

OTKA K101788 záró beszámoló

Autoimmunitáshoz és gluten-érzékenységhoz vezető és azokat blokkoló molekuláris mechanizmusok

A kutatás célja:

A jelen alap kutatás a gabonafélék gluten fehérjéi által kiváltott autoimmunitás molekuláris alapjait vizsgálja. Ennek során jellegzetes antitestek termelődnek a 2-es típusú transzglutamináz fehérje egy kitüntetett, betegségre jellemző epitópja ellen. A közelmúltban végzett teljes genom szűrések eredményeként felismert, gluten-érzékenységgel genetikai asszociációt mutató fehérjéket vizsgáljuk glutenhez hasonló peptidrészek felismerésére, hogy megállapítsuk, hogy az autoimmunitás kiváltásában lehet-e szerepe háromdimenziós molekuláris mimikri jelenségének. Amennyiben valaki egy strukturális hasonlóságot mutató ilyen fehérjéből nem szokványos variációkkal rendelkezik vagy ez a fehérje örökletes mutációt mutat, a magzati életben nem alakul ki rá immuntolerancia, mely az ellene termelődő T-sejteket gátolná. Így a gluten fogyasztásakor, főként ha a gluten bemutatásához szükséges HLA-DQ2 vagy DQ8 genetikai adottság is megvan, reaktív T sejtek aktiválódhatnak, melyek a transzglutamináz meghatározott felszíne elleni antitestek képződését serkentik. A kutatás során vizsgáljuk a gluten-érzékeny betegek sejtjeiben azokat az örökletes eltéréseket, amelyek miatt a normál sejtnek kifejezettebb eltéréseket mutathatnak az antitestek jelenlétében és amely boholatrophia kialakulásához vezethet. A transzglutamináz epitóp ismeretében olyan anyagok kifejlesztésén dolgozunk, melyet a gluten-peptidek felismerésének vagy a coeliakia antitestek hatásának gátlásával terápiás hatást válthatnak ki.

A kutatás az alábbi három fő vizsgálati terület köré csoportosult:

- i. A coeliakiás antitestek és keletkezésük vizsgálata
- ii. A priori (örökletes) sejtbiológiai eltérések kimutatása a rizikó és coeliakiás sejtekben és ezek kapcsolata a gluten illetve az antitestek hatásaival
- iii. A coeliakiás autoimmunitás megelőzési vagy gátlási lehetőségei

Mindhárom területen vizsgáltuk a molekuláris mechanizmusokat, diagnosztikus illetve terápiás módszerek fejlesztési lehetőségeit.

Eredmények

A coeliakiás antitestekkel kapcsolatos molekuláris mechanizmusok, biológiai hatások

Nadalutti CA, Korponay-Szabo IR, Kaukinen K, Griffin M, Mäki M, Lindfors K.

Celiac disease patient IgA antibodies induce endothelial adhesion and cell polarization defects via extracellular transglutaminase 2.

Cell Mol Life Sci. 2014;71:1315-26. doi: 10.1007/s00018-013-1455-5.

Impakt faktor: 5.856

Nadalutti C, Korponay-Szabo IR, Kaukinen K, Wang Z, Griffin M, Mäki M, Lindfors K.

Thioredoxin is involved in endothelial cell extracellular transglutaminase 2 activation mediated by celiac disease patient IgA.

PLoS One.2013;8(10):e77277. doi: 10.1371/journal.pone.0077277.

Impakt faktor: 3.73

Modellként normál humán endothel sejteket használva igazoltuk, hogy a természetes IgA antitestek (coeliakiás betegek tisztított IgA frakciója) adhéziós defektushoz, migrációs zavarhoz vezet. A sejtek lekerekedése gyakoribb, polarizációs zavar keletkezik és fokozott mennyiségű TG2 jut ki az extracelluláris matrixba, ahol azonban a TG2 által keresztkötött fehérjék mennyisége alacsonyabb, mint alaphelyzetben. A coeliakiás antitestek az integrinek eloszlását és csoportosulását is befolyásolják. A coeliakiás IgA hatására fokozódik ugyan a TG2 emzimatis aktivitása, de a folyamatok egy része nem igényli a TG2 keresztkötő aktivitását és protein-protein interakciók szintjén valósul meg. A jelátvitelben részt vesz a RhoA anyagcsereút is. Az antitestek TG2 enzimre kifejtett hatását jelentősen módosíthatja a biokörnyezet. A thioredoxin felelős a TG2 hatékony konformációjának fenntartásáért és az oxidáció miatt funkcióvesztés elkerüléséért.

Mogyorósy G, Felszeghy E, Kovács T, Berkes A, Tóth L, Balla G, Korponay-Szabó I.

Pediatric myocarditis: A sentinel of non-cardiac chronic diseases?

Interv Med Appl Sci. 2014;6(4):154-9. doi: 10.1556/IMAS.6.2014.4.3.

Taavela J, Popp A, Korponay-Szabo IR, Ene A, Vornanen M, Saavalainen P, Lähdeaho ML, Ruuska T, Laurila K, Parvan A, Anca I, Kurppa K, Mäki M.

A Prospective Study on the Usefulness of Duodenal Bulb Biopsies in Celiac Disease Diagnosis in Children: Urging Caution.
Am J Gastroenterol. 2016;111(1):124-33. doi: 10.1038/ajg.2015.387

Impakt faktor: 9.931

A coeliakia természetes lefolyása során csak ritkán nyilvánvaló a TG2-elleni antitestek meghatározó szerepe, és mivel ez a folyamat könnyen nem modellezhető, az antitestek biológiai hatásának pathomechanikai szerepét prospektív klinikai körülmények között tanulmányoztuk és igazoltuk myocarditis manifesztáció hátterében, mely addig fel nem ismert coeliakia szövődményeként vagy a glutenmentes diéta önkényes abbahagyása miatt alakult ki. Utóbbi jellemző serdülőkre és életveszélyes állapothoz vezethet. Három ilyen esetben a szívizomból vett biopsziás mintában a klinikai lefolyással párhuzamosan anti-TG2 antitestek jelenlétét igazoltuk ezzel a ritka klinikai manifesztációval kapcsolatosan. Ugyancsak az anti-TG2 antitestek jelenléte különböztette meg a coeliakiás és nem coeliakiás vékonybélkárosodást a proximális, bulbáris szakaszon.

Coeliakiás modellben hasznosítható antitestek preparálása, epitóp tesztelése

Simon-Vecsei Z, Király R, Bagossi P, Tóth B, Sivadó E, Mäki M, Fésüs L, Korponay-Szabó IR.

Identification of „early” celiac epitopes utilizing recombinant transglutaminases from different protein expression systems
Magyar Biokémiai Társaság Vándorgyűlése, Siófok, 2013

Sivadó E, Simon-Vecsei Z, Király R, Zibera F, Tóth B, Florian F, Fésüs L, Korponay-Szabó IR.

Investigation of the effects of coeliac minibodies on transglutaminase activity and epitope mapping studies
Magyar Biokémiai Társaság Vándorgyűlése, Siófok, 2013

Sikerrel preparáltunk biológiailag aktív coeliakia-specifikus IgA antitesteket szűrővel felfedezett coeliakiás szülő nő placéntájából. Ezen kívül a kiválasztott epitópok ellen egyláncú fág antitesteket készítettünk. Megállapítottuk, hogy ezek az epitópok a születéstől követett gyermekeknél jellemzőek a coeliakia kialakulási fázisában. Új eredmény, hogy ezekkel a monospecifikus antitestekkel kimutattuk, hogy azok preferenciálisan a TG2 enzim nyitott konformációját ismerik fel. Kompetíciós vizsgálatokkal elsősorban két fontos, részben kapcsolatot mutató epitóp látszik ebben jelentősnek. Az egyik az általunk 2012-ben leírt (PNAS;109:431-6) összetett epitóp (Epitóp „2”), melynek fő horgonyzó gyöke a 19-es arginin az N-terminális doménen, a másik a norvég munkacsoport által 2013-ban közölt Epitóp „1”, mely az N-terminális domén ellentétes oldalán a 134-es hisztidin körül van (Iversen, J Immunol. 2013;190:5981-91.). Ezen kívül még két kevésbé jelentős N-terminális epitópot (Epitóp3,4) közöltek ugyanebben a cikkben az N-terminális doménen. A coeliakiás antitestek jellegzetes VH vázzal termelődnek, a VH5 típusúak többnyire az 1-es epitópot, a VH3 típusúak a 2-es epitópot ismerik fel. Epitóp-specifikus TG2 mutánsokkal történt kvantitatív mérések alapján a betegek szérumában a VH3 antitestek vannak túlsúlyban és többségében ezek alkotják a placéntáról leoldott antitesteket is. A VH3 antitestek humán specifikusak, nem reagálnak egér TG2-vel.

Vizsgáltunk továbbá 4 eddig még nem közölt egér monoklonális anti-TG antitestet. Az ezek által felismert epitópok egy része konformáció függő, de mind nagyon alacsony reaktivitást mutat az egér TG2-vel. A fibronectinhez kötött TG2 antigenításában a kalcium jelentős szerepet játszik, hiányában a coeliakiás epitóp 1 hozzáférhetősége csökken. Sikerült olyan TG2 pontmutánst előállítanunk, melyben kalcium jelenléte nélkül is látható az epitóp 1. Értékeljük még egy aminosav csere hatását a TG2 szerkezeti stabilitására, mely ellentétes hatású, az enzim fokozott kalcium-érzékenységgel jár (közölve Kanchan K, et al. Identification of a specific one amino acid change in recombinant human transglutaminase 2 that regulates its activity and calcium sensitivity. Biochem J. 2013;455:261-72). A TG2 konformáció-függő felismerését tovább vizsgálva a fehérje kinyílási régióhoz közel elhelyezkedő aminosavakon új mutációkat készítettünk (E329Q, W332F), melyek közül az első a csukott, a második a nyitott szerkezetet preferálja. Ezek eltérést mutatnak az antitestek kötésében. A vizsgálati eredményeket igyekeztünk a TG2 kalcium jelenlétében készített kristályszerkezet analízisével kiegészíteni. Az MTA Enzimológiai Intézetben készített 10 Angström felbontású leképezés alapján a kalcium jelenlétében a TG2 szerkezete nem felel meg a korábban, Pinkas által inhibitor

jelenlétében kapott teljesen extendált szerkezetnek (PLoS Biol. 2007;5:e327), azonban a felbontás korlátai miatt az antitestek pontos kötőhelyét nem lehetett azonosítani. A TG2 szerkezete nem stabil a kalcium jelenlétében, és a mobilitás kedvezőtlenül hat a kristályképződésre. Nem keletkeztek értékelhető kristályok a fág antitestek-TG2 komplexekből.

Az egéren tervezett kísérleteket figyelembe véve, tovább analizáltuk a 2-es epitóp szerkezetét és megkíséreltük az epitópot felépíteni az egér TG2 szerkezeten. Az R19 közelében csak a 28. helyen és a 15-17 pozíciókban vannak eltérő aminosavak, de ezeket a humán homológokra cserélve, nem kaptunk jobb reaktivitást. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a core doménnek – korábbi eredményeinkkel egyezően, de a norvég adatok alapján elterjedt nézettel ellentétben - sokkal nagyobb szerepe van.

Összefoglalva, a coeliakiás antitestek által felismert epitópok bonyolultabbak, mint azt 2012-ben látni lehetett, egyszerre minden epitóppal kompetíciót elérni nem sikerül. Megállapítható azonban, hogy a VH3 antitestek mennyisége domináns és ezek kötődése releváns a szövetekben, így ezek kötődésének akadályozása járhat terápiás haszonnal. Az egér immunizálással nyert monoklonális antitestek között van ugyan hasonló specifitású, de az sem ismeri fel az egér TG2-t, így in vivo hatásának értékelése humán in vivo rendszert kíván. Az eredmények in extenso közlése az első szerző (Simon-Vecsei Zsófia) szülési szabadsága miatt még nem történt meg, a későbbiekben tervezzük.

Coeliakiás állatmodellek fejlesztése

Kalliokoski S, Sulic AM, Korponay-Szabó IR, Szondy Z, Frias R, Perez MA, Martucciello S, Roivainen A, Pelliniemi LJ, Esposito C, Griffin M, Sblattero D, Mäki M, Kaukinen K, Lindfors K, Caja S

Celiac Disease-Specific TG2-Targeted Autoantibodies Inhibit Angiogenesis Ex Vivo and In Vivo in Mice by Interfering with Endothelial Cell Dynamics. PLoS One. 2013;8(6):e65887.

Impakt faktor: 3.730

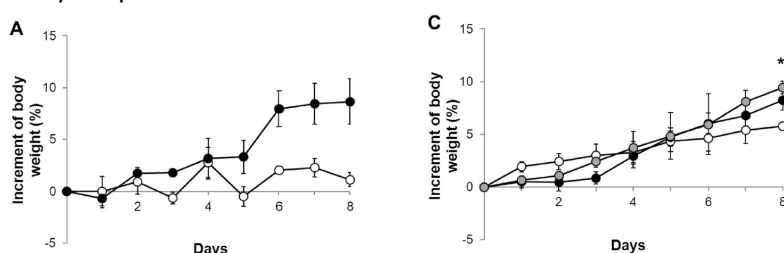
A projekt megkezdése előtti eredményeink humán endothel 3-dimenziós sejt kultúrán Matrigel közegben az angiogenesis gátlását mutatták a coeliakiás antitestek jelenlétében, ezért további vizsgáltuk az angiogenesis paramétereket *ex vivo* és *in vivo* Balb/c és C57BL/6 háttérén létrehozott TG2^{-/-} egéren valamint humán endothel sejteken és Matrigel plug egérbe történő implantációjával. A kísérletekben coeliakiás beteg savóból preparált természetes anti-TG2 IgA antitesteket és coeliakiás betegből klónozott monoklonális IgG vázzal készített monoklonális antitesteket (4.1 anti-TG2 klón és irreleváns kontroll antitestek) használtunk, melyek jelenléte az angiogenesis morfológiai és funkcionális paramétereit, valamint a sejtek migrációját hasonlóan gátolta. Az eltérések csökkenthetők voltak sejtbe be nem hatoló TG2 inhibitorokkal vagy TG2^{-/-} egéren végezve, mely az extracelluláris TG2 szerepét jelzi ezekben a folyamatokban.

Kalliokoski S, Caja S, Frias R, Laurila K, Koskinen O, Niemelä O, Mäki M, Kaukinen K, Korponay-Szabó IR, Lindfors K.
Injection of celiac disease patient sera or immunoglobulins to mice reproduces a condition mimicking early developing celiac disease. J Mol Med (Berl). 2015;93(1):51-62.

Impakt faktor: 5.107

A biztató kezdeti eredmények után passzív antitest transzfer hatását vizsgáltuk egerekben. A kísérletekhez athymikus nude (Hsd:Athymic Nude-Foxn1nu) egereket használtunk, melyek nem képesek aktív immunválaszra a beadott humán immunglobulin ellen, mivel korábbi közlemények szerint normál immunrendszerű egerek anti-idiotype válasszal reagáltak a kívülről bejuttatott coeliakiás antitestekre (Di Niro, Mol Immunol 2008;45:1782–1791). Tekintettel arra, hogy előzetes vizsgálataink szerint az endothelre való hatás a női nemben kifejezettebb volt és a szervezet teljes telítéséhez a betegminták száma és volumene korlátozott volt, a kísérletekhez 4-5 hetes nőtény, még kis testméretű, növekedésben lévő egereket használtunk. Ugyancsak az előzetes vizsgálatok folyamán észleltük, hogy az intraperitoneálisan beadott humán IgA antitestek nem jutnak be az egér keringésébe, melynek oka feltehetően az, hogy az egérben nincs megfelelő polymerikus IgA receptor. Ezért IgA hiányos coeliakiás betegsavókat használtunk, mert ezek a betegek IgA helyett IgG típusú coeliakiás (anti-DGP és anti-TG2) antitesteket termelnek. A kísérletekben savót vagy protein G oszlopon tisztított IgG antitesteket adtunk be intraperitoneálisan. A

kísérleteket kezdetben 8 napig, egy kísérletben 28 napig folytattuk, csoportonként 3-5 egérrel. A kezdeti kísérletben az egerek egyedi betegmintákat kaptak, de a 28 napos kísérletnél ezt már nem lehetett teljesíteni és ott poolozott betegmintákkal telítettük őket. A kontrollok vagy nem kaptak injekciót vagy IgA hiányos nem coeliakiás kontroll személy savóját illetve immunglobulinját kapták. Minden kísérletben sikerült elérni, hogy a humán antitestek az emberi betegséghez hasonlóan magas koncentrációban megjelentek az egér szérumban és le is rakódtak a szervekben a transzglutamináznak megfelelő lokalizációban, köztük a vékonybélbolyhokban. A savóval folytatott kísérleteknél a coeliakiás mintákat kapott állatok súlyfejlődése megállt és hasmenésük jelentkezett, azonban a kísérlet idejének meghosszabbításával ezek a tünetek lassan csökkentek. A tisztított immunglobulinok adásánál nem volt szignifikánsan több tünet, mint a kontrolloknál, de itt is észlelhető volt vékonybélben a gyulladásos sejtszám emelkedése, a proliferáció fokozódása (össz és Ki-67+ lamina propria sejtek szignifikánsak magasabb volta) és a boholy/crypta arány mérsékelt csökkenése. Az egerekben azonban nem alakult ki a humán betegségre jellemző flat mucosa, azaz a súlyos boholyatrophia.



Kalliokoski S, Piqueras VO, Frías R, Sulic AM, Määttä JA, Kähkönen N, Viiri K, Huhtala H, Pasternack A, Laurila K, Sblattero D, Korponay-Szabó IR, Mäki M, Caja S, Kaukinen K, Lindfors K.

Transglutaminase 2-specific coeliac disease autoantibodies induce morphological changes and signs of inflammation in the small-bowel mucosa of mice. Amino Acids. 2016 Aug 9. [Epub ahead of print]

Impakt faktor:

Az eltérések kifejezettebbé tételére megkíséreltük a beadott antitestek mennyiségének emelését nagyteljesítményű proteomikai rendszerben termelt, monospecifikus klónozott antitestek beadásával. A kísérletekben a 4.1-es, coeliakiás betegből származó, VH5 variábilis nehézlánc típusú szerkezettel rendelkező, korábban mások és általunk is *in vitro* kiterjedten vizsgált anti-TG2 antitestet alkalmaztuk 2 mg/ml-es koncentrációban, ez egyformán jól felismeri a humán és egér transzglutaminázt is. Az antitesteket humán IgG konstans Fc résszel klónozott formában készítettük el (ScFv-Fc). A természetes betegantitestekkel és savóval kapott eredményeket ugyan sikerült reprodukálni és bizonyítani, hogy a 4.1 antitest önmagában is változatos gyulladásos aktivitást és bizonyos fokú citokin emelkedést indukál, a modell boholykárosodásra vonatkozó része nem vált egyértelműbbé és klinikai tünetek sem jelentkeztek. További vizsgálatainkban viszont kimutattuk, hogy a VH5 antitestek csak kis részét reprezentálják a betegsavókban lévő természetes antitesteknek, míg azokban többségben vannak a VH3 típusú antitestek, melyek általunk leírt kötődési epitópja viszont humánspecifikus, az egér transzglutaminázban nem található meg. Ennélfogva a VH3 antitestek a betegsavókból sem tudtak az egér antigénhez megfelelően kötődni, ez magyarázhatja, hogy miért nem kaptunk olyan eredményeket, mint a klinikai betegekben észlelt eltérések. Mivel a TG2 elleni autoimmunitási reakció a legfontosabb jelenség, mely a coeliakiát megkülönbözteti más felszívódási zavarral és boholykárosodással járó kórképektől és a nemcoeliakiás glutén-intoleranciától, az eredmények azt jelzik, hogy az egér egyáltalán nem megfelelő species coeliakiás állatmodell létrehozására, és mindazon jelenségek, melyeket regisztrálni tudtunk (pl. a klinikai tünetek), valószínűleg csak a kisebbségben jelen lévő antitestek vagy egyéb szérum eltérések eredményei. A VH5 antitestnek volt bizonyos angiogenezist gátló hatása, ez önmagában talán nem elég a boholyatrophia kiváltásához. Ezek a kísérletek passzív antitest transzferre vonatkoznak, de fontos relevanciával bírnak gliadinnal vagy más módon aktiválható állatmodellre is, mert azt jelzik, hogy ezek egérben semmiképp sem lesznek sikeresek, olyan állatfajt kell találni, melynek transzglutamináz enzime a VH3 és VH5 epitópokat egyaránt tartalmazza. Saját vizsgálatainkat ebből a szempontból tengerimalac TG2 enzimre terjesztettük ki, de ott is változó VH3 antitest-kötődést tapasztaltunk, így ez sem lenne igazán jó állatmodell. Megjegyzendő, hogy a korábbiakban mások által

egéren végzett kísérletek (Freitag 2004, 2009, gliadin immunizálással, De Kauwe 2009, gliadin-specifikus CD4 sejtek transzferjével) sem hoztak létre megfelelő TG2 autoantitest termeléssel kísért, az emberi betegségre hasonlító állatmodell. Az eredmények saját kutatásunk menetét is jelentősen befolyásolták, melyben a kutatási terv szerint Lpp-/- egeret szerettünk volna coeliakiás állatmodellként használni. Azonban a fenti eredmények és az Lpp kísérletekben talált negatív eredmények (ld.lejebb) miatt ennek elkészítése értelmetlen lett volna, így helyette vizsgálatainkat a molekuláris mechanizmusok feltárására humán sejtenyészési rendszerekben illetve más klinikai vizsgálatban résztvevő coeliakiás családtagok megfigyelésével és elemzésével (preventCD cohort) végeztük.

A coeliakiás antitestek keletkezésének mechanizmusa és a betegség kialakulásának megelőzési lehetőségei humán vizsgálatokban

Tack GJ, van de Water JM, Bruins MJ, Kooy-Winkelaar EM, van Bergen J, Bonnet P, Vreugdenhil AC, Korponay-Szabo I, Edens L, von Blomberg BM, Schreurs MW, Mulder CJ, Koning F.

Consumption of gluten with gluten-degrading enzyme by celiac patients: a pilot-study.

World J Gastroenterol. 2013;19(35):5837-47. doi: 10.3748/wjg.v19.i35.5837

Impakt faktor: 2.433

A coeliakia aktivitás blokkolására egyik lehetőség olyan enzimek fogyasztása, melyek a bélrendszerben hozzájárulnak a gluten peptidek degradációjához. A normál emésztési folyamat során a bevitt peptidok nem bomlanak le aminosavakig, mert az emberi emésztőenzimek nem képesek bizonyos prolin gyökök mellett hasítani. A tanulmányban *Aspergillus niger*-ből származó gluten-bontó enzimek alkalmazása mellett jelenségeket vizsgáltuk ismert coeliakiás, kezelt betegeknek adott gluten+enzimek mellett. Az aktivitási jelek közül leghamarabb – 2 hét után – a vékonybélben lerakódott anti-TG2 antitestek kimutathatóságában észleltünk különbséget, míg az egyéb szokásosan vizsgált kóros paraméterek még nem váltak detektálhatóvá. Ez egy rövid pilot vizsgálat volt, melynek következtetéseit hosszabb adagolással kell majd ellenőrizni.

Vriezinga SL, Auricchio R, Bravi E, Castillejo G, Chmielewska A, Crespo Escobar P, Kolaček S, Koletzko S, Korponay-Szabo IR, Mummert E, Polanco I, Putter H, Ribes-Koninckx C, Shamir R, Szajewska H, Werkstetter K, Greco L, Gyimesi J, Hartman C, Hogen Esch C, Hopman E, Ivarsson A, Koltai T, Koning F, Martínez-Ojinaga E, te Marvelde C, Pavic A, Romanos J, Stoopman E, Villanacci V, Wijmenga C, Troncone R, Mearin ML.

Randomized feeding intervention in infants at high risk for celiac disease.

N Engl J Med. 2014 Oct 2;371(14):1304-15. doi:10.1056/NEJMoa1404172.

Impakt faktor: 55.873

Szajewska H, Shamir R, Chmielewska A, Pieścik-Lech M, Auricchio R, Ivarsson A, Kolacek S, Koletzko S, Korponay-Szabo IR, Mearin ML, Ribes-Koninckx C, Troncone R; PREVENTCD Study Group.

Systematic review with meta-analysis: early infant feeding and coeliac disease--update 2015.

Aliment Pharmacol Ther. 2015;41(11):1038-54. doi: 10.1111/apt.13163.

Impakt faktor: 6.320

Szajewska H, Shamir R, Mearin L, Ribes-Koninckx C, Catassi C, Domellöf M, Fewtrell MS, Husby S, Papadopoulou A, Vandenplas Y, Castillejo G, Kolacek S, Koletzko S, Korponay-Szabó IR, Lionetti E, Polanco I, Troncone R.

Gluten Introduction and the Risk of Coeliac Disease: A Position Paper by the European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition.

J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2016;62(3):507-13. doi: 10.1097/MPG.0000000000001105.

Impakt faktor: 2.400

A coeliakiára családirag veszélyeztetett csecsemőknél orális tolerancia kialakítására törekedtünk a korai életkorban (4-6 hónapos kor között) adott kis mennyiségű gluten bevitelével (preventCD vizsgálat). A vizsgálatban kettős vak, randomizált módon a gyermekek egy része napi 100 mg glutent kapott, majd 6 hónapos után mindkét csoport fokozatosan emelkedő gluten mennyiségeket élelmiszerekben. A klinikai követés során vizsgáltuk a coeliakia immunológiai jeleinek kialakulását. Pozitív esetekben a coeliakia fennállását a vékonybél szövettani vizsgálata alapján állapítottuk meg. 3 éves korban nem volt különbség a szerológiai aktivitásban és a verifikált coeliakia diagnózisban a két csoport között (publikáció 2014-ben), a 6 éves kori értékelés jelenleg folyik. A HLA-DQ2 homozigóta gyermekek, főként lányok a korai bevitelnél erőteljesebb immunválasszal reagáltak és számos olyan gyermeknél is találtunk glutenre adott antitest reakciót, akik később nem betegedtek meg. Az anti-TG2 reakció 2 éves kor körül vált kimutathatóvá és megfelelően előre jelezte a coeliakia manifesztálódását. Mivel az eredményeknek fontos klinikai jelentősége

van, meta-analízissal elemeztük a gluten csecsemőkori elkezdésével kapcsolatos párhuzamos vizsgálatokat és az eredmények alapján új csecsemőtáplálási ESPGHAN irányelv kidolgozásához járultunk hozzá.

Paula Crespo-Escobar P, Mearin ML, Hervas-Marín D, Auricchio R, Castillejo G, Gyimesi J, Martínez-Ojinaga E, Werkstetter K, Vriezinga S, Koletzko S, Korponay-Szabo IR, Polanco S, Troncone R, Stoopman E, Kolacek S, Shamir R, Szajewska H, Ribes-Koninck C.

The role of gluten consumption at early age in celiac disease development

submitted manuscript (AJCN)

előzetes konferencián bemutatás: 48th Annual Meeting of the ESPGHAN, Amsterdam, 2015.05.06-9.

A coeliakia, mint gluten-dependens betegség, fő provokáló faktora a búza, árpa, rozs fogyasztása. Mivel ezek az európai népesség alap-élelmiszerei közé tartoznak, gyakorlatilag mindenki elkezd ezek fogyasztását a csecsemőkorban, hacsak a szülők a családban már meglévő coeliakia betegség miatt nem idegenkednek a gluten bevitelétől. A korábbi epidemiológiai vizsgálatok azt sugallták, hogy a korai életkorban fogyasztott nagyobb mennyiségű gluten jobban hajlamosít a coeliakia kialakulására. Az adatokat azonban hosszabb idővel (néha több évvel) a csecsemőkor után gyűjtötték, amikor a coeliakia már kialakult, kontrollált, randomizált vizsgálatok ezen a téren eddig nem álltak rendelkezésre. A preventCD vizsgálatban azonban prospektíven regisztráltuk mind a napi glutenfogyasztást, mind a coeliakia későbbi kialakulását is 715 olyan csecsemőnél, akiknél a glutenbevitel kezdete randomizált módon történt 4 vagy 6 hónapos korban és 10 hónapos korig pontos utasítást kaptak a napi mennyiség fokozatos emelésére. Ezt követően szabad glutenbevitt javasoltunk. A 6 éves korig kialakuló coeliakia előfordulást nem befolyásolta a 10 és 36 hónapos kor között bevitt gluten napi mennyisége. A magyar gyermekek 1 éves kor körül több glutent fogyasztottak (elsősorban kenyér formájában), mint a többi országban, de a 2 éves korig kialakuló coeliakia incidenciája magasabb volt a spanyolok között, akik a legkevesebb napi glutennemennyiséget fogyasztották, míg a többi országban köztes értékeket kaptunk. Azonos országon belül nem volt különbség a napi glutenbevételben a később coeliakiássá vált és a meg nem betegedett rizikógyermekek napi glutenbevétele között. Az eredmények azt mutatják, hogy a coeliakia kialakulása nem elsősorban a glutenbevitel kezdetének idején, mennyiségén és minőségén, hanem egyéni, feltehetően örökletes faktorokon múlik.

A coeliakiára hajlamosító a priori eltérések vizsgálata

[Romanos J, Rosén A, Kumar V, Trynka G, Franke L, Szperl A, Gutierrez-Achury J, van Diemen CC, Kanninga R, Jankipersadsing SA, Steck A, Eisenbarth G, van Heel DA, Cukrowska B, Bruno V, Mazzilli MC, Núñez C, Bilbao JR, Mearin ML, Barisani D, Rewers M, Norris JM, Ivarsson A, Boezen HM, Liu E, Wijmenga C; PreventCD Group.

Improving coeliac disease risk prediction by testing non-HLA variants additional to HLA variants.

Gut. 2014;63(3):415-22. doi: 10.1136/gutjnl-2012-304110.]

A PreventCD vizsgálatba bevont magyar gyermekek és családjaik genetikai tesztelésének eredményeit felhasználták abban a kollaborációs analízisben, mely non-HLA variációk, elsősorban SNP eltérések klinikai prediktív értékét vizsgálta. Bár ebben a tanulmányban közvetlenül nem vettünk részt, az Lpp polimorfizmusra vonatkozó magyar eredményeket megkaptuk és feldolgoztuk. Ennek alapján nem találtunk összefüggést az Lpp nem-kódoló régiókban lévő SNP variációk száma, jelenléte és a coeliakia megjelenési módja között.

Kirchberg FF, Werkstetter KJ, Uhl O, Auricchio R, Castillejo G, Korponay-Szabo IR, Polanco I, Ribes-Koninck C, Vriezinga SL, Koletzko B, Mearin ML, Hellmuth C.

Investigating the early metabolic fingerprint of celiac disease - a prospective approach.

J Autoimmun. 2016 Aug;72:95-101. doi:10.1016/j.jaut.2016.05.006.

IF: 7.760

A coeliakia későbbi kialakulását befolyásolhatja az egyén olyan metabolikus adottságai is, melyek már a gluten fogyasztása előtt megnyilvánulnak. Ezért rizikógyermekektől 4 hónapos korban gyűjtött szérummintákon az aminosav és lipidkoncentrációkat vizsgáltuk tömegspektrometria segítségével. Az aminosavakat ion-páros LC-MS/MS alkalmazásával, a poláros lipideket (karnitin, acylkarnitinek, lisofoszfátidilkolinok, diacilfoszfátidilkolinok, acil-alkil-foszfátidilkolinok, szfingomyelinek) elektropray ionizációs MS segítségével határoztuk meg, az egyes különböző hosszúságú szénláncú komponenseket

egyenként analizálva. Az eredményeket az egyes futtatások közötti eltérések miatt Bonferroni korrekcióval értékeltük. Bár számos lipidfrakció mutatott kisebb eltéréseket a később coeliakiás és nem coeliakiás gyermekek között, a Bonferroni korrekció után ezek közül egyik sem maradt szignifikáns. Ennek megfelelően eleve predesztináló metabolikusan mérhető eltérést igazolni nem sikerült.

Barta-Tóth B, Tóth B, Ujházi B, Veréb Z, Petrovski G, Fésüs F, Korponay-Szabo IR
Characterization of primary cells derived from Human Umbilical Cord
Magyar Biokémiai Társaság Vándorgyűlése, Siófok, 2013

Ujházi B, Tóth B, Barta-Tóth B, Fésüs L, Korponay-Szabo IR
Live imaging of adhesion complexes handling in coeliac and normal cells
Magyar Biokémiai Társaság Vándorgyűlése, Siófok, 2013

Korponay-Szabó IR, Tóth B, Gyimesi J, Barta-Tóth B, Bogáti R, Ujházi B, Király R, Caja S, Nadalutti C, Lindfors K, Mäki M, Fésüs L.
Search for gluten non-dependent prospective biomarkers of coeliac disease for in vitro diagnostic use.
16th International Coeliac Disease Symposium, Prága, 2015.06.21-24.

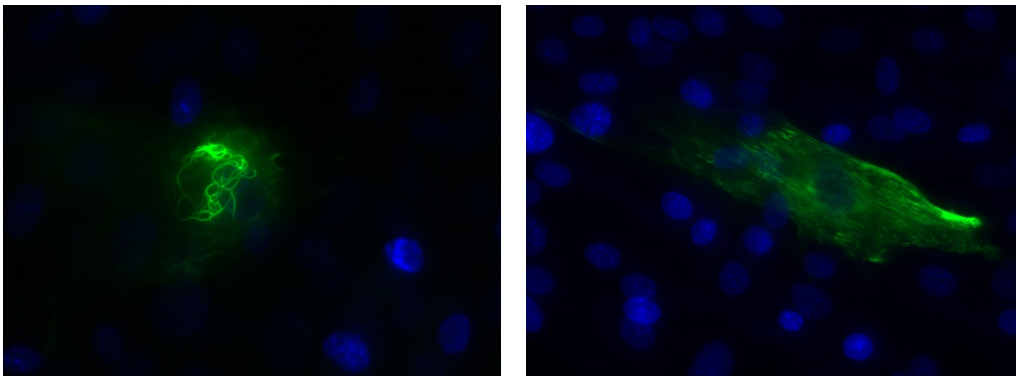
Mivel sem a direkt genetikai, sem a metabolikus megközelítés nem mutatott eleve meglévő vagy meghatározó különbséget a coeliakiás betegek és a normál populáció között, a sejtszintű morfológiai és molekuláris biológiai megközelítést választottuk betegség-releváns eltérések keresésére, azzal a céllal, hogy a megfigyelt anyagcsere-úti különbségek mögött később célzottan találjunk genetikai vagy epigenetikai markereket. A coeliakia megelőzési klinikai vizsgálatok kapcsán jelentkezett családokban olyan rizikó-újszülöttek beválogatására került sor, akik elsőfokú rokonai között már igazolt coeliakiások voltak. A szülők 102 esetben ajándékoztak köldökzsínór mintát sejtpreparálásra, előzetes felvilágosítás és beleegyezés után. A köldökzsínórokból etikai engedély birtokában endothel, majd 2012 után endothel és mesenchymalis/myogén primer sejteket preparáltunk és vizsgáltunk sejt kultúrában, RNS expressziós vizsgálatokkal és csendesítési kísérletekkel. Az endothel sejtek izolálására standard módszert alkalmaztunk. A köldökvéna pufferrel történő átmosása után, 12 percre kollagenázzal töltöttük fel a vénát, majd a levált sejteket 10% foetalis borjúsérumot (FBS) tartalmazó tápfolyadékkal kimostuk és flakóban tenyésztettük. A mesenchymális sejtek tenyésztésére saját módszert fejlesztettünk ki. A köldökzsínór feldarabolt és fehérjementes pufferben mosott 1-2 mm-es darabjait tripszinezttük, majd plate-re helyezve mozgatható nélkül 2-3 hétig kitapadva tápfolyadékban tartottuk. Ezt követően indult meg a sejtek szövetdarabból történő kivándorlása és proliferációja. Közben a gyermekek prospektív követése során rendszeresen végeztünk szerológiai vizsgálatokat és pozitív esetben a coeliakia klinikai igazolására vékonybél szövettani vizsgálatot javasoltunk a klinikai irányelvek szerint a beteg érdekében közvetlenül szükséges diagnózis felállítására. A gyermekek egy része a preventív korcsoportba tartozott, de a többség már annak beválogatási idejét követően, 2012 után született. Az első coeliakiás gyermeket 3 éves korban, 2013-ban diagnosztizáltuk, ezt követően azonban 2014 végéig nem volt újabb vizsgálható eset, mely az addig készült eredmények kiértékelését jelentősen nehezítette. A beszámoló készítésének idejéig összesen 12 gyermeknél igazolódott coeliakia, de ezek közül csak 8-tól vannak meg az eredeti köldökzsínór sejtek, mivel a többi négytől származókat gyenge vitalitásuk és technikai nehézségek miatt nem sikerült fenntartani. Egy gyermeknél Duchenne kór fennállása igazolódott (exon 43 hiány), azonban ő nem hordoz coeliakiára hajlamosító HLA-DQ2 vagy DQ8-t. A rizikósejtekkel párhuzamosan 16 normál köldökzsínórból is preparáltunk kontrollként hasonló módszerrel sejteket.

A tenyésztés során a sejteken megfigyelt jelenségek a következőkben összegezhetők: 1. A coeliakiás sejtek fenntartása nehezebb közvetlen a preparálás után és az első 3-4 passage idején, ha ezt túléljük, könnyebben tenyészthetők. 2. A sejtek érzékenyebbek a médium FBS tartalmára, ezért számukra optimalizálni kellett a tápfolyadék összetételét. A 2% FBS tartalmú gyári endothel médiumok helyett 10%-os FBS tartalmú 10% Endothelial Growth Mediummal (EGM2, Lonza) kiegészített médiumot alkalmaztunk a Debreceni Egyetemen korábban szokásos endothel médium helyett. 3. A coeliakiás sejtek letapadása a normál sejtekhez viszonyítva csökkent, de fibronektinnel bevont felszín alkalmazása és TG2 hozzáadása javítja a csökkent adhéziót. A csökkent adhézió miatt a normál sejteknél gyakoribb a lekerekített alak felvétele, különösen médiumcsere után, amikor a sejtek egy része felválhat. 4. A coeliakiás sejtek fokozottan érzékenyek a motilitást fokozó anyagokra (többek között pl. a nagyobb koncentrációban alkalmazott EGM2-re), ha

előzetesen stressz éri őket vagy eleve rosszabb állapotban vannak. Ezért a továbbiakban az igazolt coeliakiás sejtek és kontroll sejtek felhasználásával ezeket a jelenségeket vizsgáltuk részletesebben.

Mivel a primer sejtek osztódási képessége korlátozott, a kísérletekhez szükséges sejtmennyiség biztosítása érdekében 5 coeliakiás és 4 kontroll sejtvonalat pBABE vektorral bevitt telomeráz segítségével sikeresen immortalizáltunk. Az immortalizált coeliakiás sejtek adhéziós tulajdonságai hasonlóak voltak az eredeti sejtekhez, de gyorsabb és erőteljesebb szaporodási képességük miatt jobban bírták a médium változásokat és az EGM2-t. Az sejthadhéziót és proliferációt resorufin assay alkalmazásával mértük. A tápfolyadékhoz adott resazurin a sejtek metabolizmusa során vörös fluoreszcenciát adó resorufinnál alakul át, mely fluorescens readerrel mérhető és ezáltal a sejtszám valós időben történő követését teszi lehetővé. Az adhéziós méréseket – az elfogadott standardoknak megfelelően – alacsony szérumszámú médiumban legalább 12 órát át tartó előkezelés mellett végeztük. A teljesen szérumszámmentes vagy 0.1%-os médiumban történő éheztetést sem a kontroll, sem a coeliakiás endothel sejtek nem bírták, a legkifejezettebb különbség a két csoport között 1% FBS mellett adódott, ha az EGM2-t is megvontuk. Viszont EGM2 mellett gyakorlatilag alig volt különbség. Ez egyrészt arra utal, hogy a sejteknek adott növekedési faktorok segítik az adhéziós molekulák képzését és a kompenzációt, másrészt azt jelzi, hogy a coeliakiában csökkent adhézióért felelős anyagcsereút más metabolikus utakon áthidalható.

A coeliakiával kapcsolatos eltérések vizsgálata során elemeztük a sejtekben található TG2 mennyiségét és eloszlását. Az endothel sejtekben a specifikus mRNS szint változatos értékeket adott, annak megfelelően, hogy a TG2 expresszió dinamikusan változhat, de nem volt különbség a coeliakiás és a többi sejtek között és festéssel sem észleltünk különbséget. Az endothel sejtekben igen sok citoplazmatikus TG2 található, de az izomsejtekben viszont a TG2 mennyisége kevesebb és az intracelluláris TG2-t felismerő festéssel azt a coeliakiás sejtekben főként az aktin filamentumokkal és talinnal szorosan asszociálnak találtuk, míg a normál sejtekben sokkal diffúzabb megjelenést mutatott. Ezért a továbbiakban time lapse kísérletekkel vizsgáltuk az aktin hálózat és a talin kapcsolatát, melyhez Cell-light® fluoreszcens GFP-talint és RFP-aktint alkalmaztunk, azonban ennek során a vártnál több technikai nehézséggel szembesültünk. Míg az izomjellegű mesenchymális sejtekben igen jó és stabil kettős expressziót értünk el, a primer endothel sejtekben a transzdukció hatékonysága lényegesen alacsonyabb volt, valamint az egyes reagens szériák nem voltak azonos minőségűek. Ezért a különféle sejtvonalak összehasonlítása lényegesen több időt igényelt, mint terveztük. Ezen felül a szokásos mozgóképes rögzítés helyett rövid felvételeket kellett alkalmaznunk közvetlen az inkubátor mellett, mert a coeliakiás sejtek a rendszeres fluoreszcens fénnel történő exponálás mellett (még az UV gerjesztést is elhagyva) elpusztultak, mely arra utal, hogy ez számukra nehezen tolerálható stressz jelentett. Az OTKA szakmai kollégium engedélyével átcsoportosításból beszerzett fluoreszcens fotófeltéttel azonban jól értékelhető képeket sikerült készíteni, melyek a talinnal asszociált cytoskeleton csökkent dinamikáját, deformálódását, a plazmamembránról való gyakori leválását és a centroszóma körüli összezsugorodását mutatják. Bár nem zárható ki, hogy a GFP-talin megzavarja a fiziológiai interakciókat és magas expressziós szint esetén műtermékekhez vezet, a coeliakiás sejtekben ezek a jelenségek jól reprodukálók és sokkal gyakrabban fordultak elő, mint az azonos módon kezelt egyéb rizikó sejtekben vagy normál kontrollokban.



GFP-Talin coeliakiás (baloldalt, zöld) és normál sejten (jobb oldalt). Élő sejteken készült fluoreszcens felvételek. Sejtmagok jelölése vitális Hoechst festékkel (kék)

A Lipoma-preferred partner protein (Lpp) lehetséges pathomechanikai szerepének vizsgálata

Tóth B, Bogáti R, Király R, Simon-Vecsei Z, Csa S, Barta-Tóth B, Nadalutti C, Lindfors K, Markku Mäki, László Fésüs L, Korponay-Szabo I
Lipoma-preferred partner protein (lpp), a genetic marker for coeliac disease predisposition is interacting with transglutaminase2
 46th Annual Meeting of the ESPGHAN, London, 2013

Bogáti R.

Rekombináns lipoma-preferred partner protein készítése és molekuláris interakcióinak vizsgálata
 Diplomamunka 2013

Az Lpp 612 aminosav hosszúságú adhéziós protein, melynek N-terminális prolin-gazdag régiójában számos gliadin homológ szekvenciaregión található. A Lpp nem kódoló génszakaszain lévő 4 SNP polimorfizmus statisztikailag szignifikánsan gyakoribb a coeliakiásokban (Hunt Nat Genet. 2008;40:395-402). Ez felvetette annak lehetőségét, hogy más olyan variációk is előfordulhatnak a fehérjében, melyek révén az érintettek a glutenre kórosan reagálhatnak. A glutenre hasonlító normál Lpp szekvenciákra a thymusban fiziológiásan kialakuló T-sejt tolerancia defektív lehet, vagy a gliadinra hasonlító szekvenciákhoz kapcsolódó kötődési partnerek normális működését megzavarhatják az étellel fogyasztott glutenből származó peptidek. Az Lpp N-terminális régiójához három LIM domén kapcsolódik, melyek az effektor mechanizmusokban, a nukleális transzportban és a protein-protein interakciókban játszanak szerepet. Ismert, hogy az Lpp kapcsolódik az alábbi fehérjékhez: alfa-aktin, VASP (vazodilatátor-stimulált foszoprotein) LASP-1 (LIM és SH3 domén protein 1), palladin. Az Lpp nagy mennyiségben elsősorban simaizomsejtekben expresszálódik, de előfordul endothel sejtekben is.

LPP [Homo sapiens]

GenBank: AAC50739.1

[GenPept Graphics](#)

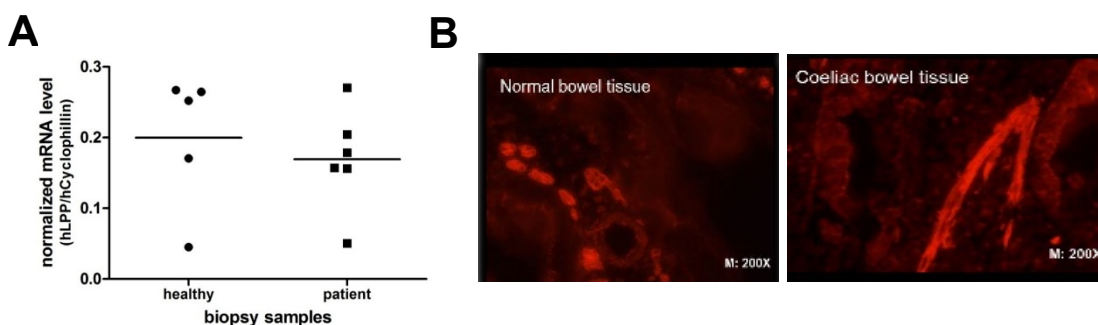
>gi|1537030|gb|AAC50739.1| LPP [Homo sapiens]

MSHPSWLPPKSTGEPLGHVPMETTHSFGNPSISVSTQPPKPFAPVVPKPKYNPYKQPGGEGDFLPP
 PPPPLDDSSALPSISGNFPPPPPLDEEAFKVGQNGPGKTLLEERRSSSLDAEIDSLTSLADLECSPYKPR
 PPQSSTGASTAPPVSTPVTGHRMVIQNPPLTATKKSTLKPQAPQAGPIVAPIGTLKQPPQVPASY
 TTASTSSRPFTFNQVKSAPSPHYMAAPSSGQIYSGPGQYNTQPVVSGQCPPPSTRGMDYAYIPPPG
 LQPEPGYGYAPNQGRYYEGYAAAGPGYGGRRNDSDPTYGQQGHPNTWKREPGYTPPGAGNQNPMPYPTG
 PKKTYITDPVSAPCAPPLQPKGGHSGQLGPSSVAPSRPEDELEHLTKMLYDMENPPADEYFGRCARCG
 ENVVGEGETGCTAMDQVFHVDCFTCIICNNKLRGQPFYAVEKKAYCEPCYINTLEQCNVCSKPIMERILRA
 TGKAYHPHCFCTVMCHRSLDGIPFTVDAGGLIHCIEDFHKKFAPRCSVCKEPIPPAPGQEEVTRVALDR
 DFHVHCYRCEDCGLLSEGDNGGCYPLDGHILCKTCNSARIRVLTAKASTDL

Domain	414 – 473	60	LIM zinc-binding 1
Domain	474 – 534	61	LIM zinc-binding 2
Domain	535 – 603	69	LIM zinc-binding 3
Compositional bias	41 – 370	330	Pro-rich

A humán Lpp fehérje aminosav szekvenciája (gluten homológ részek aláhúzással jelölve) és doménszerkezete

Kísérleteinkben megállapítottuk, hogy az Lpp mRNS expresszió nem különbözik coeliakiás és nem coeliakiás vékonybélbiopsziás mintákban (n=11) és endothel sejtvonalakban (n=4) és a fehérje festésével sem kaptunk eltérő eredményeket. Az általunk elkészített rekombináns humán Lpp megfelelő térszerkezetű és specifikus antitest reagensek számára jól felismerhető, viszont a coeliakiás szérum antitestek számára nem volt jelentős antigén - bár a coeliakiás minták szignifikánsan magasabb reaktivitást (median 0.114) adtak ELISA vizsgálattal, mint a normál kontrollok (0.036, p<0.005).



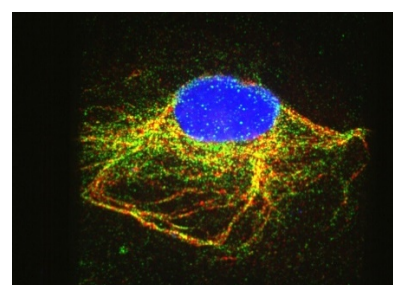
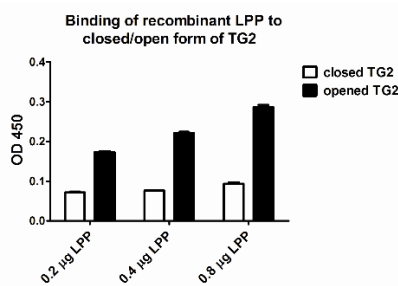
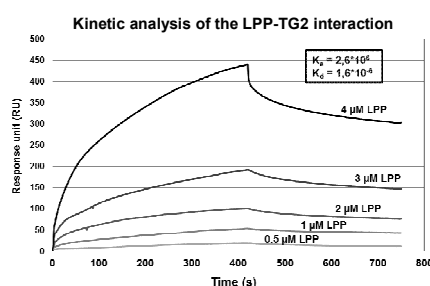
A humán Lpp mRNS (A) fehérje (B) expressziójának összehasonlítása coeliakiás betegekben és normál egyéneknél

Az Lpp szekvenciáját 47 coeliakiás betegben vizsgáltuk, akik közül a coeliakiára hajlamosító **rs1464510** polimorfizmus T alléljét 36-an hordozták homozigóta vagy heterozigóta formában. A heterozigótáknál külön csoportban vizsgáltuk a súlyos klinikai prezentáció (malabszorpció) miatt és a családtagként tünetmentesen diagnosztizált (silent) betegeket.

CD patients	rs1464510	Number of samples
G	GG	11
H	GT (malabsorption)	12
S	GT (mild or silent)	12
T	TT	12

Az N-terminális gliadin homológ szekvenciákat specifikus primerekkel, a három LIM domént Roche ampikon könyvtárban szereplő panelekkel (ampikon 3,4) vizsgáltuk. Az N-terminális szakaszon egyik betegben sem találtunk eltérést, a LIM doménekben egy betegnél és 2 kontrollnál aminosav cserét nem okozó varációt (535 CGA→CGG) mutattunk ki. Adataink alapján elvethető Lpp germ-line mutáció oki szerepe a coeliakia kialakulásában, de tovább vizsgáltuk, hogy a normál szerkezetű Lpp fehérje kölcsönhatásai révén szerepet játszhat-e a coeliakiához vezető molekuláris mechanizmusokban.

A coeliakiás TG2 autoantigén és az Lpp fehérje direkt molekuláris kölcsönhatását *in vitro* és *in vivo* is bizonyítottuk. A plasmon surface rezonancia vizsgálattal a humán rekombináns TG2 és Lpp 1.6×10^{-6} Kd értékkel jellemezhető erős interakciót mutatott. A kölcsönhatás kifejezettebb a TG2 nyitott formájával. Domén mutánsokkal végzett mérések alapján a kölcsönhatásban a TG2 core és C-terminális doménje is részt vesz, azonban nem szükséges hozzá a TG2 enzimaktivitása, mivel a kötődés a C277S aktív hely mutáns TG2 fehérjével is létrejön. A két fehérje ko-lokalizációját multicolor immunfluoreszcens vizsgálatokkal szövetmetszeteken és sejtkultúrában is kimutattuk. Az Lpp és TG2 kölcsönhatásban a TG2 intracelluláris, aktin filamentumokkal asszociált formája vesz részt, míg az ezt a formát felismerő antitestek az extracelluláris TG2-t nem ismerik fel, így feltehető, hogy az Lpp kötődéshez speciális TG2 konformáció szükséges. Az Lpp és TG2 közös lokalizációja megfigyelhető volt az adhéziós komplexekben és a lamellipodiumokban is, azonban itt mindkét fehérje felismeréséhez ismét eltérő epitóp specificitású antitest reagensek kellenek. A TG2-t a coeliakiás epitóppal interferáló MAb885 vagy a fibronektin kötőhelyre specifikus 4G3 antitest ismerte fel az adhéziós komplexekben, a szokványos reagensek alig. Az Lpp-t az adhéziós komplexekben egy monoklonális nyúl antitesttel lehetett láthatóvá tenni, míg az Lpp 318-334 peptidre specifikus egér antitesttel nem. Sajnos a gyártó a nyúl monoklonális antitest immunogén peptidjére vonatkozó információt nem hozza nyilvánosságra, így csak azt a következtetést tudjuk levonni, hogy a komplexben a 318-334 aminosavak involváltak és fedésbe kerülnek, nem hozzáférhetők.

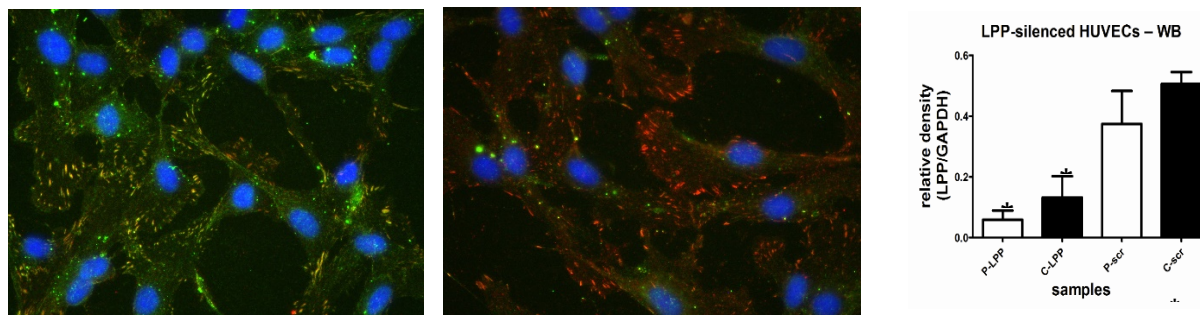


Lpp (piros) és TG2 (zöld) endothel sejtekben

Tóth B, Barta-Tóth B, Ujházi B, Nemes É, Gyimesi J, Caja S, Kerekes T, Lindfors K, Nadalutti C, Fésüs L, Mäki M, Korponay-Szabó IR. **A sejtheadhéziós anyagcsereutak zavara coeliakiás betegek köldökzsinór endotél sejtjeiben**
A Magyar Gyermek-Gasztroenterológiai Társaság 4. kongresszusa, Hajdószoboszló, 2014

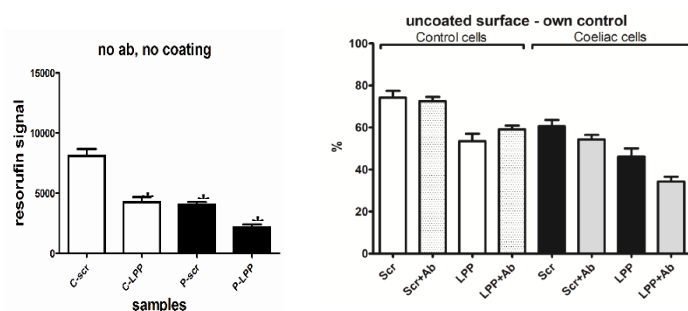
Tóth B, Király R, Simon-Vecsei Z, Caja S, Barta-Tóth B, Bogáti R, Nadalutti C, Lindfors K, Markku Mäki, László Fésüs L, Korponay-Szabó I. **Primary deficiency in cellular adhesion in coeliac disease manifest in umbilical cord endothelial cells at birth and related to the lipoma-preferred partner (Lpp) protein pathway**
submitted manuscript

Az Lpp coeliakiában betöltött szerepének további vizsgálatára normál és coeliakiás sejtekben csendesítési kísérleteket végeztünk. Az Lpp-t pLKO Tet-On vektorral bevitt Lpp-specifikus szekvenciával csendesítettük, melyek hatása doxycyclinnel indukálható. A vektorokat előzetesen HeLa sejteken optimalizáltuk. A kísérletekhez 4 normál és 4 coeliakiás beteg köldökzsínórból preparált újszülöttkori, pBABE vektorral bevitt telomerázzal immortalizált sejtjeit használtuk, azaz a coeliakiás sejteket módunk volt még a gluten hatás és a betegség kialakulása előtti állapotukban tanulmányozni. Az Lpp mRNS jelentős csökkenése már 72 óra után mérhető volt, a fehérje azonban immunfluoreszcens detektálással csak 17 nap után tűnt el az adhéziós komplexekből, ami az Lpp strukturális jellegével magyarázható.

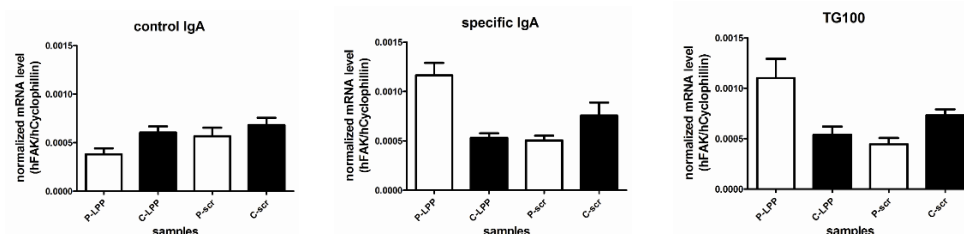


Lpp (zöld) és vinculin (piros) fehérje kimutatás scramble vektorral kezelt (A) és Lpp-csendesített (B) coeliakiás sejtekben

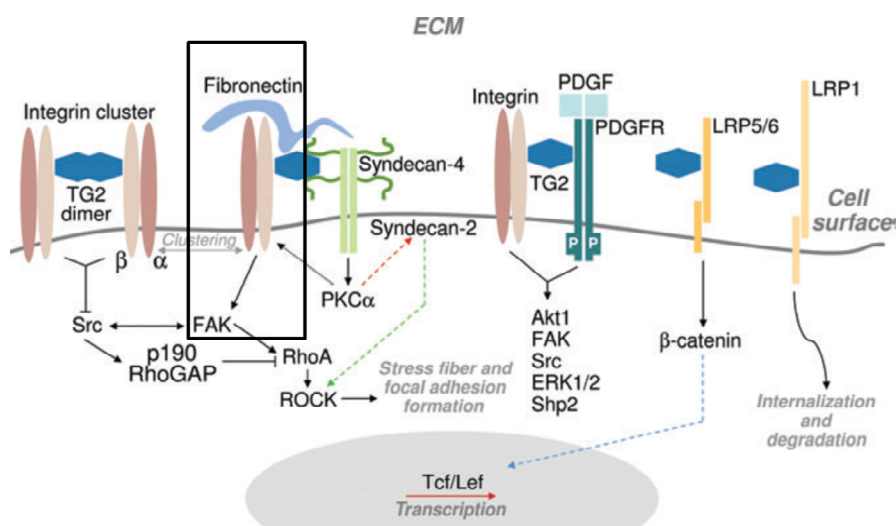
Az Lpp csendesített sejtek a scramble szekvenciával kezelt kontroll sejtekhez képest mind a normál, mind a coeliakiás sejtek esetében szignifikánsan csökkent adhéziót és proliferációt mutattak. A vizsgálatokat resorufin hozzáadásával real time sejtszám méréssel végeztük, 1 óra adhéziós idő után. Mivel a coeliakiás sejtek már eleve csökkent adhéziós képességgel rendelkeztek, és ez tovább, gyakran kritikus értékre csökkent az Lpp csendesítés után, a kísérleteket kollagén felszínre történő adhézió vizsgálatával is kiegészítettük, mely kedvezően befolyásolta a coeliakiás sejtek túlélését. Az összehasonlítás érdekében minden kísérleti elrendezésben az 1 óra alatt letapadó sejtek százalékos arányát számítottuk ki az összes letapadt sejthez viszonyítva. Ennek alapján az Lpp csendesítés nagyjából hasonló mértékben csökkentette a normál (ábrán C, control) és coeliakiás (P, patient) sejtek letapadását a kiindulási szintekhez képest, így arra utalt, hogy az eredetileg már fennálló különbségért elsődlegesen nem az Lpp funkciózavara felelős. A coeliakia szempontjából fontosnak tartottuk azt is megvizsgálni, hogy a TG2 csökkentése miképp befolyásolja az Lpp hiányos sejtek viselkedését. A TG2 csendesítést azonban sem a normál, sem a coeliakiás sejtek nem tolerálták, Lpp csendesítés nélkül sem. Tekintettel arra, hogy az extracelluláris TG2 gátlása vagy coeliakiás anti-TG2 antitestek hozzáadása is csökkenti normál sejtek adhézióját, az Lpp csendesítést anti-TG2 antitestek egyidejű adásával kombináltuk. A 4.1-es VH5 szerkezetű humán IgG klónozott coeliakiás antitest azonban nem befolyásolta számottevően a sejtek viselkedését, ezért humán placentából (frissen diagnosztizált coeliakiás szülő nőtől) tisztított természetes coeliakiás IgA antitesteket alkalmaztunk, melyek a szövetekben lerakódott antitesteket reprezentálják. Eritóp teszteléssel kimutattuk, hogy ezek az antitestek (hasonlóan az egyéb szövetekben, pl. a myocardiumban kimutatott patogén antitestekhez) a 2-es TG2 epitópra kötődnek, azaz a VH3 szerkezetnek megfelelő tulajdonságúak. A placentából tisztított TG2-specifikus IgA (ábrán +Ab) adhézióra kifejtett negatív hatása kifejezettebb volt a coeliakiás sejteken, különösen akkor, ha egyidejűleg az Lpp-t is csendesítettük. Ezzel szemben a normál sejtek adhéziója alig változott.



Önmagában az Lpp csendesítés nem okozott jelentős eltérést a legtöbb adhéziós fehérje és kötődési partner mRNS expressziójában, míg a TG2 esetében változó értékeket kaptunk az egyes sejtvonalaknál. Amennyiben azonban anti-TG2 antitesteket is alkalmaztunk egyidejűleg, a coeliakiás sejtek nagymértékű szelektív FAK emelkedéssel reagáltak, mely arra utal, hogy az Lpp és TG2 együttes kikapcsolására fokozottan érzékenyek és a FAK emelkedést kompenzációs mechanizmusként használják. A FAK emelkedés létrejött nemcsak a coeliakia-specifikus IgA hozzáadása esetén, hanem akkor is, ha más epitópra ható kereskedelmi anti-TG2 antitestek (TG100, NeoMarkers) alkalmaztunk.



Eredményeink összhangban vannak Nanayakkara és mtsai időközben megjelent közleményével (PLOS One. 2013;8:e79763), ahol már diagnosztizált és diétát folytató coeliakiás betegek bőréből illetve vékonybélből preparált fibroblastoknál fokozott FAK tartalmat mutattak ki. Ugyanakkor saját kísérleteink azt is igazolják, hogy a FAK emelkedés eredetileg nem áll fenn, csak a sejtekre ható kényszerítő körülmények között jön létre, pl. az Lpp tartalom (vagy más adhéziós komponens) csökkenésekor a TG2-t zavaró második mechanizmus (antitestek) hatására, viszont megfelelő körülmények között már a coeliakia klinikai kialakulása előtt kiváltható. Ezzel az első olyan specifikus eltérést azonosítottuk, mely a coeliakiás betegek eleve meglévő sejtszintű defektusára utal, és melyre diagnosztikus vizsgálatokat érdemes tervezni a betegség előrejelzése céljából. Az adhéziós mechanizmusok mechanikai erőt képező többszörös protein-protein interakción alapulnak, melyek additívak és a FAK emelkedés kompenzálhatja más adhéziós anyagcsere útvonal defektusát. A FAK az integrinek átrendeződése révén többféle mechanizmussal is emelkedhet, melyekben az antitestek és az extracelluláris TG2 is szerepel játszik (áttekintő ábra Belkin után). Összességében az eredmények azt igazolják, hogy a coeliakiás sejtek eredendő defektív anyagcsere útvonala az Lpp és TG2 mellett valamely más redundáns adhéziós útvonalon lehet, melynek kedvezőtlen hatását a sejtek egész addig kompenzálni képesek, amíg az Lpp és a TG2 működése nem szenved zavart. A coeliakia pathomechanizmus során kialakuló eltérések viszont ezt a kompenzációt megbolygatva vezethetnek kóros következményekhez.



Belkin, FEBS Journal 2011

Az Lpp szerepének értékeléséhez eredetileg terveztük Lpp^{-/-} egér sejtek vizsgálatát is, de az állatmodell kollaboráció keretében nem sikerült megszerezni. Az Lpp^{-/-} egeret kifejlesztő kutatócsoport időközben feloszlott, a szerzők a megkeresésekre egyáltalán nem is válaszoltak, az első szerző feltehetően abbahagyta

az ezzel foglalkozó (Ph.D) munkáját. Mivel az Lpp-/- egénnél az eredeti közlemény szerint önmagában az Lpp hiánya miatt nem alakul ki boholyatrophia és saját kutatásaink azt mutatták, hogy a biológiai hatással rendelkező VH3 típusú anti-TG2 coeliakiás antitestek humán-specifikusak, azaz nem ismerik fel az egér TG2-t és atymikus egéren sincs hatásuk, az Lpp-/- egérmodell saját kifejlesztését nem tartottuk érdemesnek és célravezetőnek. Ezért a továbbiakban egyrészt modellként hasznosítható humán anyagokon vizsgáltuk a molekuláris mechanizmusokat, másrészt vizsgálatainkat más adhéziós molekulákra is kiterjesztettük.

Korponay-Szabo IR, Tóth B, Ujházi B, Fésüs L, Zilahi E, Maki M, Felszeghy E, Mogyorósy G.

Molecular basis for the myocardium involvement in coeliac disease

United European Gastroenterology Journal 2013;1:(Suppl 1) p. A579.

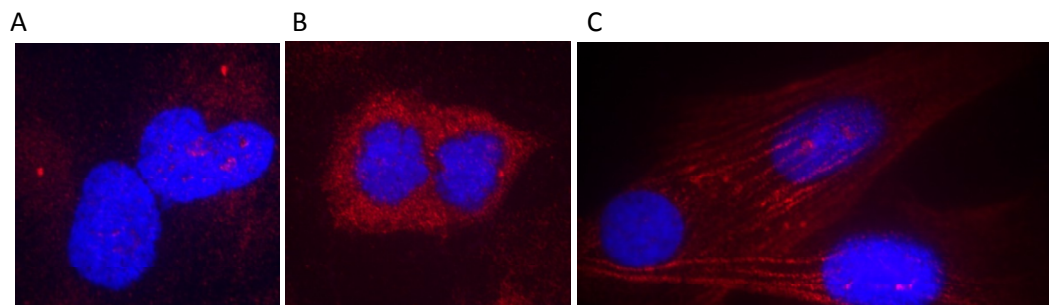
Biri B, Kiss B, Király R, Schlosser G, Láng O, Köhidai L, Fésüs L, Nyitray L.

Metastasis-associated S100A4 is a specific amine donor and an activity-independent binding partner of transglutaminase-2.

Biochem J. 2016 Jan 1;473(1):31-42.

Impakt faktor: 3.582

A súlyos szívelégtelenséggel jelentkező coeliakiás betegek myocardium mintáiban az endomysiumon lerakódott anti-TG2 antitesteket találtunk, ezért vizsgáltuk az izomsejtek egyéb alkotórészeit, többek között Z vonal proteinek és a dystrophint is, bár ezekben defektív mennyiséget vagy elrendeződést kimutatni nem sikerült. Egy kollaboráló csoporttal közösen a TG2 és az S100A4 fehérje direkt kötődését szintén leírtuk. Az S100A4 a myosinnal kapcsolódva részt vesz a cytoskeleton stabilizálásában, a sejtek mozgásában és az adhézióban, közvetlenül kapcsolódni tud a talinnal (Indo, J Clin Biochem Nutr. 2015;57:13-20) és az integrinokkal is. Coeliakiás endothel sejtekben nem észleltünk kóros elrendeződést, viszont az izomsejtekben fokozott, az aktin hálózathoz kötődő S100A4 expressziót találtunk, melynek további vizsgálatát tervezzük. Megemlítendő, hogy a gluten homológiát vizsgáló további kísérleteink (ld. lejjebb) szintén azonosítottak további adhéziós molekulákat, melyeket érdemes tovább vizsgálni.



A S100A4 fehérje expressziója coeliakiás endothel (A:interfázis, B:oszlás során) sejtekben és izomsejtekben (C)

A glutenválasz finomabb analízise mimikri lehetőségének elbírálására

Korponay-Szabo IR, Koletzko S, Gyimesi J, Castillejo G, Mummert E, Bravi E, Ribes-Koninckx C, Polanco I, Shamir R, Kolacek S;Troncone R;Mearin ML

Evolution and HLA-association of the early infantile gliadin antibody response in a high-risk cohort for coeliac disease.

United European Gastroenterology Journal 2013;1:A581.

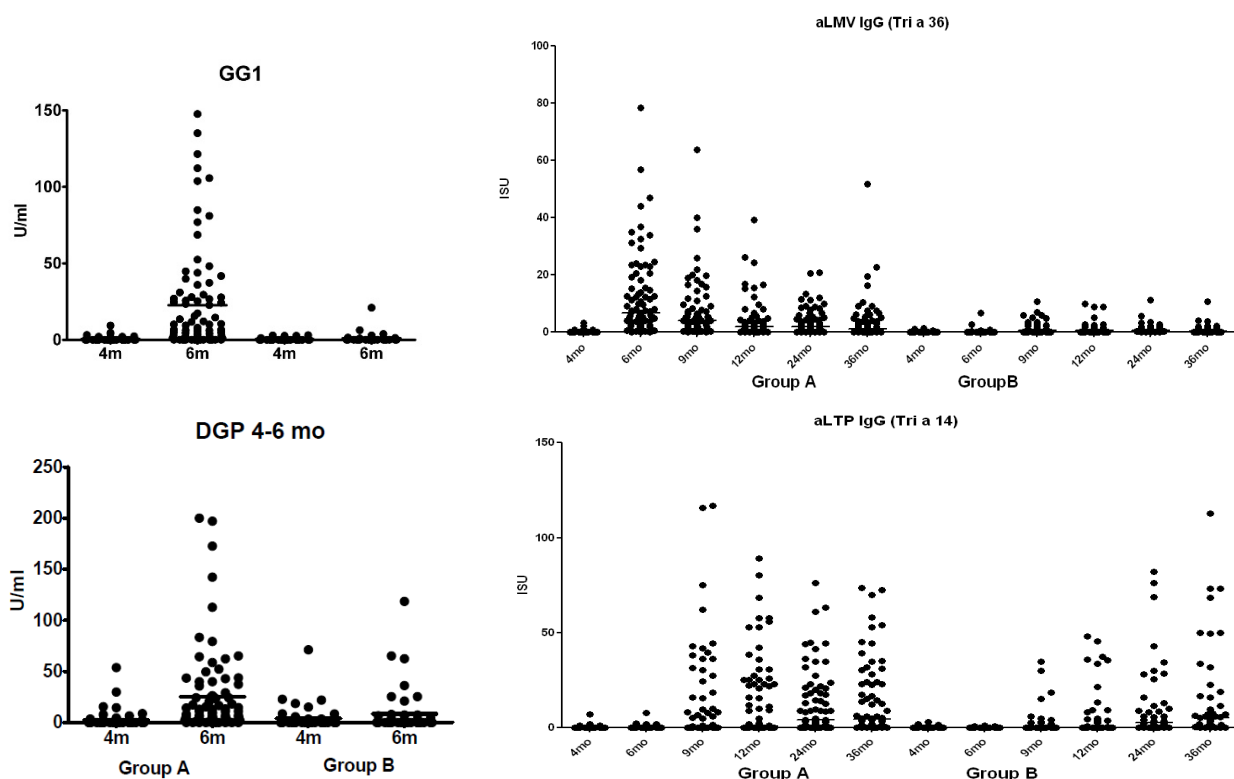
Ilma R Korponay-Szabó IR, Srinivasan B, Pahr S, Werkstetter K, Gyimesi J, Mearin ML, Valenta R, Koletzko S

Analysis of the early infantile gliadin antibody response by recombinant food allergen microarray and prospective evaluation of a protective role

49th Annual Meeting of the ESPGHAN, Athens, 2016

Mivel megfelelő állatmodell továbbra sem áll rendelkezésre, a glutenre adott primer immunválasz molekuláris mechanizmusainak értékelésére felhasználtuk azt a prospektív, fiatal csecsemőkön végzett, randomizált, kettős vak vizsgálatot, ahol 4 hónapos korban a gyermekek azonos mennyiségű, napi 100 mg tisztított glutenport kaptak az A csoportban, míg a B csoportban placebo, és ezzel lényegében ideális humán kísérletnek megfelelő elrendezés alakult ki. A vizsgálat célja eredetileg orális tolerancia kialakítása volt

ezekkel az igen alacsony gluten mennyiségekkel (Vriezinga, 2014). Azonban már a kezdeti eredmények alapján nyilvánvalóvá vált, hogy a napi 100 mg gluten erősen immunogén és az egészséges gyermekek is immunválaszt alakítanak ki. A jelen tanulmányban a követési idő alatt (4,6,9,12,24 és 36 hónapos kor) levett vérmintákból kiegészítő vizsgálatokat végeztünk. Meghatároztuk a deamidált és nem deamidált gluten peptidek elleni antitest választ, majd MedAll chip alkalmazásával vizsgáltuk az egyéb búzafehérjék (n=25) és táplálékfehérjék (n=152) elleni IgA és IgG reaktivitást. Ezen kívül a vad TG2(Val224) és annak epitóp mutánsai is szerepeltek a chip-re kötött antigének között, annak megállapítására, hogy az autoimmunitás mikor kezdődik és milyen kezdeti TG2 epitópokat érint. Az eredményeket 3 éves korban, a randomizációs kódok felnyitása után értékeltük. Megállapítható, hogy 6 hónapos korban a fogyasztott gluten peptidek elleni IgA és IgG antitest reaktivitás 92.7% megbízhatósággal (accuracy) jelzi, hogy ki kapott és ki nem kapott glutent, a ROC görbe alatti terület 0.961 volt. Az antitestválasz azokra a frakciókra rendre kialakult, amelyet benne voltak a tisztított gluten porokban (deamidált (DGP) és gamma-gliadinok (GG1), magas (HMW) és alacsony molsúlyú (LMW) gluteninek, amylase-trypsin inhibitorok (ATIs)). Viszont a nem gluten fehérjék elleni válasz (pl.LTP) csak akkor kezdett emelkedni, amikor a gyermekek a porok után már szokásos élelmiszerekben is kaptak búzalisztet. Az eredményekben meglepő, hogy az egészséges gyermekek is reagáltak deamidált gluten peptidek elleni antitestek képzésével, holott ezek jelenlétét korábban coeliakiára specifikusnak és diagnosztikus értékűnek tartották. Viszont a TG2 elleni reaktivitás a fiatal korban klinikai diagnosztizált coeliakiásokkal egyező epitópokra kezdődött és specifikusan csak a betegség megjelenésekor vált észlelhetővé. Ezzel egyidejűleg az epitóp specifitás detektálására kialakított kit diagnosztikus validálása is megtörtént.



Csóke Á.

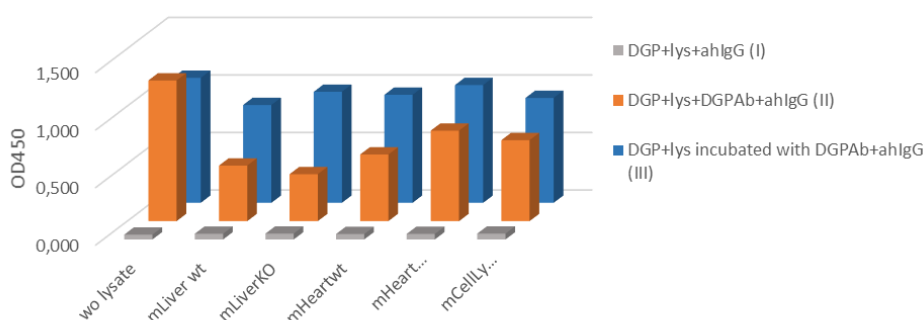
A deamidált gliadin elleni antitestek és lehetséges emlős-keresztreakáló fehérjék vizsgálata

Diplomamunka, 2016

Az előző tanulmányban fiatal életkorban vizsgált gyermekek savójában talált DGP-ellenes antitesteket használtuk fel a coeliakia kialakulásában feltételezett keresztreakció illetve mimikri értékelésére és specifikus voltának vizsgálatára. Első lépésként CnBr aktivált oszlophoz között deamidált peptidek segítségével

megtisztítottuk a specifikus IgA és IgG antitesteket, majd protein G oszlop segítségével tovább tisztítottuk a készítményeket. Manifeszt coeliakiában szenvedő gyermekek (A, n=5), valamint DGP antitest pozitív, később coeliakiássá vált (B, n=3) és DGP antitest pozitív, de később coeliakiássá nem vált csecsemők savójából (C, n=3) készítettünk antitesteket. A megtisztított antitestek ELISA vizsgálat szerint specifikusak voltak a deamidált gluten szekvenciákra.

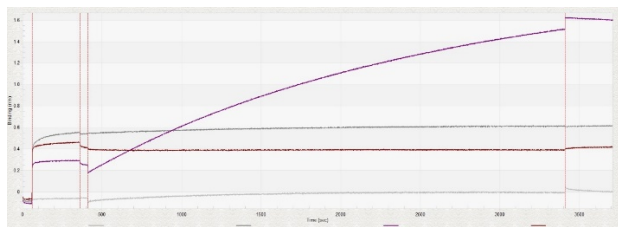
A tisztított DGP antitestekkel sejtlizátumokat és szövetkivonatokat vizsgáltunk keresztreakáló emlősfehérjék kimutatására Western blot és ELISA módszerrel, valamint bio-layer interferometriával (Bli) ForteBio Octet készüléken, mely direkt molekuláris interakciókat mér optikai eszközökkel, ahol nincs szükség szekunder jelölő antitestekre az interakciós partnerek detektálására. Az Octet készüléken kollaboráció keretében a Tamperei Egyetemen (Finnország) volt lehetőségünk mérni. A jelölésmentes mérési technikára azért volt szükség, mert a kísérletek egy szakaszában az interakciót adó kötődési partnerek kiléte nem volt ismert és azokat antitesttel közvetlenül felismerni nem tudtuk. Mivel korábbi eredményeink (Korponay és mtsai JPGN 2008;46:253-61) szerint az elsődleges keresztreakció a TG2 antigénnel már bizonyított, ezt elkerülendő, TG2 hiányos rendszerekben dolgoztunk. Egyrészt TG2^{-/-} egér szövetlizátumokból (máj, szív) és TG2^{-/-} egér aorta szegmensekből preparált primer mesenchymális sejt kultúra sejtlizátumból tisztítottunk. Másrészt olyan humán, intézetünkben rendelkezésre álló promyelocytás leukemia sejt vonalat (NB4) alkalmaztunk, melyben a TG2 expressziót korábban stabil transzfekcióval csendesítették (NB4TG2-KD). Az NB4TG2-KD és a kiindulási NB4 sejteket egyaránt all-transz retinsavval kezeltük, mely fokozza a TG2 expressziót, így ellenőriztük, hogy a KD sejtek tényleg nem képesek TG2 termelésére. Az A, B és C csoportban lévő személyekből tisztított anti-DGP antitestek egyformán jól felismerték a DGP peptideket, aviditásukban sem volt különbség. Azonban az A csoport-beli savókból lényegesen több antitest volt nyerhető. A manifeszt coeliakiás (A) és a csecsemőkori első glutenbevitelkor termelt antitestek (B,C) nem különböztek az egér illetve NB4 lizátumokkal adott reakcióban sem. Minden preparátumban elsősorban anti-IgG reaktivitást találtunk, specifikus sávokat nem. Nem volt továbbá különbség a vad és TG2^{-/-} illetve a normál és TG2-KD lizátumok között sem Western blot vizsgálatok alapján. Ennek ellenére, ELISA mérésekben megállapítható volt, hogy a lizátumokban lévő alkotórészek zavarják a tisztított anti-DGP antitestek kötődését a DGP-hez. Ez a kompetíció a TG2-hiányos mintákban kifejezettebb volt, mint a normál szövetlizátumokban. A további vizsgálatok azt mutatták, hogy a lizátumban a DGP-hez kötődő fehérjék vannak, mert a jel csökkenése akkor is bekövetkezett az ELISA reakcióban, ha a DGP-t először a lizátummal inkubáltuk és az anti-DGP antitesteket csak annak lemosása után adtuk hozzá.



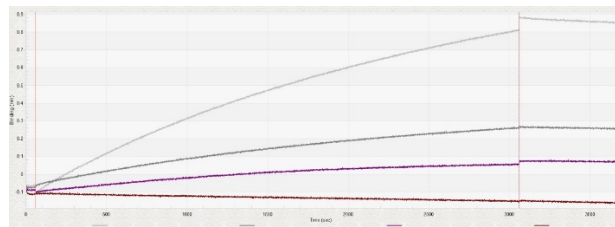
Ezt követően a DGP antigént kovalens kötést eredményező reakcióval mágneses gyöngyökre kötöttük, és nagyobb mennyiségű TG2^{-/-} lizátumból (máj, sejtlizátum) megtisztítottuk a DGP-reaktív fehérjét, majd a gélből kivágott sávokat LC-MS-MS vizsgálattal analizáltuk. A tisztított eluátumok az Octet készülékkel történt direkt interakciós mérés során specifikusan és dózis-dependensen reagáltak a fő deamidált gliadin peptiddel (PLQPEQFPF), míg annak nem deamidált natív peptidjével (PLQPQQFPF) és irreleváns random peptiddel

nem. A kötődési görbéből látható, hogy magas affinitású kötődésről van szó, a korrekt Kd értéket azonban az interakciót adó molekulá(k) pontos molekulatömegének ismerete nélkül egyelőre nem tudtuk kiszámítani. A lizátumok az általunk korábban vizsgált extracelluláris és sejtes fehérjékkel (fibronektin, vinculin, Lpp, calreticulin) nem adtak jelet.

A



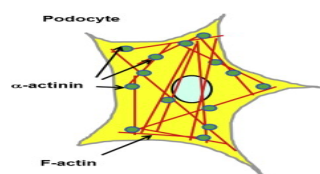
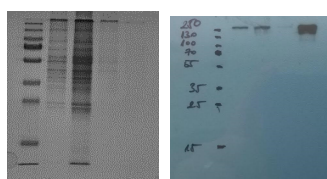
B



Bio-layer interferometriás görbe streptavidin felszínre rögzített biotin-SGGPLQPEQFPF, biotin-GGGLQPQQFPF és irreleváns biotinilált peptiddel. A TG2^{-/-} májszövetből megtisztított DGP-interaktáns fehérje specifikus (A) és dózis-dependens (B) kötődése a deamidált szekvenciához

A tisztított sejt kivonatok Coomassie festéssel csak igen halvány sávokat adtak, de a membránban szétválasztott fehérjéket DGP peptiddel majd anti-DGP antitesttel kezelve jelentős sávok mutatkoztak, elsősorban a 250 kD feletti tartományban, ugyanakkor egyes preparálásoknál 64 kD és 120 kD körül is kaptunk jelet. A 64 kD sáv tömegspektrometriás analízisével elsősorban mitochondriális enzimeket és citoplazmatikus egér fehérjéket valamint actinin-4-t azonosítottunk, a 120 kD sávban csupán 2 egér fehérje volt: aktin és AHNAK fragmentumok. Az AHNAK 600 kD molekulatömegű óriás, pálcaszerű adhéziós fehérje, melynek ismert a kölcsönhatása az S100 fehérjékkel és más sejt motilitásban szerepet játszó komponensekkel. Az egér és humán AHNAK jelentős homológiát mutat. A tömegspektrometriás analízis egérspecifikus szekvenciákat mutatott, de ez az eredmény nem zárja ki, hogy a tisztítási lépés során a fehérje olyan szekvenciával kötődött a DGP gyöngyökhöz, mely közös a humán AHNAK szerkezetével. Jelenleg további vizsgálatokat végzünk annak igazolására, hogy a magas kD sávokban kapott jel is AHNAK-nak tulajdonítható-e. Feltehető, hogy a tisztítási lépések során egy ilyen nagy protein degradálódhat, ezért jelent meg az alacsonyabb sávokban is.

1 2 3 4 1 2 3 4



DGP peptiddel tisztított TG2^{-/-} egér máj lizátum gélképei. 1-lizátum, 2-átfolyó, 3-mosó, 4-eluátum a mágneses gyöngyökről. A jobboldali képen DGP és anti-DGP antitest hozzáadásával immunblottal láthatóvá tett reaktív sávok

Az actinin-4 és az AHNAK releváns találat lehet a coeliakia szempontjából. Az AHNAK jelentős adapter a cytoskeleton plazmamebránhoz való rögzítésében, ezért érdekesnek látszik a coeliakiás sejteken észlelt rendellenes talin-asszociált struktúrák szempontjából is. A fehérje szekvenciájának vizsgálata – óriási mérete miatt - várhatóan hosszabb időt vesz majd igénybe. Az actinin-4 szintén fontos szerepet játszik az aktin filamentumokból képzett hálózat merevítésében és ezért szintén közrejátszhat a cytoskeleton abnormitásban. Változásait a podocytaiban leírták a diabeteses nephropathia létrejöttében. Elképzelhető, hogy a bejutott glutenből származó DGP peptidek ezen struktúrákhoz való kötődése kapcsolatos a coeliakia pathomechanizmussal és szerepel a TG2 elleni autoimmunitás provokálásában. A vizsgálati eredmények alapját képezték egy Msc diplomamunkának, melyet további adatokkal kiegészítve in extenso közleményben megjelentetni szándékozunk.

Epitóp dokkolási eredmények és mimotóp peptidek identifikálása

Kiss Z, Juhász A, Gellért Á, Korponay-Szabó IR.

Potenciális gliadin T-sejt mimotópok a humán proteomban

Magyar Gyermekgastroenterológiai Társaság 4. kongresszusa, Hajdúszoboszló, 2014

Juhász A, Kiss Z, Gellért Á, Korponay-Szabó IR.

Identification of potential human mimotopes of cereal gluten epitopes related to celiac disease
manuscript

A coeliakia egyik legfontosabb jellemzője a döntően deamidált gluten peptidekre specifikus T lymphocyták jelenléte a vékonybélben, de ezek eredete pontosan nem tisztázott. Normál egyénekben – a gluten fogyasztása ellenére – ilyenek nem mutathatók ki, bár egyelőre nem tisztázott, hogy a DGP ellenes csecsemőkori antitest válaszban más T-sejtek játszanak-e szerepet. Kiinduló hipotézisünk az volt, hogy a gliadin hasonlíthat egyes humán fehérjékre, így normál körülmények között a thymusban ezekre kialakuló immuntolerancia gátolja a glutenre kialakuló immunválasz eszkalációját. A coeliakiás betegeknél lehetnek variációk vagy mutációk ezekben a fehérjékben, mely miatt az immuntolerancia másképp alakul ki vagy egyáltalán nem jön létre, és így a gluten bejutásakor reaktív és triggerelhető T sejtek megmaradnak.

A hipotézis vizsgálatára kísérletes és bioinformatikai eszközöket alkalmaztunk. 2000-ben Kumar és munkatársai (J.Mol.Biol. 2000; 300:1155-67) gliadin cDNS alkalmazásával 4 lehetséges homológot találtak, akkor azonban még nem vették figyelembe, hogy a TG2 enzim által generált gliadin deamidáció fontos a T-sejt epitóp létrejöttében, és nem álltak még rendelkezésre kristályszerkezeti adatok a gliadin peptidek dokkolásáról az antigén prezentációban közreműködő HLA-DQ2 illetve DQ8 molekulákon. Ezért saját vizsgálatainkban a coeliakiás T sejtek számára kísérletesen igazoltan felismerhető gluten peptidekből indultunk ki. Mivel elsősorban 3 dimenziós mimikrit kerestünk, nyilvánvaló volt, hogy egyszerű szekvencia homológiával ezeket azonosítani nem lehet. Az utóbbi években azonban jelentősen fejlődtek a bioinformatikai adatbázisok, mint pl. a humán proteom, a gliadin epitóp és DQ2/DQ8 prezentált peptid gyűjtemények, valamint a molekuláris modellezési és predikciós lehetőségek (pl. molekuláris dinamika szimuláció, dokkolási algoritmus programok), melyek alapján definiálható néhány horgonyzó oldallánc és ezt alkalmazva értékelhető a szekvencia variációk szélesebb skálája is. A kezdeti találatok szűkítésére figyelembe vettük a kérdéses protein szöveti expressziós adatait, domén szerkezetét és struktúráisan rendezetlen részeit, mert az autoantigének preferenciálisan a rendezetlen részekben halmozódhatnak. Emellett az adatokat funkcionális annotációt követően összehasonlítottuk az ismert autoantigén adatbázisokkal és megvizsgáltuk, hogy in silico emésztést követően milyen peptidek képződhetnek és azok jelen vannak-e a lymphoid szövetekben leírt proteom adatokban. A részletes analízist a kristályszerkezeti adatok alapján peptid-DQ (EpiDOCK) dokkoló programokkal végeztük. Első lépésként definiáltunk egy 43 peptidből álló core teszt peptidsort, mely tartalmazta az összes leírt T-sejt reaktív gluten szekvenciát és egy 136 natív peptidből álló, ismert MHC DQ2-re kötődő pozitív kontroll peptid készletet valamint összeállítottunk egy negatív kontroll peptidkészletet, mely egyrészt egyenlően reprezentált aminosavak random nonapeptidjeiből, az ismert immunogén deamidált peptidek random szekvenciáiból valamint az IEDB adatbázisban szereplő ligand assay adatok alapján DQ-ra nem kötődő ismert peptid szekvenciákból állt. A Word size 2, BLOSUM62 and PAM30 substitution matrices beállításokkal rövid szekvenciákra optimalizált első keresés 783 potenciálisan homológ, legalább 9 aminosavas hézag nélküli alignment találatot eredményezett, 490 humán fehérjében. A találatok 31%-a 6 gliadin peptid (FPPEQPFQ, PQPEQPFQ, QQPEQPFQ, QQPFPFQ, PQQSFPEQ and QLPEQPQQF) homológjainak felelt meg. Egy összehasonlítás egér fehérjékre indított keresés 103 találatot eredményezett, de ezek közel fele jelentős homológiát mutatott a human találatokkal. A random és DQ dokkolási képesség nélküli peptid készletekkel végzett kontroll keresések mindössze 29 olyan fehérjét (5.9%) találtak, mely a gluten peptidekkel történt kereséssel átfedést mutatott, így az adatok azt mutatták, hogy a találatok nem véletlenszerűek.

A pozitív találatokat a DAVID Bioinformatics Resources 6.7 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>) és InterPro resources alkalmazásával értékelve a DQ2 peptid találatok a legjelentősebb struktúrális és funkcionális tulajdonságok alapján főként zinc finger protein doméneket (22), szerin/threonin-protein kinase doméneket (21), immunoglobulin-like proteineket (11), ankyrin repeat doméneket (10) ATPase core-t (10), epidermal growth factor-like doméneket (9) tartalmztak, a DQ8 peptidek zinc finger protein doméneket, ankyrin repeat doméneket és calponin homology domént tartalmztak. Feltűnő volt a talált fehérjék között ismét a cytoskeleton, adhézis és membrán fehérjék gyakorisága. Ezek közül említést érdemel egy transzglutamináz peptid, a dystrobrevin, különféle integrin alpha láncok, cadherine, actinin és actin-kötő fehérjék, valamint filamentumok alkotórészei.

Az eredmények további szűrésére a következőket vettük figyelembe: 1. mely fehérjék lehetnek jelen extracellulárisan, ahol a prezentáció esélye nagyobb, 2. melyek kapcsolatosak ismert autoantigénnel, 3. melyek jelennek a lymphaticus folyadékban, melynek összetételére a közelmúltban jó adatbázis jelent meg. E szempontok alapján szűkítve 58 fehérje látszott relevánsnak.

A peptideket elemeztük abból a szempontból is, hogy tartalmazznak-e lizoszómális enzim hasítóhelyeket. A fehérjék a lizoszómákban emésztődnek az antigen prezentáció előtt, és ha közben a releváns peptidek elhasadnak, az antigen prezentáció nagy valószínűséggel elmarad. Ezért a továbbiakban csak azoknak a peptideknek a dokkolását végeztük el, melyek in silico rezisztensnek látszottak az alábbi enzimek hatásával szemben: cTEC, mTEC, pDC, mDC, cathepsin B, D, H, S, X, AEP (asparagine endopeptidase) és GILT (gamma-interferon inducible lysosomal thiol reductase).

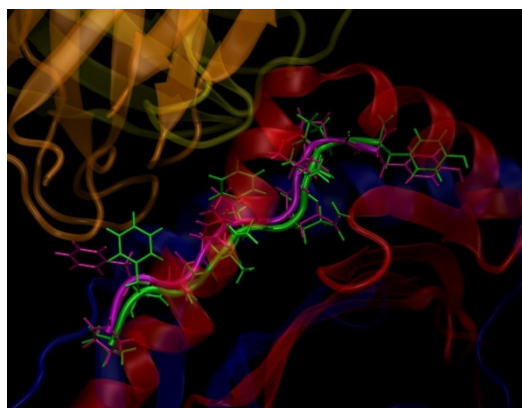
Az így előszűrt adatokkal dokkolási méréseket végeztünk az online EpiDOCK programmal (Atanasova, 2013) a DQ2 és DQ8 molekulákon, ahol a legtöbb peptiddel a gluten peptidekhez hasonló kötődési eredményeket kaptunk. Mivel a DQ molekulába való illeszkedés csak egyik feltétele a T-sejt aktiválási képességnek, a peptidnek a T-sejt receptorral is megfelelően kell érintkeznie. Ezt a tulajdonságot a legjobban megfelelő 20-20 peptiddel ellenőriztük a gluten peptid-MHC-T-sejt receptor ismert hármaskristályszerkezeteken: HLA-DQ2.5-glia- α 1a-S2 TCR (PDB ID: 4OZI) és DQ2.5-glia- α 2 (4OZH) complex, illetve HLA-DQ8-glia- α 1-SP3.4 TCR (PDB ID: 4GG6, Petersen et al. 2014, Broughton et al. 2012). A szerkezetben az eredeti peptidet helyettesítettük a mimotóp jelölt peptidekkel. Ellenőrzésként az eredeti peptid visszadokkolását végeztük, mely a DQ2 peptid (PFPQPELPY) esetében 1.4 Å, a DQ8 peptid (EGSFQPSQE) esetében 0.69 Å pontossággal sikerült. A továbbiakban azokat a peptideket tekintettük potenciális mimotópnak, ahol a dokkolási eredmény (Glide emodel score) minél negatívabb, de legalább az eredeti gluten peptiddel azonos nagyságrendű értéket adott. Meg kell azonban jegyezni, hogy azoknál a peptideknél nem lehetett ezt az analízist elvégezni, melyek nem a fenti kristályszerkezetben leírt peptidek homológjai voltak (a 6 leggyakoribb homológokkal rendelkező gluten peptidről nincs ilyen pontos kristályszerkezeti adat, így valószínűen ebben a lépcsőben releváns pozitív találatok egy része elveszhet).

A T-sejt receptor számára fontos P7 oldalláns tulajdonságait is a dokkolási mutatók mellett figyelembe véve az alábbi peptidek rendelkeztek a legjobb kötődési tulajdonságokkal.

accession	Blast hit	Protein name
Q9H799	PFPQSLNLY	chromosome 5 open reading frame 42
O95239	PFDLPKELKH	kinesin family member 4B; kinesin family member 4A
Q9Y2L5	PLPQLPLPY	KIAA1012
P55771	PTPQPALPY	paired box 9
Q6UB99	PFSASEAPY	ankyrin repeat domain 11; hypothetical protein LOC100128265
Q9H706	PFPHDILPY	hypothetical protein LOC100130616; family with sequence similarity 59, member A

Q66GS9	PVPQPDDPY	centrosomal protein 135kDa
P42704	PFDVPELWY	leucine-rich PPR-motif containing
Q96JG9	PFPSPEPPH	zinc finger protein 469
Q9BXT5	PLPQATYPY	testis expressed 15
Q6P1W5	PFVQPNYPY	chromosome 1 open reading frame 94
Q6VUC0	PYPQPPLPY	transcription factor AP-2 epsilon (activating enhancer binding protein 2 epsilon)
Q8N3S3	PFHQSHLPW	putative homeodomain transcription factor 2
Q8N2S1	PFARREAPY	latent transforming growth factor beta binding protein 4
A2VDJ0	PFVEQEDPY	KIAA0922
P38570	PFAIFQLPY	integrin, alpha E (antigen CD103, human mucosal lymphocyte antigen 1; alpha polypeptide)
P05814	PIPQQVVPY	casein beta
Q99684	PFPLPFKPY	growth factor independent 1 transcription repressor
P54886	PFNQHLLPW	aldehyde dehydrogenase 18 family, member A1

Az összes szűrési feltételnek csupán 3 csupán DQ2-homológ peptid felelt meg, melyek az integrin alpha E (CD103 antigén), transcription factor AP-2 epsilon és chromosome 5 open reading frame 42 fehérjéhez tartoztak (táblázatban szürkével jelölve). A DQ8 peptidek közül nem sikerült kellően magas score-ral rendelkezőt vagy közösen DQ2 és DQ8 dokkolásra képest találni. Az AP-2 transcription factor szerepe lupusban és sclerosis multiplexben ismert, a chromosome 5 open reading frame 42 fehérje mutációja ciliopathiát okozhat, mely Joubert szindróma képében jelenhet meg. Az integrin alphaE a beta7 láncsal kapcsolódik és megjelenik az intraepithelialis T sejtek, egyes regulatorikus T-sejtek és a bél dendritikus sejtek egy részének felszínén, valamint a enteropathia-asszociált lymphoma (EATL) sejteken, így a coeliakia szempontjából leginkább releváns találatnak tartható. A CD103+ sejtek száma aktív coeliakiában magasabb a vékonybélben, mint kontrollokban, de akut gluten terhelés esetén csökkenést mutathatnak (Beitnes PLoS One. 2012;7(3):e33556). Megemlítendő, hogy a DGP kötő fehérjével végzett kísérleteink során azonosított AHNK fehérje is kapcsolatba léphet vele, szerepe lehet a coeliakiás sejtek vizsgálatakor észlelt adhéziós eltérésekben.



Az integrin alphaE peptid (zöld) és homológ gluten peptid (lila) dokkolási helyzete a DQ2-Tsejt receptor komplexben

Az MHC-DQ felé jól illeszkedő, de a T-sejt receptorral ütköző szerkezetet mutató peptid szekvenciák jó mimotópoknak tekinthetők a T-sejt válasz megzavarására és potenciális terápiás alkalmazásra, így ezek további in vivo tesztelésre érdemesek.

Hit_accession	Docked peptide sequence	Glide gscore	Glide emodel	Number of H-Bonds	Number of docking contacts		
					Good	Bad	Ugly
DQ8- α -gliadin	EGSFQPSQE	-20,451	-401,733	23	807	18	0
Q9BRR8	EANFQSSQD	-19,550	-380,881	21	825	13	1
Q5IJ48	EGTYSQSQQ	-18,753	-314,645	20	808	33	5
Q9NQ11	EGSLEPSPQ	-19,041	-333,773	19	724	13	1
Q5T4T6	EGSFAKSQQ	-18,024	-270,008	23	801	38	3
Q8IYN2	EGNPQPSEE	-16,081	-260,007	18	738	23	4
P24394	KGSFKPSEH	-18,483	-279,680	18	879	32	2
Q9BUF7	EGTYRPSSE	-18,13	-308,187	20	839	38	3
Q5W150	EGSFQPGRQ	-18,447	-331,947	21	790	25	0

Hit_accession	Docked peptide sequence	Glide gscore	Glide emodel	Number of H-Bonds	Number of docking contacts		
					Good	Bad	Ugly
DQ2.5-glia- α 1a	PFPQPELPY	-13,365	-150,711	4	597	39	30
Q9H799	PFPQSLLNY	-15,963	-267,133	12	701	23	1
P55771	PTPQPALPY	-12,718	-148,264	7	512	21	0
Q6UB99	PFSASEAPY	-15,514	-261,767	13	569	7	0
P42704	PFDVPELWY	-17,109	-289,529	11	732	10	0
Q6P1W5	PFVQPNYPY	-14,502	-193,547	9	604	26	1
Q8N3S3	PFHQSHLPW	-12,284	-183,384	7	578	17	1
Q8N2S1	PFARREAPY	-15,208	-245,700	13	693	25	1
A2VDJ0	PFVEQEDPY	-16,220	-293,499	13	641	24	0
P38570	PFAIFQLPY	-17,137	-282,149	11	677	8	1
P05814	PIPQQVVPY	-13,781	-188,340	7	624	20	2

Mimotóp tulajdonságú természetes peptidek

Összefoglalásul megállapíthatjuk, hogy adatokat találtunk gluten-homológ, T sejtek számára prezentálható humán fehérjékre, bár a pathomechanizmusban feltételezett variáció vagy mutáció nem igazolódott. Az Lpp szekvenciája nem tér el coeliakiásokban a normálistól, a fehérje inkább protein-protein interakciók révén játszhat szerepet a coeliakia kialakulásában. Igazoltuk viszont, hogy a coeliakiás betegeknél már a születéskor vett sejtekben jellegzetes eltérések mutathatók ki az adhézión képességben és a coeliakiás antitestekre adott kompenzáló reakciókban, mely új, gluten-független diagnosztikus eszközök kifejlesztési lehetőségét teremti meg.

Új megállapítások

1. A deamidált peptidek normál egyénekben is immunválaszt váltanak ki, az így keletkezett antitestek nem specifikusak a coeliakiás pathomechanizmusra
2. Kimutattuk, hogy a DGP peptidek kötődni képesek egyes adhézión molekulákhoz
3. Számos humán protein rendelkezik gluten peptidekhez hasonló aminosav szerkezettel, mely kellő dokkolási tulajdonságokkal rendelkezik az MHCII-Tsejt receptor komplexben, míg a hasonló, de dokkolási anomáliával rendelkező homológ peptidek alkalmasak lehetnek a glutenre adott immunválasz terápia megzavarására
4. Egérben nem lehet megfelelő coeliakia állatmodellt létrehozni, mivel a természetes coeliakia antitestek között dominálnak a VH3 típusúak, melyek kötődési epitópja hiányzik az egér TG2 fehérjében

5. A VH3 epitóp elleni antitestek szelektív mérése hozzájárulhat a betegmintákban lévő antitestek jobb kvantitatív meghatározásához és ezzel az enteropathia súlyosságának non-invazív diagnosztikus meghatározásához. Egy epitope array-ra épülő új módszert a kutatás során validáltunk.