

## Részletes szakmai beszámoló „A gluten-enteropathia kialakulását befolyásoló tényezők vizsgálata” című OTKA által támogatott kutatás eredményeiről

Azonosító: K61868

Futamidő: 2006.02.01-2010.12.31

Témavezető: Dr Korponay-Szabó Ilma, Debreceni Egyetem

A gluten-enteropathia, más néven coeliakia kondicionális autoimmun folyamat, melyet a kalászos gabonafélékkel fogyasztott prolaminok és közülük elsősorban a gluten vált ki. A betegek életreszóló intoleranciát mutatnak a gliadin peptidekkel és néhány gluteninnek szemben, de ezektől mentes étrend (glutenmentes diéta) mellett a kórfolyamat regrediál, az immunrendszer kóros működése a szervezet saját fehérjei ellen megszűnik. Az autoimmun folyamat fő célpontja a vékonybél és a transzglutamináz 2 (TG2) enzim, mely ellen biológiai hatásokkal rendelkező autoantitestek termelődnek. Ezek az antitestek diéta mellett eliminálódnak. Mivel a betegségnek nem mindig vannak jellegzetes tünetei vagy a tünetek hosszú ideig nem specifikusak, a diagnózis sok esetben késik, felnőttkorra tolódik, amikor a már évtizedek óta tartó autoimmunitás káros hatásai kifejlődtek. A coeliakia az autoimmun betegségek egyik prototípus modellje, ahol a kiváltó trigger molekula (gliadin), a genetikai háttér szerepe és az autoimmunitás fő célpontja (TG2) már ismert, ezért napjainkban mind a klinikai kutatás, mind az immunológiai alap kutatás szempontjából jelentős érdeklődés kíséri és a jelen kutatási projekt futamideje alatt is a coeliakiáról alkotott nemzetközi ismeretek jelentősen fejlődtek. Saját kutatásunk célja a betegségre hajlamosító gének, a gliadin kezelésének, feldolgozásának kutatása valamint a betegség korai vagy subklinikus jelenségeinek tanulmányozása volt, hogy megfelelő képet kapjunk a betegség prevalenciájáról és egészségügyi jelentőségéről, új és egyszerűbb diagnosztikus eszközöket fejlesszünk ki korszerű biomarkerek alkalmazásával és tanulmányozzuk azokat a pathomechanikai tényezőket, melyek a megelőzésben vagy a kezelésben hasznosíthatók.

A genetikai kutatásokban integráns szerepet játszott együttműködésünk az OTKA pályázatban résztvevőként is feltüntetett két finn kutatócsoporttal (Biomedicum Helsinki, Päivi Saavalainen és Tamperei Egyetem, Markku Mäki), akiknél rendszeresen végeztünk méréseket, kísérleteket és akikkel közösen publikáltuk eredményeinket.

### 1. A coeliakiára hajlamosító genetikai tényezők vizsgálata

A coeliakia genetikai háttere komplex, pontos öröklésmenete nem tisztázott. Leggyakrabban egymást követő generációkban jelenik meg és nőknél gyakoribb, mint általában az autoimmun kórfolyamatok. A betegek elsőfokú rokonaiban a kockázatot 10% körülinek adják meg a nemzetközi felmérések. Saját vizsgálatainkban a betegek utódaiban azonban ennél nagyobb ismétlődési arányt (a szülőnél gyermekkorban manifesztálódó formáknál 40%, felnőttkorban manifesztálódó formáknál 20% körüli előfordulást) figyeltünk meg 270 coeliakiás beteg 481 utódjának klinikai követésével és szerológiai szűrővizsgálatával (*Korponay-Szabó et al. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2005;40:638.*). A klinikai betegség kialakulásának feltétele a gliadin immunológiai prezentációja, mely a HLA-DQ molekulákon keresztül valósul meg. A gliadin kizárólag a HLA-DQ2 és DQ8 típusú heterodimerekhez kötődik, azokhoz is csak akkor, ha az eredetileg neutrális gliadin peptidek glutamin oldalláncai sav vagy enzimatikus hatásra savanyú töltésűvé alakulnak. Ilyen átalakítást elsősorban a TG2 végez a glutaminok deamidálásával. A HLA-DQ2 és DQ8 heterodimerek genetikai különböző módon kódolt alegységekből jöhetnek létre, melynek diagnosztikus jelentősége lehet. A HLA-DQ molekulák tipizálása már régóta alkalmazott klinikai vizsgálati eljárás, de költséges volta és a társadalombiztosítási finanszírozás megoldatlansága miatt Magyarországon még nem terjedt el a coeliakia vizsgálatára. Diagnosztikai helyének megállapítását az is nehezíti, hogy az egészséges magyar népesség 25%-a is hordoz DQ2-t vagy DQ8-t, így a HLA markerek magukban nem tekinthetők a coeliakia bizonyítékának és a genetikai rizikóért biztosan felelősek non-HLA gének is.

## 1.1 HLA markerek vizsgálata

**Kapitány A, Tóth L, Tumpek J, Csipő I, Sipos E, Woolley N, Partanen J, Szegedi G, Oláh E, Sipka S, Korponay-Szabó IR.: Diagnostic significance of HLA-DQ typing in patients with previous coeliac disease diagnosis based on histology alone, *Aliment Pharmacol Ther.* 2006;24:1395-402.**

*Impakt faktor: 3.430*

A coeliakia hagyományosan a vékonybél szövettani vizsgálatával diagnosztizálható, a szövettani eltérések (gyulladás, a bélbolyhok változó fokú atrophíája) azonban nem specifikusak és főként a coeliakiára jellemző anti-TG2 antitestek hiányában gyakori a diagnosztikus bizonytalanság. A tanulmányban vizsgált 70 egymást követően jelentkező beteg esetében a HLA-DQ2 vagy DQ8 hiánya helyesen jelezte egy korábbi coeliakia diagnózis megalapozatlanságát és jól korrelált a prospektíven végrehajtott diagnosztikus gluten terhelés klinikai kimenetelével. Megállapítottuk azt is, hogy a coeliakia autoantitestek (anti-TG2 és EMA, endomysium antitest) csak a HLA-DQ2 vagy DQ8 adottságú személyekben termelődtek és ezek a glutenmentes diéta felfüggesztése, újabb glutenbevitel hatására visszaestek. Ennek megfelelően a HLA-DQ tipizálást a klinikai gyakorlatban nagyobb hangsúllyal és gyakrabban kellene használni, különösen a bizonytalan esetekben és a már diétával előkezelt betegeknel.

**Dezsőfi A, Szebeni B, Hermann CS, Kapitány A, Veres G, Sipka S, Körner A, Madácsy L, Korponay-Szabó I, Rajczy K, Arató A. Frequencies of genetic polymorphisms of TLR4 and CD14 and of HLA-DQ genotypes in children with celiac disease, type 1 diabetes mellitus, or both. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2008;47:283-7.**

*Impakt faktor: 2.132*

További vizsgálataink során a HLA DQ2 és DQ8 megoszlásában összefüggést találtunk a klinikai manifesztációval 100 hosszán követett coeliakiás, 80 diabetesben szenvedő és 47 coeliakiás+diabeteses gyermek HLA tipizálásával. Az 1-es típusú diabetes mellitus és coeliakia genetikai háttere HLA és non-HLA gének tekintetében számos átfedést mutat, viszont DQ2 és DQ8 együttes jelenlétében coeliakiás betegeknel gyakrabban manifesztálódik diabetes. A HLA DQ2 hordozás diabetes esetén viszont predispozíciót jelent coeliakiára is, míg a csak DQ8 hordozás csak diabetesre hajlamosít. A DQ8 önmagában nem emeli a coeliakia kialakulásának kockázatát a normál népességhez képest sem. A tanulmányban a toll-like receptor (TLR) 4 funkcionális polymorphismusa (A<sup>+896</sup>G), mely a korai immunválasz fokozott beindításában játszhat szerepet, nem mutatott összefüggést a coeliakia predispozícióval. Vizsgáltuk a CD14 molekula C<sup>-260</sup>T minor alléljének jelenlétét is, mely homozygota TT formában fokozott CD14 expresszióra és potenciálisan kifejezettebb immunreakcióra és gyulladásra hajlamosít. A diabeteses betegeknel a T allél és a TT genotípus a normál népességhez képest ritkábban fordult elő, míg coeliakia esetén nem tért el a normál megoszlástól. Diabeteses betegeknel a TT előfordulása azonban hajlamosított a coeliakia együttes előfordulására.

**Koskinen L, Romanos J, Kaukinen K, Mustalahti K, Korponay-Szabo I, Barisani D, Bardella MT, Ziberna F, Vatta S, Széles G, Pocsai Z, Karell K, Haimila K, Adány R, Not T, Ventura A, Mäki M, Partanen J, Wijmenga C, Saavalainen P. Cost-effective HLA typing with tagging SNPs predicts celiac disease risk haplotypes in the Finnish, Hungarian, and Italian populations, *Immunogenetics.* 2009;61:247-56.**

*Impakt faktor: 2.988*

Tekintettel arra, hogy a HLA-DQ allélek részletes tipizálása a jelenleg általánosan használatos szekvencia-specifikus primerekkel alapuló PCR eljárással viszonylag költséges, nehéz a HLA-DQ meghatározást a klinikai gyakorlatban olyan méretekben végezni, mely a diagnosztikában vagy a populáció szűrésében indokolt lenne. Elvileg a népességben csak azokat kellene coeliakiára szűrni, akik DQ2 vagy DQ haplotípusúak. Szerológiai tipizálás az MHC II típusú alléleknél nem megbízható és ezért nem ajánlott. Mindenképp genetikai meghatározás indokolt azért is, hogy a HLA-DQ2 altípusokat elkülönítsük, mert a HLA DQB1\*0201 (DQ2.5 haplotípus) és \*0202 (DQ2.2 haplotípus) különböző kockázati tényezőt jelent. Ezért azt vizsgáltuk, hogy a coeliakia szempontjából fontos allélek meghatározhatók-e a bennük található jellegzetes single nucleotid polimorfizmusok (SNP) tipizálása alapján. Erre elvileg az ad lehetőséget, hogy a DR, DQA1 és DQB1 locusok linkage disequilibrium miatt határozott haplotípus blokkokban öröklődnek. A vizsgálatokban összesen 1284 ismert, szövettani vizsgálattal bizonyított és 1587 nem coeliakiás (normál populáció vagy családtag) személy vett részt. A vizsgált SNP-k közül egy a DQ2.5 haplotípust (rs2187668), három a DQ2.2 haplotípust (rs2395182, rs4713586, rs7775228) egy-egy pedig a DQ7 (rs4639334) illetve DQ8 () alléleket mutatja ki. A DQ2.5 jelenléte elegendő a gliadin megfelelő prezentációjához, de a DQ2.2. önmagában nem hoz létre gliadint kötő funkcionális

heterodimert, csak akkor, ha a másik allél DQ7, melynek A lánc (\*0505) kapcsolódik a DQ2.2 B láncával (\*0202), ezért van szükség a DQ7 kimutatására is.

Technikailag mind a 6 SNP közül 5 jól működött a Hardy-Weinberg szabálynak megfelelő normál eloszlással, az egyik DQ2.2 SNP tipizálása nehézkes volt.

A magyar coeliakiás betegek 97.2%-a hordozott DQ2 heterodimert (87.5% DQ2.5, 9.7% DQ2.2/DQ7) és 2.3 % DQ8-t. A finn betegek között a DQ2.5 aránya hasonló, a DQ2.2/DQ7 alacsonyabb, a DQ8 magasabb volt, míg az olasz betegknél a DQ2.5 volt alacsonyabb, de a DQ2.2/DQ7 magasabb, míg a DQ8 hasonló volt a finnekhez. Ez megfelel annak a klinikai körülménynek, hogy a magyar népességben relatíve alacsonyabb a diabetes előfordulása mint Finnországban. A magyaroknál ritkán olyan DQ2.2 allél fordult elő, ami inkonzulzív eredményhez (látszólag 3 allél DQ2.2, DQ7 és DQ8) vezetett, ezeknél minden esetben az A és B lánc nem szokványos társulásával, azaz csökkent disequilibriummal talákoztunk. Ezeknél a betegknél látszólag csak DQ2.2 jelenléte ellenére más vizsgálatok igazolták a teljes heterodimer jelenlétét. Ilyen esetekben tehát továbbra is a hagyományos alléltipizálást kell végezni. Az SNP meghatározáson alapuló HLA-DQ tesztelésnek azonban sok előnye van. Nemcsak olcsóbb, hanem alkalmas nagylétszámú szűrővizsgálat elvégzésére is automatizált rendszerekben. A vizsgálat megerősítette azon korábbi eredményt, hogy a DQ2.5 homozigótáság 5.5-szörösre emeli a coeliakia kockázatát a DQ2.5 heterozigótákhoz képest, míg a DQ2.2 jelenléte a DQ2.5 mellett 3.1-szoros rizikót jelent.

A veszélyeztetett családok utódait korai életkorban vizsgálva megállapítottuk, hogy 85% hordozza a HLA DQ2 vagy DQ8 alléleket, ezért a betegség előrejelzéséhez feltétlen szükség van más genetikai markert keresésére.

## 1.2 Non-HLA coeliakia gének kutatása

Tekintettel arra, hogy a HLA-DQ2 vagy DQ8 a normál európai és magyar népesség 25-30%-ámál előfordul, jelenlétük szükséges feltétel, de nem elegendő a coeliakia manifesztálódásához és a HLA markerek csak részben, mintegy 40%-ban magyarázzák meg a genetikai fogékonyságot. Ezért a valódi coeliakia gének kutatása sokkal jelentősebb a betegség pontos okának felderítésében. Tekintettel arra, hogy az öröklésment nem tisztázott és nagy valószínűséggel multi- vagy legalábbis oligogénes és változó penetranciájú, a non-HLA hajlamosító tényezők megközelítésére a komplex genetikai betegségeknek alkalmazott stratégiát követtük. Az első lépésben érintett testvéreknél végzett SNP analízissel igyekeztünk azokat a kromoszóma szakaszokat megtalálni, melyek közösek. A vizsgálati eredményeket később nagy, sok érintett családtaggal rendelkező családokban validáltuk. A legnagyobb ilyen magyar család 10 érintett beteggel rendelkezett. Ezt követően az érintettnek látrszó kromoszóma szakaszokon sűrűbb SNP analízissel szűkítettük azt vizsgálva, hogy mely gén(ek)ben van a közös tulajdonság, és ezeket transzmissziós disequilibrium analízisnek (TDT) vetettük alá. Ennek során a betegeket és szüleiket (triotkat) vizsgálva megállapítottuk, hogy van-e olyan allél, mely preferenciálisan kerül át a betegbe, azaz van-e valamilyen haplotípussal kapcsolatban betegségi asszociáció, és ha volt, akkor mi lehet ennek a funkcionális mechanizmusa. Végül az azonosított allélek megoszlását vizsgáltuk coeliakiás betegek és egészséges populációs kontrollok között. Az érdekes génszakaszok keresésére automatikus SNP teszteléssel az összes kromoszómán random fellelhető SNP-k meghatározását is lehet alkalmazni (genome-wide screening, GWA).

A kutatási idő alatt 1540 egységes gyakorlat szerint diagnosztizált coeliakiás betegtől gyűjtöttünk mintát, köztük 218 (részben többes) érintett testvérpártól és 232 triótól, így ez a beteganyag jelenleg Európa egyik legnagyobb ilyen típusú mintakészlete. A normál magyar népességet statisztikailag reprezentáló populációs kontrollokat (1067) Dr Ádány Róza (Debreceni Egyetem, Népegészségügyi Iskola) bocsátotta rendelkezésünkre a vizsgálatokhoz. A vizsgálatokban a Tamperei Egyetem által gyűjtött finn minták illetve esetenként más mintakollekciók is szerepeltek. Mivel az esetek egy részében a kapcsolódás (linkage) és az asszociáció gyenge volt, jelentős volt a minél nagyobb esetszám biztosítása a megfelelő vizsgálati power eléréséhez, melyet statisztikailag kalkuláltunk.

**Koskinen LL, Korponay-Szabo IR, Viiri K, Juuti-Uusitalo K, Kaukinen K, Lindfors K, Mustalahti K, Kurppa K, Adány R, Pocsai Z, Széles G, Einarsdottir E, Wijmenga C, Mäki M, Partanen J, Kere J, Saavalainen P. Myosin IXB gene region and gluten intolerance: linkage to coeliac disease and a putative dermatitis herpetiformis association. J Med Genet. 2008;45:222-7.**

Impakt faktor: 5.713

A magyar testvérpárokban jelentős egyezést találtunk (LOD score:3.76) a 19-es kromoszóma egy korábban már azonosított szakaszán (*van Belzen Gastroenterology. 2003;125:1032-41, Monsuur Nat Genet. 2005;37:1341-4*) a myosin IXb gén mellett és annak egyik intronális szakaszán. A gluten-szenzitivitás bőrtünetekkel járó formájában (dermatitis herpetiformisban) nemcsak linkage-t, hanem asszociációt is kimutattunk a minor alléllal, ahol az AGAA rizikó-haplotípus a TDT elemzés szerint preferenciálisan öröklődött. A IX-es myosin egy ritka motoros protein, melynek a transcellularis transzportban és a sejtmotilitásban lehet szerepe, valamint feltételezik szerepét a vékonybél barrier funkciójában is. Mivel ez a polymorphismus nem változtatja meg a fehérjét kódoló szekvenciát, azt vizsgáltuk, hogy lehet-e szerepe az expresszió szabályozásában, de az eredmények ezt nem támogatták. A SNP felbontás finomítása utáni eredmények megerősítik a 19p13 régió szerepét, de inkább arra utalnak, hogy ezért esetleg a myosin IXb közelében lévő másik gén is felelős lehet. Az értékelést nekezeíti, hogy az azonos haploblokkban lévő többi gén öröklődése eleve hasonló.

**Papp M, Földi I, Nemes É, Udvardy M, Hársfalvi J, Altorjay I, Máté I, Dinya T, Várvölgyi C, Barta Z, Veres G, Lakatos PL, Tumpek J, Toth L, Szathmári E, Kapitány A, Gyetvai A, Korponay-Szabó IR: Haptoglobin polymorphism: a novel genetic risk factor for celiac disease development and its clinical manifestations. Clin Chem. 2008;54:697-704.**  
*Impakt faktor: 4.800*

Új asszociációt írtunk le a haptoglobin polimorfizmussal. 712 biopsiával igazolt coeliakiás beteg és 384 egészséges kontroll vizsgálatával megállapítottuk, hogy a 2-1 geno/fenotípus esetén magasabb a kockázat coeliakia előfordulására (odds ratio 1.54, p=0.0006). A haptoglobin polimorfizmus a betegség klinikai megjelenését is befolyásolja, összefüggést mutattunk ki a prezentációs tünetekkel. A haptoglobin elsődleges funkciója a hemoglobin eltakarítása a lebomló vörösvérsejtekből, de emellett jelentős anti-inflammatórikus és immunmoduláló hatással is rendelkezik. A 2-2 gyakoribb egyes más betegségekben, köztük diabetes mellitusban. Coeliakiában a 2-2 genotípus ritkább mint a normál népességben, de azoknál a coeliakiásoknál, akik 2-2 típusúak, a lefolyás súlyosabb, gyakrabban fordul elő súlyos malabsorptio. A 2-1 heterozigótáság viszont jelentős asszociációt mutat a coeliakia megjelenésével, mely az enyhe tünetekkel és silent formában megjelenő coeliakiára is jellemző. Érdekes, hogy miért jelenthet egy heterozigótáság más kockázatot, mint a két komponensre vonatkozó homozigótáság. A haptoglobin 2 alegység kombinációjából jön létre. A béta lánc azonos, a polimorfizmust az alfa lánc részleges duplikációja okozza. Ennek következtében az alfa2 két kötőhellyel rendelkezik a béta lánc számára. Az 1-1 genotípus esetén létrejövő alfa1beta molekulák kis dimereket képeznek. Mivel az alfa2 két béta lánccal képes kapcsolódni, a 2-2 genotípusú személyeknél különböző méretű gyűrűs komplexek alakulnak ki. Mivel a 2-1 heterozigótáknál alfa1 és alfa2 is termelődik, a komplexek bonyolult elágazódó, lineáris szerkezetet vesznek fel. Ezeknek a molekuláknak a biológiai tulajdonságai eltérők. A haptoglobin elősegíti a T-helper 1 túlsúlyt, valamint a CD163-n keresztül IL-10 képződést vált ki, mely gyulladáscsökkentő hatású. Ez a hatás kisebb a 2-2 fenotípus esetén, mely magyarázhatja az ebben csoportban észlelt súlyosabb klinikai coeliakia manifestációt.

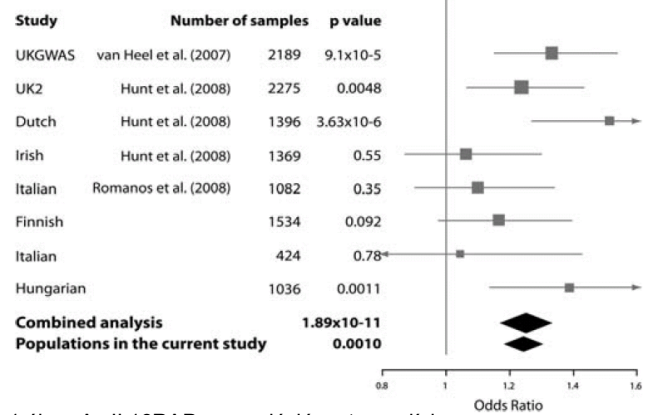
A cikk megjelenését követően egy független USA kutatócsoport kimutatta, hogy a vékonybél permeabilitásában kulcsszerepet játszó és coeliakia kezdetén jelentősen fokozódó expressziójú zonulin azonos a pre-haptoglobin 2 molekulával és így a genetikai eredmény coeliakiára vonatkozó relevanciáját alátámasztotta (*Tripathi et al, PNAS 2009;106(39):16799-804.*)

**Koskinen LL, Einarsdottir E, Dukes E, Heap GA, Dubois P, Korponay-Szabo IR, Kaukinen K, Kurppa K, Ziberna F, Vatta S, Not T, Ventura A, Sistonen P, Adány R, Pocsai Z, Széles G, Mäki M, Kere J, Wijmenga C, van Heel DA, Saavalainen P. Association study of the IL18RAP locus in three European populations with coeliac disease. Hum Mol Genet. 2009 Mar 15;18(6):1148-55.**

*Impakt faktor: 7.386*

Jelentős asszociáció és linkage igazolódott a magyar betegeknek a 2q12 régióban lévő interleukin 18 receptor asszociált protein (IL18RAP) tekintetében is (odds ratio 1.48, p=0.0012). Funkcionális vizsgálatok és western blot analízis fehérvérsejtekben a rs917997 helyen AA and AG rizikó alléleket hordozóknál egy rövidebb 37 kDa izoforma fokozott, a teljes hosszú 70kDa körüli protein csökkent expresszióját mutatták. Az IL18RAP a vékonybélben immunhisztokémiai is kimutatható volt, de az egyes genotípusokkal összefüggő változást nem mutatott. Az eredményeket tovább analizálva és összehasonlítva az egyéb országokban talált eredményekkel, az asszociáció a magyaroknál jelentősebb volt, mint más országok coeliakiás betegei között (kivéve a hollandokat). Az olasz és finn betegcsoportokban önmagukban nem is lehetett az asszociációt igazolni, ami arra

hívja fel a figyelmet, egyes országokban a genetikai hajlamosító tényezők eltérést mutathatnak. Másrészt az egyes eltérések kimutathatóságában a mintaszám is szerepet játszhat. Ez a vizsgálat 1638 coeliakiás és 1385 kontroll beteggel történt. Egy későbbi genome-wide screening során (Dubois, 2010, ld. alább), ahol 9451 coeliakiás beteget és 16434 kontrollt vizsgáltunk, az IL18RAP locus nagyon szignifikáns asszociációt mutatott ( $2.98 \times 10^{-28}$ ). Ez megerősíti az IL18RAP jelentőségét, mely feltehetően az immunválasz modulálása révén valósul meg. Ebben a vizsgálatban is magas volt a magyar alcsoportban az elemszámmal arányos asszociáció ( $10^{-6}$ ).

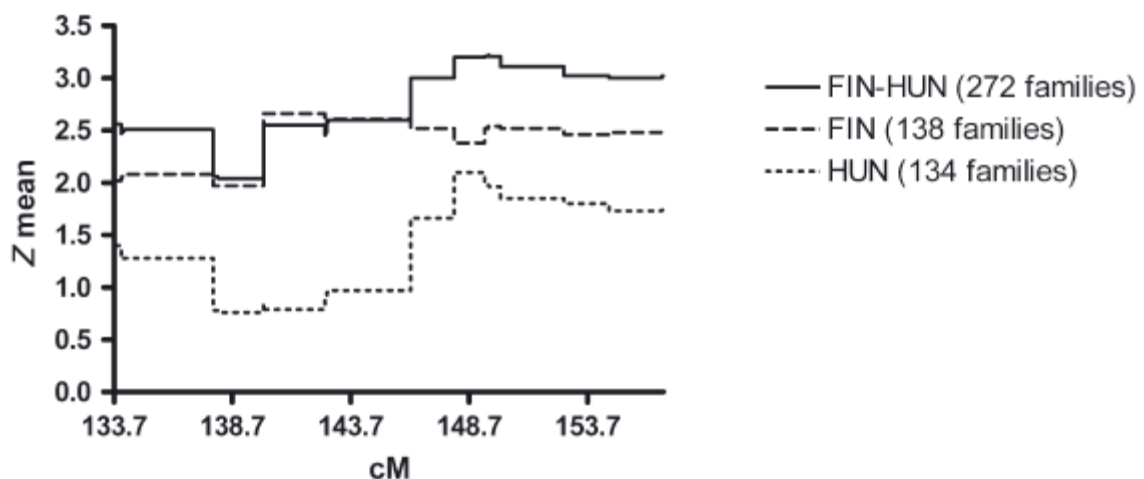


1. ábra Az IL18RAP asszociáció meta-analízise

**Koskinen LL, Einarsdottir E, Korponay-Szabo IR, Kurppa K, Kaukinen K, Sistonen P, Pocsai Z, Széles G, Adány R, Mäki M, Kere J, Saavalainen P. Fine mapping of the CELIAC2 locus on chromosome 5q31-q33 in the Finnish and Hungarian populations. Tissue Antigens. 2009;74:408-16.**

*Impakt faktor: 2.330*

A magyar testvérpárok analízise alapján a 19p13 szakasz után a 5q31-33 adta a legmagasabb linkage értékeket, ezért ezt a szakaszt részletesebben is megvizsgáltuk 374 magyar és 277 finn családban. Az 5q szakaszokkal korábban olasz, skandináv és ír betegekben is találtak összefüggést. Sűrűbb eloszlású, 56 microsatellite és SNP marker alkalmazásával az asszociáció továbbra is jelentős maradt és észlelhető volt nemcsak a testvérekben, hanem multiplexen érintett családokban is, de más génekkel kapcsolódott a fiinneken (FGF1, STK32A, SLC36A2) mint a magyarokban (IL3 és TGFBI). Az 5q 31-33 régió számos immunreakcióval kapcsolatos gént tartalmaz és más tanulmányokban asszociációt mutatott más olyan gyulladásszerű és immunológiai betegségekkel, mint a Crohn betegség, psoriasis, 1-es típusú diabetes mellitus és asthma, de egyikben sem sikerült ezt egyedi génekhez kötni. Erre arra hívja fel a figyelmet, hogy a gyulladásszerű reakcióra való fokozott hajlam mindegyik szempontjából fontos lehet, de az adottság betegenként eltérhet.



2. ábra. Az 5-ös kromoszómán vizsgált régió asszociálójának eloszlása finn és magyar multiplex családokban

**Haimila K, Einarsdottir E, de Kauwe A, Koskinen LL, Pan-Hammarström Q, Kaartinen T, Kurppa K, Zibera F, Not T, Vatta S, Ventura A, Korponay-Szabo IR, Adány R, Pocsai Z, Széles G, Duker E, Kaukinen K, Mäki M, Koskinen S, Partanen J, Hammarström L, Saavalainen P. The shared CTLA4-ICOS risk locus in celiac disease, IgA deficiency and common variable immunodeficiency. Genes Immun. 2009;10:151-61.**

*Impakt faktor: 4.222*

**Einarsdottir E, Bevova MR, Zernakova A, Monsuur A, Koskinen LL, Slot RV, Mulder C, Mearin ML, Korponay-Szabo IR, Kaukinen K, Kurppa K, Kere J, Mäki M, Wijmenga C, Saavalainen P. Multiple independent variants in 6q21-22 associated with susceptibility to celiac disease in the Dutch, Finnish and Hungarian populations. Eur J Hum Genet. 2011 Feb 16. [Epub ahead of print] PubMed PMID:21326284.**

*Impakt faktor: 3.564*

Einarsdottir E, Koskinen LL, Dukes E, Kainu K, Suomela S, Lappalainen M, Ziberna F, Korponay-Szabo IR, Kurppa K, Kaukinen K, Adány R, Pocsai Z, Széles G, Färkkilä M, Turunen U, Halme L, Paavola-Sakki P, Not T, Vatta S, Ventura A, Löfberg R, Torkvist L, Bresso F, Halfvarson J, Mäki M, Kontula K, Saarialho-Kere U, Kere J, D'Amato M, Saavalainen P. IL23R in the Swedish, Finnish, Hungarian and Italian populations: association with IBD and psoriasis, and linkage to celiac disease. *BMC Med Genet.* 2009 Jan 28;10:8.

Impakt faktor: 2.840

Sareneva I, Koskinen LL, Korponay-Szabo IR, Kaukinen K, Kurppa K, Ziberna F, Vatta S, Not T, Ventura A, Adány R, Pocsai Z, Széles G, Mäki M, Saavalainen P, Einarsdottir E. Linkage and association study of Fcγ3 polymorphisms in celiac disease. *Tissue Antigens.* 2009;73:54-8.

Impakt faktor: 2.330

További kiegészítő vizsgálatokban is nagyszámú magyar beteget és érintett családot vizsgáltunk (>400 család), de a 2q33 régióban, ahol további antigénprezentációban immunológiailag fontos gének (ICOS, CTLA) voltak a finn populációban, a magyaroknál nem volt semmilyen asszociáció. A 6q21-22 régióban is sokkal szerényebb eltérések mutatkoztak, mint a finneké vagy a hollandoké, akiknél számos új gén-asszociációt mutattunk ki (HACE1, PREP, GJA1, CX43, RWDD1). Az IL23 ugyan összefüggött a coeliakia kialakulásával, de nem a magyar népességben, az Fcγ3 receptorral pedig egyik vizsgált országban (Svédország, Finnország, Magyarország, Olaszország) sem volt kapcsolat. Vizsgáltuk még a calreticulint, de nem volt eltérés.

Dubois PC, Trynka G, Franke L, Hunt KA, Romanos J, Curtotti A, Zhernakova A, Heap GA, Adány R, Aromaa A, Bardella MT, van den Berg LH, Bockett NA, de la Concha EG, Dema B, Fehrmann RS, Fernández-Arquero M, Fiala S, Grandone E, Green PM, Groen HJ, Gwilliam R, Houwen RH, Hunt SE, Kaukinen K, Kelleher D, Korponay-Szabo I, Kurppa K, MacMathuna P, Mäki M, Mazzilli MC, McCann OT, Mearin ML, Mein CA, Mirza MM, Mistry V, Mora B, Morley KI, Mulder CJ, Murray JA, Núñez C, Oosterom E, Ophoff RA, Polanco I, Peltonen L, Platteel M, Rybak A, Salomaa V, Schweizer JJ, Sperandio MP, Tack GJ, Turner G, Veldink JH, Verbeek WH, Weersma RK, Wolters VM, Urcelay E, Cukrowska B, Greco L, Neuhausen SL, McManus R, Barisani D, Deloukas P, Barrett JC, Saavalainen P, Wijmenga C, van Heel DA. Multiple common variants for celiac disease influencing immune gene expression. *Nat Genet.* 2010;42:295-302.

Impakt faktor: 34.284

Mivel feltehető volt, hogy egyes finomabb hajlamosító gének identifikálására a nagy esetszámok ellenére nincs megfelelő statisztikai power az egyes nemzeti mintakollektívákban, újabb coeliakia gének felismeréséhez nemzetközi kollaborációban még egy, a sorrendben harmadik coeliakiára irányuló nagyvolumenű genome-wide screeningre (GWA) is sor került; ebben először vettek részt magyar betegek is. A vizsgálatban összesen 25885 személy mintája (9451 igazolt coeliakiás beteg, köztük 965 magyar és 16464 kontroll, köztük 1067 magyar) szerepelt. Illumina 670-QuadCustom\_v1 és Golden Gate nagykapacitású automatizált tesztrendszerrel előbb 292.387, majd újabb 231.362 random SNP markert vizsgáltak az autoszomális kromoszómákon és az X kromoszómán, a betegek mintegy felében. A legmagasabb találati arányt jelző 113 megfelelően működő SNP-t tesztelték tovább a többi betegen mint verifikációs csoportokban. A magyarokat a verifikációs csoportban használták fel. A 3. GWA eredménye megerősítette a HLA-DQ szerepét és 13 korábban már leírt locus/géncsoport jelentőségét (RGS1, REL/AHS, IL18RAP, ITGA4, CTLA/ICOS, CCR3/CCR1,2,5,9, IL12A, LPP, IL2/IL21, TNFAIP3, TAGAP, SH2B3, PTPN2).

Mindezek mellett 13 új, jelentősen szignifikáns génesszociációt találtunk:

Chr	Position (bp)	SNP	LD block <sup>ab</sup> (Mb)	Minor allele	Minor allele freq <sup>c</sup>	P <sub>GWA</sub> 4533 cases, 10750 controls	P <sub>follow-up</sub> 4918 cases, 5684 controls	P <sub>combined</sub> 9451 cases, 16434 controls	Odds ratio <sup>c</sup> [95% CI]	Multiple independent association signals <sup>d</sup>	Ref	RefSeq Genes in LD block	Genes of Interest and GRAIL annotat
New loci, genome-wide significant evidence (P <sub>combined</sub> < 5 × 10 <sup>-8</sup> )													
1	2516606	rs3748816	2.40-2.78	G	0.339	4.93 × 10 <sup>-7</sup>	1.17 × 10 <sup>-3</sup>	3.28 × 10 <sup>-9</sup>	0.89 [0.85-0.92]		4	TNFRSF14, MMEL1	
1	25176163	rs10903122	25.11-25.18	A	0.480	3.21 × 10 <sup>-5</sup>	8.44 × 10 <sup>-7</sup>	1.73 × 10 <sup>-10</sup>	0.89 [0.85-0.92]		1	RUNX3	
1	199158760	rs296547	199.12-199.31	A	0.357	6.46 × 10 <sup>-5</sup>	1.34 × 10 <sup>-5</sup>	4.11 × 10 <sup>-9</sup>	0.89 [0.86-0.92]		2	?	
2	68452459	rs17035378 <sup>f</sup>	68.39-68.54	G	0.278	1.34 × 10 <sup>-5</sup>	1.41 × 10 <sup>-4</sup>	7.79 × 10 <sup>-9</sup>	0.88 [0.84-0.92]		2	PLEK	
3	32990473	rs13314993 <sup>f</sup>	32.90-33.06	C	0.464	6.87 × 10 <sup>-6</sup>	1.09 × 10 <sup>-4</sup>	3.27 × 10 <sup>-9</sup>	1.13 [1.08-1.17]		2	CCR4	
3	120601486	rs11712165 <sup>f</sup>	120.59-120.78	C	0.394	5.40 × 10 <sup>-7</sup>	1.72 × 10 <sup>-3</sup>	8.03 × 10 <sup>-9</sup>	1.13 [1.08-1.17]		5	CD80, KTELC1	
6	90983333	rs10806425	90.86-91.10	A	0.397	9.46 × 10 <sup>-6</sup>	9.25 × 10 <sup>-6</sup>	3.89 × 10 <sup>-10</sup>	1.13 [1.09-1.17]		1	BACH2, MAP3K7	
6	128320491	rs802734	127.99-128.38	G	0.311	1.36 × 10 <sup>-6</sup>	1.70 × 10 <sup>-9</sup>	2.62 × 10 <sup>-14</sup>	1.17 [1.12-1.22]	yes	2	PTPRK, THEMIS	
8	129333771	rs9792269	129.21-129.37	G	0.238	8.14 × 10 <sup>-6</sup>	1.00 × 10 <sup>-4</sup>	3.28 × 10 <sup>-9</sup>	0.88 [0.84-0.91]		0	?	
10	80728033	rs1250552	80.69-80.76	G	0.466	5.80 × 10 <sup>-8</sup>	1.81 × 10 <sup>-3</sup>	9.09 × 10 <sup>-10</sup>	0.89 [0.86-0.92]		1	ZMIZ1	
11	127886184	rs11221332 <sup>f</sup>	127.84-127.99	A	0.237	4.74 × 10 <sup>-11</sup>	9.98 × 10 <sup>-7</sup>	5.28 × 10 <sup>-16</sup>	1.21 [1.16-1.27]	yes	1	ETS1	
16	11311394	rs12928822	11.22-11.39	A	0.161	1.07 × 10 <sup>-5</sup>	7.59 × 10 <sup>-4</sup>	3.12 × 10 <sup>-8</sup>	0.86 [0.82-0.91]		4	CIITA, SOCS1, CLE	
21	44471849	rs4819388	44.42-44.47	A	0.280	3.42 × 10 <sup>-5</sup>	1.66 × 10 <sup>-5</sup>	2.46 × 10 <sup>-9</sup>	0.88 [0.84-0.92]		2	ICOSLG	

Ezen közül a magyaroknál a BACH2 locus adta a legmagasabb asszociációs értéket. Az újonnan felismert hajlamosító gének jelentős része az immunrendszer működését illetve a T lymphocyták érési folyamatait befolyásolja. Ezek közül kiemelkedően fontosnak látszik a coeliakia szempontjából a THEMIS és a RUNX. Más polimorfizmusok a vírus DNS-ek felismerését végző toll-like receptorok működését (TLR7 és TLR8), a T- és B lymphocyták kooperációját (TNFRSF14, CD80, ICOSLG) illetve cytokineket (CCR4) érintik.

### 1.3 A coeliakia szuszceptibilitás modellje, prediktív érték veszélyeztetett családtagokban

Az eredmények alapján a coeliakia genetikai háttere a következőkben összegezhető: A genetikai háttér nagy valószínűséggel polygénus. A populációban jelentős számú variáció fordul elő az immunrendszer működését kódoló és a bélrendszert permeabilitását szabályozó génekben. Ezek hajlamosító alléljeinek együttes jelenléte esetén nagyobb az esély arra, hogy a gliadin behatolása (MYOIXb) illetve feldolgozása (THEMIS, RUNX) kóros, vagy a szokásosnál nagyobb immunreakcióval jár (IL2/IL21, IL18RAP, CCR, TNF és haptoglobin variációk). Amennyiben az ilyen egyedek HLA-DQ2-t vagy DQ8-t is hordoznak, lehetőség van a gliadin kóros felismerésére és az autoimmun reakció megindulására, melyben vírusok (TLR aktiválódás), vagy más környezeti tényezők is szerepet játszhatnak. A nagyszámú polymorphismus magyarázhatja a coeliakiát kísérő klinikai tünetek sokszínűségét, melyek az életveszélyes malabsorptiótól a tünetmentes állapotig terjedhetnek, és előfordulhat számos különböző egyéb szervrendszer érintettsége is. A genetikai markerek korrelációját a klinikai kimenetellel a 2007-ban indult coeliakia prevenció vizsgálatban születéstől követett 1344 európai (186 magyar) gyermekben is vizsgáltuk, ahol hasonló eredményt kaptunk. A vizsgálat prospektív, a végleges eredmények 2011-2013-ban, 4-6 éves korban várhatóak, mert ebben az életkorban várható a coeliakia klinikai manifesztálódása, ha kialakul.

## 2. *A coeliakia kialakulását befolyásoló környezeti tényezők, prevalencia a magyar népességben, szűrési stratégiák*

### 2.1 A gliadinfogyasztás szerepe

**Koskinen O, Villanen M, Korponay-Szabo I, Lindfors K, Mäki M, Kaukinen K. Oats do not induce systemic or mucosal autoantibody response in children with coeliac disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2009;48:559-65.**  
*Impakt faktor: 2.183*

A coeliakia kiváltásában fontos prolaminok kutatása az 1950-es évekre nyúlik vissza. Akkor úgy gondolták, hogy a búza, árpa, rozs és zab fehérjéi egyaránt ártalmasak. A 21. század elején kimutatták, hogy a zabot a legtöbb coeliakiás beteg klinikailag jól tűri, de voltak olyan kutatási eredmények is, hogy a zab mégiscsak provokált immunreakciót. A tanulmányban prospektív terhelést végeztünk gyermekeknél búza eredetű gliadinnal és zab fehérjékkel. Kimutattuk, hogy a zab nem okoz autoimmun mechanizmust és coeliakia antitest (anti-TG2) képződést vagy a vékonybélben boholykárosodást, ahogy a búza gliadin. A zabbal kapcsolatos reakciók, ha vannak, más immunmechanizmussal folynak és inkább allergiás jellegűek lehetnek.

### 2.2 Coeliakia előfordulása a magyar gyermekpopulációban

**Korponay-Szabó IR, Szabados K, Pusztai J, Uhrin K, Ludmány É, Nemes É, Kaukinen K, Kapitány A, Koskinen L, Sipka S, Imre A, Mäki M: Population screening for coeliac disease in primary care by district nurses using a rapid antibody test: diagnostic accuracy and feasibility study, British Medical Journal 2007;335(7632):1244-7.**  
*Impakt faktor: 9.250*

Ez a tanulmány az első reprezentatív felmérés a coeliakia magyarországi előfordulásáról. Mivel a glutenfogyasztás immunológiai hatásainak kifejlődéséhez idő kell és jelenleg csak az aktív immunfolyamat ismerhető fel megbízhatóan, 6 éves korú gyermekeket vizsgáltunk a kötelező beiskolázási gyermekgyógyászati ellenőrzésnél. A vizsgálatban Jász-Nagykun-Szolnok megye összes 6 éves korú gyermekeinek 76%-a, 2676 fő vett részt. A szűrést ujjbegy vérből a helyi védőnők TG2 autoantitestet kimutató helyszíni gyorstesztel (Biocard Celiac Disease Test) végezték; a pozitív eredményű gyermekeknél vékonybélbiopsiával igazoltuk a diagnózist. A védőnők által gyűjtött vérmintákból laboratóriumi antitestméréssel ellenőriztük a szűrőteszt hatékonyságát és a védőnői értékelés megbízhatóságát.

A vizsgálat alapján a vékonybél szövettani vizsgálattal igazolt coeliakia prevalenciája 1.38% (1:73) a 6 éves magyar gyermekpopulációban, a coeliakia antitest pozitívitás előfordulása 1.79%. A gyorsteszt működése megfelelő volt és a védőnői értékelés 99.4%-ban egyezett a laboratóriumi eredménnyel, annak ellenére, hogy a

védőnők az alacsony antitest koncentrációjú betegek egy részét (14 gyermek) nem ismerték fel. Mivel a gyorsteszt ezeknél halvány reakciót adott és a védőnők a vizsgálati protokollnak megfelelően közvetlenül küldték biopsziára a kiszűrt gyermekeket, elképzelhető, hogy a halvány reakció esetén nem minden esetben merték ennek a döntésnek a súlyát felvállalni.

A populációból kiszűrt coeliakiás gyermekek kisebbek voltak kortársaiknál és egy validált kérdőív (Child Health Questionnaire) alacsonyabb életminőséget mutatott, mely glutenmentes diéta hatására javult. Minor tünetek vagy anaemia a kiszűrt gyermekek 85%-ánál észlelhető volt, de ezekkel a szülők még nem fordultak orvoshoz.

A szűrésre alkalmazott első generációs gyorsteszt csak IgA antitesteket vizsgál. Ennek megfelelően a helyszíni szűrés egy IgA hiányos coeliakiás gyermeknél álnegatív eredményt adott. Azóta második generációs teszt jelent meg, melynek kontroll vonala a vérben lévő össz IgA-t mutatja ki, így jelzi a hiányos állapotot. Ezzel a második generációs teszttel további szűréseket végeztünk 2008-2010 között Magyarország több városában (Balatonfüred, Pomáz, Budaörs) a helyi önkormányzatok segítségével, szintén 6 éves gyermekeknél. Ezek a szűrések hasonló, 1-1.5% közötti prevalenciát állapítottak meg, közel kétszer annyi esetszámon, mint az első szűrés. Az IgA hiány előfordulását is megállapítottuk, mely 0.8%-nak adódott, mely az európai értékeknél (1:400) magasabb. Az eredményeket közlésre előkészítettük.

### 2.3 Coeliakia előfordulása magyar serdülőkben és felnőttekben

2010-ben szűrővizsgálatot indítottunk Budapesten 14-18 éves fiatalok körében, melynek első üteme 2010 decemberig tartott. Ennek során 1000 középiskolás fiatalt szűrtünk a Heim Pál Gyermekkorházban, mint közreműködő kutatóhelyen. A coeliakia antitest pozitivitás 1.2% volt. A szűrés tovább folytatódik, a tervezett esetszám, 3000 fő eléréséig. A felnőtt lakosság szűrése nehezebb, mivel kevés a lakosság ismerete a betegségről és a kamprányszerű szűrések esetén a panaszos személyek túljelentkezése miatt a valós értéknél magasabbat mérhetünk. Ezért két olyan keresztmetszeti vizsgálatot terveztünk, melyekben a szűrésre alkalmas adó egészségügyi ténykedés a panaszoktól független volt és ezért a szűrt népesség válogatás nélkülinek tekinthető. Mindkettő egyben a klinikailag fel nem ismert, hosszan fennálló coeliakia következményeit, vékonybélrendszeren kívüli szervrendszerekre kifejtett károsító hatását is vizsgálja.

**Korponay-Szabó IR, Tóth B, Király R, Nemes E, Vecsei Z, Juuti-Uusitalo K, Csípő A, Gyimesi J, Fésüs L, Mäki M. Passive transfer model of coeliac autoimmunity in newborns from mothers with coeliac disease and transglutaminase antibodies. 32th Annual Meeting of ESPGHAN 20, abstract**

Az egyik felnőtt szűrés során a kötelező terhesgondozáson sorban jelentkező terhes nőket szűrtük a 32-36. gestációs hét között Debrecenben és Nyíregyházán. Pozitív esetben a szüléskor megvizsgáltuk a placentát, az újszülött állapotát és az anyai antitestek transzmisszióját. A szűrésben 658 fő vett részt, köztük 4 új coeliakia antitest pozitív anyát (0.6%) találtunk. További 5 ismert, már kezelt coeliakiás beteg szült ugyanebben az időszakban, akinek lakóhelye a vizsgált földrajzi területen van, így a teljes prevalencia hasonló a gyermekekhez és fiatal felnőttekhez (1.36%). A magzatokban szülészeti szövödményt nem találtunk, mindnyájan érett súllyal születtek (a kisebb súlyú koraszülöttek felmérésére a vizsgálat nem alkalmas, mivel a szűrés a 32. héten vagy utána történt). Az újszülöttekbe nem jutottak át az erősen pathogen IgA típusú anyai coeliakia antitestek, a köldökzsinór vérben változó koncentrációban voltak IgG anyai coeliakia antitestek. Mivel a szűrés szervezésénél számos technikai adadályba ütköztünk és azt csak késve, 2009 novemberében sikerült megindítani, az OTKA kérésünkre a projekt befejezési idejét 2010.01.31-ről 2010.12.31-re módosította.

A másik szűrővizsgálatot a Debreceni Egyetem Patológiai Intézetében végeztük a sorban boncolásra kerülő halottakban, az egy csepp vérből alkalmazható Biocard Celiac Test TG2 antitestet kimutató helyszíni gyorstesztel. Elvileg ebbe az intézetbe kerül minden Debrecenben elhunyt személy. A vizsgálatnál elsősorban a fel nem ismert szervi manifesztációkra voltunk kíváncsiak, azt remélve, hogy így olyan szervekben is vizsgálható az antitestek jelenléte, melyek élőben biopsziás vizsgálatokkal nem hozzáférhetőek. Az első 300 halott vizsgálat során nem találtunk pozitív személyt, jóllehet laboratóriumi ELISA mérésekkel ellenőrizve a postmortem vér elvileg alkalmas volt az antitestek kimutatására. A klinikai adatok értékelésénél azt találtuk, hogy az elhunytak fele olyan tumoros betegségben szenvedett, melyre a megelőző hónapokban kemoterápiás kezelést kapott.



Mivel a citosztatikumok immunszuppresszív hatásuknál fogva csökkentik az autoimmun reakciókat, az antitestek emiatt eltűnhettek a vérből fals negatív reakciót okozva.

## 2.4 A szűrési stratégia javítása

**Raivio T, Korponay-Szabó IR, Paajanen T, Ashorn M, Iltanen S, Collin P, Laurila K, Nemes E, Kovács JB, Carrard G, Saramäki M, Mäki M, Kaukinen K. Comparison of a novel whole blood transglutaminase-based ELISA with a whole blood rapid antibody test and established conventional serological celiac disease assays. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2008;47:562-7.**

*Impakt faktor: 2.183*

A hagyományos szerológiai vizsgálatokra épülő coeliakia szűrővizsgálatok munka- és költségigényesek. A korábban általunk kifejlesztett helyszíni gyorsteszt alkalmazásával a szűrés meggyorsítható, számszerűen mérhető objektív eredmények azonban csökkenthetnék azokat az interpretációs nehézségeket, melyeket az alacsony antitest koncentrációból fakadó halvány tesztvonalak okoznak. Másrészt automatizálható rendszerek elősegítenék nagy átbocsátó képességű mérés létrehozását. Ezért a gyorsteszt elvén működő ELISA eljárást fejlesztettünk ki, mellyel az antitestek teljes vérből automatizált rendszerrel is kvantitatívan mérhetők.

## 3. *A coeliakia kifejlődése, az antitestek pathológiás hatásai, a klinikailag fel nem ismert coeliakia következményei*

### 3.1 A gliadin peptidek transzportja, deamidálása és detoxifikálása

**Garcia-Horsman JA, Venäläinen JI, Lohi O, Auriola IS, Korponay-Szabó IR, Kaukinen K, Mäki M, Männistö PT. Deficient activity of mammalian prolyl oligopeptidase on the immunoreactive peptide digestion in coeliac disease. Scand J Gastroenterol. 2007;42:562-71.**

*Impakt faktor: 1.758*

Az emberi emésztőtraktus enzimeit nem képesek a kalászos gabonákból származó egyes gliadin peptideket teljesen lebontani. Egy 33 aminosavból álló, prolinokban gazdag immunogén peptid különösen rezisztens és átjut a vékonybél hámsejteken. Ezért a coeliakia kezelésére exogén, bakteriális eredetű prolyl-oligoendopeptidázokat (POP) javasoltak USA kutatók (*Shan L, Science 2002;297:2275-9*). A POP típusú enzimek emberben is előfordulnak, ezért megvizsgáltuk ezek bélrendszeri előfordulását és szubsztrátspecifitását. A humán POP a vékonybél hámsejtek cytoplazmájában megtalálható, de nem kerül be olyan compartimente, ahol a gliadin peptidekkel találkozhat. Továbbá kimutattuk, hogy a tisztított humán POP enzim in vitro sem képes a gliadin peptideket megfelelően bontani, sőt a 33-mer peptid gátolja a POP aktivitását.

**Rauhavirta T, Qiao SW, Jiang Z, Myrsky E, Loponen J, Korponay-Szabó IR, Salovaara H, Garcia-Horsman JA, Venäläinen J, Männistö PT, Collighan R, Mongeot A, Griffin M, Mäki M, Kaukinen K, Lindfors K: Epithelial transport and deamidation of gliadin peptides: a role for coeliac disease patient immunoglobulin A, Clin Exp Immunol. 2011 Jan 14. doi: 10.1111/j.1365-2249.2010.04317**

*Impakt faktor: 3.009*

A hámsejtek képezik az első barriert a le nem bontott gliadin peptidek számára. Ebben a vizsgálatban kimutattuk, hogy gliadin peptidek már a hámsejteken való átjutás során deamidálódnak és a betegekben termelődő IgA anti-TG2 antitestek fokozzák a gliadin peptidek átjutását. A hatás a TG2 aktivitás fokozásán keresztül jön létre és TG2 inhibitorral gátolható.

**Hodrea J, Demény MA, Majai G, Sarang Z, Korponay-Szabó IR, Fésüs L. Transglutaminase 2 is expressed and active on the surface of human monocyte-derived dendritic cells and macrophages. Immunol Lett. 2010;130:74-81.**

*Impakt faktor: 2.906*

A gliadin peptidek deamidációját tekintik a legfontosabb lépésnek, melyben a TG2 kapcsolatba kerül a peptidekkel és azok TG2 deamidációs működése révén válnak negatív töltésűvé és illeszkednek be a HLA-DQ2 vagy DQ8 molekula antigén-prezentáló részébe. Az azonban nem világos, hogy ez a folyamat pontosan hol megy végbe, a sejteken belül, a lamina propria-ban vagy az antigénprezentáló sejtek felszínén. Az extracelluláris matrixban lévő TG2 nem aktív. A jelen munkában azonban a humán dendritikus sejtek és macrophagok felszínén aktív TG2 jelenlétét igazoltuk, így ezek felszínén effektív deamidáció lehetséges.

### 3.2 A deamidált peptidek felismerése, molekuláris mimikri

**Korponay-Szabó IR, Vecsei Z, Király R, Dahlbom I, Chirido F, Nemes E, Fésüs L, Mäki M. Deamidated gliadin peptides form epitopes that transglutaminase antibodies recognize. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2008;46:253-61.**  
Impakt faktor: 2.132

A coeliakia antitestek jellegzetes velejárói az aktív coeliakia betegségnek, de nem coeliakiás egyedekben nem fordulnak elő. A deamidált peptidek ellen antitestek termelődnek, de az anti-TG2 keletkezése nem tisztázott; megjelenését a haptén-carrier elv alapján magyarázzák, melyet a deamidált gliadin peptidekre adott immunválasz tesz lehetővé. A tanulmányban kimutattuk, hogy monoclonalis nem coeliakia eredetű anti-TG2 antitestek a deamidált gliadin peptideket is felismerik. A keresztreakció többféle kompetíciós vizsgálattal és coeliakiás tisztított páciens antitestekkel is alátámasztható. Mivel a peptidek primer aminosav szerkezete nem egyezik a TG2-vel, a jelenség háromdimenziós hasonlóságon alapul. Ezen eredmények alapján a coeliakia antitestek megjelenésére új mechanizmust, a molekuláris mimikri jelenségét proponáljuk.

**Papp M, Foldi I, Altorjay I, Palyu E, Udvardy M, Tumpek J, Sipka S, Korponay-Szabó IR, Nemes E, Veres G, Dinya T, Tordai A, Andrikovics H, Norman GL, Lakatos PL. Anti-microbial antibodies in celiac disease: trick or treat? World J Gastroenterol. 2009;15:3891-900.**  
Impakt faktor: 2.092

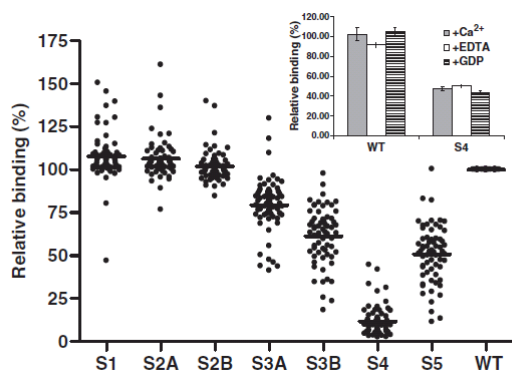
A gliadin peptidekre adott választól függetlenül találtuk a bélben található baktériumok egyes felszíni komponensei ellen a coeliakia aktív szakaszban kimutatható antitesteket. Ezek diagnosztikus értéke csekély. Primer oki szerepük ellen szól, hogy az antitestek a kezelés, glutenmentes diéta mellett eliminálódnak.

### 3.3 A coeliakia autoantitestek kötődése és biológiai hatásai, a fő TG2 epitóp azonosítása

**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;26:278-87.**  
Impakt faktor: 2.154

**Király R, Csoz E, Kurtán T, Antus S, Szigeti K, Simon-Vecsei Z, Korponay-Szabó IR, Keresztessy Z, Fésüs L. Functional significance of five noncanonical Ca<sup>2+</sup>-binding sites of human transglutaminase 2 characterized by site-directed mutagenesis. FEBS J. 2009;276:7083-96.**  
Impakt faktor: 3.042

Biokémiai vizsgálatokkal kimutattuk, hogy az coeliakia antitestek kötődése nem gátolja az enzim transzglutamináz aktivitását, sőt fokozza azt. Ennek alapján az a korábbi feltételezés (*Byrne, Gut* 2007), hogy az aktív centrum lenne kötődési hely, nem tekinthető helytállónak. A coeliakia antitestek kötőhelyét tovább vizsgáltuk a TG2 calcium kötő helyeit reprezentáló mutánsokban. A core domain kezdetén lévő calcium-kötőhely (S4) mutációja esetén a TG2 antigenicitása jelentősen csökken, így ez az eredmény jelentett kiindulási alapot a speciifikus epitópok lokalizálásához.



3. ábra. A coeliakia antitestek kötődése mutáns TG2 molekulákhoz

**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 autoantibody binding and effects in celiac disease. Közlésre benyújtva**

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

**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 szabadalmi bejelentés**

Ezekből a kezdeti adatokból kiindulva irányított mutagenesis segítségével egy fő TG2 epitópot azonosítottunk, mely konformációs és 3 domain részvételével alakul ki. Az N-terminális rész vagy a C-terminális rész alternatív módon elegendő a coeliakia antitestek kötődéséhez, míg a core domain területén levő aminosavak szerepe obligát. Betegsavóból származó és betegekből készített monoclonalis antitestekkel végzett kompetíciós kísérletekkel kimutattuk, hogy a különböző betegek antitestjei ugyanahhoz a fő coeliakiás epitóphoz kötődnek, és hogy ennek dominanciája évtizedeken át tartó aktív betegség során is megmarad. Ez azt jelenti, hogy az anti-TG2 antitestek képződése szabályos, adott felszín ellen irányul és nem véletlenszerűen a TG2 ellen. A kísérletek során adatokat találtunk arra, hogy az azonosított fő epitópon keresztül valósul meg az anti-TG2 antitestek biológiai hatása is sejtes rendszerekben és egy materno-foetalis transzmissziós helyzetben. Vizsgálataink során egy olyan egér monoclonalis anti-TG2-t is találtunk, melynek kötőhelye részleges átfedést mutat a coeliakiás antitestek kötődésével. Ez az antitest feleslegben alkalmazva képes megakadályozni a beteg antitestek káros biológiai hatását, sőt a szövetekről is képes őket leszorítani. Eredményeink alapján lehetségesnek látszik, hogy hasonló tulajdonságú antitestekkel vagy más, az epitópot elfedő molekulákkal terápiás hatás érhető el. Az ilyen anyagok előállítására a Debreceni Egyetem szabadalmi beadványt nyújtott be.

**Salmi TT, Collin P, Korponay-Szabó IR, Laurila K, Partanen J, Huhtala H, Király R, Lorand L, Reunala T, Mäki M, Kaukinen K. Endomysial antibody-negative coeliac disease: clinical characteristics and intestinal autoantibody deposits. Gut. 2006;55:1746-53.**

*Impakt faktor: 9.002*

Az anti-TG2 kötődés relevanciáját in vivo is igazoltuk olyan betegeknél, akiknek a vérben az anti-TG2 antitestet nem lehetett mérni. A vékonybél vizsgálatával azonban igazolható volt, hogy a szövetekben kötődött TG2-specifikus antitestek ezeknél a betegeknél is jelen vannak. A TG2 specificitást elucióz és kötődési vizsgálatokkal igazoltuk.

**Stenman SM, Lindfors K, Korponay-Szabó IR, Lohi O, Saavalainen P, Partanen J, Haimila K, Wieser H, Mäki M, Kaukinen K. Secretion of celiac disease autoantibodies after in vitro gliadin challenge is dependent on small-bowel mucosal transglutaminase 2-specific IgA deposits. BMC Immunol. 2008 Feb 29;9:6.**

*Impakt faktor: 2.661*

Kimutattuk azt is, hogy a gliadin hatásra ex vivo rendszerben a beteg vékonybél biopsiás szövetmintájában kimutatható antitest választ a szövetekbe már korábban lerakódott anti-TG2 antitestek mobilizálása váltja ki. Korábban úgy gondolták, hogy a hosszabb ideje kezelt (glutenmentes diétát folytató) betegeknél kiváltódó reakció diagnosztikusan alkalmazható. Saját vizsgálatunkban azonban a gliadin provokatív hatást már nem fejtett ki, ha a vékonybélből a diéta mellett már kiürültek az anti-TG2 antitestek.

**Myrsky E, Kaukinen K, Syrjänen M, Korponay-Szabó IR, Mäki M, Lindfors K. Coeliac disease-specific autoantibodies targeted against transglutaminase 2 disturb angiogenesis. Clin Exp Immunol. 2008;152:111-9.**

*Impakt faktor: 2.853*

**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 RhoA. Cell Mol Life Sci. 2009;66:3375-85.**

*Impakt faktor: 6.090*

**Caja S, Myrsky E, Korponay-Szabó IR, Nadalutti C, Sulic AM, Lavric M, Sblattero D, Marzari R, Collighan R, Mongeot A, Griffin M, Mäki M, Kaukinen K, Lindfors K. Inhibition of transglutaminase 2 enzymatic activity ameliorates the anti-angiogenic effects of coeliac disease autoantibodies. Scand J Gastroenterol. 2010;45:421-7.**

*Impakt faktor: 2.084*

Az anti-TG2 antitestek biológiai hatásának in vitro vizsgálatára finn munkatársaink endothel sejtkultúra modellre fejlesztettek ki. Az endothel sejtek az immunreakció középpontjában állnak, mivel az anti-TG2 antitestek szövetekhez a kiserek mentén kötődnek. Kimutattuk, hogy anti-TG2 antitestek jelenlétében az angiogenesis károsodik, új értubulusok képződése csökken. A vascularis permeabilitás is megnövekszik, a barrier funkció

károsodik. Bár az érképződés egyes lépéseit más TG2 gátló antitestek is befolyásolják, ezek hozzájárulnak az összes coeliakiára jellemző eltéréshez. További kísérletekkel igazoltuk, hogy a coeliakiás betegek antitestjei úgy kötődnek az enzimhez, hogy annak aktivitását fokozzák. Ezek a kísérletek többféle biológiai rendszerben is megerősítik korábbi biokémiai megfigyelésünket az antitestek TG2-t aktiváló hatásáról. Kimutattuk továbbá, hogy a megnövekedett TG2 hatására a RhoA anyagcsereút aktiválódik. Korábbi irodalmi adatok kimutatták, hogy a konstitucionálisan aktív RhoA hatására hasonló sejtkárosodás és motilitási zavar következik be, mint azt a kísérletekben észleltük. Ezek az eredmények, összevetve azzal, hogy anti-TG2 antitestek gyakorlatilag minden coeliakiás betegben kimutathatók, a coeliakia antitestek fontos patogenetikai szerepét alátámasztják. A súlyos boholyatrophia kialakulásában betöltött direkt szerepük azonban további igazolásra szorul.

### 3.4 A fel nem ismert klinikai betegség következményei

**Nemes É, Lefler É, Szegedi L, Kapitány A, Kovács J, Balogh M, Szabados K, Tumpek J, Sipka S, Korponay-Szabó IR. Gluten intake interferes with the humoral immune response to recombinant hepatitis B vaccine in patients with celiac disease. Pediatrics 2008;121:e1570-6.**

*Impakt faktor: 4.470*

A coeliakia kórfolyamata a rendszeres gabonafogyasztás, gliadin bevitel hatására már a korai életkorban megindul. A tünetek megjelenése változó és a diagnózis felállítása késhet. Mivel a coeliakia a népesség 1-1.5%-ában megtalálható (de gyakran nem ismerik fel), a vele járó immunológiai anomáliák népegészségügyi szempontból is jelentősek lehetnek. A coeliakia kezeletlen állapotában adott, életkorhoz kötött (Magyarországon 14 éves kori) kötelező hepatitis B védőoltás után csökkent immunreaktivitást észleltünk, míg a jól diétázó betegeknél normál immunválaszt mutattunk ki. A hepatitis B peptidok prezentálása részben a HLA-DR3 és DQ2 molekulákon keresztül történik és DQ2 pozitív személyeknél gyakoribb a non-responder állapot. A gluten jelenlétében a nem kezelt coeliakiás betegeknél elsősorban a gliadin peptidok prezentálódnak és ezzel ronthatják az oltás hatékonyságát. Ezt a feltételezést támogatja az az eredményünk, hogy a diéta melletti immunizálás hasonló eredménnyel járt mint az egészséges populáció oltása, és a non-responder coeliakiás fiatalokat újraoltva szintén jó szerológiai immunválasz alakul ki.

**Hadjivassiliou M, Mäki M, Sanders DS, Williamson CA, Grünewald RA, Woodroffe NM, Korponay-Szabó IR. Autoantibody targeting of brain and intestinal transglutaminase in gluten ataxia. Neurology. 2006;66:373-7.**

*Impakt faktor: 5.690*

A korai életkorban kialakuló malabsorptio esetén vagy később is, nyilvánvaló gasztrointesztinális manifesztáció esetén viszonylag egyszerűen megtörténik a coeliakia diagnosztizálása és kezelést írnak elő. Ezért a betegség hosszabb távú szövődményeire azoknál kell számítani, akiknél az emésztőrendszeri manifesztáció szerény vagy hiányzik. A coeliakia irreverzibilis károsodást képes okozni az idegrendszerben, ennek eredményeképp demencia és cerebellaris ataxia alakul ki. Az ataxiás betegeknél általában nincsenek gyomor-bélrendszeri tünetek. A vizsgálatban azonban kimutattuk, hogy ezeknek a betegeknél a vékonybél nyálkahártyájában lerakódnak az anti-TG2 antitestek és azok a károsodott agyterületek kis ereiben is megtalálhatók. A vizsgálat további klinikai adatokat szolgáltat arra, hogy az anti-TG2 antitestek kötődése károsító hatású.

**Koskinen O, Collin P, Korponay-Szabó I, Salmi T, Iltanen S, Haimila K, Partanen J, Mäki M, Kaukinen K. Gluten-dependent small bowel mucosal transglutaminase 2-specific IgA deposits in overt and mild enteropathy coeliac disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2008;47:436-42.**

*Impakt faktor: 2.132*

Az anti-TG2 antitestek által kiváltott károsodásokhoz változó idő kellhet. A tanulmányban 48 betegen azt vizsgáltuk, hogy az első klinikai kivizsgáláskor látszólag normál vékonybél boholszerkezetet mutató betegeknél milyen a későbbi kimenetel. Ezeknél a betegeknél a vérben nem vagy csak alacsony koncentrációban voltak jelen anti-TG2 antitestek. A vékonybélbe lerakódott anti-TG2 antitestek jelenléte esetén több év után nagy valószínűséggel jelent meg klasszikus boholyatrophia, egy ezek az eltérések prediktív értékűek.

### 3.5 A coeliakia diagnózis non-invazív lehetőségei

**Dahlbom I, Korponay-Szabó IR, Kovács JB, Szalai Z, Mäki M, Hansson T. Prediction of clinical and mucosal severity of coeliac disease and dermatitis herpetiformis by quantification of IgA/IgG serum antibodies to tissue transglutaminase. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2010;50:140-6.**

*Impakt faktor: 2.183*

Mivel a szérumban jelen lévő anti-TG2 nem minden esetben társul manifeszt vékonybélkárosodással, azt vizsgáltuk 304 gluten-érzékeny és 131 kontroll betegnél, hogy a vékonybél boholy szerkezetének átépülése mutat-e összefüggést az antitestek szérumkoncentrációjával. A kóros határát tízszeresen meghaladó (>10xULN) értékeknél, különösen akkor, ha az IgA és IgG anti-TG2 antitestek is pozitívak, manifeszt boholyatropiára kell számítani (specifititás:99%). Ezért a szérum antitestek kvantitatív mérése megkönnyítheti a coeliakia non-invazív diagnózisát.

**Giersiepen K, Leigemann M, Stuhldreher N, Ronfani L, Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabó IR. Accuracy of Diagnostic Antibody-Tests for Coeliac Disease in Children: Summary from an Evidence Report. J Pediatr Gastroenterol Nutr, in press**

**Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabó IR, Mearin ML, Phillips A, Shamir R, Troncone R, Giersiepen K, Branski D, Catassi C, Leigeman M, Mäki M, Ribes-Koninckx C, Ventura A, Zimmer KP. ESPGHAN guidelines for the diagnosis of coeliac disease in children and adolescents. An evidence-based approach. J Pediatr Gastroenterol Nutr, in press**

Saját adatainkat és a 2004. január – 2009. szeptember között megjelent irodalmi adatokat meta-analízissel értékeltük. A vizsgálatban a különféle coeliakia szérum antitest eredmények (hagyományos gliadin antitest, deamidált gliadin elleni antitest, anti-TG2 és a hagyományos ún. anti-endomysium antitest) diagnosztikus prediktív értékét elemeztük összesen 3110 betegben. Az endomysium antitest volt a legmegbízhatóbb, mely a anti-TG2 antitestek speciálisan coeliakiára jellemző formáját mutatja ki, azonban magas anti-TG2 értékek is jó egyezést mutattak a vékonybél szövettani eredmény alapján felállított diagnózissal. Szintén megfelelő klinikai biztonságot jelent a deamidált gliadin peptidekkel végzett antitestvizsgálat. Ennek alapján az Európai Gyermekgastroenterológiai, Hepatológiai és Táplálkozástudományi Társaság (ESPGHAN) új diagnosztikus irányelveket dolgozott ki: amennyiben a betegség jellegzetes tünetei jelen vannak, az anti-TG2 antitestek szintje a vérben magas (>10xULN) és a beteg hordozza a HLA-DQ2 vagy DQ8 tulajdonságot, a jövőben a coeliakia diagnózisa gyermekeknél vékonybélbiopsziás szövettani vizsgálat nélkül is kimondható. A korai illetve bizonytalan esetekben a szövetekben lerakódott anti-TG2 antitestek jelenléte figyelembe vehető a diagnózis támogatására.

### Új eredmények:

- 1. Új, coeliakiára hajlamosító genetikai eltéréseket írtunk le és új, a betegséggel összefüggő géneket ismertünk fel (haptoglobin, THEMIS, RUNX3, TNFRSF14, MMEL1, PLEK, CCR4, CD80, KTELCl, BACH2, MAP3K7, PTPRK, ZMIZ1, ETS1, CIITA, SOCS1, CLEC16A, ICOSLG).**
- 2. Megállapítottuk, hogy a magyar népességben a coeliakia előfordulása 1.3% körül van.**
- 3. Azonosítottuk a coeliakia-specifikus antitestek kötődési epitópját a transzglutaminase enzim felszínén, új potenciális kezelési lehetőséget írtunk le a kötődés gátlása révén**
- 4. Kimutattuk, hogy a coeliakia autoantitestek részt vesznek a betegség pathomechanizmusában biológiai hatásaik révén**
- 5. Az antitest meghatározások technikai javításával hozzájárultunk az új európai, non-invazív coeliakia diagnózist lehetővé tevő irányelvek kialakításához.**

A projekt során, főként az igen nagyszámú genetikai minta tárolására és nyilvántartására egy -70 fokos hűtőt és egy folyékony nitrogén tartályt valamint egy számítógépet, a laboratóriumi munkához centrifugát, szivót szereztünk be. A genetikai vizsgálatok jelentősebb reagensköltsegekkel jártak, ezért kevesebb állóeszköz beszerzés történt a tervezettnél. Az eredmények bemutatását célzó kongresszusi részvételeken kívül utazási költséget igényelt a finnországi kutatási partnerekkel való közös kísérletek, mérések elvégzése.

Dr Korponay-Szabó Ilma  
vezető kutató