

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**A TRANSZGLUTAMINÁZ 2 SZERKEZETI ÉS
ENZIMOLÓGIAI TULAJDONSÁGAINAK SZEREPE A
COELIAKIÁBAN ÉS A JELÁTVITELI FOLYAMATOKBAN**

Király Róbert

Témavezető: Prof. Dr. Fésüs László



**DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
BIOKÉMIAI ÉS MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI INTÉZET
DEBRECEN, 2008**

BEVEZETÉS

A coeliakia (glutén szenzitív enteropátia) egy glutén által indukált krónikus vékonybél rendellenesség, jelentős autoimmun folyamatokkal, a genetikailag fogékony egyéneknél. Egyedülálló autoimmun betegség, mivel mind a környezeti kiváltó ok (glutén) és mind a fő autoantigén (transzglutamináz 2, TG2) ismert; és a glutén elhagyása az étrendből a betegség teljes tünetmentességéhez vezet. Gyakorisága eléri az 1%-ot, HLA-DQ2 és DQ8 heterodimerekhez kötődik. A coeliakia patogenezise igen összetett, klinikai manifesztációi igen változatosak: némely esetekben általános felszívódási rendellenesség alakul ki, amely súlyos fogyáshoz vezet már a korai gyermekkorban, míg más esetek tünetmentesek akár a felnőtt korukig. A klinikailag „csendes” coeliakia megjelenhet mint dermatitis herpetiformis vagy más változatos extraintesztinális betegség. Jelenleg a betegség egyetlen ismert és elfogadott kezelése az élethosszig tartó glutén-mentes diéta, ami a súlyos szövődmények kockázatát is normalizálja.

A coeliakiában a humán TG2-t azonosították fő autoantigénként. A szervezet minden részén előforduló TG2 egy egyedülállóan sokarcú fehérje. Katalizálja a Ca^{2+} -függő ϵ -(γ -glutamil)lizin izopeptid kötés kialakulását a fehérjék között NH_3 felszabadulása mellett (transzglutamináz aktivitás, fehérje keresztkötés) és a GTP hidrolízisét (GTPáz aktivitás, jelátviteli folyamatok). Rendelkezik még néhány másfajta enzimaktivitással és enzimaktivitás-független funkcióval is. *In vivo* a Ca^{2+} - és nukleotid-kötés reciprok módon szabályozza a TG2 legfontosabb két enzimfunkcióját. A TG2 sokféle sejtalkotóban jelen van a sejtmagtól a sejtmembrán belső és külső oldaláig. Szerepet játszik a sejt-differenciációban, a programozott sejthalálban, a fagocitózisban, jelátvitelben, sejt-letapadásban, az extracelluláris mátrix összeszerelésében, sebgyógyulásban és érintett különböző betegségek patofiziológiájában (coeliakia, tumor növekedés, idegrendszeri kórképek).

Antitestek a coeliakiában

A coeliakiában specifikus jelenség az anti-TG2 IgA osztályú endomizium antitestek (EmA) jelenléte a betegek szérumában. Habár a szérum EmA közel 100% specifitást mutat a coeliakiára, a kezeletlen betegek 10-20 %-a nem rendelkezik ilyen keringő antitestekkel. Több tanulmány azt találta, hogy az EmA hiánya csak mérsékelt szöveti lézióval jár együtt. Ez ellentmond annak az elméletnek, hogy az EmA korábban képződik, mint ahogy a boholyatrófia kialakul. Az EmA helyileg a vékonybél nyálkahártyában termelődik és ezek

az IgA, illetve IgG antitestek lerakódnak mind a vékonybélben, mind a vékonybélen kívül a különböző szövetekben. Ennek alapján feltételezhető, hogy az anti-TG2 antitestek az EmA negatív betegekben is jelen lehetnek. Ha ez igaz, akkor a TG2 ellenes autoantitestek jelenléte valószínűleg a coeliakia leguniverzálisabb és egyben legspecifikusbb jelensége lehet.

A coeliakiás autoantitestek biológiai hatása

A TG2 összetett biokémiai és élettani funkciói miatt az anti-TG2 autoantitesteknek az enzim aktivitására gyakorolt hatása fontos lehet a coeliakia patogenezisében. A TG2 ellenes antitestek számos biológiai aktivitást mutatnak. Egér könnymirigy csatornában limfocita beszűrődést indítanak el és gátolják a humán T84 hámszövet kripta sejtek differenciálódását, befolyásolva a TG2-függő TGF- β aktiválódást. A coeliakiás antitestek *ex vivo* elősegítik a sejtosztódást a coeliakiás betegek hámsejtjeinél a sejtciklus S-fázisába történő belépés felgyorsításával és növelik az epitélium átérésztőképességét. Ezek a folyamatok végül kripta hiperpláziához vezetnek. Az antitestek befolyásolják a mezenhimális sejtek funkcióját, gátolva a sejt mozgásképességét és felgyorsítva a mátrix lebontását a mátrix metalloproteázok kifejeződésének növelésével.

Az autoantitestek a Toll-szerű receptor 4-hez kötődve aktiválják a monocytákat és így monocita-szabályozott citotoxikusságot, szöveti károsodást eredményeznek, amit a gliadin is felgyorsít. A kezeletlen, aktív coeliakiára jellemző a vékonybél nyálkahártya ereinek szabálytalan elrendeződése. Az autoantitestek célpontja specifikusan a TG2, és *in vitro* is gátolják az angiogenezis számos lépését. A coeliakiás betegek 7 %-a idegrendszeri manifesztációt is mutat (neuropátia, epilepszia, agy atrófia, glutén ataxia). A glutén ataxiás betegek agyi ereiben szintén található lerakódott coeliakiás antitestek. A vér-agy gát átérésztőképessége szintén nagyobb az anti-TG2 antitestek hatására. Ráadásul a coeliakiás szérumok idegsejt apoptózist is indukálnak. Ezek az eredmények megerősítik azt az elképzelést, hogy a glutén-indukált coeliakia specifikus autoantitestek fontos szerepet játszanak a coeliakia intesztinális és extraintesztinális manifesztációi kialakulásában.

A TG2 deamidálva a gliadin fragmentek glutamin oldalláncát erősíti annak antigenitását, ami így sokkal jelentősebb T-sejt választ vált ki. Emiatt az antitestek a TG2 aktivitását és így a deamidálási folyamatokat is befolyásolva, képesek súlyosítani a glutén által kiváltott immunológiai hatásokat. Korábbi tanulmányokban a betegek totál IgA és IgG antitest szérum frakciója csökkentette a sejt-kivonatokban lévő transzglutamináz aktivitást. Más kutatók nem találtak eltérő hatást a kontrollokhöz képest, de az affinitás

tisztított coeliakiás autoantitestek rendelkeztek gátló hatással, ami azonban nem volt olyan mértékű, hogy gátolja a keresztkötések kialakulását. Viszont a coeliakiás vékonybél nyálkahártya szubepitéliális részén, ahol a legtöbb lerakódott coeliakiás antitest található, emelkedett TG2 aktivitást és kifejeződést találtak. Érdekes még, hogy korábbi tanulmányok szerint állatkísérletekben a TG2 ellen két különböző fajta, gátló és aktiváló hatású, anti-TG2 antitest is termelődhet. Így fontos és tisztázatlan kérdés, hogyan befolyásolják a coeliakiás autoantitestek a TG2 enzimátikus sajátosságait.

A transzglutamináz 2 Ca^{2+} -kötése

A TG2 aktuális enzimátikus aktivitása attól függ, milyen szerkezeti állapotban van, ezt pedig a hozzá kötődő ligandok minősége és mennyisége befolyásolja, hasonlóan az epidermális transzglutaminázhoz (TG3). Liu és mtsai. feltárták a TG2 GDP-kötött formájú kristályszerkezetét, az enzim Ca^{2+} hatására létrejövő aktív formája azonban nem ismert. Az enzim négy doménből áll: N-terminális β -szendvics, az aktív helyeket tartalmazó core és két C-terminális β -hordó doménből. A GDP-kötött és a nemrégiben azonosított inhibitor-kötött kristályszerkezet között nagy különbség tapasztalható. Valószínűleg ezt a nagy konformáció változást a Ca^{2+} kötés indítja el, de a pontos Ca^{2+} -kötő helyek nem azonosíthatóak az újabb kristályszerkezet alapján sem. Így a Ca^{2+} -kötő helyek keresése és vizsgálata napjainkban is aktuális. Ráadásul a TG2 Ca^{2+} -kötő helyei szerepet játszhatnak a coeliakiás autoantitestek enzimhez való kötődésében. Korábbi eredmények alapján a TG2 Ca^{2+} -kötése szükséges és megnöveli a coeliakiás antitestek kötődését a TG2-höz, ami igen jelentős lehet a coeliakia patogenezisében.

CÉLKITŰZÉSEK

1. Mivel a TG2 összetett biokémiai és sejtfunkciókkal rendelkezik, a coeliakiás autoantitestek hatása az enzim működésére jelentős lehet a coeliakia patogenezisében. Célul tűztük ki a TG2 transzglutamináz és GTPáz aktivitásának vizsgálatát az anti-TG2 autoantitestek jelenlétében. Azt is megvizsgáltuk, vajon az autoantitestek hatása összefüggésben van-e különböző klinikai manifesztációkkal és a diéta betartásával.

2. Egy feltételezés szerint a coeliakiás TG2 specifikus autoantitestek mindig jelen vannak a coeliakiás betegekben, ráadásul gyakran korábban, mint ahogy a betegség tünetei megjelennek. Célul tűztük ki ennek a feltételezésnek a megerősítését coeliakiás anti-TG2 antitest lerakódások vizsgálatával intra- és extraintesztinálisan, a coeliakiás biopsziákban még a keringő autoantestekkel nem rendelkező betegek esetén is.

3. A TG2 egyedülállóan multifunkcionális fehérje Ca- és GTP-függő aktivitásokkal, és ráadásul a Ca^{2+} -kötése befolyásolhatja a coeliakiás autoantitestek felismerését is. Ezért célul tűztük ki az enzim Ca^{2+} -kötő helyeinek lokalizálását irányított mutagenézis alkalmazásával. Ennek során a XIII-as faktor és az epidermális transzglutamináz ismert Ca^{2+} -kötő helyeivel homológ helyeken és még két, homológ modellezéssel újonnan felismert negatív felületi potenciállal rendelkező helyen készített mutánsokat vizsgáltunk.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

IgG és IgA tisztítás

25 endomizium antitest pozitív coeliakiás beteg és 3 negatív, kontroll egyénből IgG és IgA antitesteket tisztítottunk (Sepharose-Protein G és agaróz-jacalin felhasználásával). A betegek a következő klinikai manifesztációjú csoportokba tartoztak: (i) súlyos felszívódási zavar a korai gyermekkorban, (ii) felnőtt betegek jó általános kondícióban, (iii) felnőtt betegek súlyos felszívódási zavarral, (iv) gyermekek bőr biopsziával igazolt dermatitis herpetiformisszal, bélrendszeri panaszok nélkül, (v) IgA deficiens gyermekek hasonló tünetekkel, mint (i)-es csoport. Egy további csoportként (G) IgA hiányos betegeket is vizsgáltunk, akik csak IgG keringő antitestekkel rendelkeztek. Az (i) csoport betegeinek antitesteit glutén-mentes diéta során, a klinikai és hisztológiai javulás után szintén megvizsgáltuk. A kísérleteket a Heim Pál Gyermekkorház Etikai Bizottságának engedélyével végeztük.

Transzglutamináz enzim preparátumok

Három különböző forrásból származó TG2-t használtunk az coeliakiás antitestek hatását vizsgáló kísérleteinkhez. A rekombináns TG2-t *E. coli*-ban glutation S-transzferáz (GST) fúziós formában termeltük. 4 napos 1 μ M all-transz retinsavval kezelt humán mieloid leukémiai sejtek kivonatát, valamint vörösvértestből származó TG2-t használtunk, mint természetes forrásból származó enzimeket.

A kalcium-kötődési vizsgálatokhoz Rosetta 2-ben pET-30 Ek/LIC vektor használatával termelt (His)₆-véggel rendelkező TG2-t használtunk. A helyspecifikus mutánsokat QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit segítségével készítettük. A mutánsokat restrikciós analízissel és DNS szekvenálással ellenőriztük. A (His)₆-fúziós fehérjét ProBond Ni-NTA géllal tisztítottuk és Bradford-módszerrel határoztuk meg a fehérje koncentrációkat.

Az önkeresztítő képességet, a preparátumok tisztaságát az SDS-poliakrilamid gél Coomassie BB festésével és Western blotton kecske poliklonális anti-TG2 antitesttel és torma peroxidáz (HRP) konjugált anti-kecske antitesttel, kemilumineszcens módszerrel ellenőriztük.

TG2-ELISA módszer

A tisztított antitestek specifikus anti-TG2 tartalmának, a mutánsok antigenitásának és funkcionális tisztaságának meghatározásához egy általános ELISA módszert használtunk. A vályúkat GST-fúziós vagy (His)₆-fúziós rekombináns enzimekkel fedtük. A tisztított antitesteket különböző hígításban használtuk a normalizáláshoz szükséges hígítás meghatározásához. Később az antitestek enzim aktivitásra gyakorolt hatásának a vizsgálatához két antitest koncentrációt használtunk: (i) 15 µg/ml IgA vagy IgG, ahol minden coeliakiás antitest már maximum abszorbanciát produkált az ELISA-ban („azonos immunoglobulin koncentráció”), és (ii) azt a hígítást, ahol a coeliakiás antitestek a maximum abszorbancia felét produkálták az ELISA módszerrel („normalizált antitest koncentráció”). Az antitest-kötődés alapján történő normalizálásnál monoklonális TG100 antitestet és HRP-konjugált anti-egér IgG-t, illetve a mutánsok antigenitásának vizsgálatánál 64 kezeletlen coeliakiás szérumot használtunk.

A transzglutamináz aktivitás meghatározása

A transzglutamináz aktivitást három különböző módszerrel határoztuk meg. A mikrotiter lemez módszer esetén az 5-(biotinamido)pentilamin beépülését mérjük a lemezen immobilizált sztreptavidin-alkalikus foszfatáz és p-nitrofenil-foszfát szubsztrát hozzáadásával 405 nm-en.

A transzglutamináz reakció első lépését kísérő, oldatfázisú reakció során történő NH₃ felszabadulást glutamát-dehidrogenáz kapcsolt reakcióval detektáltuk a NADPH koncentráció csökkenése révén 355 nm-en (UV-teszt).

A filterpapír módszer a [1,4(n)-3H] putreszcin N,N-dimetilált kazeinbe történő beépülésén alapszik. A reakció elegyet filterpapíron hideg triklór-ecetsavval kicsapjuk és a jelzett [3H]putreszcin beépülését a filterpapír mosása után β-számlálóval mérjük.

Transzglutamináz aktivitás mérése a fibronektin kötött transzglutamináz 2-vel

A specifikus anti-TG2 autoantestek transzglutamináz aktivitásra gyakorolt hatásának mérésére a mikrotiter lemez módszert módosítottuk. A vályúkat fibronektinnel fedtük és erre kötöttük a GST-fúziós, illetve az NB4 sejtkivonatban lévő TG2-t. Mosás után inkubáltuk a jacalinnal tisztított teljes IgA-val és ez után a TG2-höz nem kötődött antitesteket lemostuk a lemezeiről. A vályúkban inkubáltuk a reakcióelegyet és a korábban leírtak szerint detektáltuk az aminbeépülést.

A vékonybélben található IgA lerakódások specifikitásának meghatározása

Az EmA-negatív és –pozitív betegek fixálatlan fagyasztott duodénium metszeteiről kálium-tiocianátos kezeléssel lemostuk az aspecifikusan kötődött fehérje komplexeket, majd klór-ecetsavval szelektíven leoldottuk a fibronectin felszínén lévő szöveti TG2-t és ezzel az esetlegesen ahhoz megkötött antitesteket. Ezután a metszeteket megfestettük a visszamaradó IgA-ra és TG2-re.

Annak érdekében, hogy bizonyítsuk, hogy az EmA-negatív betegek esetén az IgA lerakódások anti-TG2 antitesteket tartalmaznak, a fixálatlan fagyasztott vékonybél metszeteket rekombináns GST-fúziós TG2-vel inkubáltuk, majd feltételezvé, hogy ez csak a szövetekben lévő TG2-specifikus IgA szabad kötőhelyeivel reagál, kettős festéssel szelektíven felismertük (anti-GST antitesttel és Alexa Fluor® 594-jelölt csirke anti-kecske immunglobulin antitesttel, piros). A humán IgA-t zöld festéssel jelöltük, ahogy korábban. A használt anti-GST antitest nem keresztreakál a metszeten természetesen jelen lévő TG2-vel. Annak megakadályozására, hogy a hozzáadott GST-fúziós TG2 a metszeten lévő fibronectinhez kötődjön a rekombináns fehérjével együtt a fibronectin 45 kDa méretű zselatin-kötő darabját és G92 antitestet adtunk. Ez az antitest a TG2 N-terminálisához kötődik, ahol a fibronectin kötőhely található.

GTPáz aktivitásmérés és közvetlen fotojelölés

A GTPáz aktivitást az irodalomban korábban leírt aktív szenes elválasztási módszerrel mértük. A hidrolizált [32P]Pi-t β -számlálóval mértük. A közvetlen fotojelölést Beggs és mtsai. által leírt módon végeztük.

Molekuláris modellezés és szekvencia összehasonlítás

A használt humán TG2, TG3 és XIII-as faktor kristályszerkezete az RCBS fehérje adatbázisában megtalálható. A molekula-modellezést Silicon Graphics Fuel munkaállomáson GRASP és Sybyl, valamint RasMol és VMD programokkal végeztük. A szekvencia összehasonlításra a ClustalW programot használtuk.

Equilibrium dialízis

A Ca^{2+} -kötést equilibrium dialízissel tanulmányoztuk ^{45}Ca izotópot és 96-Well Equilibrium Dialyzer Plate-t alkalmazva. Dialízis után folyadék szcintillációs méréssel határoztuk meg a radioaktivitást. Szcintillációs folyadéknak Tritosol-t használtunk. Az eredményeket a dialízis után meghatározott fehérjetartalomra normalizáltuk. A preparátum

fehérjertalmát, tisztaságát Bradford-módszerrel és poliakrilamid gélben megfuttatva majd megfestve az Alpha Imager szoftverével határoztuk meg. A szabad Ca^{2+} koncentrációt internetes Maxchelator és Fabiato és Fabiato programmal határoztuk meg.

Izotermális titrációs mikrokolorimetria és induktív csatolású plazma emissziós spektrometria

A TG2 kalcium-kötő képességét izotermális titrációs mikrokolorimetriával vizsgáltuk (VP-ITC MicroCalorimeter, MicroCal) Ehhez nagy tisztaságú rekombináns TG2-t készítettünk ioncserés kromatográfiával (HiTrap Q HP Column). A tisztaságot poliakrilamid gélelektroforézissel és Coomassie-festéssel ellenőriztük. Az igen tiszta preparátumot először EDTA-val, majd kétszer Chelex-100 géllal dializáltuk. A mérést 25°C -on végeztük. Az induktív csatolású plazma emissziós spektrometriához (ICP-OES) hasonlóan készítettük elő a mintákat. A kalcium törzsoldat koncentrációját szintén ezzel a módszerrel ellenőriztük.

Cirkuláris dikroizmus spektroszkópia

Cirkuláris dikroizmus (CD) spektrumot Jasco-810 spektropolariméterrel 25°C -on mértük kvarc küvettákban. A CD dekonvolúciót continll, cdsstr és selcon3 programokkal végeztük, amelyek a Dichroweb honlapján elérhetőek.

Statisztikai analízis

A mérési adatok statisztikai értékeléséhez varianciaanalízist (ANOVA, egy utas), Wilcoxon-próbát és Mann-Whitney U-próbát végeztünk Microsoft Excel (Microsoft Inc.) and Analyse-it (Analyse-it Software, Ltd.) szoftverekkel.

EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

Munkánk során tanulmányoztuk a coeliakiás autoantitestek hatását a TG2 transzglutamináz és GTPáz aktivitására, és azt találtuk, hogy a coeliakiás antitestek aktiválják a transzglutamináz aktivitást. Ez a hatás jelentős, mivel sikerült bizonyítanunk, hogy az antitestek a TG2-höz kötődve vannak lerakódva a betegek intra- és extraintesztinális szöveteiben, akkor is, ha a szérumban nem mutathatók ki. Mivel ezek az antitestek képesek befolyásolni a TG2 aktivitásait, amelyeket az enzim Ca^{2+} -kötése is szabályoz, a TG2 Ca^{2+} -kötő képességének és kötőhelyeinek azonosítása, valamint azok kapcsolata az antitestek célpontjával új adatokat szolgáltat a coeliakia patomechanizmusának megértéséhez.

Coeliakiás autoantitestek hatása a TG2 transzglutamináz aktivitására

A TG2 aktivitása és maga a fehérje is jelen van a coeliakia szempontjából kritikus helyen, a bél kefeszegélyében és a szubepiteliális részeken. Ráadásul nemcsak a TG2 található meg az egész testben mindenfelé, hanem az anti-TG2 autoantitest lerakódások is. A lerakódott antitestek hatása jelentős a betegség előrehaladásában, mivel a TG2 által deamidált gliadin peptid sokkal intenzívebb immunválaszt vált ki. Ráadásul az autoantitestek kötődése veszélyezteti a TG2 és a fibronectin kölcsönhatását, ami megzavarhatja a sejtek adhéziós és elterjedési folyamatait.

Azt találtuk, hogy olyan aktivitás mérési módszer esetén, ahol nagy immobilizált glutamin akceptor fehérjéket használtunk szubsztrátként, a coeliakiás autoantitestek (IgA és IgG) növelik mind a rekombináns, mind a természetes forrásból származó TG2 transzglutamináz aktivitását dózis-függő módon (105,4-242,2 %). Az aktiváló hatás gyermekekből származó antitestek esetén jelentősebb, mint a felnőtt betegek antitestei esetén. A normalizálás után az antitestek hatása sokkal homogénebb lett, mint az azonos antitest koncentrációval mért aktivitások esetén, ami megerősíti, hogy a tapasztalt aktiváló hatás a coeliakiás antitesteknek tulajdonítható. Ráadásul az újonnan fejlesztett aktivitásmérési módszer esetén, amelyben a TG2 a fibronectinnel fedett mikrotiter lemezre van kötve és a coeliakiás antitestek közvetlenül erre a kihorgonyozott TG2-re kötődnek és fejtik ki hatásukat, szintén transzglutamináz aktivitást növelő hatását tapasztaltuk az autoantitesteknek. Ez a típusú módszer sokkal jobban hasonlít az extracelluláris mátrix körülményeire és ekvivalens egy affinitás-tisztítással, egyidejűleg kiküszöböli az antitestek affinitás tisztításának nehézségeit.

Az aktiváló hatás lehetséges mechanizmusa

A transzglutamináz reakció két fő lépésből áll. Az első lépés az acil-enzim köztes termék képződése, amit ammónia felszabadulás kísér. A második lépés az intermedier reakciója a vízzel (deamidálás esetén) vagy primer amin csoporttal. Az UV-teszt eredményei alapján a coeliakiás és nem coeliakiás antitestek is felgyorsítják a reakció első lépését, ami azt jelenti, hogy a coeliakiás antitestek specifikus aktiváló hatása a reakció mechanizmus második részét befolyásolja.

Az antitestek stabilizálhatják a TG2 konformációját megakadályozva az inaktivációját. A TG2 nagyon érzékeny enzim, tisztítva vagy a sejteken kívül hamar elveszíti a transzglutamináz aktivitását. Az antitestek elősegíthetik a TG2 megfelelő feltekeredését, illetve a már csökkent aktivitással rendelkező újra-feltekeredését. Másik lehetőség, hogy az antitestek elősegítik a szubsztrát bekötődését az aktív helyre az enzimkatalízis második lépése során. Az a tapasztalatunk, hogy a coeliakiás antitestek aktiváló hatása fordítottan korrelál a rekombináns és a természetes enzim preparátumok specifikus aktivitásával, alátámasztja a felvázolt mechanizmusokat és kizárja, hogy a nem megfelelő feltekeredés az *E. coli*-ban az oka az antitestek aktiváló hatásának. Ráadásul *in vivo* is megfigyeltek már korábban emelkedett transzglutamináz aktivitást a coeliakiás bélbolyhokban.

Az a hipotézis, hogy a coeliakiás antitestek dajkafehérjeként hatnak, magyarázza azt is, hogy miért nem találtak jelentős antitest hatást a korábbi tanulmányokban, ahol sejtkivonatot használtak az enzim forrásaként. A sejtkivonaton jelenlévő TG2-vel kölcsönható partnerek már a mérések előtt kötődhetnek és így elfedhetik az antitestek enzim-fitnesszt javító hatását. Az extracelluláris térben azonban érvényesülhet az antitestek hatása, aminek fontos következményei lehetnek a betegség patomechanizmusában.

Korreláció az antitestek hatása és a coeliakia klinikai lefolyása között

A súlyos klinikai tünetekkel rendelkező gyermek és felnőtt betegekből származó antitestek egyaránt jelentősen fokozták a transzglutamináz aktivitást, míg a jó általános kondícióban lévő beteg esetén nem találtunk szignifikáns aktiváló hatást. Ez, valamint az aktiváló hatás megszűnése ugyanabból a betegből származó minta esetén glutén-mentes diétát tartva arra utal, hogy az aktiváló antitestek jelenléte kedvezőtlen és súlyosbító tényező a betegség klinikai lefolyása szempontjából, habár a felnőtt súlyos tünetekkel rendelkező betegek antitestei normalizálás után sokkal kevésbé jelentős aktiváló hatást mutattak. A felnőtt korban diagnosztizált betegek sokkal összetettebb epitóp specifitású

antitestekkel rendelkezhetnek az epitóp elterjedés miatt. A normalizált antitest koncentrációnál mért eredményeink is arra utalnak, hogy a felnőtt betegekben az aktivitást fokozó antitestek már kisebb arányban vannak jelen a coeliakia előrehaladottabb állapota miatt.

A TG2 transzglutamináz aktivitása nagyon pontosan szabályozott. A nem megfelelő aktiválódás sejthalálhoz, különböző gyulladásos reakciók befolyásolásához vezethet. A TG2 fokozott aktivitása nagyobb mennyiségű és jelentősen immunogénebb deamidált gliadin fragmentek képződéséhez is vezethet, ami súlyosabb klinikai tüneteket okozhat. Arról még nagyon kevés információnk van, hogyan befolyásolhatják az antitestek a TG2 aktivitását a sejteken belül.

Coeliakiás autoantitestek hatása a TG2 GTPáz aktivitására

Ismert tény, hogy több autoimmun betegségben az autoantitestek bejuthatnak a sejteken belülre. Elsőként megvizsgálva, azt találtuk, hogy a coeliakiás autoantitestek gátolják a TG2 GTPáz aktivitását. Mivel a TG2 jelátviteli folyamatokban is fontos szerepet játszik, ennek a gátló hatásnak lehet klinikai jelentősége, ha később sikerül bizonyítani, hogy a coeliakiás autoantitestek szintén bejutnak a sejtekbe.

Az coeliakiás IgA lerakódások TG2 specifikitásának bizonyítása

Vékonybél metszeteket GST-fúziós TG2-vel inkubálva azt tapasztaltuk, hogy a rekombináns enzim kötődik a coeliakiás és egészséges szövetekben is megtalálható fibronektinhez. A TG2 fibronektinhez kötődése megakadályozható a fibronektin 45 kDa-os fragmentjével és egy egér monoklonális antitesttel (G92). Ilyen körülmények között a GST-fúziós TG2 csak a coeliakiás metszetekhez kötődik, a lerakódott IgA-nak megfelelő mintázattal. Nem kötődik a kontroll metszetekhez, amelyek nem tartalmaznak lerakódott extracelluláris IgA-t. Az EmA-negatív betegekből származó metszetekkel ugyanolyan eredményeket kaptunk, mint az EmA-pozitív metszetek esetén. Ezek a kísérletek arra utalnak, hogy az IgA antitestek specifikusan, nagy affinitással a TG2-höz kötődnek, anti TG2 autoantitestek. Az EmA-negatív coeliakiás betegek idősebbek és több hasi panasszal, komplikációval rendelkeztek, mint az EmA-pozitív betegek, ami előrehaladottabb coeliakiára utal. Ez alatt a hosszabb ideig tartó immunválasz nagyobb affinitású anti-TG2 antitesteket eredményezhetett, ami magyarázza az alacsonyabb szérum autoantitest szintet. Ily módon a hosszú ideig tartó kezeletlen coeliakia EmA-negativitáshoz vezethet.

Feltételezhető, hogy a coeliakiás autoantitestek szerepet játszanak a boholy atrófia kialakulásában, de az, hogy az autoantitesteket nem találták meg minden betegben ennek a feltételezésnek ellentmondott. Eredményeink megerősítik, hogy a coeliakiás autoantitesteknek jelentősége lehet a betegség patogenezisében, hiszen minden betegben megtalálhatóak, még a szeronegatív betegekben is és ráadásul TG2 specifikusak.

Módszerünk klinikailag is alkalmazható a szeronegatív esetekben a coeliakia differenciál diagnózisához is. Mivel az anti-TG2 autoantitestek minden coeliakiás betegben jelen vannak és kölcsönhatva egymással módosíthatják az enzim aktivitását, funkciót, nyilvánvalónak tűnik, hogy az autoantitestek szerepet játszanak a coeliakia patomechanizmusában.

A rekombináns TG2 kalcium-kötése

A coeliakiás betegekben mindig jelen levő TG2 specifikus autoantitestek, kapcsolódva a TG2-höz és befolyásolva annak funkciót, fontos szerepet játszhatnak a coeliakia kialakulásában. A TG2 kalcium-függő enzim és ráadásul a Ca^{2+} -kötése megnöveli az antitestek affinitását is az enzimhez. Mivel a TG2 Ca^{2+} -kötött kristályszerkezete és a pontos Ca^{2+} -kötő helyei nem ismertek, ezek meghatározása, az enzim aktivitásra és az antitestek kötésére gyakorolt hatásuknak a tisztázása jelentős.

Meghatároztuk ICP-OES módszerrel, hogy EDTA-s dialízis után a TG2 0,5 Ca^{2+} -t köt nagy affinitással. Ez azt jelenti, hogy a TG2, hasonlóan a TG3-hoz rendelkezik egy erős Ca^{2+} -kötő hellyel. Equilibrium dialízis mérések alapján a rekombináns TG2 6 Ca^{2+} -t köt, mint a natív eritrocita TG2. Az ITC mérések is megerősítik az erős Ca^{2+} -kötő hely meglétét és az equilibrium dialízis eredményét. Az integrált hő görbe 0,5 mol/mol Ca^{2+} -kötést mutat nagy affinitással. A következő 5 Ca^{2+} igen kicsi, egymással összehasonlítható affinitással kötődik. Az itt tapasztalt kis hőváltozások, kis entalpiaváltozást eredményeznek. A TG2 GDP-kötött inaktív és inhibitor-kötött aktív formája között tapasztalható nagy konformáció változás nagy entrópiaváltozásra utal, ami magyarázhatja a kis entalpiaváltozást.

Ca^{2+} jelenlétében a TG2 transzglutamináz aktivitással rendelkezik és más szubsztrát hiányában képes önkeresztkötésre, ami a vizsgálatok alatt megváltoztathatja a Ca^{2+} -kötő képességét. Azért, hogy az önkeresztkötés hatását tisztázzuk a Ca^{2+} -kötésre, megvizsgáltuk egy transzglutamináz aktivitás nélküli mutáns (C277S) Ca^{2+} -kötő képességét is. Ez a mutáns equilibrium dialízis alapján kisebb affinitással, de szintén 6 Ca^{2+} -ot köt, és hasonló

ITC eredményt is kaptunk, mint a vad típus esetén. Ezeknek az eredményeknek alapján az önkeresztkötés szignifikánsan nem befolyásolja a TG2 Ca²⁺-kötő képességét.

A TG2 Ca²⁺-kötő mutánsai

Az ismert fontosabb Ca²⁺-kötő domének nem mutatnak jelentős hasonlóságot a transzglutamináz család Ca²⁺-kötő motívumaihoz. Ezért a családon belüli nagymértékű szekvencia-hasonlóság és a TG3, 13-as faktor azonosított Ca²⁺-kötő helyei alapján homológ és összehasonlító modellezéssel 5 felületi helyen 7 mutánst készítettünk. Az S1 és S3 mutáns a TG3 Ca²⁺-kötő helyeivel való hasonlóság, a S2 a 13-as faktor Ca²⁺-kötő helye alapján lett tervezve. Az S2 hely nagy hasonlóságot mutat a TG3 S2 Ca²⁺-kötő helyével is. Az S2 és S3 helyek esetén két-két mutánst készítettünk, mert ezek a helyek két szemben lévő hurokból állnak. Az S4 és S5 hely két nagy negatív felületi potenciállal rendelkező hely, amelyet modellezés alapján választottunk ki. Az volt a célunk, hogy olyan mutánsokat hozzunk létre, amelyek a Ca²⁺-kötő képességet csökkentik, de a molekula szerkezetet nem befolyásolják. Így főleg a negatív töltésű Glu és Asp aminosavakat cseréltük Gln és Asn aminosavakra.

A mutánsok kifejeződésének és tisztaságának normalizálására egy monoklonális antitest (TG100) kötődési ELISA-t használtunk, mert az antitestek érzékenyebbek a konformáció-változásra. A mutánsok natív állapotát cirkuláris dikroizmus spektroszkópiával is ellenőriztük.

A mutáns enzimek kalcium-kötése

A mutánsok Ca²⁺-kötő képességét 1,7 mM [Ca²⁺]_{szabad}-nál vizsgáltuk equilibrium dialízissel. Mivel ennél a Ca²⁺ koncentrációnál éri el a maximumot a vad típus Ca²⁺-kötési görbéje, ezért, ha a mutáns alacsonyabb Ca²⁺-kötő képességgel rendelkezik, a Ca²⁺-kötési görbének ezen exponenciális részén láthatjuk a legnagyobb változást.

1,7 mM [Ca²⁺]_{szabad}-nál szignifikánsan kevesebb Ca²⁺-t köt minden mutáns a vad típusnál. Ez azt sugallja, hogy mindegyik hely szerepet játszik a TG2 Ca²⁺ kötésében. Az, hogy a mutagenézis során egy Ca²⁺-kötő hely elvesztése nem egy, hanem több Ca²⁺-kötés elvesztéséhez vezetett, a Ca²⁺-kötő helyek közötti kooperativitást jelzi, amelyet Ahvazi és mtsai. a TG3 S2 és S3 Ca²⁺-kötő helye esetén tapasztaltak is.

ICP-OES módszerrel megvizsgálva az S1 mutánst azt tapasztaltuk, hogy ez a mutáns EDTA-s dialízis után már nem köt Ca²⁺-t a vad típusal és a C277S mutánsal szemben. Ez azt jelenti, hogy a TG2 nagy affinitású Ca²⁺-kötő helye az S1 hely.

A mutáns enzimek Ca^{2+} -függő transzglutamináz aktivitása

A TG2 Ca^{2+} -függő transzglutamináz aktivitását mikrotiter lemez és filterpapír módszerrel vizsgáltuk. A Ca^{2+} -kötő mutánsok aktivitása csökkent, sőt a S3, S4 és S5 mutáns teljesen elveszítette a transzglutamináz aktivitását. A magasabb Ca^{2+} koncentráció nem volt képes kompenzálni a Ca^{2+} -kötő helyek elvesztését. A transzglutamináz aktivitást a GTP és GDP gátolja, ennek megfelelően a még csökkent transzglutamináz aktivitással rendelkező mutánsok aktivitását is tovább csökkentette GTP jelenléte.

A kötődő Ca^{2+} fontos feladata a transzglutamináz aktivitás elindítása. Az S1 helyen erősen kötött Ca^{2+} nem elég, hogy a TG3 rendelkezzen aktivitással. A Ca^{2+} -kötődése az S3 helyhez szükséges, hogy egy szubsztrát csatorna alakuljon ki, szabaddá téve az aktív helyet. Az S1 hely mutáns visszamaradt transzglutamináz aktivitása azt sugallja, hogy ez a hely fontos az aktív konformáció kialakításában, de a többi Ca^{2+} -kötő hely is részt vesz ebben. A Ca^{2+} kötődése az S2 helyhez csak kisebb szerepet játszik a TG2 esetén az aktív konformáció kialakításában, mivel az S2 hely mutánsok esetén csak kevéssel csökkent az enzimaktivitás. Az S3 hely nagyon fontos szerepet játszik az aktív forma kialakításában a TG3-hoz hasonlóan, mivel az S3 mutánsok teljesen elveszítik az aktivitásukat.

Ahvazi és mtsai. azt találták, hogy az S2 és S3 Ca^{2+} -kötő helyek kooperálhatnak a TG3-ban. Az S4 és S5 hely mutánsok hasonlóan a transzglutamináz aktivitás finom szabályozásában játszhatnak szerepet, mert ezek a mutánsok sem rendelkeznek Ca^{2+} -függő aktivitással.

Érdekes kérdés, hogyan képesek ezek a kis affinitással kötődő Ca^{2+} -k olyan jelentős szerepet játszani a transzglutamináz aktivitásban, amikor a különböző szerkezeti vizsgáló módszerek nem képesek jelentős változást kimutatni a Ca^{2+} -kötés során? A C2 Ca^{2+} -dependens foszfolipid kötő domén esetén azt figyelték meg, hogy a foszfolipid jelenlétében megnövekszik a Ca^{2+} -affinitása a Ca^{2+} koordinációs szférájának kiegészülése miatt. Ez a jelenség felveti a lehetőséget, hogy hasonló Ca^{2+} -affinitás növekedés tapasztalható esetleg a TG2 esetén is valamilyen interakciós partner, vagy esetleg a szubsztrát jelenléte esetén.

A mutáns fehérjék GTPáz aktivitása és GTP kötése

Tanulmányoztuk a mutánsok GTPáz aktivitását és GTP kötését is, mivel a Ca^{2+} -kötés befolyásolhatja ezeket. Direkt fotoaffinitás jelöléssel az S4 és S5 mutáns nem mutat GTP kötést, míg az S1 és S2A mutánsok alacsonyabb, az S2B, S3A és S3B hasonló GTP kötést mutatnak, mint a vad típus.

A mutánsok GTPáz aktivitása jól korrelál a fotoaffinitás jelölés eredményével, kivéve az S4 és S5 mutánsokat, amelyek 1,5-2-szer magasabb aktivitást mutattak a vad típushoz képest. A Ca^{2+} jelenléte csökkentette a fehérjék GTPáz aktivitását a vad típushoz képest, kivéve az S4 és S5 mutánsokat.

A TG3 szerkezetében a 324-es aszparaginsav, amely közvetlenül koordinálja a harmadik Ca^{2+} kötését és egy hurok régióban található, felelős a GTP és Ca^{2+} -kötés illetve a megfelelő aktivitások közötti kapcsolásért. Eredményeink alapján az S4 és S5 hely is felelős lehet a GTPáz aktivitás szabályozásáért, és a GTPáz és transzglutamináz aktivitás közötti megfelelő váltásért. Ha ez a két hely nem köt Ca^{2+} -t, az enzim GTPáz aktivitása nem gátolható az emelkedő Ca^{2+} koncentrációval. Ez a két mutáció helyileg közel található ahhoz a hidrofób zsebhez, ahova a GTP/GDP kötődik és így befolyásolhatják a GTP kötését és a GTPáz aktivitást. A mutációk olyan konformációt eredményezhettek, amely esetén felgyorsul a GDP/GTP kicserélődés, lerövidül a dokkolási idő, magasabb GTPáz aktivitást és alacsonyabb GTP-kötő képességet eredményezve.

A Ca^{2+} -kötő mutánsok antigenitása

A coeliakiás antitestek konformációs epitópok ellen irányulnak, amelyeket az enzim Ca^{2+} -kötése megváltoztathat, növelve a beteg antitestek affinitását a TG2-höz. Próbaként teszteltük a coeliakiás antitestek kötődését a Ca^{2+} -kötő mutánsokhoz egy ELISA módszerrel. Az S1-S3 mutációk nem befolyásolták az antitestek kötődését viszont az S4 és S5 helyek szerepet játszanak az epitóp képzésében, főleg az S4 hely, mert ennek mutációja esetén szignifikáns csökkenést tapasztaltunk az autoantitestek kötődésben ($11,5 \pm 8,2$ % a 100 % vad típushoz képest). Az S5 mutáns esetén is csökkent kötődést mutatnak a coeliakiás antitestek, amit a két mutáció közelsége és kooperativitása is magyarázhat.

A tengerimalac TG2 esetén a coeliakiás autoantitestek kötődését jelentősen befolyásolja a Ca^{2+} jelenléte vagy hiánya. Ezért megvizsgáltuk, hogy a Ca^{2+} , GDP, EDTA jelenléte befolyásolja-e az autoantitestek kötődését a TG2-höz, de nem találtunk különbséget.

Egy munkacsoport közölte, hogy a TG2 katalitikus triádját mutálva lecsökken a coeliakiás autoantitestek kötődése a TG2-höz. A mi kísérleteinkben a C277S mutáns esetén nem találtunk szignifikáns csökkenést a kötődésben a vad típushoz képest. Az aktív hely a TG2 inaktív állapotában el van fedve. A Ca^{2+} -kötött aktív formában pedig valószínűleg a szubsztrát fedi el ezt a helyet. Egy másik kutatócsoport pedig azt találta, hogy az extracelluláris térben a sejt felszínén a TG2, amely a célpontja a coeliakiás antitesteknek, a

magas Ca^{2+} koncentráció ellenére nem található aktív formában. Mindezeket egybevetve nem valószínű, hogy az aktív hely lenne a coeliakiás autoantitestek fő epitópja. A Ca^{2+} -kötő helyek szerepének tisztázása az epitóp képzésében elősegítheti a coeliakia patogenezisének jobb megértését és terápiás lehetőséget is jelenthet.

A transzglutamináz enzimek Ca^{2+} -kötő helyeinek evolúciója

Az emlős transzglutamináz család egy gén duplikációja és ezt követően különböző kromoszómákra történő átrendeződése révén alakult ki. A korábbi és saját adataink alapján az egyes izoformák Ca^{2+} -kötő helyeinek evolúciója levezethető. A szekvencia összehasonlítás azt mutatja, hogy az S2 Ca^{2+} -kötő hely mindegyik transzglutaminázban konzervált és egyedül is képes meghatározni a transzglutamináz aktivitás Ca^{2+} -függését, mivel a 13-as faktor csak ennek megfelelő Ca^{2+} -kötő hellyel rendelkezik. Valószínűleg a prosztata transzglutamináz (TG4) is csak ezzel a hellyel rendelkezik, így ennek a két szekretált enzimnek elégséges ez az egy Ca^{2+} -kötő hely az aktiváláshoz az extracelluláris térben, ahol igen magas a Ca^{2+} koncentráció. A TG1 a terminálisan differenciált keratinocitákban működik, ahol a Ca^{2+} koncentráció szintén magas, de a szekvencia adatok alapján a TG1 az S1 hellyel is rendelkezik. Az intracelluláris transzglutaminázok úgy tűnik, hogy sokkal összetettebb Ca^{2+} -regulációval rendelkeznek. Mivel minden intracelluláris transzglutamináz rendelkezik a nagy affinitású S1 hellyel, így ez kiemelkedően fontos az intracelluláris transzglutamináz aktivációhoz. A szekvencia összehasonlítás magyarázza azt is, hogy miért nincs S1 hely a 13-as faktorban, ugyanis pozitív töltésű aminosav van a 13-as faktor S1 régiójában. Hasonló szekvencia különbségekkel magyarázhatjuk, az S1 Ca^{2+} -kötő hely hiányát a TG4-ben. Néhány apoláris és pozitív töltésű aminosav található a 13-as faktor, a TG1, és TG4 S3, S4 és S5 régiójában, valamint a TG3 S4 és S5 helynek megfelelő régiójában, ami azt sugallja, hogy itt nem képesek Ca^{2+} kötésére. Habár az S3 hely szükséges az intracelluláris transzglutaminázokban a szubsztrát csatorna kinyitásához, a TG5 és TG7 valószínűleg ezt a Ca^{2+} -kötő helyet elveszítette. Ezt magyarázhatja az, hogy ez a két transzglutamináz a filogenetikai fa másik ágán helyezkedik el a TG2, TG3 és TG6-hoz képest; esetükben valószínűleg másik kötőhely láthatja el az S3 hely feladatait. A TG5, TG6 és TG7 rendelkezik S4 és S5 Ca^{2+} -kötő helyekkel és így hasonló Ca^{2+} -szabályozási mechanizmussal rendelkezhet, mint a TG2. Ez megmagyarázhatja azt a megfigyelést is, hogy ezek a transzglutaminázok képesek kompenzálni a TG2 hiányát a TG2 knock-out egerekben.

ÖSSZEFOGLALÁS

A coeliakia (GSE) a vékonybél leggyakoribb, genetikailag fogékony egyéneknél kialakuló krónikus autoimmun betegsége, melynek igen sokféle klinikai manifesztációja lehet. A GSE fő autoantigénje az egyedülállóan sokarcú transzglutamináz 2 (TG2).

Kimutattuk, hogy az anti-TG2 antitest lerakódások negatív szerológiai vizsgálatok esetén is jelen vannak a vékonybélben, megerősítve azt a hipotézist, hogy a betegekben mindig képződnek anti-TG2 autoantitestek. Ezért jogosan vetődik fel a lehetőség, hogy a TG2 és az anti-TG2 antitestek fontos szerepet játszanak a coeliakia patogenezisében illetve manifesztációjában. Munkánk alapján a súlyos felszívódási zavarral rendelkező betegek autoantitestei dózisfüggő módon fokozzák a TG2 transzglutamináz aktivitását. Hasonló aktiválás volt megfigyelhető egy *in vivo* körülményeket utánozó tesztben, ahol a fibronectinhez kötött TG2 transzglutamináz aktivitását vizsgáltuk specifikus TG2 ellenes autoantitestekkel. Eredményeink alapján valószínűsíthető, hogy a coeliakiás autoantitestek stabilizálják az enzimet a katalitikusan kedvező konformációban. Az autoantitestek gátolják az enzim GTPáz aktivitását, így befolyásolhatják a TG2 jelátviteli funkcióit is.

A TG2 coeliakia patomechanizmusában lévő szerepének további tisztázásához megvizsgáltuk az enzim Ca^{2+} -kötő sajátságait, mivel annak Ca^{2+} -függő funkciója és az e mögött lévő szerkezeti tulajdonságok befolyásolhatják az autoantitestek kötődését a TG2-höz. ^{45}Ca equilibrium dialízis és izoterm mikrokalorimetriás titrálás azt mutatta, hogy a vad típus és a keresztkötő aktivitásra nem képes aktív hely mutáns egyaránt 6 Ca^{2+} -t köt. Homológ modellezés, negatív felületi potenciálú helyek kiválasztása és irányított mutagenézis segítségével azonosítottunk 5 különböző Ca^{2+} -kötő (S1-S5) helyet, melyek szerkezeti nem kanonikus Ca^{2+} -kötő helyek és multiplex kötésre is képesek lehetnek. Minden ezeket érintő mutáns Ca^{2+} -kötő képessége csökkent, annak ellenére, hogy CD spektroszkópia, antitest kötési vizsgálat és GTPáz mérés alapján elmondhatjuk, hogy ezek a mutációk nem okoztak szignifikáns szerkezeti változást. Egy kötőhely mutációja egynél többel csökkentette a kötött Ca^{2+} -ok számát, ami a kötőhelyek közötti kooperativitásra utal. Az S1 hely nagy affinitású kötőhely, a többi alacsony affinitással köti a Ca^{2+} -t. Minden mutánsnak csökkent a transzglutamináz aktivitása, ami GTP-vel gátolható volt. A vad típushoz hasonlóan a GTPáz aktivitások Ca^{2+} -függőek voltak, kivéve az S4 és S5 mutánsokat, amelyeknek jelentősen emelkedett a GTPáz aktivitása. Az S4 hely jelentősen befolyásolja a TG2 antigenitását, azaz szerkezeti kapcsolatban van a TG2 coeliakiában fontos építőjaival és ez az új ismeret lehetőséget ad azok pontosabb lokalizálására.

KÖZLEMÉNYEK

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

Kiraly R, Vecsei Z, Demenyi T, Korponay-Szabo IR, Fesus L. Coeliac autoantibodies can enhance transamidating and inhibit GTPase activity of tissue transglutaminase. Dependence on reaction environment and enzyme fitness. *J Autoimmun* 2006;**26**:278-287. (JCR 2006 IF: 2,154)

Salmi TT, Collin P, Korponay-Szabo IR, Laurila K, Partanen J, Huhtala H, Kiraly R, Lorand L, Reunala T, Mäki M, and Kaukinen K. Endomysial antibody negative coeliac disease: Clinical characteristics and intestinal autoantibody deposits. *Gut* 2006;**55**:1746-53 (JCR 2006 IF: 9,002)

Korponay-Szabó IR, Halttunen T, Szalai Z, Laurila K, Király R, Kovács JB, Fésüs L, Mäki M. In vivo targeting of intestinal and extraintestinal transglutaminase 2 by coeliac autoantibodies. *Gut* 2004;**53**:641-8. (JCR 2004 IF: 6,601)

Kiraly R, Csoosz E, Kurtan T, Antus S, Vecsei Z, Korponay-Szabo IR, Keresztessy Z and Fesus L. Functional significance of five non-canonical Ca²⁺-binding sites of transglutaminase 2 characterized by site directed mutagenesis (közlésre beküldve)

Egyéb közlemények:

Tumpek J, Korponay-Szabó I, Király R, Csípő I, Fésüs L és Sipka S. A coeliakiás ellenanyagok epitópspecifitásának jelentősége a transzglutamináz autoantitestek diagnosztikus kimutatásában. *Gyermekgyógyászat* 2004;**4**: 453-459.

Korponay-Szabo IR, Raivio T, Laurila K, Opre J, Kiraly R, Kovacs JB, Kaukinen K, Fesus L, Mäki M. Coeliac disease case finding and diet monitoring by point-of-care testing. *Aliment Pharmacol Ther* 2005;**22**:729-37. (JCR 2005 IF: 3,434)

Korponay-Szabo IR, Vecsei Z, Kiraly R, Dahlbom I, Nemes E, Fesus L, Mäki M. Deamidated gliadin peptides form epitopes that transglutaminase antibodies recognize. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2008;**46**:253-61. (JCR 2007 IF: 2,102)

Vecsei Z, Király R, Bagossi P, Tóth B, Csósz É, Sblattero D, Marzari R, Mäki M, Fésüs L, Korponay-Szabó IR. Coeliac autoantibodies recognize a composite main epitope on tissue transglutaminase involving amino acids from 3 domains (kézirat)

Előadások és poszterek az értekezés témájában:

Király R, László É, Keresztessy Z, Fésüs L. A humán szöveti transzglutamináz Ca²⁺-kötő helyeinek felderítése irányított mutagenézis alkalmazásával. A Magyar Biokémia Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya 6. Munkaértekezlete, Sárospatak, 2001.

Kiraly R, Demenyi T, Korponay-Szabo IR, Fesus L: Effect of coeliac autoantibodies on the enzymatic activity of tissue transglutaminase, Előadás: 10th International Symposium On Coeliac Disease, Párizs, Franciaország, 2002

Király R, Csoz E, Keresztessy Z, Fésüs L: Identification of Ca²⁺-binding sites in the human tissue transglutaminase by surface potential engineering using site directed mutagenesis. 7th International Conference on Transglutaminases and Protein Crosslinking Reactions, Ferrara, Olaszország, 2002. *Minerva Biotechnologica* 2002; **14**(2)

Király R, Demenyi T, Korponay-Szabo IR, Fésüs L: Effect of coeliac autoantibodies on the enzymatic activity of tissue transglutaminase. 7th International Conference on Transglutaminases and Protein Crosslinking Reactions, Ferrara, Olaszország, 2002. *Minerva Biotechnologica* 2002; **14**(2)

Király R, Deményi T, Korponay-Szabó IR, Fésüs L. Coeliakiás autoantitestek hatása a szöveti transzglutamináz enzimaktivitására. A Magyar Biokémia Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya 7. Munkaértekezlete, Keszthely, 2002.

Király R, Csósz É, Keresztessy Z, Fésüs L. A humán szöveti transzglutamináz Ca²⁺-kötő helyeinek felderítése irányított mutagenézis alkalmazásával. A Magyar Biokémia Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya 9. Munkaértekezlete, Sopron, 2004.

Király R, Vecsei Z, Deményi T, Korponay-Szabó IR and Fésüs L. Coeliac autoantibodies can enhance transamidating and inhibit GTPase activity of tissue transglutaminase. 30th FEBS Congress and 9th IUBMB Conference Budapest, 2005. *FEBS Journal* 2005; 272, Suppl 1: 411.

Király R, Csoz E, Keresztessy Z, Fésüs L: An attempt to identify the Ca²⁺-binding sites of human tissue transglutaminase using site directed mutagenesis. 8th International Conference on Protein Crosslinking and Transglutaminases, Lübeck, Németország, 2005.

Király R, Csoz E, Kurtan T, Keresztessy Z, Fésüs L: Kísérlet a humán szöveti transzglutamináz Ca²⁺-kötő helyeinek felderítésére irányított mutagenézis alkalmazásával. Előadás a Magyar Biokémia Egyesület Vándorgyűlésén. Pécs, 2006.

Király R, Csoz E, Kurtan T, Keresztessy Z, Fésüs L: Ca²⁺-binding sites of transglutaminase 2 revealed by site directed mutagenesis. 32th FEBS Congress, Bécs, Ausztria, 2007. *FEBS Journal* 2007; 274, Suppl 1: 167.

Király R, Csoz E, Kurtan T, Keresztessy Z, Fésüs L: Ca²⁺-binding sites of transglutaminase 2 revealed by site directed mutagenesis. 9th International Conference on Protein Crosslinking and Transglutaminases, Marrakech, Marokkó, 2007.

Vecsei Z, Király R, Korponay-Szabó IR, Csósz É, Mäki M, Fésüs L: Calreticulin can mask the coeliac epitopes of transglutaminase 2. 8th International Conference on Protein Crosslinking and Transglutaminases, Lübeck, Németország, 2005.

Vecsei Zs, Király R, Bagossi P, Korponay-Szabó IR, Fésüs L. A transzglutamináz 2 coeliákia epitópjainak vizsgálata. Magyar Biokémia Egyesület Vándorgyűlése. Pécs, 2006.

Korponay-Szabó IR, Vecsei Z, Király R, Dahlbom I, Mäki M. Homology of deamidated gliadin peptides and tissue transglutaminase. 40th annual meeting of ESPGHAN, Barcelona, Spanyolország, 2007.

Vecsei Z, Király R, Bagossi P, Fésüs L, Korponay-Szabó IR: Investigation of coeliac epitopes of transglutaminase 2. 32th FEBS Congress, Bécs, Ausztria, 2007. *FEBS Journal* 2007; 274, Suppl 1: 263.

Vecsei Zs, Király R., Bagossi P., Fésüs L., Korponay-Szabó IR. A transzglutamináz 2 coeliákia epitópjainak vizsgálata. Magyar Biokémia Egyesület Vándorgyűlése, Debrecen, 2007.

Vecsei Z, Király R, Bagossi P, Fésüs L, Korponay-Szabó IR: Investigation of coeliac epitopes of transglutaminase 2. 9th International Conference on Protein Crosslinking and Transglutaminases, Marrakech, Marokkó, 2007.

Korponay-Szabo IR, Vecsei Z, Király R, Nemes E, Dahlbom I, Fesus L, Maki M. Homology of deamidated gliadin peptides and tissue transglutaminase. International Celiac Disease Meeting, Maribor, 2007. In Dolinsek J, Ornik T [Ed] Proceedings of the International Celiac Disease Meeting, Maribor (Slovenia) 13-16 September 2007; University Medical Center, 2007. Page 163.

Korponay-Szabó IR, Vecsei Z, Király R, Dahlbom I, Mäki M. Homology of deamidated gliadin peptides and tissue transglutaminase. 40th Annual Meeting of the ESPGHAN, Barcelona, Spanyolország, 2007. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, <http://www.espghan2007.org/PG05-04>

Korponay-Szabo IR, Kovacs J, Kiraly R, Nemes E, Mäki M. High efficiency of gluten-dependent transglutaminase-specific intestinal IgA deposits as candidate diagnostic criteria in coeliac disease. „15th United European Gastroenterology week” Parizs, Franciaország, 2007. *Gut* 2007;56:(Suppl III) A109.

Korponay-Szabo IR, Vecsei Z, Kiraly R, Nemes E, Dahlbom I, Fesus L, Mäki M. Homology of deamidated gliadin peptides and tissue transglutaminase. „15th United European Gastroenterology week”, Párizs, Franciaország, 2007.