

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**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

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

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudomány tudományágban

Írta: Diós Ádám okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskolája
keretében

Témavezető: Prof. Dr. Korponay-Szabó Ilma, az MTA doktora

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Sipka Sándor, az MTA doktora

Prof. Dr. Arató András, az MTA doktora

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Szabó Gábor, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Sipka Sándor, az MTA doktora

Prof. Dr. Arató András, az MTA doktora

Prof. Dr. Sárdy Miklós, az MTA doktora

Dr. Kapitány Anikó, PhD

Az értekezés védésének időpontja: 2022. július 11. 11:00 óra

A nyilvánosságot online módon biztosítjuk. Amennyiben a vitán részt kíván venni, úgy jelezze a dios.adam@med.unideb.hu email címre küldött üzenetben 2022. július 10. 16:00 óráig.

A határidő lejáratát követően technikai okok miatt már nincs lehetőség a védéshez kapcsolódni.

1. Bevezetés

A coeliakia glutén fogyasztás által indukálódó T-sejt mediált kondicionális autoimmun kórkép, mely genetikailag predisponált 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, IgA nephropathia, rheumatoid arthritis) 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 poszttranszlációosan 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, 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.

2. Irodalmi áttekintés

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.

A betegség hátterében több genetikai komponenst azonosítottak, melyek közül a legfontosabb a humán leukocita antigén (HLA) DQ lókuszekhez köthető. A betegség ma ismert legfontosabb jellemzője, hogy a betegek a gliadin elleni antitestek mellett TG2-specifikus autoantitesteket termelnek. A coeliakiára még nincsen hatékony oki terápia, így a betegség kezelésének egyetlen lehetséges módja az élethosszig tartó gluténmentes diéta.

A coeliakia gastrointesztinális tüneteinek oka a vékonybél nyálkahártyájának gyulladása által kialakuló boholyatrófia és következményes malabszorpció. A coeliakia növeli más autoimmun kórképek kialakulásának kockázatát is, mint az I. típusú diabetes mellitus, autoimmun thyreoiditis, autoimmun májbetegségek, Sjögren szindróma, rheumatoid arthritis.

A hagyományos diagnosztika alapja a vékonybél biopsziából készített szövettani metszetek hisztopathológiai elemzése volt a Marsh által felállított beosztás (I-III) szerint, melynek fő szempontjai a vékonybél boholy/kripta magasság aránya és az intraepitheliális lymphocita szám. Coeliakiára jellemző a Marsh III súlyosságú lézió. A Marsh II eltérés pozitív coeliakia autoantitestek esetén diagnosztikus, míg a Marsh I eltérés nem specifikus, más kórállapotokban is gyakori, csak 10%-ban áll mögötte coeliakia.

A kezdeti coeliakia diagnosztikai protokoll kizárólag a glutén táplálás, illetve megvonás hatására bekövetkező szövettani változásokon alapult, majd a kórképre jellemző antitestek felismerésével a szerodiagnosztika is jelentős szerepet kapott.

Elsőként a gliadin elleni antitesteket fedezték fel, melyek nem voltak tökéletes diagnosztikai markerek, hiszen más kórképek esetén is kimutathatók voltak, és nem minden coeliakiás beteg esetében voltak detektálhatók. A rekombináns peptidok megjelenésével és a dezamidáció fontos szerepének felismerét követően azonban elterjedtek a dezamidált gliadin peptid (DGP) alapú ELISA tesztek, melyekkel jóval magasabb specificitás és szenzitivitás értéket értek el, mint a hagyományos gliadin keveréket alkalmazó tesztek, ezért a DGP alapú ELISA tesztek sok helyen még ma is használják a klinikai gyakorlatban. A transzglutamináz elleni antitestek felfedezése új korszakot nyitott a coeliakia diagnózisában, az ELISA alapú TG2 antitest tesztek még magasabb szintű specificitást és szenzitivitást biztosítanak, így ez a vizsgálat coeliakia diagnózis nélkülözhetetlen alappillére lett. A szerodiagnosztikai eljárások közé tartozik még az úgy nevezett EMA teszt (endomizium elleni antitest kimutatás), mely a beteg vérmintájának normál szövetmetszeteken autoantitestekre utaló jellegzetes immunhisztokémiai festődési

mintázatán alapszik. Bár ezen eljárás nem automatizálható és nagyfokú szakértelmet igényel, megbízhatósága miatt ma is használatos megerősítő vizsgálatként.

A TG2-specifikus antitestek, diagnosztikai értékükön túl, feltételezhetően a pathomechanizmusban is szerepet játszhatnak. A TG2 elleni antitestek lerakódhatnak az extracelluláris TG2 antigén felszínén, elsősorban a kis erek mentén. Ezzel összefüggésben májkárosodás, nephropathia, kardiovaszkuláris rendellenesség, myopathia, glutén ataxia, oszteoporózis alakulhat ki egyes betegekben.

A coeliakiában, eltérően a legtöbb gyulladásos betegségtől, az antitestek célzott módon, a gliadin peptidek, illetve a TG2 fehérje esetében is néhány kitüntetett epitóp ellen irányulnak. A TG2 esetében a két fő epitóp az enzim N-terminális részén összpontosul (epitóp 1 fő horgonyzó aminosavai: K30, R116, H134, illetve epitóp 2 fő horgonyzó aminosavai: R19, E153). Az irányított immunválaszra utal, hogy a gliadin elleni, illetve TG2-specifikus antitestek esetében is kitüntetett B-sejt receptor (BCR) nehéz és könnyűlánc variáns láncok dominálnak a különböző páciensekben, melyek csekély számú szomatikus hipermutációval rendelkeznek. Hasonló módon a gliadin specifikus T-sejt receptorok (TCR) is bizonyos kitüntetett α és β -lánc variábilis szegmens előfordulásával jellemezhetők.

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. A glutén és TG2 között létrejövő kovalens 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 autoantitest képződés, viszont a TG2-glutén kovalens komplex in vivo keletkezése és a normál körülmények között anergiás autoreaktív B-sejt klónok aktivációjához hozzájáruló faktorok nem teljeskörűen igazoltak.

A pathogenezis szempontjából az is nyitott kérdés, hogy eleve zavart-e a glutén elleni immuntolerancia megfelelő létrejötte, vagy pedig egy meglévő tolerancia szűnik meg a betegség kialakulásakor. Egészséges személyekből nem sikerült kimutatni glutén reaktív T-sejteket, melynek oka lehet egy aktív, szerzett immuntolerancia, illetve a HLA-DQ2 és DQ8 negatív személyekben a megfelelő antigén prezentációs képesség hiánya.

A gliadinok elleni adaptív immunválasz

Glutén prolaminok alatt a kalászos gabonafélék szemtermésében található, magas prolin és glutamin tartalmú, vízben rosszul oldódó fehérjéket értjük. Ezek a gabonanövények a búza (prolaminjai a gliadinok és a gluteninek), az árpa (prolamin fehérjéi a hordeinek) és a rozs (prolaminjai a szekalinok). A zab prolaminjai, az aveninek, kissé különálló csoportot képeznek és általában nem váltanak ki coeliakiás autoimmunitást. A coeliakiás betegek számára a búzában található gliadinok a domináns immunogének. A gliadinokon belül négy alcsoportot különíthető el: α , γ és ω gliadinok.

A gliadinokra, mint prolamin fehérjékre jellemző a prolinban és glutaminban gazdag repetitív szekvencia, mely nagymértékű rezisztenciát biztosít számukra a humán intesztinális proteáz aktivitással szemben, így akár 20-30 aminosav hosszúságú oligopeptidek is képesek fennmaradni, melyek kellően hosszúak ahhoz, hogy a fő hisztokompatibilitási komplex II. típusú molekuláinak (MHC II) peptidkötő zsebét elfoglalják, ezért potenciálisan immunogének. A részlegesen emésztett, potenciálisan immunogén gliadin peptidek specifikus receptorok nélkül, transzcelluláris transzport folyamatok, illetve az endocitózis által képesek átjutni az epitheliális barrieren. Manifeszt coeliakiás betegekben pedig az epitheliális tight junction kapcsolatok számának csökkenése okán jelentősen megnő a paracelluláris gliadin transzport mértéke is.

A coeliakia fő genetikai komponense a betegségre hajlamosító HLA-DQ lókuszokhoz köthető, melyek a T-sejtek irányába történő exogén antigén prezentációt végző MHC II molekulákat kódolják. Az MHC II molekulákat kódoló HLA lókuszok polimorfak, a populációban előforduló változatok közül a coeliakiás személyek körében a leggyakoribb a HLA-DQ2.5 genotípus, gyakori még a HLA-DQ8, illetve a beteg kb. 15% százaléka HLA-DQ2.2 és egyidejűleg HLA-DQ7.5 genotípussal rendelkezik, akik a HLA-DQ2.5 genotípussal funkcionálisan egyenértékű, úgynevezett transz-DQ2 heterodimert képesek létrehozni. A coeliakia kialakulásának nélkülözhetetlen feltétele ezen hajlamosító genetikai komponens megléte, de önmagában nem elégséges hozzá, hiszen a coeliakia incidenciája (~1%) jóval alacsonyabb, mint ezeknek a HLA-DQ alléleknek a becsült gyakorisága (~30%) a humán populációban. A coeliakia kialakulásához további genetikai faktorok és környezeti tényezők együttes hatása szükséges.

A betegségre hajlamosító HLA-DQ molekulák, eltérően a legtöbb HLA molekulától, melyek nem preferálják a prolin tartalmú szekvenciák megkötését (hiszen ezen aminosav nem tud hidrogén-híd kötést kialakítani), a HLA-DQ2 és DQ8 molekulák képesek befogadni a prolin tartalmú szekvenciákat a peptidkötő zsebbe. Az egyéb genotípussal rendelkező személyekben

ezen sajátságok hiányában valószínűtlen a gliadin peptidek hasonlóan produktív prezentációja és a coeliakiás adaptív immunválasz. Erre utal, hogy HLA-DQ2/DQ8 negatív személyek szérum és biopsziás mintáiból nem mutathatók ki gliadin specifikus T-sejtek.

A coeliakiára hajlamosító HLA-DQ allélek peptidkötési preferenciájához az is hozzátartozik, hogy bizonyos pozíciókban a negatív töltésű oldalláncokat részesítik előnyben, a prolamin peptidek viszont natív formában nagyon kevés negatív töltésű aminosavval rendelkeznek. Negatív töltésű oldalláncokat eredményezhet a TG2 enzim dezamidáz aktivitása. A TG2 szinte minden szövetben intra- és extracellulárisan is jelen lévő multifunkcionális (transzamidáz, dezamidáz, GTPáz) enzim, mely aktivációjához mM nagyságrendű Ca^{2+} koncentráció meglétét igényli és számos fiziológias folyamatban (sejtdhézió, extracelluláris mátrix felépítés, G-protein függő jelátvitel, apoptózis) részt vesz.

A dezamidáció eredményeként a glutén prolaminok bizonyos pozícióiban található pozitív töltésű glutamin oldalláncok negatív töltésű glutamát oldalláncokká alakulnak, mely hozzájárul a stabilabb MHC II – peptid komplexek létrejöttéhez és a T-sejtek irányába történő hatékonyabb antigén prezentációhoz. A dezamidáció következtében a TG2 katalitikus aktivitása szelekciós hatást fejt ki a prezentálódó glutén prolamin szekvenciákra, így a coeliakia is egy példája azon kórképeknek, ahol a fehérjék poszttranszlációs módosítása fontos szerepet játszik a pathogenezisben. Erre utal azon megfigyelés, hogy a TG2 enzim általi módosítás során preferált szekvencia motívumok (QXP, QXPF/Y, illetve QXXF/Y) az eddig leírt coeliakiás T-sejt epitópok szinte mindegyikében fellelhetők.

A glutén prolaminok MHC II függő prezentációja kapcsán eddig 38 coeliakiára jellemző glutén T-sejt epitópot írtak le, ezekből 25 gliadin peptidekből származik és a legtöbb epitóp, 27, HLA-DQ2.5 függő. Ez a megfigyelés jól szemlélteti, hogy miért a gliadinok a fő immunogének és miért a HLA-DQ2.5 molekulák jelentik a legnagyobb rizikót a betegség kifejlődésére. A T-sejt klón aktivációs kísérletek során az α és γ -gliadinok hasonlóan potens immunogénként viselkednek. Az immundomináns gliadin specifikus T-sejt aktiváló szekvenciának az úgynevezett 33-mer α -gliadin fragmenst tartják, melynek része a p57-68 peptid (DQ2.5glia- α 1 T-sejt epitópnak felel meg).

A produktív antigén prezentáció eredményeként a kitüntetett gliadin peptidek ellen Th1 immunválasz zajlik. Az antigén prezentáció megvalósítói a gliadin specifikus B-sejtek is lehetnek, aktivációjuk eredményeként plazmasejtté differenciálódnak és IgA, illetve IgG izotípusú gliadin elleni antitesteket kezdenek termelni. A coeliakia további különlegessége a gliadin peptidek azon tulajdonságából adódik, hogy nem rendelkeznek rendezett harmadlagos szerkezettel, így T-sejt epitópjaik mellett B-sejt epitópjaik is lineáris szekvencia motívumok,

sőt ezen szekvencia motívumok sokszor egymással átfedésben találhatók és nagyfokú egyezést mutatnak.

Több független peptid könyvtár szűrésen és pull-down kísérleten alapuló tanulmány is bizonyította, hogy az antitestek számára az immundomináns szekvencia a γ -gliadinokra jellemző QPQQPFP motívum, mely a dezamidáció eredményeként QPEQPFP formában jelenik meg a gliadin peptidekben (a kettő együttes jelölése QP(Q/E)QPFP módon történik.) Az α -gliadinok kapcsán pedig leírták a QXQPFP epitópot, mely a p31-43 és a p57-68 peptidekben is megtalálható. A gliadin peptidek T-sejtek irányába történő prezentációjához kulcsfontosságú a dezamidáció. Ehhez hasonlóan a gliadin elleni antitestek kötődését is kedvezően befolyásolja a negatív oldalláncok jelenléte, ugyanakkor a coeliakiás betegekből klónozott B-sejtek többsége natív és a dezamidált gliadin peptidet is hatékonyan képes megkötni, és csak kisebb részükre jellemző, hogy kizárólagosan a dezamidált peptid szekvenciákat képes felismerni.

Az adaptív immunválasz indukálása mellett a p31-43 α -gliadin fragmens (LGQQPFPFPQQPY) kapcsán a veleszületett immunitást aktiváló, úgy nevezett 'toxikus' hatást is leírtak. Caco2 sejtvonalon, illetve coeliakiás páciensektől származó primer biopszia kultúrán végzett kísérletekben a p31-43 peptid megnövekedett sejt proliferációt, az aktin hálózat átrendeződését, reaktív oxigén gyök képződést, TG2 aktivációt és NF κ B aktivációt idéz elő. Ezen 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. 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 gyulladásozó INF α termelődést vált ki. A vezikuláris körforgás megváltozásával gyakoribbá válik az IL-15/IL-15R α (interleukin-15 receptor α) transzprezentációja és megnő az IL-15 expresszió is, mely az intraepitheliális limfociták aktivációjához vezethet és a gluténnal szembeni orális tolerancia megszűnésének egyik oka lehet.

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. A glutén fogyasztás hatására bekövetkező TG2-specifikus autoimmun választ és a jellegzetes boholyatrófiával járó szövettani károsodást nem sikerült humanizált egér modellekben sem megfelelő analógiával

létrehozni, így a kórfolyamat tanulmányozására a legmegfelelőbb módszert jelenleg is a prospektív klinikai vizsgálatok során gyűjtött minták tanulmányozása jelenti.

3. Célkitűzés

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 használunk fel, antigénként pedig a coeliakiában leírt immundomináns epitópokat hordozó szintetikus peptid szekvenciákat és rekombináns fehérjéket használunk.

Ebben a munkában közvetlen módon vizsgáljuk a coeliakiában kulcsszerepet játszó p31-43, illetve p57-68 α -gliadin fragmensek TG2 általi dezamidációját a human genomban ténylegesen előforduló vad típusú (Val²²⁴-t hordozó) enzimmel, majd ezek natív, illetve dezamidált formájának antigenitását a γ -gliadin peptidokkal összevetve. A hasonló szekvencia motívumok között esetlegesen fennálló immunológiai keresztreakciót egyedi peptid szekvenciák által affinitás tisztított antitest populációk segítségével térképezzük fel.

Coeliakia rizikóval rendelkező gyermekek esetén az első glutén beviteltől kezdődően nyomon követjük a gliadin elleni antitestek megjelenését, az antitestek natív, illetve dezamidált szekvenciák iránti preferenciájának, továbbá az antitestek immundomináns epitóp iránti affinitásának változását. Megvizsgáljuk a gliadin elleni antitestek coeliakia kialakulására vonatkozó predikciós erejét, illetve a diagnóziskor megjelenő TG2 elleni antitestek epitóp specificitását.

4. Betegek és módszerek

Betegminták

A vizsgálatainkban használt szérumban minták egyrészt 69 kezeletlen magyar coeliakiás betegből 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. Továbbá felhasználtunk 122 olyan csecsemőtől származó 720 szérumban mintát, akik a PreventCD (<http://www.preventceliacdisease.com>) prospektív klinikai tanulmányban vettek részt, és érintett családtagjaik révén magas genetikai rizikóval rendelkeznek a coeliakia kialakulására. A szérumban minták 4, 6, 9, 12, 24 illetve 36 hónapos

korban kerültek begyűjtésre (illetőleg a coeliakia diagnózisakor, amennyiben az ezektől eltérő időpont volt). A vizsgálatban 2007 és 2010 között született csecsemők vettek részt, akik elsőként HLA-DQ genotipizáláson estek át, majd a HLA-DQ2.5, DQ2.2 vagy DQ8 rizikó alléleket hordozók randomizált módon kerültek az intervenciós (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, fokozatos emelkedő adagban kaptak glutént 7-10 hónapos korban, ezt követően 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 és a résztvevő partnerek orvosi etikai bizottságainak engedélyével történt. Az eredeti PreventCD tanulmányból kizárásra kerültek a HLA-DQ rizikó allélekre negatív csecsemők, viszont a PreventCD tanulmányba történő beválogatás lezárultát követően, szülői kérésére 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.

Peptidek és reagensek

Az N-terminális biotinilációval rendelkező szintetikus gliadin peptideket >95% tisztaságban a GenScript (Leiden, Hollandia) gyártó szolgáltatta a következő szekvenciákkal: γ Glia_Q (SGGPLQPQPFP), γ Glia_E (SGGPLQPEQPFP), γ Glia_sh (SGGPEQPFP), p31-43 (LGQQQPFPQQPY), p31-43_E34 (LGQEQPFPQQPY), p31-43_E40 (LGQQQPFPPEQPY), p57-68 (QLQPFPQPQLPY), p57-68_E65 (QLQPFPQPELPY) illetve irreleváns peptid szekvencia (VVKVGGSSSLGW), mely negatív kontrollként szolgált. A SGG kapcsoló szekvenciát alkalmaztuk a biotin és a gliadin szekvencia között a peptidek azonos hosszának biztosítására. A PreventCD rizikó csecsemők szérum mintáinak affinitás tisztításához felhasznált gliadin peptid reagens az Inova Diagnostics (San Diego, CA, USA)

ajándéka volt, a MeDALL chip-en használt, a Gliadin DP ELISA klinikai kittel azonos dezamidált gliadin peptideket és azok nem dezamidált változatait a Thermo Fisher Scientific (Freiburg, Németország) gyártótól kaptuk.

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 ditiotritol tartalmú MOPS pufferben (50mM, pH 6,8) végeztük, melyhez 50 pmol rekombináns humán TG2 (Val²²⁴ variáns) 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 Orbitrap Fusion tribrid tömeg spektrométerrel (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Az eredmények vizualizációjához a Scaffold szoftvert (Proteome Software Inc. Portland, OR, USA) alkalmaztuk.

Gliadin-specifikus antitestek affinitás tisztítása

A szérum minták antitest tartalmának pontos mennyiségi meghatározásához, illetve az antitestek keresztreaktivitásának teszteléséhez az egyedi α és γ -gliadin peptid szekvenciákkal külön-külön affinitás tisztítást végeztünk a coeliakiás betegek (n=2) egyedileg feldolgozott szérum mintáiból. A biotinizált szintetikus peptideket PierceTM High Capacity Neutravidin Agarose gyantára (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) kötöttük a gyártói utasításokat követve. A coeliakiás betegek szérum mintáit 0,1% Tween 20 tartalmú foszfát pufferelt sóoldatban (TPBS pH 7,4) inkubáltuk az egyes peptideket hordozó agarózzal. A kötődött antitestek elúciójához 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) történő gliadin elleni antitestek tisztításához

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 antitest tisztítását a fentivel azonos módon végeztük.

Gliadin elleni antitestek mennyiségi meghatározása szérumból mintákból 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 sztreptavidinnel (SA) fedett bioszenzorokat (FortéBio, Fremont, CA, USA) alkalmaztunk. Az antitestek kötődését az eszköz valós időben regisztrálja, a molekuláris interakciók által kiváltott változó optikai denzitás függvényében. A biotinizált peptideket SA bioszenzorokra kötöttük, a mérést TPBS oldatban végeztük. 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 meghatároztuk a szérumból minták specifikus antitest tartalmát.

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 kötődési hányadosokat logaritmusos 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).

Gliadin elleni antitestek affinitásának meghatározása biofelszín interferometriás módszerrel

A gliadin elleni antitestek egyedi epitópokra vonatkozó ekvilibrium disszociációs állandójának (K_D) meghatározásához TPBS pufferben oldott biotinizált gliadin peptideket kötöttünk a sztreptavidin bioszenzorok (FortéBio, Fremont, CA, USA) felszínére, majd az affinitás tisztított gliadin elleni antitesteket 240, 120, 60, illetve 30nM koncentrációban adtuk hozzá. A kinetikai mérések kétszeri ismétléssel 5 perc asszociáció és 5 perc disszociáció lépésekből álltak. A K_D értékeket a BLItz Pro 1.2.1.5 szoftver kalkulálta, az illesztéshez 1:1 kinetikai modellt használva.

Gliadin peptidek hatásának vizsgálata Caco2-sejtkultúrán

A gliadin peptidek ismert 'toxikus' hatásának vizsgálatára egy már korábban publikált módszert alkalmaztunk. A Caco-2 sejteket (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) minimum esszenciális médiumban növesztettük a konfluencia eléréséig. A kísérletet megelőző éjszakára a tápfolyadék FBS tartalmát 1%-ra csökkentettük és a sejteket 100 µg/mL szintetikus peptiddel inkubáltuk 24 órán át 5% CO₂ és 37°C mellett. 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. 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. Szöllösi János laboratóriumában.

Szérum antitestek mérése MeDALL fehérje chip felhasználásával

MeDALL fehérje mikrochip 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 mikrochipen teszteltük még a munkacsoportunk által korábban termelt vad típusú humán transzglutamináz 2 enzimet (TG2), mely 224-es pozícióban a természetes humán TG2 enzimhez hasonlóan valint hordoz (Val²²⁴) illetve ezen enzim dupla mutáns változatát (TG2 RE), melyben a coeliakiás TG2 epitóp 2 ellenes antitestek kötődéséhez szükséges horgonyzó aminosavakat pontmutációval módosítottuk (R19S, E153S). A MeDALL chipet a Phadia GmbH bécsi laboratóriumában készítették el. A szérum minták MeDALL chipen való mérését a Bécsi Orvostudományi Egyetem Kórélettani és Allergia Kutató Intézetében Dr. Bharani Srinivasan végezte kollaborációs együttműködés keretében. Az antigének 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. A szérum mintákat TTBS oldatban 1:5 hígítva 60-180 percig inkubálták a lemezekkel 37°C-on 150rpm kevertetés mellett. 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) segítségével mutatták ki. A fluoreszcens jel detektálását Affymetrix 418 scanner-rel (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) végezték, és a kapott adatokat a GenePix Software Version 3.0 (Axon Instruments, Union City, CA, USA) segítségével értékeltük ki. A három párhuzamossal mért jelek átlagát akkor tekintettük pozitívnak, ha az a humán szérum albumin jelének ötszörösét meghaladta.

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.

5. Eredmények

Az α -gliadin peptidek TG2 általi dezamidációs mintázata

Megvizsgáltuk a p31-43 és a p57-68 szintetikus α -gliadin peptid rekombináns humán TG2 Val²²⁴ enzim általi dezamidációját, folyadék kromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriával (LC-MS/MS) azonosítva a dezamidációs eseményeket. 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 glicin helyett. Arra kerestük a választ, hogy a TG2 Val²²⁴ enzimmal 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 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, míg a Q65, Q34, illetve Q40 dezamidációs események

olyan szekvencia motívumokat érintenek, melyek coeliakiában releváns B-sejt epitópokat eredményezhetnek.

A gliadin elleni szérumban antitestek vizsgálatához a TG2 általi dezamidációs eredményeink és a B-sejt epitópokról leírt irodalmi adatok alapján a további vizsgálatokhoz a fentiekben leírt szekvenciájú nyolc szintetikus gliadin peptidet választottuk ki (a szekvenciákat a betegek és módszerek részben tüntettük fel), melyekben a vizsgálni kívánt α , illetve γ -gliadin epitópok natív, dezamidált, illetve rövidített változatai találhatók meg.

Az α és γ -gliadin szekvenciák antigenitásának összehasonlítása coeliakiás szérumban mintákban

A szérumban antitestek különböző natív és dezamidált α és γ -gliadin peptidekhez való kötődését a ProCeDE elnevezésű prospektív klinikai vizsgálatban részt vett anti-TG2 pozitív, kezeletlen coeliakiás betegek (n=69) szérumban mintáinak felhasználásával vizsgáltuk meg. Ezek a betegek már többféle klinikai szerológiai teszt eredménnyel rendelkeznek (anti-DGP, anti-TG2 antitest és EMA teszt). 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 azok összehasonlítása nehézkes volt. Ezért vizsgálatunkhoz biofelszín interferometriás eszközt alkalmaztunk, mely egy valós idejű, jelölés nélküli, optikai úton direkt molekuláris interakciót vizsgáló módszer, mely abszolút koncentráció ($\mu\text{g/mL}$) értékeket szolgáltat és a méréshez nem szükséges másodlagos antitest alkalmazása. A mennyiségi meghatározásához 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. Méréseinkben a klinikai eredményekkel összehangban, a coeliakiás betegek gliadin peptidre reagáló antitestjei preferenciális módon a γ -gliadin szekvenciákat ismerik fel. A p31-43 α -gliadin peptidek esetén is detektálható volt mérsékelt antitest kötődés, a p57-68 α -gliadin peptid esetében viszont rendkívül alacsony antitest reakciók mérhetők.

A natív és dezamidált gliadin peptid szekvenciák összehasonlításakor azt tapasztaltuk, hogy a szérumban antitestek kissé magasabb kötődési értéket mutatnak a dezamidált α , illetve γ -gliadin peptidekhez, de a különbség statisztikailag nem szignifikáns.

A γ Glia_E peptiddel (PLQPEQPF) mért szérumban antitest szintek jó korrelációt mutattak 6 különböző klinikai gyakorlatban használt gyári anti-DGP IgG antitest teszt eredményeivel. A korreláció vizsgálatánál figyelembe vettük, hogy az adott gyári teszt logaritmusos vagy

koncentráció-arányos számítást alkalmaz. 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 szérumban az γ -gliadin-specifikus antitestek vannak többségben.

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.

A teljes dezamidált QPEQFPF heptapeptid epitópot hordozó γ Glia_E peptidhez képest a rövidebb homológ szekvenciákkal rendelkező peptidek jelentősen csökkent antitest kötő képességgel rendelkeznek. A dezamidáció képes kissé mérsékelni az antitest kötőképesség csökkenését, és az is egyértelműen látszik, hogy a PQQ motívum hiányában drasztikusan esik a peptidek antigenitása.

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

A gliadin elleni humorális immunválasz megjelenését és korai életkorban tapasztalható sajátosságait 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 (a coeliakia diagnózisakor 3-5,5 éves korban) gyűjtött szérumban mintáját vizsgáltuk meg biofelszín interferometriás módszerrel, hogy összehasonlítsuk α és γ -gliadin peptidekre adott szérumban antitest reakcióikat.

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

9 hónapos korban a gyermekek már glutén tartalmú étrendet követték és gliadin elleni antitest termelés is detektálható volt. A termelődő gliadin elleni antitestek kizárólagos módon a γ -gliadin peptid szekvenciákat ismerték fel, mely arra utal, hogy elsőként a γ -gliadin szekvenciákra reagáló B-sejt klónok aktiválódnak. A coeliakia diagnózis idejéről származó

minták esetében, amikor a TG2-specifikus antitest pozitívitas és a boholyatrófia is kimutatható volt, már a p31-43 és p57-68 α -gliadin peptideket felismerő antitestek is megjelentek, de a humorális immunválaszt egyértelműen, továbbra is a γ -gliadin peptid szekvenciákkal reagáló antitestek dominálták.

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

A γ Glia peptidek alkalmazásával izolált antitest populációk azonos antigén kötődési tulajdonsággal rendelkeznek, mindkét poliklonális antitest reagens a γ Glia_Q (PLQPQQPFP) és γ Glia_E (PLQPEQPFP) 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. A γ -gliadin peptidek közül a γ Glia_sh peptid kevésbé jó antigénnek bizonyult, ennek oka minden bizonnyal a peptidlánc csökkent hossza lehet, mely megnehezíti az antitestek kötődését. 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, illetve p57-68 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. A p57-68_E65, illetve a p31-43_E34 peptidek által tisztított antitestek esetében dezamidált motívum iránti preferenciát figyeltünk meg, ezen antitestek a γ -gliadin peptidek esetében is a dezamidált szekvenciát részesítették előnyben a natívval szemben.

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 kifejezni a p31-43 peptiddel kapcsolatban jól ismert sejtszintű (ún. 'toxikus') hatást Caco2 sejt kultúrában. A Caco2 sejt kultúrában a p31-43 peptid jellegzetes módon a tight junction

kapcsolatok 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 interdentációval jellemezhető mintázatát, a sejtkontúrok kiegyenesednek. Ezt az ismert biológiai hatást ki tudtunk mutatni a 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. Az eredmények alapján a p31-43 peptid 'toxikus' hatása egyedi, a homológ γ -gliadin szekvenciákkal nem reprodukálható.

A PreventCD tanulmány mintáinak vizsgálata – klinikai kimenetel

A korábbi kísérleteinkben a coeliakiás betegek α és γ -gliadin peptidekre irányuló szérumszint antitest reakcióit 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 antitest válaszát vizsgáltuk a prospektíven vett szérumszint 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 intervenció csoport), míg másik részük ezalatt placebo készítményt (B csoport vagy kontrol csoport). 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, illetve a coeliakia diagnózisának kimondásakor, ami ettől eltérő időpont is lehet. A PreventCD eredményei alapján az elsődleges kimeneti végpont nem teljesült, a coeliakia kialakulásának arányában nem volt szignifikáns különbség az intervenció és a placebo csoport között, 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 szérumszint

antitestek változását követtük nyomon MeDALL fehérje mikrochip módszer segítségével és hasonlítottuk össze a coeliakiássá váló, illetve nem váló rizikó csecsemők válaszát az egyes csoportokban.

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 szérumokban IgG és IgA antitest reakció egyaránt kimutatható volt, mind az NGP, mind pedig a DGP iránt, 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. A B csoportban lévő csecsemők 6 hónapos korukig csak placebo kaptak, így szérum mintáik 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.

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 azonos módon válaszoltak a korai glutén bevitelre, sőt a coeliakiával érintett családban született, de HLA-DQ rizikó alléllal nem rendelkező csecsemők is hasonló módon, IgA és IgG ellenanyag termeléssel reagáltak. Ezen alcsoportok mindegyikében, a coeliakiásokat is beleértve, szintén megfigyelhető, hogy a korai immunválasz 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.

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, illetve IgA antitest termeléssel reagáltak az adott mennyiségű glutén bevitelre, mint a coeliakia kifejlődésre kisebb kockázatot jelentő HLA-DQ2.2/HLA-DQ2.5 vagy csak HLA-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.

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 ellen 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 szérum antitestek csökkenő tendenciája figyelhető meg. A coeliakiássá nem váló rizikó gyermekek esetében viszont csak egy, a gluténre adott korai immunválasz detektálható. A korai antitest válasz - 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 azoknál a gyermekeknél, akik nem lesznek coeliakiások, míg a coeliakiássá váló gyermekeknél a diagnózis időpontjában tapasztalható az addig alulreprezentált DGP elleni antitestek nagymértékű megemelkedése. Ezen tendencia mind az IgG, mind az IgA antitestek esetén fellelhető, de az IgA válasz kevésbé egységes (nem mindenkinél jelentkezik).

Hasonlóképpen a B csoportba tartozó coeliakiássá váló és nem váló 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.

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

A coeliakia manifesztációval járó affinitás érés a PEQPFP 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 szérum mintákból, 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 estén: nem dezamidált γ Glia_Q (PLQPQQPFP), dezamidált γ Glia_E (PLQPEQPFP) és rövid dezamidált γ Glia_sh (PEQPFP) peptid, ahol egyetlen epitóphoz történő, monovalens kötődésre lehet számítani.

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 epitópra irányul. Ugyanakkor, a 6 hónapos korban termelődő antitestek egységesen csak 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 PEQPFP 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 értékeket adott személyre egyenként kiszámítva 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 szignifikánsan 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.

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. Ugyanakkor, ha csak azon 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.

Ezen eredmények alapján egyértelmű, hogy sem a primer glutén bevitelre adott korai antitest válasz, sem a későbbi életkorban detektálható gliadin elleni antitestek önmagukban nem adnak lehetőséget 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 pozitívítás kimutatása.

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 pozitívítás 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. 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 szérum koncentrációjuk, Pearson teszt alapján, nem mutatott korrelációt a TG2 elleni antitestek mennyiségével (TG2 IgA kontra NGP IgA $r=0,21$ illetve TG2 IgA kontra DGP IgA $r=0,16$).

A diagnózis idején megjelenő TG2 elleni antitestek epitóp specificitását 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. A dupla mutáns TG2 RE fehérje esetén az antitestek kötődése a vad típusú TG2 fehérjéhez képest egyhatod részére 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.

6. Megbeszélés

Vizsgálatainkban jelölés nélküli kvantitatív analízis és kötődés vizsgálatok során egyedi peptidekkel 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 DQ2.5 függő T-sejt stimuláló gliadin szekvencia, melynek TG2 általi dezamidáció nagymértékben növeli a peptid immunogenitását, míg a p31-43 peptid egy olyan α -gliadin fragmens, mely képes aktiválni a természetes immunitást, ezáltal celluláris stressz választ idéz elő. 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. Vizsgálatainkban közvetlen módon elemeztük a p31-43 és a 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 QEPPF 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.

A coeliakiás betegek szérum antitestjeinek p31-43, p57-68, illetve γ -gliadin peptidek natív és dezamidált formáihoz 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 coeliakiás betegek szérum antitestjei kissé magasabb kötődést mutatnak a dezamidált peptidek esetében, mint a natív peptideknél, de a különbség statisztikailag nem 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 szérumból 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 csecsemőkori 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 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.

A szérumban 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 QPEQPFP motívumot hordozó szintetikus dezamidált γ Glia_E peptidet egyedül alkalmazva meghatározott antitest szérumban koncentrációk jó korrelációt mutatnak a klinikai gyakorlatban használatos gyártói DGP IgG esszék eredményeivel. A különféle klinikai tesztek többféle peptid antigént alkalmaznak, melyek szabadalmi oltalom alatt állnak. A tesztek mért értékei tapasztalati úton választott kalibrátorokra vonatkoztatott relatív egységekben vannak kifejezve. Az általunk használt újszerű mérési módszer, a biofelszín interferometria megfelelő eszköz lenne egy egységes kalibráció kialakítására, hiszen a specifikus antitest kötődést $\mu\text{g/mL}$ egységben képes megadni. Az abszolút koncentráció mérésén 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

kívüli eső magas pozitív szerológiai eredmények használhatatlanok, amikor a terápia, azaz a gluténmentes diéta hatását szeretnénk követni a szérum antitestek mérésével.

A jelölés nélküli biofelszín interferometria (BLI) 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, ezeket az előnyöket egyesítheti a BLI mérés.

A klinikumban közismert, hogy gliadin elleni antitestek már a coeliakia manifesztációját megelőzően is kimutathatók, ugyanakkor rendkívül keveset tudunk a 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 ki 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 viszont 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 primer glutén bevitelre adott korai 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)QFP immundomináns gliadin epitópra 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 PreventCD kohorsz más nemzetiségű tagjaiban a közelmúltban kimutatták, hogy coeliakia rizikóval rendelkező, TG2 szeronegatív és normál szövettant mutató gyermekekben is előfordulnak gliadin reaktív T-sejtek a vékonybélben, 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. Az általunk követett nem érintett csecsemőknél nem volt indikációja ilyen invazív vizsgálatoknak.

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 a rizikó allélekkel rendelkező társaiknál észletekkel.

Ezek a megfigyelések felveti 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 egyénekben a gliadin ellen aktív immuntolerancia mechanizmus működik.

Mindezek tükrében érdekes megfigyelés az, hogy éppen a magas coeliakia rizikóval járó genotípusok (főként a HLA-DQ2.5 homozigotáság) társultak feltűnően gyenge humorális immunválasszal. Ebből arra a következtetésre juthatunk, hogy a magas coeliakia rizikóval leírható HLA-DQ allélek talán elégtelen módon prezentálja 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, melyek szerint a HLA-DQ2.5 molekulák beszűkült antigén prezentációs képességgel jellemezhetők és a glutén prolaminek változatos palettájáról csak igen kisszámú peptidet képesek megkötni. Továbbá a HLA-DQ2.5 molekula

sajátsága, hogy egy rá jellemző egyedi nukleotid polimorfizmus következtében csak gyenge interakcióra képes a HLA-DM chaperon molekulával, 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 sejtfelszínen a gliadin peptidok produktív prezentációja helyett. A kísérletesen megfigyelt csökkent antigén prezentációs képességet igazolja, hogy a HLA-DQ2.5 személyek gyenge immunizálhatóságát írták le a hepatitis B vírus vakcináció során is.

A tolerogén immunválasz létezését a HLA-DQ2.5 genotípusú coeliakiás személyekben kimutatott egyes típusú regulatorikus T-sejtek jelenléte igazolja. 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. Ezzel szemben egészséges HLA-DQ2.5 genotípusú személyekben nem mutathatók ki sem gliadin specifikus effektor, sem gliadin specifikus regulatorikus T-sejtek. 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 általunk vizsgált genotípus csoportokban jelentősen eltérő elemszámok szerepeltek, ez 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 kialakulásával szemben. 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 is, 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. Mindez a TG2 enzim általi dezamidáció kórfolyamatban betöltött aktív szerepére utal.

Biofelszín interferometriás kísérleteinkben a coeliakia rizikójú 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, hogy a coeliakiás páciensek esetében szterotipikus gliadin elleni antitest választ mutattak ki, 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 javuló kötődést mutatnak a rövidebb PEQFPF motívum 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 $KD \gamma$ Glia_E / $KD \gamma$ 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.

A gliadin elleni antitestek önmagukban, életkortól és dezamidációtól 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 jelenléte 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 arányban 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 különböző szövetekben az extracelluláris TG2 antigén felszínén. 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, 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. Ugyanakkor a coeliakia manifesztációja akár évtizedekig is elhúzódhat, mely arra utal, hogy más faktoroknak (intesztinális fertőzés, változások a mikrobiomban) is szerepe lehet a pathológiás 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. 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, 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. 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. A PreventCD programban részt vevő magyar coeliakiás páciensek közül azonban 11-en részt vettek egy másik tanulmányban is, ahol vékonybélbiopsziás mintájukból gliadin specifikus T-sejt vonalakat klónoztak és különböző gliadin peptid szekvenciák felhasználásával tesztelték a T-sejt vonalak antigén specificitását.

Így arra lehetőségünk nyílik, hogy ezen manifeszt coeliakiás betegek esetében a gliadin specifikus T-sejtek és B-sejtek célpontjait összehasonlítsuk. A 11 páciensből technikailag sikeresen 10 eset biopsziás 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 QP(Q/E)QFPF szekvencia iránti antitest szintű reakció. A klinikai tanulmányok 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.

7. Összefoglalás

Vizsgálataink során izolált reakciókban igazoltuk a p31-43 és a p57-68 α -gliadin peptidek TG2 általi dezamidációját, melyek a coeliakiás B-sejt epitópotokat 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 PLQPEQFPF 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. 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 immunreakciójuk során a nem-dezamidált gliadin peptid elleni antitestek detektálhatók szignifikánsan nagyobb mennyiségben (a nem-dezamidált és dezamidált peptid felismerésben tapasztalt jelentős átfedés ellenére). Ez a tendencia a prospektív követés időtartama alatt fennmarad mindazon gyermekek esetén, akik nem lesznek coeliakiások. A coeliakiássá váló gyermekeknél viszont 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 mérsékelt 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 szérumban antitestek önmagukban nem kellően specifikus diagnosztikus markerek. Ezt jól mutatja azon adat, hogy a gliadin elleni szérumban antitest szintek alapján nem különíthetők el a coeliakiás és a nem coeliakiás egyének. Kizárólag a TG2-specifikus antitest pozitívitás 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.

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 tudománytermetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2022.03.08.

