

**A COELIÁKIÁS ANTITESTEK TRANSZGLUTAMINÁZ 2
EPITÓPJAINAK SZERKEZETI VIZSGÁLATA ÉS
KLINIKAI JELENTŐSÉGE**

SIMON-VECSEI ZSÓFIA

TÉMAVEZETŐ: DR. KORPONAY-SZABÓ ILMA



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIAI DOKTORI ISKOLA

DEBRECEN, 2011

1. BEVEZETÉS

A coeliákia klinikai jellemzői

A coeliákia szisztémás autoimmun betegség, melynek kiváltó faktorai a búza, a rozs és az árpa fehérjéi. A genetikailag fogékony egyénekben ezen gluténnek nevezett fehérje frakció krónikus vékonybélgyulladást, bélboholy atrófiát és a 2-es típusú transzzglutamináz enzim (TG2) elleni antitestek termelődését idézi elő.

Európában és az Amerikai Egyesült Államokban a betegség prevalenciája 1%-ra tehető. A coeliákia egy genetikailag meghatározott betegség, nagyfokú családi halmozódással. A betegséggel legszorosabb kapcsolatot HLA allélek mutatnak, elsősorban a DQ2, kisebb mértékben a DQ8. A DQ2 és DQ8 az egészséges populációban is általánosan megtalálható, ami arra enged következtetni, hogy ezen HLA genotípusok szükségesek, de önmagukban nem elégségesek a betegség kialakulásához, és más gének is szerepet játszanak a coeliákia patogenezisében.

A coeliákia klinikai megjelenési formái változatosak: gyermekek esetében hasmenés, puffadás, a gyarapodás elmaradása jellemzőek, míg a felnőttek esetén leggyakrabban krónikus hasmenés figyelhető meg hasi fájdalommal, gyengeséggel és felszívódási zavarokkal. A betegek egy része tünetmentes (csendes coeliákia), de ezen esetekben is jelen lehet a bélben nyálkahártya-károsodás, ami a gluténmentes diéta bevezetésével visszafordítható. A látens coeliakiások normál bélboholy-szerkezettel rendelkeznek, azonban a betegség előrehaladtával villus atrófia és kriptá hiperplázia alakulhat ki a vékonybélben.

A dermatitis herpetiformis a coeliákia legismertebb vékonybél kívüli megjelenési formája, papulovezikuláris bőrkárosodással és transzzglutamináz 3 ellenes IgA típusú antitest-lerakódásokkal a dermális papillákban. Bizonyos neurológiai betegségek –pl. glutén ataxia-, illetve számos más autoimmun betegség, mint pl. I. típusú diabetes mellitus, autoimmun pajzsmirigy betegségek és Sjögren szindróma szintén a coeliákia társuló jelenségei lehetnek. A tünetek hiánya vagy atipikus volta miatt a betegség sok esetben diagnosztizálatlan marad, ami Non-Hodgkin limfóma, enteropátiával társult T-sejtes limfóma és vékonybél adenocarcinóma kialakulásához vezethet.

A coeliákia diagnosztikus kritériumait az Európai Gyermekegyesület Gyermek-Gastroenterológiai, Hepatológiai és Táplálkozástudományi Társaság (European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition, ESPGHAN) állapította meg 1970-ben, amely három vékonybél biopsziát írt elő. 1990-ben módosították ezeket a kritériumokat; eszerint egy biopszia, és annak kóros eredménye esetén a gluténmentes diétára történő javulás elégséges a coeliákia diagnosztizálásához. A 2011-ben megfo-

galmazott új ESPGHAN állásfoglalás szerint a vékonybél biopszia nem szükséges olyan gyermekek esetében, akik jellegzetes coeliákias tünetekkel, magas TG2-, valamint endomysium-ellenes szérumszinttel, illetve HLA DQ2-vel vagy DQ8-al rendelkeznek. A szerológiai vizsgálatok fontos szerepet töltenek be a coeliákia diagnosztikájában; első vizsgálatként a TG2 ellenes IgA típusú antitestek detektálása javasolt. A rendelkezésre álló ELISA tesztek érzékenysége 97%, míg specifitása 90%, ha az antitesteket detektáló kit alapjául humán TG2 szolgál. Ennek ellenére sok tanulmány fals negatív és fals pozitív eredményekről számol be. A diagnosztikában széleskörűen használt endomysium-ellenes IgA antitest (EMA) kimutatási módszer, mely a coeliákias antitesteket természetes TG2-t tartalmazó szövetmetszeteken mutatja ki, majdnem 100%-osan specifikus a coeliákia diagnózisában. Az antitestek kimutatását indirekt immunfluoreszcenciával végzik, humán köldökzsinórt használva antigénként. Nemrégiben új, deamidált gliadin peptidek ellen termelődött antitesteket kimutató tesztet vezettek be, 94%-os diagnosztikus hatásfokkal.

Mai tudásunk szerint a coeliákia egyetlen elfogadott terápiás lehetősége a gluténmentes diéta, melylyel az autoimmun reakció leállítható, és amelyet a coeliákias betegeknek életük végéig tartaniuk kell. A szigorú gluténmentes diéta a búza, a rozs és az árpa teljes megvonását jelenti az étrendből, amely a betegek életmódját és szociális aktivitását jelentősen befolyásolhatja. Mindezek miatt egyre nagyobb igény van alternatív terápiás lehetőségekre.

Molekuláris mechanizmusok a coeliákia patogenezisében

A coeliákia patogenezisében környezeti, genetikai és immunológiai tényezők is szerepet játszanak. A betegség kiváltó oka a glutén, amely aktiválja az innate és az adaptív immunrendszert, és így nyálkahártya károsodáshoz és gliadin-, valamint TG2-ellenes antitestek termelődéséhez vezet. Érdekes módon, ha a beteg nem fogyaszt glutént, a TG2-ellenes antitestek termelődése is megszűnik, bár maga a TG2 még mindig jelen van a szervezetben.

A lamina propria-ba belépő gliadin peptideket az antigénprezentáló sejtek feldolgozzák és HLA DQ2 és DQ8 molekulájukhoz kapcsoltnak bemutatják a glutén-specifikus CD4+ T sejteknek. A gliadin peptidek glutamin oldalláncait a TG2 deamidálja, ezek a deamidált peptidek (DGP) erősebben kötődnek a HLA DQ2 vagy DQ8 molekulákhoz, és erőteljesebb immunválaszt váltanak ki. A CD4+ sejtek proinflammatorikus citokineket termelnek, amelyek stimulálják a fibroblasztok és citotoxikus T sejtek mátrix metalloproteináz termelését. Ezen folyamatok végül bélbolygó atrofiahoz vezetnek. A glutén-specifikus CD4+ T sejtek aktiválódása a glutén-specifikus B-sejtek klonális expanzióját és a glutén-specifikus antitest-termelés megindulását vonja maga után, míg a TG2-

specifikus B sejtek valószínűleg intermolekuláris segítséggel aktiválódnak ugyanazon T sejtek által. Azonban a TG2 ellenes antitestek termelődésének pontos folyamata még nem tisztázott.

Az autoantitestek patológiás hatásai

Számos nemrégiben megjelent közlemény eredményei támasztják alá azt, hogy a vérben keringő és a szövetekben lerakódott TG2-ellenes autoantitesteknek szerepük lehet a coeliákia patogenezisében. A coeliákias IgA antitestek gátolják a bél epitél sejteinek differenciálódását, ugyanakkor előidéznek ezen sejtek proliferációját, és specifikusan növelik a gliadin peptidek epitheliumon történő átjutását *in vitro*. Az autoantitestek aktiválják a monocitákat a toll-like receptor 4-hez kötődve, indukálják a monocita-mediált citotoxicitást, így közvetve szövetkárosodást okoznak. A coeliákia-specifikus IgA antitestek gátolják az érképződés kezdeti lépéseit *in vitro* humán köldökzsinór véna endotél sejt kultúrában (human umbilical vein endothelial cell, HUVEC), és növelik az erek átjárhatóságát a makromolekulák és limfociták számára.

Mivel a TG2 fontos szerepet játszik a coeliákia patogenezisében, és a TG2-ellenes antitestek az antigénjükhöz kötődve megtalálhatók a bélben és más szervekben is, fontos kérdés, hogy ezen antitestek hogyan befolyásolják az enzim aktivitását. Az irodalomban ellentmondó adatok találhatók; gátló, részlegesen gátló és aktiváló hatású antitesteket is leírtak már. Az eredmények az aktivitásmérési reakciók környezetétől és a használt szubsztrátok tulajdonságaitól is jelentősen függték. Korábbi vizsgálatainkban úgy találtuk, hogy a coeliákias antitestek képesek kötődni a TG2-höz akkor is, ha az enzim az aktív helyén egy inhibitor molekulát köt.

Transzglutamináz 2

A TG2 az egész emberi testben előforduló enzim, fő biokémiai funkciói: keresztkötések képzése a fehérjékhez kötött γ -glutamil és más fehérjék lizin oldalláncai között, amin inkorporáció, deamidálás, guanin nukleotidok kötése és GTP hidrolízis (GTPáz, G fehérje funkció). Az enzim Ca^{2+} -dependens módon működik, intracelluláris lokalizációja, de megtalálható a sejtmagban, illetve a sejt felszínen –fibronektinhez és integrinekhez kötve- is. Ezen sejt felszíni molekuláris interakciók befolyásolják a sejtek adhézióját és mozgását. A TG2 részt vesz az apoptózisban, a sebgyógyulásban, az érképződésben, a sejtek differenciálódásában, a fagocitózisban, illetve az extracelluláris mátrix fehérjeinek összeépülésében és stabilizálásában.

A TG2 76-kDa nagyságú, 687 aminosavból álló protein. Az enzimet strukturálisan 4 domén alkotja: egy N-terminális β -szendvics - fibronektin- és integrin-kötőhellyel –, egy katalitikus, core-domén – a katalitikus triádot tartalmazza (Cys²⁷⁷, His³³⁵, Asp³⁵⁸ aminosavak), és két, C-terminális β -hordó, a másodikon található a foszfolipáz C kötőhely. Az enzimnek két kristályosított formáját vizsgálták, az egyik GDP-kötött, és inaktív, „zárt” konformációt mutat, a szubsztráttal analóg inhibitorral komplexben kristályosított forma azonban „nyitott” konformációjú. A GDP kötött forma alapján a GDP kötőhely a katalitikus, core domén és az első β -hordó közötti „hasadékban” található, míg az enzim hat Ca^{2+} -kötőhelyét korábban munkacsoportunk azonosította. Az S1 az „erős” Ca^{2+} -kötőhely (229-233. aminosavak), míg az S4 (151-158. aminosavak) és S5 (434-438. aminosavak) hely mutációi befolyásolják a coeliákias antitestek kötődését a TG2-höz.

A transzglutamináz 2 coeliákias epitópjainak térképezése

A TG2 epitópokat számos munkacsoport vizsgálta, különféle módszerekkel, de eddig sem egyedi epitópot nem sikerült azonosítani, sem az nem tisztázódott, hogy egy vagy több ilyen epitóp létezik. A leglényegesebb következtetések az alábbiak: (I) sem a C-, sem az N-terminális része a molekulának nem nélkülözhetetlen az antitest-kötésben, de mindkettő hiánya esetén a coeliákias antitestek nem tudnak kötődni a TG2-höz; (II) a TG2 N-terminális (III) és C-terminális része is fontos lehet az epitóp felépítésében; (IV) a core domén szintén tartalmazhat egy epitópot; (V) a core domén feldarabolása megszünteti az antitest-kötődést, tehát ezen rész konformációja fontos az epitóp szempontjából. Az adatok alapján a szerzők arra a következtetésre jutottak, hogy az antitest-válasz egyénektől függően különböző, a molekula különféle helyei ellen irányulhat. Egy másik tanulmányban azt találták, hogy a katalitikus triád mutációja a coeliákias antitestek kötődésének jelentős csökkenését okozta. További kötődési vizsgálatok történtek fág-felszínen kifejezett rövid TG2 részekkel, de a coeliákias betegekből klónozott monoklonális antitestek egyik ilyenhez sem kötődtek. Így lehetséges, hogy az enzim konformációja fontos a coeliákias epitóp kialakításában.

2. CÉLKITŰZÉSEK

1. Célul tűztük ki a TG2 molekula coeliákiás antitest-kötőhelyének pontos meghatározását molekuláris modellezéssel és hely-specifikus mutációkkal. Arra is kerestük a választ, hogy van-e coeliákia-specifikus kötőhely a TG2 enzim felszínén.
2. Céljaink között szerepelt különböző betegcsoportokból, különböző életkorú betegekből származó és a szövetekből izolált antitestek kötődési sajátosságainak összehasonlítása, és ennek alapján a klinikai szempontból lényeges, biológiailag aktív antitestek azonosítása.
3. További célunk volt annak megállapítása, hogy az azonosított TG2 epitópok részt vesznek-e a coeliákiás antitestek biológiai hatásainak kialakításában, mik a kötődés következményei, illetve lehet-e kötődésüket egy kötőhely-specifikus inhibitorral gátolni.
4. Vizsgálni kívántuk azt is, hogy lehetséges-e molekuláris mimikri a TG2 és a gliadin peptidek között, mely szerepet játszhat a coeliákia patogenezisében.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Betegek

A TG2 epitóp térképezéshez 216 nem kezelt és 22 kezelt, vékonybél szövettani vizsgálattal igazolt coeliákias (CD) betegből (11 hónapostól 78 évesig) származó szérummintákat használtunk. Ezek közül 11 CD betegnél az első jelentkezéskor a vékonybél boholy szerkezete megtartott volt (látens) coeliákia, a jellegzetes boholyatrófia később alakult ki. További 74 CD beteg (átlagéletkor 7 év, 1,6-tól 39,7 év tartományban) és 65 EMA negatív, ép vékonybél szerkezettel rendelkező nem coeliákias kontroll személy (átlagéletkor 13 év, 11 hónapostól 42,4 év tartományban) vett részt a DGP peptid antitestek diagnosztikai meghatározásában.

Autoimmun szérumok

Rutin klinikai szűrés során 11 TG2 ellenes antitestet tartalmazó szérummintát találtunk olyan nem coeliákias, felnőtt betegnél, akiknek más diagnosztizált betegségük volt: szisztémás lupus erythematosus (n=3), reumatoid arthritis (n=2) vagy Sjögren szindróma (n=6). Egy betegnek sem volt coeliákiára utaló gyomor-bél tünete, szérum endomysium vagy deamidált gliadin peptid ellenes antistest. A humán rekombináns TG2-vel való reaktivitást két különböző rekombináns TG2 fehérjével is megerősítettük.

A rekombináns TG2 termeltetése és tisztítása

pET-30 Ek/LIC vectorban lévő teljes hosszúságú human N-terminálison His-taggal ellátott TG2-t (1-687 aminosav) Rosetta 2 *E. coli* sejtekben termeltettük. A TG2 mutánsokat a QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit segítségével állítottuk elő. A TG2 domén hiányos mutánsokat a rendelkezésünkre álló pcDNS 3.1/myc-His emlős expressziós vektorból történő átklónozással hoztuk létre, amely a következő TG2 szerkezeti domén kombinációkat tartalmazta: A/ I+II+III (1-584. aminosav), B/ I+II+IV (1-471. és 585-687. aminosav), C/ II+III+IV (139-687. aminosav), D/ I+III+IV (1-138. és 472-687. aminosav) és E/His tag magában az enzim szekvencia nélkül. A mutánsok szekvenciáját DNS szekvenálással ellenőriztük ABI PRIM® 3100-Avant Genetic Analyzer segítségével.

A Rosetta 2 sejteket vad típusú és mutáns TG2-t tartalmazó expressziós vektorokkal transzformáltuk és 37°C-on LB folyadékban 0.6-0.8 OD₆₀₀-ig növesztettük. A sejteket 0.3 mM izopropil β-D-

tiogalaktozid jelenlétében növesztettük, majd begyűjtöttük és lízis pufferben szuszpendáltuk. A lízist és centrifugálást követően a felülúszókat ProBond Ni-NTA gyantára vittük fel és a gyártó utasításainak megfelelően tisztítottuk. Az imidazolos elúciót követően a fehérje frakciókat koncentráltuk és további vizsgálatokhoz használtuk.

Transzglutamináz és GTP-áz aktivitás mérése

A transzglutamináz aktivitást mikrotiter plate-en 5-(biotinamido) pentilaminnak immobilizált *N,N*-dimetil-kazeinbe való beépülésén alapuló módszerrel határoztuk meg, míg a GTP-áz aktivitást aktív szín módszerrel mértük.

Molekuláris modellezés

A teljes hosszúságú TG2 modellezéséhez a humán TG2 (PDB kód: 1KV3) és TG3 (PDB kód: 1VJJ) kristályszerkezeteket használtuk. A homológ modellt a Modeller program templát funkcióját használva építettük fel. A grafikai analízis Silicon Graphics Fuel állomáson történt Sybyl programcsomag –Bagossi Péter segítségével- és VMD felhasználásával.

Anti-TG2 ELISA

Mikrotitráló lemezre vajúlatonként 100 μ L 5mM CaCl_2 -t tartalmazó tris-pufferelt sóoldatban (Ca-TBS, pH 7.4) 0,6 μ g TG2-t vittünk fel. Amikor a denaturált TG2-t vizsgáltuk, a TBS-hez 8 M ureát vagy 6 M Guanidin-HCl-t adtunk a TG2 kitapasztása során. Ez után a lemezeket 3-szor mostuk 0,1 % (v/v) Tween 20-t és 10 mM EDTA tartalmú TBS-sel (TTBS+EDTA). Minden antitestet TTBS+EDTA-ban hígítottunk. A szérum mintákat, a betegek vékonybeléből klónozott variábilis egyláncú antitesteket (ScFv) és a monoklonális antitesteket (TG100, CUB7402, 895, 4G3; G92; H23) egy óráig inkubáltuk a lemezen, szobahőmérsékleten. Inkubálás után a lemezeket mostuk és további egy óráig inkubáltuk szobahőmérsékleten tormaperoxidáz konjugált, nyúl anti-humán IgA vagy IgG antitestekkel vagy az ScFv C-terminális végén lévő SV5 jelölést felismerő monoklonális antitesttel, amelyet peroxidáz konjugált anti-egér IgG-vel történő inkubálás követett. A színreakciót 100 μ L 3,3',5,5' tetrametilbenzidin szubsztrát adásával, majd 50 μ L 1 N H_2SO_4 hozzáadásával történt leállítást után 450 nm-en detektáltuk.

A TG100 anti-TG2 antitest három koncentrációjával hígítási görbét készítettünk minden mutáns esetben és a többi antitest kötődését 4 paraméteres illesztéssel számoltuk ki úgy, hogy a vad típusú TG2 kötését 100 %-nak tekintettük.

Fibronectin-TG2 ELISA

Mikrotitráló lemezre 0,3 mg humán fibronectint (FBN) tapasztottunk ki bikarbonát pufferben, pH 9,6, egy órán át szobahőmérsékleten. A lemezeket 0,8 µg TG2-vel inkubáltuk 5 mM CaCl₂ és 0,1% (v/v) Tween 20-at tartalmazó TBS-ben majd a folyamat innentől megegyezik a fentiekben leírtakkal.

Kompetíciós ELISA módszer

Mikrotitráló lemezre 100 µL 5mM CaCl₂-t tartalmazó tris-pufferelt sóoldatban (pH 7,4) 0,6 µg vad típusú TG2-t vittünk fel. Ezután a vajúlatokba M13 fág konjugált ScFvs és növekvő mennyiségű szolúbilis ScFvs keverékét adtuk és a kötődött fág-ScFvs-t peroxidáz konjugált anti-M13 fág antitesttel detektáltuk. Más kísérletekben a lyukakat coeliákias szérummal és növekvő mennyiségű tisztított totál coeliákias IgG antitestekkel inkubáltuk és az IgA és IgG antitestek kötődését mértük. A kompetíciós ELISA-kat coeliákias szérumokkal is elvégeztük, úgy hogy növekvő mennyiségű (18 µg-ig) monoklonális egér antitesteket (885, CUB7402 és H23) adtunk a well-ekbe és a kötődött IgA-t mértük.

IgG és IgA tisztítás

A kompetíciós kísérletekhez az IgG antitesteket Protein G konjugált Sepharose gyöngyökkel, míg az IgA antitesteket anti-humán IgA (α-lánc specifikus)-agaróz segítségével tisztítottuk coeliákias és egészséges kontroll szérummintákból a gyártó leírásának megfelelően.

Immunfluoreszcencia

A betegek szöveteinek nem fixált fagyasztott metszeteit fluoreszcein-izotiocianát-(FITC)-konjugált anti-humán IgA vagy IgG antitestekkel inkubáltuk. Ezeket a festéseket kombináltuk is anti-TG2

monoklonális antitest (CUB7402 és 885) jelölésekkel is. Második antitestként Alexa 594 konjugált anti-egér antitestet használtunk. A metszeteken végzett kompetíciós vizsgálatokban TG2 specifikus monoklonális antitestet adtunk a szövethez 30 percig foszfát pufferelt sóoldatban (PBS) és ezt követően az inkubációs oldatot összegyűjtöttük és ELISA módszerrel mértük az IgA antitestek koncentrációját.

IgA antitestek elúciója szövetmetszetekről

A nem fixált fagyasztott metszeteket kétszer mostuk PBS-el, majd elúciós pufferrel (0,25% klóracetát 0,2 M/L NaCl oldatban, pH 2,7) inkubáltuk 20 percig. Az eluátumot 1 M/L imidazzollal semlegesítettük, majd 10K-os koncentrátorcsővel koncentráltuk, a puffert PBS-re cseréltük.

Humán köldökszinór véna endotél sejtek (HUVEC) izolálása és vizsgálata

A HUVEC sejtek izolálása és tenyésztése standard technikákkal történt. A HUVEC sejteket Matrigel-el kevertük össze, majd 24 lyukú lemezen növesztettük EGM1 teljes endotél tápfolyadékban, amely 2% főtális borjúsérumot tartalmazott 1 ug/well 885 monoklonális antitesttel kombinálva, vagy a nélkül. 4 óra elteltével 1 ug/well tisztított coeliákiás vagy kontroll IgA-t adtunk a sejtekhez. További 24 óra elteltével 10 felvételt készítettünk minden lyukról, majd a képződött endotél tubulusok hosszát Image J szoftverrel elemeztük. Az eredmények értékelésénél az antitestek nélküli tubusok hosszának geometriai átlagát tekintettük referenciának, és ennek százalékában ábrázoltuk a tubulusok hosszának mediánját 95% konfidencia intervallummal. Egyes vizsgálatokban a HUVEC sejteket I-es típusú kollagénnre tettük, a vizsgált antitestekkel együtt, vagy nélkülük, és 24 órán át növesztettük. A sejthosszakat az előbb leírt módon értékeltük az Image J szoftverrel. Ezen kísérleteket kollaborátorunk, Sergio Caja végezte Tamperében, Finnországban.

DGP-ELISA

A DGP-vel reagáló antitesteket Quanta Lite™ Celiac DGP Screen teszt kittel vizsgáltuk a gyártó utasításainak megfelelően. A kit ELISA plate-re kitapasztott deamidált gliadin peptideket tartalmaz, illetve mind IgA, mind IgG típusú humán antitesteket felismerő tomaperoxidázal (HRP) kapcsolt konjugátumot. Ugyanezen plate-ket egér monoklonális TG2-specifikus antitestekkel is reagáltattuk,

melyeket HRP kapcsolt anti-egér antitestekkel ismertünk fel, majd a reakciót az Anti-TG2 ELISA fejezetben leírt módon detektáltuk.

DGP ELISA-val végzett kompetíciós mérések

A monoklonális TG2-specifikus antitesteket humán rekombináns TG2 konstrukciók vagy coeliákias betegszérumok növekvő koncentrációjával együtt adtuk a DGP-ELISA kithez. A TG2 szekvenciáját nem, csak His-tag-et tartalmazó konstrukciót használtuk negatív kontrollként. A vak OD450 értékét tekintettük 100% gátlásnak, míg a hozzáadott TG2 konstrukciók vagy coeliákias szérumok nélküli jelet 0% gátlásnak definiáltuk.

Statisztikai analízis

Az ELISA eredményeket GraphPad Prism és STATISTICA szoftverrel elemeztük. Az antitestek mutáns TG2-höz való kötődését ANOVA varianciaanalízissel és azt követő Dunnett Multiple, illetve Tukey utó-teszttel vagy Kruskal-Wallis teszttel és Dunn összehasonlító utó-teszttel végeztük. A $p < 0,05$ értéket tekintettük szignifikánsnak.

4. EREDMÉNYEK

A transzglutamináz 2 coeliákiás epitópja(i) konformációs(ak)

Korábbi irodalmi adatok alapján a TG2 coeliákiás epitópjairól megállapítható, hogy azok „elszór-tan” helyezkednek el a TG2 molekulán, és az enzim számos része részt vehet az epitóp(ok) felépítésében. A coeliákiás antitestek nem vagy nagyon rosszul kötődnek a TG2 enzimhez SDS gélelektroforézist követő Western blot vizsgálatokban, mely folyamatban a TG2 háromdimenziós szerkezete sérül. Mivel az enzim ép konformációja szükséges az antitestek kötődéséhez, az epitópok konformációs jellegűek is lehetnek.

Annak megállapítására, hogy a poliklonális coeliákiás szérum antitestek lineáris vagy konformációs epitóp(ok)hoz kötődnek, a kötődést kaotróp, az enzimet denaturáló ágensekkel (guanidin-hidroklorid és urea), valamint CaCl_2 -al kezelt TG2 esetében vizsgáltuk ELISA módszerrel. A coeliákiás IgA antitestek nem voltak képesek a denaturált TG2-höz kötődni, míg a lineáris epitóppal rendelkező TG2 ellenes egér monoklonális TG100 antitest kötődött ezen formájú antigénhez is. A CaCl_2 jelenlétében kitapasztolt TG2-höz mindkét típusú antitest kötődött. Az eredmény alapján feltételezhető, hogy a coeliákiás antitestek konformációs epitóp(ok)hoz kötődnek, és nem lineáris szekvenciákat ismernek fel.

A coeliákiás epitóp áll a TG2 Ca^{2+} -kötőhelyeivel kapcsolatos

Korábbi munkánk során a TG2 két, a core doménen lehelyezkedő Ca^{2+} -kötőhelyét azonosítottuk, amelyek részt vehetnek a coeliákiás antitestek kötődésében: Site4 kötőhely (S4, 151-158. aminosavak) és Site5 kötőhely (S5, 433-438. aminosavak). Az S4 hely a TG2 core doménjának első alfa-hélixén található, melyhez relatíve közel helyezkedik el az S5 hely. A teljes S4 hely mutációja esetén a coeliákiás antitestek kötődése $11,6 \pm 8,5\%$ -ra csökkent, ha a kötődés mértéke a vad típusú (Wt) antigénhez 100%. Ezért ebben a régióban kerestük a coeliákiás epitóp lehetséges „horgonyzó” aminosavait. Jelen munka során az alábbi aminosav-cseréket tartalmazó mutáns TG2 fehérjéket állítottunk elő: D151N, E153Q, E154Q, E155Q. A coeliákiás antitestek kötődési vizsgálata alapján a 153-as glutaminsav cseréje okozott szignifikánsan csökkent kötődést ($p < 0,0001$; medián 82,6% az E153Q esetben).

A core doménen kívül elhelyezkedő, az epitóp felépítésében részt vevő molekula-részek azonosítása

Mivel a 153-as glutamin cseréje nem szüntette meg az antitest-kötődést teljes mértékben, tovább kerestük az epitóp felépítésében részt vevő lehetséges TG2-részeket. Olyan domén deléciós mutánsokat készítettünk, ahol a TG2 egyes doménjei hiányoznak. Amikor ezen mutánsokat ekvimoláris mennyiségben alkalmaztuk a kötődési vizsgálatokban, mind az első domén (1-139. aminosav), mind a II. domén (147-460. aminosav) fontosnak bizonyult a coeliákias antitestek kötésében (medián kötődés 6,7% a II.+III.+IV. domén jelenléte esetén, 14,4% kötődés az I.+III.+IV. domén esetében). Az antitestek kötődését a IV. domén (585-687. aminosav) hiánya is befolyásolta bizonyos mértékben (medián 74,0% az I.+II.+III. domén jelenléte esetén). Ezzel szemben a coeliákias antitestek kötődését a III. domén (472-584. aminosav) elvesztése nem befolyásolta (medián 97,9%).

A transzglutamináz három különböző doménjén elhelyezkedő „horgonyzó pontok” egy összetett epitópot alkotnak, melyből kettő elegendő a coeliákias antitestek kötéséhez

A továbbiakban molekuláris modellezéssel vizsgáltuk, mely aminosavakkal képes a core doménen elhelyezkedő 153-as glutamin konformációs és funkcionális epitóp vagy epitópok kialakítására. A TG2 molekula „zárt” konformációjában az enzim N- és C-terminális része közel helyezkedik el egymáshoz, illetve a core domén felszínéhez is. A 153-as glutaminsav közel helyezkedik el a 19-es arginin oldallánchoz (I. doménen, 12,9 Å távolságban), illetve a 659-es metionin aminosavhoz a (IV. doménen, 16,8 Å távolságban). Ezen kívül a két utóbbi aminosav is közel található egymáshoz (7,7 Å), így lehetőség adódik egy közös konformációs epitóp képzésére. Így ezen aminosavakat cseréltük szerinre egyszeres mutánsokat (R=R19S; E=E153S; M=M659S), illetve ezek kombinációjából dupla mutánsokat (RE, RM, EM) és egy tripla mutánt (REM) is készítve.

A rekombináns TG2-eket hisztidin-taggal kapcsolt formában termeltettük és nikkel-affinitás kromatográfiával tisztítottuk. A fehérjéket SDS gélelektroforézissel és Western blottal, valamint funkcionális vizsgálatokkal ellenőriztük. A mutánsok antitestkötő-képességét TG2 ellenes egér monoklonális antitestekkel vizsgáltuk (CUB7402, epitóp: 447-478. aminosav; 895, epitóp: 649-687. aminosav; 4G3, epitóp: 1-165. aminosav; G92, epitóp: 1-14. aminosav és H23, epitóp: 433-438. aminosav). Az összes mutáns képes volt a különböző kötőhellyel rendelkező egér antitestek kötésére.

A mutánsok egy része (ahol az S4 Ca²⁺ kötőhely is érintett) a vad típusú enzimhez képest csökkent, de mérhető transzglutamináz aktivitást mutatott: 21%-73% (EM és RM mutáns), szemben a katalitikus domént nem tartalmazó I-III-IV mutánssal, melynek egyáltalán nem volt aktivitása. Az R mutáns 30%-al magasabb aktivitás értéket mutatott, mint a vad típusú enzim. A mutánsok GTPáz vizsgálata során az RM, EM és REM mutáns aktivitása magasabbnak bizonyult, mint a vad típusú enzimé. Az egyszeres mutánsok és a kettős mutáns RE csökkent GTPáz aktivitású volt (24-50%). Az aminosav cserék egyik mutáns fibronektin-kötő képességét sem változtatták meg. Ezen eredmények alapján elmondható, hogy a mutánsok feltekeredett szerkezettel rendelkeznek, melyet az R és RE mutáns esetében direkt módon, CD spektroszkópiával is igazoltunk.

Coeliákias autoantitestek mutáns TG2-höz való kötődését 58 gyermek és 18 felnőtt coeliákias szérummintájával vizsgáltuk. Az R, E és M egyszeres mutánsokhoz a kötődés csökkent volt (medián 26,5% az R, 28,8% az E és 56,9% az M mutáns esetén), míg a mutációk kombinálása arányosan még tovább csökkentette a kötődést. Az EM mutáns 21,7%, az RM 14,6%, míg az REM tripla mutáns 13,4% kötődést mutatott, ha a kötődés a vad TG2 enzimhez 100%. Érdekes módon a legnagyobb mértékben az RE mutáns esetében csökkent a kötődés: medián 6,6%, az alábbi tartományban: 1,1%-22,7% a coeliákias gyermekek esetében. A coeliákias felnőttek mintái azonos kötődési mintázatot, de kicsivel magasabb kötődési értékeket adtak, mint a gyermekeké.

A vizsgált szérum eredetű antitestek nagy része az azonosított epitóphoz kötődött, annak ellenére, hogy ezen antitest-populáció poliklonális. Annak a vizsgálatára, hogy termelődnek-e további, más kötőhellyel rendelkező immunglobulin molekulák, egyláncú variábilis fragmenteket (ScFv) vizsgáltunk, melyeket olasz kollaborációs partnerünk (Daniele Sblattero, Trieszti Egyetem, Trieszt, Olaszország) bocsátott rendelkezésünkre. Ezek az ScFv-k egy coeliákias beteg vékonybél-biopsziájából előállított teljes antitest könyvtárból humán TG2-vel szelektált klónok; ezen kívül monospecifikusak, csak egy kötőhellyel rendelkeznek az enzim felületén, illetve a magyartól eltérő coeliákias betegcsoportot alkotnak. 8 ScFv kötődési sajátosságait vizsgáltuk, és mindegyik esetben jelentősen csökkent kötődést tapasztaltunk, ha az RE, REM és D (I.+III.+IV. domént tartalmazza a TG2-ből) mutánsokat alkalmaztuk antigénként (átlag 13,0% az RE, 14,0% az REM és 5,4% a D mutáns esetén).

A XIII-as faktor homológ mutánsok vizsgálata

További vizsgálatok során szerettünk volna egy olyan aminosavat azonosítani, amelynek kulcssze-repe van az antitestek kötésében. Ehhez a coeliakiában nem antigén, a TG2-vel homológ véralvadási

faktort, a XIII-as faktort (fXIII) használtuk úgy, hogy az azonosított epitóp elsődleges aminosav szekvenciáját és szerkezetét összehasonlítottuk a két enzim esetében olyan eltérő aminosavat keresve, amely felelős lehet a fXIII alacsony antigenitásáért. A TG2 esetében a 154-es glutaminsavat, míg a fXIII esetében a homológ 199-es lizint azonosítottuk. Azért, hogy a fXIII-al homológ struktúrát hozzunk létre a 154-es glutaminsavat lizinre cseréltük (154K mutáns), valamint ezen cserét kombináltuk a másik két doménen levő aminosav cserékkel (E154K csere együtt az R19S és M659S cserével: RKM mutáns).

A mutánsokat Western blottal ellenőriztük, illetve enzimatis aktivitásaikat is mértük. Mindkét mutánsnak csökkent, de mérhető transzglutamináz aktivitása volt, és míg a 154K mutáns nem mutatott GTPáz aktivitást, az RKM GTPáz aktivitása 78% volt a vad TG2 enzimhez képest. Mindkét mutáns azonos mértékben kötődött a fibronectinhez, mint a vad TG2. Egy aminosav lizinre cserélése (E154K) szignifikánsan csökkentette a coeliákias szérum antitestek kötődését az anti-TG2 ELISA-ban (átlag 66,6% kötődés). A tripla mutáns RKM hasonló csökkent kötődést mutatott (átlag 22,1% kötődés), mint az REM mutáns. A felnőtt betegek antitestei ismét kissé magasabb kötődési értéket mutattak a gyerekekéhez viszonyítva.

A coeliákia epitóp hozzáférhetősége az extracelluláris mátrixban: a fibronectin-kötött TG2 mint *in vitro* modell

A coeliákias antitestek kötődését olyan rendszerben is vizsgáltuk, melyben a TG2 fibronectinhez (FBN) kötött formában van jelen. A sejtfelszínen a TG2 FBN-el és integrinokkal alkot komplexet, így a FBN-TG2 ELISA ezen körülményeket kívánja modellezni. Ezen kívül ez a módszer csak a FBN-kötött TG2-t használja antigénként, így ez egy további, ELISA plate-n történő enzim-tisztítási lépést jelent, valamint ezzel az eljárással a műanyag lemezre közvetlenül kitapasztott enzim esetleges szerkezetváltozása is elkerülhető. A coeliákias szérum antitestek hasonló kötődési mintázatot mutattak, mint a direkt plate-re kötött enzimek esetében. Az egyszeres mutáns M-hez kissé csökkent vagy kissé növekedett kötődési értékeket kaptunk (47,1%-140,8%, medián 99,6%, ha a kötődés a vad típushoz 100%). Csökkent kötődést tapasztaltunk az E és EM mutáns esetében (medián 69,9% és 69,1%), míg a csökkenés akkor volt igazán nagymértékű, ha a mutáns az R19S aminosav-cserét is tartalmazta: 40,7% volt az egyszeres mutáns R esetében, de 20% alatt volt az RE és REM mutánsoknál.

Ezek alapján valószínűsíthető, hogy a 659-es metionin egyedüli mutálása nem változtatja meg a coeliákias antitestek kötődését, és ezen „horgonyzó pont” a C-terminális (IV.) doménen nem elen-

gedhetetlenül fontos az epitóp felépítésében. Így a coeliákiás antitestek a TG2 katalitikusan aktív formájához is tudnak kötődni, amikor az enzim a „nyitott” konformációban található és a IV. domén – így a 659-es metionin is- elmozdul az első két doménhez képest. A 19-es arginin és 153-as glutaminsav egymáshoz viszonyított helyzete a TG2 „nyitott” formájú kristályszerkezetében (2Q3Z) nem mutat változást a „csukott” formához (1KV3) képest.

Különböző coeliákiás betegek antitestei ugyanannak az epitópnak a részeit ismerik fel

A coeliákiás betegekből klónozott monoklonális ScFv-k két csoportba tartoznak: vannak, amelyek felismerik az R mutánst, és vannak, amelyek nem. Azonban az összes ScFv csökkent kötődést mutatott az E (153-as glutaminsav cseréje szerinre) és a 154K (154-es glutaminsav cseréje lizinre) mutáns esetében, amely felveti a kérdést, hogy ezen ScFv-k különböző epitópokat ismernek-e fel vagy másféleképpen kötődnek ugyanahhoz az epitóphoz. Kompetíciós vizsgálatokban a plate-re kikötött Wt TG2-höz az alábbi antitest fragmenteket adtuk: fággal kapcsolt ScFv-t, amely felismerte az R mutánst, illetve növekvő mennyiségű szolubilis ScFv-t, mindkét csoportból. A vizsgálat során a ScFv-hez kapcsolt M13 fágot ismertettük fel specifikus antitesttel. A szolubilis, R mutánssal reagáló ScFv (4.1 klón) 76%-al gátolta a fág kapcsolt, R-t felismerő ScFv kötődését, és az R mutánssal nem reagáló 3.7 klón szintén képes volt 40%-os kompetícióra. Az R mutánssal nem reagáló fággal kapcsolt ScFv esetében 30%-os gátlást tapasztaltunk mindkét fajta szolubilis ScFv-el.

További kompetíciós vizsgálatokban coeliákiás betegek állandó mennyiségű szérum IgA és növekvő mennyiségű tisztított IgG típusú antitesteket adtuk a lemezre kötött vad típusú TG2 fehérjéhez, és a kötődött IgA-t és IgG-t is detektáltuk párhuzamos well-ekben. A coeliákiás szérum IgA és a tisztított coeliákiás IgG1 reagált az R mutánssal, míg a tisztított coeliákiás IgG2 nem reagált. Mindkét tisztított coeliákiás IgG kompetíciót mutatott a coeliákiás IgA-val, míg az egészséges egyénből származó –kontroll- tisztított IgG nem volt képes gátolni az coeliákiás IgA kötődését.

Az azonosított epitóp coeliákia specifikus

További vizsgálatokban összehasonlítottuk a coeliákiás szérum antitestek kötődési mintázatát egyéb autoimmun betegségben szenvedők (SLE, Sjögren's szindróma, reumatoid arthritis) TG2 ellenes szérum IgA antitestjeinek kötődésével. A nem coeliákiás antitestek eltérő antitest-kötődési mintázatot mutattak. Ezen kívül negatívnak bizonyultak antigliadin antitest ELISA, illetve endomysium antitest vizsgálatokban is, mely utóbbi módszer szövetmetszeteken detektálja a coeliákia-specifikus

TG2 ellenes antitesteket. A látens coeliákias betegek mintáinál azonban az aktív coeliákiasok antitesteihez hasonlóan csökkent kötődést tapasztaltunk az R és RE mutánsokhoz, bár ezeknek a betegek a mintavétel idején még nem volt a vékonybélben boholyatrófiája. Ezen adatok alapján elmondható, hogy a coeliakiában speciálisan irányított a TG2 elleni immunválasz és a jellegzetes epitóp kötődési mintázat felhasználható szelektív diagnosztikus tesztek kifejlesztésére.

A keringő és a coeliákias betegek szöveteihez *in vivo* kötődött antitestek epitópspecifitása azonos

A nagy aviditású coeliákias antitestek a szövetekben lerakódhatnak, és a betegek egy kis részénél nem jelennek meg a keringésben. Valószínűleg ezeknek van jelentősebb szerepük a kóros folyamatok elindításában, ezért fontosnak tartottuk megvizsgálni, hogy ezek is az általunk azonosított TG2 epitóphoz kötődnek-e. Szövetmetszetekről klóracetáttal leoldottuk a betegek IgA antitesteit, és további tisztítás után ELISA-ban vizsgáltuk azok epitópjait a fontosabb TG2 mutánsokkal. Két, szeropozitív coeliákias anyától származó méhlepényt használtunk, mindkettő nagy mennyiségben tartalmazott TG2-höz kötött anyai IgA antitesteket a deciduális részekben, illetve a chorion boholyok felületén. Ezen kívül az IgG típusú anti-TG2 antitestek lerakódtak a köldökszínórban és megjelentek az újszülött szérumban. Az újszülöttek vérében lévő IgG, és a méhlepényről leoldott IgA antitestek hasonló epitóp specifitást mutattak, mint az anyai szérum antitestek.

A 153-as glutaminsavhoz kötődő monoklonális antitestek megakadályozzák a coeliákias antitestek kötődését *in vitro*, leszorítják azokat a betegek szöveteiről, illetve kivédik azok biológiai hatásait

Vizsgálataink során találtunk egy olyan egérben termeltetett monoklonális TG2 ellenes antitest klónt (MAb 885, Phadia, Uppsala, Svédország), amelynek kötődésében a 153-as glutaminsav, a coeliákias epitóp egy része játszik szerepet. Ha a humán vad típusú TG2-t három különböző coeliákias szérummintával MAb 885 jelenlétében inkubáltuk, a poliklonális IgA 6,9-10,1%-a tudott csak kötődni. Azonos mennyiségű, más epitóppal rendelkező monoklonális anti-TG2 antitestek (MAb TG100, CUB7402 vagy H23) nem mutattak hasonló interferáló hatást. Ezen kívül hat coeliákias beteg IgA kötődését a MAb 885 szelektíven megakadályozta (maradék kötődés 14,8%, ha a MAb 885 nélküli kötődés 100%), míg hat, más autoimmun betegségben szenvedő beteg nem coeliákias IgA antitestei MAb 885 jelenlétében is kötődtek a vad típusú TG2-höz (maradék kötődés 82,8%).

A továbbiakban kompetíciós kísérleteket végeztünk MAb 885-el és kontroll monoklonális antitestekkel (MAbs) olyan coeliákiás méhlepény metszeteken, amelyek lerakódott IgA antitesteket tartalmaztak. A MAb 885 képes volt kötődni a szövetmetszetekre, és ezt a kötődés detektálható volt az extracelluláris TG2 mentén, ugyanekkor az eredetileg szövetekhez kötött IgA-t már nem a szöveteken, hanem a pufferben lehetett detektálni. Izotípus kontroll antitesttel, más epitóp specifikus (CUB7402) monoklonális anti-TG2 antitesttel, vagy csak pufferrel történő inkubálás esetén az *in vivo* kötődött TG2 ellenes IgA antitestek változatlanul a szövetekhez kötődve maradtak.

A MAb 885 TG2 enzimre gyakorolt biológiai hatásait is vizsgáltuk mikrotiter plate módszerrel. Korábbi eredményeinkhez hasonlóan a coeliákiás antitestek növelték (150,4% aktivitás, ha a vad TG2 antitest nélküli aktivitása 100%), míg a MAb CUB7402 és TG100 gátolta az enzim katalitikus aktivitását (5,6% és 21,6% aktivitás). A MAb 885 szignifikánsan nem változtatta meg az enzim aktivitását (89,6%), ha azonos antitest koncentrációt használtunk (5 µg/ml), mint a többi MAb esetében.

A MAb 885 hatását ezen kívül angiogenezis vizsgálatokban is tanulmányoztuk. Coeliákiás betegek, nem-coeliákiás autoimmun betegek, valamint egészséges kontroll szérumból tisztított IgA frakciókat adtunk a matrigel-en növesztett HUVEC sejtekhez MAb 885 jelenlétében vagy a nélkül. Az autoimmun betegek, nem coeliákiás anti-TG2 antitestek, valamint a TG2 ellenes antitesteket nem tartalmazó kontroll IgA-k csupán kis mértékben, nem specifikusan csökkentették az endotél tubulus képződést (medián 83,1% és 81,3%, ha az antitestek nélküli tubulus hossz 100%). Azonban a coeliákiás IgA antitestek szignifikánsan csökkentették a tubulusok hosszát (medián 43,7%, $p < 0,001$ az autoimmun betegekhez képest) és számát. Ezt a hatást a MAb 885 megakadályozta: statisztikailag nem volt különbség a tubulusok hossza között egészséges kontroll IgA-k jelenlétében, illetve ha a coeliákiás IgA-kat együtt alkalmaztuk a MAb 885-el.

Szerkezeti hasonlóság az azonosított TG2 epitóp és a HLA-DQ-dokolt gliadin peptid között

Eredményeink alapján elmondható, hogy a coeliákiás antitestek nagy része egy specifikus epitóphoz kötődik, így felvetődik a kérdés, mindez hogyan segíti a betegség patogenezisének feltárását. A coeliákia kiváltó faktora a gliadin, amely aktiválja a beteg immunrendszerét, és antitest-termelést eredményez egy saját fehérje, a TG2 ellen. Így azt szeretnénk volna vizsgálni, van-e szerkezeti hasonlóság a gliadin és a TG2 között. Habár oldatban a gliadin peptidok rendezetlen szerkezettel rendelkeznek, egy immunogén gliadin peptid (LQFPQPPELPY) kristályszerkezete ismert olyan formában,

amint a gliadin a HLA-DQ2 antigénköti zsebébe dokkolt (pdb: 1S9V). Ebben a komplexben a gliadin peptid 6-os glutamin (Gln6), 8-as glutaminsav (Glu8) és 9-es leucin aminosavai lépnek kölcsönhatásba a HLA-DQ2 antigénköti zsebének aminosavaival. A Gln6 és Glu8 oldalláncainak szénatomjai közötti távolság (9,84 Å), illetve azok térbeli elrendeződése hasonló a TG2 coeliákias epitópjának felépítésében szerepet játszó Glu153 és Glu154 oldalláncainak távolságához (9,36 Å) és elhelyezkedéséhez. Ugyanígy a Glu8 és Leu9 közötti távolság a gliadin peptid esetében hasonló a TG2 Glu154 és Val431 aminosavak között levőkkel. Ha a két molekula szerkezetét egymásra vetítjük, ezen oldalláncok helyzete átfedést mutat.

A DGP antigén vizsgálata nem coeliákias monoklonális TG2-specifikus antitestekkel

A TG2- és gliadin-epitópok közötti lehetséges hasonlóság további vizsgálatára 74 EMA-pozitív nem kezelt coeliákias beteg szérumbintáját analizáltuk Celikey (Phadia, Freiburg, Germany; TG2 ellenes antitesteket detektál) és a Celiac DGP Screen (Inova Diagnostics, San Diego, CA; deamidált gliadin peptideket (DGP) használ antigénként) tesztekkel. Minden vizsgált minta pozitív volt mind TG2 és DGP ellenes antitestekre is.

Ez után azt vizsgáltuk, hogy a DGP teszt egyes antigénjei mutatnak-e hasonlóságot a TG2-vel, és így felismertethetők-e más, nem coeliákias TG2-specifikus antitestekkel. 13 különböző egér monoklonális TG2 ellenes antitestet teszteltünk, amelyeknek –korábbi mérések alapján– különböző kötőhelyei vannak a TG2 különböző doménjein. A DGP tesztben történő alkalmazás során három antitest felismerte a DGP antigént. A MAb1-nek lineáris kötőhelye van a TG2 core doménjén, míg a MAb2 (637-648. aminosavak) és MAb3 (649-687. aminosavak) epitópjai a C-terminális doménen találhatók. Mivel a három keresztreagáló monoklonális antitest különböző kötőhellyel rendelkezik a TG2-n, ez arra utal, hogy a DGP-n több olyan epitóp van, amely hasonlít a TG2-re.

A TG2 és a DGP között kompetíció vizsgálata az antitest-kötés szempontjából

A továbbiakban arra kerestük a választ, hogy a három TG2 ellenes MAb kötődése specifikus-e a DGP-hez, illetve lehet-e ezt a kötődést a TG2-vel, vagy annak fragmentjeivel gátolni. Szolubilis teljes hosszú rekombináns TG2 jelenlétében a MAb1, MAb2 és MAb3 DGP-hez kötődése teljes mértékben gátolható volt, és a gátlás dóziszfüggő módon történt. Az üres His-konstrukció és a monoklonális antitestek kötőhelyeit nem tartalmazó deléciós domén-mutáns TG2 konstrukciók nem gátolták a kötődést, amely arra enged következtetni, hogy a kötődés specifikus volt arra a TG2

szekvenciára, amelyhez az antitestek kötődnek. A coeliákias szérumban antitestek DGP-hez történő kötődését sem a teljes hosszú rekombináns TG2, sem a MAb-ek nem tudták gátolni, amely arra utal, hogy vannak olyan coeliákias IgA klónok, amelyek a TG2-től eltérő DGP epitópokat ismernek fel, így a coeliákia patogenezise bonyolultabb, mint egy egyszerű molekuláris mimikri.

5. MEGBESZÉLÉS

A TG2 enzim a coeliákia fő autoantigénje, fontos szerepet tölt be a coeliákia patogenezisében: a gliadin peptidek deamidálásával erősíti az immunválaszt. Egyre több tudományos vizsgálat bizonyítja, hogy az autoantitesteknek lehet patogenetikai szerepe. A coeliákias betegek IgA antitestei növelik a TG2 transzamidáló aktivitását, befolyásolják az epithél sejtek transzportját, gátolják az angiogenezist, a fibroblasztokban morfológiai változásokat idéznek elő, és befolyásolják azok sejtciklusát *in vitro*. A fő coeliákias epitóp azonosítása utat nyit egy olyan specifikus kompetitor antitest előállításához, mellyel ezen folyamatok tovább vizsgálhatók, illetve az is, hogy az említett káros folyamatok gátolhatók-e, és így lehet-e terápiás felhasználási jelentőségük.

Jelen tanulmányban négy olyan aminosavat azonosítottunk, melyek együtt egy konformációs fő coeliákias epitópot alkotnak, mely 3 domén egymáshoz közeli részeiből jön létre. Az epitóp legfontosabb része a 153-as glutaminsav, valamint a mellette lévő felszín a 154-es glutaminsavval, (az enzim core (II.) domén első α -hélixének csúcsát alkotja). Ez léphet kooperációba a β -szendvics (I.) domén első α -hélixén elhelyezkedő 19-es argininnal. Az argininek gyakran vesznek részt fehérje-fehérje kölcsönhatások kialakításában és a két ellentétes töltésű aminosav a TG2 molekula olyan részén található, mely egy antitest dokkolása esetén nagy változást okoz az oldószerrel érintkező felszínben. Ez az energetikailag kedvező kötődés egyik fontos feltétele. Az epitóp felépítésében részt vehet a 659-es metionin is, amely a második β -hordó (IV.) doménen helyezkedik el. Ezen analízis alapján mutáns TG2 molekulákat állítottunk elő, és különböző coeliákias antitestek kötődését vizsgáltuk a konstrukciókhoz. Mind az IgA típusú, mind a betegekből klónozott monoklonális coeliákias antitestek kötődése szignifikánsan csökkent az RE mutáns esetében, míg további aminosav-csere (hármas mutáns) nem csökkentette tovább a kötődés mértékét. Ez arra utal, hogy az előbb említett két aminosav cseréje elegendő az antitest-kötés megszüntetéséhez. Hasonlóképpen, ha a TG2-t FBN-kötött formában alkalmaztuk, a 659-es metionin mutációja nem befolyásolta az antitestkötést. Az enzim aktivált, nyitott konformációjában a C-terminális aminosavak (mindkét β -hordó) 120 Å-el elmozdulnak, míg az Arg19 és Glu153 egymáshoz viszonyított helyzete nem változik a folyamat során. Ez arra enged következtetni, hogy az azonosított epitóp független az aktiváció során bekövetkező konformációs változástól. A következtetést támogatja az a megfigyelés is, hogy a coeliákias antitestek képesek kötődni az enzim Ca^{2+} -kötött, Ca^{2+} -nélküli, és inhibitor-kötött formájához is; utóbbi a nyitott szerkezetet reprezentálja.

Tehát eredményeink alapján elmondható, hogy a Glu153 és Arg19 elegendő a coeliákiás epitóp meghatározásához, azonban csak a Glu153 bizonyult elengedhetetlennek az antitestkötés szempontjából. Néhány coeliákiás IgA és a monoklonális scFv-k egy része felismerte az R mutánszt. Ez összhangban áll korábbi epitóp térképezési eredményekkel, miszerint normál kötődés figyelhető meg, ha a TG2 N- vagy C-terminális része hiányzik, de nem jön létre a kötődés mindkét rész, vagy a core domén hiánya esetén. A domén deléciós mutánsokkal végzett mérések szintén alátámasztották a core domén fontos szerepét: a deléciós mutáns, amely nem tartalmazza a core domént (de mind az N-, mind a C-terminális doméneket igen), nem bizonyult jó antigénnek a coeliákiás antitestek számára. Így tehát a core doménen levő Glu153 alapvető a coeliákiás antitestek kötésében.

Annak igazolására, hogy a TG2 mutánsok konformációját nem befolyásolták az elvégzett aminosav-cserék, aktivitásmérést végeztünk. Az R mutáns transzglutamináz aktivitása 30%-al magasabbnak bizonyult a vad típushoz képest, amely arra utal, hogy a fehérje megfelelően feltekeredett térbeli szerkezettel rendelkezik. Hasonló megemelkedett keresztköti aktivitást írtak le a XIII-as faktor esetében, a Val34Leu SNP esetében. A további mutánsok aktivitása különböző mértékben csökkent, egyes mutációk (E és I54K mutációk) az enzim egyik Ca^{2+} -köti helyén vannak, amely megmagyarázhatja a csökkent aktivitást. Három mutáns (RM, EM és REM) nagyobb mértékben hidrolizálta a GTP-t, mint a vad típus. Korábbi irodalmi adatok szerint a molekula utolsó 52 aminosavának eltávolítása a TG2 C-terminálisáról megnöveli az enzim GTPáz aktivitását. A fokozott GTP-áz aktivitást mutató mutánsok mind tartalmazzák a Met659Ser aminosav-cserét az enzim IV. doménjén, így lehetséges, hogy hasonló okok miatt tapasztaltunk megnövekedett GTPáz aktivitást. Az összes mutáns FBN-kötő kapacitása azonos volt a vad típusú enzimével, valamint a legfontosabb mutánsok CD spektruma sem mutatott jelentősebb szerkezetbeli változást. Így feltételezhetjük, hogy a mutánsok feltekeredett szerkezettel rendelkeznek.

Tekintettel arra, hogy a coeliákia antitestek kötődését a TG2 molekula különböző részeit érintő módosítások befolyásolták, kérdés, hogy kötődésben részt vevő aminosavak alkotnak-e egy közös epitópot, vagy ezen aminosavak külön epitópokat képviselnek. Ahogy már korábban említésre került, az azonosított aminosavak közül a core doménen található Glu153 bizonyult a legfontosabbnak, mind a poliklonális, mind a monoklonális coeliákiás antitestek esetében. A coeliákiás betegekől klónozott scFv-k bizonyos variabilitást mutattak az R mutánsokhoz való kötődésben, és így két csoportra oszthatók: R-el reagáló, illetve R-el nem reagáló antitestek. Ezen antitestek eredményesen kompetícióba hozhatók mind az azonos, mind a másik csoportba tartozó antitestekkel, amely azt mutatja, hogy egy közös epitóphoz kötődnek. Hasonló kompetíciós vizsgálatok coeliákiás IgA és IgG antitestekkel szintén alátámasztják ezen megfigyelést.

A rekombináns humán TG2-t széleskörűen használják a coeliákia diagnosztikájában a klinikai ELISA kit-ekben jó szenzitivitással és specifitással. Azonban számos tanulmányban fals pozitív anti-TG2 IgA eredményről számolnak be IgA endomysium pozitivitás nélkül, illetve fals negatív eredményekről pozitív IgA endomysium kötődéssel. A fals pozitív eredmények relatív gyakoriak a klinikai gyakorlatban, és ez megnehezíti azt a törekvést, hogy kizárólag a TG2 antitesteket használják a betegség diagnosztizálására. Más autoimmun betegségekben szenvedő egyének, tumoros betegek, szív- és májbetegek, neurológiai betegségekben szenvedők, illetve pikkelysömörös betegek esetében is megfigyelhető kis mennyiségű TG2 ellenes antitest termelése. Ez azzal magyarázható, hogy a szövetekben relatív nagy mennyiségű TG2 található intracellulárisan, amely a sejtek károsodása során felszabadul, és a coeliákától független módon antitest-termelést indukálhat.

Vizsgálatainkhoz más autoimmun betegségben szenvedő (szisztémás lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, Sjögren's szindróma), nem-coeliákias betegek szérummintáit használtuk, melyek anti-TG2 antitest pozitivitást mutattak, azonban az endomysium antitest vizsgálatban és DGP ELISA-ban negatívnak bizonyultak. Ezzel párhuzamosan, teljesen eltérő kötődési mintázatot mutattak a TG2 mutánsokhoz, mint a coeliákias antitestek, és a kötődésük nem volt gátolható a coeliákias epitópra specifikus monoklonális antitesttel (MAb 885). Ez a megfigyelés lehetővé teszi olyan új diagnosztikai kit tervezését, amely intakt epitóppal rendelkező vad TG2-t és egy módosított coeliákia epitópot tartalmazó teszt TG2-t tartalmaz. Mivel a coeliákias antitestek nem, vagy csak kis mértékben képesek a teszt molekulához kötődni, a kötődési különbség alapján azonosíthatóak a valóban coeliákias antitestek. A klinikumban is használható kit alapjául számos platform szolgálhat, pl. ELISA, radioimmunoassay, immunprecipitáció vagy jelölés nélküli technikák, mint BIACORE.

Az epitóp-specifikus ELISA használata segíthet a klinikai tünetek megjelenése előtt diagnosztizálni a betegséget (látens betegek), mivel ezen betegek is azonos epitópspecifitású antitestekkel rendelkeznek, mint az „aktív” betegek. A látens coeliákiasokat gyakran „potenciális” coeliákiasoknak is nevezik, mivel a betegek csak évek múlva mutatnak villus atrófiát és kripta hyperplasiát, míg eközben egyéb szerveik súlyosan károsodhatnak (glutén ataxia, kardiomiopátia, diabetes mellitus, hypothyreozis léphet fel). Ezért a látens fázisban lévő coeliákias betegek diagnózisa egyre fontosabbnak látszik a kapcsolódó betegségek elkerülése érdekében.

A tény, hogy egy betegség-specifikus epitóp van, módosíthatja nézeteinket a coeliákia patogenezisével kapcsolatban. Érdekes módon az epitóp specifitása nem változik még több évtized alatt sem a felnőtt coeliákiasok esetében, habár az epitóp „szétterjedése” (spreading) jellemző több autoimmun betegségre is. Ebben a tekintetben, a coeliákias antitestek sajátos jellemzőit már más

munkacsoportok is azonosították: az összes coeliákias antitest a VH₅ géneket használja, és a szomatikus hipermutáció mértéke nagyon alacsony ezen antitestek esetében. Vizsgálataink során mi is megfigyeltük az epitóp-felismerő mintázat állandóságát a diétát nem tartó betegek hosszú távú vizsgálatával. Eredményeink összességükben azt jelzik, hogy a gliadin peptidek specifikus reakciót indítanak el a TG2 meghatározott felszíni epitópja irányában. Epitóp modellezési, illetve DGP-vel és monoklonális TG2 ellenes antitestekkel végzett vizsgálataink azt mutatták, hogy bizonyos peptidek bemutatásában a molekuláris mimikri is szerepet játszhat. Ez lehet a betegség egyik elindító folyamata, ami nem zárja ki a „haptén-hordozó” (carrier) modellt, sokkal inkább kiegészíti azt. Valójában eredményeink azt mutatják, hogy a coeliákias szérumminták számos DGP elleni IgA klónt tartalmaznak, többek között olyanokat is, amelyek nem lépnek keresztreakcióba a TG2-vel.

A coeliákia egész életen át tartó glutén intolerancia, és kezelés hiányában megnövekedett morbiditás és mortalitás jellemző a betegekre. Valójában a szigorú gluténmentes diéta betartása bonyolult és így további kezelési lehetőségek is szükségesek lennének a diéta megszegésének esetére. A coeliákias antitestek közös epitópja lehetőséget kínál az antitest-interferencia használatára, adjuváns terápiásmódozatként. Kísérleteink során a szövetekre rakódott coeliákias antitesteket le tudtuk szorítani egy olyan monoklonális antitesttel, amelynek részlegesen azonos epitópja van, mint a fő coeliákias antitestkötő-hely. Továbbá ezen monoklonális antitest sejt kultúrákban nem okoz a coeliákias antitestekhez hasonló patológiás hatásokat, sőt a coeliákias antitesthatások kivédhetők az említett antitesttel. A monoklonális antitest-terápia – egy kulcsfontosságú citokinnel, növekedési faktorról vagy sejtreceptorral interferáló antitest bejuttatása a beteg szervezetébe - manapság elterjedten használt terápiás stratégia a krónikus gyulladásoz, immunológiai (reumatoid arthritis, Crohn betegség) és rosszindulatú daganatos betegségek gyógyításában. Eredményeink kezdeti alapot nyújtanak hasonló terápiás lehetőség vizsgálatára a coeliakiában.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A coeliakia a vékonybél leggyakoribb krónikus autoimmun betegsége, amely a klinikailag fogékony egyénekben változatos módon manifesztálódhat. A betegség folyamán autoantitestek termelődnek a transzglutamináz 2 (TG2) enzim ellen.

Munkánk során azonosítottuk a TG2 fő coeliákias epitópját, amely konformációs, és az enzim három különböző doménjén, térben egymáshoz közel elhelyezkedő felszíni aminosavai alkotják. Az epitóp kapcsolatban áll az enzim Ca^{2+} -kötő helyeivel, de maga a Ca^{2+} ion nem része az epitópnak. A core doménon található Glu153 és az N-terminális doménon elhelyezkedő Arg19 határozzák meg kötőhelyet, amely az enzim "csukott" és "nyitott" konformációjában is elérhető az antitestek számára. Az C-terminális doménon lokalizálódó Met659 és Glu154 szintén részt vehet az antitest-kötésben. Az epitóp fontosnak bizonyult attól függetlenül, milyen környezetben jön létre az antigén-antitest kötődés: az enzim szilárd fázishoz kötött, liquid fázisban található vagy fibronektinhez kapcsolt. Az általunk vizsgált szérum eredetű poliklonális, vékonybél biopsziából klónozott monoklonális, szövetekhez kötött és anyából magzatba átjutó coeliákias antitestek esetében is ez az epitóp volt meghatározó. A betegekben klónozott egyláncú variábilis antitest fragmentek kompetíciós vizsgálatával igazoltuk, hogy a fenti aminosavak egy közös epitópot alkotnak. Különböző más autoimmun betegségekben (szisztémás lupus erythematosus, Sjögren szindróma, rheumatoid arthritis) szenvedő nem coeliákias betegek antitestei eltérő kötődési mintázatot mutattak a megváltoztatott kötőhelyű mutáns enzimekhez, mint a coeliákias antitestek, amely arra enged következtetni, hogy az epitóp betegség-specifikus. Ezen kívül bizonyítottuk, hogy ugyanerre az epitóra kötődnek a betegség kezdetekor a látens fázisban lévő betegek antitestei is. Az epitóp egyik részéhez kötődő TG2-specifikus egér monoklonális antitestek képesek leszorítani a szövetekben megkötődött coeliákias antitesteket in vitro körülmények között, ugyanakkor a TG2 transzamidáló aktivitását nem befolyásolják. Sejtkultúrákban végzett vizsgálatok alapján az is elmondható, hogy ezen monoklonális antitesteknek nincs a coeliákias antitestekhez hasonló káros hatása, így ezen antitestek, mint specifikus kompetitorok terápiás alkalmazása is felmerül.

Vizsgálataink során lehetséges szerkezeti homológiát találtunk a TG2 enzim és a deamidált gliadin peptidek (DGP) között, valamint TG2-specifikus monoklonális antitestek képesek a DGP felismerésére is. Azonban kompetíciós mérések alapján megállapítható, hogy a coeliákias antitestek a TG2-től eltérő DGP epitópokat is felismernek.

7. PUBLIKÁCIÓK

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

Korponay-Szabó IR, Vecsei Z, Király R, Dahlbom I, Chirido F, Nemes É, Fésüs L, Mäki M. Deamidated gliadin peptides form epitopes that transglutaminase antibodies recognize. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2008; 46(3):253-261.

Simon-Vecsei Z, Király R, Bagossi P, Tóth B, Dahlbom I, Caja S, Csősz É, Lindfors K, Sblattero D, Nemes É, Mäki M, Fésüs L, Korponay-Szabó IR. A single conformational transglutaminase 2 epitope contributed by three domains is critical for celiac antibody binding and effects. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012; 109(2):431-436.

EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

Király R, Vecsei Z, Deményi T, Korponay-Szabó IR, Fésüs L. Coeliac autoantibodies can enhance transamidating and inhibit GTPase activity of tissue transglutaminase: dependence on reaction environment and enzyme fitness. *J Autoimmun.* 2006; 26(4):278-287.

Király R, Csősz É, Kurtán T, Antus S, Szigeti K, Simon-Vecsei Z, Korponay-Szabó IR, Keresztessy Z, Fésüs L. Functional significance of five non-canonical Ca²⁺-binding sites of transglutaminase 2 characterized by site directed mutagenesis. *FEBS J.* 2009; 276(23):7083-7096.

Myrsky E, Caja S, Simon-Vecsei Z, Korponay-Szabó IR, Nadalutti C, Collighan R, Mongeot A, Griffin M, Mäki M, Kaukinen K, Lindfors K. Celiac disease IgA modulates vascular permeability in vitro through the activity of transglutaminase 2 and Rho A. *Cell Mol Life Sci.* 2009; 66(20):3375-3385.

SZABADALMI BEADVÁNYOK

Korponay-Szabó IR, Fésüs L, Bagossi P, Csősz É, Király R, Simon-Vecsei Z, Mäki M. Diagnosis and treatment of gluten-induced autoimmune diseases. *PCT WO* 2010/116196 A2

Korponay-Szabó IR, Fésüs L, Bagossi P, Csósz É, Király R, Simon-Vecsei Z, Mäki M. Diagnosis of gluten-induced autoimmune diseases. PCT WO 2010/113025 A2

AZ ÉRTEKEZÉSHEZ KAPCSOLÓDÓ KONFERENCIA PREZENTÁCIÓK

ANGOL NYELVŰ ELŐADÁSOK:

Vecsei Z. Epitope mapping of coeliac anti-transglutaminase immunoglobulins. 1st Molecular Cell and Immune Biology (MCIB) Winter School, Krompachy, Szlovákia 2008. Január 8-11.

Simon-Vecsei Z. Investigation of the coeliac epitope utilizing samples from different patient groups. 2nd Molecular Cell and Immune Biology (MCIB) Winter School, Krompachy, Szlovákia 2009. Január 6-9.

Simon-Vecsei Z., Kiraly R, Bagossi P, Toth B, Dahlbom I, Caja S, Csoz E, Lindfors K, Sblattero D, Nemes E, Maki M, Fesus L, Korponay-Szabo IR. Identification of the disease-specific coeliac epitope of transglutaminase 2 and possible antibody-based immunotherapy. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition 50: pp. e208-e209. (2010). 43th Annual Meeting of ESPGHAN, Isztanbul, 2010. Prezentálta: Korponay-Szabó IR.

MAGYAR NYELVŰ ELŐADÁS:

Vecsei Z., Király R, Korponay-Szabó IR, Csósz É, Fésüs L. A transzglutamináz 2 coeliákias epitópjainak vizsgálata molekuláris biológiai módszerekkel. A Magyar Gyermekorvosok Társasága és a Magyar Gasztroenterológiai Társaság Gyermekgasztroenterológiai Szekciójának XXII. Tudományos Ülése, Eger, 2005. október 7–8. Henry Nestlé-díj a 3 legjobb 40 éven aluli első szerzőnek, harmadik hely.

POSZTEREK:

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.

Vecsei Z, Király R, Korponay-Szabó IR, Csősz 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 coeliákias epitópjainak vizsgálata. A Magyar Biokémiai Társaság 2006. évi vándorgyűlése. Pécs, 2006. augusztus 30.–szeptember 2.

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-Szabó IR, Vecsei Z, Király R, Nemes E, Dahlbom I, Fesüs L, Mäki M. Homology of deamidated gliadin peptides and tissue transglutaminase. International Celiac Disease Meeting, Maribor, 2007. In Dolinsek J, Omik T [Ed] Proceedings of the International Celiac Disease Meeting, Maribor 13-16 September 2007; University Medical Center, 2007. Page 163.

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 coeliákias epitópjainak vizsgálata. A Magyar Biokémiai Társaság 2007. évi vándorgyűlése. Debrecen, 2007. augusztus 26.–29.

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.

Simon-Vecsei Zs, Király R, Zibera F, Florian F, Fésüs L, Korponay-Szabó IR. Coeliákias fág könyvtárból transzglutamináz 2- és deamidált gliadin peptid-specifikus egyláncú variábilis fragmentek szelekciója. A Magyar Biokémiai Társaság 2009. évi vándorgyűlése. Budapest, 2009. augusztus 23.-26.

Korponay-Szabó IR, Csípő A, Király R, Tóth B, Tumpek J, Nemes É, Simon-Vecsei Zs, Maki M, Fésüs L. Reaction with the recombinant tag as cause of false positive transglutaminase antibody results. International Coeliac Disease Symposium, Oslo, 2011.

Tóth B, Király R, Simon-Vecsei Z, Nadalutti C, Gyimesi J, Nemes É, Lindfors K, Mäki M, Fésüs L, Korponay-Szabó IR. Primary cellular defect in coeliac-risk endothelial cells. International Coeliac Disease Symposium, Oslo, 2011.



DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA

Iktatószám: DEENKÉTK /302/2011.
Tételezés:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Simon-Vecsei Zsófia

Neptun kód: BERGU1

Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológiai Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Simon-Vecsei, Z.**, Király, R., Bagossi, P., Tóth, B., Dahlbom, I., Caja, S., Csósz, É., Lindfors, K., Sblattero, D., Nemes, É., Máki, M., Fésüs, L., Korponay-Szabó, I.: A single conformational transglutaminase 2 epitope contributed by three domains is critical for celiac antibody binding and effects.
PNAS USA - "accepted by publisher", 2011.
IF:9.771 (2010)
2. Korponay-Szabó, I., **Vecsei, Z.**, Király, R., Dahlbom, I., Chirio, F., Nemes, É., Fésüs, L., Máki, M.: Deamidated Gliadin Peptides Form Epitopes That Transglutaminase Antibodies Recognize.
J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 46 (3), 253-261, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/MPG.0b013e31815ee555>
IF:2.132

További Közlemények

3. Király, R., Csósz, É., Kurtán, T., Antus, S., Szigeti, K., **Simon-Vecsei, Z.**, Korponay-Szabó, I., Keresztessy, Z., Fésüs, L.: Functional significance of five noncanonical Ca²⁺-binding sites of human transglutaminase 2 characterized by site-directed mutagenesis
FEBS J. 276 (23), 7083-7096, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07420.x>
IF:3.042





DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA

4. Myrsky, E., Caja, S., **Simon-Vecsei, Z.**, Korponay-Szabó, I., Nadalutti, C., Collighan, R., Mongeot, A., Griffin, M., Mäki, M., Kaukinen, K., Lindfors, K.: Celiac disease IgA modulates vascular permeability in vitro through the activity of transglutaminase 2 and RhoA.
Cell. Mol. Life Sci. 66 (20), 3375-3385, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-009-0116-1>
IF: 6.09
5. Király, R., **Vecsei, Z.**, Deményi, T., Korponay-Szabó, I., Fésüs, L.: Coeliac autoantibodies can enhance transamidating and inhibit GTPase activity of tissue transglutaminase: dependence on reaction environment and enzyme fitness.
J. Autoimmun. 26 (4), 278-287, 2006.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2006.03.002>
IF: 2.154

Összesített impakt faktor: 23,189

Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 11,903

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2011.11.28.

