Murthy SN, Lorand L and Goldman RD. (1995) Association of a transglutaminase-related antigen with intermediate filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92:8940-4.

Tripathi A, Lammers KM, Goldblum S, Shea-Donohue T, Netzel-Arnett S, Buzza MS, Antalis TM, Vogel SN, Zhao A, Yang S, Arrietta MC, Meddings JB, Fasano A (2009). Identification of human zonulin, a physiological modulator of tight junctions, as prehaptoglobin-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:16799-804.

Tucková L, Karská K, Walters JR, Michalak M, Rossmann P, Krupicková S, Verdu EF, Saalman R, Hanson LA, Tlaskalová-Hogenová H (1997). Anti-gliadin antibodies in patients with celiac disease cross-react with enterocytes and human calreticulin. *Clin Immunol Immunopathol*. 1997;85:289-96.

Upchurch HF, Conway E, Patterson MK Jr, Maxwell MD (1991). Localization of cellular transglutaminase on the extracellular matrix after wounding: characteristics of the matrix bound enzyme. *J Cell Physiol*. 1991;149:375-82.

van Belzen MJ, Mulder CJ, Pearson PL, Houwen RH, Wijmenga C (2001). The tissue transglutaminase gene is not a primary factor predisposing to celiac disease. *Am J Gastroenterol*. 2001;96:3337-40.

van Belzen MJ, Meijer JW, Sandkuijl LA, Bardoel AF, Mulder CJ, Pearson PL, Houwen RH, Wijmenga C (2003). A major non-HLA locus in celiac disease maps to chromosome 19. *Gastroenterology*. 2003;125:1032-41.

van Belzen MJ, Koeleman BP, Crusius JB, Meijer JW, Bardoel AF, Pearson PL, Sandkuijl LA, Houwen RH, Wijmenga C (2004). Defining the contribution of the HLA region to cis DQ2-positive coeliac disease patients. *Genes Immun*. 2004;5:215-20.

van Heel DA, West J (2006). Recent advances in coeliac disease. *Gut* 2006;55:1037-1046.

van Heel DA, Franke L, Hunt KA, Gwilliam R, Zhernakova A, Inouye M, Wapenaar MC, Barnardo MC, Bethel G, Holmes GK, Feighery C, Jewell D, Kelleher D, Kumar P, Travis S, Walters JR, Sanders DS, Howdle P, Swift J, Playford RJ, McLaren WM, Mearin ML, Mulder CJ, McManus R, McGinnis R, Cardon LR, Deloukas P, Wijmenga C (2007). A genome-wide association study for celiac disease identifies risk variants in the region harboring IL2 and IL21. *Nat Genet*. 2007;39:827-9.

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 (2010). Increased expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in coeliac disease. *Pediatr Res*. 2010;68:118-22.

Viljamaa M, Collin P, Huhtala H, Sievänen H, Mäki M, Kaukinen K (2005). Is coeliac disease screening in risk groups justified? A fourteen-year follow-up with special focus on compliance and quality of life. *Aliment Pharmacol Ther.* 2005; 22:317-324.

Viljamaa M, Kaukinen K, Pukkala E, Hervonen K, Reunala T, Collin P (2006). Malignancies and mortality in patients with coeliac disease and dermatitis herpetiformis: 30-year population-based study. *Dig Liver Dis.* 2006;38:374-80.

Villalta D, Crovatto M, Stella S, Tonutti E, Tozzoli R, Bizzaro N (2005). False positive reactions for IgA and IgG anti-tissue transglutaminase antibodies in liver cirrhosis are common and method-dependent. *Clin Chim Acta.* 2005;356:102-109.

Vilppula A, Kaukinen K, Luostarinen L, Krekelä I, Patrikainen H, Valve R, Mäki M, Collin P (2009). Increasing prevalence and high incidence of celiac disease in elderly people: a population-based study. *BMC Gastroenterol.* 2009;9:49.

Virta LJ, Kaukinen K, Collin P (2009). Incidence and prevalence of diagnosed coeliac disease in Finland: results of effective case finding in adults. *Scand J Gastroenterol.* 2009;44(8):933-8.

Volta U, De Franceschi L, Molinaro N, Tetta C, Bianchi FB (1997). Organ-specific autoantibodies in coeliac disease: do they represent an epiphenomenon or the expression of associated autoimmune disorders? *Ital J Gastroenterol Hepatol.* 1997;29:18-21.

Wang XQ, Liu W, Xu CD, Mei H, Gao Y, Peng HM, Yuan L, Xu JJ (2011). Celiac disease in children with diarrhea in 4 cities in China. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2011;53:368-70.

Wang Z, Griffin M (2012a). TG2, a novel extracellular protein with multiple functions. *Amino Acids.* 2012 42:939-49.

Wang Z, Collighan RJ, Pytel K, Rathbone DL, Li X, Griffin M (2012b). Characterization of the heparin binding site of tissue transglutaminase: its importance in the enzyme's cell surface targeting, matrix deposition and cell signalling. *J Biol Chem.* Epub 2012 Feb 1.

Walker-Smith JA, Guandalini S, Schmitz J, Schmerling DH, Visakorpi JK (1990). Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. *Arch Dis Child.* 1990;65:909-911.

West J, Logan RF, Hill PG, Lloyd A, Lewis S, Hubbard R, Reader R, Holmes GK, Khaw KT (2003). Seroprevalence, correlates, and characteristics of undetected coeliac disease in England. *Gut.* 2003;52:960-5.

Zamora J, Abaira V, Muriel A (2006). Meta-DiSc: a software for meta-analysis of test accuracy data. *BMC Med Res Methodol* 2006;6:31

Zanoni G, Navone R, Lunardi C, Tridente G, Bason C, Sivori S, Beri R, Dolcino M, Valletta E, Corrocher R, Puccetti A (2006). In celiac disease, a subset of autoantibodies against transglutaminase binds toll-like receptor 4 and induces activation of monocytes. *PLoS Med.* 2006 Sep;3(9):e358.

Zone JJ, Schmidt LA, Taylor TB, Hull CM, Sotiriou MC, Jaskowski TD, Hill HR, Meyer LJ (2011). Dermatitis herpetiformis sera or goat anti-transglutaminase-3 transferred to human skin-grafted mice mimics dermatitis herpetiformis immunopathology. *J Immunol.* 2011;186:4474-80.

9.1. AZ ÉRTEKEZÉSHEZ FELHASZNÁLT SAJÁT *IN EXTENSO* KÖZLEMÉNYEK

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, Csipő 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 monitoring 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-Hoyer 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, Csipő 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, B 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, Altorjay 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, Altorjay 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, Pocsa 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, Csosz E, Kurtán T, Antus S, Szigeti K, Simon-Vecsei Z, Korponay-Szabó IR , Keresztessy Z, Fésüs L. Functional significance of five noncanonical Ca ²⁺ -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, Pocsa 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, Pocsa 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, Pocsa 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, Pocsa 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, Einarsdóttir 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.	Einarsdóttir 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, Csósz É, Király R, Simon-Vecsei Z, Mäki M. Diagnosis and treatment of gluten-induced autoimmune diseases. <i>PCT WO 2010/116196 A2</i>			
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, Dema 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, Csósz É, Király R, Simon-Vecsei Z, Mäki M. Diagnosis of gluten-induced autoimmune diseases. <i>PCT WO 2010/113025 A2</i>			
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.	Einarsdóttir 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, Lopenen 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, Dezsőfi A, Arató A. Duodenal ulceration in a celiac patient with plasminogen I deficiency: coincidence or cofactors? Pediatrics 2011, e1302-6. 5,391
59. Einarsdóttir E, Koskinen L, de Kauwe A, Dukes E, Mustalahti K, Balogh M, **Korponay-Szabó IR**, Kaukinen K, Kurppa K, Ádány R, Pocsai 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, Mäki 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, Rauhavirta 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

9.1. 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-szenzitivitás okozta vékonybél- boholyatrophia specifikus serológiai 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 sensitív 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 sensitív 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, Csitáry 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. Karell 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 gyermekegyógyászati 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, 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 (gluténszenzitiv 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, Dezsöfi 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

10. Köszönetnyilvánítás

Először is szeretném köszönetemet kifejezni szüleimnek odaadó támogatásukért és türelmükért, hogy hosszú távolléteimet oly sokszor elviselték és hogy olyan kevés időt töltöttem velük.

Szeretném köszönetemet kifejezni mestereimnek, Dr. B.Kovács Judit főorvosnőnek, Dr. Markku Mäki tamperei professzornak és Dr. Fésüs László akadémikusnak, akik a coeliakia klinikai ismereteiben, a coeliakiás antitestek tanulmányozásában és transzglutamináz enzimek kutatása területén mindvégig türelemmel vezettek és mindig segítségemre voltak.

Szeretném továbbá megköszönni tartós támogatásukat Dr. Oláh Éva professzorasszonynak és Dr. Balla György professzornak, a Debreceni Gyermekklinika igazgatóinak valamint a Heim Pál Gyermekkórház korábbi és jelen vezetőinek, köztük elsősorban Dr. Gorácz Gyula, Dr. Harmat György, Dr. Nyerges Gábor és Dr. Czimmer Antalnak professzoroknak, Smrcz Ervinnek, valamint Dr. Nagy Anikó és Dr. Saracz Judit igazgatóknak. Gorácz Gyulának külön köszönettel tartozom, mint patológus munkatársamnak is, aki mindig megbízható és konzekvens leleteivel nagymértékben elősegítette a transzglutamináz antitestek klinikai értékének felismerését és igazolását.

Köszönettel tartozom Dr. Nagy Iván főorvosnak, aki munkám kezdetén lehetőséget adott arra, hogy laboratóriumában dolgozzam, valamint utódainak, akik munkámhoz a későbbiek segítséget adtak.

Köszönöm Dr. Kárpáti Sarolta professzornak, hogy felkette érdeklődésemet a coeliakia antitestek kutatása iránt, megtanított az immunfluoreszcens technikára és kezdeti kutatásaimat támogatta.

Köszönöm kutatótársaimnak, elsősorban Tuula Haltunennek, Kaija Laurilának, Király Róbertnek, Kapitány Anikónak, Dr. Papp Máriának, Katri Linforsnak, Katri Kaukinennek, Kati Juuti-Uusitalonak, Segio Caja-nak, Bagossi Péternek, PhD hallgatóimnak, Dr. Nemes Évának, Simon-Vecsei Zsófiának, és Tóth Boglárkának, valamint a Tamperei csoport PhD hallgatóinak, Tiina Raivionak, Tiina Rauhavirtának, Essi Myrskynek segítségüket, tanácsaikat és a közös munkát.

Ezúton is köszönöm klinikai és kórházi orvoskollégáimnak, különösen Dr. Gyimesi Juditnak, Dr. Lőrincz Margitnak, Dr. Meichelbeck Krisztinának, Dr. Tumpek Juditnak, Dr. Opre Juditnak, Dr. Kadenczki Orsolyának, Dr. Tóth Lászlónak, a velem dolgozó nővéreknek

valamint Barabás Beatrix és Vajda Nagy Erika dietetikusoknak, asszisztenseimnek, dr Iványiné Karajz Katalinnak, Nagyné Nagy Erzsébetnek, Nagy Laszlónénak és Lengyelné Bodor Ágnesnek segítségüket, támogatásukat és megértésüket a klinikai munka, kutatás valamint a betegellátás során.

Köszönöm a kutatási együttműködést és támogatást Dr. Sipka Sándor professzornak és a Debreceni III. Belkínika Immunlabor munkatársainak, Dr. Ingrid Dahlbomnak (Uppsalai Egyetem, Svédország) Dr. Päivi Saavalainennek és kutatócsoportjának (Helsinki Egyetem, Biomedicum, Finnország), Dr. Jukka Partanennek és kutatócsoportjának (Helsinki Vérellátó és Szövettipizáló Laboratórium), Dr. Marios Hajdivassiliounak (Shieffield-i Egyetem, Anglia), Dr. Hassan Naimnak (Hannoveri Állatorvosi Főiskola, Németország), Dr. Alessandro Venturának és Dr. Tarcisio Notnak és kutatóiknak (Trieszti Egyetem, Olaszország), Dr. Arató András professzornak, Dr. Veres Gábornak, Dr. Dezsőfi Antalnal és a Semmelweis Egyetem I. Gyermekklinika gasztroenterológiai kutatócsoportjának, Pusztai Jánosnak és Jánosnénak, a Szolnoki Lisztérzékenyek Egyesületének, a megyei kórházak gyermekgasztroenterológusainak, köztük különösképp Dr. Szabados Katalinnak, Dr. Balogh Mártának és Dr. Horváth Ágnesnek, valamint a kutatásokban és szűrővizsgálatokban résztvevő védőnőknek, betegeknek és családjaiknak.

Szeretnék köszönetet mondani még az alábbi kutatási támogatásokat rendelkezésemre bocsátó szervezeteknek: OTKA K6168 és 10788, TÉT IT4/2007, Marie Curie Transcom IAPP PIAP-GA-2010-251506, TÁMOP 4.2.1./B-09/1/KONV-2010-0007, EUFP6 PreventCD, Pirkanmaan Sairanhoitopiiri EVO, Finnish Coeliac Society.

11. Mellékletek jegyzéke

1. melléklet

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. Gut. 2004;53:641-8.

2. melléklet

Simon-Vecsei Z, Király R, Bagossi P, Tóth B, Dahlbom I, Caja S, Csősz É, Lindfors K, Sblattero D, Nemes É, Mäki 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;109:431-6.

In vivo targeting of intestinal and extraintestinal transglutaminase 2 by coeliac autoantibodies

I R Korponay-Szabó, T Halttunen, Z Szalai, K Laurila, R Király, J B Kovács, L Fésüs, M Mäki

Gut 2004;53:641–648. doi: 10.1136/gut.2003.024836

See end of article for authors' affiliations

Correspondence to:
Dr M Mäki, Coeliac Disease Study Group, Paediatric Research Centre, Building FM3, University of Tampere, FIN-33014, Finland; markku.maki@uta.fi

Accepted for publication
26 November 2003

Background: IgA class serum autoantibodies against type 2 (tissue) transglutaminase (TG2) bind to both intestinal and extraintestinal normal tissue sections in vitro, eliciting endomysial, reticulin, and jejunal antibody reactions. It is not known whether similar binding also occurs in coeliac patients in vivo, and may thereby contribute to disease manifestations.

Aims: To investigate intestinal and extraintestinal coeliac tissues for the presence of in vivo bound TG2 specific IgA and its relation to small intestinal mucosal atrophy.

Patients: We investigated jejunal samples with normal villous morphology from 10 patients with developing coeliac disease who subsequently progressed to a flat lesion, from 11 patients with dermatitis herpetiformis, and from 12 non-coeliac controls. Six extrajejunal biopsy samples (liver, lymph node, muscle, appendix), obtained based on independent clinical indications from patients with active coeliac disease, were also studied.

Methods: Double colour immunofluorescent studies for in situ IgA, TG2, and laminin were performed. IgA was eluted from tissue sections and tested for TG2 specificity by enzyme linked immunosorbent assay and indirect immunofluorescence.

Results: IgA (in one IgA deficient case IgG) deposition on extracellularly located TG2 was detected in jejunal and extrajejunal specimens of all coeliac patients, and also in seven of 11 dermatitis herpetiformis patients, of whom two had no circulating endomysial antibodies. IgA eluted from extraintestinal coeliac tissues was targeted against TG2.

Conclusions: Coeliac IgA targets jejunal TG2 early in disease development even when endomysial antibodies are not present in the circulation. Extraintestinal target sites of coeliac IgA further indicate that humoral immunity may have a pathogenetic role.

In a certain proportion of individuals carrying the extended autoimmune HLA DR3-DQ2 or DR4-DQ8 haplotype, daily ingested wheat, rye, and barley proteins induce small intestinal villous atrophy and crypt hyperplasia, resulting in a symptomatic gastrointestinal disease.^{1–3} Clinical research has also focused on gluten induced entities with no or mild gastrointestinal symptoms where extraintestinal manifestations predominate—for example, malignant diseases,³ osteopenia and bone fractures,⁴ infertility and unfavourable outcome of pregnancy,^{5–6} liver disorders and diseases,⁷ central nervous system involvement,^{8–9} autoimmune myocarditis,¹⁰ and potentially even the general development of autoimmune diseases.¹¹ The classical extraintestinal disease is dermatitis herpetiformis where ingestion of gluten induces a blistering skin disease which can develop even in individuals with normal small intestinal morphology.¹² Coeliac type gluten sensitivity is not restricted to villous atrophy, which in fact develops gradually from a normal mucosal morphology.¹³ Both gastrointestinal and extraintestinal symptoms, and even complications, may occur in the early stages when the mucosal morphology is still considered normal.^{8–14–15}

The pathogenetic mechanisms of gluten induced small intestinal mucosal lesions are not fully understood,² even less so in the case of extraintestinal manifestations. A general and disease specific phenomenon is the occurrence of circulating gluten dependent autoantibodies which target transglutaminase 2 (TG2).^{16–17} TG2 is also the antigen for the in vitro binding of coeliac IgA antibodies to intestinal and extraintestinal normal tissues, such as the liver, kidney, appendix, oesophagus, and umbilical cord sections, used in endomysial, reticulin, and jejunal antibody laboratory assays.^{18–19} These

antibodies are present in the jejunal juice²⁰ and are produced solely in the intestinal mucosa.²¹

Recent studies indicate that coeliac antibodies reduce the enzymatic activity of TG2 in vitro and, similar to monoclonal TG2 antibodies, inhibited transforming growth factor β (TGF- β) mediated epithelial cell differentiation in an in vitro small intestinal crypt villus axis model.²² Although these results prove that autoantibodies exert biological effects, their role in the immunopathology of the coeliac mucosal lesion, which is currently considered to be primarily a T lymphocyte mediated disorder, is a matter of debate. Indeed, it is not known to what extent TG2 autoantibodies reach their intracellularly produced enzyme autoantigen throughout the body in vivo, and whether autoantibody targeting precedes mucosal deterioration.

It has been repeatedly observed that the small intestinal epithelial basement membrane region contains deposited IgA in patients with active coeliac disease,^{24–26} and such IgA deposits have also been found in the subepithelial area and on subepithelial fibroblasts by immunoelectron microscopic studies.²⁷ Whether this IgA is bound to any specific target is not known.

In this study, we hypothesised that in vivo deposited IgA targets TG2 and sought to establish whether extraintestinal TG2 specific autoantibody deposition occurs in coeliac patients with extraintestinal manifestations. Furthermore, we investigated if small intestinal subepithelial

Abbreviations: ELISA, enzyme linked immunosorbent assay; PBS, phosphate buffered saline; TG2, transglutaminase type 2 or tissue transglutaminase; TGF- β , transforming growth factor β

Table 1 Presenting clinical characteristics and symptoms in patients with a normal small intestinal villous architecture

	Patients with developing coeliac disease (n = 10) or dermatitis herpetiformis (n = 11)	Non-coeliac controls (n = 12)
Diarrhoea	5	6
Short stature	0	4
Iron deficiency anaemia	1	2
Constipation	1	0
Asymptomatic family members of known coeliac patients	3	0
Rash	11	0

immunoglobulin deposition occurs in the early stages of disease development when the mucosal morphology is still normal.

MATERIALS AND METHODS

Jejunal biopsy samples

Samples from three sources were investigated. (i) Ten patients (aged 4.4–32 years at presentation, median 7.8) with developing coeliac disease and an initially normal small intestinal villous structure were studied. These patients were prospectively followed up, they consumed normal gluten containing food, and 4–33 months later (mean 9.3) developed overt coeliac disease with a flat mucosa. Initial samples

were evaluated at the time of the first biopsy when the final diagnosis was not known. (ii) Eleven patients (aged 3.6–57 years, median 10.4) with untreated dermatitis herpetiformis were studied who had typical IgA deposits in the dermal papillae but normal jejunal mucosal architecture at presentation. (iii) The third group comprised 12 non-coeliac control patients (aged 1–17 years, median 4.6) with a normal small intestinal mucosa. Controls were negative for serum endomysial antibodies while all 10 patients in group (i) and five in group (ii) had circulating endomysial antibodies in serum. Clinical characteristics are presented in table 1.

Biopsies were obtained from the jejunum by Watson capsule and were cut into two pieces. One piece was fixed in formaldehyde for routine histology and the other was snap frozen in liquid nitrogen and stored at –70°C until use.

Other organ samples

A study was made of frozen tissue samples from six additional patients who underwent biopsies from organs other than the small bowel while they had active coeliac disease. All of these biopsies had been performed based on clinical indications independent of the evaluation of coeliac disease (table 2). Samples were traced retrospectively and included two lymph nodes, one skeletal muscle, two liver biopsy samples, and a non-inflamed appendix. As controls, one lymph node, three liver, and six appendix samples from non-coeliac patients were included. These had been removed in unrelated surgical interventions and were histologically normal. All biopsies were performed for diagnostic purposes and informed consent was obtained.

Table 2 Clinical and laboratory characteristics in coeliac patients who had extrajejunal tissue removed

Patient No	Sex/age (y)	Symptoms and signs	Removed tissue	Indication for biopsy/removal	Routine histology	Serum EMA titre	Jejunal biopsy histology	Outcome on a gluten free diet	Colocalisation of antibody deposits with TG2
1	M/13	Anaemia, iron deficiency, mesenteric lymph node and right testis enlargement	Mesenteric lymph node	Suspicion of malignancy	Normal*	640 (IgA)	SVA	Marked clinical improvement, normal villi	Yes
			Testis biopsy	Suspicion of malignancy	Normal				ND
2	F/14	Diarrhoea, weight loss, anaemia, mesenteric lymph node enlargement	Mesenteric lymph node	Suspicion of malignancy	Normal	640 (IgA)	SVA	Symptom free, refused a control jejunal biopsy	Yes
			Appendix	Technical at laparoscopy	Normal				Yes
3	M/18	Progressive gait disturbance, known but not treated coeliac disease	Skeletal muscle biopsy	Suspicion of progressive neuromuscular disease	Normal†	40 (IgA)	PVA	Improved gait, normal villi	Yes
4	F/3	Cystic fibrosis, anaemia, steatorrhoea, parvovirus B19 infection, elevated liver transaminase values	Liver biopsy	Acute liver enlargement	Steatosis	320 (IgA)	SVA	Died of progressive liver failure. Near normal villi at autopsy	Yes
5	F/12	Elevated liver transaminase values, selective IgA deficiency	Liver biopsy	HBsAg positivity	Normal	5120 (IgG)	SVA	Symptom free, control jejunal biopsy not done	Yes
6	M/3	Proteinuria, selective IgA deficiency	Kidney biopsy	Proteinuria	Mesangial IgG deposition	1280 (IgG)	SVA	Symptom free, normal villi	ND

*Also with immunohistochemistry for T and B cell markers.

†Also with histochemistry and electron microscopy.

EMA, serum endomysial antibodies; PVA, partial villous atrophy with crypt hyperplasia; SVA, subtotal villous atrophy; TG2, transglutaminase type 2; HBsAg, hepatitis B surface antigen; ND, not done.

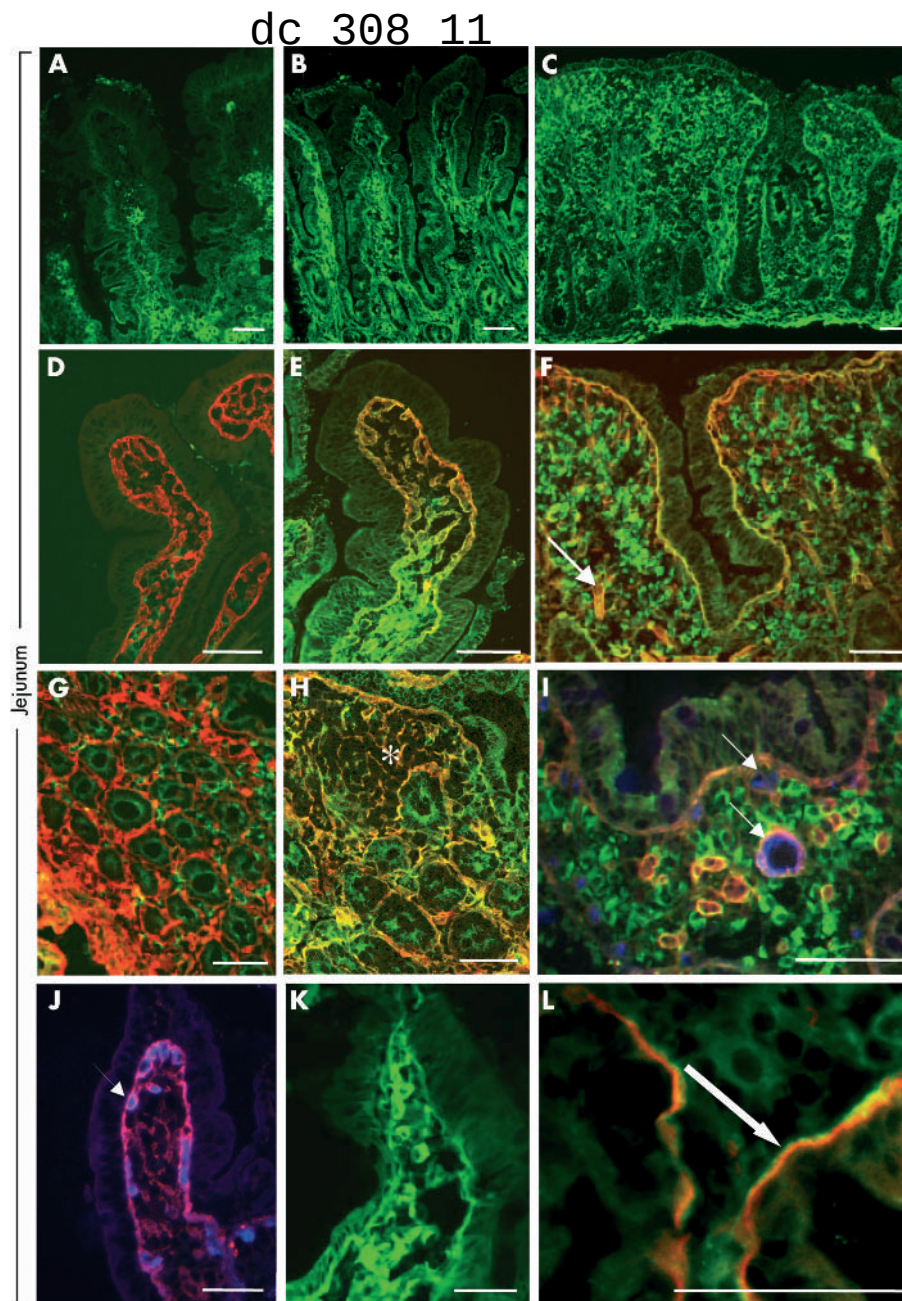


Figure 1 IgA (green) and transglutaminase 2 (TG2, red) in the normal jejunum (A, D, G), in the early developing stage of coeliac disease (B, E, H) and in the coeliac flat lesion (C, F, I). (B) Subepithelial IgA deposits in the villi and around crypts in the mucosa with a normal architecture and (C) in the flat mucosa developed four months later in the same patient. IgA deposits colocalised with TG2 (E, F, H, I), as indicated by the yellow merging of the labels. Both deposited IgA and TG2 were closely related to vessels shown in blue (I, J, arrows). (K) Similar jejunal IgA deposits in a patient with dermatitis herpetiformis and negative serum endomysial antibodies. (L) Crypt basement membrane laminin (red band) with coeliac IgA (green) deposits. There was only partial overlap (yellow) on the extracellular surface of the laminin. Bar = 50 μ m.

Immunofluorescent studies

Unfixed 5 μ m thick sections of patient tissues were investigated for deposited immunoglobulins by direct immunofluorescence using fluorescein isothiocyanate labelled rabbit antibodies against human IgA, IgG, and IgM (Dako AS, Glostrup, Denmark) at a dilution of 1:40 in phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4. These stainings were also performed as multicolour procedures where patient immunoglobulins were shown in green and extracellular matrix proteins in red using rhodamine conjugated antimouse or antirabbit secondary antibodies, as described elsewhere.^{18 19} The primary antibodies used were monoclonal mouse antibodies against TG2 (CUB7402; NeoMarkers, Fremont,

California, USA), and rabbit antibodies against fibronectin (Dako) and laminin (Dako), respectively, diluted 1:200 in PBS. For investigation of the relation of patient immunoglobulins to blood vessels, green was used for detection of patient IgA, red for TG2, and blue for an endothelial marker (rabbit antibodies against von Willebrand factor (Dako) followed by AMCA conjugated secondary antirabbit antibodies (Vector Laboratories, Burlingame, California, USA)).

Elution of IgA and TG2 from tissue sections

Unfixed cryosections were washed twice in PBS to remove blood and related antibodies. A solution of 0.25% chloroacetic

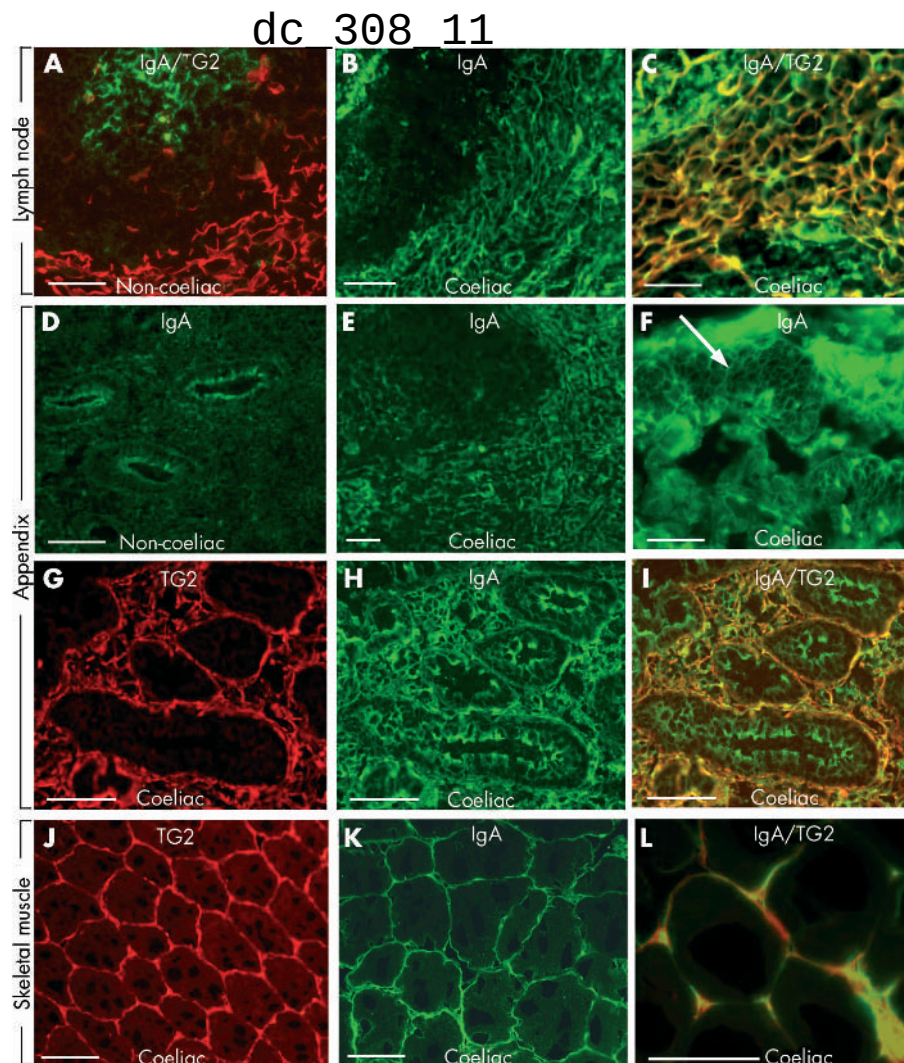


Figure 2 (A) Non-coeliac lymph node double stained for IgA (green) and transglutaminase 2 (TG2, red). (B) In vivo deposited IgA (green) on reticulin fibres in a lymph node from a coeliac patient (case 1 in table 2). (D) Normal appendix with IgA in epithelial cells. (E–I) Appendix from a coeliac patient (case 2) with in situ IgA deposits (green) on reticulin fibres (E), endomysium (F, arrow), and pericryptal subepithelial layer (H), corresponding to TG2 localisation in red (G). (J–L) Skeletal muscle from a coeliac patient (case 3) with an endomysial TG2 pattern (J) and endomysial IgA deposits (K, green). Colocalisation of IgA deposits with TG2 in all three coeliac specimens is indicated by yellow (C, I, L). There was no merging for IgA in the germinal centres or epithelial IgA (green in C and I). Bar = 50 μ m.

acid (Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland) with 0.2 M/NaCl, pH 2.7, was then used as the eluent²⁸ and applied to the sections for 20 minutes. The eluates with chloroacetic acid were neutralised with 1 M/l imidazole, washed in PBS, concentrated by centrifugation on 10K membranes (Microsep, Pall Corporation, Ann Harbor, Michigan, USA), and lyophilised. Treated sections were washed twice in PBS and examined by immunofluorescence for the remaining IgA and TG2 in tissues, as described above.

Sections from extraintestinal samples, from six coeliac and three dermatitis herpetiformis jejunum samples, were investigated by immunofluorescence after chloroacetic acid treatment. Lyophilised tissue eluates were prepared from a coeliac liver, lymph node, and a non-coeliac liver.

Detection of coeliac antibodies in serum samples and tissue eluates

Endomysial antibodies were investigated in serum samples and tissue eluates by an indirect immunofluorescent method on monkey oesophagus, normal human umbilical cord, jejunum, and appendix sections, as described elsewhere.¹⁸ The initial dilution was 1:2.5 in PBS, and samples

non-reactive at this dilution were considered negative. Eluates were also tested on TG2 knockout mouse (TG2^{-/-}) jejunum as a substrate, and on TG2^{-/-} jejunum coated with human recombinant TG2 expressed in *Escherichia coli*,¹⁹ as previously described.¹⁹

Tissue eluates were tested for the presence of TG2 and IgA by western blot³⁰ and for TG2 specific IgA by ELISA using microtitre plates coated with fibronectin (Sigma, St Louis, Missouri, USA) and recombinant TG2, as described by Achyuthan and colleagues.³¹ Also, plates coated with rabbit antibodies against mouse IgG1 (ICN, Aurora; dissolved in 0.03 M bicarbonate buffer, pH 9.6) and CUB7402 monoclonal TG2 specific capture antibodies were applied to further verify the presence of both TG2 specific IgA and TG2 in the eluates. Bound IgA was detected with peroxidase conjugated rabbit antibodies against human IgA, as described previously.³⁰

RESULTS

In vivo deposited IgA in the coeliac jejunum

In non-coeliac jejunal biopsy samples, IgA was detected only inside plasma cells and epithelial cells (fig 1A). In contrast, clear subepithelial IgA positivity was found along the villous

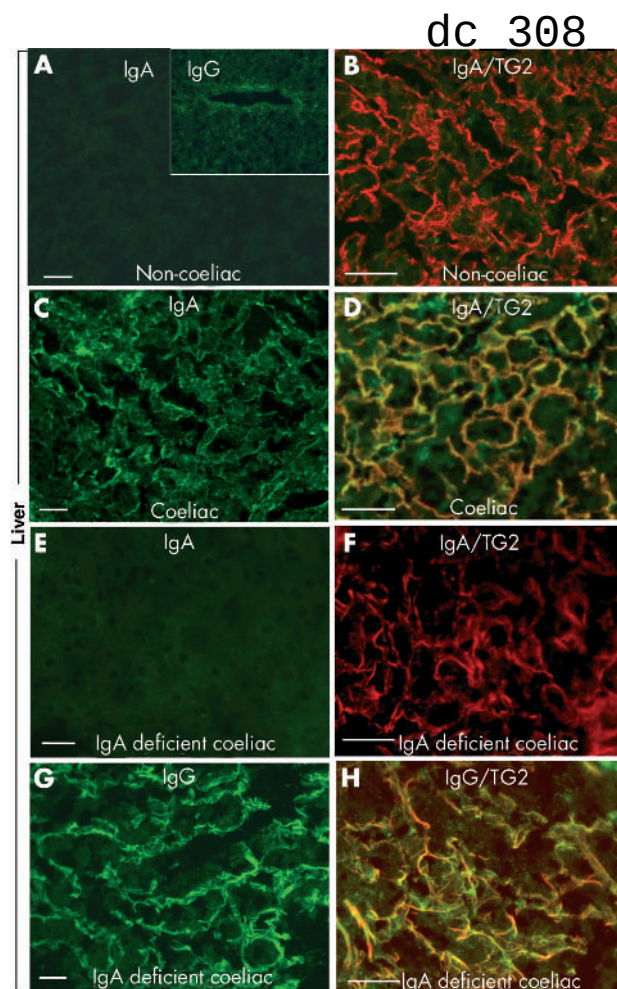


Figure 3 IgA or IgG (green) and transglutaminase 2 (TG2, red) in the liver of a non-coeliac patient (A–B), and from an IgA competent (C–D, case 4 in table 2) and IgA deficient (E–H, case 5) coeliac patient. In coeliac patients, there was IgA (in IgA deficiency IgG) deposition on reticulin fibres (C, G). Yellow in (D) and (H) indicates colocalisation of deposits with TG2. Bar = 50 μ m.

and crypt basement membranes in jejunal samples from all 10 coeliac patients, both in the developing stage of the disease when the villous architecture was still normal and also later when the mucosa had deteriorated to the typical flat lesion (fig 1B, C, same patient).

This IgA positivity pattern was identical to the normal tissue localisation of TG2 (fig 1D, G; red) which appeared merged into yellow in the coeliac mucosa due to colocalisation with IgA deposits labelled in green (fig 1E, F, H, I). This colocalisation was also seen on reticulin fibres of lymphoid follicles (fig 1H, asterisk) and on trabecular structures which appeared fragmented in the flat lesion (fig 1F, arrow). IgA in plasma cells or inside crypt epithelial cells did not merge into yellow in either normal or coeliac mucosa. Both coeliac IgA and TG2 were arranged around mucosal vessels, shown in blue (fig 1I, J, arrows). Coeliac IgA was located on the extracellular surface of laminin (fig 1L), and also showed a close relation to fibronectin (not shown). Similar IgA deposits were present in seven of 11 patients with dermatitis herpetiformis who had a normal jejunal villous structure at diagnosis. Two dermatitis herpetiformis patients who had clear jejunal IgA deposits were negative for circulating IgA class serum endomysial antibodies (fig 1K).

Jejunal IgM and IgG positivity did not differ between coeliac and control samples.

dc 308 11

In vivo deposited IgA in extrajejunal tissues

To establish whether coeliac IgA can reach TG2 in extra-intestinal tissues, we examined by double immunofluorescence two coeliac lymph nodes, two liver samples, one appendix, and one skeletal muscle specimen from coeliac patients (table 2, figs 2, 3). Specimens were normal (cases 1, 2, 3, 5, and 6 in table 2) or showed only non-specific changes (case 4, liver steatosis; table 2) by conventional microscopy. All of these tissues contained abundant TG2 in endomysial localisations or around reticulin fibres both in non-coeliac controls (fig 2A, 3B) and in coeliacs (fig 2G, J; fig 3D, F, H, red). Tissue IgA was not related to endomysial or reticulin structures in non-coeliac lymph node (n = 1), appendix (n = 6), or liver (n = 3) samples and appeared only inside epithelial cells or in the centre of lymphoid follicles (fig 2A, D; fig 3A, B, green). However, in coeliac samples there were heavy IgA deposits on reticulin fibres also (lymph nodes, appendix, liver (fig 2B, E, H; fig 3C)) and on endomysial structures (muscular layer of the appendix, skeletal muscle (fig 2F, K)) which were colocalised with tissue TG2 (fig 2C, I, L; fig 3D).

In vivo deposited IgG in coeliac disease with IgA deficiency

In the case of IgA deficiency (cases 5 and 6 in table 2), IgA deposits were missing (fig 3E, F) but TG2 related IgG deposits were seen in the liver (fig 3G, H) and also on archive electron microscopic kidney pictures of case 6 (not shown).

Investigation of in vivo IgA-TG2 autoantigen binding

Colocalisation of in vivo deposited antibodies with TG2, both in the jejunum and also in extraintestinal tissues, strongly suggested that the specific target for coeliac antibody binding is TG2. To obtain direct evidence, we eluted deposited IgA from extraintestinal tissues for further studies.

We used chloroacetic acid to disrupt TG2 binding to fibronectin²⁸ and to release the in vivo deposited IgA together with released TG2. Treatment of the sections resulted in disappearance of extracellular IgA deposits in sections from both the extrajejunal and jejunal coeliac samples, while IgA in plasma cells and epithelial cells remained visible on immunofluorescence (fig 4A, B). Likewise, in tissues, TG2 became undetectable by monoclonal TG2 specific autoantibodies after elutions with chloroacetic acid.

TG2 specific IgA in coeliac tissue eluates

To ascertain that both TG2 and IgA are found in eluates, western blot and ELISA studies were conducted with concentrated eluates prepared from a coeliac and a non-coeliac control liver, and from a coeliac lymph node. A clear band at 80 kDa, corresponding to the molecular weight of TG2 was, as expected, equally detectable with monoclonal TG2 antibodies both in coeliac and non-coeliac eluates (fig 4C). Human IgA was also detected both in coeliac and non-coeliac eluates (data not shown).

However, when the eluates were tested by ELISA for TG2 specific IgA class antibodies, high optical density values were obtained only with IgA eluted from the coeliac liver and lymph node (0.578 and 2.551, respectively) but not with IgA eluted from the control liver (0.052, representative values from two independent elution experiments). This finding indicates that IgA originating from non-coeliac tissues was not directed against TG2. The result was confirmed in an additional experiment where the eluates were added to ELISA plates coated with TG2 specific monoclonal antibodies and IgA was measured from the bound TG2 human IgA complexes; coeliac liver eluate gave an optical density of 0.493 versus 0.107 obtained with the control liver eluate (fig 4D).

dc_308_11

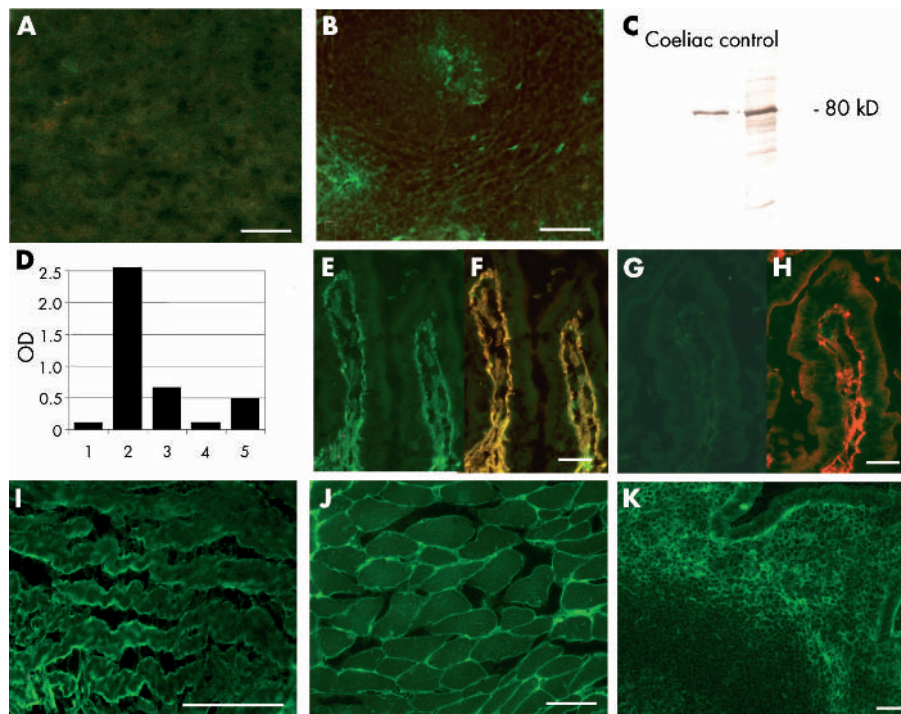


Figure 4 Coeliac liver (A) and coeliac lymph node (B) double stained for IgA (green) and transglutaminase 2 (TG2, red) after elution with choroacetic acid which releases tissue TG2. (C) Demonstration of TG2 in the eluates by western blotting. (D) TG2 specific IgA detected in the eluates by ELISA using human recombinant TG2 antigen (bars 1–3) or anti-TG2 capture antibody (bars 4, 5): 1, 4: IgA eluted from a normal liver; 2: IgA eluted from the coeliac lymph node; 3, 5: IgA eluted from the coeliac liver. (E–K) Indirect immunofluorescent studies with the eluates. (E) IgA (green) eluted from coeliac liver bound to recombinant human TG2 coated on TG2 knockout mouse jejunum and merged into yellow (F) when TG2 was labelled in red, while IgA eluted from a normal liver did not bind (G–H). (I) Endomysial binding of IgA eluted from the coeliac lymph node to human umbilical cord. Binding of IgA eluted from the coeliac liver to monkey oesophagus endomysium (J) and human appendix subepithelial band (K). Bar = 50 μ m.

Similarly, IgA eluted from coeliac tissues bound to human recombinant TG2 applied on TG2 $^{-/-}$ mouse tissues (fig 4E, F), and also to the endomysial and reticulin structures of human umbilical cord (fig 4I), monkey oesophagus (fig 4J), and normal appendix (fig 4K) sections. In contrast, IgA eluted from the non-coeliac liver did not bind to any of these structures (fig 4G, H). Furthermore, there was no IgA binding to the TG2 $^{-/-}$ mouse tissues with either the coeliac or non-coeliac eluates.

The experiments above collectively demonstrate that deposited IgA seen in coeliac tissues is targeted against TG2.

DISCUSSION

In the present study, we showed for the first time that in vivo targeting of TG2 in coeliac disease occurs in the form of in situ endomysial, reticulin, and jejunal subepithelial autoantibody binding. Patient IgA found deposited on extracellular TG2 in the liver, lymph nodes, and muscles indicates that the coeliac disease autoantigen is widely accessible to the intestinally produced²¹ circulating coeliac autoantibodies throughout the body. Based on clinical evidence of the occurrence of extraintestinal manifestations, coeliac disease should be regarded as a systemic disease and not solely involving the intestinal tract. The present primary observations may constitute one important denominator for gluten induced extraintestinal disease manifestations.

This study also showed that coeliac autoantibodies are deposited in the morphologically normal small intestinal mucosa before they can be detected in the circulation, and furthermore that the TG2 specific IgA deposition precedes the formation of the gluten induced flat jejunal lesion. This raises the possibility that autoantibodies against TG2, apart from T lymphocytes, contribute to the pathogenesis of mucosal

atrophy in both coeliac disease and dermatitis herpetiformis. Also, in all other organs studied, TG2 was targeted by autoantibodies, as shown by the TG2 specificity of the IgA co-eluted together with TG2 from coeliac tissues. At the same time, conventional elution agents (for example, urea) capable of removing serum endomysial antibodies coated on tissue sections,³² did not extract any specific IgA from the same tissues (data not shown), which would strongly argue against the possibility that the eluted IgA represents circulating (blood) antibodies.

However, in the gluten dependent skin disease of dermatitis herpetiformis, IgA further targets type 3 transglutaminase in the skin.³³

The coeliac disease autoantigen, TG2, is a ubiquitous cellular protein which also functions on the cell membrane associated with integrins.³⁴ In the extracellular space, TG2 is involved in the cell-extracellular matrix interactions and also in the remodelling and stabilisation of the extracellular matrix.³⁵ As coeliac antibodies have been shown to influence the protein cross linking enzymatic activity of TG2,²² their presence may interfere with the normal performance of the enzyme in the turnover of the extracellular matrix and cytokines. It may also be hypothesised that binding of autoantibodies to TG2 also disturbs TG2 mediated cellular adhesion. It has been shown that subepithelial blistering leading to loss of surface epithelial cells occurs in the coeliac mucosa,³⁶ coincident with findings indicating that the most pronounced IgA deposition is characteristically seen subepithelially.^{24–26} None the less, ulceration is not a feature of coeliac disease. Our study also showed that TG2 stands in intimate relation with mucosal blood vessels where deposition of coeliac IgA (fig 1I) might influence their nutritive and architectural function. There is remodelling of vessels in the

dc_308_11

coeliac flat lesion, and angiogenesis is very likely important for mucosal regeneration on diet when a normal villous structure without scarring is achieved.¹

Coeliac disease may also induce architectural changes in extraintestinal tissues—for example, dental enamel defects in permanent teeth or loss of Purkinje cells in the brain.^{8–37} Our patients with extraintestinal manifestations and IgA autoantibody deposition in their organs evinced no specific abnormalities on conventional histology (table 2). However, some inflammation was present and it is possible that, as in the case of the jejunum,¹³ more time is required to develop advanced lesions. The most general pathology, scarring, seems to be related to the bioactivity of TG2³⁵ and may be inhibited by the presence of antibodies. The observed clinical symptoms and signs (for example, size of the lymph nodes, muscular weakness, and proteinuria) were clearly responsive to gluten withdrawal, which suggests an ongoing pathology in the respective organs. In situ endomysial antibody deposition would also be a reasonable case for the gastrointestinal motility disorder observed in other clinical studies.³⁸ Direct evaluation of the effect and dynamics of extraintestinal TG2 antibody deposition is especially difficult as repeated biopsies were not possible in our cases. In addition, our liver patients also had independent hepatic diseases (case 4: cystic fibrosis, parvovirus B19 infection³⁹; case 5: hepatitis B infection). TG2 specific autoantibodies found in the morphologically normal appendix again indicate that a clinically silent deposition of TG2 specific antibodies in various organs can occur in any coeliac patient. It remains to be established which factors determine organ manifestations or whether there are contributing factors directing the antibodies to particular organs.

The ability of coeliac autoantibodies to inhibit the bioactivity of TG2²² and the resulting decrease in the availability of active TGF- β ²³ could also be part of the mechanisms which elicit the diverse extraintestinal disease entities. In fact, TGF- β is known as an elementary regulatory growth factor in organogenesis and tissue homeostasis maintenance, in addition to its known function as a proinflammatory and immunosuppressive factor. Furthermore, as the present results show the self-antigen to be targeted by immunoglobulins early on in disease development, it is intriguing to hypothesise that an initially ongoing Th2-type mucosal inflammation passes on to the classical Th1-type inflammatory process only later, as the mucosa deteriorates.

As the histological changes in coeliac organ manifestations are non-specific, examination of TG2 specific immunoglobulin deposition by direct immunofluorescence might be a useful diagnostic tool in the differential diagnosis of organ diseases of unknown aetiology. For example, lymph node enlargement, hitherto not acknowledged as a presenting symptom in coeliac disease, was a prominent feature in two of our patients.

TG2 related IgA deposits in the morphologically normal jejunum were predictive of forthcoming overt coeliac disease with villous atrophy. They may thus be regarded as a further marker of developing coeliac disease and coeliac disease latency, and a promising diagnostic tool in cases with low grade enteropathy. In agreement with previous studies,^{24–26} our results support the notion that subepithelial IgA deposits are specific for gluten induced enteropathy. However, further studies are needed to confirm this in larger patient groups and to explore the kinetics of IgA deposition in relation to gluten intake and intraepithelial lymphocyte counts. Moreover, it should be established whether humoral targeting of TG2 occurs in gluten induced peripheral or central nervous system diseases, or heart, bone, or reproductive system involvement.

In conclusion, the widespread in situ endomysial, reticulin, and jejunal binding of TG2 specific IgA antibodies found in the tissues of our coeliac patients with developing disease or extraintestinal organ manifestations strongly supports the concept that humoral immunity is involved in pathogenesis of coeliac disease.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Mária Géczy, Margit Lörincz, Anikó Marosi, Erika Molnár, Anikó Nagy, and Rita Újhelyi for collaboration in the clinical care of the patients, Zoltán Szentirmai, National Institute of Oncology, Budapest, Hungary, for kindly providing frozen sections from one of the coeliac lymph nodes, and Gerry Melino, University of Rome "Tor Vergata", Italy, for the generous donation of TG2 knockout mice. The study was supported by the Medical Research Fund of Tampere University Hospital, the Päivikki and Sakari Sohlberg Foundation, the Foundation of the Friends of the University Children's Hospitals in Finland, and the Finnish Coeliac Society.

Authors' affiliations

I R Korponay-Szabó, Paediatric Research Centre, Tampere University Hospital, Tampere, Finland, and Department of Gastroenterology-Nephrology, Heim Pál Children's Hospital, Budapest, Hungary
T Halttunen, K Laurila, M Mäki, Paediatric Research Centre, Tampere University Hospital, Tampere, Finland
Z Szalai, Department of Dermatology, Heim Pál Children's Hospital, Budapest, Hungary
R Király, L Fésüs, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Medical and Health Science Centre, University of Debrecen, Debrecen, Hungary
J B Kovács, Department of Gastroenterology-Nephrology, Heim Pál Children's Hospital, Budapest, Hungary

REFERENCES

- Mäki M, Collin P. Coeliac disease. *Lancet* 1997;**349**:1755–9.
- Schuppan D. Current concepts of celiac disease pathogenesis. *Gastroenterology* 2000;**119**:234–42.
- Holmes GK. Coeliac disease and malignancy. *Dig Liver Dis* 2002;**34**:229–37.
- Bernstein CN, Leslie WD, Leboff MS. AGA technical review on osteoporosis in gastrointestinal diseases. *Gastroenterology* 2003;**124**:795–841.
- Sher KS, Mayberry JF. Female fertility, obstetric and gynaecological history in coeliac disease: a case control study. *Acta Paediatr Suppl* 1996;**412**:76–7.
- Collin P, Vilks S, Heinonen PK, et al. Infertility and coeliac disease. *Gut* 1996;**39**:382–4.
- Kaukinen K, Halme L, Collin P, et al. Celiac disease in patients with severe liver disease: gluten-free diet may reverse hepatic failure. *Gastroenterology* 2002;**122**:881–8.
- Hadjivassiliou M, Gibson A, Davies-Jones GA, et al. Does cryptic gluten sensitivity play a part in neurological illness? *Lancet*, 1996;**347**:369–71.
- Kieslich M, Errazuriz G, Posselt HG, et al. Brain white-matter lesions in celiac disease: a prospective study of 75 diet-treated patients. *Pediatrics* 2001;**108**:E21.
- Frustaci A, Cuoco L, Chimenti C, et al. Celiac disease associated with autoimmune myocarditis. *Circulation* 2002;**105**:2611–18.
- Ventura A, Magazzu G, Greco L. Duration of exposure to gluten and risk for autoimmune disorders in patients with celiac disease. *Gastroenterology* 1999;**117**:297–303.
- Fry L. Dermatitis herpetiformis. *Baillière Clin Gastroenterol* 1995;**9**:371–93.
- Troncone R. Latent coeliac disease in Italy. *Acta Paediatr* 1995;**84**:1252–7.
- Freeman HJ, Chiu BK. Multifocal small bowel lymphoma and latent celiac sprue. *Gastroenterology*, 1986;**90**:1992–7.
- Kaukinen K, Mäki M, Partanen J, et al. Celiac disease without villous atrophy: revision of criteria called for. *Dig Dis Sci* 2001;**46**:879–87.
- Mäki M. The humoral immune system in coeliac disease. *Baillière Clin Gastroenterol* 1995;**9**:231–49.
- Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, et al. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nature Med* 1997;**3**:797–801.
- Korponay-Szabó IR, Sulkanen S, Halttunen T, et al. Tissue transglutaminase is the target in both rodent and primate tissues for celiac disease-specific autoantibodies. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000;**31**:520–7.
- Korponay-Szabó IR, Laurila K, Szondi Z, et al. Missing endomysial and reticulin binding of coeliac antibodies in transglutaminase 2 knockout tissues. *Gut* 2003;**52**:199–204.
- Mawhinney H, Lowe AHG. Anti-reticulin antibody in jejunal juice in coeliac disease. *Clin Exp Immunol* 1975;**21**:394–8.

dc 308 11

- 21 **Marzari R**, Sblattero D, Florian F, *et al*. Molecular dissection of the tissue transglutaminase autoantibody response in celiac disease. *J Immunol* 2001;**166**:4170–6.
- 22 **Esposito C**, Paparo F, Caputo I, *et al*. Anti-tissue transglutaminase antibodies from coeliac patients inhibit transglutaminase activity both in vitro and in situ. *Gut* 2002;**51**:177–81.
- 23 **Halttunen T**, Mäki M. Serum immunoglobulin A from patients with celiac disease inhibits human T84 intestinal crypt epithelial cell differentiation. *Gastroenterology* 1999;**116**:566–72.
- 24 **Shiner M**, Ballard J. Antigen-antibody reactions in jejunal mucosa in childhood celiac disease after gluten challenge. *Lancet* 1972;**1**:1202–5.
- 25 **Lancaster-Smith M**, Packer S, Kumar PJ, *et al*. Immunological phenomena in the jejunum and serum after reintroduction of dietary gluten in children with treated coeliac disease. *J Clin Pathol* 1976;**29**:592–7.
- 26 **Kárpáti S**, Kósnai I, Török E, *et al*. Immunoglobulin A deposition in jejunal mucosa of children with dermatitis herpetiformis. *J Invest Dermatol* 1988;**91**:336–9.
- 27 **Jos J**, Labbe F. Ultrastructural localisation of IgA globulins in normal and coeliac intestinal mucosa using immunoenzymatic methods. *Biomedicine* 1976;**24**:425–34.
- 28 **Radek JT**, Jeong JM, Murthy SN, *et al*. Affinity of human erythrocyte transglutaminase for a 42-kDa gelatin-binding fragment of human plasma fibronectin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;**90**:3152–6.
- 29 **Ambrus A**, Bányai I, Weiss MS, *et al*. Calcium binding of transglutaminases: A ⁴³Ca NMR study combined with surface polarity analysis. *J Biomol Struct Dyn* 2001;**19**:59–74.
- 30 **Sulkanen S**, Halttunen T, Laurila K, *et al*. Tissue transglutaminase autoantibody enzyme-linked immunosorbent assay in detecting celiac disease. *Gastroenterology* 1998;**115**:1322–8.
- 31 **Achyuthan KE**, Goodell RJ, Kennedy JR, *et al*. Immunochemical analyses of human plasma fibronectin-cytosolic transglutaminase interactions. *J Immunol Methods* 1995;**180**:69–79.
- 32 **Lock RJ**, Gilmour JE, Unsworth DJ. Anti-tissue transglutaminase, anti-endomysium and anti-R1-reticulin autoantibodies—the antibody trinity of coeliac disease. *Clin Exp Immunol* 1999;**116**:258–62.
- 33 **Sárdy M**, Kárpáti S, Merkl B, *et al*. Epidermal transglutaminase (TGase 3) is the autoantigen of dermatitis herpetiformis. *J Exp Med* 2002;**195**:747–57.
- 34 **Akimov SS**, Krylov D, Fleischman LF, *et al*. Tissue transglutaminase is an integrin-binding adhesion coreceptor for fibronectin. *J Cell Biol* 2000;**148**:825–38.
- 35 **Griffin M**, Casadio R, Bergamini CM. Transglutaminases: nature's biological glues. *Biochem J* 2002;**368**:377–96.
- 36 **Kainulainen H**, Rantala I, Collin P, *et al*. Blisters in the small intestinal mucosa of coeliac patients contain T cells positive for cyclooxygenase 2. *Gut* 2002;**50**:84–9.
- 37 **Aine L**. Coeliac-type permanent-tooth enamel defects. *Ann Med* 1996;**28**:9–12.
- 38 **Cucchiara S**, Bassotti G, Castellucci G, *et al*. Upper gastrointestinal motor abnormalities in children with active celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1995;**21**:435–42.
- 39 **Granot E**, Miskin H, Aker M. Monoclonal anti-CD52 antibodies: A potential mode of therapy for Parvovirus B19 hepatitis. *Transplant Proc* 2001;**33**:2151–3.

A single conformational transglutaminase 2 epitope contributed by three domains is critical for celiac antibody binding and effects

Zsófia Simon-Vecsei^a, Róbert Király^{a,b}, Péter Bagossi^a, Boglárka Tóth^a, Ingrid Dahlbom^c, Sergio Caja^d, Éva Csősz^a, Katri Lindfors^d, Daniele Sblattero^e, Éva Nemes^f, Markku Mäki^d, László Fésüs^{a,b}, and Ilma R. Korponay-Szabó^{f,g,1}

^aDepartment of Biochemistry and Molecular Biology, Medical and Health Science Center, University of Debrecen, Nagyerdei krt 98, Debrecen H-4032, Hungary; ^bApoptosis and Genomics Research Group of Hungarian Academy of Sciences, Debrecen H-4032, Hungary; ^cDepartment of Women's and Children's Health, University of Uppsala, Uppsala SE-75185, Sweden; ^dPaediatric Research Centre, University of Tampere and Tampere University Hospital, Tampere, FIN-33014, Finland; ^eDepartment of Medical Sciences and Interdisciplinary Research Center of Autoimmune Disease (IRCAD), University of Eastern Piedmont, Novara 28100, Italy; ^fDepartment of Pediatrics, Medical and Health Science Center, University of Debrecen, Debrecen H-4032, Hungary; and ^gCeliac Disease Center, Heim Pál Children's Hospital, Budapest H-1089, Hungary

Edited by Michael Sela, Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel, and approved October 31, 2011 (received for review June 18, 2011)

The multifunctional, protein cross-linking transglutaminase 2 (TG2) is the main autoantigen in celiac disease, an autoimmune disorder with defined etiology. Glutamine-rich gliadin peptides from ingested cereals, after their deamidation by TG2, induce T-lymphocyte activation accompanied by autoantibody production against TG2 in 1–2% of the population. The pathogenic role and exact binding properties of these antibodies to TG2 are still unclear. Here we show that antibodies from different celiac patients target the same conformational TG2 epitope formed by spatially close amino acids of adjacent domains. Glu153 and 154 on the first alpha-helix of the core domain and Arg19 on first alpha-helix of the N-terminal domain determine the celiac epitope that is accessible both in the closed and open conformation of TG2 and dependent on the relative position of these helices. Met659 on the C-terminal domain also can cooperate in antibody binding. This composite epitope is disease-specific, recognized by antibodies derived from celiac tissues and associated with biological effects when passively transferred from celiac mothers into their newborns. These findings suggest that celiac antibodies are produced in a surface-specific way for which certain homology of the central glutamic acid residues of the TG2 epitope with deamidated gliadin peptides could be a structural basis. Monoclonal mouse antibodies with partially overlapping epitope specificity released celiac antibodies from patient tissues and antagonized their harmful effects in cell culture experiments. Such antibodies or similar specific competitors will be useful in further functional studies and in exploring whether interference with celiac antibody actions leads to therapeutic benefits.

conformational epitope | endomysial antibodies | immunotherapy

Transglutaminase 2 (TG2, “tissue” transglutaminase, EC 2.3.2.13) is an ubiquitous cellular protein also present in the extracellular matrix where it catalyzes Ca^{2+} -dependent protein cross-linking via N^{γ} -(γ -glutamyl)lysine bonds or the deamidation of glutamine residues. In addition, TG2 also has pleiotropic intracellular functions as GTP-ase, protein disulphide isomerase, serine/threonine kinase and acts as adaptor on the cell surface for fibronectin, integrins, syndecan 4 and other matrix proteins regulating cell adhesion, differentiation, and survival (1). TG's complex structure and high sensitivity to ligand-induced conformational changes (2) makes challenging to dissect the structural basis for these interactions, and only the fibronectin binding site on the loop with amino acids (aa) 94 and 97 (3) is known in details. Contradictory data exist also on the epitope recognized by TG2-specific antibodies produced in celiac disease (celiac sprue), an autoimmune condition resulting from intolerance to gluten-containing cereals (wheat, rye, barley) that induce after their TG2-mediated deamidation specific T-lymphocyte activation, in-

testinal inflammation, and villous atrophy in genetic susceptible individuals carrying HLA-DQ2 or DQ8 (4).

Celiac antibodies exert biological effects via TG2, partly by gain in catalytic activity, on epithelial cell differentiation (5) and transport (6), angiogenesis (7), vascular permeability (8), monocyte activation (9), cell cycle progression (10), and apoptosis (11) in cell culture experiments, and presumably also in vivo, but direct evidence for the latter has not been yet provided. Animal models remained incomplete (12) and IgA anti-TG2 antibodies similar to those in patients' serum (13) and bound in different tissues in a greatly specific pattern along vessels and TG2-rich endomysium (14) were not produced. A gluten-free diet normalizes the gut lesions and eliminates TG2 antibodies from both serum and tissues. Such a life-long diet is difficult to maintain and therefore exploration of alternative treatment modalities is in progress.

The monomeric human TG2 consists of four structural domains (N-terminal β -sandwich, core, and two C-terminal β -barrels) (1). In the presence of GDP, TG2 shows a closed conformation with the transamidating catalytic triad on the core domain in a hidden position [Protein Data Bank (PDB) ID code 1KV3] (15). When TG2 is functioning as a Ca^{2+} -dependent transglutaminase, C-terminal β -barrels are displaced by 120 Å and the structure becomes open and extended (2) (PDB ID code 2Q3Z), at least transiently. In earlier studies celiac anti-TG2 antibodies bound to multiple (often complementary) fragments of human TG2 (16–18), but to none of linear TG2 peptides expressed in phage display (19). In another study, mutagenesis of the normally buried catalytic triad decreased antibody binding (20). Celiac antibodies do not bind well in Western blot (13) or in paraffin-embedded tissues indicating conformation dependency of antibody recognition. Here we describe a single conformational TG2 epitope important for all investigated celiac patient samples and potential target for immunotherapy. This celiac epitope involves the first alpha-helix of the N-terminal domain, the first alpha-helix of the core domain, and, additionally, the C-terminal domain.

Author contributions: Z.S.-V., P.B., E.C., M.M., L.F., and I.R.K.-S. designed research; Z.S.-V., R.K., B.T., S.C., K.L., E.N., and I.R.K.-S. performed research; I.D. and D.S. contributed new reagents/analytic tools; Z.S.-V., R.K., P.B., B.T., I.D., S.C., E.C., K.L., and I.R.K.-S. analyzed data; and Z.S.-V., L.F., and I.R.K.-S. wrote the paper.

Conflict of interest statement: European patent applications PCT/HU2010/000036 and PCT/IB2010/000742 have been filed based on the results of this work.

This article is a PNAS Direct Submission.

¹To whom correspondence should be addressed. E-mail: loilko@uta.fi.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1107811108/-DCSupplemental.

Results

Binding of Celiac Antibodies is Related to a Calcium Binding Site on the Core Domain of TG2 but does not Require Calcium Ions. We recently identified two adjacent Ca^{2+} binding sites on the core domain of TG2, S4 (aa 151–158) and S5 (aa 433–438), of which S4 strongly determines antigenicity for celiac antibodies (21). As these results were generated with multiple mutations of acidic glutamate and aspartate residues in these regions, we wished to precisely identify the anchor residues that form a celiac epitope. We prepared now TG2 molecules bearing D151N, E153Q, E154Q, E155Q, E158Q, E158L, and R433S-E435S mutations separately. From these, only changes at residue 158 abolished the binding of celiac antibodies (Fig. 1), but 158 is not surface-exposed and its mutations were found to have only indirect effect on the position of the helix formed by the S4 site amino acids. Lack of binding to TG2 denatured with urea (Fig. S14) indeed confirmed that celiac autoantibodies do not bind to a linear epitope. A mutation on the surface in Glu153 had significant ($p < 0.0001$) but only moderate effect, so Glu153 could be one potential anchor point for the binding of celiac antibodies, which, however, might need cooperation with other surface structures to form an epitope. Ca^{2+} ions themselves did not contribute to the formation of the celiac epitope as shown in *SI Text* and Fig. S1B.

Analysis of Further Binding Sites Outside the Core Domain. We next used TG2 mutants each lacking one structural domain of TG2 (22) to locate celiac antibody binding sites further to S4. Previous studies (2, 3) indicate that the N-terminal domain (I) expressed alone, and also domains III and IV, will adopt a functional conformation independently of the core (II) domain. When the domain mutants were applied in equimolar concentrations in immunoassays, both domain I and II turned out to be important for autoantibody binding (Fig. 1), and antibody recognition was also influenced by the loss of domain IV (aa 585–687) but not at all by the absence of domain III (aa 472–584). These results suggested, in accordance with previous data (16–18), that parts of celiac epitopes are found both on the N-terminal and C-terminal domains. Importantly, patient antibodies, however, did not bind to the mutant containing only domains I–III–IV but not domain II, so in the absence of the anchor points on the core domain the other celiac epitope parts were not capable to form a functional binding site.

Three Anchor Points Determine a Composite Epitope Formed by Three Distinct Domains and Two of These are Sufficient for Binding of Celiac Antibodies. Molecular modeling was used to evaluate whether cooperation of core domain Glu153 with other amino acids on the

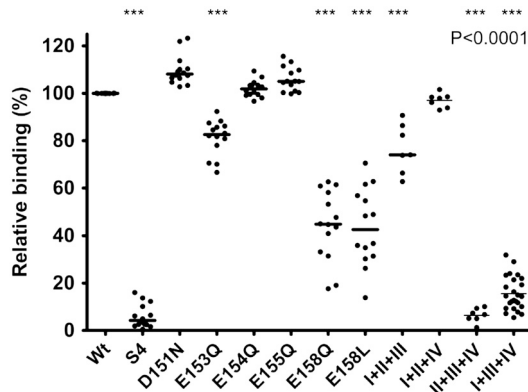


Fig. 1. Binding of celiac IgA serum antibodies ($n = 7$ –28) in ELISA to wild-type (WT) and mutant TG2s. Dash indicates median. ***, $p < 0.001$, compared to WT. S4 contains the combined mutations D151N-E153Q-E154Q-E155Q-E158Q (ref. 21). Roman numerals indicate presence of domains (I–IV).

N-terminal and/or C-terminal domains might form functional epitopes. In the resting (closed) conformation of TG2 shown by X-ray crystallography (1KV3) (15), the N- and C-terminal parts of the molecule are close to each other and to the surface of the core domain. Core domain Glu153 is in the closest proximity to N-terminal domain Arg19 (12.9 Å) and C-terminal domain Met659 (16.8 Å), and moreover, Arg19 is also close to Met659 (7.7 Å) forming possibly a common conformational epitope (Fig. 2). Mutants with changes of these amino acids to serine were successfully expressed (Fig. S24). Each single mutation (R, R19S; E, E153S; M, M659S) resulted in significant decrease in celiac antibody binding (26.5%, 28.8% and 56.9% remaining binding for R, E and M, respectively; Fig. 3A) and combined mutations caused proportionally greater changes (6.6%, 21.7%, 14.6% and 13.4% remaining binding for RE, EM, RM, and REM, respectively). The bindings of autoantibodies from consecutively diagnosed 58 childhood (Fig. 3A) and 18 adult celiac patients (Fig. 3B) as well as of all eight tested single chain monoclonal antibody clones (ScFv) (23) originating from celiac patients (Fig. S34) were abolished when mutants RE and REM were applied as antigens. Despite of the decreased binding of celiac antibodies, these mutant TG2 proteins bound normally a large set (22) of mouse monoclonal anti-TG2 antibodies, showed appropriately folded structures in CD spectra and functionality in fibronectin binding, transglutaminase and GTPase assays (Fig. S2 B–D).

Further experiments with Factor XIII homologous mutants targeting Glu154 (*SI Text* and Fig. S3 B and C) supported that celiac antibodies directly bind to the TG2 surface delineated by Arg19-Glu153-Met659. Anchor points homologous to Arg19, Glu153, and Glu154 were found by library search in those animal TG2 sequences and in human TG6 that are good celiac antigens (Table S1), whereas blood coagulation Factor XIII, a related transglutaminase not antigenic in celiac disease (24), contains a positively charged Lys199 at position corresponding to Glu154.

To establish the relative importance of Arg19 and Met659 in celiac antibody binding, we studied fibronectin-bound TG2 (25) as a model of accessibility of TG2 epitopes in the extracellular matrix where antibodies primarily encounter the autoantigen in patients. Under these conditions, the mutations of Arg19 and Glu153 had similar effects as seen above (Fig. S3D), but mutation of Met659 alone did not alter celiac antibody binding and so celiac antibodies may bind to TG2 also in its catalytically active

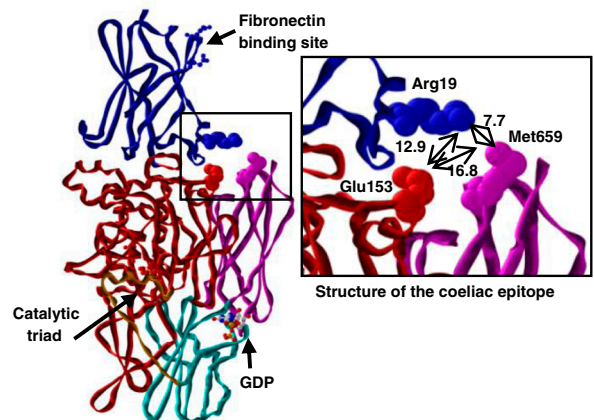


Fig. 2. Three-dimensional view of TG2 in the closed conformation with the N-terminal β -sandwich shown in blue, catalytic (core) domain in red, β -barrel 1 in cyan and β -barrel 2 in pink. The bound GDP, fibronectin binding site (Asp94, Asp97) and catalytic triad (Cys277, His335, Asp358) are represented as ball-and-stick side chains. The amino acids of the putative celiac epitope with their lowest distances in angstroms (Å) are illustrated as surface representation (frame).

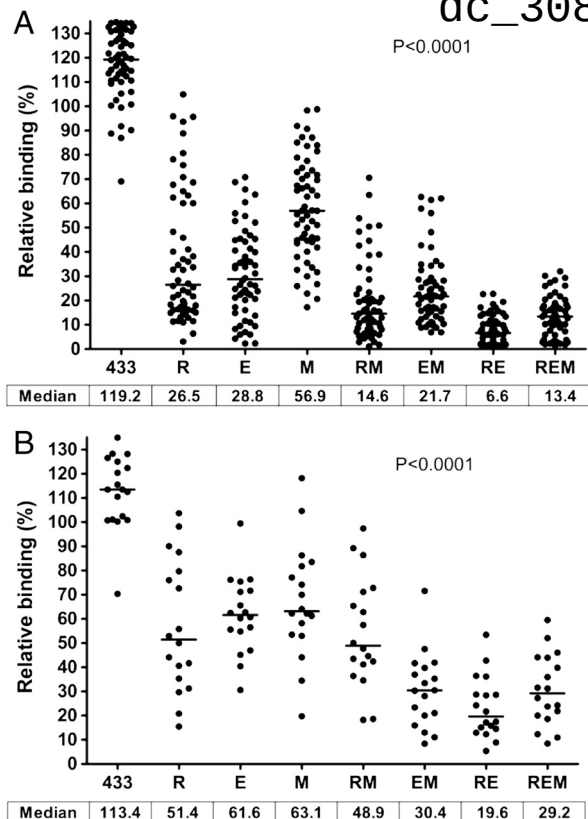


Fig. 3. Binding of serum IgA from 58 celiac children (A) and from 18 celiac adults (B) to TG2 mutants in ELISA. Bound antibody concentrations were calculated from a calibrator curve (Fig. S2E) constructed from the concentration-dependent binding of mouse monoclonal anti-TG2 antibody TG100. Binding to wild-type (WT) is 100%. All samples were examined in duplicates. Dash indicates median. $p < 0.0001$ represents significant differences between groups by ANOVA test. 433 = R433S-E435S (irrelevant control mutant), R = R19S, E = E153S, M = M659S, RM = R19S-M659S, RE = R19S-E153S, EM = E153S-M659S, REM = R19S-E153S-M659S.

form when TG2 adopts an open-extended conformation where domain IV with Met659 swings out (2). Measurements on the position of Arg19 and Glu153 in this open-form crystal structure (2Q3Z) did not show a difference in distance as compared to the closed conformation (1KV3) (Fig. S3E).

Antibodies of Different Celiac Patients Recognize Parts of the Same Epitope. Although all celiac patient serum samples displayed a severely reduced binding to REM triple and RE double mutants, their reaction showed some variability with the point mutant where only the N-terminal anchor point (Arg19) had been changed (Fig. 3). Celiac patient-derived monoclonal ScFvs expressed from phage libraries (23) belonged to two groups as well, one reacting with R19S and one not (Fig. S4A). However, ScFvs belonging to either group showed greatly reduced binding to Glu153 (E153S) or Glu154 (E154K) mutants and competed with each other for the binding to wild-type TG2 (SI Text and Fig. S4B). IgA and IgG antibodies differently recognizing R19S were purified from sera of celiac patients (25), and these competed as well with each other but not with nonceliac human IgG (Fig. S4C). Further, we were able to develop a diagnostic ELISA with 98% sensitivity and 96% specificity for measuring IgG class celiac antibodies in subjects with selective humoral IgA deficiency by their concentration-dependent displacement effect ($r = 0.88$) on a known celiac IgA tracer antibody (Fig. S4D and E).

Disease Specificity of the Composite TG2 Epitope. During the development of celiac disease, both early cases during the latent stage when villous atrophy was not yet present and at diagnosing villous atrophy showed low reactivity to Glu153 and Arg19 mutants without statistical difference (Fig. 4). Interestingly, no or only limited epitope spreading occurred during a follow-up for up to 17 y without proper diet or upon later diagnostic gluten challenge (Fig. S5). The serum samples from patients with other autoimmune diseases (systemic lupus erythematosus, Sjögren syndrome, rheumatoid arthritis; see SI Text for details) containing nonceliac anti-TG2 antibodies but negative for antiendomysial or antideamidated gliadin antibodies showed a clearly different binding pattern to the celiac epitope (Fig. 4). Monoclonal TG2-specific mouse antibodies (mAb) 885 (Phadia) that had previously been found to target Glu153 (SI Methods) selectively interfered with the binding of celiac antibodies to wild-type TG2, but they did not compete with the binding of nonceliac TG2 antibodies (Fig. 5). These data collectively suggest that celiac disease results in a particular and directed immune response toward TG2.

The Composite TG2 Epitope Mediates in Vivo Tissue Binding of Celiac Antibodies and their Biological Effects. To explore whether the identified composite epitope is also important under in vivo conditions, we performed binding studies with antibodies isolated from celiac tissues (Fig. 6). An extraintestinal tissue was chosen for this experiment to avoid contamination with nonspecific IgA present in gut plasma cells. Placenta specimens were available from two celiac mothers and both contained high amounts of TG2-bound maternal IgA antibodies in the wall of decidual blood vessels and on the surface of the chorionic villous structures (Fig. S6). This IgA was eluted with chloroacetic acid (14) and showed epitope targeting pattern identical to the typical one observed with celiac serum samples, as described above (Fig. 6A). Further, frozen placenta sections were subjected to competition studies with mAb 885 and control mAbs. After incubation with excess amounts of mAb 885 but not with buffer only or with isotype control mouse antibodies (Dako), in vivo tissue-bound anti-TG2 IgA antibodies completely disappeared from the tissue as shown by immunostainings and were released into the buffer (Fig. 6B). After incubation of celiac tissues with CUB7402 anti-TG2 mAb targeting a different TG2 epitope, celiac IgA remained unchanged and did not appear in the buffer (Fig. 6B).

Because there is an altered vasculature in the celiac small bowel mucosa and celiac antibodies deposit around vessels, a defective angiogenesis was suggested to contribute to the architectural changes eventually leading to mucosal flattening (7). Therefore, we investigated the differentiation of commercial human umbili-

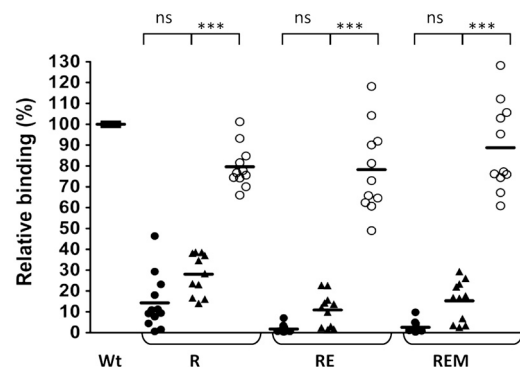


Fig. 4. Binding to mutant TG2 proteins of serum IgA antibodies from patients with early stage celiac disease (●) without villous atrophy, manifest celiac disease (▲) with small bowel villous atrophy ($n = 11$) and from patients with other autoimmune diseases ($n = 11$) (○), measured by ELISA. The binding to wild-type (WT) was set to 100%. Dash indicates median; ***, $p < 0.001$; ns, not significant. R = R19S, RE = R19S-E153S, REM = R19S-E153S-M659S.

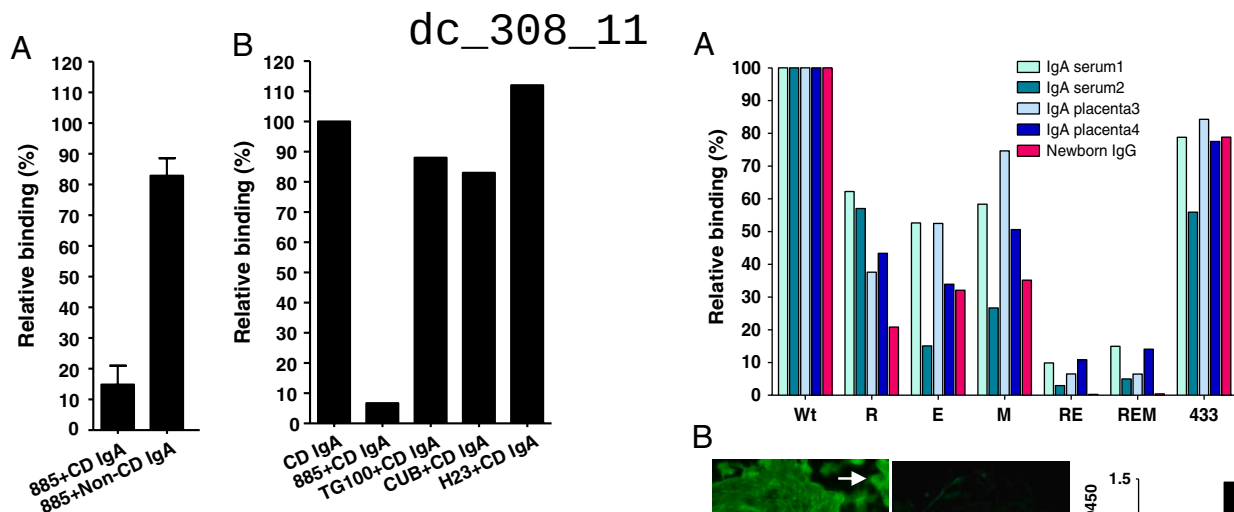


Fig. 5. Competition effect of mAb 885 on the recognition of wild-type TG2 in ELISA by antibodies from celiac disease patients ($n = 6$) and from nonceliac autoimmune patients with anti-TG2 antibodies ($n = 6$). (A) Remaining IgA binding in the presence of 18 $\mu\text{g}/\text{well}$ mAb 885 if the binding without mAb 885 was 100%. Values represent means $\pm$ standard errors. (B) Comparison of the displacing effect of anti-TG2 mAbs 885, CUB7402, TG100, or H23 (18 $\mu\text{g}/\text{well}$) using one of the celiac serum samples. Representative values from three independently performed experiments.

cal cord vein endothelial cells (HUVEC) in matrigel as a standard angiogenesis assay (26). In this assay, purified IgA from autoimmune patients with nonceliac TG2 antibodies caused only slight nonspecific decrease in endothelial tubule formation similarly to control IgA from antibody-negative healthy persons, but celiac IgA significantly decreased tubule length (Fig. 6C) and formation (Fig. S7C) and this effect was prevented in the presence of mAb 885. Similar effect was observed on cell lengths when mAb 885 was coadministered with purified monospecific celiac ScFvs to HUVEC cells grown on collagen I (Fig. S7D).

Maternal Celiac Antibodies Transferred into Newborns Have Biologic Effects. In parallel of antibody deposition in the placenta (Fig. 6B), maternal IgG anti-TG2 antibodies were detected also in the umbilical cords and sera of the newborns, and on the surface of HUVECs isolated from the umbilical cord (Fig. 6D). These antibodies had the same epitope specificity as antibodies of their mothers (Fig. 6A), but as expected, IgA autoantibodies did not cross the placenta. HUVEC cells exposed to maternal antibodies before birth displayed abnormalities in their shape and spreading, and lived for shorter time in culture compared to cells isolated from babies with antibody-negative celiac mothers (Fig. 6D and Fig. S6). These cellular changes were similar to those we observed earlier when celiac IgA was added to normal HUVEC cultures (7).

Discussion

The results presented here show a particular uniformity of gluten-driven autoantibody production in celiac disease toward one main conformational celiac TG2 epitope, characteristic for both serum antibodies and tissue-derived monoclonal antibodies. In contrast, TG2 antibodies from subjects with other autoimmune diseases prefer other binding sites. These findings make possible to design interfering compounds for further research and with potential to explore therapeutic use.

The main anchors points of this celiac epitope are Glu153 and Glu154 on the edge of the first alpha helix of the core domain of TG2, but they also need one more anchor point either on the N-terminal or C-terminal domains. The N-terminal anchor point is formed by the first helix containing Arg19. Arginins often form part of epitopes, and cooperation of Glu153 with Arg19 is

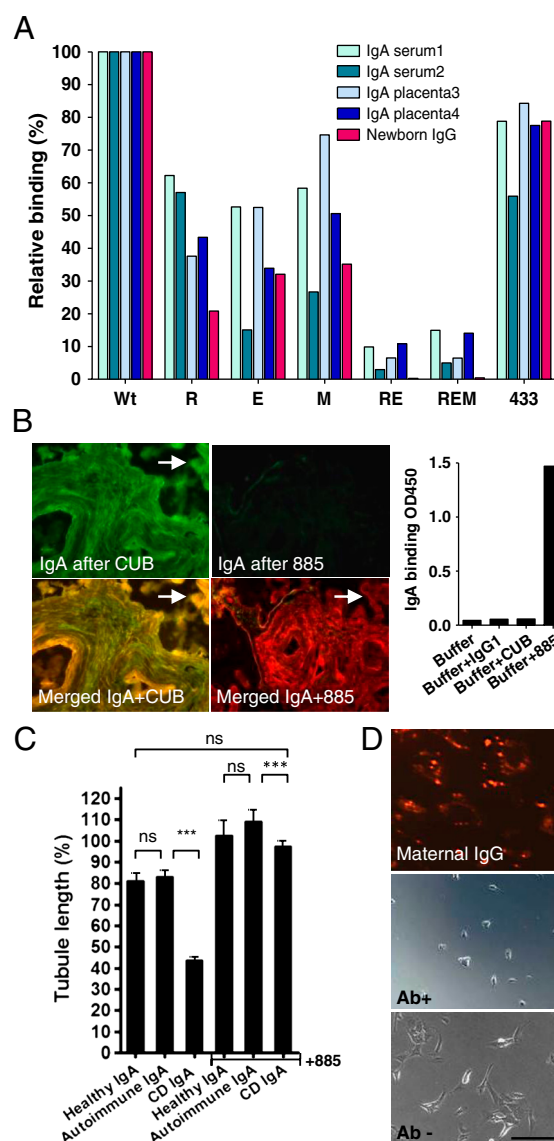


Fig. 6. Tissue-binding and biological effects of celiac antibodies mediated by the celiac TG2 epitope. (A) Epitope specificity of serum IgA (1, 2), of IgA eluted from celiac tissues (IgA placenta 3, 4) and of passively transferred maternal IgG from newborn serum measured using mutant TG2 proteins in ELISA. R = R19S, E = E153S, M = M659S, RE = R19S-E153S, REM = R19S-E153S-M659S, 433 = R433S-E435S. (B) Celiac IgA (green) in vivo deposited in the placenta and on the surface of chorionic villi (arrows) merge to yellow after incubation of the tissue sections with CUB7402 anti-TG2 mAb and double-stained by anti-mouse antibodies (red). After incubation with mAb 885 the IgA signal is no longer visible and anti-TG2 IgA is detected in the buffer by ELISA. No IgA was released by incubation with isotype control mAb (IgG1) or CUB. (C) IgA from celiac (CD) patients ($n = 5$), autoimmune patients with nonceliac TG2 antibodies ($n = 6$) and biopsied antibody-negative controls ($n = 3$) were administered alone or together with mAb 885 to normal HUVECs in matrigel and vessel formation was measured. Median lengths of endothelial tubules $\pm$ SD are shown compared to wells without antibodies set to 100%. The term ns represents not significant; ***, $p < 0.001$. (D) Morphology of HUVECs in culture from a newborn with prenatally bound maternal celiac IgG (red) on their surface (Top and Middle) compared to HUVECs prepared from newborn with celiac mother on diet and negative for antibodies (Bottom). Bars = 50 μm .

predicted to be an energetically favorable binding site resulting in a large change in solvent-accessible surface area after antibody binding (27). The position of these two anchor points does not change during the opening of the enzyme upon its activation, so this epitope is accessible in tissues independently of the

Ca²⁺-driven conformational shift, especially when TG2 is bound to fibronectin (Movies S1 and S2). Celiac antibodies bind well to both the Ca²⁺-bound and Ca²⁺-free TG2 (Fig. S1B) and to open-form TG2 (8) and TG2 transamidates substrates even in the presence of bound celiac antibodies (28). These observations strongly contradict the earlier suggestion (20) that the catalytic triad, situated buried and exposed on the surface just when Ca²⁺ and substrates are available, would compose the celiac epitope.

As an alternative to Arg19 from the N-terminal domain, Glu153 also may cooperate with Met659 on the C-terminal domain, explaining earlier epitope mapping results with some C-terminal TG2 fragments (16, 17). Accordingly, Arg19 was not indispensable for the binding of serum antibodies of all our celiac patients, nor for certain patient-derived phage antibodies provided the C-terminal domains were present. The competition between different ScFv-groups or natural IgA and IgG patient antibodies recognizing Arg19 differently and effective displacement of diverse patient antibodies by mAb 885 targeting only Glu153 demonstrates that Glu153, Arg19 and Met659 constitute one composite epitope when the protein is in the closed conformation. Binding of celiac antibodies to a surface area close to the interface of adjacent domains may be the structural basis for certain conformation stabilizing effect responsible for the earlier observed gain in catalytic activity in the presence of celiac antibodies (8, 25). The variable involvement of N-terminal and C-terminal domains explains why earlier studies typically found a sufficient binding if either the N-terminal or C-terminal TG2 parts were missing, but not if both were missing or if the core domain had been disrupted (16–18). We applied a special precaution to avoid the disruption of hydrogen bonds or the distortion of the conformation, and the folded structure of our key mutants were confirmed by CD spectra. The results with our domain deletion mutant I-III-IV indeed confirm the essential role of the core domain, whereas individual variations in the extent of the actually targeted surface could explain some heterogeneity in binding to fragments with parts of the 3-dimensional epitope on several of them.

The present identification of a celiac disease-specific epitope, already characteristic in the early (latent) stage, has also diagnostic importance. A test that combines measurement of antibody binding to wild-type TG2 and to one with modified celiac epitope could distinguish in future between celiac-type and nonspecific anti-TG2 antibodies seen in other autoimmune diseases, tumors, or tissue injury (29).

Our findings also show that gluten-derived gliadin peptides drive the celiac autoimmune response in an ordered and surface-specific way and epitope spreading is not common despite long-term disease. The primary antibody response in infants targets deamidated gliadin peptides (30) in which certain glutamines have been changed to glutamic acids. Some of these antibodies cross-reacted also with TG2 in an earlier study and TG2-specific mAbs recognized a complex of three-dimensionally shaped deamidated gliadin peptides indicating molecular mimicry (22). Interestingly, the distance and spatial arrangement of the side-chains of Glu153 and Glu154 central in the here described TG2 epitope are similar to the side-chains of Gln and Glu residues of the most typical immunogenic gliadin peptide (PQPELPY) docked into HLA-DQ2 (Fig. S8 and SI Text). Further studies may confirm experimentally the pathologic relevance of this observation.

In the complex immunopathology of celiac disease where activated gliadin-specific T lymphocytes are held responsible for tissue damage (4), the role of anti-TG2 antibodies is still undefined and often debated. Some other autoantibodies are clearly pathogenic; e.g., in rheumatoid arthritis (31), pemphigus vulgaris (32), or myasthenia gravis (33). Celiac anti-TG2 antibodies have a number of adverse biological effects in cell culture and their tissue-binding to vessels was coincident in clinical studies with

development of intestinal villous atrophy, liver, muscle and kidney damage, lymphadenopathy, and brain atrophy (5–11, 14). Passively transferred maternal antibodies targeting the celiac epitope affected the behavior of endothelial cells prepared from the umbilical cords (Fig. 6D and Fig. S6B) and some of the neonates also showed symptoms and low birth weight (SI Text). Further, the antibodies deposited on the surface of chorionic villi may alter TG2 activity (34), impair nutrient import and may be responsible for the altered pregnancy outcome (35) in celiac disease. TG2 also has nonenzymatic functions in cell adhesion, spreading and survival (1, 3) where autoantibody effects also can be directly mediated via the celiac epitope.

Celiac sprue is considered as a life-long disease and unless it is treated increased morbidity and mortality prevails (4). Because steady compliance with the gluten-free diet is difficult and often unsuccessful, other attractive alternatives have been proposed (e.g., oral protease supplementation for the gastrointestinal degradation of proline-rich gliadin peptides or inhibition of intestinal TG2 activity to prevent deamidation and binding of gluten peptides to HLA-DQ2 or HLA-DQ8 molecules) though proper TG2 inhibitors for such a purpose have not been found yet. Here we showed that tissue-deposited celiac autoantibodies, which could be associated with the multiorgan manifestation of the disease (14), can be displaced by a monoclonal antibody recognizing part of the main celiac epitope characterized in this study. Furthermore, this displacing antibody did not alter the enzymatic activity of TG2 (Fig. S7) nor had the typical pathologic effects elicited by celiac antibodies in cell culture experiments and could even antagonize the latter. These findings raise the possibility that the adverse pathologic effect of celiac autoantibodies in patients can be reversed and prevented by either humanized monoclonal antibodies similar to mAb 885 or competitor compounds specifically designed to inhibit binding of autoantibodies to the celiac epitope of TG2, though such a therapeutic benefit may be diminished by pathologic consequences of an ongoing gluten-specific T-cell activation.

In conclusion, the present identification of a disease-specific conformational epitope on the main autoantigen and its involvement in disease manifestations support the role of autoantibody response in disease pathomechanism. These findings may help design further studies to establish whether interference with the effects of celiac antibodies would have therapeutic potential.

Materials and Methods

Patients. Serum samples from altogether 216 untreated and 22 treated celiac disease patients (aged 0.9–78 y) having Marsh grade III villous atrophy at diagnosis were used. Eleven subjects initially had preserved small bowel villous architecture but subsequently developed celiac-type villous atrophy (early stage or latent celiac disease). Included nonceliac controls had normal small bowel villous architecture.

Molecular modeling. Crystal structures of human TG2 [PDB ID code 1KV3 (15)] and TG3 [PDB ID code 1VJJ (36)] were used for modeling the full-length TG2 as described in details in SI Methods.

Antigens, Protein Expression, and Purification. N-terminally His-tagged TG2 in pET-30 Ek/LIC Vector and domain deletion mutant TG2s were generated and purified as described (22). The other TG2 mutations were generated according to the QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) and confirmed by DNA sequencing using the ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer.

Anti-TG2 ELISA and Competition Studies. The ELISA measurements were performed in duplicates as described previously (13) on Maxisorp (Nunc) microtiter plates coated with 0.6 µg TG2 or equimolar amounts of mutants in tris-buffered saline containing 5 mM CaCl₂ (pH 7.4). Further steps and competition experiments are described in details in SI Methods. Standard curves were prepared using dilutions of TG100 monoclonal anti-TG2 antibody (NeoMarkers) for each mutant and the binding of other antibodies was calculated by four-parameter fit if binding to wild-type TG2 was 100%.

Immunofluorescent Studies. Unfixed frozen sections were incubated with FITC-conjugated anti-human IgA or IgG (DAKO) in combination with double labelling for TG2 by anti-TG2 mAbs as described (14). For detecting competition, TG2-specific mAbs were added to the tissue for 30 min in PBS, and the incubation solutions were recollected and tested for patient IgA by ELISA after a purification step removing mAbs by protein-G conjugated magnetic beads (Dyna beads).

HUVEC Preparation and Cell Culture Experiments. HUVECs were prepared and cultured using standard techniques (37). In some experiments the cord vein was filled with DyLight 594-conjugated anti-human IgG (Jackson) before cell isolation and cells were double-stained after 24 h in culture with TG100 anti-TG2 mAb and FITC anti-mouse antibodies. For the analysis of antibody effects, HUVECs were cultured in matrigel for 24 h (*SI Methods*).

Statistical Analysis. ELISA results were analyzed using GraphPad Prism Software and STATISTICA. For comparison of antibody binding to mutant TG2, data were analyzed using repeated measures ANOVA followed with Dunnett's Multiple post test, one way ANOVA followed by Tukey's post test, or Kruskal–Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test as appropriate. A *p* value <0.05 was considered significant.

ACKNOWLEDGMENTS. We thank the Research Unit of Phadia, Uppsala, Sweden for providing 885; Laszlo Lorand (Northwestern University Medical School, Chicago) for G92 and H23 monoclonal anti-TG2 antibodies; and Gregory J. Tsay (Chung Shan Medical University, Taichung, Taiwan) for patient sera. Support was provided by Grants OTKA 61868, 67877; TET IT-04/2007; TAMOP 4.2.1/B-09/1/KONV-2010-0007; cofinanced by the European Union and the European Social Fund, EU MRTN-CT 2006-035624; PIAP-GA-2010-251506; from Academy of Finland Research Council for Health and Competitive Research Funding of the Pirkanmaa Hospital District.

1. Iismaa SE, Mearns BM, Lorand L, Graham RM (2009) Transglutaminases and disease: lessons from genetically engineered mouse models and inherited disorders. *Physiol Rev* 89:991–1023.
2. Pinkas DM, Strop P, Brunger AT, Khosla C (2007) Transglutaminase 2 undergoes a large conformational change upon activation. *PLoS Biol* 5:e327.
3. Hang J, Zemskov EA, Lorand L, Belkin AM (2005) Identification of a novel recognition sequence for fibronectin within the NH2-terminal-sandwich domain of tissue transglutaminase. *J Biol Chem* 280:23675–23683.
4. Jabri B, Sollid LM (2006) Mechanisms of disease: immunopathogenesis of celiac disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 3:516–525.
5. Halttunen T, Mäki M (1999) Serum immunoglobulin A from patients with celiac disease inhibits human T84 intestinal crypt epithelial cell differentiation. *Gastroenterology* 116:566–572.
6. Rauhavirta T, et al. (2011) Epithelial transport and deamidation of gliadin peptides: a role for coeliac disease patient immunoglobulin A. *Clin Exp Immunol* 164:127–36.
7. Myrsky E, et al. (2008) Coeliac disease-specific autoantibodies targeted against transglutaminase 2 disturb angiogenesis. *Clin Exp Immunol* 152:111–119.
8. Myrsky E, et al. (2009) Coeliac disease IgA modulates vascular permeability in vitro through the activity of transglutaminase 2 and RhoA. *Cell Mol Life Sci* 66:3375–3385.
9. Zanon G, et al. (2006) In celiac disease, a subset of autoantibodies against transglutaminase binds toll-like receptor 4 and induces activation of monocytes. *PLoS Med* 3:e358.
10. Barone MV, et al. (2007) Humoral immune response to tissue transglutaminase is related to epithelial cell proliferation in celiac disease. *Gastroenterology* 132:1245–1253.
11. Cervio E, et al. (2007) Sera of patients with celiac disease and neurologic disorders evoke a mitochondrial-dependent apoptosis in vitro. *Gastroenterology* 133:195–206.
12. Bethune MT, et al. (2008) A non-human primate model for gluten sensitivity. *PLoS One* 3:e1614.
13. Sulkanen S, et al. (1998) Tissue transglutaminase autoantibody enzyme-linked immunosorbent assay in detecting celiac disease. *Gastroenterology* 115:1322–1328.
14. Korponay-Szabó IR, et al. (2004) In vivo targeting of intestinal and extraintestinal transglutaminase 2 by coeliac autoantibodies. *Gut* 53:641–648.
15. Liu S, Cerione RA, Clardy J (2002) Structural basis for the guanine nucleotide-binding activity of tissue transglutaminase and its regulation of transamidation activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:2743–2747.
16. Seissler J, et al. (2001) Autoantibodies from patients with coeliac disease recognise distinct functional domains of the autoantigen tissue transglutaminase. *Clin Exp Immunol* 125:216–21.
17. Sblattero D, et al. (2002) The analysis of the fine specificity of celiac disease antibodies using tissue transglutaminase fragments. *Eur J Biochem* 269:5175–5181.
18. Nakachi K, et al. (2004) Epitopes recognised by tissue transglutaminase antibodies in coeliac disease. *J Autoimmun* 22:53–63.
19. Di Niro R, et al. (2005) Characterizing monoclonal antibody epitopes by filtered gene fragment phage display. *Biochem J* 388:889–894.
20. Byrne G, et al. (2006) Mutagenesis of the catalytic triad of tissue transglutaminase abrogates coeliac disease serum IgA autoantibody binding. *Gut* 56:336–341.
21. Király R, et al. (2009) Functional significance of five non-canonical Ca²⁺-binding sites of human transglutaminase 2 characterized by site directed mutagenesis. *FEBS J* 276:7083–7096.
22. Korponay-Szabó IR, et al. (2008) Deamidated gliadin peptides form epitopes that transglutaminase antibodies recognize. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 46:253–261.
23. Marzari R, et al. (2001) Molecular dissection of the tissue transglutaminase autoantibody response in celiac disease. *J Immunol* 166:4170–4176.
24. Sjöber K, et al. (2002) Factor XIII and tissue transglutaminase antibodies in coeliac and inflammatory bowel disease. *Autoimmunity* 35:357–364.
25. Király R, et al. (2006) Coeliac autoantibodies can enhance transamidating and inhibit GTPase activity of tissue transglutaminase: Dependence on reaction environment and enzyme fitness. *J Autoimmun* 26:278–287.
26. Ponce ML (2009) Tube formation: An in vitro matrigel angiogenesis assay. *Methods Mol Biol* 467:183–8.
27. Rajamani D, Thiel S, Vajda S, Camacho CJ (2004) Anchor residues in protein–protein interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:11287–11292.
28. Dieterich W, et al. (2003) Autoantibodies of patients with coeliac disease are insufficient to block tissue transglutaminase activity. *Gut* 52:1562–1566.
29. Sárdy M, et al. (2007) Tissue transglutaminase ELISA positivity in autoimmune disease independent of gluten-sensitive disease. *Clin Chim Acta* 376:126–135.
30. Liu E, et al. (2007) Natural history of antibodies to deamidated gliadin peptides and transglutaminase in early childhood celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 45:293–300.
31. Kuhn KA, et al. (2006) Antibodies against citrullinated proteins enhance tissue injury in experimental autoimmune arthritis. *J Clin Invest* 116:961–973.
32. Ding X, et al. (1999) The anti-desmoglein 1 autoantibodies in pemphigus vulgaris sera are pathogenic. *J Invest Dermatol* 112:739–743.
33. Lennon VA, Lambert EH (1981) Monoclonal autoantibodies to acetylcholine receptors: Evidence for a dominant idotype and requirement of complement for pathogenicity. *Ann NY Acad Sci* 377:77–96.
34. Anjum N, Baker PN, Robinson NJ, Aplin JD (2009) Maternal celiac disease autoantibodies bind directly to syncytiotrophoblast and inhibit placental tissue transglutaminase activity. *Reprod Biol Endocrinol* 7:16.
35. Khashan AS, et al. (2010) The impact of maternal celiac disease on birthweight and preterm birth: A Danish population-based cohort study. *Hum Reprod* 25:528–534.
36. Ahvazi B, et al. (2002) Three-dimensional structure of the human transglutaminase 3 enzyme: Binding of calcium ions changes structure for activation. *EMBO J* 21:2055–2067.
37. Palatka K, et al. (2006) Effect of IBD sera on expression of inducible and endothelial nitric oxide synthase in human umbilical vein endothelial cells. *World J Gastroenterol* 12:1730–1738.

Supporting Information

Simon-Vecsei et al. 10.1073/pnas.1107811108

SI Text

SI Results. Ca^{2+} ions do not form part of the celiac TG2 epitope. Because previous studies (1) suggested that celiac antibodies recognize TG2 preferentially in the presence of Ca^{2+} and single point mutations or surface-localized mutations in the S4 Ca^{2+} binding region only decreased but not abolished the binding, we explored whether calcium ions themselves contribute to formation of the celiac epitope. For this purpose, we utilized TG2 preparations as antigen after exhaustive dialysis in ethylene-diamine-tetraacetate (EDTA). This procedure, however, is not capable to remove all bound Ca^{2+} as shown by earlier studies (2), only if the strong Ca^{2+} binding site of TG2 (Site 1) is mutated (2). This Site 1 mutant where Site 4 and Site 5 amino acids were intact, bound celiac antibodies equally well both in the presence and absence of Ca^{2+} (Fig. S1B), thus excluding the structural role of Ca^{2+} ions in the potential epitope(s).

Evaluation of blood coagulation Factor XIII homologous mutants targeting Glu154. The rationale to use the Factor XIII homologues was to prove that the core domain surface around Glu153 is directly involved in the antibody binding, because in highly conformation-sensitive proteins such as TG2, there is also a possibility that the REM mutation would have indirectly decreased antibody binding by distorting a distant surface important for antibody binding. To exclude this possibility, we checked for the correct folding and functional integrity of our mutants (Fig S2) and explored the mutation of an other free side-chain not involved in hydrogen bonds and located in the center of the epitope. We chose a change that occurs in nature in Factor XIII because the crystal structure of this protein is available and it shows that such a change is tolerated without conformational changes of the surface [Protein Data Bank (PDB) ID code 1GGU]. In our initial studies (Fig. 1) we have shown that changing Glu154 to Gln154 does not decrease celiac antibody binding, so does not change protein conformation. Now we changed Glu154 to lysine (E154K), which introduced into this originally negatively charged surface a positively charged side-chain, very similar to that seen in Factor XIII not antigenic for celiac antibodies (Fig. S3B and Table S1). Indeed, this change alone had similar effects as the point mutation of Glu153 to serine, and when it was combined with the mutations of Arg19 and Met 659 (RKM mutant), it had similar effect as the REM mutation (remaining binding 22.0%; Fig. S3C).

Competition of celiac patient-derived monoclonal antibodies. Monoclonal antibodies were prepared from small intestinal biopsy samples of celiac patients using phage display (3) and produced as phage-linked or soluble single chain variable fragments (scFv). Epitope mapping of these scFvs (Fig. S4A) showed two distinct groups that differed in the recognition of the R mutant (R19S). For the evaluation of competition between these groups, the binding a phage-linked ScFv recognizable by its M13 phage tag was measured when increasing amounts of soluble ScFvs representing the above groups were added. Soluble ScFvs reacting with R19S (clone 4.1) inhibited the binding of phage-linked ScFv of the same group by 78%, but soluble ScFv not reacting with R19S (clone 3.7) also competed effectively with the binding of the phage antibody reacting with R19S causing 40% inhibition (Fig. S4B). Using a phage-linked ScFv not reacting with R19S, 40% inhibition could be obtained with both groups of soluble ScFvs.

Clinical features in newborns who received maternal celiac antibodies during pregnancy. During a prospective study consecutively born newborns of 25 mothers with confirmed celiac disease were evaluated. Three of these mothers had active disease with circulating TG2 antibodies that showed typical epitope specificity; one of them was IgA deficient with high serum levels of IgG class antibodies. IgG (but not IgA) class anti-TG2 antibodies appeared in all three infants' serum and deposited in the umbilical cord. Two of these three babies were small for gestational age (<2,500 g), and the infant with the IgA deficient mother had elevated liver transaminases and low blood sugar levels for which no other clinical cause was identified. He also developed chronic diarrhea for 8 wk, and recovered in parallel of disappearance of anti-TG2 antibodies from the circulation. Jejunal biopsy was not possible by ethical reasons. Pregnancy and the perinatal period were uneventful in the newborns of the 22 antibody-negative celiac mothers with a mean birthweight of 3,330 g (± 407 g SD) whereas birth weight of normal infants ($n = 650$) in the same institution during the same period was 3,435 g (± 462 g SD, 95% confidence intervals 3,399–3,471 g, $p = 0.4$). The mean birth weight of the three antibody positive children was 2,850 g (± 832 g SD), but due to the small number of cases and large variations, this difference was not significant versus other groups.

Structural similarities of the TG2 epitope and HLA-DQ-docked gliadin peptide. In a previous study we demonstrated that a fraction of serum antibodies produced in celiac disease patients against deamidated gliadin cross-reacts with TG2 in ELISA and also that some of TG2-specific mAbs react with complexed 3-dimensionally shaped deamidated gliadin peptides (4). Although short gliadin peptides in solution likely have unordered secondary structures, the crystal structure of an immunogenic gliadin peptide (LQPFQPELPY) is available showing it as docked into the antigen-binding groove of HLA-DQ2 (PDB ID code 1S9V). In this structure, the distance of side-chain carbon atoms of Gln 6 and Glu8 (9.84 Å) and their spatial arrangement is similar to the distance measurable between the side-chains of Glu153 and Glu154 forming the celiac epitope (Fig. S8) in the TG2 structure (9.36 Å), and the distance of Glu8 to Leu9 in the gliadin peptide is similar to that between Glu154 and Val431 of TG2 with a good overlap of these side-chains when the two structures are superimposed (Fig. S8C).

SI Methods. Autoimmune sera. Eleven serum samples with nonceliac TG2 antibodies from patients with established diagnoses other than celiac disease were selected from routine clinical samples investigated in 2008. These patients (median age 51 y, range 25–79) had systemic lupus erythematosus ($n = 3$), rheumatoid arthritis ($n = 2$) or Sjögren syndrome ($n = 6$). Six had various gastrointestinal complaints and three had a small bowel biopsy performed with negative histology result (Marsh 0). The reactivity with human recombinant TG2 was confirmed by using two different recombinant constructs, but endomysial antibodies or antibodies against deamidated gliadin peptides were not present in the sera. HLA-DQ results were not available. For use in cell studies, IgA was purified from the serum samples using anti-human IgA agarose (Sigma).

Western blotting. TG2 proteins were separated by SDS-PAGE by standard techniques and transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Millipore). Polyclonal goat anti-TG2 antibodies (Upstate) diluted 1:20,000 or mouse monoclonal anti-TG2

antibodies TG100 (NeoMarkers) diluted 1:15,000 and anti-goat antibodies or anti-mouse antibodies conjugated with horseradish peroxidase (HRP, Sigma) 1:30,000 were used for recognition by Chemiluminescent ECL Detection System (Millipore).

Measurement of transglutaminase and GTP-ase activity. Transglutaminase activity was measured with microtiter plate assay based on the incorporation 5-(biotinamido) pentylamine (Invitrogen) into immobilized *N,N*-dimethylated casein (5) with the following modifications. The reaction mixture (in a total volume of 200 μ L 100 mM Tris/HCl pH 8.0) containing 10 mM dithiothreitol, 1 mM *N*-(5-aminopentyl) biotinamide, 5 mM CaCl_2 and 0.5 μ g TG2 was used for the activity measurements. The reaction was performed at 37°C for 30 min. Reaction blanks contained 10 mM EDTA and no added CaCl_2 .

GTPase activity was measured with charcoal method (5) with the following modifications. The 100 μ L reaction mixture contained 2 μ g of recombinant wild-type or mutant TG2. The reaction was performed at 37°C for 30 min and was stopped with 700 μ L of 6% (w/v) activated charcoal in ice-cold 50 mM NaH_2PO_4 , pH 7.5. The mixture was centrifuged and released [32 P] Pi was determined by counting of 150 μ L samples of the supernatant. Blank was determined without the enzyme. Transglutaminase and GTPase activities of the mutants were calculated as percentages compared to WT TG2 and are presented as means from two separate measurements done in triplicate.

Anti-TG2 ELISA. Microtiter plates (ImmunoPlate Maxisorp, Nunc) were coated with 0.6 μ g TG2 in 100 μ L of Tris-buffered saline (TBS) containing 5 mM CaCl_2 (pH 7.4). The plates were washed three times with TBS containing 0.1% (v/v) Tween20 and 10 mM EDTA (TTBS + EDTA). All antibodies were diluted in TTBS + EDTA. Serum samples (diluted 1:200), ScFvs used as bacterial culture supernatants (undiluted) or monoclonal antibodies (TG100, 1:500; NeoMarkers) were incubated for 1 h at room temperature. Plates were washed and incubated either with HRP-conjugated rabbit anti-human IgA or IgG (1:5,000; Dako) or with mAb recognizing SV5 tag at the C-terminus of the ScFv, followed by HRP-conjugated anti-mouse IgG (1:5,000; Sigma) for 1 h at room temperature. The color reaction was developed by adding 100 μ L 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine substrate (Sigma) and then stopped with 50 μ L 1 N H_2SO_4 . The absorbance was read at 450 nm.

Fibronectin-TG2 ELISA. Microtiter plates were coated with 0.3 μ g human fibronectin (FBN; Sigma) diluted in bicarbonate buffer pH 9.6 for 1 h at room temperature. The plates were incubated with 0.8 μ g TG2 in TBS containing 5 mM CaCl_2 and 0.1% (v/v) Tween 20 and the assay continued as above.

Competition ELISA assays. Microtiter plates were coated with 0.6 μ g WT TG2 in 100 μ L of TBS containing 5 mM CaCl_2 (pH 7.4). Mixture of M13 phage-conjugated ScFvs and increasing amounts of soluble ScFvs were simultaneously added and bound phage-ScFvs were detected with anti-M13 phage antibody conjugated with HRP. In other assays, wells were incubated with celiac serum (1:800) and increasing amounts of purified total celiac IgG antibodies (dilution 1:200 – 1:50) or IgA deficient patient serum, and binding of IgA and IgG antibodies were detected. Competition assays were also carried out with celiac serum added to the plate together with increasing amounts (up to 18 μ g) of monoclonal mouse antibodies (885, CUB7402, H23) and bound IgA was measured. Epitope map of mAb 885 is shown in Fig. S7A.

Molecular modeling. Crystal structures of human TG2 (PDB ID code 1KV3) and TG3 (PDB ID code 1VJJ) were used for modeling the full length TG2. Residues 1–14, 44–55, and 123–132 were missing in the crystal structure of TG2, however, the corresponding regions were visible in the TG3 structure, which had highly similar sequence and three-dimensional structure. Homologous model was built by Modeller (6) using the multiple template option of the program. Graphical analysis was made on Silicon Graphics Fuel workstation using Sybyl program package (Tripos). Coordinates of the model are available from the authors upon request.

Measurement of endothelial cell differentiation in matrigel. HUVEC cells were mixed with Matrigel (BD Biosciences) and grown in 24-well dishes (45,000 cells/well) with complete endothelial medium EGM1 (Lonza) containing 2% fetal bovine serum with or without 1 μ g/well mAb 885. After 4 h, 1 μ g/well purified patient or control IgAs were added. After further 24 h ten images were taken per well and the length of formed endothelial tubules was analyzed by Image J software using the geometric mean of tube length in wells without antibodies as reference.

1. Sulkanen S, et al. (1998) Tissue transglutaminase autoantibody enzyme-linked immunosorbent assay in detecting celiac disease. *Gastroenterology* 115:1322–1328.
2. Király R, et al. (2009) Functional significance of five non-canonical Ca^{2+} -binding sites of human transglutaminase 2 characterized by site directed mutagenesis. *FEBS J* 276:7083–7096.
3. Marzari R, et al. (2001) Molecular dissection of the tissue transglutaminase autoantibody response in celiac disease. *J Immunol* 166:4170–4176.

4. Korponay-Szabó IR, et al. (2008) Deamidated gliadin peptides form epitopes that transglutaminase antibodies recognize. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 46:253–261.
5. Király R, et al. (2006) Coeliac autoantibodies can enhance transamidating and inhibit GTPase activity of tissue transglutaminase: Dependence on reaction environment and enzyme fitness. *J Autoimmun* 26:278–287.
6. Sali A, Blundell TL (1993) Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol* 234:779–815.

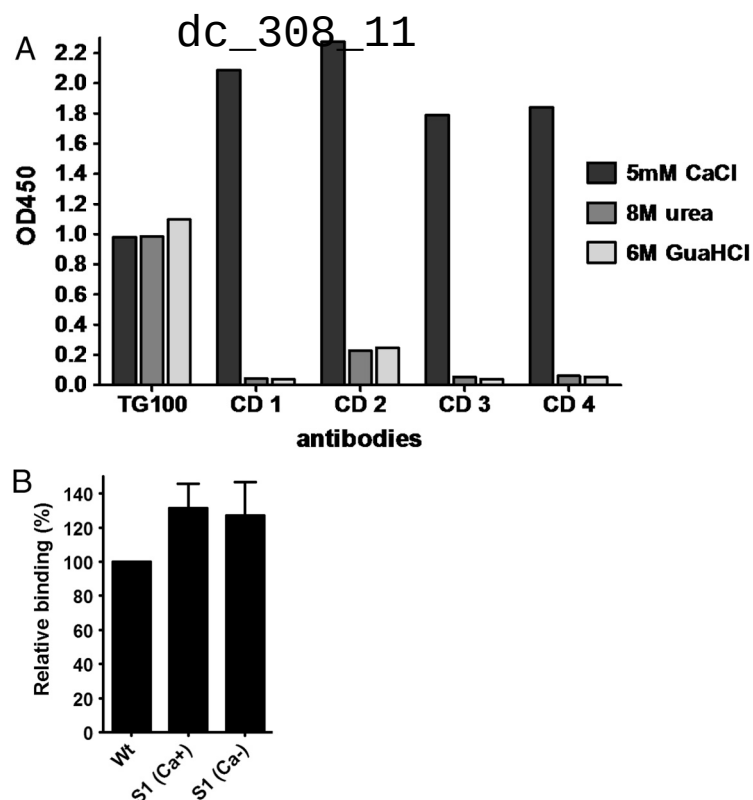


Fig. S1. Binding of celiac antibodies to TG2 is conformation dependent but presence of Ca^{2+} -is not needed. (A) Binding of monoclonal anti-TG2 antibodies TG100 (NeoMarkers) targeting a linear epitope at amino acids 447–538 and of serum IgA antibodies from 4 celiac patients (CD1-CD4) to wild-type TG2 in ELISA. The antigens were coated in the presence of 5 mM CaCl_2 , 8 M urea or 6 M Guanidine hydrochloride. (B) Binding of celiac antibodies to wild-type TG2 and to mutant of the S1 (strong) Ca^{2+} -binding site of TG2 (N229S-N231S-D232N-D233N; ref. 2). The S1 mutant was extensively dialyzed with EDTA and then coated to the plate in the presence or absence of 5 mM Ca^{2+} . Values represent means $\pm$ SD. Representative values of two independent experiments.

dc_308_11

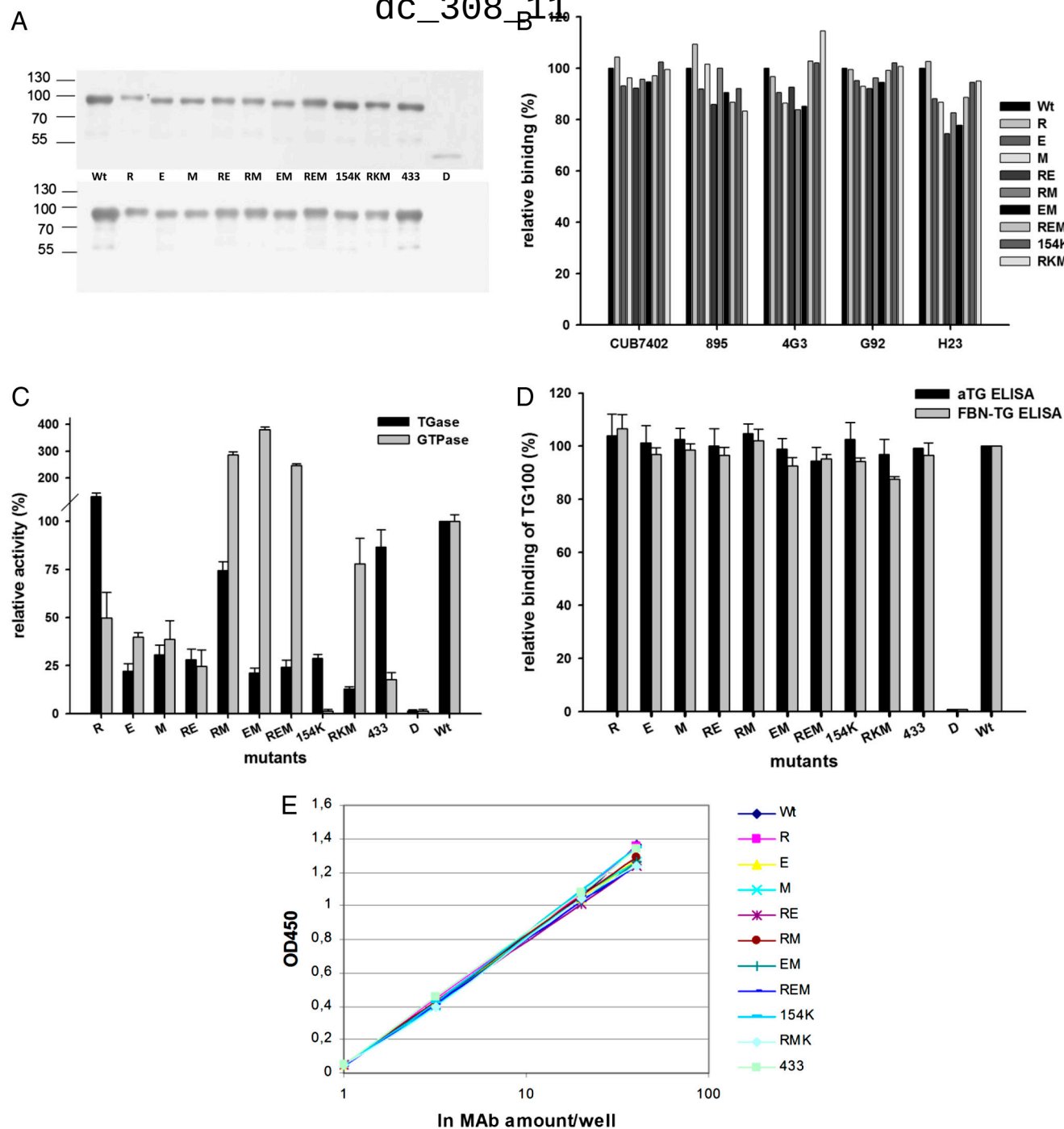


Fig. S2. Characterization of the mutant transglutaminase 2 (TG2) proteins. (A) Western blot. Upper panel: primary antibody: goat polyclonal anti-TG2 (Upstate), secondary antibody: anti-goat-HRP (DAKO); lower panel: primary antibody: mouse monoclonal anti-TG2 antibody TG100 (with a linear epitope at amino acids 447–538), secondary antibody: anti-mouse-HRP. Mutants: R, R19S; E, E153S; M, M659S; RE, R19S-E153S; RM, R19S-M659S; EM, E153S-M659S; REM, R19S-E153S-M659S; 154K, E154K; RKM, R19S-E154K-M659S; 433, R433S-E435S; D, domain deletion mutant I-III-IV lacking the core domain. (B) Binding properties of a set of mouse monoclonal (mAb) anti-TG2 antibodies to the mutants measured by anti-TG2 ELISA. Representative values of two independent experiments. (C) Transglutaminase and GTPase activities of the mutants. Mutations that include E (Glu153) are affecting the S4 Ca^{2+} binding site required for the transglutaminase catalytic activity. Values represent means $\pm$ SD. S4 had a preserved folded structure on CD spectroscopy (2). (D) Binding of the mutants to fibronectin in ELISA. TG2 was recognized by mAb TG100 (Neomarkers) diluted 1:500. (E) Calibration curves representing the binding of increasing concentrations of mAb TG100 to the mutants by anti-TG2 ELISA. The dilution 1:500 was set to 100 units/well. These curves were used for the calculation of relative amounts of bound antibodies during ELISA measurements. Values represent means $\pm$ SD.

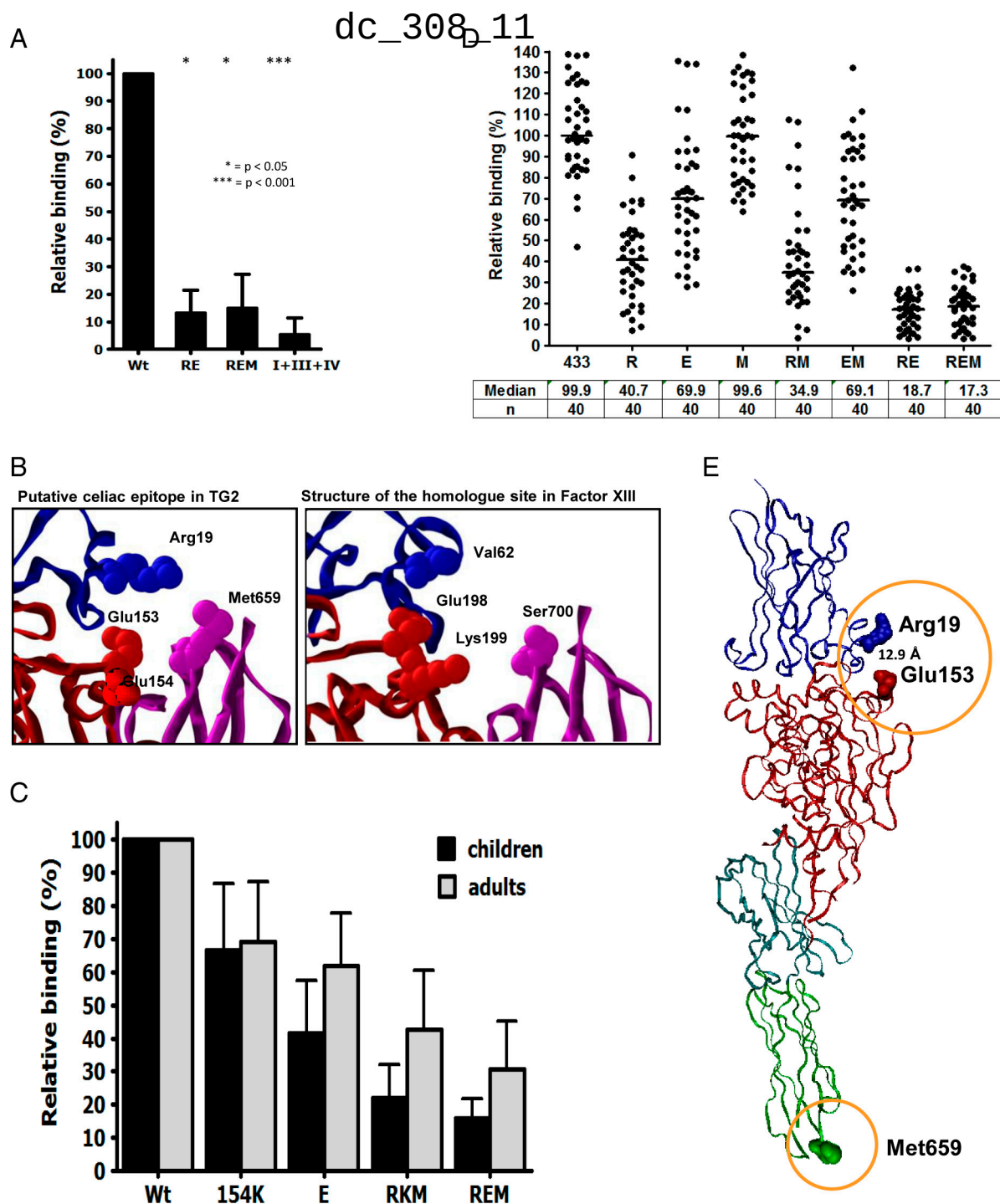


Fig. S3. Binding of serum and phage-expressed monoclonal celiac patient antibodies to TG2 mutants coated directly to ELISA plate (A, C) and to fibronectin-bound TG2 antigens (D). Relative amounts of bound antibodies were calculated by comparison to a calibrator curve constructed from the concentration dependent binding of mouse monoclonal anti-TG2 antibody TG100; binding to WT is 100%, dash indicates median. All samples were examined in duplicates. A. Binding of single chain variable fragment monoclonal antibodies ($n = 8$) isolated from celiac patients. Values represent means $\pm$ SD *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$, compared to Wt. (B) Structure and amino acids of the celiac epitope in TG2 and the corresponding site in Factor XIII. (C) Binding of celiac serum IgA antibodies from childhood ($n = 20$) and adult ($n = 18$) celiac patients to Factor XIII-homologue TG2 mutants. Values represent means $\pm$ SD, respectively. (D) Binding of IgA to fibronectin-coated TG2 from pediatric ($n = 25$) adult ($n = 15$) samples. All mutants bound to fibronectin similarly well as wild-type TG2 (Fig. S2D). R = R19S, E = E153S, M = M659S, RM = R19S-M659S, RE = R19S-E153S, EM = E153S-M659S, REM = R19S-E153S-M659S, 154K = E154K, RKM = R19S-E154K-M659S, 433 = R433S-E435S (irrelevant control mutant). I + III + IV. Domain mutant lacking core domain of TG2. (E) Structure of the opened form of TG2 (PDB ID code 2Q3Z), the anchor points for celiac antibody binding are indicated on the model as surface representation (in the circles).

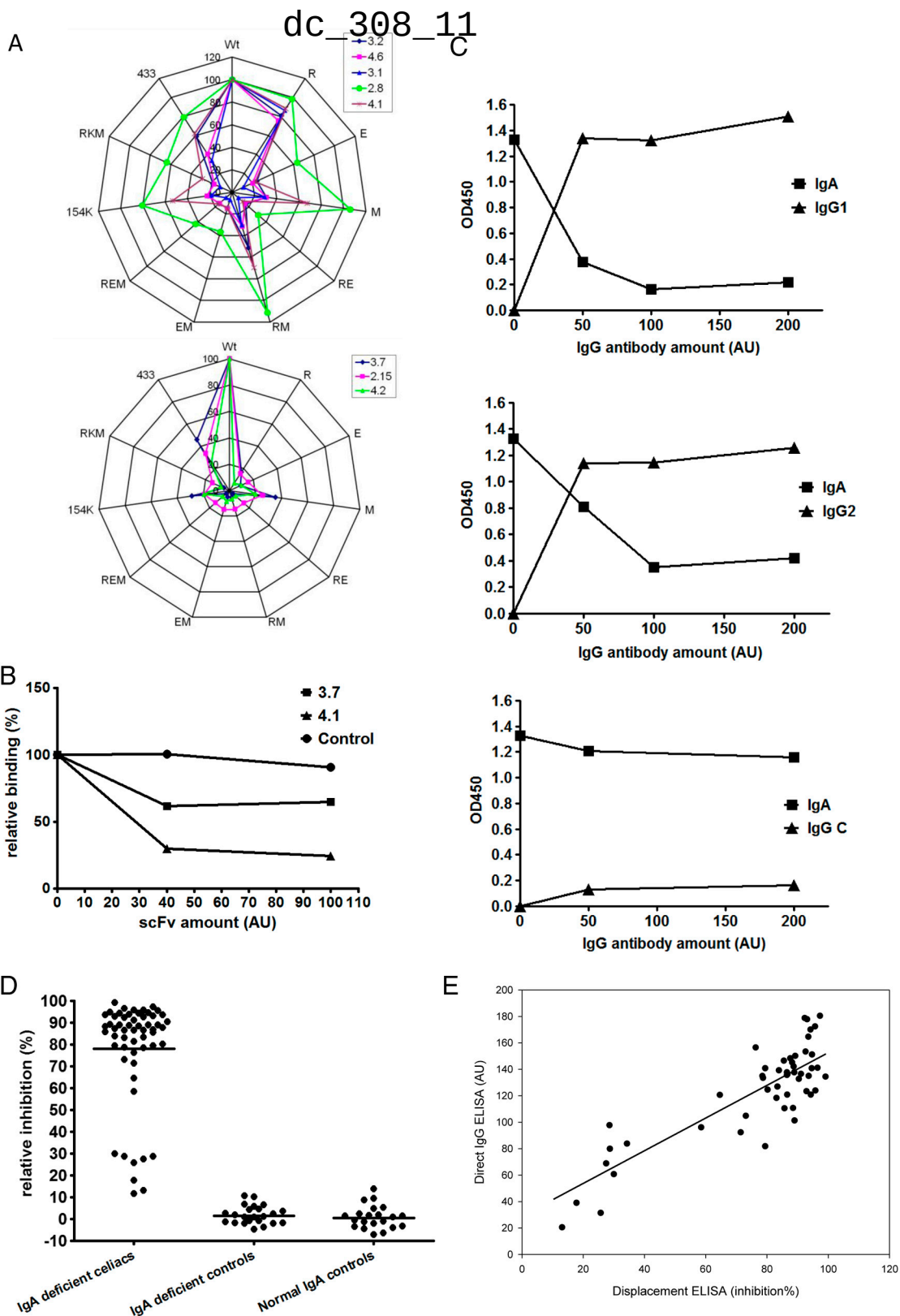


Fig. S4. Various types of antibodies obtained from different celiac patients can bind to the anchor points of the same epitope of transglutaminase 2 (TG2). (A) Epitope mapping of soluble single chain variable fragments (ScFvs) by anti-TG2 ELISA divides them into two groups. Group I (*Upper*, five clones) reacts with mutant TG2 R19S (mutant R), Group II (*Lower*, three clones) does not react with mutant R. ScFvs were used as bacterial supernatants in 1:15–1:2.5 dilutions. Relative amounts of bound antibodies were calculated by comparison to a calibrator curve constructed with mouse monoclonal antibody TG100; binding to wild-type (WT) TG2 is 100%. (B) Inhibition of binding of phage-conjugated Group I ScFv to WT TG2 in the presence of increasing amounts of soluble ScFvs of Group I (4.1), Group II (3.7) or irrelevant (control) ScFv. The degree of binding was calculated using a calibrator curve of diluted phage-conjugated ScFv; binding of phage-conjugated ScFv without soluble ScFvs is 100%. (C) Celiac IgA was incubated with wild-type TG2 in presence of increasing amounts of purified IgG fractions from celiac patients and binding of IgA and IgGs were measured in parallel wells by ELISA. Celiac IgA and celiac IgG1 were reactive with R19S, celiac IgG2 was not reactive with R19S. Purified IgG fraction from a healthy person was used as control. Data are representative of three independent experiments.

(D) Measurement of serum IgG class antitransglutaminase 2 (TG2) antibodies in IgA deficient patients by displacement of an IgA celiac patient antibody. Serum samples from 56 untreated celiac disease patients aged 0.9–73 years (median 10.5) with selective IgA deficiency (total serum IgA < 0.05 g/l), from 23 nonceliac IgA deficient and 22 normal serum IgA controls with normal small bowel architecture (age of the controls 1–18 years, median 5.5) were measured in ELISA with wild-type TG2 antigen. Investigated serum samples were diluted 1 : 100 with assay buffer containing a celiac IgA tracer antibody diluted 1 : 500 and the binding of the IgA antibody was measured by anti-IgA peroxidase-conjugated secondary antibodies. The optical density values (OD) obtained with blank were defined as 100% inhibition and the signal with the IgA tracer antibody without added IgA deficient samples was defined as 0% inhibition. The inhibition obtained with the investigated samples was calculated as $100 - (OD_{\text{tracer}} - OD_{\text{sample}} / OD_{\text{tracer}})$. Intraassay variability was 5.9% and interassay variability was 9.2%. The optimal cut-off calculated from receiver operated characteristics curves was 11% inhibition where the displacement assay had 98.2% sensitivity (95% confidence interval: 94.5–100) and 95.6% specificity (95% confidence interval: 89.9–100) for the diagnosis of celiac disease in IgA deficient persons. (E) Correlation of the displacement effect with the serum concentration of IgG anti-TG2 antibodies measured by direct recognition of human IgG by monoclonal mouse anti-human IgG (Phadia) and anti-mouse secondary HRP-conjugated antibodies (DAKO); $r = 0.88$.

when the antibody titers increased to untreated level (EMA 1-640, 17 y). Bound IgAs were detected to the mutants with anti-TG2 ELISA in duplicates, relative amounts of bound antibodies were calculated by comparison to a calibrator curve constructed from the concentration dependent binding of mouse monoclonal anti-TG2 antibody TG100; binding to WT TG2 was set to 100%. R, R19S; E, E153S; RE, R19S-E153S; REM, R19S-E153S-M659S; RKM, R19S-E154K-M659S mutant TG2s.

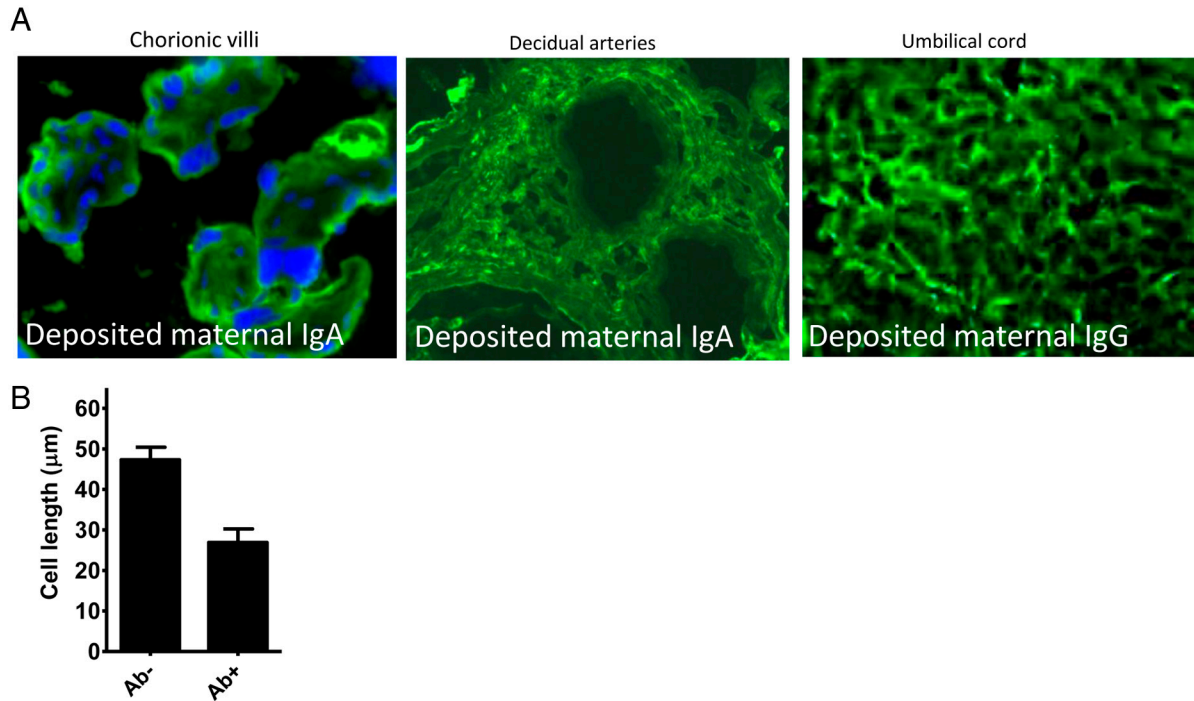


Fig. 56. In vivo-bound celiac antibodies in the placenta and newborn tissues and their effect on endothelial cells prepared from the umbilical cord. (A) Frozen sections of placenta and umbilical cord stained with FITC-conjugated anti-IgA or IgG from a pregnancy with celiac mother with active disease. Maternal IgA bound in vivo to chorionic villi (*Left*) and to the vessels of the placenta (*Center*) is shown in green, the nuclei of the fetal villous structures are shown in blue by DAPI. Celiac IgG is bound to the umbilical cord in the endomysial pattern (*Right*). (B) Length of cultured endothelial cells (HUVEC) prepared from the umbilical cords of newborns with (Ab⁺) or without (Ab⁻) maternal antibodies at birth; data from two independent experiments and analyzed by Student's *t* test; *p* was <0.001. Values represent means ± standard errors.

A dc_308_11_C

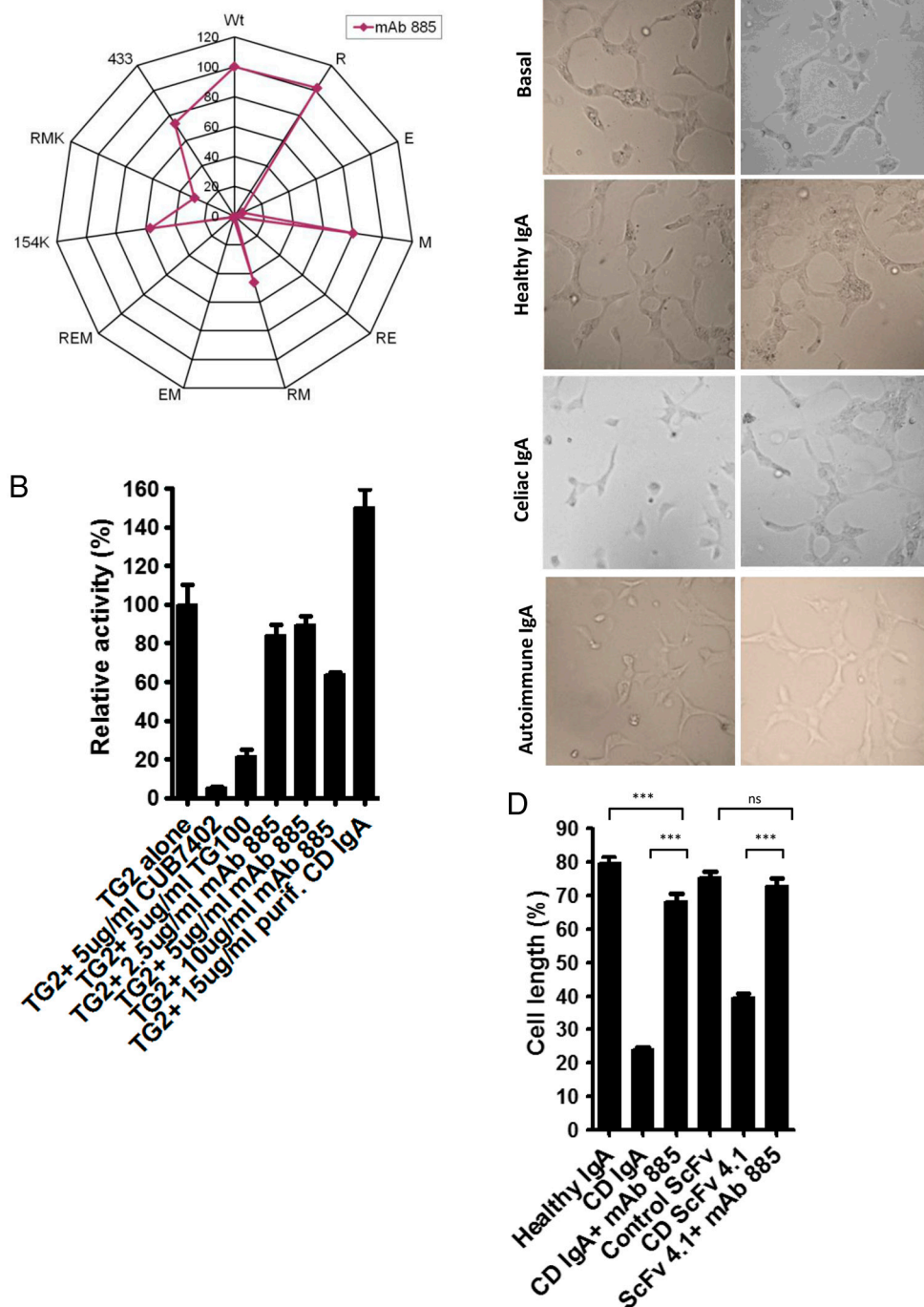


Fig. S7. Biochemical and functional characterization of anti-TG2 monoclonal antibodies 885. (A) Epitope mapping by anti-TG2 ELISA. Relative amounts of bound mAb 885 were calculated by calibrator curve constructed from the concentration dependent binding of anti-TG2 mAb TG100; binding to wild-type (WT) is 100%. (B) Effect on the catalytic activity of TG2 in comparison with other anti-TG2 mAbs by microtiter plate method. Representative values from two independent experiments done in triplicates. Values represent means of triplicates $\pm$ standard errors. (C) Endothelial tubule formation of normal human umbilical cord endothelial cells in matrigel in the presence of IgA from healthy ($n = 3$), celiac ($n = 5$) and nonceliac TG2 antibody positive autoimmune samples ($n = 6$) plus 885 antibodies (experiment shown in Fig. 6C). (D) Endothelial cell length on collagen I in the presence of celiac patient antibodies, celiac patient-derived single chain variable fragments (ScFv 4.1) and corresponding controls in the absence and presence of mAb 885. Values represent means $\pm$ standard errors.

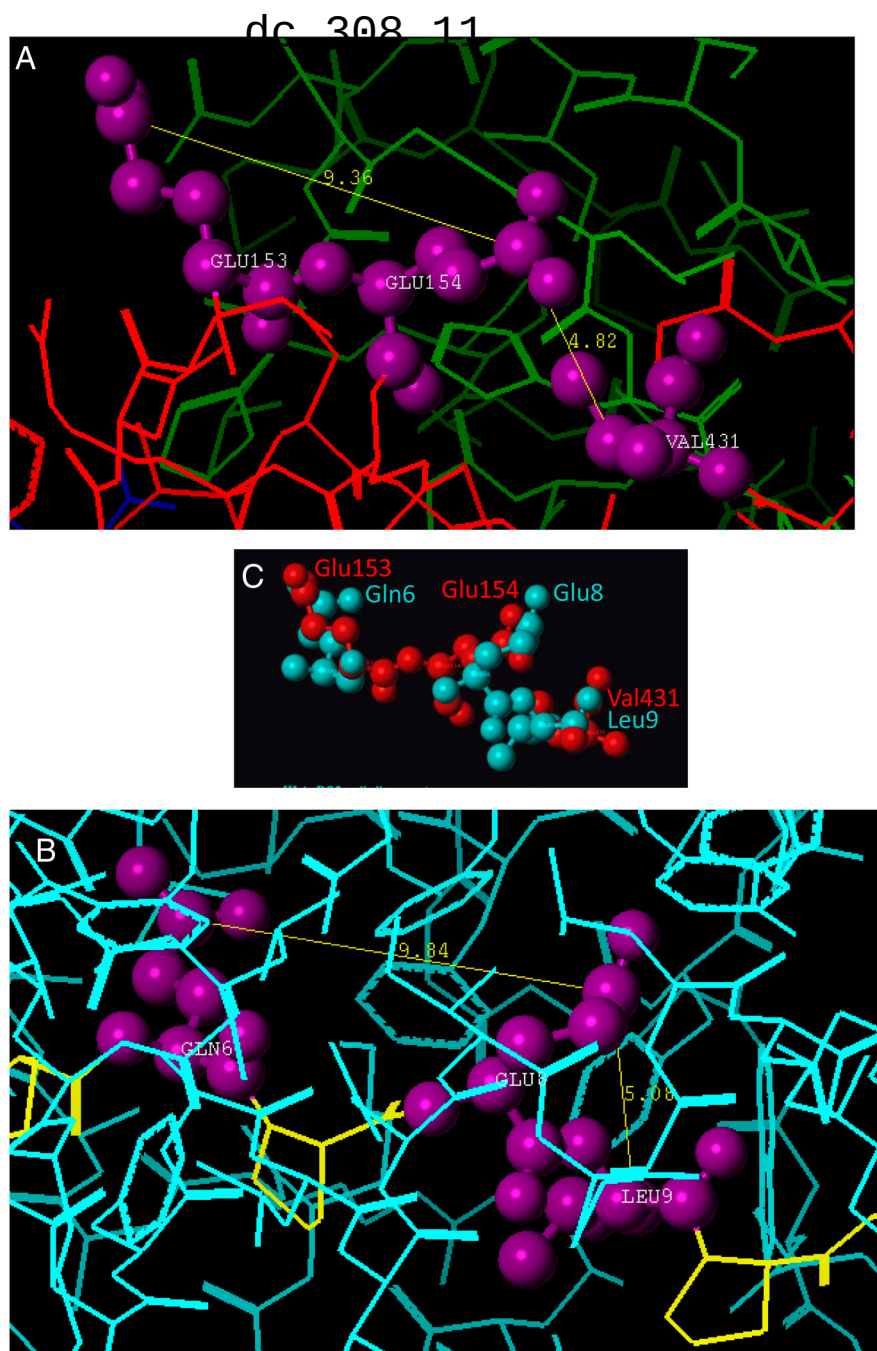
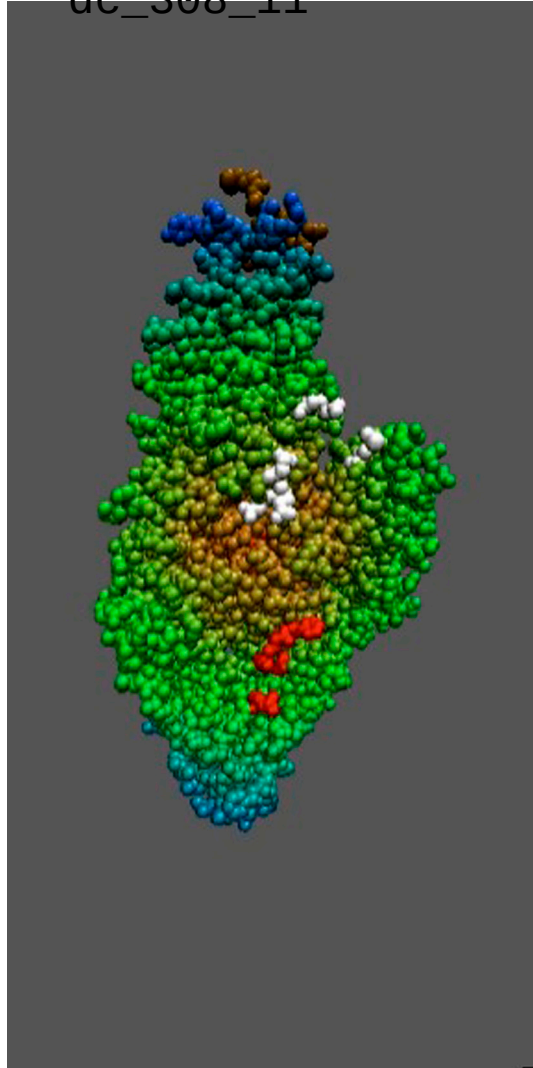


Fig. S8. Comparison of the crystal structures of transglutaminase 2 (TG2; PDB ID code 1KV3) and deamidated gliadin peptide LQFPQPPELPY docked in the antigen-binding groove of HLA-DQ2 (PDB ID code 159V). (A) The core (II) domain of TG2 is shown in red with the amino acids Glu153, Glu154 and Val431 highlighted as ball-and-stick structures in purple. The C-terminal (IV) domain is visible in green in the background. (B) HLA-DQ2 is shown in cyan. The Gln6, Glu8, and Leu9 residues of the gliadin peptide are shown as purple ball-and-sticks and the flanking prolines as yellow rings. Distances of the side-chain carbon atoms are shown in angstroms (Å). (C) Superimposition of the similar side-chains of the TG2 epitope amino acids (red) and the gliadin peptide (cyan).

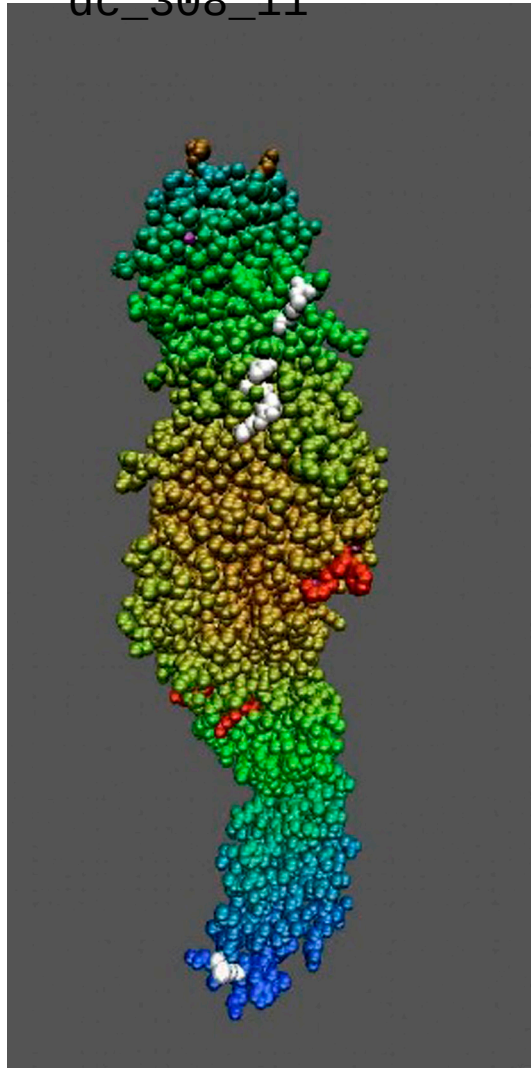
dc_308_11



Movie S1. Human transglutaminase 2 in the closed conformation. The amino acids of the celiac epitope (Arg19, Glu153, Glu154, and Met 659) are shown in white. The catalytic triad residues (Cys277, His335, Asp358) are shown in purple. The residues important for GDP binding (Lys173, Phe174, Arg478, Val479, Arg580) are depicted in red and the main fibronectin binding sites in dark brown.

[Movie S1 \(WMV\)](#)

dc_308_11



Movie S2. Human transglutaminase 2 in the open conformation. The amino acids of the celiac epitope (Arg19, Glu153, Glu154, and Met 659) are shown in white. The catalytic triad residues (Cys277, His335, Asp358) are shown in purple. The residues important for GDP binding (Lys173, Phe174, Arg478, Val479, Arg580) are depicted in red and the main fibronectin binding sites in dark brown.

[Movie S2 \(WMV\)](#)

Table S1. Alignment of the celiac epitope-relevant amino acids in members of the transglutaminase (TG) family

	Antigenicity	19	151	152	153	154	155	156	157	158	431	433	435	659
TG2_Human	High	R	D	S	E	E	E	R	Q	E	V	R	E	M
TG2_Monkey	High (1)	R	D	S	E	E	E	R	R	E	V	R	E	—
TG2_Guinea pig	High (2)	R	D	S	D	Q	E	R	Q	E	V	R	E	V
TG2_Rat	High (1)	R	D	S	E	A	E	R	R	E	V	R	D	I
TG2_Mouse	High (3)	R	D	S	E	E	E	R	R	E	V	R	D	I
TG6_Human	Medium (4)	A	A	S	E	E	E	R	Q	E	V	S	S	S
TG1_Human	Low (5)	R	D	H	E	D	W	R	Q	E	I	S	M	P
FXIII_Human	Low (6)	V	D	N	E	K	E	R	E	E	I	G	G	S
EPB_Human	Low*	E	K	N	E	A	Q	R	M	E	V	S	R	V
TG3_Human	Low (5)	Q	G	N	H	A	E	R	E	E	V	S	A	S

Deeper gray filling indicates identical, lighter gray filling indicates similar amino acids.

*Erythrocyte Band 4.2 protein.

- 1 Korponay-Szabo IR, et al. (2000) Tissue transglutaminase is the target in both rodent and primate tissues for celiac disease-specific autoantibodies. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 31:520–527.
- 2 Dieterich W, et al. (1997) Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med* 3:797–801.
- 3 Korponay-Szabo IR, et al. (2003) Missing endomysial and reticulin binding of coeliac antibodies in transglutaminase 2 knockout tissues. *Gut* 52:199–204.
- 4 Hadjivassiliou, et al. (2008) Autoantibodies in gluten ataxia recognize a novel neuronal transglutaminase. *Ann Neurol* 64:332–343.
- 5 Sardy M, et al. (2002) Epidermal transglutaminase (TGase 3) is the autoantigen of dermatitis herpetiformis. *J Exp Med* 195:747–757.
- 6 Sjöber K, et al. (2002) Factor XIII and tissue transglutaminase antibodies in coeliac and inflammatory bowel disease. *Autoimmunity* 35:357–364.