

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Diós Ádám

**A gliadinra adott humorális immunválasz kifejlődésének
és későbbi alakulásának vizsgálata coeliakia rizikóval
rendelkező gyermekekben**

DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2022

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**A gliadinra adott humorális immunválasz kifejlődésének
és későbbi alakulásának vizsgálata coeliakia rizikóval
rendelkező gyermekekben**

Diós Ádám

Témavezető: Prof. Dr. Korponay-Szabó Ilma



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2022

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke	5
2. Bevezetés	7
3. Irodalmi áttekintés	8
3.1. A coeliakia, mint autoimmun kórkép	8
3.2. A glutén prolaminok jellemzése	13
3.3. A gliadin peptidek immunogenitása	15
3.4. A gliadin peptidek HLA prezentációja	18
3.5. Gliadin elleni antitestek a coeliakiában	22
4. Célkitűzések	25
5. Betegek és módszerek	26
5.1. Betegminták	26
5.2. Peptidek és reagensek	27
5.3. Gliadin peptidek dezamidációjának vizsgálata folyadék kromatográfiához kapcsolt tandem tömegspektrometriával (LC-MS/MS)	27
5.4. Gliadin peptid specifikus antitestek affinitás tisztítása	28
5.5. Gliadin elleni antitestek mennyiségi meghatározása szérum mintákból biofelszín interferometriás módszerrel	29
5.6. Affinitás tisztított antitestek relatív kötődési hányadosának meghatározása biofelszín interferometriás módszerrel	29
5.7. Gliadin elleni antitestek kötődési affinitásának meghatározása biofelszín interferometriás módszerrel	29
5.8. Gliadin peptidek hatásának vizsgálata Caco2-sejtkultúrán	30
5.9. Szérum antitestek mérése MeDALL fehérje chip felhasználásával	30
5.10. Statisztikai analízis	31
6. Eredmények	32
6.1. Az α -gliadin peptidek TG2 általi dezamidációs mintázata	32
6.2. Az α és γ -gliadin szekvenciák antigenitásának összehasonlítása coeliakiás szérum mintákban	34
6.3. A legkorábban termelődő gliadin elleni antitestek célpontjai a γ -gliadin peptidek	38
6.4. A gliadin specifikus antitestek α és γ -gliadin keresztreaktivitása	39

6.5. A hasonló gliadin szekvenciák biológiai hatásának vizsgálata Caco2 sejteken	41
6.6. A PreventCD tanulmány mintáinak vizsgálata – klinikai kimenetel	43
6.7. A primer glutén-expozícióra adott korai antitest válasz elemzése.....	43
6.8. A korai antitest válasz értékelése a coeliakia manifesztáció, illetve a genotípusok alapján	44
6.9. Az NGP/DGP felismerés változása a korai immunválasz során és a coeliakia manifesztációja idején	46
6.10. A coeliakia manifesztációval járó affinitás érés a PEQFPF epitópra	48
6.11. A TG2 elleni antitest nélkül termelődő gliadin elleni antitestek gyenge indikátorai a coeliakiának	50
6.12. Az elsőként megjelenő TG2-specifikus antitestek az epitóp 2 felszint ismerik fel	51
7. Megbeszélés	54
8. Összefoglalás / Summary	64
9. Az értekezés új megállapításai	68
10. Irodalomjegyzék	69
11. Publikációs lista	86
12. Tárgyszavak / Keywords	88
13. Köszönetnyilvánítás	89

1. Rövidítések jegyzéke

ARA - anti-retikulin antitest

AU – relatív egység (arbitrary unit)

AUC – görbe alatti terület

BCR – B-sejt receptor

BLI – biofelszín interferometria

Caco2 – humán kolorektális adenokarcinóma sejtvonal

DGP – dezamidált gliadin peptid

EGF – epitheliális növekedési faktor

EGFR – epitheliális növekedési faktor receptor

ELISA – enzim kapcsolt immunszorbens esszé

EMA – endomizium antitest

Fab – antigén kötő fragment

GTP – guanozin-trifoszfát

HBV – hepatitis B vírus

HLA – humán leukocita antigén

HLA-DQA - humán leukocita antigén DQ α láncát kódoló gén

HLA-DQB - humán leukocita antigén DQ β láncát kódoló gén

HMW – nagy molekula tömegű

HPLC-MS/MS – folyadékkromatográfiával kapcsolt tandem tömegspektrometria

IgA – immunglobulin A

IgG – immunglobulin G

IL-15 – interleukin-15

IL-15R α – interleukin-15 receptor α

INF α – interferon- α

JEA – anti-jejunális antitest

LMW – kis molekula tömegű

MHC – fő hisztokompatibilitási komplex

NGP – nem dezamidált gliadin peptid

NF κ B – nukleáris faktor kappa B

PBS - foszfát pufferelt sóoldat

ROC – hatásfok mérő karakterisztika analízis (receiver operating characteristics)

SA - sztreptavidin

SDS-PAGE - nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforezisz

SNP - egyedi nukleotid polimorfizmus

TCR – T-sejt receptor

TG2 – szöveti (2-es típusú) transzglutamináz

TG2 RE – dupla pontmutációt (R19S, E153S) hordozó szöveti transzglutamináz

TLR7 – Toll like receptor 7

TPBS – Tween20 tartalmú foszfát pufferelt sóoldat

TTBS – Tween20 tartalmú Tris pufferelt sóoldat

2. Bevezetés

A coeliakia glutén fogyasztás által indukálódó T-sejt mediált kondicionális autoimmun kórkép, mely genetikailag prediszponált személyekben alakul ki. A glutén gyűjtőfogalmába tartoznak a különböző kalászos gabonafélék termésében található prolamin fehérjék, melyek közül a coeliakiás betegek számára a búza gliadin peptidjei a domináns antigének. A betegség során előbb T és B-sejtek közreműködésével, a gliadin peptidek ellen indul adaptív immunválasz, majd pedig a manifesztálódó, aktív coeliakia idején szöveti transzglutamináz (TG2) elleni autoantitestek is megjelennek és vékonybélboholy károsodás mutatható ki a betegekben.

A gliadin elleni antitestek nem kizárólagos markerei a coeliakiának, több más betegség esetén is előfordulhatnak: irritábilis bél szindróma (*Kull és mtsai, 1999*), IgA nephropathia (*Ots és mtsai, 1999*), rheumatoid arthritis (*Paimela és mtsai, 1995*), és néhány látszólag egészséges személy esetén is kimutathatók. Ezzel szemben a TG2 elleni autoantitestek rendkívül specifikus markerei a coeliakiának, melyek kimutatása mára a coeliakia diagnosztikájának alappillére lett.

A coeliakiás immunválasz különlegessége, hogy a glutén fogyasztás megvonásával az autoimmun folyamat megszüntethető, a reverzibilis szöveti károsodások helyreállnak, a gyulladásozó immunválasz lecseng. Újbóli glutén bevitel hatására viszont a kóros immunfolyamatok is újraindulnak, így a betegség egyetlen ismert kezelési módja az élethosszig tartó gluténmentes diéta.

A gliadin peptidekre adott és a TG2 elleni immunválasz között egyértelmű kapcsoltság áll fenn és a TG2 maga is szerephez jut a betegség pathomechanizmusában azáltal, hogy szelektív dezamidáció révén poszttranszlációsán módosítja a gliadin peptideket, növelve ezzel immunogenitásukat. Bizonyos gliadin peptidek celluláris stressz hatást provokálnak és a veleszületett immunitást indukálják, míg mások specifikus T-sejtek illetve B-sejtek aktivációját váltják ki.

A gliadin peptidek elleni antitestek gyakran már jóval a coeliakia manifesztációját megelőzően is kimutathatók (*Simell és mtsai, 2007; Amarri és mtsai 2013*), viszont ezen korai gliadin elleni immunválaszról kevés ismerettel rendelkezünk. Ezért jelen tanulmány keretében fokozott coeliakia rizikójú csecsemők, illetve coeliakiás betegek vizsgálata révén hasonlítjuk össze a korai és a coeliakia idején tapasztalható gliadin elleni humorális immunválaszt.

3. Irodalmi áttekintés

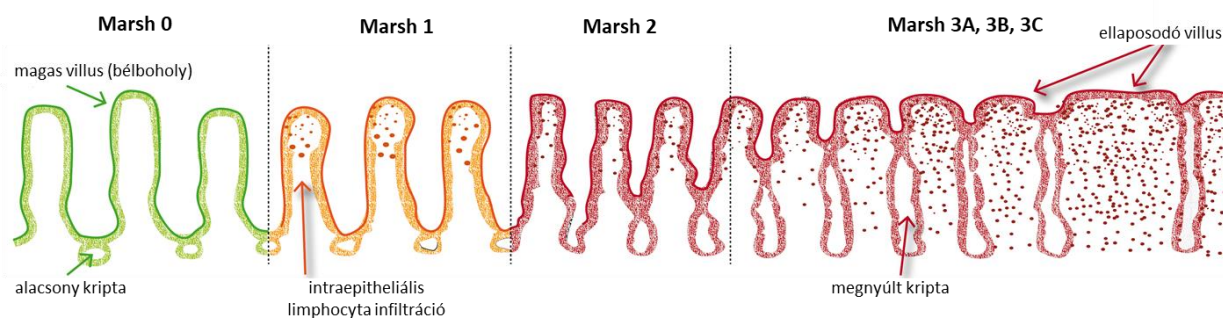
3.1. A coeliakia, mint autoimmun kórkép

A coeliakia krónikus T-sejt dependens autoimmun kórkép, melyet a glutén fogyasztás provokál genetikailag fogékony személyekben, prevalenciája világviszonylatban 1:100 körülire tehető (*Green és Cellier 2007*).

A coeliakiát elsőként Aretaeus ókori görög orvos írta le, mint malabszorpcióval járó intesztinális rendellenességet, a Krisztus után első évszázadban. A betegség kiváltó okát csak az 1940-es évek végén sikerült azonosítani Willem-Karel Dicke holland gyermekgyógyásznak (*Dicke, 1950*). Munkája nyomán vált ismerté, hogy a kórkép kiváltója a gabonafélékben található glutén prolaminok fogyasztása. Idővel pedig sikerült a betegség hátterében több genetikai komponens is azonosítani, melyek közül a legjelentősebb a humán leukocita antigén (HLA) DQ lókuszokhoz köthető (*Roep és mtsai, 1988*), majd pedig felismerték, hogy a betegek a gliadin elleni antitestek mellett TG2-specifikus autoantitesteket termelnek (*Dieterich és mtsai, 1997*). A coeliakiára még nincsen hatékony oki terápia, így a betegség kezelésének egyetlen lehetséges módja az élethosszig tartó gluténmentes diéta (*van Berge-Henegouwen és Mulder 1993*).

A coeliakia gasztrointesztinális tüneteinek oka a vékonybél nyálkahártyájának gyulladása által kialakuló boholyatrófia, melynek következménye malabszorpció lesz (*Paulley, 1954*). Mivel a vas felszívódása is zavart szenved, így gyakori a vashiányos anémia (*Halfdanarson és mtsai, 2007*). A coeliakia növeli más autoimmun kórképek kialakulásának kockázatát, mint az I. típusú diabetes mellitus (*Antvorskov és mtsai, 2014*), autoimmun thyreoiditis (*Volta és mtsai, 2001*), autoimmun májbetegségek (*Volta és mtsai, 2002*), Sjögren szindróma (*Iltanen és mtsai, 1999*), rheumatoid arthritis (*Bourne és mtsai, 1985*), ennek hátterében akár a közös genetikai hajlamosító tényezők is állhatnak (*Eyre és mtsai, 2010*).

Gasztroenterológiai kórkép lévén a hagyományos diagnosztika alapja a vékonybél biopsziából készített szövettani metszetek hisztopathológiai elemzése volt. *Marsh (1992)* fogalmazta meg a szövettan kiértékelésére vonatkozó jelenlegi ajánlásokat, melynek fő szempontjai a vékonybél boholy/kripta magasság aránya és az intraepitheliális lymphocita szám. Ezen szempontok alapján infiltratív, hiperplastikus és destruktív léziókat különített el. A kiértékelés szempontjait *Oberhuber és munkatársai (1999)* standardizálták és ezt követően vált elterjedté. A coeliakia szövettani értékelése ma is a Marsh beosztás (I-III.) alapján történik (**1. ábra**).



	Bolyhok	Kripták	Boholy/kripta arány	Intraepitheliális lymphocita szám
Marsh 0	Normál magasságúak	Sekélyek	≥3	<40 / 100 hámsejt
Marsh 1	Normál magasságúak	Sekélyek	2-3	>40 / 100 hámsejt
Marsh 2	Normál magasságúak	Megnyúltak	1-2	>40 / 100 hámsejt
Marsh 3A, 3B, 3C	Megrövidültek	Megnyúltak	≤1	>40 / 100 hámsejt

1. ábra. A szövettani minták coeliakia diagnózis szempontjából történő kiértékelése a Marsh skála alapján (Ábra forrása: Interreg, Focus IN CD projekt (<https://celiacfacts-onlinecourses.eu/>) alapján módosítva).

A kezdeti coeliakia diagnosztikai protokoll rendkívül invazív és hosszadalmas eljárás volt, ahol a diagnózis kimondásához háromszori vékonybél biopsziás vizsgálatra volt szükség: kritérium volt a súlyos boholyatrófiát mutató első kóros szövettani lelet után a glutén megvonás hatására javuló tünetek és szövettan, majd gluténterhelésre bekövetkező állapotromlás és szövettani relapszus (Meeuwisse, 1970). Az 1990-es irányelv változtatások lehetővé tették, hogy 2 éves kor felett gluténterhelés nélkül is ki lehessen mondani a diagnózist (Walker-Smith és mtsai, 1990), majd a szerológiai tesztek fejlődésével az antitestek vizsgálata egyre nagyobb szerepet kapott a diagnosztikában.

A szerológiai markerek közül elsőként a gliadin elleni antitesteket fedezték fel (Heiner és mtsai, 1962), melyek nem voltak tökéletes diagnosztikai markerek, hiszen más kórképek esetén is kimutathatók voltak, míg a coeliakiás betegek egy részénél nem (Murray, 1997). Fontos felismerés volt, hogy az aktív betegek széruma normál szövetmetszeteken autoantitestekre utaló jellegzetes festődési mintázatot ad, melyet előbb rágcsáló, majd pedig humán szöveti preparátumokon figyeltek meg. A betegek szérumában lévő antitesteket a megfestett szövettani képlet alapján nevezték el, innen származnak az ARA (anti-retikulin antitest, Seah és mtsai, 1971), EMA (anti-endomizium antitest, Chorzelski és mtsai, 1984) és JEA (anti-jejunális antitest, Kárpáti és mtsai, 1990) elnevezések. Csak 1997-ben sikerült pontosan meghatározni, hogy a jellegzetes festődéseket adó szöveti antigén a TG2 (Dieterich és mtsai, 1997), így mindhárom megnevezés (ARA, EMA, JEA) mögött a TG2-specifikus antitest áll (Korponay-Szabó és mtsai, 2000 illetve Korponay-Szabó és mtsai, 2003).

Az EMA immunhisztokémiai eljárás ma is a coeliakia diagnosztika részét képezi, de a rekombináns fehérjék és peptidok elérhetővé válásával, illetve az ELISA technológia elterjedésével megjelentek a ma ismert nagy kapacitású és automatizálható diagnosztikai tesztek. Kimutatták, hogy a dezamidált gliadin peptidok (DGP) alkalmazásával a hagyományos gliadin keveréket alkalmazó tesztekhez képes jóval nagyobb specificitás és szenzitivitás érték érhető el (*Prince, 2006*), ezért a DGP alapú ELISA tesztek ma is használják a klinikumban. Ugyanakkor a coeliakia diagnózisához sokkal nagyobb specificitást biztosítanak a TG2 ELISA tesztek (*Sulkanen és mtsai, 1998*).

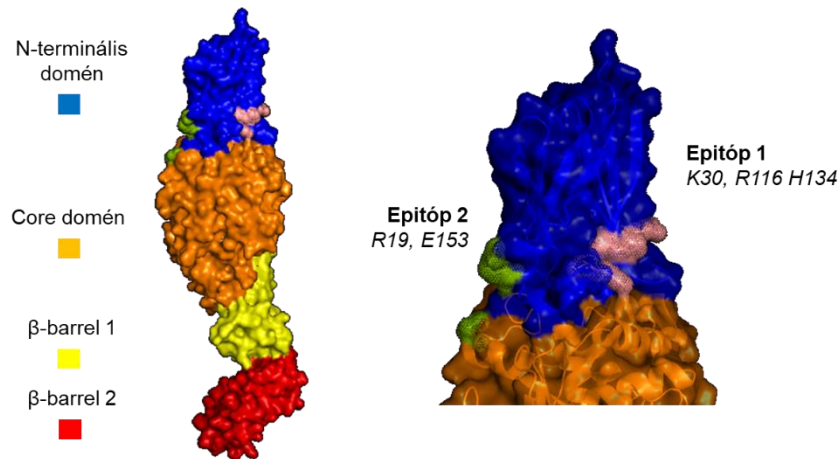
A TG2-specifikus antitestek tették lehetővé a magas specificitású gyors tesztek kifejlesztését (*Korponay-Szabó és mtsai, 2005; Nemeč és mtsai, 2006*), melyek nagyban segítik a páciensek szűrővizsgálatát.

A most hatályos coeliakia diagnosztikai elvek szerint a gyermekgyógyászatban már lehetőség van a szövettani vizsgálat nélküli non-invazív diagnózisra, ha a TG2-specifikus autoantitestek laboratóriumi vizsgálattal meghatározott szérum koncentrációja meghaladja a határérték 10-szeresét és a coeliakia autoantitest pozitivitást egy második mintából az EMA eredmény is igazolja (*Husby és mtsai, 2020*).

A coeliakia egyedi vonása, mely elkülöníti minden más kórképtől, a célzottan TG2 ellen és glutén dependens módon termelődő autoantitestek jelenléte. Ezek nem csupán rendkívüli specificitású és szenzitivitású szerológiai markerei a kórképnek, de feltételezhetően a pathomechanizmusban is szerepük lehet. A TG2-specifikus antitestek a szövetekben is kiterjedten lerakódnak az extracelluláris TG2 antigén felszínén (*Korponay-Szabó és mtsai, 2004*). Az antitestek a vékonybélben, illetve extraintesztinálisan, elsősorban a kis erek mentén felszaporodva képesek lehetnek az egyes szervek vérellátását és ezáltal funkcióját károsítani (*Myrsky és mtsai, 2008, Kalliokoski és mtsai, 2013*). Ezzel összefüggésbe hozhatók a coeliakiában megfigyelt extraintesztinális károsodások: májkárosodás (*Vajro és mtsai, 2012*), nephropathia (*Nurmi és mtsai, 2021*) kardiovaszkuláris rendellenesség (*West és mtsai, 2004*), myopathia (*Korponay-Szabó és mtsai, 2004*) glutén ataxia (*Hadjivassiliou és mtsai, 2006*), oszteoporózis (*Bianchi és Bardella 2008*).

A coeliakiás betegek által termelt TG2-specifikus autoantitestek az enzim N-terminális részére koncentrálnak a komplex epitóp felszínének ellen irányulnak (**2. ábra**). Két fő epitóp felszínét azonosították, a diszkontinuus epitóp 1-et (fő horgonyzó aminosavai: K30, R116, H134, *Iversen*

és *mtsai, 2013*) illetve a konformációs, multidomén epitóp 2 felszint (fő horgonyzó aminosavai: R19, E153, *Simon-Vecsei és mtsai, 2012*).



2. ábra. A TG2 fehérje harmadlagos térszerkezete, doménjei és a coeliakiás TG2-specifikus autoantitestek fő epitópjai. Az Epitóp 1 (rózsaszínnel) és epitóp 2 (zöld színnel) fő horgonyzó aminosavai, R = arginin, E = glutamát, K = lizin, H = hisztidin (PDB DOI: 10.2210/pdb2Q3Z/pdb).

Az autoimmun betegségek sorában megkülönböztetett helyet foglal el a coeliakia, hiszen ritka példája a kondicionális autoimmunitásnak, ahol az autoantitestek képződése és a gyulladással járó immunválasz csak a glutén expozíció idején jelentkezik (*Sulkanen és mtsai, 1998*). Gluténmentes diétával a kóros immunfolyamat felfüggeszthető, minden reverzibilis károsodás helyreállítható, majd ismételt glutén fogyasztással újra előidézhető a kórkép (*Korponay-Szabó és mtsai, 2005*).

A coeliakia pathomechanizmusa még nem teljes körűen tisztázott. Nem ismert pontosan, hogy a gluténnal szembeni klinikai tolerancia miért szűnik meg és hogyan terelődik egy exogén peptidek ellen irányuló adaptív immunválasz egy autoantigén ellen. A TG2 elleni antitestek glutén dependens megjelenésére a legelfogadottabb magyarázat a haptén-karrier elmélet (*Sollid és mtsai, 1997*). A glutén szubsztrátként kapcsolódik a TG2 enzimhez (enzim-szubsztrát intermedier jön létre) és a reakció során glutamin-lizin keresztkötés vagy a reaktív glutamin glutaminsavvá történő dezamidációja következik be. A glutén és TG2 között létrejövő komplexet a perifériára kikerülő autoreaktív TG2-specifikus B-sejtek felveszik és glutén reaktív T-sejteknek prezentálják, melyek a glutén komponens miatt aktivációs szignált adnak az autoreaktív B-sejteknek. Az elmélet jól magyarázza, hogyan lehetséges TG2-specifikus T-sejt hiányában is autoantitestek képződése. TG2-specifikus T-sejtek jelenlétét a betegekben

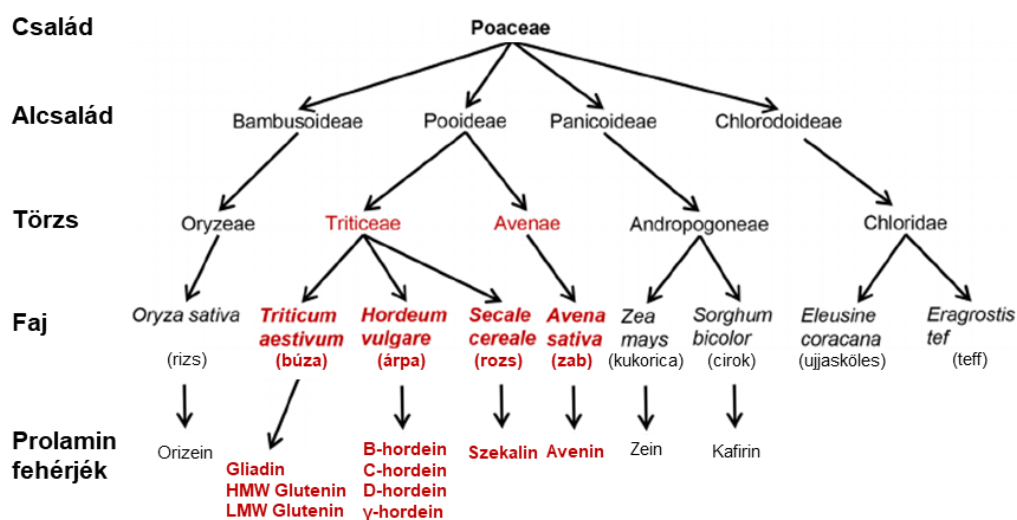
eddig meggyőző módon nem sikerült igazolni, feltehetően azért, mert a tímuszban a TG2 nagy gyakorisággal előforduló autoantigén (*Thomázy és mtsai, 1989*), így erős negatív szelekció hathat a TG2-reaktív T-sejtekre. A TG2-glutén kovalens komplex *in vivo* keletkezése és a normál körülmények között anergiásnak vélt autoreaktív B-sejt klónok aktivációjához hozzájáruló faktorok azonban még nem teljes körűen igazoltak.

A pathogenezis szempontjából az is nyitott kérdés, hogy eleve zavart-e a glutén elleni immuntolerancia megfelelő létrejötte, vagy pedig egy meglévő tolerancia bomlik fel a betegség kialakulásakor. Annyi mindenesetre klinikai tény, hogy a coeliakia megjelenését követően az egész élet folyamán glutén-intolerancia áll fenn. A coeliakiás betegekkel szemben egészséges személyekben nem sikerült kimutatni glutén reaktív T-sejteket (*Molberg és mtsai, 1997*), melynek oka lehet egy aktív, szerzett immuntolerancia, illetve a HLA-DQ2 és DQ8 negatív személyekben a megfelelő antigén prezentációs képesség hiánya.

Ellentétben más autoimmun kórképekkel, coeliakia esetén az antitestek nem csupán a diagnosztikában kisebb-nagyobb sikerrel használható markerek, vizsgálatukkal rendkívül fontos ismereteket szereztek a coeliakia pathológiáját illetően. A coeliakiában, eltérően a legtöbb gyulladással és autoimmun betegségtől, az antitestek célzott módon, a gliadin peptidok és a TG2 enzim esetében is néhány kitüntetett epitóp ellen irányulnak. Ezt jól igazolja azon megfigyelés, hogy a gliadin elleni, illetve TG2-specifikus antitestek esetében is meghatározott B-sejt receptor (BCR) nehéz és könnyűlánc variánsok dominálnak, melyek egyeznek a különböző páciensek esetében és csekély számú szomatikus hipermutációval jellemezhetők (*Steinsbø és mtsai, 2014* illetve *Roy és mtsai, 2017*). Hasonló módon a gliadin specifikus T-sejt receptorok (TCR) esetén is bizonyos kitüntetett α és β -lánc variábilis szegmensek megléte jellemző a betegekben (*Qiao és mtsai, 2014; Petersen és mtsai, 2015*). Ezek az immunológiai jellegzetességek nemcsak a felnőtt betegekre, de a gyermekekre is igazak (*Hardy és mtsai, 2015*). A felnőttkorban felismert coeliakiás betegeknél klinikai vizsgálatokkal gyakrabban mérhető fokozott antitest válasz számos egyéb sejtalkotórészre vagy sejttípusra is, például dezmin, aktin, Purkinje sejtek (*Teesalu és mtsai, 2001; Schirru és mtsai, 2013; Boscolo és mtsai, 2010*), melyek hosszan fennálló gyulladás és szövetsérülés szekunder következményei lehetnek, mivel a másodlagos autoimmun jelenségek aránya összefüggést mutat a diagnózisig eltelt idővel (*Ventura és mtsai, 1999*).

3.2 A glutén prolaminok jellemzése

A glutén prolaminok megnevezés alatt a Pooideae alcsaládba sorolt kalászos gabonafélék szemtermésében található, magas prolin tartalmú, vízben rosszul oldódó fehérjéket értjük (3. ábra). Ezek a gabonanövények a rozs (*Secale cereale*), az árpa (*Hordeum vulgare*), a búza ősi és nemesített fajtái (*Triticum monococcum/Triticum durum/Triticum aestivum*), melyek a Triticeae taxonba sorolhatók, illetve a zab (*Avena sativa*), mely az Avenae taxon tagja. Minden faj esetén más névvel illetjük a magban található peptideket: a búza prolaminjai a gliadinok és a gluteninek, az árpa prolamin fehérjéi a hordeinek, a rozs prolaminjai a szekalinok (ezek játszanak szerepet a coeliakia kialakulásában). A zab prolaminjai az aveninek, melyek kissé különálló csoportot képeznek, és általában nem váltanak ki coeliakiás autoimmunitást. A prolamin fehérje szuperfamilia másik csoportja a nem glutén prolaminok, ide tartoznak a kukorica és a rizs prolaminjai.



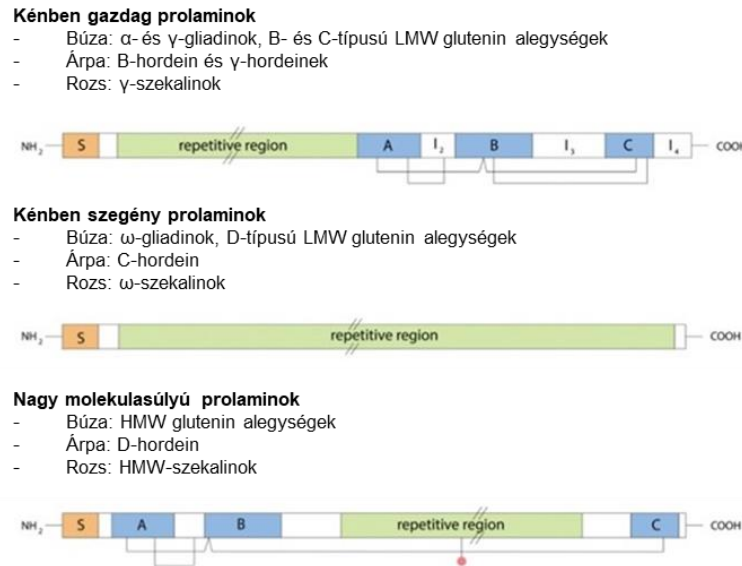
3. ábra. A glutén prolamin fehérjék. A Poaceae család főbb tagjai, köztük a glutén prolamin tartalmú gabonafélék pirossal kiemelten. LMW glutenin = kis molekula tömegű glutenin, HMW glutenin = nagy molekula tömegű glutenin. Ábra forrása: Tanner és mtsai (2014) alapján módosítva.

A glutén prolaminok csoportjai

A glutén prolaminokat tulajdonságaik alapján három fő csoportba (4. ábra) sorolhatjuk: kénben gazdag prolaminok, kénben szegény prolaminok és nagy molekulatömegű (HMW) prolaminok (Shewry és Halford 2002).

Közös szerkezeti sajátosságuk az N-terminális szignálpeptid megléte, mely a megfelelő kompartmentbe történő transzlokációjukat biztosítja, illetve az N-terminus és C-terminus nem repetitív szekvencia, mely közrefogja a repetitív szekvenciát tartalmazó centrális szakaszt

(Balakireva és Zamyatin 2016). A centrális repetitív szekvencia prolinban és glutaminban gazdag ismétlődéseket tartalmaz (innen származik a prolamin elnevezés), melyek minden csoport esetén egyediek (Kreis és mtsai, 1985).



4. ábra. A glutén prolaminek egyes csoportjának szerkezeti sajátosságai. Jelölések: S-szignál szekvencia, A, B és C konzervált szekvenciák, I₂, I₃ és I₄ variábilis szekvenciák; a szürke összekötővonalak diszulfid hidakat jelképeznek, a piros gömbök pedig párosítatlan cisztein oldalláncokat, a repetitív régiók megrövidítését a kettős vonások jelzik. LMW = kis molekula tömegű, HMW = nagy molekula tömegű. Ábra forrása: *Balakireva és Zamyatin (2016)* alapján módosítva.

A gliadinok jellemzése

A búza glutén prolamínokat oldékonyságuk szerint két csoportra tudjuk osztani (Wieser 2007). Az alkoholban oldódó frakciót a gliadinok alkotják, melyek a kénben gazdag, illetve kénben szegény prolamínok csoportjába sorolhatók, monomer szerkezetűek, mivel cisztein oldalláncaik által csak intramolekuláris diszulfid hidakat tudnak képezni (Singh és MacRitchie 2001). Az alkoholban nem, viszont híg savakban és lúgokban oldódó frakciót a gluteninek adják, melyek a nagy molekulatömegű prolamínok közé tartoznak, képesek intermolekuláris diszulfid hidakat kialakítására is, így polimereket képeznek, és a gliadin frakcióhoz is képesek kapcsolódni (Muccilli és mtsai, 2005).

A gliadin frakcióban alacsony pH-n végzett nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforezisz (SDS-PAGE) során mutatott mobilitásuk alapján négy alcsoportot tudunk elkülöníteni: α/β , γ és ω gliadinok (Wieser 2007). Az α és β - gliadinokat nagyfokú hasonlóságuk

miatt egy csoportba szokás sorolni (Zilic és mtsai, 2011), a továbbiakban együttes jelölésük α -gliadinoként történik.

Az α - és γ -gliadinok szekvenciájuk és szerkezeti tulajdonságaik alapján is nagyon hasonlóak, míg az ω -gliadinok kissé elkülönülő csoportot alkotnak. Az α - és γ -gliadinok α -hélixeket és β -redőket tartalmazó szerkezetét diszulfidhidak és intramolekuláris hidrogénhidak stabilizálják (Shewry és Halford 2002). Szolúbilis formában a prolin gazdag peptidekre jellemző a II. típusú poliprolin konformáció (Adzhubei és mtsai, 2013), mely előnyös a fő hisztokompatibilitási komplex II (MHC II) típusú molekulákhoz való kötődés során (Jardetzky és mtsai, 1996).

Az α - és γ -gliadinok centrális régiójában jellemző a prolin és glutamin gazdag hexapeptid (PQPQFP) és pentapeptid (PQQPY) szekvencia ismétlődése (Balakireva és Zamyatnin 2016).

3.3 A gliadin peptidek immunogenitása

A glutén prolaminok proteáz rezisztenciája

A táplálékkal bekerülő glutén kiterjedt processzálon esik át, mielőtt a belőle származó peptidek a lamina propria rétegben találkozoznának az antigén prezentáló sejtekkel (Kelly és mtsai, 1988). A bél lumenében és a kefeszegélyben tapasztalható proteolitikus aktivitás eredményeként a legtöbb fehérje néhány aminosavból álló peptid fragmensekre bomlik, a prolinban gazdag glutén peptidek azonban csak limitáltan degradálódnak. A humán intesztinális proteáz enzimek ugyanis prolin mellett általában nem tudnak hasítani, így akár 20-30 aminosav hosszúságú oligopeptidek is képesek fennmaradni, melyek kellően hosszúak, hogy az MHC II molekulák peptidkötő zsebét elfoglalják, így potenciálisan immunogének (Qiao és mtsai, 2009). Erre példa a 33-mer α -gliadin és a 26-mer γ -gliadin peptid. Ezek extenzív gyomor, pankréász és kefeszegély enzimekkel történő inkubációt követően is intaktak maradnak (Shan és mtsai, 2005), sőt *in vitro* képesek gátolni a degradációt végző prolil-oligopeptidáz enzimeket (García-Horsman és mtsai 2007).

A glutén prolaminok felszívódása

A részlegesen emésztett, immunogén gliadin peptidek képesek átjutni az intesztinális epithél barrieren. A folyamathoz nem köthető specifikus receptor, viszont leírták transzcitózis által zajló transzcelluláris transzport folyamatukat (Matysiak-Budnik és mtsai, 2003) illetve az endocitózissal történő felvételüket (Schumann és mtsai, 2008) is. Manifeszt coeliakiás betegekben a horizontális tight junction kapcsolatok száma lecsökken (Schulzke mtsai, 1995),

így csökken a transepitheliális rezisztencia és megnő a paracelluláris gliadin transzport mértéke is (*Matysiak-Budnik és mtsai, 2003*).

A gliadin peptidek epithél rétegen történő átjutásának különleges esete lehet a CD71 transzferin receptoron át IgA molekulához (*Matysiak-Budnik és mtsai, 2008*), illetve neonatális Fc receptoron át IgG molekulához kapcsolt transzcitózisuk (*Yoshida és mtsai, 2004*).

A toxikus hatású gliadin peptid

A p31-43 α -gliadin fragmens (LGQQQPFPPQQPY) *in vitro* vizsgálatok alapján egy különös, úgynevezett 'toxikus' hatással bíró peptid. Ez a peptid Caco2 sejtvonalon, illetve coeliakiás páciensektől származó primer biopszia kultúrán megnövekedett sejt proliferációt, az aktin hálózat átrendeződését, reaktív oxigén gyök képződést, TG2 aktivációt és NF κ B aktivációt idéz elő (*Barone és mtsai, 2014*). Az említett stressz hatásokért a peptid azon tulajdonsága felelős, hogy képes megakasztani a korai endoszóma érési folyamatát, így megnöveli az endoszóma recirkulációt és a sejtfelszíni EGF/EGFR (epidermális növekedési faktor receptor) expozíciót (*Barone és mtsai, 2010*). A p31-43 peptid ezáltal elkerülheti a lizoszómán át vezető MHC II prezentációs útvonalat, viszont adaptív immunválasz helyett a veleszületett immunitást képes aktiválni és TLR7 függő módon gyulladásszerű INF α termelődést vált ki (*Nanayakkara és mtsai, 2018*). A vezikuláris körforgás megváltozásával gyakoribbá válik az IL-15/IL-15R α (interleukin-15 receptor α) transzprezentációja és megnő az IL-15 expresszió is (*Barone és mtsai, 2011*), mely az intraepitheliális limfociták aktivációjához vezethet és a gluténnal szembeni orális tolerancia megszűnésének egyik oka lehet (*Mention és mtsai, 2003*).

A glutén prolaminek TG2 mediált dezamidációja

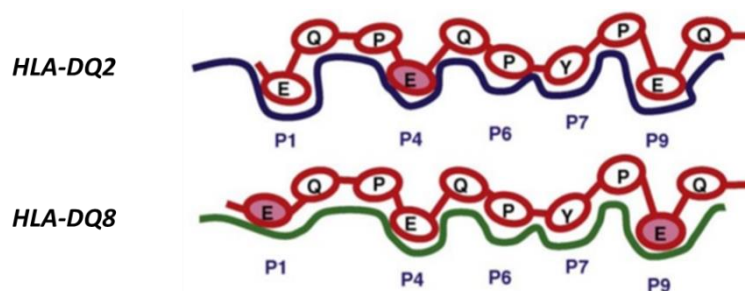
A coeliakia egy tipikus példája azon humán betegségeknek, ahol a fehérjék poszttranszlációs módosítása kulcsszerepet játszik a pathogenezisben, hiszen az epithél rétegen átjutó glutén prolaminek immunogenitását tovább növeli a TG2 enzim általi dezamidáció (**5. ábra**). A TG2 szinte minden szövetben intra- és extracellulárisan is jelen lévő multifunkcionális (transzamidáz, dezamidáz, GTP-áz) enzim, mely aktivációjához mM nagyságrendű Ca²⁺ koncentráció meglétét igényli és számos fiziológias folyamatban (sejtdhézió, extracelluláris mátrix felépítés, G-protein függő jelátvitel, apoptózis) részt vesz (*Lorand és Graham 2003*). Az extracelluláris térben a TG2 enzim aktivitását több faktor határozza meg, ezek közé tartozik az oxidatív környezet, mely normál körülmények között rövid idő alatt inaktiválni képes az enzimet (*Stamnaes és mtsai, 2010*). A gyulladás és szöveti károsodás során felszabaduló

gyulladásos mediátorok viszont növelik a TG2 enzim aktivitását (Siegel és mtsai, 2008) és az intracelluláris téréből történő fokozott TG2 felszabadulással járnak.



5. ábra. A TG2 mediált dezamidáz reakció általános sémája. Ábra forrása: Lexhaller és mtsai (2019).

A glutén prolaminok átlagosan 35% glutamint és 25% prolint tartalmaznak, natív formában nagyon kevés negatív töltésű aminosavval rendelkeznek (Qiao és mtsai, 2009), viszont a coeliakiával asszociált HLA-DQ2 vagy DQ8 lókuszok által kódolt MHC II molekulák peptidkötő zsebei több pozícióban is előnyben részesítik a negatív oldalláncú aminosavakat (6. ábra). A DQ2 MHC II molekulák a P4, P6 és P7 pozíciókban, míg a DQ8 MHC II molekulák P1 és/vagy P9 pozícióban preferálják a negatív oldalláncok kötését (Tollefsen és mtsai, 2006).



6. ábra. A HLA-DQ2 és DQ8 molekulák gliadin peptid kötési preferenciáinak sematikus ábrázolása. P1-P9 a HLA molekula peptidkötő zsebének pozícióit jelöli, míg a peptid szekvenciában a pirossal jelölt glutamát (E) aminosavak TG2 általi dezamidáció eredményeként jöttek létre. Ábra forrása: Qiao és mtsai (2009).

A TG2 dezamidáz aktivitása által a glutén prolaminok bizonyos pozícióiban található pozitív töltésű glutamin oldalláncok poszttranszlációs módosítás eredményeként negatív töltésű glutamát oldalláncokká alakulnak (Piper és mtsai, 2002). A TG2 mediált dezamidáció során az enzim számára jellemzően preferált QXP, QXPF/Y, illetve QXXF/Y szekvencia motívumokban található glutamin a glutén prolaminokban (Vader és mtsai, 2002), így megfelelő szubsztrátok a TG2 számára (Dørum és mtsai, 2009).

A dezamidáció következtében a TG2 katalitikus aktivitása szelektív hatást fejt ki a glutén prolamin szekvenciákra, mivel a dezamidált gliadin peptidok (DGP) nagyobb affinitással

képesek kötődni a coeliakiára hajlamosító HLA-DQ molekulákhoz (*Skipper és mtsai, 1996*), stabilabb komplexet képeznek velük, így a CD4⁺ T-sejtek irányába hatékonyan tudnak prezentálódni (*Qiao és mtsai, 2005*).

A TG2 enzim azonban nemcsak dezamidálni képes a gliadin peptideket, hanem keresztköti aktivitása révén fehérjékbe is képes beépíteni őket izopeptid kötés létrehozásával (*Szabolcs és mtsai, 1987*). Több tanulmányban vizsgálták, hogy milyen környezeti tényezők segítik elő a dezamidációt a TG2 keresztköti alpműködésével szemben. Megállapították, hogy a gliadin peptidek közvetlen dezamidációja elsősorban alacsony pH-n jellemző (*Fleckenstein és mtsai, 2002*), illetve ha a keresztkötésre nem áll rendelkezésre elegendő primer amin. Ugyanakkor a TG2 képes egy már kialakított izopeptid kötést is felbontani, ez a gliadin peptidek glutamin oldalláncának közvetett dezamidációjával jár (*Stamnaes és mtsai, 2008*). Régóta ismert, hogy a TG2 más fehérje szubsztrátok hiányában egy másik TG2 enzimbe is kovalensen beépítheti a gliadin peptideket (*Fleckenstein és mtsai, 2004*). A TG2 keresztköti aktivitása kapcsán felmerült a neoepitóp elmélet, mely szerint egy megváltozott saját antigén felszín jöhet létre a gliadin peptidek egyes fehérjékbe történő beépülésének következtében, mely autoimmun folyamatot indíthat meg (*Lerner és mtsai, 2016*). Azonban a TG2 és a gliadin között *in vitro* kialakított kovalens komplex nem alkot új minőségű neoepitóp felszínt, hisz a TG2 és a gliadin komponensre külön-külön mérhető a reaktivitás, önálló antigénként is megállják a helyüket.

3.4 A gliadin peptidek HLA prezentációja

A HLA-DQ2 molekulák P4, P6 és P7 pozíciókban, míg a DQ8 molekulák P1 és/vagy P9 pozícióban részesítik előnyben a negatív töltésű aminosavakat (*Tollefsen és mtsai, 2006*), melyek a TG2 általi dezamidáció során jönnek létre a glutén peptidekben (*Piper és mtsai, 2002*). Emellett a coeliakiával asszociált HLA-DQ2 molekulák képesek tolerálni, sőt bizonyos pozíciókban preferálni a prolint. A legtöbb MHC II molekula számára a prolin nem preferált aminosav, mivel prolinon keresztül nem jöhet létre hidrogén-híd. A HLA-DQ2 molekulák kivételt jelentenek, mivel bizonyos pozíciókban (P1, P3, P5 és P8) elfogadják a prolin jelenlétét és stabil MHC II-peptid komplex jön létre a T-sejtek irányába történő prezentációhoz, ezt igazolja a HLA-DQ2- α I-gliadin komplex kristály szerkezete (*Kim és mtsai, 2004*). Fontos, hogy a DQ2 az egyetlen DQ típus, mely P1 pozícióban képes elfogadni a prolint (*Stepniak és mtsai, 2008*) és az eddig ismert T-sejt epitópok közel fele az első pozícióban prolint hordoz.

A HLA-DQ8 molekulák kevésbé alkalmasak a prolinban gazdag szekvenciák prezentációjára, mivel a P1 pozícióban nem fogadnak el prolint a peptidkötő zsebben (*Bergseng és mtsai, 2008*),

így nem képesek prezentálni az immun-domináns peptidok többségét. Ezzel indokolják, hogy a DQ8 lókuszek meglehetősen alacsonyabb kockázatot jelentenek a coeliakia kifejlődésének szempontjából.

A coeliakia erős HLA asszociáltságot mutat, jóval nagyobb mértékű, mint az más autoimmun betegségek esetén megfigyelhető (Thorsby és Lie 2005). Ennek megfelelően előfordulására családi halmozódás jellemző. A HLA gének alléljai haplotípus blokkokban öröklődnek. Ezen MHC II molekulák a hivatásos antigén prezentáló sejtek (makrofágok, dendritikus sejtek és B-limfociták) felszínén találhatók meg és a CD4+ T-sejtek felé irányuló exogén antigén prezentációban vesznek részt (Rock és mtsai, 2016).

Az MHC II molekulák α és β -láncát kódoló HLA lókuszek polimorfak, a populációban előforduló allélok közül a **7. ábrán** szereplő változatok mutatnak összefüggést a coeliakia kialakulásával. A coeliakiás személyek körében a leggyakoribb a HLA-DQ2.5 genotípus, azaz a DQA1*05:01 és DQB1*02:01 allélok meglete (Sollid és mtsai, 1989). Gyakori még a HLA-DQ8 genotípus (DQA1*03 és DQB1*03:02 allélok) (Lundin és mtsai, 1994). A betegek kb. 15%-a HLA-DQ2.2 (DQA1*02:01 és DQB1*02:02 allélok) és egyidejűleg DQ7.5 (DQA1*05:05 és DQB1*03:01 allélok) genotípussal rendelkezik, akiknél a *05:05 α -lánc és a *02:02 β -lánc a DQ2.5 (cisz-DQ2) genotípussal funkcionálisan egyenértékű heterodimer (úgynevezett transz-DQ2-t) hoz létre (Sollid és Thorsby, 1993). A magyar népességben a transz DQ2 egy ritkább változata is előfordul, melynél a heterodimer β -lánc azonos ugyan, de a DQ2.2 helyett a DQ2.3 haplotípusból (DQA1*03:03 és DQB1*02:02) adódik, és ezért eltérő DQA1 tipizálási eredményt ad. A coeliakiás betegek kis százalékánál a HLA-DQ2.2 (DQA1*02:01 és DQB1*02:02) egyedül van jelen, míg a csak DQ7.5 (DQA1*05:05 és DQB1*03:01 allélok) mellett a coeliakia extrém ritkán fordul elő (Karell és mtsai 2003), és valószínű, hogy ezekben a betegekben a másik kromoszómán lévő nem azonosított vagy variáns szerkezetű DQ2 jellegű molekula járul hozzá a sikeres glutén peptid prezentációhoz.

Ezen allélok tehetőek felelőssé a glutén prolaminok CD4+ T-sejtek irányába történő antigén prezentációjáért (Lundin és mtsai, 1993), míg a többi MHC II molekula nem képes stabilan megkötni és hatékonyan prezentálni a glutén prolaminokat, ezért nem indul ellenük coeliakiás jellegű adaptív immunválasz HLA-DQ2/DQ8 negatív személyekben (Molberg és mtsai, 1997).

DQ heterodimer	A és B lánc allélok		Coeliakia rizikó
	DQA1	DQB1	
HLA-DQ2.5	05	02	magas
HLA-DQ2.2	02	02	önmagában alacsony ¹
HLA-DQ2.3	03	02	önmagában alacsony ¹
HLA-DQ7.5	05	03:01	önmagában elhanyagolható ²
HLA-DQ8	03	03:02	mérsékelt
HLA-DQ8.5	05	03:02	mérsékelt

7. ábra. A coeliakiás személyekben leírt HLA-DQ genotípusok, az MHC molekulákat kódoló allélcsoportok és azok coeliakia kialakulásával összefüggő kockázata. Ábra forrása: *Sollid és mtsai (2012)* alapján módosítva. ¹ DQ7.5 alléllal együttesen előfordulva azonban közepes kockázatot jelent, mert a DQ2.5-vel funkcionálisan egyenértékű heterodimert képez, ² DQ2.2 vagy DQ2.3 alléllal együttesen előfordulva azonban közepes kockázatot jelent, mert a DQ2.5-vel funkcionálisan egyenértékű heterodimert képez.

A coeliakia kialakulásának nélkülözhetetlen feltételének látszik a betegsre hajlamosító HLA-DQ2 és DQ8 allélek megléte, de önmagában nem elégséges hozzá, hiszen a coeliakia incidenciája (~1%) jóval alacsonyabb, mint ezeknek a HLA-DQ alléleknek a gyakorisága (~30%) a humán populációban (*Gujral és mtsai, 2012*). A coeliakia kialakulásához további egyéb genetikai faktorok és környezeti tényezők együttes hatása szükséges (*Sollid és mtsai, 2013*).

Feltételezhetően a coeliakiának a HLA-asszociáltságon felül is van genetikai faktora. Ezidáig 39 olyan egyedi nukleotid polimorfizmust (SNP) azonosítottak, melyek rizikó faktorok lehetnek, illetve szerepük lehet a coeliakia kifejlődésében (*Trynka és mtsai, 2011*). A feltárt SNP-k főképp T- és B-sejt funkciókhoz köthető lókuszok intronikus szakaszaiban találhatóak, így hatásukat valószínűsíthetően a génexpressziós szabályozásban fejtik ki (*Withoff és mtsai, 2016*).

A glutén prolaminok MHC II függő prezentációja kapcsán számos coeliakiára jellemző glutén T-sejt epitópot írtak le. Coeliakia T-sejt epitópoknak nevezzük azon glutén prolaminokban fellelhető szekvencia szakaszokat, amelyekről bizonyított, hogy képesek legalább egy adott specificitású T-sejt klónt aktiválni és ez az aktivációs folyamat MHC II prezentációs úton történik, továbbá bizonyított módon rendelkeznek olyan 9 aminosav hosszúságú szakasszal, mely az MHC II molekulák peptidkötő zsebeibe illeszkedni képes (*Sollid és mtsai, 2012*). Ezen epitópok T-sejtek általi felismerése nem korlátozódik 9 aminosavra, viszont ez az a szakasz, mely alapján az MHC II molekulák peptidkötő zsebe szelekciót végez (*Sollid és mtsai, 2012*).

A **8. ábra** bemutatja az összes eddig leírt coeliakia T-sejt epitópot. Szembetűnő, hogy ezen epitópok domináns része gliadin peptidekből származik. A legtöbb epitóp HLA-DQ2.5 függő, továbbá a HLA-DQ2.5 molekulák nemcsak gliadin, hanem glutenin, szekalin, hordein

szekvenciák prezentációjára is képesek. Következésképpen módon a coeliakia során a glutén prolamin peptidek ellen irányuló adaptív immunválasz kifejlődésének szempontjából a HLA-DQ2.5 genotípus megléte jár a legnagyobb rizikóval (*Sollid és mtsai, 2012*), homozigóta formában pedig még nagyobb kockázatot jelent a gén dózis hatás elv okán (*Ploski és mtsai, 1993*).

Az irodalomban ezidáig összesen 8 α és 13 γ -gliadinból származó coeliakiával asszociált T-sejt epitópot azonosítottak (*Sollid és mtsai, 2020*). A T-sejt klón aktivációs kísérletek során az α és γ -gliadinok hasonlóan potens immunogénként viselkedtek (*Qiao és mtsai, 2005; Tollefsen és mtsai, 2006; Dørum és mtsai, 2010; Ráki és mtsai, 2017*). Az egyik legdominánsabb glutén specifikus CD4+ T-sejt aktiváló peptid fragmens, a 6 egymással átlapoló epitópot tartalmazó 33-mer peptid (*Shan és mtsai, 2002*). A 33-mer peptidből származik a p57-68 α -gliadin fragmens (QLQPFQPQLPY), mely a DQ2.5glia- α 1 T-sejt epitópnak felel meg.

A produktív antigén prezentáció eredményeként a kitüntetett gliadin peptidek ellen Th1 immunválasz zajlik (*Nilsen és mtsai, 1995*). Az antigén prezentáció megvalósítói főképp dendritikus sejtek lehetnek, mivel aktív coeliakia idején a mukózális dendritikus sejtek számának megsokszorozódását sikerült kimutatni a lamina propriában (*Ráki és mtsai, 2006*). Glutén specifikus B-sejt klónok is végezhetnek prezentációt a T-sejtek irányába (*Lähdeaho és mtsai, 1995*), mely a B-sejtek aktivációjához és plazmasejtekké történő differenciációjukhoz vezet, a folyamat eredményeként pedig IgA és IgG izotípusú gliadin elleni antitestek termelődnek.

Epitóp	HLA-DQ peptid kötőzseb	Epitóp	HLA-DQ peptid kötőzseb
<u>DQ2.5 függő epitópok</u>	1 2 3 4 5 6 7 8 9	<u>DQ2.2 függő epitópok</u>	1 2 3 4 5 6 7 8 9
DQ2.5-glia- α 1a	P F P Q P E L P Y	DQ2.2-glia- α 1	Q G S V Q P Q Q L
DQ2.5-glia- α 1b	P Y P Q P E L P Y	DQ2.2-glia- α 2	Q Y S Q P E Q P I
DQ2.5-glia- α 2	P Q P E L P Y P Q	DQ2.2-glut-L1	P F S E Q E Q P V
DQ2.5-glia- α 3	F R P E Q P Y P Q	<u>DQ8 függő epitópok</u>	
DQ2.5-glia- γ 1	P Q Q S F P E Q Q	DQ8-glia- α 1	E G S F Q P S Q E
DQ2.5-glia- γ 2	I Q P E Q P A Q L	DQ8-glia- γ 1a	E Q P Q Q P F P Q
DQ2.5-glia- γ 3	Q Q P E Q P Y P Q	DQ8-glia- γ 1b	E Q P Q Q P Y P E
DQ2.5-glia- γ 4a	S Q P E Q E F P Q	DQ8-glia- γ 2	P Q Q S F P E Q E
DQ2.5-glia- γ 4b	P Q P E Q E F P Q	DQ8-glut-H1	Q G Y Y P T S P Q
DQ2.5-glia- γ 4c	Q Q P E Q P F P Q	<u>DQ8.5 függő epitópok</u>	
DQ2.5-glia- γ 4d	P Q P E Q P F C Q	DQ8.5-glia- α 1	E G S F Q P S Q E
DQ2.5-glia- γ 4e	L Q P E Q P F P Q	DQ8.5-glia- γ 1a	P Q Q S F P E Q E
DQ2.5-glia- γ 5	Q Q P F P E Q P Q	DQ8.5-glut-H1	Q G Y Y P T S P Q
DQ2.5-glia- ω 1	P F P Q P E Q P F		
DQ2.5-glia- ω 2	P Q P E Q P F P W		
DQ2.5-glut-L1	P F S E Q E Q P V		
DQ2.5-glut-L2	F S Q Q Q E S P F		
DQ2.5-hor-1	P F P Q P E Q P F		
DQ2.5-hor-2	P Q P E Q P F P Q		
DQ2.5-hor-3a	P I P E Q P Q P Y		
DQ2.5-hor-3b	P Y P E Q P Q P Y		
DQ2.5-sec-1	P F P Q P E Q P F		
DQ2.5-sec-2	P Q P E Q P F P Q		
DQ2.5-sec-3	P F P E Q P E Q I		
DQ2.5-ave-1a	P Y P E Q E E P F		
DQ2.5-ave-1b	P Y P E Q E Q P F		
DQ2.5-ave-1c	P Y P E Q E Q P I		

8. ábra. A glutén prolaminokban eddig leírt coeliakia CD4+ T-sejt epitópok (megjegyzés: a T sejt által felismert peptidek a feltüntetettől hosszabb szekvenciák, de a táblázat csupán az MHC II molekulák peptidkötő zsebébe illeszkedő 9 aminosavas szakaszt tünteti fel). Ábra forrása: *Sollid és mtsai (2020)* alapján módosítva.

3.5 Gliadin elleni antitestek a coeliakiában

A termelődő antitestek (szolúbilis B-sejt receptorok) által felismert glutén prolamin szekvencia motívumok a coeliakia B-sejt epitópjai, melyekről jelenleg nincs a T-sejt epitópokéhoz hasonló rendszerezett ismeretünk.

A gliadin B-sejt epitópjainak feltérképezésére az első átfogó próbálkozás *Osman és munkatársai (2000)* nevéhez fűződik, akik a PQQ motívumot azonosították, mint a gliadin-specifikus antitestek számára fő immunogén szekvenciát, és leírták az α -gliadinokra jellemző QXQPFEP epitópot is, mely a p31-43 és a p57-68 peptid fragmensekben is megtalálható. Később *Schwartz és munkatársai (2004)* kiterjesztették ezeket az ismereteket, vizsgálataikban a PQQPFEP motívumot hordozó peptidek voltak a domináns antigének. (A dezamidáció eredményeként a PQQ motívum PEQ formában jelenik meg a gliadin peptidekben). Ezen szekvencia fontosságát bizonyították *Choung és munkatársai (2016)* is, akik 12 tagú peptid

könyvtár szűrési vizsgálat során arra az eredményre jutottak, hogy a coeliakiás betegek gliadin specifikus antitestjei, a P(Q/E)Q és PFP szekvencia motívumokat hordozó peptideket ismerik fel a leghatékonyabban.

Dørum és munkatársai (2016) pedig coeliakiás betegek vékonybél biopszia mintáiból klónozott antitestek vizsgálata során azt találták, hogy komplex glutén elegyből történő immunprecipitáció eredményeként az antitestek által leggyakrabban megkötött peptidek a QPEQPFP szekvencia motívummal jellemezhetők (**9. ábra**). A QPEQPFP motívum egybeesik a coeliakiás T-sejtek által is gyakran felismert DQ2.5-glia- γ 4c és DQ2.5-glia- ω 2 epitópokban is megtalálható szekvenciával.

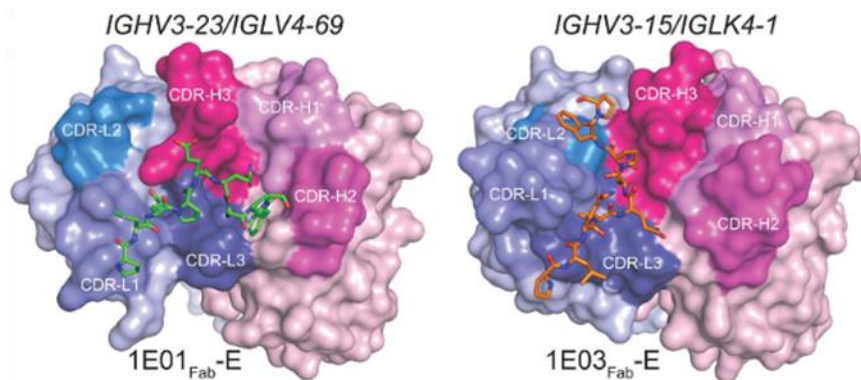
Motívum	Szekvencia	Gyakorisága az immunprecipitált peptidekben	%
3 tagú	PQQ	257/257	100%
4 tagú	PQQP	252/257	98%
5 tagú	QPFPQ	251/257	98%
6 tagú	QQPFPQ	250/257	97%
7 tagú	QPQQPFP	245/257	95%
8 tagú	QPQQPFPQ	244/257	95%
9 tagú	QQPQQPFPQ	216/257	84%
10 tagú	PQQPQQPFPQ	167/257	65%
11 tagú	QPQQPFPQQPQ	108/257	42%
12 tagú	QPQQPFPQQPQQ	103/257	40%
13 tagú	QPQQPFPQQPQQP	80/257	31%
14 tagú	PQQPFPQQPQQPFP	66/257	26%
15 tagú	QPQQPFPQQPQQPFP	66/257	26%

9. ábra. A coeliakiás betegekből klónozott gliadin elleni antitestek által leggyakrabban felismert szekvencia motívumok. Ábra forrása: *Dørum és mtsai (2016)* alapján módosítva.

Immunológiai kuriózumnak számít, hogy nagy számban vannak azonos vagy közel azonos T-sejt és B-sejt epitópok a gliadinok esetében (*Osman és mtsai, 2000; Dørum és mtsai, 2016*), ez megsokszorozza a humorális immunválasz hatékonyságát. Az epitópok egybeesése azért lehetséges, mivel a szervezetben előforduló 20-30 aminosavas gliadin peptidek nem jellemezhetők harmadlagos térszerkezettel így nemcsak a T-sejtek felé prezentált fragmenseik, de B-sejt epitópjaik is lineárisak.

Mivel a T-sejtek számára az α és γ -gliadinok hasonlóan potens immunogének, ezért meglepő, hogy a hasonló módon lineáris és a T-sejt epitópokkal nagyban átfedő gliadin B-sejt epitópok antitestek általi felismerése során egyértelműen a γ -gliadinok a preferált antigének (*Srinivasan és mtsai, 2013; Dørum és mtsai, 2016*), jöllehet, a T-sejt függő válasz során pozitív szelekciós

hatást kellene élveznie azoknak a B-sejt klónoknak, melyek a T-sejtek számára is immunogén α -gliadin peptideket prezentálnának.



10. ábra. Gliadin specifikus B-sejt klónokból létrehozott Fab antitestek és PLQPEQFPF γ -gliadin peptid komplex kristály szerkezete (PDB DOI: 10.2210/pdb5IFJ/pdb, illetve 10.2210/pdb5IJK/pdb). Ábra forrása: *Snir és mtsai (2017)*.

Poliklonális szérum antitestek vizsgálata során leírták, hogy a coeliakiás betegek antitestjei hatékonyabban ismerik fel a dezamidált gliadinokat mint a natív gliadinokat (*Osman és mtsai, 2000; Aleanzi és mtsai, 2001*), ugyanakkor *Snir és munkatársai (2017)* eredményei szerint, a gliadin elleni antitest klónok többsége nem kizárólagos módon ismeri fel a dezamidált peptideket. A vékonybél biopszia mintából klónozott B-sejt receptor és gliadin peptid komplexek kristályszerkezetét vizsgálva megállapították, hogy a klónok többsége a natív és a dezamidált gliadin peptidet is képes megkötni, míg kisebb részük, az eltérő kötőzseb szerkezetéből adódóan, kizárólagosan a negatív töltéssel rendelkező dezamidált peptidet képes felismerni (**10. ábra**).

A legtöbb betegséghez hasonlóan, a coeliakia esetében is hiányos ismereteink vannak a betegség (gyakran klinikai tünetek nélkül zajló) immunológiai és szövettani manifesztációját megelőző látens periódus során lejátszódó immun folyamatokról. A coeliakia kórképének tanulmányozásához nem áll rendelkezésre megfelelő állatmodell (*Korneychuk és mtsai, 2015*). A glutén fogyasztás hatására bekövetkező TG2-specifikus autoimmun választ és a jellegzetes boholyatrófiával járó szövettani károsodást nem sikerült HLA-DQ és T-sejt receptor (TCR) humanizált egér modellekben (*de Kauwe és mtsai, 2009; du Pré és mtsai, 2020; Abadie és mtsai, 2020*) sem megfelelő analógiával létrehozni, így a kórfolyamat tanulmányozására a legmegfelelőbb módszert jelenleg is a prospektív klinikai vizsgálatok során gyűjtött minták tanulmányozása jelenti.

4. Célkitűzések

Jelen tanulmányban célul tűztük ki a gliadin elleni humorális immunválasz korai életkortól való követéses vizsgálatát, mely során összehasonlítjuk a coeliakia manifesztációját megelőző és a coeliakia diagnózis idején detektálható szérumban antitestek tulajdonságait. A vizsgálatokhoz prospektív, nemzetközi klinikai tanulmányok (ProCeDE, PreventCD) során gyűjtött szérumban mintákat, affinitás-tisztított humán antitesteket, antigénként pedig a coeliakiában leírt immundomináns epitópokat hordozó szintetikus peptid szekvenciákat használtunk fel.

A PreventCD vizsgálat különlegessége, hogy a résztvevők egy része randomizált, kettős vak módon (a tolerancia indukció reményében) a csecsemőkor első felében standardizált és uniformizált glutén expozícióban részesült, így a glutén időbeli hatásait és a kiváltott immunválasz epitóp specificitását és kinetikáját egy experimentális farmakológiai vizsgálattal gyakorlatilag egyenértékű, humán körülmények között lehetett tanulmányozni.

Ebben a munkában közvetlen módon vizsgáljuk a coeliakiában kulcsszerepű p31-43, illetve p57-68 α -gliadin fragmensek TG2 általi dezamidációját a humán genomban - újabb adatok alapján – ténylegesen előforduló, vad típusú Val²²⁴ TG2 enzimmel, majd natív, illetve dezamidált formájuk antigenitását γ -gliadin peptidokkal összevetésben szérumban antitestek segítségével teszteljük. A hasonló gliadin szekvencia motívumok között esetlegesen fennálló immunológiai keresztreakciót egyedi gliadin peptid szekvenciák által affinitás tisztított antitest populációk segítségével térképezzük fel.

Coeliakia rizikóval rendelkező gyermekek esetén korai életkortól kezdve nyomon követjük a gliadin elleni antitestek megjelenését, az antitestek natív, illetve dezamidált szekvenciák iránti preferenciáját, továbbá az antitestek immun-domináns epitóp iránti affinitásának változását. Megvizsgáljuk a gliadin elleni antitestek coeliakia kialakulására vonatkozó predikciós erejét, illetve a TG2 elleni antitestek megjelenésének körülményeit és epitóp specificitását.

5. Betegek és módszerek

5.1 Betegminták

A vizsgálatainkban használt szérum minták egyrészt 69 kezeletlen magyar coeliakiás betegről származnak (életkor tartomány 1,8 - 17,3 év, medián 6,2 év), akik részt vettek a ProCeDE elnevezésű nemzetközi tanulmányban, mely a diagnosztikai tesztek pontosságát vizsgálta anti-TG2 pozitív egyéneken (*Werkstetter és mtsai, 2017*). Továbbá felhasználtunk 122 csecsemőtől származó 720 szérum mintát, akik a PreventCD elnevezésű prospektív klinikai tanulmányban (<http://www.preventceliacdisease.com>, *Vriezinga és mtsai, 2014*) vettek részt, és érintett családtagjaik révén magas genetikai rizikóval rendelkeznek a coeliakia kialakulására. A szérum minták 4, 6, 9, 12, 24, illetve 36 hónapos korban kerültek begyűjtésre (illetőleg a coeliakia diagnózisakor, amennyiben ez ettől eltérő időpont volt). A vizsgálatban 2007 és 2010 között született csecsemők vettek részt, akik elsőként HLA-DQ genotipizáláson estek át, majd a DQ2.5, DQ2.2 vagy DQ8 rizikó alléleket hordozók randomizált módon kerültek az intervenció (A), illetve a placebo (B) csoportba. Az A csoportba került csecsemők 4 és 6 hónapos koruk között napi 200 mg tisztított vitális glutén készítményt kaptak (Danone Research BV, Wageningen, Hollandia), míg a B csoportba került csecsemők ezen időszakban laktóz tartalmú placebo készítményt kaptak kettős vak elrendezésben. Az étrendi intervenciót követően mindkét csoportba tartozó csecsemők azonos módon, fokozatosan emelkedő adagban kaptak glutént 7-10 hónapos korban, ezután szabadon fogyasztottak glutén tartalmú ételeket. A gyermekek követése most is folyik, jelenleg 11-14 évesek.

A coeliakia diagnózisát minden esetben EMA pozitivitással és Marsh III lézió fennállásával igazolták. A tanulmányban való részvétel és a mintagyűjtés a szülők beleegyezésével történt, akik engedélyezték, hogy a begyűjtött szérum mintákat különböző laboratóriumokban antitest vizsgálatoknak vessék alá. A 122 gyermek a nemzetközi vizsgálat magyar (n=62) és német (n=60) résztvevői közül került beválogatásra. A ProCeDE és PreventCD tanulmányhoz szükséges etikai engedélyeket a résztvevő centrumok orvosi etikai bizottsága és a nemzetközi koordináló intézetek bizottságai is megadták, illetve lokálisan a Heim Pál Országos Gyermekgyógyászati Intézet (Budapest, Magyarország) etikai bizottsága is engedélyezte a tanulmány során begyűjtött szérum minták vizsgálatát.

Az eredeti PreventCD tanulmányból kizárásra kerültek a HLA-DQ rizikó allélekre negatív csecsemők, viszont a PreventCD tanulmányba történő beválogatás lezárultát követően, szülői kérésre a HLA-DQ rizikó allélek ismeretének hiányában is elvégezték a glutén intervenciót az

eredeti tanulmányban résztvevők fiatalabb testvéreinek egy részénél, mely a fentivel azonos módon zajlott, de a vitális glutén készítmény más forrásból származott (Sedamyl, Saluzzo, Olaszország). Az intervenciót követő, 6 hónapos korban végzett vérvétel során került megállapításra a HLA-DQ genotípus. Ennek során 11 DQ2/DQ8 negatív csecsemőt azonosítottak, akik további vizsgálatban nem vettek részt, csak a 6 hónapos kori mintájuk került analízisre.

5.2 Peptidek és reagensek

Az N-terminális biotinizációval rendelkező szintetikus gliadin peptideket >95% tisztaságban a GenScript (Leiden, Hollandia) gyártó szolgáltatta a következő szekvenciákkal: γ Glia_Q (SGGPLQPQQPFP), γ Glia_E (SGGPLQPEQPFP), γ Glia_sh (SGGPEQPFP), p31-43 (LGQQQPFPPQQPY), p31-43_E34 (LGQEQPFPQQPY), p31-43_E40 (LGQQQPFPEQPYPY), p57-68 (QLQPFPPQQLPY), p57-68_E65 (QLQPFPPQPELPY) illetve irreleváns peptid szekvencia (VVKVGGSSSLGW), mely negatív kontrollként szolgált. A PreventCD rizikó csecsemők szérum mintáinak affinitás tisztításához felhasznált gliadin peptid reagens az Inova Diagnostics (San Diego, CA, USA) ajándéka volt, míg a MeDALL chip-en használt, a Gliadin DP ELISA klinikai teszt antigénjével egyező dezamidált gliadin peptideket és azok non-dezamidált változatait a Thermo Fisher Scientific (Freiburg, Németország) gyártótól kaptuk. Minden további reagens, hacsak másképp nincsen jelölve, a Sigma (St. Louis, MO, USA) gyártótól származik.

5.3 Gliadin peptidek dezamidációjának vizsgálata folyadék kromatográfiához kapcsolt tandem tömegspektrometriával (HPLC-MS/MS)

A p31-43 és p57-68 szintetikus gliadin peptidek dezamidációját 5mM CaCl₂ és 1mM ditiotreitoltartalmú MOPS pufferben (50mM, pH 6,8) végeztük, melyhez 50 pmol rekombináns humán TG2 (Val²²⁴ variáns, *Kanchan és mtsai, 2013*) enzimet adtunk. A reakció 37°C-on zajlott 2 órán át, a TG2 : gliadin peptid moláris aránya 1:150 volt. A reakciót a TG2 enzim hő általi inaktiválásával állítottuk le, majd Amicon ultra 10K membránon (Merck, Darmstadt, Németország) végzett centrifugálási lépéssel szeparáltuk az enzimet a reakció termék peptidektől. Az LC-MS/MS analízist megelőzően a peptideket tovább tisztítottuk C18 PierceTip (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) segítségével a gyártói utasításokat követve. A minták vizsgálatát a Debreceni Egyetem Proteomikai Szolgáltatói Laboratóriumában Prof. Dr. Csösz Éva és Dr. Kalló Gergő végezte. A tisztított mintákat Orbitrap Fusion tribrid tömegspektrométerre (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) injektálták, nagy felbontású pozitív ion

detektálásra alkalmas beállítással. Az MS/MS spektrumokat rögzítették és a peptid azonosítást MaxQuant szoftverrel végezték az Andromeda keresőmotor használatával. Az N-terminális biotinizáció fix módosításként szerepelt, míg a dezamidáció mint változó módosítás (N, Q). Az eredmények vizualizációjához a Scaffold szoftvert (Proteome Software Inc. Portland, OR, USA) alkalmaztuk.

5.4 Gliadin-specifikus antitestek affinitás tisztítása

A szérum minták antitest tartalmának pontos mennyiségi meghatározásához, illetve az antitestek keresztreaktivitásának teszteléséhez, az egyes α és γ -gliadin peptid szekvenciákkal külön-külön affinitás tisztítást végeztünk a coeliakiás betegek (n=2) egyedileg feldolgozott szérum mintáiból. A biotinizált peptid szekvenciákból 500 μ g mennyiséget immobilizáltunk 1mL PierceTM High Capacity Neutravidin Agarose gyantára (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) a gyártói utasításokat követve. A coeliakiás betegek szérum mintáit kétszeresére hígítottuk foszfát pufferelt sóoldatban (PBS pH 7,4), mely 0,1% Tween 20 detergenst is tartalmazott (TPBS) és hét egyenlő részre osztva 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk az egyes peptideket hordozó agarózzal. A kötődött antitestek elúciójához 5 oszlop térfogatnyi 100mM glicin pH 2,5 puffert alkalmaztunk, melyet ezt követően PBS pufferre cseréltünk 50K Amicon® (Merck, Darmstadt, Németország) ultra centrifuga filterek segítségével. A fehérje koncentrációt Bio-Rad Protein Assay (Biorad Laboratories, Hercules, CA, USA) segítségével állapítottuk meg, ahol humán IgG fehérjét (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) használtunk standardként.

Az antitestek kinetikai paramétereinek meghatározásához a PreventCD tanulmányban részt vevő csecsemők szérum mintáiból (n=10) gliadin-specifikus antitestek affinitás tisztítását végeztük el, melyhez cianobromid-aktivált sepharose 4B gyantát használtunk (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA), melyhez a gyártó utasítását követve szintetikus gliadin peptid reagenst (Inova Diagnostics, San Diego, CA, USA) immobilizáltunk. Az affinitás tisztítás során a csecsemők szérum mintáit TPBS pufferrel kétszeresére hígítottuk és 1 órán át inkubáltuk szobahőmérsékleten a peptidet tartalmazó agaróz gyantával. Az agaróz gyantát gravitációsan szedimentáltuk, majd az antitesteket 100 mM glicin pH=2,5 oldattal eluáltuk, ezt követően pedig a 50K Amicon® Ultra centrifuga filter (Merck, Darmstadt, Németország) használatával az antitestet tartalmazó oldatot bekonzentráltuk és PBS oldatra cseréltük. Az antitest oldat koncentrációját Bio-Rad Protein Assay (Biorad Laboratories, Hercules, CA, USA) segítségével határoztuk meg, referenciaként humán IgG (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) molekulát használva.

5.5 Gliadin elleni antitestek mennyiségi meghatározása szérumból biofelszín interferometriás módszerrel

A gliadin elleni antitestek szérumból történő mennyiségi meghatározásához jelölés nélküli biofelszín interferometriás eszközt (Personal Assay BLItz, PALL FortéBio, Fremont, CA, USA) és sztreptavidin (SA) fedett bioszenzorokat (FortéBio, Fremont, CA, USA) alkalmaztunk. Az antitestek kötődését az eszköz a bioszenzor felszínén létrejött fényvisszaverődésnek a kialakult rétegvastagságtól függő hullámhossz eltolódása alapján nm-ben valós időben regisztrálja. 3 μM biotinilált peptidet immobilizáltunk a SA bioszenzorokra, a mérés során pufferként TPBS oldatot használtunk. Az egyes α és γ -gliadin peptidekkel külön-külön kalibrációs görbéket készítettünk az adott peptid felhasználásával kinyert, ismert koncentrációjú affinitás tisztított antitestek segítségével. A kalibrációs görbék alapján duplikátumokkal mérve meghatároztuk a 40x hígítású szérumból minták specifikus antitest tartalmát. A bioszenzorokat 0,5M foszforsavval regeneráltuk és 10 alkalomig újra használtuk. Kontroll kísérletekben, anti-humán IgG és IgA (Dako, Roskilde, Dánia) segítségével megállapítottuk, hogy a BLItz esszében a szérumból kötődő komponensek valóban immunglobulinok.

5.6 Affinitás tisztított antitestek relatív kötődési hányadosának meghatározása biofelszín interferometriás módszerrel

Az affinitás tisztított gliadin elleni antitestek különböző α és γ -gliadin szekvenciákhoz történő relatív kötődési hányadosának megállapításához az antitestek kötődését 150nM koncentrációban TPBS pufferben teszteltük a 3 μM gliadin peptidet hordozó SA bioszenzorokhoz duplikátumokat regisztrálva. A kötődési hányadosokat logaritmikus illesztés útján kaptuk (a meredekség arányos a kötődő ligand mennyiségével). A negatív kontroll peptid értékeinek levonását követően a duplikátumokat átlagoltuk és normalizáltuk (100% az a kötődés, melyet az antitest azon peptid iránt mutat, amellyel az affinitás tisztítása történt).

5.7 Gliadin elleni antitestek kötődési affinitásának meghatározása biofelszín interferometriás módszerrel

A gliadin elleni antitestek egyedi gliadin epitópokra vonatkozó ekvilibrium disszociációs állandóját (K_D) szintetikus rövid peptidekkel, biofelszín interferometriás eszköz (Personal Assay BLItz System, PALL FortéBio, Fremont, CA, USA) segítségével végeztük. A TPBS pufferben oldott biotinilált gliadin peptidekből 3 μM mennyiséget immobilizáltunk sztreptavidin bioszenzorok (FortéBio, Fremont, CA, USA) felszínére, majd az affinitás tisztított

gliadin elleni antitesteket 240, 120, 60, illetve 30nM koncentrációban adtuk hozzá, szintén TPBS pufferben oldva. A kinetikai mérések kétszeri ismétléssel 5 perc asszociáció és 5 perc disszociáció lépésekből álltak. A bioszenzorokat 0,5M foszforsav felhasználásával regeneráltuk és újra használtuk 10 mérésig. A K_D értékeket a BLItz Pro 1.2.1.5 szoftver kalkulálta, az illesztéshez 1:1 kinetikai modellt használva.

5.8 Gliadin peptidek hatásának vizsgálata Caco2-sejtkultúrán

A gliadin peptidek ismert 'toxikus' hatásának vizsgálatára egy már korábban publikált módszert alkalmaztunk (*Stenman és mtsai, 2010*). A Caco-2 sejteket (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) Nunc™ 4 vájulatú sejtenyésztő edényben (Thermo Scientific) növesztettük a konfluencia eléréséig minimum esszenciális médiumban, mely tartalmazott 20% magzati borjú szérumot (FBS), 50 U/mL Penicillin–Sztreptomycin elegyet, 1 mM nátrium-piruvátot, 1,5 g/L nátrium-bikarbonátot és 0,1 mM nem esszenciális aminosav oldatot. A kísérletet megelőző éjszakára a tápfolyadék FBS tartalmát 1%-ra csökkentettük és a sejteket 100 µg/mL szintetikus peptiddel, melyek azonosak voltak a biofelszín interferometriás vizsgálatoknál alkalmazottakkal, inkubáltuk 24 órán át 5% CO₂ és 37°C mellett. Háromszori PBS mosást követően a sejteket 4% paraformaldehiddel fixáltuk, majd 0,05% TritonX-szel permeabilizáltuk és monoklonális egér anti-ZO1 antitestekkel inkubáltuk (1:200; Zymed Inc. San Francisco, CA, USA) 4°C-on éjszakán át. Másodlagos jelölő antitestként AlexaFluor 488 kecske anti-egér immunglobulin G-t (1:1000; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) használtunk, mellyel 90 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten. A megjelölt szoros kapcsolatokat (tight junction) Olympus IX81 mikroszkóp (Olympus, Hamburg, Németország) felhasználásával fényképeztük és értékeltük a Debreceni Egyetem Biofizikai és Sejtbiológiai Intézetében, Prof. Dr. Szöllősi János laboratóriumában.

5.9 Szérum antitestek mérése MeDALL fehérje chip felhasználásával

MeDALL fehérje mikrochip (*Lupinek és mtsai, 2014; Hiller és mtsai, 2002*) felszínére antigénként a klinikumban használatos Gliadin DP ELIA diagnosztikai kit-ben (Thermo Fisher Scientific, Freiburg, Németország) validált dezamidált gliadin peptid (DGP) illetve ezen szekvencia nem dezamidált gliadin peptid (NGP) változata került immobilizálásra. Az NGP és DGP reagenseket a Thermo Fisher Scientific biztosította ajándékként a vizsgálatokhoz. A mikrochipeken a munkacsoportunk által termelt vad típusú humán transzglutamináz 2 enzimet (TG2) is teszteltük, mely 224-es pozícióban a leggyakrabban előforduló természetes humán TG2 enzimhez hasonlóan valint hordoz (Val²²⁴, *Kanchan és mtsai, 2013*) illetve ezen enzim

dupla mutáns változatát (TG2 RE), melyben a coeliakiás TG2 epitóp 2 ellenes antitestek kötődéséhez szükséges horgonyzó aminosavakat pontmutációval módosítottuk (R19S, E153S) (Simon-Vecsei és mtsai, 2012). A MedALL chipeket a Phadia GmbH bécsi laboratóriumában készítették el. Az antigének 0,1% nátrium dodecil szulfátot (SDS) tartalmazó 150mM nátrium foszfát oldatban ($pH=8,5$) 0,3 mg/mL végkoncentrációra hígítva robot automata (Affymetrix 417 Arrayer, Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) által kerültek felvitelre az előaktivált üveg lemezekre (VBC-GENOMICS), melyek a fehérjék kovalens megkötését biztosítják. Ezt követően a lemezek felszínét TTBS oldattal (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,5% Tween 20, pH 8,0) 15 percig történt mosás és kétszeresen desztillált vízzel öblítés után levegőn megszáritották. A szérum minták MeDALL chipen való mérését a Bécsi Orvostudományi Egyetem Kórélettani és Allergia Kutató Intézetében Dr. Bharani Srinivasan végezte kollaborációs együttműködés keretében. A szérum minták TTBS oldatban 1:5 hígítva kerültek a chip lemezek (Sigma, St. Louis, MO, USA) felszínére és 60-180 percig inkubálták őket $37^{\circ}C$ -on 150 rpm kevertetés mellett. Ezután a lemezeket TTBS oldattal mosták 15 percig. A megkötődött IgA és IgG izotípusú antitesteket 1:1000 hígításban használt Alexa Fluor 546-jelölt egér monoklonális anti-humán IgA illetve IgG antitestekkel (Pharmingen, San Diego, CA, USA) detektálták. A lemezeket ötszörös TTBS mosást követően, kétszer desztillált vízzel öblítették és levegőn megszáritották. A lemez szkennelését Affymetrix 418 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) készülékkel végezték, és a kapott adatokat a GenePix Software Version 3.0 (Axon Instruments, Union City, CA, USA) segítségével értékeltük ki, majd Microsoft Excel-lel analizáltuk. A három párhuzamossal mért jelek átlagát akkor tekintettük pozitívnak, ha az a humán szérum albumin jelének ötszörösét meghaladta.

5.10 Statisztikai analízis

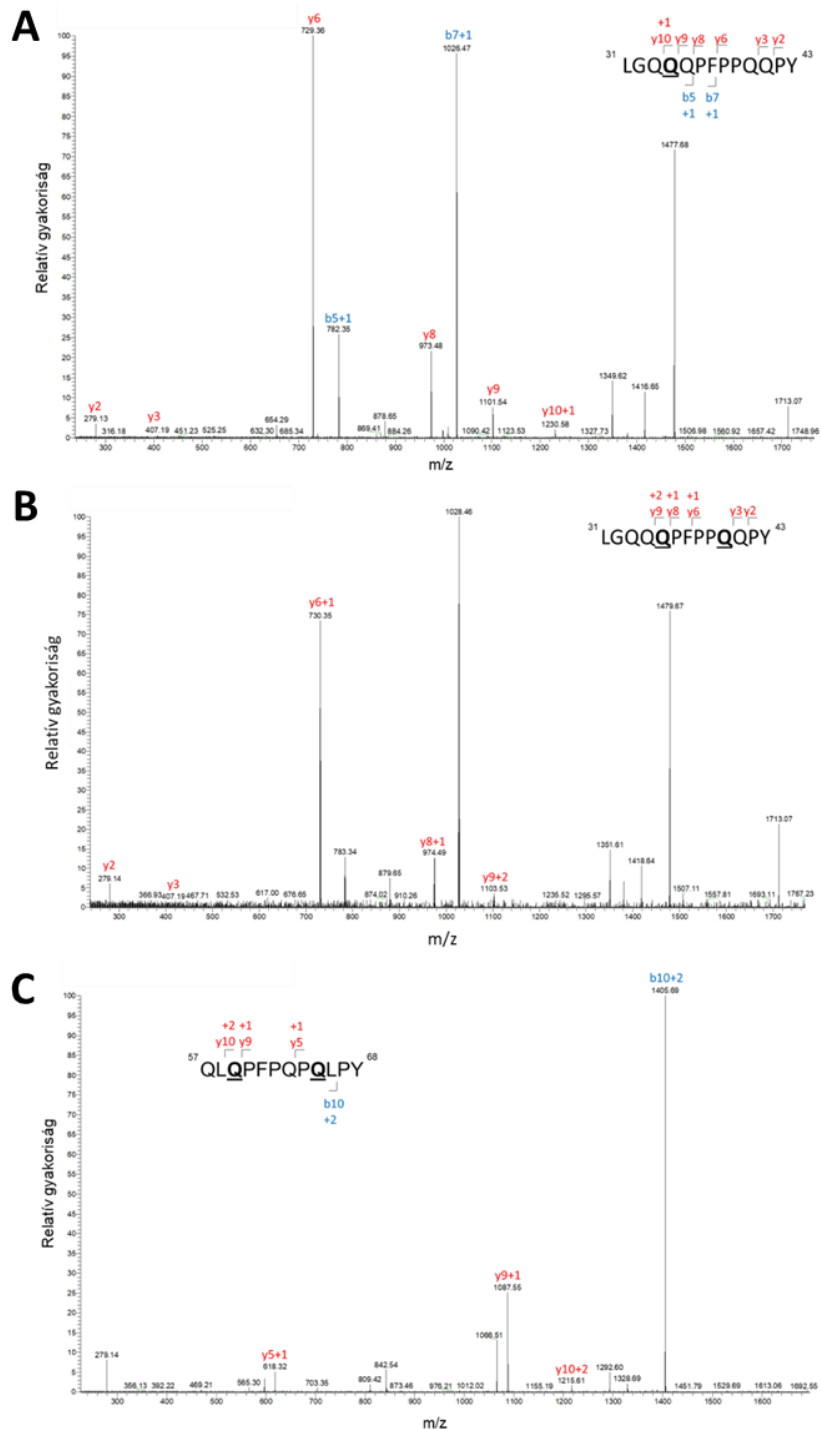
A statisztikai vizsgálatokat a GraphPad Prism7 (San Diego, CA, USA) program segítségével készítettük. Az egyes mintacsoportok összehasonlítását két csoport esetében párosítatlan kétszélű T-tesztel, míg kettőnél több csoport esetében egyutas ANOVA analízissel, Tukey teszt alkalmazásával végeztük. Azonos minta szettek eltérő kondíciók esetén való összehasonlításához párosított kétszélű T-teszt alkalmaztunk. A normál eloszlást mutató adatok közötti korreláció vizsgálatához Pearson tesztet, míg ettől eltérő esetekben az adatok összehasonlításához nem parametrikus Spearman's Rank korrelációs tesztet használtunk. A mért antitest értékek diszkriminációs értékét receiver operating characteristics (ROC) analízis segítségével vizsgáltuk. A grafikonokon feltüntetett értékek átlagot és szórást, illetve mediánt és interkvartilis tartományokat jeleznek, a $p<0,05$ különbségeket vettük szignifikánsnak.

6. Eredmények

6.1. Az α -gliadin peptidek TG2 általi dezamidációs mintázata

Elsőként a p31-43 és a p57-68 szintetikus α -gliadin peptid rekombináns humán Val²²⁴ TG2 enzim általi dezamidációját vizsgáltuk meg, mivel az utóbbi évek genomikai vizsgálatai alapján kiderült, hogy a korábban elterjedten használt rekombináns TG2 fehérjékkel szemben a normál emberi TG2 a 224-es pozícióban valint tartalmaz és nem glicint (*Kanchan és mtsai, 2013*). A dezamidációs termékeket folyadék kromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriával (LC-MS/MS) azonosítottuk. Arra kerestük a választ, hogy a Val²²⁴ TG2 enzimmel tudjuk-e reprodukálni a p57-68 peptid ismert dezamidációs mintázatát, illetve, hogy képes-e a TG2 dezamidálni a p31-43 peptidet, melyről nincs közvetlen irodalmi adat. Eredményeink szerint a Val²²⁴ TG2 képes egyszeres és többszörös dezamidációt végezni a gliadin peptideken (**11. ábra**). A p57-68 peptid esetén a Q65 pozícióban történő dezamidáció kimutatható volt, mely az ismert DQ2.5-glia- α 1a T-sejt epitóp létrejöttét eredményezi, illetve előfordult dezamidáció a Q59 pozícióban is. A p31-43 peptid esetében a Q34, Q35, illetve Q40 glutaminok dezamidációját detektáltuk. A Q59, illetve a Q35 dezamidáció eredményeként létrejövő, QLEPF, illetve QQEPF motívumok gyenge antigenitása már irodalmi adatok alapján bizonyított (*Schwartz és mtsai, 2004*), míg a Q65, Q34, illetve Q40 dezamidációs események olyan szekvencia motívumokat érintenek, melyek coeliakiában releváns B-sejt epitópokat eredményezhetnek.

A további kísérletes vizsgálatokhoz, a betegek gliadin elleni antitestjeivel történő mérésekhez a fenti TG2 általi dezamidációs eredményeink és a B-sejt epitópokról leírt irodalmi adatok alapján, a következő szintetikus gliadin peptidek natív és dezamidált formáit választottuk: γ Glia_Q és γ Glia_E peptid, mely a QPQQPFP immundomináns B-sejt epitóp illetve annak QPEQPFP dezamidált megfelelője (a kettő együttes jelölése QP(Q/E)QPFP módon történik), p31-43 és p57-68 α -gliadin peptidek natív és E34, E40 illetve E65 dezamidált változata, melyek a QXQPFP B-sejt epitópot illetve a QPQQPFP epitóphoz hasonló motívumot hordoznak. Továbbá a γ Glia_E peptid egy rövidített változatát, a PEQPFP szekvenciát is megvizsgáltuk, hogy vajon a rövidebb epitóp is elegendő-e az antitest kötődéshez. Az összes felhasznált peptid szekvenciát a **12. ábra** mutatja be.



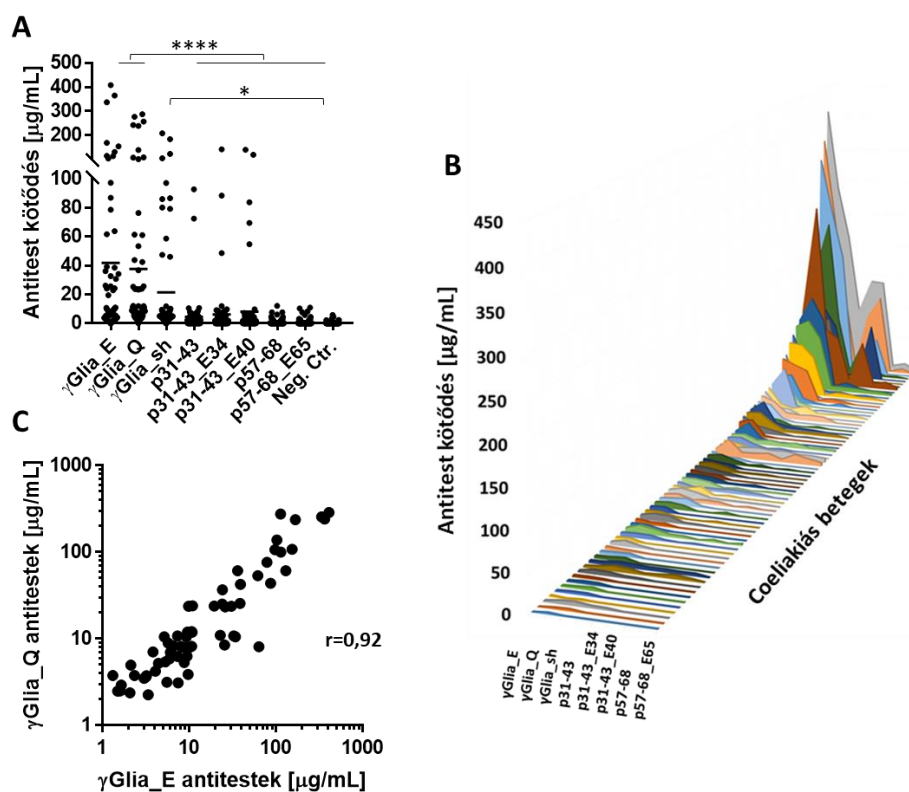
11. ábra. A p31-43, illetve p57-68 α -gliadin peptid humán rekombináns TG2 általi dezamidációjának LC-MS/MS analízise. 50 pmol rekombináns humán TG2 enzimet inkubáltunk 150-szeres moláris feleslegben lévő p31-43, illetve p57-68 peptiddel 2 órán át 37°C-on. A dezamidáció eredményeként keletkezett reakció termékeket LC-MS/MS analízissel detektáltuk. Az MS/MS spektrumon a +1, illetve +2 egyszeres, illetve kétszeres dezamidációt jelölnek az azonosított b- illetve y- fragmensekben. A Scaffold analízis alapján a p31-43 peptid esetében a Q34 (A panel) és Q40 (B panel) pozícióban gyakori volt a dezamidáció, míg a Q35 (B panel) pozícióban ritka. A p57-68 peptid esetében (C panel) a Q65 pozícióban gyakori volt a dezamidáció, míg a Q59 pozícióban ritka.

γ Glia_Q	SGGPL QPQQPFP	γ Glia_Q	SGGPL QPQQPFP
γ Glia_E	SGGPL QPEQPFP	γ Glia_E	SGGPL QPEQPFP
p57-68	QLQPFP QPQLPY	γ Glia_sh	SGG PEQPFP
p57-68_E65	QLQPFP QPELPY	p31-43_E34	LGQ EQPFP PQQPY
p31-43	LGQQPFP PQQPY	p31-43	LGQQ QPFP PQQPY
p31-43_E40	LGQQPFP PEQPY		

12. ábra. A kísérleteinkben alkalmazott szintetikus gliadin peptid szekvenciák. A peptidek N-terminálisan biotint tartalmaztak, illetve az összevethető hosszúság biztosításához SGG összekötő szekvenciát iktattunk be a rövidebb γ -peptidekbe az antigén szekvencia és a biotin közé. A QPQQPFP immunogén γ -gliadin epitóp natív és dezamidált változatát, illetve a rövidebb homológ szekvenciákat szürke négyzet jelöli. A p31-43_E34, p31-43_E40, illetve p57-68_E65 peptidekben az MS/MS spektrum alapján azonosított TG2-specifikus dezamidációk szerepelnek (Q \rightarrow E).

6.2. Az α és γ -gliadin szekvenciák antigenitásának összehasonlítása coeliakiás szérumban

A szérumban antitestek különböző natív és dezamidált α és γ -gliadin peptidekhez való kötődését a ProCeDE elnevezésű prospektív klinikai vizsgálatban részt vett kezeletlen, anti-TG2 pozitív coeliakiás betegek (n=69) szérumban felhasználásával vizsgáltuk meg. Ezeknél a betegeknél összehasonlításra alkalmas, kiterjedt szerológiai tesztpanel eredmények álltak rendelkezésre többféle klinikai kereskedelmi coeliakia antitest tesztel (6 anti-DGP, 9 anti-TG2 antitest teszt, valamint EMA eredmény). Ezek a vizsgálatok komplex antigénnel történtek olyan módszerekkel, melyeknél az értékeket az adott teszt saját kalibrátoraihoz viszonyított relatív értékekben, illetve relatív koncentrációban adták meg, így a számszerű értékek különböztek. Ezért vizsgálatunkhoz biofelszín interferometriás eszközt alkalmaztunk, mely egy valós idejű, jelölés nélküli, optikai úton direkt molekuláris interakciót vizsgáló, rövid peptid antigének tesztelésére alkalmas módszer, mely abszolút koncentráció ($\mu\text{g/mL}$) értékeket szolgáltat és a méréshez másodlagos felismerő antitestre nincs szükség. A kvantitáláshoz minden egyes szintetikus gliadin peptiddel külön kalibrációs görbét vettünk fel, amelyhez betegek szérumból affinitás tisztított antitesteket használtunk. Minden peptid esetében a kalibrációt olyan antitesttel végeztük, melyet az adott peptid felhasználásával izoláltunk. Eredményeink szerint - a korábbi klinikai eredményekkel összhangban - a coeliakiás betegek gliadin peptidre reagáló antitestjei preferenciális módon a γ -gliadin szekvenciákat ismerik fel (**13.A ábra**). A p31-43 α -gliadin peptidek esetén mérsékelt antitest kötődés volt detektálható, a p57-68 α -gliadin peptid esetében viszont rendkívül alacsony antitest reakciók mérhetők.



13. ábra. Kezeletlen coeliakiás betegek (n=69) szérum antitestjeinek kötődése sztreptavidin bioszenzorhoz rögzített biotinilált natív és dezamidált α - és γ -gliadin peptidekhez biofelszín interferometriás vizsgálatban. A mért szérum antitest szintek kétdimenziós (A) illetve 3 dimenziós bemutatása (B). A γ Gliadin_E és γ Gliadin_Q peptidekkel mért értékek korrelációja Spearman analízis alapján (C). A pöttyök egyedi betegek antitest szintjeit, a vonalak pedig az átlag értéket jelölik. Az ANOVA analízis során a $p < 0,05$ értéket tekintettük szignifikánsnak. * $p < 0,05$ **** $p < 0,0001$. Neg.Ctr.: irreleváns peptid.

Amikor az egyes peptidek esetében tapasztalt antitest reakciókat egyéenként vizsgáljuk, megfigyelhetjük, hogy egyetlen páciens esetében sem mutatható ki magasabb antitest kötődés az α -gliadin peptidekhez, mint a γ -gliadinokhoz. Jelentősebb mennyiségű α -gliadin peptidet felismerő antitest csak olyan személyek esetében detektálható, akiknél nagyon nagy mennyiségű γ -gliadinnal reagáló antitest mutatható ki (**13.B ábra**). A coeliakiás betegek többségének azonban csak alacsony gliadin specifikus szérum antitest szintje volt.

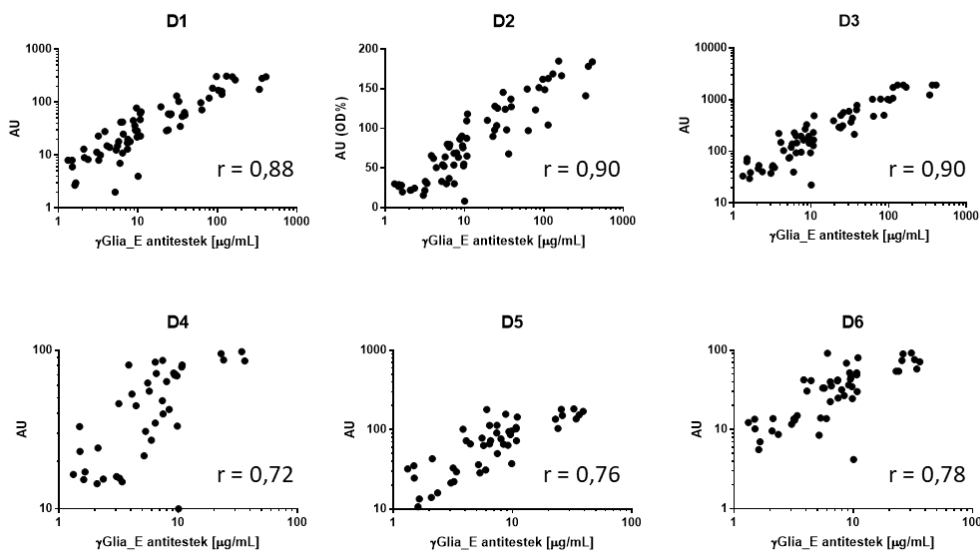
A dezamidált és nem dezamidált gliadin peptidek relatív antigenitása

A natív és dezamidált gliadin peptid szekvenciák összehasonlításakor azt tapasztaltuk, hogy a γ Gliadin_Q és γ Gliadin_E peptidekkel detektált antitest koncentráció értékek kiváló lineáris korrelációt ($r=0,92$) mutatnak (**13.C ábra**). Ez arra utal, hogy a szérum antitestek hasonlóan kedvezően ismerik fel mind a natív, mind a dezamidált γ -gliadin peptidet. Bár a coeliakiás betegek esetében kissé magasabb értékeket kaptunk a dezamidált peptiddel, a különbség nem

szignifikáns (γ Glia_Q kontra γ Glia_E $p=0,74$). A p31-43, illetve p57-68 peptidek esetében sem mutatható ki szignifikáns különbség a natív és dezamidált peptidek szérumban antitestek általi felismerésében.

A PLQPEQFPF γ -gliadin peptid reaktivitás jó korrelációt mutat a klinikai tesztek eredményeivel

A γ Glia_E peptiddel mért szérumban antitest szintek jó korrelációt mutatnak 6 különböző klinikai gyakorlatban használt gyári anti-DGP IgG antitest teszt eredményeivel (**14. ábra**). A korreláció vizsgálatánál figyelembe vettük, hogy az adott gyári teszt logaritmikus (küszöb-kalibrátoros ELISA tesztek) vagy koncentráció-arányos (koncentráció-alapú kalibrátor soros tesztek és fluoreszcens tesztek) számítását alkalmaz.



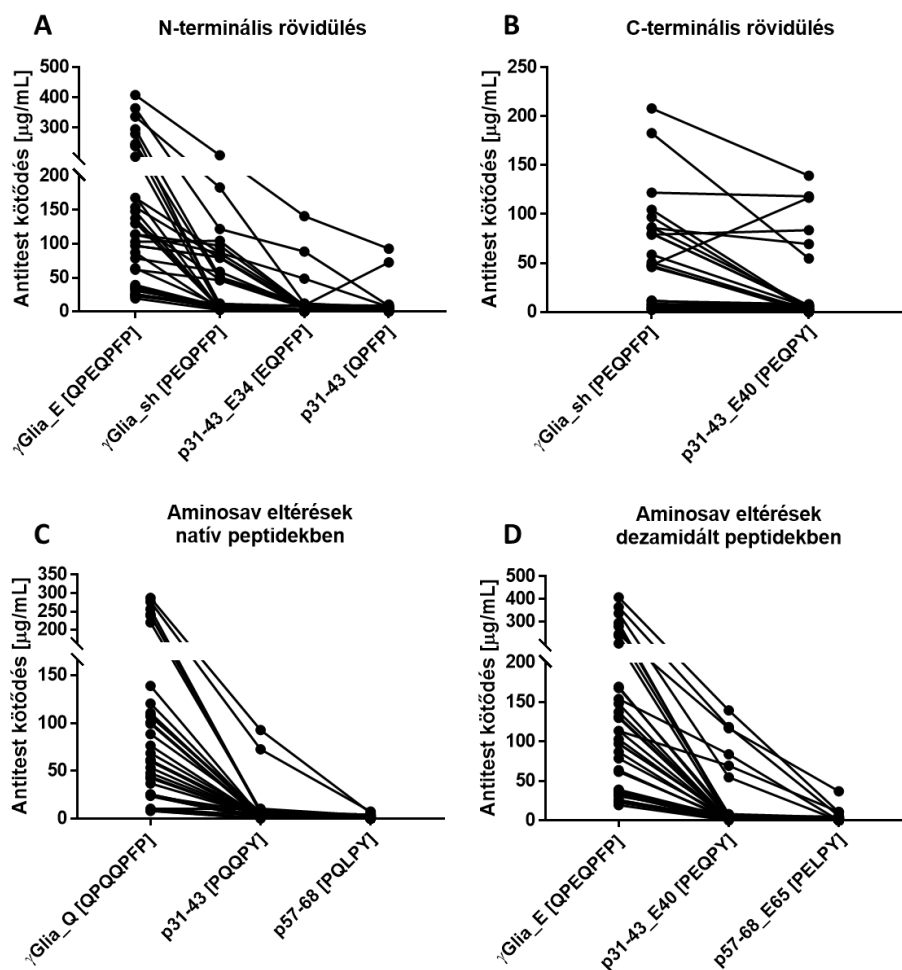
14. ábra. A biofelszín interferometriás vizsgálatokban kezeltlen coeliakiás páciensek ($n=69$) szérumban γ Glia_E (QPEQFPF) peptiddel detektált antitest koncentráció értékek korrelációja 6, klinikai diagnosztikai anti-DGP IgG antitest teszt eredményével. D1-D6: a ProCeDE tanulmányban felhasznált klinikai anti-DGP IgG diagnosztikai tesztek (*Werkstetter és munkatársai, 2017*). A D1, D3, D4, D5 és D6 teszt antitest koncentráció értékei egy gyártói kalibrációs görbe alapján relatív egységben (AU, arbitrary unit) vannak kifejezve. A D2 teszt eredményét az általa optikai denzitás értékben (OD) meghatározott küszöb érték többszöröseként fejezi ki, mely a szignál amplifikáció következtében logaritmikusan arányos az antitest koncentrációval. Az értékek korrelációs analízisét Spearman's rank teszttel végeztük. A mérési tartományon kívül eső mintákat kizártuk a korrelációs analízisből az alábbiak szerint D1 (EliA GliadinDP IgG; Thermo Fisher): 0 minta, D2 (QUANTA Lite DGP IgG; Inova Diagnostics): 0 minta, D3 (QUANTA Flash DGP IgG; Inova Diagnostics) és D4 (α -Gliapép-IgG-code 9138; Eurospital): 27 minta, D5 (Anti-Gliadin(GAF-3X)-ELISA IgG; EUROIMMUN): 17 minta D6 (Anti-DGPx1-IgG; Zedira): 18 minta).

Ezen eredmény jelentősége abban rejlik, hogy a gyári tesztek publikusan nem ismert szekvenciájú komplex gliadin antigéneket alkalmaznak, a mi méréseinkben viszont egyetlen rövid peptid szekvenciát használtunk. Az eredmények szerint az általunk alkalmazott γ Glia_E peptid segítségével a teljes gliadin elleni antitest mennyiség túlnyomó többségét képesek voltunk detektálni, mely megerősíti, hogy a betegek szérumában az γ -gliadin-specifikus antitestek vannak többségben. Az α -gliadin peptidokkal mért reakciók viszont jelentősen alul becsülik a teljes antitest szintet, ilyen peptideket alkalmazva a gliadin elleni antitestek jelentős részét nem tudjuk detektálni.

Az epitópok hosszának és szekvencia különbségeinek hatása az antitest kötődésre

A teljes dezamidált QPEQFPF heptapeptid epitópot hordozó γ Glia_E peptidhez képest a rövidebb homológ szekvenciákkal rendelkező peptidek jelentősen csökkent antitest kötő képességgel rendelkeznek (**15.A ábra**).

Az N-terminális irányból rövidülő motívumok a teljes dezamidált epitópot (QPEQFPF) hordozó γ Glia_E peptidhez képest a PEQFPF (γ -Glia_sh peptid része), EQFPF (p31-43_E34 peptid része) és QFPF (p31-43 peptid része) szekvenciák antitest kötőképessége csupán 33,1%, 8,9% illetve 6,2%. A C-terminális irányból rövidülő PEQPY motívum (p31-43_E40 peptid része) antitest kötő képessége pedig 43,7%-a teljes epitópot hordozó PEQFPF (γ Glia_E peptid része) peptid antitest kötőképességének. (**15.B ábra**), azonban itt a prolin hiányán túl az aromás aminosav minősége is eltérő, ami szintén hozzájárulhat a csökkent kötőképességhez. A heptapeptid epitóp motívum rövidítése és a fennálló fenilalanin/tirozin csere hatásai kisebb antitest kötőképesség csökkenést idéztek elő a dezamidált peptidek esetén, mint a natív peptidekben (**15.C, D ábra**). Ugyanakkor a p31-43 peptidben található PEQPY/PQQPY epitóphoz képes a PELPY/PQLPY epitópot hordozó p57-68 peptidek jelentősen gyengébb antitest kötőképességgel rendelkeznek, ami arra utal, hogy a glutamin/leucin csere dezamidációtól függetlenül erősen negatív hatással bír.



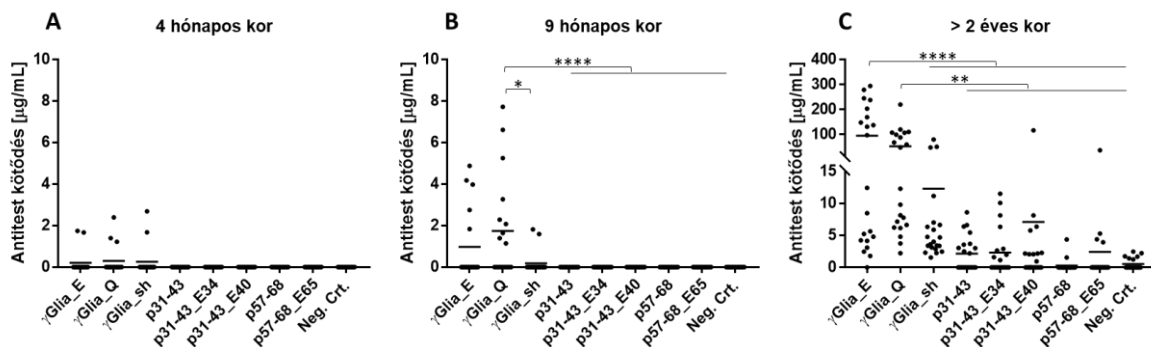
15. ábra. Az α és γ -gliadin peptidek epitópjában fellelhető aminosav különbségek és az epitóp motívum rövidülésének szérumban antitest kötődésre gyakorolt hatása. A γ Glia_E heptapeptid (illetve az ezzel homológ) motívumok N-terminális irányból történő (A) illetve C-terminális irányból történő (B) rövidítése által az antitest kötődésben bekövetkező változások. A dezamidált (C) és natív szekvenciák (D) esetében fennálló aminosav különbségek hatása a szérumban antitestek általi felismerésre. Az ábrán csak a $20\mu\text{g/mL}$ szintet meghaladó antitest reakciók vannak feltüntetve ($n=36$), a vonallal összekötött pontok adott páciens reakcióját mutatják. A peptidek teljes szekvenciája a 12. ábrán látható.

6.3. A legkorábban termelődő gliadin elleni antitestek célpontjai a γ -gliadin peptidek

A gliadin elleni humorális immunválasz megjelenését és korai életkorban tapasztalható sajátságait a PreventCD tanulmányból származó szérumban minták felhasználásával vizsgáltuk. A tanulmányban magas coeliakia kockázattal született csecsemők vettek részt, akiket prospektív vizsgálatokkal követték az első glutén beviteltől kezdődően. 21 coeliakiássá váló páciens 4 hónapos, 9 hónapos, illetve 2 éves kor fölött gyűjtött szérumban mintáját vizsgáltuk meg biofelszín interferometriás módszerrel, hogy összehasonlítsuk α és γ -gliadin peptidekre adott szérumban antitest reakcióikat. A 4 hónapos kori minta idején a csecsemők még nem fogyasztottak glutént,

9 hónapos korukra viszont a páciensek mindegyike glutén tartalmú étrendet követett. A 2 éves kor után vett minták pedig a coeliakia diagnózisának idejéről származnak, amikor a TG2 elleni antitest pozitivitás már igazolható volt.

A 4 hónapos korból származó minták között 3 esetben detektáltunk alacsony mennyiségben γ -gliadin peptid elleni antitesteket, viszont ezek egyértelműen anyai eredetű IgG antitestek voltak (minden esetben az anya antitest pozitív, aktív coeliakiás volt) A csecsemők ekkor, még nem fogyasztottak glutént és az antitest termelést lehetővé tevő önálló adaptív immunitásuk még nem fejlődött ki (**16.A ábra**).



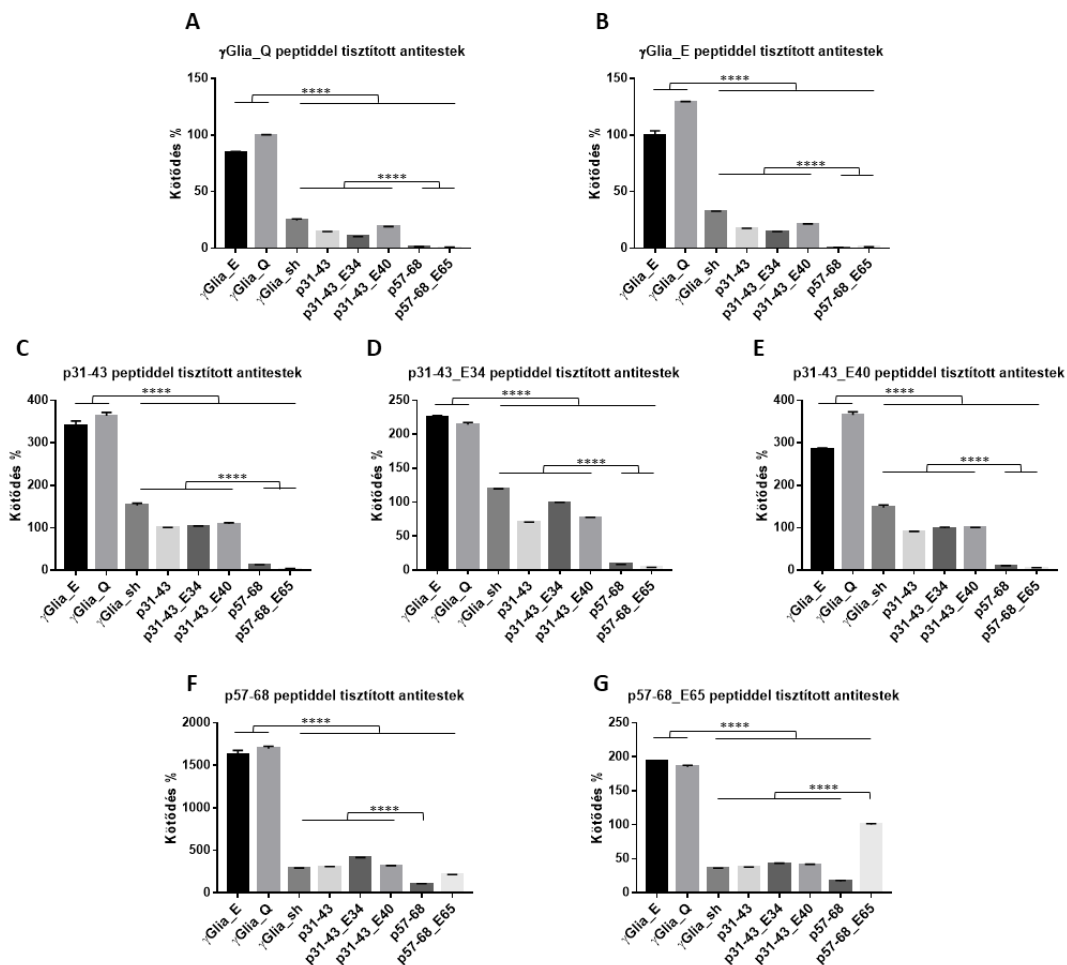
16. ábra Magas coeliakia rizikóval rendelkező csecsemők (n=21) humorális gliadin elleni immunválaszának kifejlődése. Szérum antitestek natív, illetve dezamidált α - és γ -gliadin peptidekhez történő kötődésének mérése biofelszín interferometriás módszerrel 4 hónapos (A), 9 hónapos (B) és > 2 éves (C) korban (a coeliakia diagnózis idején). A vonalak átlag értékeket jelölnek. Az ANOVA analízis során a $p < 0,05$ értéket tekintettük szignifikánsnak. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ **** $p < 0,0001$. Neg.Ctr: irreleváns peptid.

9 hónapos korban a gyermekek már glutén tartalmú étrendet követtek és gliadin elleni antitest termelés is detektálható volt. A termelődő gliadin elleni antitestek kizárólagos módon a γ -gliadin peptid szekvenciákat ismerték fel (**16.B ábra**), mely arra utal, hogy elsőként a γ -gliadin szekvenciákra reagáló B-sejt klónok aktiválódnak. A 2 éves kor feletti, coeliakia diagnózis idejéről származó minták esetében, amikor a TG2-specifikus antitest pozitivitás és a boholy atrófia is kimutatható volt, már a p31-43 és p57-68 α -gliadin peptideket felismerő antitestek is megjelennek, de a humorális immunválaszt egyértelműen továbbra is a γ -gliadin peptid szekvenciákkal reagáló antitestek dominálják (**16.C ábra**).

6.4. A gliadin specifikus antitestek α és γ -gliadin keresztreaktivitása

A detektált gliadin elleni antitestek keresztreaktivitásának megvizsgálásához coeliakiás betegek szérum mintájából antitesteket nyertünk ki a különböző gliadin peptid szekvenciák felhasználásával. Minden egyes natív és dezamidált gliadin peptiddel külön-külön affinitás

tisztítást végezve különböző antitest populációkat izoláltunk és megvizsgáltuk, hogy az egyes antitest populációk hogyan kötődnek a különböző peptid antigénekhez.



17. ábra Coeliakiás páciensek szérum mintájából egyedi gliadin peptid szekvenciákkal tisztított antitestek keresztreakciójának vizsgálata. Az egyes tisztításokban a következő peptid antigének kerültek felhasználásra: 2 γ -gliadin (γ Glia_Q, γ Glia_E) és 5 α -gliadin (p31-43, p31-43_E34, p31-43_E40, p57-68 and p57-68_E65) szekvencia. 100% értéknek azt a peptid-antitest interakciót tekintettük, amelyik peptiddel az adott antitestek tisztítása történt. Az oszlopok az átlagokat és a szórást reprezentálják. Az ANOVA analízis során a $p < 0,05$ értéket tekintettük szignifikánsnak. **** $p < 0,0001$

A γ Glia_Q, illetve a γ Glia_E peptid antigén alkalmazásával izolált antitest populációk azonos antigén kötődési tulajdonsággal rendelkeznek. Mindkét poliklonális antitest reagens a γ Glia_Q és γ Glia_E peptidek iránt mutatta a legnagyobb mértékű kötődést, ugyanakkor a p31-43 peptideket is jól detektálható módon felismerték (közülük is legjobban a p31-43_E40 peptidet), viszont a p57-68 peptidek esetében rendkívül gyenge kötődést mutattak (17.A, B ábra). A γ -gliadin peptidek közül a γ Glia_sh peptid kevésbé bizonyult jó antigénnek, ennek oka minden bizonnyal a peptidlánc csökkent hossza lehet. Érdekes módon a γ Glia_E peptiddel izolált

antitestek egyforma kötődést mutattak a dezamidált (γ Glia_E) és a natív (γ Glia_Q) γ -gliadin peptidek esetében, ez megerősíti a direkt módon szérumból végzett antitest kvantitálás során tapasztalt eredményeket.

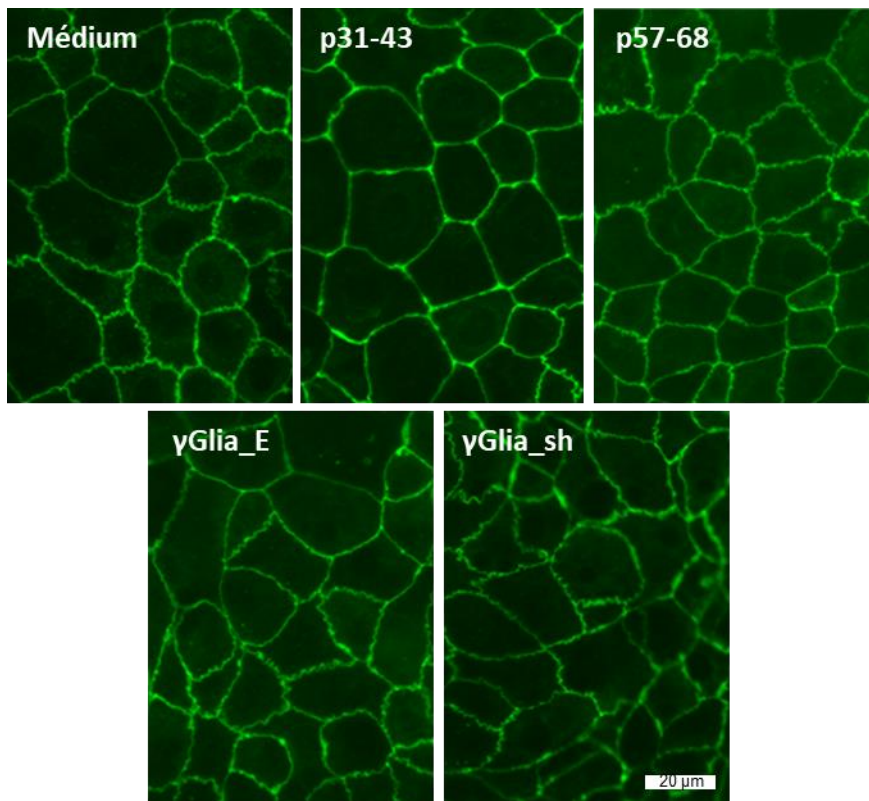
Amikor az egyes p31-43 α -gliadin peptideket használtuk antigénként az affinitás tisztítások során, a kinyert antitest populációk érdekes módon minden esetben preferenciálisan a γ Glia_Q és γ Glia_E szekvenciákhoz kötődtek az α -gliadin peptidek helyett, mely egyértelműen jelzi, hogy erősen keresztreakáló antitestekről van szó. Akár natív, akár dezamidált p31-43 α -gliadin peptiddel izolált antitest populációról volt is szó, mindegyikük egyforma kötődést mutatott a p31-43, p31-43_E34, p31-43_E40 és γ Glia_sh peptid szekvenciákhoz, viszont nagyon gyengén reagált a p57-68 és p57-68_E65 peptidekkel (**17.C, D, E ábra**). Ez utóbbi eredmény azt mutatja, hogy bár a p31-43 α -gliadin peptidek és a γ Glia peptidek között keresztreakció mutatható ki, a p57-68 α -gliadin peptid jelentősen különböző antigénként viselkedik. Ennek oka lehet, hogy a p57-58 α -gliadin peptid esetében hiányzik a PQQ motívum, míg a p31-43 α -gliadin peptid, mely a coeliakiás páciensek szérum antitestjei számára a γ Glia szekvenciákhoz hasonló antigénként viselkedik, hordozza ezt a motívumot.

Bár a szérumból történő antitest mérések során a p57-68 és p57-68_E65 α -gliadin peptidek gyenge antigénként viselkedtek, mégis sikerült a betegek szérumából ezen peptidek felhasználásával antitesteket izolálnunk. Az így nyert antitestek szintén a γ Glia_Q és γ Glia_E peptid szekvenciákat ismerték fel a leghatékonyabban, tehát keresztreakálók. A natív p57-68 peptiddel izolált antitestek a p31-43 peptid szekvenciákat is jobban ismerték fel, mint a p57-68 peptideket, ezáltal pedig a p31-43 peptidek által izolált antitest populációkkal teljesen azonos módon viselkedőnek tekinthetők. A dezamidált p57-68_E65 peptid által izolált antitest populáció viszont sokkal jobban reagált a p57-68_E65 peptid szekvenciával, mint bármelyik p31-43 peptiddel vagy akár a natív p57-68 peptiddel, így ez az antitest populáció egyértelműen dezamidáció dependens kötődésűnek tekinthető (**17.F, G ábra**). Hasonló dezamidált peptid iránti preferenciális antitest kötődést a p31-43_E34 peptiddel izolált antitest populáció esetében is megfigyeltünk. Fontos megemlíteni, hogy az α -gliadin peptidekkel izolált dezamidációt preferáló antitestek a γ -gliadin peptidek esetében is a dezamidált (γ Glia_E) szekvenciát részesítették előnyben a natívval (γ Glia_Q) szemben.

6.5. A hasonló gliadin szekvenciák biológiai hatásának vizsgálata Caco2 sejteken

Mivel a p31-43 peptidet felismerő antitestek jellemzően keresztreakáltak a γ -gliadin peptidekkel, megvizsgáltuk, hogy szekvencia hasonlóságuk nyomán vajon a γ -gliadin peptidek

is képesek-e kifejteni a p31-43 peptiddel kapcsolatban jól ismert sejtszintű (ún. 'toxikus') hatást Caco2 sejt kultúráján. A Caco2 sejt kultúráján a p31-43 peptid jellegzetes módon a tight junction kapcsolatokat felbomlását idézi elő. Ez jól vizualizálható a citoplazma membránban a tight junction kapcsolódási pontokon előforduló ZO-1 fehérje fluoreszcens jelölésével, mely a toxikus peptid jelenlétében elveszti hullámos interdentációjával jellemezhető mintázatát, a sejt kontúrok kiegyenesednek. Ezt az ismert biológiai hatást ki tudtuk mutatni a biotinilált p31-43 peptiddel, ugyanakkor sem a p57-68, sem pedig a γ -gliadin peptidek nem voltak képesek a nagyfokú szekvencia hasonlóság ellenére a tight junction kapcsolatokat befolyásolni (**18. ábra**). Az eredmények alapján a p31-43 peptid toxikus hatása egyedi, a homológ γ -gliadin peptid szekvenciákkal nem reprodukálható.



18. ábra Caco-2 sejt kultúra immunfluoreszcens festése anti-ZO1 antitestek alkalmazásával. Az anti-ZO1 antitest festődés a tight junction kapcsolatokat jeleníti meg, a biotinilált α -gliadin (p31-43, p57-68) és γ -gliadin (γ Glia_E, γ Glia_sh) peptidekkel történő 24 órás inkubáció hatását vizsgáltuk ezen sejt-sejt kapcsolatra. A képek két ismételt kísérletből származó reprezentatív felvételek.

6.6. A PreventCD tanulmány mintáinak vizsgálata – klinikai kimenetel

A korábbi kísérleteinkben a coeliakiás betegek α és γ -gliadin peptidekre irányuló szérumban antitestreakcióit vizsgáltuk meg, melyből jól látható, hogy a domináns antigén a γ -gliadin és az α -gliadin elleni válasz leginkább keresztreakció eredménye.

A továbbiakban a PreventCD tanulmányban részt vevő csecsemők gliadin elleni antitestválaszát vizsgáltuk a prospektív vizsgálat során vett szérumban minták felhasználásával. A PreventCD nemzetközi tanulmány egyedülálló lehetőséget kínált a coeliakia rizikóval rendelkező gyermekek immunválaszának az első glutén beviteltől kezdődő követéses vizsgálatára, továbbá a coeliakiássá váló, illetve később nem érintett gyermekek immunválaszának összehasonlítására.

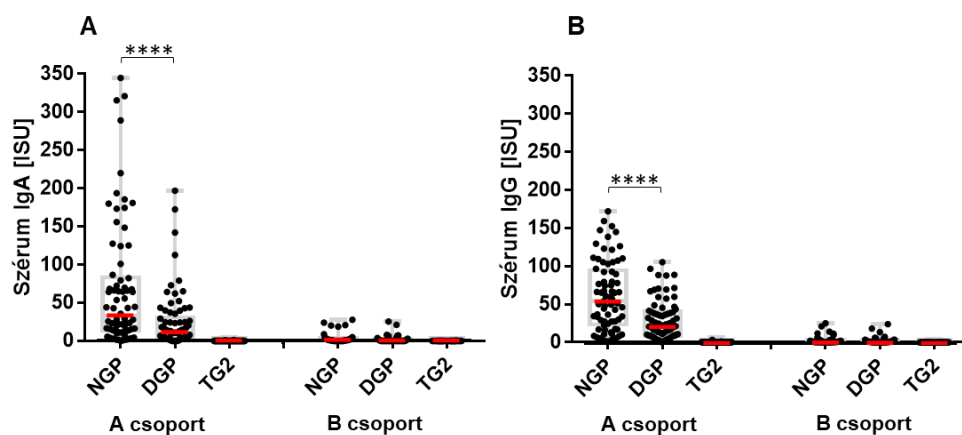
Az eredeti PreventCD tanulmány elsődleges célkitűzése a coeliakia lehetséges megelőzésének vizsgálata volt kis dózissal, korai glutén bevitellel genetikai rizikóval rendelkező csecsemőkben. A csecsemők egy része 4 és 6 hónapos kora között vitális glutén készítményt kapott (A csoport vagy intervenciócsoport), míg másik részük ezalatt placebo készítményt (B csoport vagy kontrolcsoport). 6 hónapos kor után mindkét csoportba tartozó gyermekek azonos módon, emelkedő mennyiségben, majd 10 hónapos kortól szabadon fogyaszthattak glutént, és az esetleges coeliakia diagnózis kimondásáig glutén tartalmú étrendet tartottak. Az előütemezett vérminta vételek időpontja 4, 6, 9, 12, 24, 36 hónapos korban volt és a coeliakia diagnózisának kimondásakor, ettől eltérő időpontban is vettek mintát. A PreventCD eredményei alapján az elsődleges kimeneti végpont nem teljesült, a coeliakia kialakulásának arányában nem volt szignifikáns különbség az intervenciócsoport és a placebo csoport között (*Vriezinga és mtsai, 2014*), azonban az azonos dózissal, azonos életkorban adott glutén hatásainak vizsgálatára a levett minták páratlan lehetőséget adnak.

A következőkben a coeliakia főbb antigénjei (nem dezamidált gliadin peptidek – NGP, dezamidált gliadin peptidek – DGP, szöveti transzglutamináz – TG2) ellen irányuló szérumban antitestek változását követtük nyomon MedALL fehérje mikrochip módszer segítségével és hasonlítottuk össze a coeliakiássá váló, illetve nem váló rizikó csecsemők válaszát az egyes csoportokban.

6.7. A primer glutén-expozícióra adott korai antitest válasz elemzése

Az A csoportban a csecsemők jelentős antitest termeléssel válaszoltak a 8 hetes glutén táplálásra. A 6 hónapos kori szérumban mintákban IgG és IgA antitestreakció egyaránt kimutatható

volt, mind az NGP, mind pedig a DGP iránt (**19.A,B ábra**), de coeliakiát jelző TG2 specifikus antitestek nem jelentek meg. Ebben a kezdeti immunválaszban az antitest koncentrációk szignifikánsan magasabbak voltak az NGP antigénre, mint a DGP antigénre. A gliadin elleni IgA immunválasz bizonyítja a csecsemők saját adaptív immunválaszát a táplálékban található antigénre, hiszen ilyen antitestek nem juthatnak a csecsemő keringésébe transzplacentális transzfer vagy anyatejes táplálás útján (*Van De Perre, 2003*). A B csoportban lévő csecsemők 6 hónapos korukig csak placebo kaptak, így szérumbelvételeik nem mutattak reakciót ezen időpontban, viszont 9 hónapos korban, a glutén tartalmú étrend bevezetését követően, hasonló, az NGP és DGP ellen irányuló antitest termelést mutattak (lásd később, 23. ábra).

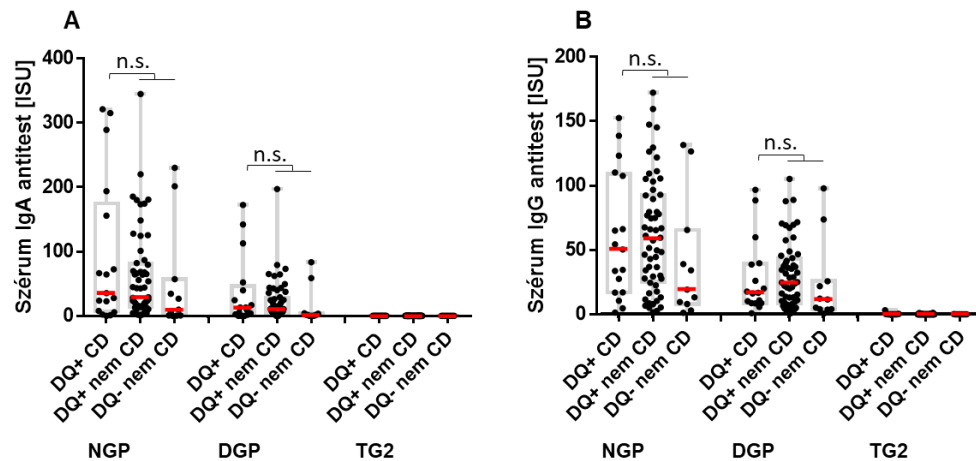


19. ábra. IgA és IgG szérumbelvételek termelődése a 8 hetes glutén intervenciót (A csoport n=74) illetve placebo fázist (B csoport n=48) követően. Nem dezamidált gliadin (NGP), dezamidált gliadin (DGP) és szöveti transzglutamináz (TG2) elleni szérumbelvételek kimutatása Alexa Fluor 546 jelölt anti-humán IgA illetve IgG másodlagos antitestek alkalmazásával fehérje mikrochip módszer segítségével. ISU a detektált fluoreszcencia intenzitás, mely arányos a szérumbelvételek koncentrációjával. A grafikonok a mediánt (piros vonal) és az interkvartilis értékeket (szürke téglalapok) reprezentálják. Az ANOVA analízis során a $p < 0,05$ értéket tekintettük szignifikánsnak. **** $p < 0,0001$

6.8 A korai antitest válasz értékelése a coeliakia manifesztáció, illetve a genotípusok alapján

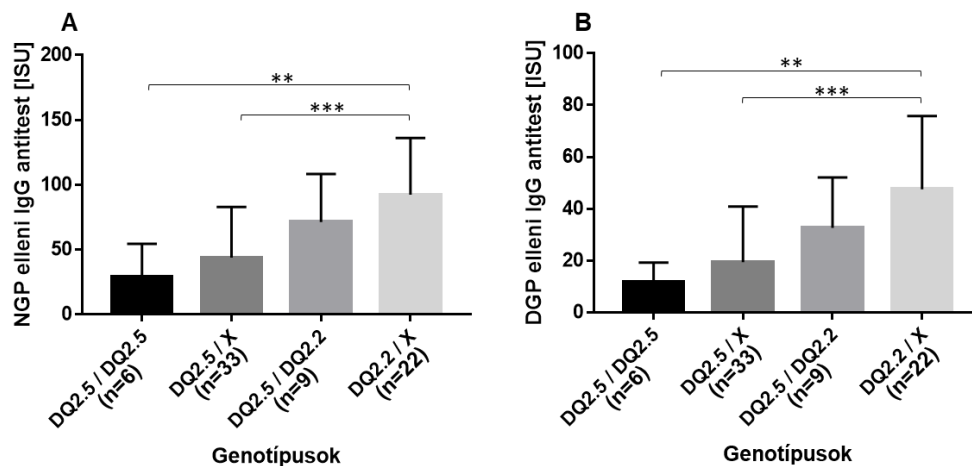
Az A csoportba tartozó, HLA-DQ2, illetve DQ8 rizikó allélekkel rendelkező, később coeliakiássá váló, illetve nem váló csecsemők hasonló IgA (**20.A ábra**) és IgG (**20.B ábra**) ellenanyag termeléssel reagáltak a glutén bevitelre, mint a coeliakiával érintett családban született, de HLA-DQ rizikó alléllal nem rendelkező csecsemők. Ezen alcsoportok mindegyikében, a coeliakiásokat is beleértve, szintén megfigyelhető, hogy korai

immunválaszuk során a nem-dezamidált gliadin ellen magasabb antitest szintet regisztráltunk, mint a dezamidált gliadin ellen és ezen gliadin elleni humorális reakció nem társult TG2-specifikus antitestek megjelenésével.



20. ábra. A később coeliakiás (n=17), nem coeliakiás (n=57) illetve a HLA-DQ2/DQ8 negatív (n=11) csecsemők 8 hetes glutén bevitelre adott korai IgA és IgG szérumszintjei hasonlóak. Nem dezamidált gliadin (NGP), dezamidált gliadin (DGP) és szöveti transzglutamináz (TG2) elleni szérumszintjei kimutatása Alexa Fluor 546 jelölt anti-humán IgA illetve IgG másodlagos antitestek alkalmazásával fehérje mikrochip módszer segítségével. CD = coeliakia, ISU = detektált fluoreszcens intenzitás, mely arányos a szérumszint koncentrációval. A grafikonok a mediánt (piros vonal) és az interkvartilis értékeket (szürke téglalapok) reprezentálják. Az ANOVA analízis során $p < 0,05$ tekintettük szignifikánsnak. n.s. nem szignifikáns.

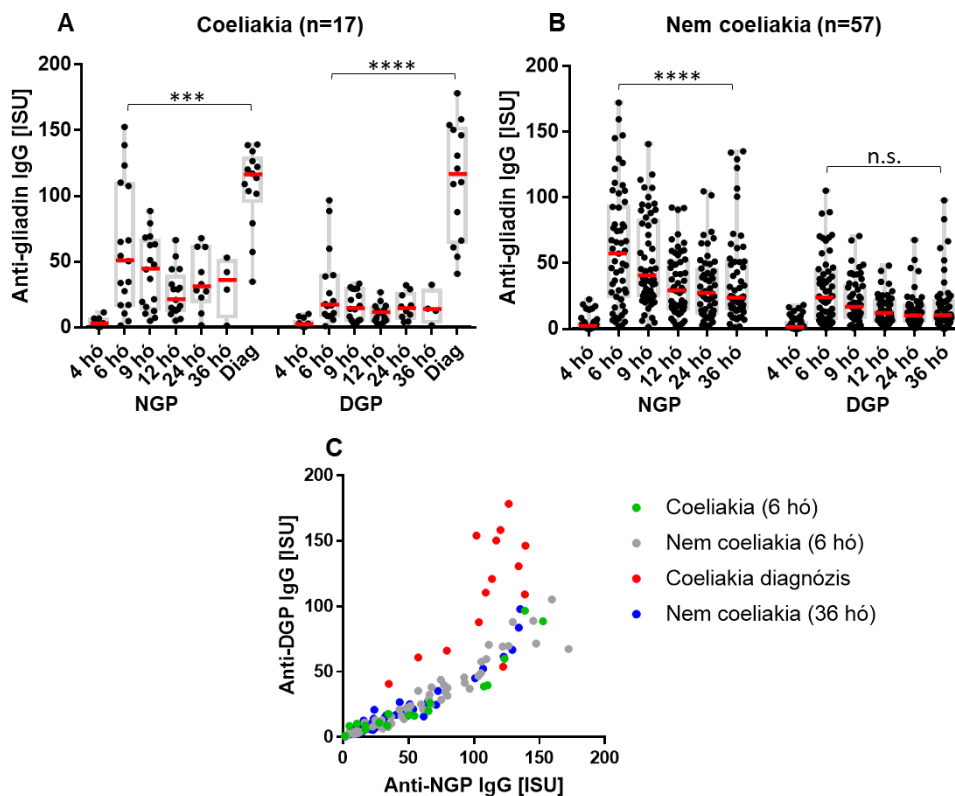
A csecsemők korai glutén elleni humorális immunválaszában érdekes tendenciát figyelhetünk meg, ha a HLA-DQ genotípusok szerint csoportosítjuk az A csoportba tartozó egyéneket. Azt tapasztalhatjuk, hogy a coeliakia kifejlődésére magas kockázatot jelentő HLA-DQ2.5 genotípussal rendelkező személyek jellemzően jelentősen alacsonyabb szintű IgG (21.A ábra), illetve IgA (21.B ábra) antitest termeléssel reagáltak az adott mennyiségű glutén bevitelre, mint a coeliakia kifejlődésére kisebb kockázatot jelentő HLA-DQ2.2/HLA-DQ2.5 vagy csak DQ2.2 genotípussal rendelkező személyek. A legmagasabb kockázatú HLA-DQ2.5 genotípusra homozigóta személyek pedig még kisebb antitest termeléssel reagáltak vagy számos esetben egyáltalán nem is volt mérhető korai antitest válaszuk.



21. ábra. Az A csoportba tartozó csecsemők 6 hónapos kori NGP, illetve DGP elleni antitest válasza genotípusok szerint. HLA genotípusok esetén az X az egyéb nem DQ2, nem DQ8 alléleket jelöli. Nem dezamidált gliadin (NGP), dezamidált gliadin (DGP) elleni szérumban antitestek kimutatása Alexa Fluor 546 jelölt anti-humán IgA illetve IgG másodlagos antitestek alkalmazásával fehérje mikrochip módszer segítségével. ISU a detektált fluoreszcens intenzitás, mely arányos a szérumban antitest koncentrációval, az oszlopok az átlagokat és a szórást reprezentálják. Az ANOVA analízis során a $p < 0,05$ értéket tekintettük szignifikánsnak. ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$

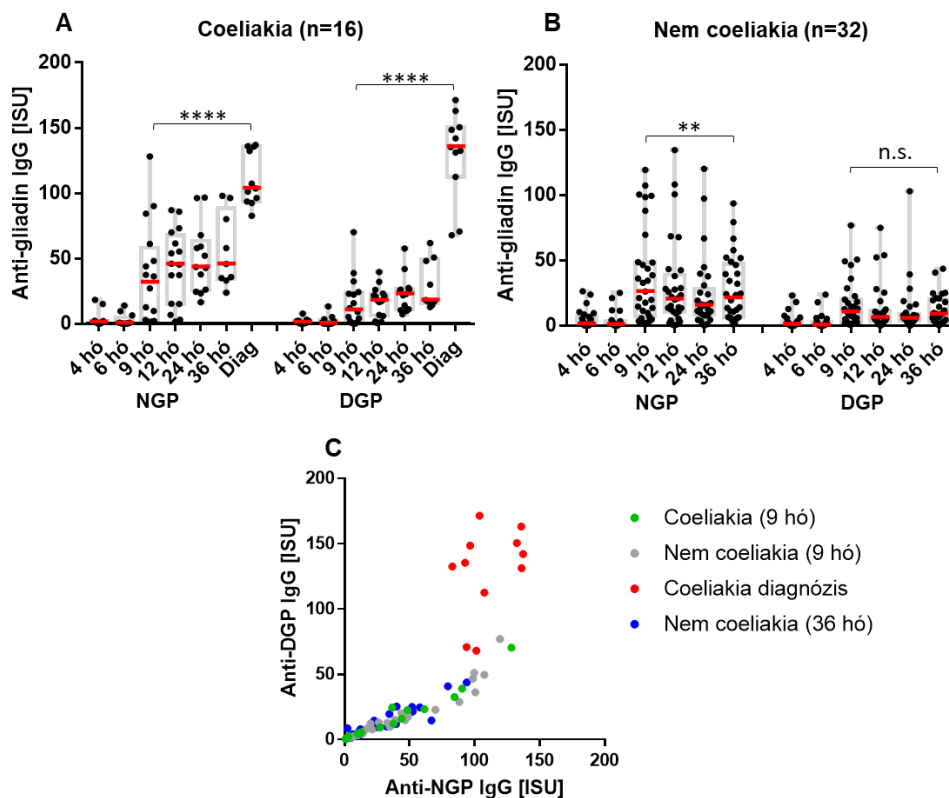
6.9. Az NGP/DGP felismerés változása a korai immunválasz során és a coeliakia manifesztációja idején

Az A csoportba tartozó coeliakiássá váló, illetve nem váló rizikó csecsemők NGP és DGP elleni irányuló antitest válaszát vizsgálva megállapítható, hogy a coeliakiássá váló gyermekek esetén két kiemelkedő antitest válasz detektálható: az első 6 hónapos korban a primer glutén bevitelre adott korai reakció, míg a másik a coeliakia diagnózis idején tapasztalható, e két pont között pedig a szérumban antitestek csökkenő tendenciája figyelhető meg (**22.A ábra**). A coeliakiássá nem váló rizikó gyermekek esetében viszont csak egy, a gluténre adott korai immunválasz detektálható (**22.B ábra**). A korai antitest immunválasz - későbbi coeliakia kialakulásától független - közös jellemzője, hogy az NGP antigént részesíti előnyben a DGP-vel szemben. Ezen NGP iránt mutatott preferenciális kötődés a követés teljes időtartamában megmarad azon gyermekeknél, akik nem lesznek coeliakiások, míg a coeliakiássá váló gyermekeknél a diagnózis időpontjában tapasztalható az addig alulreprezentált DGP elleni antitestek nagymértékű megemelkedése (**22.C ábra**). Ezen tendencia mind az IgG, mind az IgA antitestek esetén fellelhető, de az IgA válasz kevésbé egységes (nem mindenkinél jelentkezik).



22. ábra. Az A csoportban lévő gyermekek gliadin elleni antitest immunválasza a követéses vizsgálat időtartama alatt. A coeliakiássá váló (A) illetve nem váló (B) gyermekek szérumban detektált NGP, illetve DGP elleni antitest átlagkoncentrációk. Az egyes gyermekek NGP, illetve DGP elleni reakcióinak korrelációja a primer glutén bevitelt követő korai immunválasz, illetve a coeliakia diagnózis idején (C). A szérumban antitestek kimutatása Alexa Fluor 546 jelölt anti-humán IgG másodlagos antitest alkalmazásával, fehérje mikrochip módszer segítségével történt. Alkalmazott rövidítések hó = hónap (életkor), Diag = a coeliakia diagnózis időpontja (3-5,5 éves kor között). ISU a detektált fluoreszcens intenzitás, mely arányos a szérumban antitest koncentrációval. A grafikonok a mediánt (piros vonal) és az interkvartilis értékeket (szürke téglalapok) reprezentálják. Az ANOVA analízis során a $p < 0,05$ értéket tekintettük szignifikánsnak. * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$

Hasonlóképpen, a B csoportba tartozó coeliakiássá váló (23.A ábra) és nem váló (23.B ábra) gyermekek esetében is tapasztalható, hogy 9 hónapos korban, a primer glutén bevitelt követően (6 hónapos korig csak placebo kaptak) a termelődő korai antitestek az NGP kötést preferálják. Ez a tendencia kizárólag a coeliakiássá váló gyermekeknél a diagnózis idején változik meg és tolódik az antitest válasz a DGP irányába (23.C ábra).



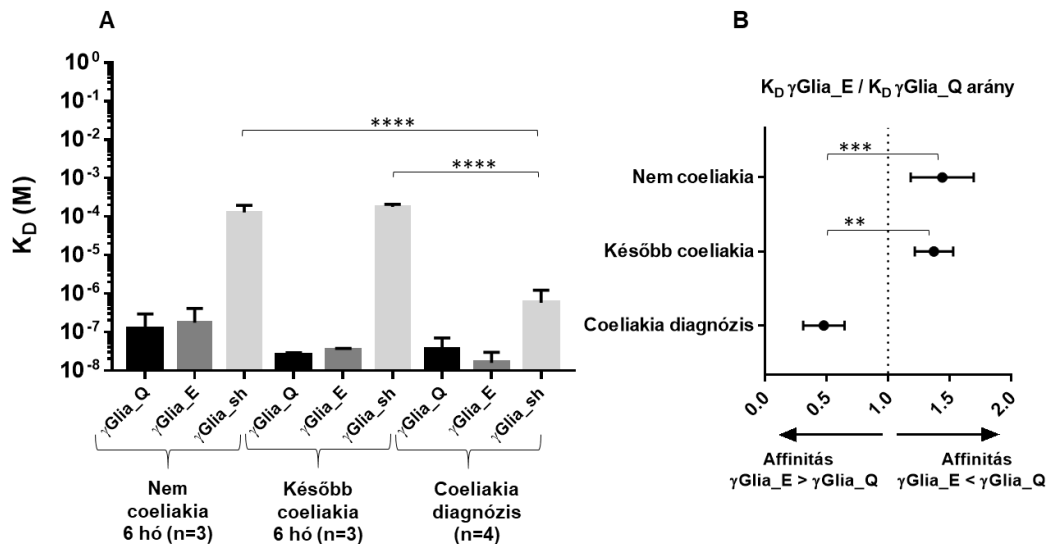
23. ábra. A B csoportban lévő coeliakiássá váló (A) illetve nem váló (B) gyermekek követéses vizsgálat időtartama alatt detektált gliadin elleni antitest válasza. A primer glutén bevitt követő korai immunválaszt a nem dezamidált gliadin elleni antitestek dominálják, míg a coeliakia diagnózis idején az egyének antitest válasza a dezamidált gliadin felé tolódik el (C). A szérumban antitestek kötődésének kimutatása Alexa Fluor 546 jelölt anti-humán IgG másodlagos antitest alkalmazásával, fehérje mikrochip módszer segítségével történt. Alkalmazott rövidítések hó = hónap (életkor), Diag = a coeliakia diagnózis időpontja. ISU a detektált fluoreszcens intenzitás, mely arányos a szérumban antitest koncentrációval. A grafikonok a mediánt (piros vonal) és az interkvartilis értékeket (szürke téglalapok) reprezentálják. Az ANOVA analízis során a $p < 0,05$ értéket tekintettük szignifikánsnak. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$

Eredményeink azt mutatják, hogy a gliadin elleni antitest válasz a TG2 elleni antitestek megjelenésekor (azaz a coeliakia diagnózis idején) kezd a dezamidált gliadin felé tolódni.

6.10. A coeliakia manifesztációval járó affinitás érése a PEQFP epitópra

Szintetikus gliadin peptid szekvenciákat használva, jelölés nélküli molekuláris interakció detektáló biofelszín interferometriás módszerrel vizsgáltuk, hogy a coeliakia rizikójú gyermekek által, a korai immunválasz során termelt gliadin elleni antitestek a coeliakia szempontjából kulcsfontosságú epitópot célozzák-e, illetve, hogy ezen korai antitestek affinitása mennyiben tér el a coeliakia diagnózis idején termelődő antitestekétől. Gliadin elleni antitesteket nyertünk ki affinitás tisztítással a 6 hónapos korban gyűjtött szérumból, coeliakiássá váló gyermekek (n=3) illetve coeliakiássá nem váló gyermekek (n=3) esetén,

valamint a coeliakia diagnózis idejéről származó mintákból (n=4). Az antitestek egyensúlyi disszociációs állandóját (K_D) meghatároztuk a következő gliadin szekvenciák esetén: nem dezamidált γ Glia_Q (PLQPQQPFP), dezamidált γ Glia_E (PLQPEQPFP) és rövid dezamidált γ Glia_sh (PEQPFP) peptid (**24.A ábra**), ahol egyetlen epitóphoz történő, monovalens kötődésre lehet számítani.



24. ábra. A coeliakia diagnózis idején megnő a gliadin elleni antitestek affinitása a PEQPFP γ -gliadin eredetű epitópra. A 6 hónapos korban, illetve a coeliakia diagnózis idején megjelenő, affinitás tisztított gliadin antitestek gliadin peptid kötési kinetikáját valós idejű jelölés nélküli biofelszín interferometriás módszerrel vizsgáltuk (A). Sztreptavidin bioszenzorra 3 μ M biotinilált γ Glia_Q, γ Glia_E, illetve γ Glia_sh peptidet immobilizáltunk, majd az antitesteket 240, 120, 60, 30 nM koncentrációban adtuk hozzá. Az egyensúlyi disszociációs állandót (K_D) a BLItz Pro 1.2.1.5 szoftver segítségével állapítottuk meg illetve megállapítottuk a γ Glia_E/ γ Glia_Q K_D értékek hányadosát (B) az egyes csoportokban. A grafikonok az átlagokat és a szórást reprezentálják. Az ANOVA analízis során a $p < 0,05$ értéket tekintettük szignifikánsnak. ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$

A később coeliakiássá váló, illetve nem váló csecsemők által 6 hónapos korban termelt gliadin elleni antitestek egyaránt nagy affinitással kötődtek a γ Glia_Q (átlag K_D $2,5 \times 10^{-8}$ M, illetve $1,2 \times 10^{-7}$ M) és γ Glia_E (átlag K_D $3,5 \times 10^{-8}$ M, illetve $1,7 \times 10^{-7}$ M) peptid szekvenciákhoz. Ez azt jelenti, hogy a glutén bevitelre adott korai antitest válasz, a betegség későbbi kialakulásától függetlenül, a coeliakiában immundomináns gliadin epitóra irányul. Ugyanakkor ezen 6 hónapos korban termelődő antitestek csupán gyenge interakcióra képesek a rövid γ Glia_sh peptiddel (átlag K_D $1,3 \times 10^{-4}$ M, illetve $1,8 \times 10^{-4}$ M).

A coeliakia diagnózis idején megjelenő antitestek viszont nemcsak a γ Glia_Q és γ Glia_E peptidekkel (átlag K_D $3,6 \times 10^{-8}$ M, illetve $1,6 \times 10^{-8}$ M) képesek erős interakciót kialakítani,

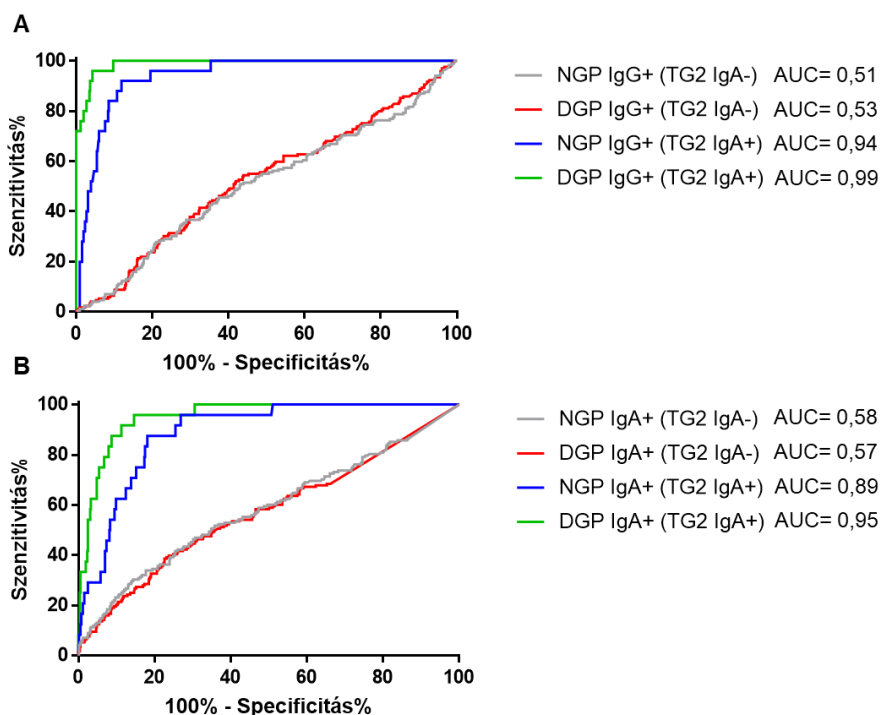
hanem jelentős affinitás érést mutatnak a γ Glia_sh peptid dezamidált PEQFPF motívumára is (átlag K_D $5,8 \times 10^{-7}$ M).

Noha az antitestek K_D értékei nem mutattak szignifikáns különbséget a γ Glia_Q és γ Glia_E peptiddel való interakció során az egyes csoportokban, a K_D γ Glia_E / K_D γ Glia_Q hányados értékeit adott személyre egyéneenként kiszámítva (**24.B ábra**) egyértelműen látható, hogy a 6 hónapos korban termelődő antitestek szignifikánsan nagyobb affinitással kötődnek a nem dezamidált γ Glia_Q peptidhez. A coeliakia diagnózis idején termelődő antitestek affinitása pedig a dezamidált γ Glia_E peptid iránt volt jelentősen magasabb. Ezek az eredmények összhangban vannak a szérum minták esetén tapasztalt változással, miszerint a korai reakció idején az NGP a preferált antigén, míg a coeliakia diagnózis idején a kezdetben alulreprezentált DGP elleni reakció jelentősen megnő.

6.11. A TG2 elleni antitest nélkül termelődő gliadin elleni antitestek gyenge indikátorai a coeliakiának

Vizsgálatainkban látható, hogy rendszeres glutén bevitel mellett NGP, illetve DGP elleni antitestek gyakran előfordulnak a coeliakia rizikóval rendelkező gyermekekben. ROC analízis segítségével vizsgáltuk, hogy a termelődő NGP, illetve DGP elleni antitestek mennyisége alapján megkülönböztethetők-e a coeliakiássá váló és nem váló gyermekek, illetve hogyan változik a prediktív érték, ha a megjelenő TG2 antitesteket is figyelembe vesszük.

A TG2 elleni antitest hiányában, bármely életkorban termelődő NGP, illetve DGP elleni antitestek által adott ROC görbe alacsony görbe alatti területtel (AUC) jellemezhető (NGP IgG AUC=0,51 illetve DGP IgG AUC=0,53), mely nem alkalmas a coeliakiássá váló és nem váló gyermekek elkülönítésére egyetlen pozitívítási küszöbértéknél sem (**25.A ábra**). Ugyanakkor, ha csak azokat a NGP, illetve DGP antitest értékeket vesszük figyelembe, melyek TG2 elleni antitest megjelenésével is párosulnak, a ROC görbe jelentősen javul és a görbe alatti terület növekszik (NGP IgG AUC=0,94 illetve DGP IgG AUC=0,99). Az NGP, illetve DGP elleni IgA izotípusú antitestek azonos eredményt mutatnak egy kissé gyengébb diszkriminációs értékkel (**25.B ábra**).



25. ábra. A transzglutamináz antitestek nélkül jelentkező nem dezamidált (NGP) illetve dezamidált gliadin (DGP) elleni antitestek nem jelzik előre a későbbi coeliakia kialakulását. Hatásfokmérő karakterisztika (ROC) analízis segítségével vizsgáltuk az életkortól függetlenül, de glutén fogyasztás idején detektált gliadin (NGP, illetve DGP) elleni szérum IgG (A), illetve IgA (B) antitestek coeliakia predikciós hatását a TG2 elleni IgA antitestet tartalmazó (>3,9 ISU) illetve nem tartalmazó mintákban. AUC jelentése görbe alatti terület.

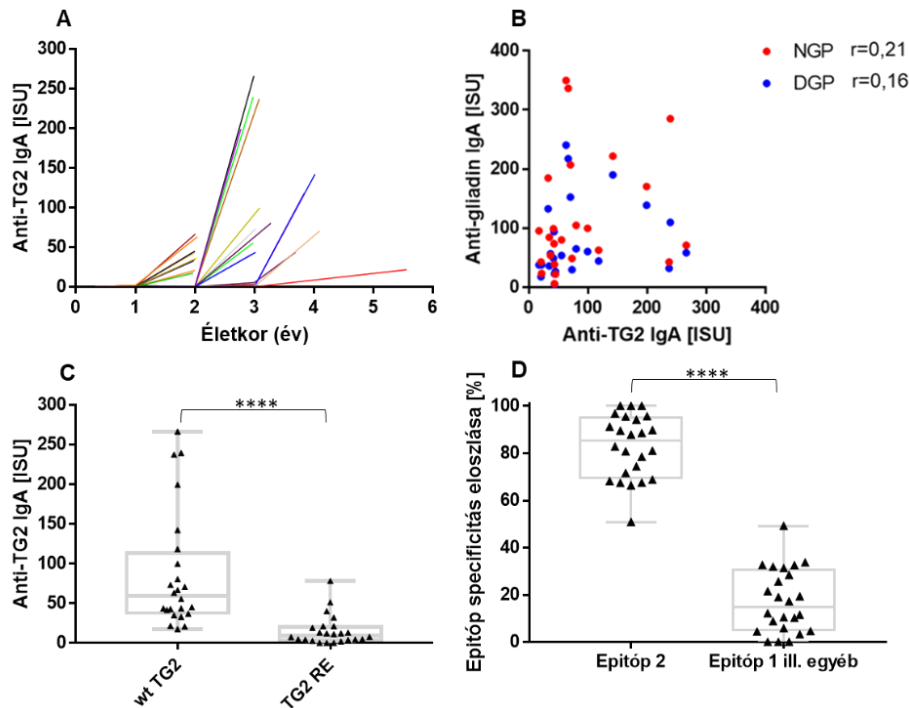
Ezen eredmények alapján egyértelmű, hogy sem a primer glutén bevitelre adott korai antitest válasz, sem a későbbi életkorban detektálható gliadin elleni antitestek önmagukban nem képesek a coeliakiás és nem coeliakiás esetek elkülönítésére, csakis a TG2 elleni antitestek figyelembevételével érhető ez el, ami alátámasztja, hogy a coeliakia diagnózisának alappillére a TG2 antitest pozitivitás.

6.12. Az elsőként megjelenő TG2-specifikus antitestek az epitóp 2 felszint ismerik fel

A klinikai vizsgálat időtartama alatt 33/122 (27%) gyermeknél alakult ki coeliakia (medián 3 éves életkorban, szélső értékek 2-5,5 év), a diagnózist Marsh III szövettani eredménnyel is alátámasztották. A diagnózis idején a TG2 antitest pozitivitás minden esetben klinikai ELISA, illetve EMA vizsgálatokkal is igazolt volt. A MeDALL mikrochip vizsgálatban ezek közül csak 24 gyermek diagnózis kori mintái álltak rendelkezésre, mivel 9 gyermek esetén a coeliakia a MeDALL vizsgálatok elvégzését követően manifesztálódott.

Az összes PreventCD minta analízise során TG2 elleni IgA antitest csak a 24 coeliakiás páciens mintáiban és csak a diagnózis idején volt detektálható (**26.A ábra**). A TG2 elleni IgG antitestek

ezek közül csak 20 páciens esetében voltak kimutathatók alacsony koncentrációban (IgA hiányos coeliakiás nem volt a vizsgált minták között). A coeliakia diagnózis idején az NGP és DGP antitestek mennyisége is megemelkedett, de szérumszintjük Pearson teszt alapján nem mutatott korrelációt (**26.B ábra**) a TG2 elleni antitestek mennyiségével (TG2 IgA kontra NGP IgA $r=0,21$).



26. ábra. A coeliakia diagnózis idején megjelenő TG2 elleni antitestek az epitóp 2 felszínre irányulnak. (A) A humán TG2 elleni szérumszint IgA antitestek megjelenését 4 hónapos kortól kezdve követtük a vizsgálatban résztvevő coeliakiássá váló rizikó gyermekek esetében (a coeliakia diagnózis idején a medián életkor 3 év). A színes vonalak az egyes pácienseket reprezentálják. (B) A coeliakia diagnózis idején ($n=24$) detektált TG2-specifikus IgA antitestek és a nem dezamidált gliadinhoz (NGP), illetve a dezamidált gliadinhoz kötődő IgA antitestek szintjének korrelációja, a korrelációs koefficiens (r) Pearson tesztel meghatározva. (C) A coeliakia diagnózis idején ($n=24$) a vad típusú TG2, illetve az epitóp 2-vel nem rendelkező dupla mutáns TG2 RE (R19S, E153S) fehérjéhez kötődő szérumszint antitestek kimutatása Alexa Fluor 546 jelölt anti-humán IgA másodlagos antitest alkalmazásával, fehérje mikrochip módszer segítségével történt. (D) Az antitestek epitópok közötti százalékos megoszlását a B panel adatai alapján számítottuk ki (a vad típusú TG2 fehérjéhez való kötődést 100%-nak véve). A TG2 RE dupla mutánshoz való kötődés az epitóp 1, illetve egyéb felszínre rendezhető reziduális kötődést reprezentálja. A háromszögek az egyes pácienseket jelölik, míg az oszlopok a mediánt és az interkvartilis tartományokat. ISU a detektált fluoreszcens intenzitás, mely arányos a szérumszint antitest koncentrációval. Az egypróbás T-teszt során a $p < 0,05$ értéket tekintettük szignifikánsnak. **** $p < 0,0001$

A diagnózis idején megjelenő TG2 elleni antitestek epitóp specifikitását is megvizsgáltuk egy, a munkacsoportunkban korábban termelt dupla mutáns TG2 fehérje (TG2 RE) felhasználásával,

melyben az epitóp 2 felszínét alkotó kulcsfontosságú aminosavakat pontmutációval szerinre cseréltük (R19S, E153S). Ezt a rekombináns fehérjét – bár térszerkezete megfelelő - az epitóp 2 elleni antitestek nem képesek felismerni (*Simon-Vecsei és mtsai, 2012*). A dupla mutáns TG2 RE fehérje esetén az antitestek kötődése a vad típusú TG2 fehérjéhez képest 17%-ra csökkent, mely az epitóp 1-re és TG2 egyéb felszíneire kötődő antitesteket reprezentálja. Ezen eredmények alapján a termelődő TG2 elleni antitestek túlnyomó többsége az epitóp 2 felszínre irányul (**26.C, D ábra**).

7. Megbeszélés

Irodalmi adatok alapján az α és a γ -gliadinok egyformán potens kiváltói a coeliakiás betegek T-sejt válaszában (*Qiao és mtsai, 2005; Tollefsen és mtsai, 2006; Dørum és mtsai, 2010*), viszont a B-sejtek számára egyértelműen a γ -gliadinok a preferált antigének és csupán rendkívül alacsony mértékű szérum reakciók mérhetők α -gliadinokra (*Srinivasan és mtsai, 2013; Dørum és mtsai, 2016*). Vizsgálatainkban jelölés nélküli kvantitatív analízis és kötődés vizsgálatok során egyedi peptidek által affinitás tisztított antitestek alkalmazásával kimutattuk, hogy bár a humorális immunitás célpontjai egyértelműen a γ -gliadinok, némely α -gliadin szekvencia is lehet immunogén a B-sejtek számára és antigenitásuk a TG2 általi dezamidációval fokozható.

A coeliakia pathomechanizmusában rendkívül fontos szerepet tölt be két α -gliadin fragmens: a p31-43, illetve a p57-68 peptid. A p57-68 peptid a legerősebb HLA-DQ2.5 függő T-sejt stimuláló gliadin szekvencia, melynek TG2 általi dezamidációja nagymértékben növeli a peptid immunogenitását (*Arentz-Hansen és mtsai, 2000*), míg a p31-43 peptid egy olyan α -gliadin fragmens, mely képes aktiválni a természetes immunitást, ezáltal celluláris stressz választ idéz elő (*Barone és mtsai, 2014*). A glutén TG2 általi dezamidációját legtöbbször egy komplex glutén elegyben vizsgálták, melyhez kezdetben még tengerimalac TG2 enzimet, majd pedig rekombináns humán TG2 Gly²²⁴ enzimet alkalmaztak, azonban a humán TG2 enzim leggyakoribb természetes variánsa a TG2 Val²²⁴ (*Kanchan és mtsai, 2013*). Vizsgálatainkban közvetlen módon elemeztük a p31-43 és p57-68 peptidek TG2 általi dezamidációját, a TG2 Val²²⁴ formát alkalmazva, mert a természetes TG2-ben a 224 pozícióban található valin befolyásolja az enzim aktivitását. A tömegspektrometriás analízis alapján a Q34 és Q40 pozícióban történő dezamidáció is megállapítható volt a p31-43 peptidben, mely a QEQPF és PEQPY motívumok létrejöttét eredményezte. Ezen eredmények összhangban vannak az irodalmi ismeretekkel, miszerint a TG2 általi dezamidáció során preferált felismerő szekvencia a QXP motívum. A p57-68 peptid esetében a Q65 pozícióban bekövetkező dezamidáció volt a leggyakoribb reakció termék, mely megerősíti az irodalomban már leírt PELPY motívum létrejöttét.

Tömegspektrometriás adataink szerint a p31-43 peptid esetében a Q35, míg a p57-68 peptid esetében Q59 pozícióban is előfordulhat dezamidáció. Ennek hatását azonban nem teszteltük, mivel korábbi vizsgálatok már kimutatták, hogy az így létrejövő QQEPPF, illetve QLEPF motívumok még a nem dezamidált szekvenciáknál is gyengébb antigének a coeliakiás gliadin elleni antitestek számára. (*Schwartz és mtsai, 2004*).

A coeliakiás betegek szérum antitestjeinek különböző natív és dezamidált gliadin peptidekhez való kötődését biofelszín interferometriás módszerrel vizsgálva megállapítható, hogy az α -gliadin peptidek esetében nagyon alacsony mértékű kötődés mutatható ki, míg a γ -gliadin peptidek egyértelműen domináns antigének a humorális immunválasz szempontjából. A coeliakia manifesztáció idején a betegek szérum antitestjei egyformán jól kötődtek a natív (γ Glia_Q) és a dezamidált (γ Glia_E) γ -gliadin peptidhez (korrelációs index, $r=0,92$). Bár a dezamidált α és γ -gliadin peptid formák esetében kissé magasabb antitest kötődési értékek adódtak, a különbség nem volt szignifikáns.

A biofelszín interferometriás mérés során a γ Glia_E peptiddel kapott szérum antitest koncentráció értékek jó korrelációt mutatnak a klinikai anti-DGP IgG diagnosztikai tesztek eredményeivel, mely egyrésztől validálja mérésünk pontosságát, másrésztől pedig kifejezi ezen heptapeptid szekvenciának az antitest válaszban betöltött központi szerepét.

Ismereteink szerint ez az első alkalom, hogy egyedi peptidekkel, coeliakiás betegek szérum mintáiból affinitás tisztított antitestek antigén preferenciáit és keresztreaktivitását vizsgálták. Vizsgálatainkban bármelyik gliadin peptiddel is végeztük el az affinitás tisztítást, az izolált antitestek számára a QP(Q/E)QPFP γ -gliadin motívum volt a legjobb immunogén szekvencia, mely egyértelműen arra utal, hogy a coeliakiás betegek B-sejtjei számára ez a szekvencia a fő immunogén. Minden vizsgált páciens esetében a γ -gliadinra reagáló antitestek mennyisége jóval meghaladja a p31-43 és p57-68 α -gliadin peptidekre reagáló antitest szintet, mely szintén mutatja a γ -gliadin domináns szerepét. Továbbá a QPQQPFP γ -gliadin motívumot tartalmazó peptideknek fontos szerepe van a csecsemőkorai immunválasz során, hiszen az elsőként megjelenő gliadin elleni antitestek kizárólag ezen motívumot ismerik fel natív, illetve dezamidált formában. Az α -gliadinokat felismerő antitestek csak későbbi életkorban és mindig alacsonyabb mennyiségben detektálhatók. Ezen eredmények együttesen arra utalnak, hogy a γ -gliadinok az elsődleges immunogének és az immunválasz során alakulnak ki az α -gliadin peptidekkel keresztreakáló tulajdonságú antitestek.

Az antitestek gliadin peptid szekvenciák közötti keresztreaktív tulajdonságára jó irodalmi példa az egér 33-mer α -gliadin fragmenssel történő immunizációja által nyert G12 illetve A1 monoklonális gliadin elleni antitest. Ezek, bár eltérő hatékonysággal, de a QPQLPY, QPQQPY, QPQQPF, QPQLPF, QPQLPL, QPELPY motívumok mindegyikét képesek felismerni (*Morón és mtsai, 2008*). Az általunk vizsgált coeliakiás betegekből származó gliadin-specifikus antitestek esetében is hasonló jellegű keresztreaktív tulajdonságot figyeltünk meg az γ -gliadinhoz hasonló szekvencia motívumok felismerésében.

Az egyedi peptidekkel végzett affinitás tisztítás eredményei azt is megerősítik, hogy a coeliakiás betegek szérumban található gliadin-specifikus antitestek erőteljes keresztreakciót mutatnak a natív és dezamidált γ -gliadin szekvenciák között. Ezt a megfigyelést alátámasztja azon korábbi eredmény, miszerint a coeliakiás betegekből klónozott gliadin-specifikus B-sejtek többsége a dezamidációtól független felismerésre képes (*Snir és mtsai, 2017*). Bár a klinikai diagnosztikai esszék esetében nagyobb specificitást értek el dezamidált gliadin peptidek alkalmazásával (*Schwartz és mtsai, 2004; Rashtak és mtsai, 2008*), fontos kiemelni, hogy a valós idejű biofelszín interferometriás vizsgálati módszer a rövid peptid antigének esetében jobb hozzáférhetőséget biztosít az ELISA immunesszékkel összevetve, ahol az antitestek kötődését sztérikus gátlás nehezítheti. Ez a különbség magyarázhatja a rendszerünkben tapasztalt hatékony kötődést a natív gliadin peptidhez.

A PQQ γ -gliadin szekvencia motívum kulcsfontosságú a coeliakiás betegek gliadin-specifikus antitestjei számára, ezt jól szemlélteti, hogy a p31-43 α -gliadin peptid, mely tartalmazza a PQQ motívumot, nagyságrenddel jobb antigén, mint a p57-68 α -gliadin peptid, melyből hiányzik a PQQ szekvencia. Az α -gliadin peptidek gyenge antigenitásának magyarázatához hozzájárulhat az a kísérletes irodalmi adat, mely szerint a tirozin jelenléte kedvezőtlenebb az antitest felismerés során, mint a fenilalanin (*Schwartz és mtsai, 2004*). Ezen megfigyelést ma már gliadin peptidet kötött antitest kristályszerkezet is alátámasztja (*Snir és mtsai, 2017*), melyben megfigyelhető, hogy a fenilalanin jól tud illeszkedni az antitestben egy apoláros zsebbe, viszont a tirozin poláros hidroxil csoportja kedvezőtlenül hat az antitest kötődésre.

A szérum antitestek gliadin peptidek esetében tapasztalható keresztreaktivitásának fontos diagnosztikai vonatkozásai is vannak. A keresztreaktív antitest jelenlétének köszönhetően nő a klinikai tesztek szenzitivitása. Ezt demonstrálja az a megfigyelés, hogy méréseink során a QPEQFPF motívumot hordozó szintetikus dezamidált γ -gliadin peptidet egyedül alkalmazva, a meghatározott antitest szintek jó korrelációt mutatnak a klinikai gyakorlatban használatos gyártói DGP IgG esszék eredményeivel. Ezek a klinikai tesztek többféle peptid antigént alkalmaznak, melyek szabadalmi oltalom alatt állnak. A tesztek mért értékei relatív egységekben vannak kifejezve és magas pozitív prediktív értékkel bírnak az anti-TG2 pozitív páciensek körében (*Werkstetter és mtsai, 2017*). Egy olyan újszerű mérési módszer, mint a biofelszín interferometria megfelelő eszköz lenne egy egységes kalibráció kialakítására, hiszen a specifikus antitest kötődést $\mu\text{g/mL}$ egységben képes kifejezni. Az abszolút koncentráció mérésen alapuló eljárás kiküszöbölné az egyes klinikai centrumok és a különböző forgalomban lévő klinikai tesztek között tapasztalható eltéréseket és a mérési tartomány még pontosabb

beállítását tenné lehetővé. Fontos megemlíteni, hogy a ProCeDE klinikai vizsgálatban meghatározott antitest szintek a különböző klinikai tesztek esetében 0 - 39%-ban a mérési tartomány fölé estek. A mérési tartományon kívül eső magas pozitív szerológiai eredmények pedig használhatatlanok, amikor a gluténmentes diéta terápiás hatását szeretnénk követni a szérum antitestek mérésével.

A jelölés nélküli biofelszín interferometria másik nagy előnye, hogy egy lépésben képes kvantitatív módon meghatározni az IgA és IgG izotípusú antitesteket. A klinikai tanulmányok szerint az IgG mérésen alapuló teszteknek nagyobb a szenzitivitása, míg az IgA mérésen alapuló tesztek nagyobb specificitással jellemezhetők (*Rashtak és mtsai, 2008*), és a fiatal gyermekek körében gyakran nagyon magas gliadin elleni IgA antitest szintek detektálhatók (*Vriezinga és mtsai, 2014*). A kezeletlen coeliakia esetében, idősebb gyerekek és felnőttek körében az IgG gliadin elleni antitest szint azonban sok esetben kifejezetten alacsony is lehet és ezen esetekben a klinikai tesztek kevésbé specifikusak, mint az anti-TG2 IgA mérések. A jelen munkánk során nem vizsgáltuk az egyes gliadin peptidokkal mért antitest szintek diagnosztikai pontosságát, azonban az irodalomban ismert, hogy a gliadin elleni antitest mérés esetében nem ritka a fals pozitívitás. Ennek egyik oka lehet, hogy a glutént nem tartalmazó gabonafélék is hordoznak strukturálisan hasonló peptid motívumokat és az ezek ellen termelődő antitestek képesek keresztreakálni a gliadin peptidokkal.

Másrészt a klinikumban közismert, hogy gliadin elleni antitestek már a coeliakia manifesztációját megelőzően is kimutathatók (*Simell és mtsai, 2007; Amarri és mtsai 2013*), ugyanakkor rendkívül keveset tudunk ezen coeliakia diagnózist megelőző adaptív immunválaszról, annak prediktív jellegéről, és arról, hogy ez mennyiben tér el a coeliakia manifesztációjakor tapasztalható gliadin elleni reakciótól.

A PreventCD nemzetközi tanulmány adta lehetőséget használtuk fel, hogy választ kapjunk ezen kérdésekre. A PreventCD olyan, prospektív étrendi intervenciót alkalmazó klinikai vizsgálat volt, melyben a coeliakia kialakulására magas genetikai rizikóval rendelkező csecsemők vettek részt, így eredményei közvetlenül az egészséges csecsemő populációra nem alkalmazhatók. A tanulmány erőssége viszont, hogy prospektív jellege ellenére jelentős számban alakult coeliakia a követés során és hogy a korai glutén bevitel egységesített dózírozás alapján történt. A vizsgálatban a gliadin, illetve TG2 elleni antitestek megjelenését folyamatos rendszerességgel nyomon követték, mely biztosítja a megbízható és összehasonlítható eredményeket, illetve a betegség manifesztációjának pontos detektálását.

A humorális adaptív immunválasz megbízható kvantitálásához MeDALL fehérje mikrochip technológiát alkalmaztunk, melynek segítségével a coeliakiában releváns antigének (NGP, DGP, TG2, TG2 RE) ellen irányuló antitesteket párhuzamosan tudtuk különböző életkorokban mérni. A klinikumban használatos diagnosztikus ELISA/ELIA esszék kalibrációja az alacsony koncentráció tartományhoz igazított, hogy a lehető legnagyobb érzékenységet éri el, ennek következtében pedig gyakori a szignál szaturáció. A MeDALL mikrochip módszer viszont széles lineáris mérési tartománnyal rendelkezik, így a mennyiségi változásokat pontosabb módon tudjuk nyomon követni.

Ismereteink szerint ez az első alkalom, hogy coeliakia rizikó csecsemők NGP és DGP elleni humorális immunválaszát szimultán nyomon követik és a termelődő antitestek affinitását meghatározzák.

A PreventCD tanulmányban résztvevő német és magyar gyermekek eredményei azt mutatják, hogy a korai glutén bevitelre adott antitest válasz a dezamidált gliadinokkal szemben a nem dezamidált gliadinokat részesíti előnyben. A termelődő antitestek között IgG és IgA izotípusú is kimutatható, mely izotípus váltást jelez, ami a csecsemők saját adaptív immunválaszának eredménye. Ezen korai immunválasz során termelődő antitestek a coeliakia későbbi kialakulásától függetlenül a QP(Q/E)QFPF immundomináns gliadin epitóra irányulnak. Eredményeink valószínűsítik, hogy T-sejt függő immunválaszról van szó és egyben megvilágítják a fiatal életkorban gyakran nem coeliakiásokban is észlelhető gliadin antitest pozitivitás nem patológiás okait.

A gliadin specifikus T-sejtek vizsgálata kapcsán *Camarca és munkatársai (2017)* kimutatták, hogy coeliakia rizikóval rendelkező, TG2 szeronegatív és normál szövettant mutató gyermekekben is előfordulnak gliadin reaktív T-sejtek, melyek magas gliadin elleni szérumszinttel társulnak. Ezen eredmények igazolják, hogy nem coeliakiás betegek esetében is, a gliadin elleni szérumszint jelenléte a vékonybélben zajló T-sejt mediált immunreakcióval hozható összefüggésbe. Ugyanakkor a coeliakia rizikóval rendelkező gyermekek esetében kimutatott gliadin reaktív T-sejtek jelenléte és a betegség későbbi kifejlődése közötti összefüggés még nem teljeskörűen igazolt.

Vizsgálatainkban a HLA-DQ2/DQ8 negatív személyek szintén képesek voltak gliadin elleni IgA és IgG antitesteket termelni a korai glutén bevitelre adott immunválaszuk során. Ezen kulcsfontosságú megfigyelés arra utal, hogy nem csupán a rizikó allélekkel rendelkező egyének számára immunogének a gliadinok és hogy a gliadin peptidek produktív prezentációja nem csak

az eddig leírt MHC II molekulák által lehetséges. Fontos kiemelni, hogy a HLA-DQ2/DQ8 negatív személyek által termelt gliadin elleni antitestek izotípusa és nem-dezamidált gliadin iránti preferenciája is azonos volt, mint a rizikó allélekkel rendelkező társaiké.

Ezek a megfigyelések felvetik annak a lehetőségét, hogy a gliadin peptidek prezentációja más HLA molekulák által is megvalósulhat, illetve azt is sugallják, hogy a gliadinra vonatkozó tolerancia nem a rizikó allélek hiányából adódó passzív következmény, hanem egészséges egyéneknél a gliadin ellen aktív immuntolerancia mechanizmus működik.

Mindezek tükrében érdekes megfigyelés az, hogy éppen a magas coeliakia rizikóval járó genotípusok (főként pedig a HLA-DQ2.5 homozigótáság) társultak feltűnően gyenge humorális immunválasszal. Ebből arra a következtetésre juthatunk, hogy a magas coeliakia rizikóval leírható HLA-DQ allélek elégtelen módon prezentálhatják a gliadin peptideket a korai életkorban a primer glutén bevitel alkalmával, és ez egy csökkent tolerogén választ eredményezhet, részben hozzájárulva a későbbi coeliakia kifejlődésének magasabb kockázatához.

Feltevésünket alátámasztják azok az irodalmi adatok, mely szerint a HLA-DQ2.5 molekulák beszűkült antigén prezentációs képességgel jellemezhetők és a glutén prolaminok változatos palettájáról csak igen kis számú peptidet képesek megkötni (*Dørum és mtsai, 2014*). Továbbá a HLA-DQ2.5 molekula sajátosága, hogy egy rá jellemző egyedi nukleotid polimorfizmus következtében csak gyenge interakcióra képes a HLA-DM chaperon molekulával (*Nguyen és mtsai, 2017*), mely a CLIP fragmens peptidnek az antigén kötőzsebből történő leválását segítené. Így a HLA-DQ2.5 molekula gyakran az invariáns lánc CLIP peptidjét hordozza a sejt felszínén a gliadin peptidek produktív prezentációja helyett (*Hung és mtsai, 2019*). A kísérletesen megfigyelt csökkent antigén prezentációs képességet igazolja, hogy a HLA-DQ2.5 személyek gyenge immunizálhatóságát írták le a hepatitis B (HBV) vakcináció során (*Alper és mtsai, 1989*).

A tolerogén immunválasz létezését pedig a HLA-DQ2.5 genotípusú coeliakiás személyekben kimutatott egyes típusú regulatorikus T-sejtek jelenléte igazolja (*Gianfrani és mtsai, 2006*). HLA-DQ2.5 humanizált egér modellben is megfigyelték, hogy a proliferáló, humanizált gliadin reaktív T-sejt receptorral bíró sejtek immunszuppresszív tulajdonságú, IL-10 szekretáló, egyes típusú regulatorikus T-sejt irányba differenciálódtak (*du Pré és mtsai, 2011*). Ezzel szemben egészséges HLA-DQ2.5 genotípusú személyekben nem mutathatók ki sem gliadin specifikus effektor, sem gliadin specifikus regulatorikus T-sejtek (*Christophersen és mtsai, 2016*). Ez arra

utal, hogy a megfelelő gliadin elleni tolerancia kialakulása során ezek a sejtek anergiás állapotba kerülnek vagy teljes negatív szelekción esnek át.

A különböző genotípusok által adott immunreakciók értékelése során limitációt jelent, hogy az egyes genotípus csoportokban jelentősen eltérő elemszámok szerepeltek, ami a statisztikai kiértékelést nehezíti. Illetőleg T-sejt aktivációra vonatkozó adatok nélkül nem jelenthető ki teljes biztossággal, hogy a HLA-DQ2.5 személyek minden szempontból gyengébben reagálnak a bevitt gluténre. Bár a magasabb rizikóval társuló HLA-DQ2.5 genotípusú csecsemők korai gliadin elleni antitest reakciója átlagosan alacsonyabb volt mint a más genotípussal rendelkezőké, mégsem magyarázható pusztán ezzel a coeliakia kialakulására mutatott magasabb kockázat. A vizsgált egyének szintjén ugyanis nem minden alacsony korai antitest reakció társult későbbi coeliakiával, ahogyan a magas korai antitest reakció sem minden esetben nyújtott védelmet a coeliakia kialakulásától. Azonban az eredményeink és az irodalmi adatok tükrében érdemes újra gondolni a HLA-DQ gliadin peptid prezentációjáról alkotott képünket. Ebbe integrálnunk kell az eddig ismerttől eltérő, HLA-DQ2/HLA-DQ8 független gliadin peptid prezentáció lehetőségét, mely coeliakia rizikótól mentesen zajlik, illetőleg a HLA-DQ2.5 molekula csökkent válaszadó képességét, mely valamilyen módon összefüggésben állhat a megnövekedett coeliakia rizikóval.

A korai immunválasszal ellentétben a coeliakia diagnózis idején detektált gliadin elleni antitestek erőteljesebb kötődést mutatnak a dezamidált gliadinok iránt. Azoknál a rizikó gyermekeknél viszont, akiknél nem alakult ki coeliakia, nem módosult a dezamidált gliadinokkal szembeni antitest válasz, mely a TG2 enzim általi dezamidáció kórfolyamatban betöltött aktív szerepére utal.

Biofelszín interferometriás kísérleteinkben a coeliakia rizikó csecsemők által 6 hónapos korban termelt gliadin elleni antitestek nagy affinitást mutattak az immundomináns QP(Q/E)QFPF gliadin epitóp iránt. Ezen megfigyelést jól magyarázza *Snir és munkatársai (2017)* eredménye, akik szterotipikus gliadin elleni antitest választ mutattak ki coeliakiás páciensek esetében, ahol a gliadin specifikus B-sejtek erősen limitált szomatikus mutációval rendelkeznek, mert a csírvonalban kódolt aminosavak már inherens módon biztosítják a stabil gliadin peptid kötő képességet. Ugyanakkor a coeliakia diagnózis idején termelődő gliadin elleni antitestek jelentősen javuló kötődést mutatnak a rövidebb, PEQFPF motívumot hordozó peptid iránt. Mindez a pathogenezis során bekövetkező affinitás éérésre utal.

Összhangban a szérum antitestek MeDALL mikrochipen mért NGP illetve DGP antigénre adott válaszával, a 6 hónapos kori immunválasz során termelődő antitestek nagyobb affinitást mutatnak a nem dezamidált gliadin peptid (γ Glia_Q) iránt, míg a coeliakia diagnózis idején termelődő antitestek a dezamidált gliadin peptidhez (γ Glia_E) kötődnek jelentősen nagyobb affinitással. Ezt jól kifejezi a $K_D \gamma$ Glia_E / $K_D \gamma$ Glia_Q hányados szignifikáns csökkenése, tehát a dezamidált peptid iránti affinitás növekedése. Ezzel összhangban, a coeliakia diagnózis idején a duodénumból izolált gliadin reaktív T-sejtekre nézve is kimutatták, hogy sokkal intenzívebben reagálnak a dezamidált gliadin peptidekre, mint a natív peptidekre. A nem coeliakiás biopsziából származó T-sejtek a natív és a dezamidált gliadinokra azonban hasonló módon reagáltak (*Camarca és mtsai, 2017*).

A gliadin elleni antitestek önmagukban, életkortól és dezamidációtól is függetlenül, nagyon gyenge coeliakia prediktív képességgel rendelkeznek. ROC analízisük segítségével a coeliakiássá váló és nem váló gyermekek nem különíthetők el egymástól. Eredményeink jól mutatják, hogy a gliadin elleni antitestek már jóval a TG2 elleni antitestek megjelenése előtt kimutathatók a szérumból, viszont nincsen diagnosztikus jelentőségük és nem jeleznek coeliakiás immunválaszt. Kizárólag a TG2 elleni antitestek alapján vagyunk képesek elkülöníteni a coeliakiás és nem coeliakiás eseteket, ezért a TG2 antitest pozitivitás a coeliakia legmegbízhatóbb klinikailag alkalmazható markere.

A coeliakia diagnózis idején megjelenő TG2 elleni antitestek mennyisége nem áll lineáris korrelációban az NGP, illetve DGP elleni antitestek mennyiségével. Ennek oka lehet a termelődésüket kiváltó esetlegesen eltérő trigger, illetve az a megfigyelés, hogy a TG2 elleni antitestek lerakódnak a szövetekben az extracelluláris TG2 antigén felszínén (*Korponay-Szabó és mtsai, 2004*). Ezáltal csökken a szérumban mérhető koncentrációjuk, így az nem reprezentálja a teljes termelt mennyiséget.

A coeliakia diagnózis idején detektált TG2 elleni antitestek epitóp specificitását egy dupla mutáns TG2 (R19S, E153S) enzim segítségével vizsgáltuk meg, mely nem képes az epitóp 2 specificitású antitesteket megkötni. Méréseink alapján a coeliakiások által termelt TG2 elleni antitestek túlnyomó többsége az epitóp 2 felszínre kötődik. A PreventCD tanulmányban végzett vékonybél szövettani vizsgálatok alapján ezen epitóp 2-specificitású anti-TG2 antitestek jelenléte életkortól függetlenül villus atrófia kialakulásával hozható összefüggésbe.

A rendszeres glutén bevitel és a TG2 fehérje folytonos extracelluláris jelenléte ellenére is úgy tűnik, hogy a dezamidált gliadin peptidek és a TG2 mint autoantigén csak később kerül az

immunrendszer célkeresztjébe. A korai immunválasz során az antitestek nem dezamidált gliadin irányába tapasztalható kötődési preferenciája annak is lehet a következménye, hogy a dezamidáció nem gyakori ebben a fázisban, illetve, hogy a normál tolerogén válasz a glutén veszély szignál nélküli bejutásával alakul ki és csak később, valamilyen külső hatás által szaporodnak fel a dezamidált peptidek. Több tanulmány bemutatta már, hogy a gliadin peptidek önmagukban is képesek a TG2 enzim, illetve a veleszületett immunitás aktivációját előidézni (*Caputo és mtsai, 2012; Nanayakkara és mtsai, 2018*). Ugyanakkor a coeliakia manifesztációja akár évtizedekig is elhúzódhat, mely arra utal, hogy más faktoroknak (intesztinális fertőzés, változások a mikrobiomban) is szerepe lehet a patológiás változások előidézésében. Fontos lenne tudnunk, hogy mi irányítja a TG2 figyelmét a gliadin peptidekre, illetve, hogy a dezamidáz vagy a keresztköti aktivitása döntő a coeliakia pathogenezisében. *In vitro* vizsgálatokban már kimutatták, hogy a gliadin és a TG2 között a TG2 keresztköti enzimaktivitásának következtében egy kovalens haptén-karrier komplex jöhet létre (*Fleckenstein és mtsai, 2004; Lexhaller és mtsai, 2019*). Ugyanakkor ilyen komplex *in vivo* történő keletkezése még nem megfelelően alátámasztott. Egy friss tanulmány azt sugallja, hogy *in vivo* körülmények között a gliadin és a TG2 inkább egy átmeneti enzim-szubsztrát komplexet alkot (*Iversen és mtsai, 2020*), így elképzelhető, hogy a komplex képződés pusztán a dezamidáció megnövekedett gyakoriságának következménye. Ugyanilyen irányba hathat a TG2 izopeptidáz aktivitásának fokozódása is, mely a korábban keresztkötésbe bevont oldalláncok dezamidációját eredményezi (*Stamnaes és mtsai, 2008*). Azonban a TG2 pontos szerepe, mint a pathogenezis elősegítője és a kialakuló autoimmun válasz áldozata, továbbra sem tisztázott.

Ahhoz, hogy a coeliakiás és nem coeliakiás személyek gliadin elleni immunválaszáról pontosabb képet kaphassunk, szükséges lenne a gliadin specifikus T-sejtek átfogó vizsgálata is, erre azonban jelen vizsgálataink nem terjedtek ki. Azonban, a PreventCD programban részt vevő magyar coeliakiás páciensek közül 11-en részt vettek egy másik tanulmányban is, ahol vékonybél biopsziás mintájukból gliadin specifikus T-sejt vonalakat klónoztak és különböző gliadin peptid szekvenciák felhasználásával tesztelték a T-sejt vonalak antigén specificitását (*Ráki és mtsai, 2017*). Így lehetőségünk nyílik, hogy ezen manifeszt coeliakiás betegek esetében a gliadin specifikus T-sejtek és B-sejtek célpontjait összehasonlítsuk. A 11 páciens közül technikailag sikeres módon 10 páciens biopszia mintáiból összesen 81 gliadin specifikus T-sejt klónt sikerült létrehozni. Ezek közül 9 volt specifikus α -gliadinokra (köztük a 33-mer immunogén szekvenciára), 22 volt specifikus γ -gliadin szekvenciákra (ebből 5 klón

keresztreakált ω -gliadinokkal) és 2 volt specifikus ω -gliadinokra (mindkettő keresztreakciót mutatott a γ -gliadinokra). A többi T-sejt klón esetében nem sikerült pontos specificitást megállapítani. A mi vizsgálatainkban azon 4 páciens közül, akik klónozott T-sejtjei között előfordult α -gliadin reaktív T-sejt, mindössze 1 páciens mutatott antitest szintű reaktivitást a p57-68 peptiddel. Azoknál a pácienseknél viszont, akik γ és ω -gliadinokra reagáló T-sejt klónokkal rendelkeztek, minden esetben kimutatható volt a QPEQFPF szekvencia iránti antitest szintű reakció.

A T-sejtek esetében már a korai életkorban izolált klónok esetében is, kevés kivételtől eltekintve, magasabb proliferációs ráta volt megfigyelhető, amikor natív gliadin peptid helyett dezamidált gliadin peptiddel stimulálták őket (*Ráki és mtsai. 2017*). Kötődési vizsgálataink során a coeliakiás páciensek gliadin elleni szérumban antitestjei - bár hatékonyabban ismerték fel a dezamidált γ -gliadin peptideket - nem mutattak ilyen mértékű különbséget.

A klinikai tanulmányok további limitációja, hogy HLA-DQ2 és DQ8 negatív személyek esetén, akiknél a coeliakia kialakulása kizárható, etikailag nem engedélyezhető a gluténre adott immunválasz követéses vizsgálata vagy invazív módszerek használata a vékonybélben zajló immunreakció megítélésére. Így nem derül fény arra, hogy a coeliakia rizikóval nem rendelkező személyek esetében milyen a korai életkorban a gluténre adott normál immunválasz.

8. Összefoglalás

Vizsgálataink során izolált reakciókban igazoltuk a p31-43 és a p57-68 α -gliadin peptidek TG2 általi dezamidációját, melyek a coeliakiás B-sejt epitópokat érintik, így befolyással lehetnek a peptidek antigenitására. A coeliakiás betegek szérum antitestjeinek vizsgálata alapján egyértelműen azt találtuk, hogy a gliadin elleni szérum antitestek főként a γ -gliadin peptidek ellen irányulnak, míg az α -gliadin peptidek nagyfokú szekvencia hasonlóságuk ellenére is jóval gyengébb antigének. A PLQPEQFP peptiddel végzett kvantitatív vizsgálatunk eredménye jó korrelációt mutat a klinikai diagnosztikai tesztek értékeivel, mely jól szemlélteti, hogy ezen egyetlen γ -gliadin eredetű peptid szekvencia milyen nagymértékben felelős a coeliakiás betegek humorális immunválaszáért. A dezamidált és natív gliadin peptid párok közül a szérum antitestek a manifeszt coeliakia idején javuló kötődést mutattak a dezamidált formákhoz, de a különbség nem volt statisztikailag szignifikáns. Az egyes peptid antigénekkal külön-külön végzett affinitás tisztítások eredményei azt mutatják, hogy erős immunológiai keresztreakció érhető tetten a γ -gliadin peptidek javára, hiszen az α -gliadin peptidekkel izolált antitestek nagyobb mértékben kötődtek a γ -gliadin szekvenciákhoz. A keresztreakció kórfolyamat során történő kifejlődését erősíti az a megfigyelés, hogy a coeliakia rizikójú csecsemőkben elsőként kizárólag γ -gliadinnal reagáló antitestek mutathatók ki, majd a diagnózis idején megjelennek az α -gliadinokat is felismerni képes változatok, de minden egyes betegben a γ -gliadin elleni antitest válasz jóval erősebb, mint az α -gliadin elleni válasz.

A dezamidáció szerepét vizsgálva megállapítható, hogy a coeliakia rizikóval rendelkező csecsemőkben a primer glutén expozícióra adott humorális immunreakciónk során a nem-dezamidált gliadin peptid elleni antitestek detektálhatók jelentősen nagyobb mértékben (a nem-dezamidált és dezamidált peptid felismerésben tapasztalt jelentős átfedés ellenére). Ezen tendencia a prospektív követés időtartama alatt fennmarad mindazon gyermekek esetén, akik nem lesznek coeliakiások. Viszont a coeliakiássá váló gyermekeknél, a diagnózis időpontjában jelentősen megemelkedik a dezamidált gliadin peptid elleni antitestek szintje és a mennyiségi változás mellett az antitestek affinitása is szignifikáns érést mutat a dezamidált gliadin epitópok irányába, mely a szöveti transzglutamináz (TG2) dezamidáz aktivitásában történő, a betegség manifesztációjával összefüggésben álló változásra enged következtetni.

A korai gliadin elleni immunválasz különlegessége, hogy a betegségre hajlamosító HLA-DQ genotípusokkal nem rendelkező csecsemők is képesek voltak az immun-domináns epitópra irányuló, izotípus váltáson átesett IgA és IgG antitestek termelésére. Ez arra utal, hogy a primer glutén bevitel során a coeliakiától eltérő, tünetmentes, nem patológiás gliadin elleni

immunválasz zajlik, mely egészséges személyekben valószínűsíthetően a megfelelő gliadin elleni tolerancia kiépülésének részét képezheti és nem társul TG2 elleni antitestek megjelenésével. A korai immunválasz során éppen a legnagyobb genetikai rizikóval rendelkező HLA-DQ2.5 homozigóta egyének voltak a leggyengébb válaszadók, a mérsékeltebb korai immunválasznak pedig szerepe lehet abban, hogy a megfelelő tolerancia nem tud kialakulni. Ilyen esetben később egy kóros, coeliakiás immunitás fejlődhet ki. E megfigyeléseink alátámasztásához a gliadin specifikus T-sejtek és az antigén prezentáció beható vizsgálatára lesz szükség.

A gliadin elleni szérum antitestek, önmagukban, nem kellően specifikus diagnosztikus markerek. Ezt jól mutatja azon adat, hogy a gliadin elleni szérum antitest szintek alapján nem különíthetők el a coeliakiás és a nem coeliakiás egyének. Kizárólag a TG2-specifikus antitest pozitivitás birtokában megfelelő a prediktív érték, ezért az anti-TG2 IgA tesztek vezető szerepet töltenek be a coeliakia diagnosztikában.

A coeliakia diagnózis idején megjelenő autoantitestek epitóp specificitását is megvizsgáltuk. Az eredményeink azt mutatják, hogy az epitóp 2 felszín a domináns, hiszen a betegek mindegyikében túlnyomó többségben (83%) az epitóp 2 elleni TG2-specifikus antitesteket lehetett kimutatni.

8. Summary

In the present study, we confirmed the TG2 mediated deamidation of p31-43 and p57-68 α -gliadin peptides in vitro, that resulted in the production of celiac disease (CeD) relevant B-cell epitopes and may influence antigenicity of these peptides. By examining serum antibodies of CeD patients we observed that antibodies mainly targeted γ -gliadin peptides, while α -gliadin peptides, despite of their highly similar sequences, were poor antigens. Quantitative results obtained with the PLQPEQFPF peptide were in linear correlation with the results of clinical diagnostic kits and indicated that this single γ -gliadin derived peptide has key role in the humoral immune response of CeD patients. Serum antibodies displayed improved binding towards deamidated gliadin peptides compared to their non-deamidated counterparts at the time of manifest CeD. Results of the affinity purifications performed by single peptides confirmed a high degree of cross-reaction, since antibodies isolated by α -gliadin peptides recognized the γ -gliadin peptides more efficiently. The first appearing antibodies in CeD risk patients recognized γ -gliadin peptides exclusively, and we observed α -gliadin reactive antibodies only at the time of CeD diagnosis. Serum levels of α -gliadin antibodies were always much lower compared to γ -gliadin antibodies, further indicating that they might develop from γ -gliadin specific antibodies during CeD immune maturation.

CeD risk infants exerted more intense antibody response towards the non-deamidated gliadin peptide after the early age gluten introduction, despite the remarkable overlap seen in non-deamidated versus deamidated peptide binding. Preferential antibody binding to non-deamidated peptide continues in the children who do not develop CeD, while in the cases where CeD developed, antibody binding to deamidated peptides significantly improved at the time of CeD diagnosis. Moreover, besides the qualitative changes, antibodies displayed affinity maturation towards the deamidated epitope. These observations suggest changes in TG2 enzyme deamidase activity that might be in connection with disease manifestation.

Interestingly, also infants who lack disease predisposing HLA-DQ alleles were able to produce in early age IgA and IgG antibodies targeting the immune dominant epitope of gliadin. This observation suggests that in response to the primary gluten intake, a non-celiac type, symptomless, non-pathological anti-gliadin immune response takes place that might be part of the normal processing of gluten in healthy subjects leading to immune tolerance development without anti-TG2 antibody production. In the course of this early antibody response, HLA-DQ2.5 homozygous children, who are at the highest genetic risk for CeD, were the poorest responders. This might have an impact on the later developing CeD, presumably because the

proper tolerogenic processing of gluten cannot be performed. To confirm and validate these observations, detailed investigation of the antigen presentation and gliadin specific T-cell response needs to be done.

Anti-gliadin serum antibodies are not appropriate prognostic or diagnostic markers of CeD, because CeD and non-CeD cases cannot be distinguished based on their positivity. Proper CeD prediction can be assured only if we test for TG2-specific antibody positivity, hence TG2-specific IgA antibodies are the first line reliable clinical markers for CeD diagnosis.

We examined epitope specificity of the autoantibodies, emerging at the time of the CeD diagnosis. Based on our results, the majority of TG2-specific antibodies (83%) targeted the epitope 2 surface of the enzyme, hence this seems to be the dominant celiac epitope of TG2.

9. Az értekezés új megállapításai

Az értekezés a következő új megállapításokat tartalmazza:

- A természetes szekvenciájú humán TG2 képes a p31-43 α -gliadin peptid dezamidációjára, mely potenciális coeliakia B-sejt epitópokat eredményez
- A p31-43 és p57-68 α -gliadin peptidekre coeliakiás betegekben csak alacsony mértékű szérum antitest reakció mérhető, és az a γ -gliadinra specifikus antitestek keresztregáló tulajdonságának tulajdonítható
- A p31-43 α -gliadin peptid Caco2 sejtvonalra gyakorolt, ismert biológiai hatása nem reprodukálható azokkal a γ -gliadin peptidekkel, melyeket a keresztregáló antitestek felismernek
- A primer glutén expozíciót követően a coeliakia rizikójú csecsemők – függetlenül attól, hogy később coeliakia ténylegesen kialakul-e - IgA és IgG gliadin-specifikus antitesteket termelnek, melyek szignifikánsan nagyobb mértékű reakciót mutatnak a nem dezamidált gliadin peptid antigénnel, mint a dezamidált változattal
- A coeliakia diagnózis idején szignifikánsan megnő a dezamidált gliadin peptid antigénnel reagáló antitestek mennyisége és az antitestek jelentős affinitás érést mutatnak a PEQFPF dezamidált epitóp motívum iránt
- A HLA-DQ2/DQ8 negatív gyermekek is képesek korai életkorban a primer glutén expozíciót követően gliadin elleni IgA és IgG izotípusú antitestek termelésére
- A legnagyobb genetikai rizikóval rendelkező HLA-DQ2.5 homozigóta csecsemők szignifikánsan kevesebb gliadin elleni antitestet termelnek a primer glutén expozíciót követően, mint a más genotípusú csecsemők
- A coeliakia manifesztációját megelőzően nincs szignifikáns különbség a coeliakiássá váló és nem váló gyermekek gliadin elleni antitest termelésében
- A coeliakia kisgyermekkorai manifesztációjakor az elsőként megjelenő TG2-specifikus antitestek döntő többsége az epitóp 2 felszínre specifikus

10. Irodalom jegyzék

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.* 29, 493–525.

Abadie V, Kim SM, Lejeune T, Palanski BA, Ernest JD, Tastet O, Voisine J, Discepolo V, Marietta EV, Hawash MBF, Ciszewski C, Bouziat R, Panigrahi K, Horwath I, Zurenski MA, Lawrence I, Dumaine A, Yotova V, Grenier JC, Murray JA, Khosla C, Barreiro LB, Jabri B. (2020) IL-15, gluten and HLA-DQ8 drive tissue destruction in coeliac disease. *Nature.* 578, 600–604.

Adzhubei AA, Sternberg MJE, Makarov AA. (2013) Polyproline-II helix in proteins: structure and function. *J Mol Biol.* 425, 2100–2132.

Aleanzi M, Demonte AM, Esper C, Garcilazo S, Waggener M. (2001) Celiac disease: antibody recognition against native and selectively deamidated gliadin peptides. *Clin Chem.* 47, 2023-2028.

Alper CA, Kruskall MS, Marcus-Bagley D, Craven DE, Katz AJ, Brink SJ, Dienstag JL, Awdeh Z, Yunis EJ. (1989) Genetic prediction of nonresponse to hepatitis B vaccine. *N Engl J Med.* 321, 708-712.

Antvorskov JC, Josefsen K, Engkilde K, Funda DP, Buschard K. (2014) Dietary gluten and the development of type 1 diabetes. *Diabetologia.* 57, 1770–1780.

Amarri S, Alvisi P, De Giorgio R, Gelli MC, Cicola R, Tovoli F, Sassatelli R, Caio G, Volta U. (2013) Antibodies to deamidated gliadin peptides: An accurate predictor of coeliac disease in infancy. *J. Clin. Immunol.* 33, 1027–1030.

Arentz-Hansen H, Körner R, Molberg O, Quarsten H, Vader W, Kooy YM, Lundin KE, Koning F, Roepstorff P, Sollid LM, McAdam SN (2000) The intestinal T cell response to alpha-gliadin in adult celiac disease is focused on a single deamidated glutamine targeted by tissue transglutaminase. *J Exp Med.* 191, 603-612.

Balakireva AV, Zamyatnin AA. (2016) Properties of gluten intolerance: gluten structure, evolution, pathogenicity and detoxification capabilities. *Nutrients.* 8, 644.

Barone MV, Nanayakkara M, Paoletta G, Maglio M, Vitale V, Troiano R, Ribocco MTS, Lania G, Zanzi D, Santagata S, Auricchio R, Troncone R, Auricchio S. (2010) Gliadin peptide P31-43 localises to endocytic vesicles and interferes with their maturation. *PLoS One*. 5, e12246.

Barone MV, Zanzi D, Maglio M, Nanayakkara M, Santagata S, Lania G, Miele E, Ribocco MT, Maurano F, Auricchio R, Gianfrani C, Ferrini S, Troncone R, Auricchio S. (2011) Gliadin-mediated proliferation and innate immune activation in celiac disease are due to alterations in vesicular trafficking. *PLoS One*. 6, e17039.

Barone MV, Troncone R, Auricchio S. (2014) Gliadin peptides as triggers of the proliferative and stress/innate immune response of the celiac small intestinal mucosa. *Int J Mol Sci*. 15, 20518-20537.

Bergseng E, Sidney J, Sette A, Sollid LM. (2008) Analysis of the binding of gluten T-cell epitopes to various human leukocyte antigen class II molecules. *Hum Immunol*. 69, 94–100.

Bianchi ML, Bardella MT. (2008) Bone in celiac disease. *Osteoporos. Int*. 19, 1705–1716.

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*. 5, e9698.

Bourne JT. et al. (1985) Arthritis and coeliac disease. *Ann. Rheum. Dis*. 44, 592–598.

Camarca A, Auricchio R, Picascia S, Fierro O, Maglio M, Miele E, Malamisura B, Greco L, Troncone R, Gianfrani C. (2017) Gliadin-reactive T cells in Italian children from preventCD cohort at high risk of celiac disease. *Pediatr Allergy Immunol*. 28, 362-369.

Caputo I, Secondo A, Lepretti M, Paoletta G, Auricchio S, Barone MV, Esposito C. (2012) Gliadin peptides induce tissue transglutaminase activation and ER-stress through Ca²⁺ mobilization in Caco-2 cells. *PLoS One*. 7, e45209.

Chorzelski TP, Beutner EH, Sulej J, Tchorzewska H, Jablonska S, Kumar V, Kapuscinska A. (1984) IgA anti-endomysial antibody: A new serological marker of dermatitis herpetiformis and coeliac disease. *Br J Dermatol*. 111, 395-402.

Choung RS, Marietta EV, Van Dyke CT, Brantner TL, Rajasekaran J, Pasricha PJ, Wang T, Bei K, Krishna K, Krishnamurthy HK, Snyder MR, Jayaraman V, Murray JA. (2016) Determination of B-cell epitopes in patients with celiac disease: Peptide Microarrays. *PLoS One*. 11, e0147777.

Christophersen A, Risnes LF, Bergseng E, Lundin KEA, Sollid LM, Qiao SW. (2016) Healthy HLA-DQ2.5+ subjects lack regulatory and memory T cells specific for immunodominant gluten epitopes of celiac disease. *J. Immunol.* 196, 2819–2826.

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.* 182, 7440-7450.

Dicke, W. (1950) Investigation of the harmful effects of certain types of cereal on patients with coeliac disease (Thesis). University of Utrecht; The Netherlands: 1950 Coeliac disease.

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. *Nature Med.* 3, 797–801.

Dørum S, Qiao SW, Sollid LM, Fleckenstein B. (2009) A quantitative analysis of transglutaminase 2-mediated deamidation of gluten peptides: implications for the T-cell response in celiac disease. *J Proteome Res.* 8, 1748-1755.

Dørum S, Arntzen MØ, Qiao S-W, Holm A, Koehler CJ, Thiede B, Sollid LM, Fleckenstein B (2010) The preferred substrates for transglutaminase 2 in a complex wheat gluten digest are peptide fragments harboring celiac disease T-cell epitopes. *PLoS One.* 5, e14056.

Dørum S, Bodd M, Fallang LE, Bergseng E, Christophersen A, Johannesen MK, Qiao SW, Stamnaes J, de Souza GA, Sollid LM (2014) HLA-DQ molecules as affinity matrix for identification of gluten T cell epitopes. *J Immunol.* 193, 4497-4506.

Dørum S, Steinsbø Ø, Bergseng E, Arntzen MØ, de Souza GA, Sollid LM (2016) Gluten-specific antibodies of celiac disease gut plasma cells recognize long proteolytic fragments that typically harbor T-cell epitopes. *Sci Rep.* 6, 25565.

du Pré MF, Kozijn AE, van Berkel LA, ter Borg MND, Lindenbergh-Kortleve D, Jensen LT, Kooy-Winkelaar Y, Koning F, Boon L, Nieuwenhuis EES, Sollid LM, Fugger L, Samsom JN. (2011) Tolerance to ingested deamidated gliadin in mice is maintained by splenic, type 1 regulatory T cells. *Gastroenterology*. 141, 610–620, 620 e1-2.

du Pré MF, Blazeovski J, Dewan AE, Stammaes J, Kanduri C, Sandve GK, Johannesen MK, Lindstad CB, Hnida K, Fugger L, Melino G, Qiao SW, Sollid LM. (2020) B cell tolerance and antibody production to the celiac disease autoantigen transglutaminase 2. *J Exp Med*. 217, 2: e20190860.

Eyre S, Hinks A, Bowes J, Flynn E, Martin P, Wilson AG, Morgan AW, Emery P, Steer S, Hocking LJ, Reid DM, Harrison P, Wordsworth P, Yorkshire Early Arthritis (YEAR) Consortium, Biologics in RA Control (BIRAC) Consortium, Thomson W, Worthington J, Barton A. (2010) Overlapping genetic susceptibility variants between three autoimmune disorders: rheumatoid arthritis, type 1 diabetes and coeliac disease. *Arthritis Res Ther*. 12, R175.

Fleckenstein B, Molberg Ø, Qiao SW, Schmid DG, von der Mulbe F, Elgstoen K, Jung G, Sollid LM. (2002) Gliadin T cell epitope selection by tissue transglutaminase in celiac disease. Role of enzyme specificity and pH influence on the transamidation versus deamidation process. *J Biol Chem*. 277, 34109–34116.

Fleckenstein B, Qiao SW, Larsen MR, Jung G, Roepstorff P, Sollid LM. (2004) Molecular characterization of covalent complexes between tissue transglutaminase and gliadin peptides. *J Biol Chem*. 279, 17607-17616.

García-Horsman JA, Venäläinen JI, Lohi O, Auriola IS, Korponay-Szabó IR, Kaukinen K, Mäki M, Männistö PT. (2007) Deficient activity of mammalian prolyl oligopeptidase on the immunoactive peptide digestion in coeliac disease. *Scand J Gastroenterol*. 42, 562-571.

Gianfrani C, Levings MK, Sartirana C, Mazzarella G, Barba G, Zanzi D, Camarca A, Iaquinto G, Giardullo N, Auricchio S, Troncone R, Roncarolo MG. (2006) Gliadin-specific type 1 regulatory T cells from the intestinal mucosa of treated celiac patients inhibit pathogenic T cells. *J. Immunol*. 177, 4178–4186.

Green PH, Cellier C. (2007) Celiac disease; *N. Engl. J. Med*. 357, 1731-1743.

Gujral N, Freeman HJ, Thomson ABR. (2012) Celiac disease: Prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment; *World J Gastroenterol* 18, 6036-6059.

Hadjivassiliou M, Mäki M, Sanders DS, Williamson CA, Grünewald RA, Woodroffe NM, Korponay-Szabó IR. (2006) Autoantibody targeting of brain and intestinal transglutaminase in gluten ataxia. *Neurology*. 66, 373-377.

Halfdanarson TR, Litzow MR, Murray JA. (2007) Hematologic manifestations of celiac disease. *Blood* 109, 412–421.

Hardy MY, Girardin A, Pizzey C, Cameron DJ, Watson KA, Picascia S, Auricchio R, Greco L, Gianfrani C, La Gruta NL, Anderson RP, Tye-Din JA. (2015) Consistency in polyclonal T-cell responses to gluten between children and adults with celiac disease. *Gastroenterology*. 149, 1541-1552.

Heiner DC, Lahey ME, Wilson JF, Gerrard JW, Schwachman H, Khaw KT. (1962) Precipitins to antigens of wheat and cow's milk in celiac disease. *J Pediatr*. 61, 813-830.

Hiller R, Laffer S, Harwanegg C, Huber M, Schmidt WM, Twardosz A, Barletta B, Becker WM, Blaser K, Breit-eneder H, Chapman M, Cramer R, Duchêne M, Ferreira F, Fiebig H, Hoffmann-Sommergruber K, King TP, Kleber-Janke T, Kurup VP, Lehrer SB, Lidholm J, Müller U, Pini C, Reese G, Scheiner O, Scheynius A, Shen HD, Spitzauer S, Suck R, Swoboda I, Thomas W, Tinghino R, Van Hage-Hamsten M, Virtanen T, Kraft D, Müller MW, Valenta R. (2002) Microarrayed allergen molecules: diagnostic gatekeepers for allergy treatment. *FASEB J*. 16, 414-416.

Hung SC, Hou T, Jiang W, Wang N, Qiao SW, Chow IT, Liu X, van der Burg SH, Koelle DM, Kwok WW, Sollid LM, Mellins ED (2019) Epitope selection for DQ2 presentation: implications for celiac disease and viral defense. *J Immunol*. 202, 2558-2569.

Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabó I, Kurppa K, Mearin ML, Ribes-Koninckx C, Shamir R, Troncone R, Auricchio R, Castillejo G, Christensen R, Dolinsek J, Gillett P, Hróbjartsson A, Koltai T, Maki M, Nielsen SM, Popp A, Størdal K, Werkstetter K, Wessels M (2020) - European Society Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Guidelines for Diagnosing Coeliac Disease 2020. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 70, 141-156.

Iltanen S, Collin P, Korpela M, Holm K, Partanen J, Polvi A, Maki M. (1999) Celiac disease and markers of celiac disease latency in patients with primary Sjögren's syndrome. *Am J Gastroenterol.* 94: 1042-1046.

Israel EJ, Taylor S, Wu Z, Mizoguchi E, Blumberg RS, Bhan A, Simister NE. (1997) Expression of the neonatal Fc receptor, FcRn, on human intestinal epithelial cells. *Immunology.* 92, 69–74.

Iversen R, Di Niro R, Stammaes J, Lundin KEA, Wilson PC, Sollid LM. (2013) Transglutaminase 2-specific autoantibodies in celiac disease target clustered, N-terminal epitopes not displayed on the surface of cells. *J Immunol.* 190, 5981-5991.

Iversen R, Amundsen SF, Kleppa L, du Pré MF, Stammaes J, Sollid LM. (2020) Evidence that pathogenic transglutaminase 2 in celiac disease derives from enterocytes. *Gastroenterology.* 159, 788–790.

Jardetzky TS, Brown JH, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC. (1996) Crystallographic analysis of endogenous peptides associated with HLA-DR1 suggests a common, polyproline II-like conformation for bound peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 734.

Kalliokoski S, Sulic AM, Korponay-Szabó IR, Szondy Z, Frias R, Perez MA, Martucciello S, Roivainen A, Pelliniemi LJ, Esposito C, Griffin M, Sblattero D, Mäki M, Kaukinen K, Lindfors K, Caja S. (2013) Celiac disease-specific TG2-targeted autoantibodies inhibit angiogenesis ex vivo and in vivo in mice by interfering with endothelial cell dynamics. *PLoS One.* 8, e65887.

Kanchan K, Ergülen E, Király R, Simon-Vecsei Z, Fuxreiter M, Fésüs L. (2013) Identification of a specific one amino acid change in recombinant human transglutaminase 2 that regulates its activity and calcium sensitivity. *Biochem J.* 455, 261-72.

Karell K, Louka AS, Moodie SJ, Ascher H, Clot F, Greco L, Ciclitira PJ, Sollid LM, Partanen J. (2003) HLA types in celiac disease patients not carrying the DQA1*05-DQB1*02 (DQ2) heterodimer: results from the European Genetics Cluster on Celiac Disease; *Hum Immunol* 64, 469–477.

Kárpáti S, Burgin-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*. 336, 1335-1338.

Kelly J, Weir DG, Feighery C. (1988) Differential expression of HLA-D gene products in the normal and coeliac small bowel; *Tissue Antigens*. 31, 151–160.

Kim CY, Quarsten H, Bergseng E, Khosla C, Sollid LM. (2004) Structural basis for HLA-DQ2-mediated presentation of gluten epitopes in coeliac disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101, 4175-4179.

Korneychuk N, Meresse B, Cerf-Bensussan N. (2015) Lessons from rodent models in coeliac disease. *Mucosal Immunology*. 8, 18–28.

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 coeliac disease - specific autoantibodies. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 31, 520-527.

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

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*. 53, 641-648.

Korponay-Szabó IR, Raivio T, Laurila K, Opre J, Király R, Kovács JB, Kaukinen K, Fésüs L, Mäki M. (2005) Coeliac disease case finding and diet monitoring by point-of-care testing. *Aliment Pharmacol Ther.* 22, 729-37.

Kreis M, Forde BG, Rahman S, Mifflin BJ, Shewry PR. (1985) Molecular evolution of the seed storage proteins of barley, rye and wheat. *J. Mol. Biol.* 183, 499–502.

Kull K, Uibo O, Salupere R, Metskula K, Uibo R. (1999) High frequency of antigliadin antibodies and absence of antiretulin and antiendomysium antibodies in patients with ulcerative colitis. *J Gastroenterol.* 34, 61–65.

Lähdeaho ML, Vainio E, Lehtinen M, Parkkonen P, Partanen J, Koskimies S, Mäki M. (1995) Activation of celiac disease immune system by specific α -gliadin peptides. *Cereal Chem.* 72, 475-479.

Lerner A, Jeremias P, Neidhöfer S, Matthias T. (2016) Antibodies against neo-epitope tTg complexed to gliadin are different and more reliable than anti-tTg for the diagnosis of pediatric celiac disease. *J Immunol Methods.* 429, 15-20.

Lexhaller B, Ludwig C, Scherf KA. (2019) Comprehensive detection of isopeptides between human tissue transglutaminase and gluten peptides. *Nutrients.* 11, 2263.

Lorand L, Graham RM. (2003) Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nature Rev Mol Cell Biol.* 4, 140–156.

Lundin KEA, Scott H, Hansen T, Paulsen G, Halstensen TS, Fausa O, Thorsby E, Sollid LM. (1993) Gliadin-specific, HLA-DQ ($\alpha 1^*0501$, $\beta 1^*0201$) restricted T cells isolated from the small intestinal mucosa of celiac disease patients; *J Exp Med.* 178, 187–196.

Lundin KEA, Scott H, Fausa O, Thorsby E, Sollid LM. (1994) T cells from the small intestinal mucosa of a DR4, DQ7/DR4, DQ8 celiac disease patient preferentially recognize gliadin when presented by DQ8. *Hum Immunol.* 41, 285–291.

Lupinek C, Wollmann E, Baar A, Banerjee S, Breiteneder H, Broecker BM, Bublin M, Curin M, Flicker S, Garmatiuk T, Hochwallner H, Mittermann I, Pahr S, Resch Y, Roux KH, Srinivasan B, Stentzel S, Vrtala S, Willison LN, Wickman M, Lødrup-Carlsen KC, Antó JM, Bousquet J, Bachert C, Ebner D, Schleiderer T, Harwanegg C, Valenta R. (2014) Advances in allergen-microarray technology for diagnosis and monitoring of allergy: The MeDALL allergen-chip. *Methods.* 66, 106-119.

Marsh MN. (1992) Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ('celiac sprue') *Gastroenterology.* 102, 330–354.

Matysiak-Budnik T, Candalh C, Dugave C, Namane A, Cellier C, Cerf-Bensussan N, Heyman M. (2003) Alterations of the intestinal transport and processing of gliadin peptides in celiac disease; *Gastroenterology.* 125, 696–707.

- Matysiak-Budnik T, Moura IC, Arcos-Fajardo M, Lebreton C, Menard 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.* 205, 143–154.
- Meeuwisse GW. (1970) Diagnostic criteria in coeliac disease. *Acta Paediatr Scand.* 59, 461–463.
- Mention JJ, Ahmed MB, Bègue B, Barbe U, Verkarre V, Asnafi V, Colombel JF, Cugnenc PH, Ruemmele FM, McIntyre E, Brousse N, Cellier C, Cerf-Bensussan N. (2003) Interleukin 15: a key to disrupted intraepithelial lymphocyte homeostasis and lymphomagenesis in celiac disease. *Gastroenterology.* 125, 730-745.
- Molberg Ø, Kett K, Scott H, Thorsby E, Sollid LM, Lundin KEA. (1997) Gliadin specific, HLA DQ2-restricted Tcells are commonly found in small intestinal biopsies from coeliac disease patients, but not from controls; *Scand J Immunol.* 46, 103–109.
- Morón B, Bethune MT, Comino I, Manyani H, Ferragud M, López MC, Cebolla A, Khosla C, Sousa C. (2008) Toward the assessment of food toxicity for celiac patients: Characterization of monoclonal antibodies to a main immunogenic gluten peptide. *PLoS One.* 3, e2294.
- Muccilli V, Cunsolo V, Saletti R, Foti S, Masci S, Lafiandra D. (2005) Characterization of B- and C-type low molecular weight glutenin subunits by electrospray ionization mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Proteomics.* 5, 719–728.
- Murray JA. (1997) Serodiagnosis of celiac disease. *Clin Lab Med.* 17, 445-464.
- 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.* 152, 111–119.
- Nanayakkara M, Lania G, Maglio M, Auricchio R, De Muis C, Discepolo V, Miele E, Jabri B, Troncone R, Auricchio S, Barone MV. (2018) P31-43, an undigested gliadin peptide, mimics

and enhances the innate immune response to virus-es and interferes with endocytic trafficking: a role in celiac disease. *Sci Rep.* 8, 10821.

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.* 101, 1597-1600.

Nilsen EM, Lundin KE, Krajci P, Scott H, Sollid LM, Brandtzaeg P. (1995) Gluten specific, HLA-DQ restricted T cells from coeliac mucosa produce cytokines with Th1 or Th0 profile dominated by interferon gamma. *Gut.* 37, 766–776.

Nguyen TB, Jayaraman P, Bergseng E, Madhusudhan MS, Kim CY, Sollid LM. (2017) Unraveling the structural basis for the unusually rich association of human leukocyte antigen DQ2.5 with class-II-associated invariant chain peptides. *J Biol Chem.* 292, 9218–9228.

Nurmi R, Korponay-Szabó IR, Laurila K, Huhtala H, Niemelä O, Mustonen J, Mäkelä S, Kaukinen K, Lindfors K. (2021) Celiac disease-type tissue transglutaminase autoantibody deposits in kidney biopsies of patients with IgA nephropathy. *Nutrients.* 13, 1594.

Oberhuber G, Granditsch G, Vogelsang H. (1999) The histopathology of coeliac disease: time for a standardized report scheme for pathologists. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 11, 1185–1194.

Osman AA, Günnel T, Dietl A, Uhlig HH, Amin M, Fleckenstein B, Richter T, Mothes T. (2000) B cell epitopes of gliadin. *Clin Exp Immunol.* 121, 248-254.

Ots M, Uibo O, Metskula K, Uibo R, Salupere V. (1999) IgA-antigliadin antibodies in patients with IgA nephropathy: The secondary phenomenon? *Am J Nephrol.* 19, 453–458.

Paimela L, Kurki P, Leirisalo-Repo M, Piirainen H. (1995) Gliadin immune reactivity in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 13, 603–607.

Paulley JW. (1954) Observation on the aetiology of idiopathic steatorrhoea; jejunal and lymph-node biopsies. *Br Med J.* 2, 1318–1321.

Petersen J, van Bergen J, Loh KL, Kooy-Winkelaar Y, Beringer DX, Thompson A, Bakker SF, Mulder CJJ, Ladell K, McLaren JE, Price DA, Rossjohn J, Reid HH, Koning F. (2015) Determinants of gliadin-specific T cell selection in celiac disease. *J Immunol.* 194, 6112-6122.

Piper JL, Gray GM, Khosla C. (2002) High selectivity of human tissue transglutaminase for immunoactive gliadin peptides: implications for celiac sprue. *Biochemistry*. 41, 386–393.

Ploski R, Ek J, Thorsby E, Sollid LM. (1993) On the HLA-DQ ($\alpha 1^*0501$, $\beta 1^*0201$)-associated susceptibility in celiac disease: a possible gene dosage effect of DQB1*0201. *Tissue Antigens*. 41, 173–177.

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*. 13, 150–151.

Qiao SW, Bergseng E, Molberg Ø, Jung G, Fleckenstein B, Sollid LM. (2005) Refining the rules of gliadin T cell epitope binding to the disease-associated DQ2 molecule in celiac disease: importance of proline spacing and glutamine deamidation. *J Immunol*. 175, 254-261.

Qiao SW, Sollid LM, Blumberg RS. (2009) Antigen presentation in celiac disease. *Curr Opin Immunol*. 21, 111–117.

Qiao SW, Christophersen A, Lundin KEA, Sollid LM. (2014) Biased usage and preferred pairing of α - and β -chains of TCRs specific for an immunodominant gluten epitope in coeliac disease. *Int Immunol*. 26, 13-19.

Rashtak S, Ettore MW, Homburger HA, Murray JA. (2008) Combination testing for antibodies in the diagnosis of coeliac disease: comparison of multiplex immunoassay and ELISA methods. *Aliment Pharmacol Ther*. 28, 805-813.

Ráki M, Tollefsen S, Molberg Ø, Lundin KEA, Sollid LM, Jahnsen FL. (2006) A unique dendritic cell subset accumulates in the celiac lesion and efficiently activates gluten-reactive T cells. *Gastroenterology*. 131, 428–438.

Ráki M, Dahal-Koirala S, Yu H, Korponay-Szabó IR, Gyimesi J, Castillejo G, Jahnsen J, Qiao SW, Sollid LM (2017) Similar responses of intestinal T cells from untreated children and adults with celiac disease to deamidated gluten epitopes. *Gastroenterology*. 153, 787-798.

Rock KL, Reits E, Neefjes J. (2016) Present Yourself! By MHC Class I and MHC Class II Molecules. *Trends Immunol*. 37, 724–737.

- Roep BO, Bontrop RE, Pena AS, Vaneggermond MCJA, Vanrood JJ, Giphart MJ. (1988) An HLA-DQ alpha allele identified at DNA and protein level is strongly associated with celiac disease. *Hum.Immunol.* 23, 271.
- Roy B, Neumann RS, Snir O, Iversen R, Sandve GK, Lundin KEA, Sollid LM. (2017) High-Throughput Single-Cell Analysis of B Cell Receptor Usage among Autoantigen-Specific Plasma Cells in Celiac Disease. *J Immunol.* 199, 782-791.
- Schirru E, Danjou F, Cicotto L, Rossino R, Macis MD, Lampis R, Jores RD, Congia M. (2013) Anti-actin IgA antibodies identify celiac disease patients with a Marsh 3 intestinal damage among subjects with moderate anti-TG2 levels. *Biomed Res Int.* 2013:630463.
- Schulzke JD, Schulzke I, Fromm M, Riecken EO. (1995) Epithelial barrier and ion transport in coeliac sprue: electrical measurements on intestinal aspiration biopsy specimens. *Gut.* 37, 777–782.
- Schumann M, Richter JF, Wedell I, Moos V, Zimmermann-Kordmann M, Schneider T, Daum S, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. (2008) Mechanisms of epithelial translocation of the a2-gliadin-33mer in coeliac sprue. *Gut.* 57, 747–754.
- 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.* 50, 2370-2375.
- Seah PP, Fry I, Hoffbrand AV, Holborow EJ. (1971) Tissue antibodies in dermatitis herpetiformis and adult coeliac disease. *Lancet.* 1, 834-836.
- 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.* 297, 2275.
- Shan L, Qiao SW, Arentz-Hansen H, Molberg Ø, Gray GM, Sollid LM, Khosla C. (2005) Identification and analysis of multivalent proteolytically resistant peptides from gluten: implications for celiac sprue. *J Proteome Res.* 4, 1732-1741.
- Shewry PR, Halford NG. (2002) Cereal seed storage proteins: Structures, properties and role in grain utilization; *J. Exp. Bot.* 53, 947–958.

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*. 3, e1861.

Simell S, Hoppu S, Hekkala A, Simell T, Ståhlberg MR, Viander M, Yrjanainen 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*. 102, 2026–2035.

Simon-Vecsei Z, Király R, Bagossi P, Tóth B, Dahlbom I, Caja S, Csösz 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 USA*. 109, 431-436.

Singh H, MacRitchie F. (2001) Application of polymer science to properties of gluten. *J. Cereal Sci*. 33, 231–243.

Skipper JCA, Hendrickson RC, Gulden PH, Brichard V, Van Pel A, Chen Y, Shabanowitz J, Wolfel T, Slingluff CL Jr, Boon T, Hunt DF, Engelhard VH. (1996) An HLA-A2-restricted tyrosinase antigen on melanoma cells results from posttranslational modification and suggests a novel pathway for processing of membrane proteins. *J Exp Med*. 183, 527–534.

Snir O, Chen X, Gidoni M, du Pré MF, Zhao Y, Steinsbø Ø, Lundin KEA, Yaari G, Sollid LM. (2017) Stereotyped antibody responses target posttranslationally modified gluten in celiac disease. *JCI Insight*. 2, e93961.

Sollid LM, Markussen G, Ek J, Gjerde H, Vartdal F, Thorsby E. (1989) Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ α/β heterodimer. *J Exp Med*. 169, 345–350.

Sollid LM, Thorsby E. (1993) HLA susceptibility genes in coeliac disease: genetic mapping and role in pathogenesis. *Gastroenterology*. 105, 910-922.

Sollid LM, Molberg Ø, McAdam S, Lundin KEA. (1997) Autoantibodies in coeliac disease: tissue transglutaminase - guilt by association? *Gut*. 41, 851–852.

Sollid LM. (2002) Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder; *Nat Rev Immunol.* 2, 647–655.

Sollid LM, Qiao SW, Anderson RP, Gianfrani C, Koning F. (2012) Nomenclature and listing of celiac disease relevant gluten T-cell epitopes restricted by HLA-DQ molecules. *Immunogenetics.* 64, 455–460.

Sollid LM, Jabri B. (2013) Triggers and drivers of autoimmunity: lessons from coeliac disease. *Nat Rev Immunol.* 13, 294-302.

Sollid LM, Tye-Din JA, Qiao SW, Anderson RP, Gianfrani C, Koning F. (2020) Update 2020: nomenclature and listing of celiac disease-relevant gluten epitopes recognized by CD4 + T cells. *Immunogenetics.* 72, 85-88.

Srinivasan B, Focke-Tejkl M, Swoboda I, Constantin C, Mittermann I, Pahr S, Vogelsang H, Huber WD, Valenta R. (2013) A combined biochemical, biophysical and immunological approach towards the identification of celiac disease-specific wheat antigens. *Amino Acids.* 45, 889-900.

Stamnaes J, Fleckenstein B, Sollid LM. (2008) The propensity for deamidation and transamidation of peptides by transglutaminase 2 is dependent on substrate affinity and reaction conditions. *Biochim Biophys Acta.* 1784, 1804-1811.

Stamnaes J, Pinkas DM, Fleckenstein B, Khosla C, Sollid LM. (2010) Redox regulation of transglutaminase 2 activity. *J Biol Chem.* 285, 25402–25409.

Steinsbø Ø, Dunand CJH, Huang M, Mesin L, Salgado-Ferrer M, Lundin KEA, Jahnsen J, Wilson PC, Sollid LM. (2014) Restricted VH/VL usage and limited mutations in gluten-specific IgA of coeliac disease lesion plasma cells. *Nat Commun.* 5, 4041.

Stenman SM, Lindfors K, Venäläinen JI, Hautala A, Männistö PT, Garcia-Horsman JA, Kaukovirta-Norja A, Auriola S, Mauriala T, Mäki M, Kaukinen K. (2010) Degradation of coeliac disease-inducing rye secalin by germinating cereal enzymes: diminishing toxic effects in intestinal epithelial cells. *Clin Exp Immunol.* 161, 242–249.

Stepniak D, Wiesner M, de Ru AH, Moustakas AK, Drijfhout JW, Papadopoulos GK, van Veelen PA, Koning F. (2008) Large-scale characterization of natural ligands explains the unique gluten-binding properties of HLA-DQ2. *J Immunol.* 180, 3268–3278.

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.* 115, 1322–1328.

Szabolcs M, Csorba S, Sipka S. (1987) In vitro cross-linking of gluten into high-molecular-weight polymers with transglutaminase. *Acta Paediatr. Hung.* 28, 215-227.

Tanner GJ, Colgrave ML, Howitt CA. (2014) Gluten, celiac disease, and gluten intolerance and the impact of gluten minimization treatments with prolylendopeptidase on the measurement of gluten in beer; *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 72, 36-50.

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.* 126, 157-166.

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

Thorsby E, Lie BA. (2005) HLA associated genetic predisposition to autoimmune diseases: genes involved and possible mechanisms. *Transpl Immunol.* 14, 175–182.

Tollefsen S, Arentz-Hansen H, Fleckenstein B, Molberg O, Ráki M, Kwok WW, Jung G, Lundin KEA, Sollid LM. (2006) HLA-DQ2 and -DQ8 signatures of gluten T cell epitopes in celiac disease. *J Clin Invest.* 116, 2226-2236.

Trynka G, Hunt KA, Bockett NA, Romanos J, Mistry V, Szperl A, Bakker SF, Bardella MT, Bhaw-Rosun L, Castillejo G, de la Concha EG, de Almeida RC, Dias KR, van Diemen CC, Dubois PC, Duerr RH, Edkins S, Franke L, Fransen K, Gutierrez J, Heap GA, Hrdlickova B, Hunt S, Plaza Izurieta L, Izzo V, Joosten LA, Langford C, Mazzilli MC, Mein CA, Midah V, Mitrovic M, Mora B, Morelli M, Nutland S, Nunez C, Onengut-Gumuscu S, Pearce K, Platteel M, Polanco I, Potter S, Ribes-Koninckx C, Ricano-Ponce I, Rich SS, Rybak A, Santiago JL, Senapati S, Sood A, Szajewska H, Troncone R, Varade J, Wallace C, Wolters VM, Zhernakova A, Thelma BK, Cukrowska B, Urcelay E, Bilbao JR, Mearin ML, Barisani D, Barrett JC,

Plagnol V, Deloukas P, Wijmenga C, van Heel DA. (2011) Dense genotyping identifies and localizes multiple common and rare variant association signals in celiac disease. *Nat Genet.* 43, 1193-1201.

Vader LW, de Ru A, van der Wal Y, Kooy YMC, Benckhuijsen W, Mearin ML, Drijfhout JW, van Veelen P, Koning F. (2002) Specificity of tissue transglutaminase explains cereal toxicity in celiac disease. *J Exp Med.* 195, 643-649.

Vajro P, Paoletta G, Pisano P, Maggiore G. (2012) Hypertransaminasemia and coeliac disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 35, 202–203; author reply 203–204.

van Berge-Henegouwen GP, Mulder CJ. (1993) Pioneer in the gluten free diet: Willem-Karel Dicke 1905–1962, over 50 years of gluten free diet. *Gut.* 34, 1473–1475.

Van de Perre P. (2003) Transfer of antibody via mother's milk. *Vaccine.* 21, 3374-3376.

Ventura A, Magazzù G, Greco L. (1999) Duration of exposure to gluten and risk for autoimmune disorders in patients with celiac disease. SIGEP Study Group for Autoimmune Disorders in Celiac Disease. *Gastroenterology.* 117, 297-303.

Volta U, Ravaglia G, Granito A, Forti P, Maioli F, Petrolini N, Zoli M, Bianchi FB. (2001) Coeliac disease in patients with autoimmune thyroiditis. *Digestion.* 64, 61-65.

Volta U, Rodrigo L, Granito A, Petrolini N, Muratori P, Muratori L, Linares A, Veronesi L, Fuentes D, Zauli D, Bianchi FB. (2002) Celiac disease in autoimmune cholestatic liver disorders. *Am J Gastroenterol.* 97, 2609-2613.

Vriezinga SL, Auricchio R, Bravi E, Castillejo G, Chmielewska A, Crespo Escobar P, Kolaček S, Koletzko S, Korponay-Szabó IR, Mummert E, Polanco I, Putter H, Ribes-Koninckx C, Shamir R, Szajewska H, Werkstetter K, Greco L, Gyimesi J, Hartman C, Hogen Esch C, Hopman E, Ivarsson A, Koltai T, Koning F, Martinez-Ojinaga E, te Marvelde C, Pavic A, Romanos J, Stoopman E, Villanacci V, Wijmenga C, Troncone R, Mearin ML (2014) Randomized feeding intervention in infants at high risk for celiac disease. *N Engl J Med.* 371, 1304-1315.

Walker-Smith JA, Guandalini S, Schmitz J, et al. (1990) Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. *Arch Dis Child.* 65, 909–911.

Werkstetter KJ, Korponay-Szabó IR, Popp A, Villanacci V, Salemme M, Heilig G, Lillevang ST, Mearin ML, Ribes-Koninckx C, Thomas A, Troncone R, Filipiak B, Mäki M, Gyimesi J, Najafi M, Dolinšek J, Dydensborg Sander S, Auricchio R, Papadopoulou A, Vécsei A, Sztanyi P, Donat E, Nenna R, Alliet P, Penagini F, Garnier-Lengliné H, Castillejo G, Kurppa K, Shamir R, Hauer AC, Smets F, Corujeira S, van Winckel M, Buderus S, Chong S, Husby S, Koletzko S, ProCeDE study group (2017) Accuracy in diagnosis of celiac disease without biopsies in clinical practice. *Gastroenterology*. 153, 924-935.

West J, Logan RF, Card TR, Smith C, Hubbard R. (2004) Risk of vascular disease in adults with diagnosed coeliac disease: a population-based study. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 20, 73–79.

Wieser H. (2007) Chemistry of gluten proteins; *Food Microbiol.* 24, 115–119.

Withoff S, Li Y, Jonkers I, Wijmenga C. (2016) Understanding celiac disease by genomics. *Trends Genet.* 32, 295-308.

Yoshida M, Claypool SM, Wagner JS, Mizoguchi E, Mizoguchi A, Roopenian DC, Lencer WI, Blumberg RS. (2004) Human neonatal Fc receptor mediates transport of IgG into luminal secretions for delivery of antigens to mucosal dendritic cells. *Immunity*. 20, 769–783.

Zilic S, Barac M, Pesic M, Dodig D, Ignjatovic-Micic D. (2011) Characterization of proteins from grain of different bread and durum wheat genotypes. *Int. J. Mol. Sci.* 12, 5878–5894.

11. Publikációs lista



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/111/2022.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Diós Ádám

Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Diós, Á.**, Srinivasan, B., Gyimesi, J., Werkstetter, K., Valenta, R., Koletzko, S., Korponay-Szabó, I.: Changes in Non-deamidated versus Deamidated Epitope Targeting and Disease Prediction during the Antibody Response to Gliadin and Transglutaminase of Infants at Risk for Celiac Disease.
Int. J. Mol. Sci. 23 (5), 1-16, 2022.
IF: 5.923 (2020)
2. **Diós, Á.**, Elek, R., Szabó, I., Horváth, S., Gyimesi, J., Király, R., Werkstetter, K., Koletzko, S., Fésüs, L., Korponay-Szabó, I.: Gamma-gliadin specific celiac disease antibodies recognize p31-43 and p57-68 alpha gliadin peptides in deamidation related manner as a result of cross-reaction.
Amino Acids. 53 (7), 1051-1063, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00726-021-03006-7>
IF: 3.52 (2020)





További közlemények

3. Birinyi, Z., Réder, D., **Diós, Á.**, Korponay-Szabó, I., Hunyadi-Gulyás, É., Florides, C. G., Juhász, A., Gell, G.: Immunoanalytic investigation of grain proteins antigenic for celiac disease patients in an einkorn collection.
Food Chem. 371, 1-11, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131148>
IF: 7.514 (2020)
4. Miczi, M., **Diós, Á.**, Bozóki, B., Tózsér, J., Mótyán, J. A.: Development of a Bio-Layer Interferometry-Based Protease Assay Using HIV-1 Protease as a Model.
Viruses-Basel. 13 (6), 1-20, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/v13061183>
IF: 5.048 (2020)

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 22,005

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 9,443

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2022.03.08.



12. Tárgyszavak

Coeliakia

Dezamidált gliadin peptid

Gliadin elleni antitest

Gliadin peptid

Szöveti transzglutamináz

12. Keywords

Celiac disease

Deamidated gliadin peptide

Anti-gliadin antibodies

Gliadin peptide

Tissue transglutaminase

13. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék hálás köszönetet mondani témavezetőmnek Prof. Dr. Korponay-Szabó Ilmának, aki mindvégig támogatta kutatási munkámat, tanácsaival és iránymutatásával segítette a doktori értekezés elkészülését és szakmai fejlődésemet. Segítsége és odaadó, fáradtságot nem kímélő munkája nélkül nem érhettem volna el ezen eredményeket.

Köszönetet szeretnék mondani a Coeliakia munkacsoport minden korábbi és jelenlegi tagjának, akik végig kísérték munkámat, külön kiemelve Elek Ritát, akitől számos molekuláris biológiai módszert és praktikát tanultam, és aki önzetlenül segítette munkámat az első naptól fogva. Köszönet illeti a Gyermekklinika mindenkor vezetőit, Prof. Dr. Balla Györgyöt, Prof. Dr. Veres Gábort és Dr. Szabó Tamást, akik lehetővé tették PhD képzésemet.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Tózsér Józsefnek, aki a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet vezetőjeként sok éven keresztül laboratóriumot és az intézeti eszközparkhoz való hozzáférést biztosított számomra és a coeliakia munkacsoport számára.

Külön köszönetet szeretnék mondani Prof. Dr. Fésüs Lászlónak, aki mindvégig önzetlenül segítette munkámat, nemcsak a kísérletekhez szükséges eszközök és reagensek terén, de azáltal is, hogy lehetőséget biztosított a szakmai megbeszéléseken való részvételre, eredményeim prezentációjára. Meglátásai és tanácsai nagyban hozzájárultak szakmai fejlődésemhez, hálás köszönet érte.

Továbbá szeretnék köszönetet mondani a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet összes korábbi és jelenlegi dolgozójának, különös tekintettel a Fésüs munkacsoport tagjaira, kiemelve Dr. Király Róbertet, akihez bármilyen szakmai segítségért mindig bizalommal fordulhattam.

Szeretnék köszönetet mondani minden társzerző kollégámnak, akik segítették a publikációk elkészítését, illetve köszönettel tartozom Debreceni Egyetem Biofizikai és Sejtbiológiai Intézetének, akik lehetővé tették a mikroszkóp használatát.

Legfőképpen szeretnék köszönetet mondani a családomnak, akik mindvégig rendületlen bizalommal és odaadással támogattak, megértésük és biztató szavaik nélkül nem tudtam volna mindezt elérni, hálás köszönet érte.

A disszertáció elkészítéséhez szükséges kísérletek elvégzését az alábbi pályázatokból nyert források támogatták: GINOP 2.3.2-15-2016-00015, EFOP-3.6.1-16-2016-00022. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.