

Molekylære mekanismer bag den immunologiske reaktion mod gluten hos patienter med cøliaki

STATUSARTIKEL

Cand.scient. Christian Nielsen, Steffen Husby & Søren T. Lillevang

Cøliaki skyldes intolerance over for kosttilført hvedegluten og relaterede proteiner i rug og byg. Intolerancen forårsager en kronisk inflammation af tyndtarmens slimhinde. Inflammationen fører til villusatrofi og kryptcellehyperplasi af tarmmucosa, hvilket hindrer en effektiv optagelse af næringsstoffer med malabsorption til følge. Cøliaki er den eneste beskrevne sygdom med autoimmunt præg, hvor den eksterne *trigger* (gluten) er kendt, og en strengt glutenfri diæt medfører fuldstændig remission af sygdommen. Sygdommens forekomst og symptomer og diagnostikken, der er forbundet hermed, er for nylig gennemgået i Ugeskrift for Læger (1).

Inden for de seneste år har man identificeret peptider, der genkendes af CD4⁺-T-celler, isoleret fra cøliakipatienters tarmbiopsier. Det er desuden fastslået, at en enzymkatalyseret modificering af disse peptider er essentiel for den binding til DQ2- eller DQ8-molekyler på antigenpræsenterende celler, der er nødvendig for at initiere et effektivt T-celle-respons. På denne baggrund er der etableret en molekylær model af den velkendte association mellem cøliaki og forekomsten af vævstypantigenerne DQ2 og DQ8. Denne statusartikel fokuserer på ny viden om samspillet mellem genetiske og miljømæssige faktorer samt de cellulære og molekylære processer, der fører til udviklingen af cøliaki.

Genetik

Risikoen for at søskende til en cøliakipatient får sygdommen er 20-60 gange højere end hos den normale befolkning, hvilket understreger betydningen af genetiske faktorer. Tvillingestudier understøtter dette, idet konkordansraten for sygdomsforekomst er ca. 70% hos monozygotiske tvillinger mod ca. 20% hos dizygotiske tvillinger.

Omkring 95% af de kaukaside cøliakipatienter bærer vævstypemolekylet HLA-DQ2 (DQA1*0501/DQB1*0201) og med meget få undtagelser findes HLA-DQ8 (DQA1*0301/DQB1*0302) hos de resterende patienter. De fleste patienter har haplotypen DR3-DQ2 (DRB1*0301; DQA1*0501; DQB1*0201) eller de er DR5-DQ7- og DR7-DQ2-heterozygote (Fig. 1). Hos de få HLA-DQ2-negative cøliakipatienter findes næsten uden undtagelse HLA-DQ8 (DQA1*0301; DQB1*0302).

Major histocompatibility complex (MHC)-associationen forklarer imidlertid ikke mere end ca. 40% af den familiære risiko for at udvikle cøliaki, og konkordansraten for cøliaki mellem HLA-identiske søskende er kun ca. 30%. Sammenholdt med at 25-30% af normalbefolkningen bærer ovenstående allelkombinationer uden at få sygdommen, betyder det, at non-HLA-loci har afgørende betydning for den genetiske prædisposition. Trods flere familiebaserede associa-

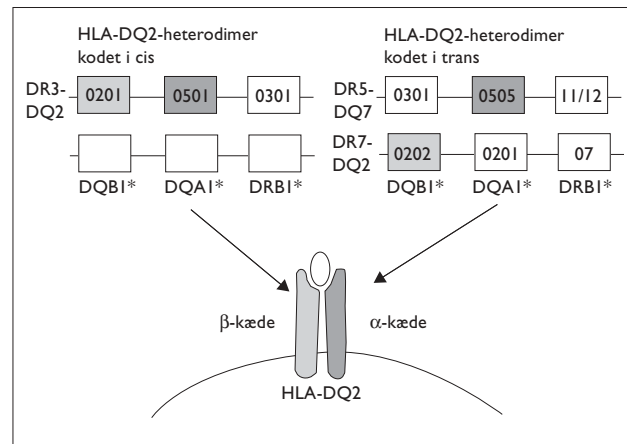


Fig. 1. HLA-association i cøliaki. Hos de fleste patienter udtrykkes en bestemt HLA-DQ2 (DQA1*05-DQB1*02) heterodimer. Dette HLA-molekyle er enten kodet i cis hos personer med DR3-DQ2-haplotypen, eller i trans hos personer, der er DR5-DQ7- og DR7-DQ2-heterozygote. Modificeret efter (2).

tions- og koblingsstudier af det humane genom, er det endnu ikke lykkedes at identificere mere end et fåtal non-HLA loci, der bidrager til den genetiske disposition for cøliaki. Dette tyder på, at de ukendte prædisponerende gener hver især kun bidrager i begrænset omfang til den totale genetiske risiko for at komme til at lide af sygdommen. Visse allele varianter (polymorfier) af genet for CTLA-4 (cytotoksisk T-lymfocytassocieret antigen 4) synes at bidrage til den genetiske disposition for cøliaki. Derudover er der fundet (svag) kobling til kandidatregioner på de kromosomale loci 2q, 5q og 11 q. Der er dog fundet demografiske forskelle i bl.a. koblingen til CTLA-4-genet, hvilket tyder på, at cøliaki har en kompleks genetisk baggrund. Komplekse genetiske sygdomme udviser ofte locus heterogenitet, således at forskellige gener producerer sygdom i forskellige familier, gener interagerer med hinanden, og forskellige kombinationer af genvarianter fører til den samme fænotype. Dette vanskeliggør naturligvis identifikationen af gener, der prædisponerer for sygdommen.

T-celle-genkendelse af deamiderede glutenpeptider

Glutenreaktive T-celler findes hyppigt i tyndtarmsbiopsier fra cøliakipatienter, men ikke hos kontrolpersoner. Disse T-celler er CD4⁺, benytter αβ-receptortypen og er primært af

Cøliaki eller glutenallergi er en CD4⁺-T-celle-medieret autoimmun sygdom, der er kendetegnet ved en kronisk inflammation af tyndtarmens slimhinde. Tilstanden udløses af kosttilført gluten hos genetisk disponerede individer.

Th1-fænotypen. Ex vivo-studier af tyndtarmsbiopsier fra cøliakipatienter har afsløret, at disse T-celler uden undtagelse responderer på peptider fra gluten, præsenteret af de sygdomsassocierede HLA-DQ2- og -DQ8-molekyler (3).

Gluten indeholder proteinfraktionen prolamin, og i hvede er det prolaminfraktionen gliadin, der indeholder det toksiske protein. De immunreaktive proteiner i cøliaki er α - og γ -gliadin og disse indeholder i deres oprindelige form meget få negativt ladede aminosyrer. Derfor har uændrede peptider udledt af gliadin ikke en tilstrækkelig høj bindingsaffinitet til HLA-DQ2-molekylet til at sikre de stabile peptid-DQ2-komplekser, der er nødvendige for at initiere et effektivt Th-hjælpercelle-respons. Gliadin indeholder imidlertid mange neutrale glutamin (Q)-aminosyrer (omkring 40% af peptidet), der ved deamidering til den negativt ladede aminosyre-glutaminsyre (E) på bestemte steder af peptidet øger bindingen til HLA-DQ2. En sådan deamidering kan finde sted i tarmens miljø, men alternativt kan deamideringen medieres af det Ca^{2+} -afhængige enzym vævstransglutaminase (tTG), hvis aktivitet er forhøjet i tyndtarmsslimhinden hos cøliakipatienter. Ud over at mediere deamidering af Q har tTG en vigtig funktion i heling af vævsskader, samling af ekstracellulærmatrix og sammenvoksning af celler via katalyse af krydsbindinger (transamidering) mellem Q-donor og Q-acceptor-proteiner (f.eks. fibronektin).

I løbet af de senere år er der identificeret peptider, der er udledt af gliadin og genkendt af DQ2-restringerede CD4^+ T-celler isoleret fra tarmbiopsier af cøliakipatienter. Stimuleringen af T-cellerne til proliferation kræver udskiftning af enkelte Q-aminosyrer med E på bestemte ankerpositioner (4). Denne deamidering katalyseres af tTG in vivo.

Der optræder en markant ophobning af DQ2-restringerede T-celle-epitoper i de regioner af α - og γ -gliadin, der har den højeste forekomst af aminosyren prolin (P). P spiller en central rolle for disse epitopers immunogenicitet, hvilket kan skyldes flere faktorer: 1) fordøjede T-celle-antigener er normalt sjældne, idet kosttilførte proteiner oftest nedbrydes under fordøjelsen til peptidfragmenter, der er mindre end den minimumslængde på ni aminosyrer, der kræves for at initiere et T-celle-respons (gælder MHC I-præsentation, mens MHC II-præsentation, fx via DQ2, kræver endnu længere peptider); 2) P beskytter peptider mod proteolytisk nedbrydning, hvilket medfører, at de P-rige regioner af gliadinpeptiderne når tyndtarmens lamina propria i store fragmenter. Desuden har den indbyrdes afstand mellem Q og P helt afgørende betydning for tTG's specificitet. Den fortrukne afstand mellem Q og P forekommer ofte i de regioner, hvor epitoperne er ophobet, og de mange Q-aminosyrer i disse P-rige omgivelser er et glimrende substrat for tTG.

Helt ny forskning har medført identifikation af et 33-mer peptidfragment af α -gliadin, der tilsyneladende er den primære igangsætter af den inflammatoriske respons mod gluten i cøliakipatienter (Fig. 2) (5). Peptid-fragmentet reagerer med tTG med markant højere affinitet end noget kendt naturligt tTG substrat. Peptidfragmentet indeholder tre gentagne og overlappende (oligomeriserede) unikke T-celle-epitoper, der henholdsvis er til stede tre gange, to gange og en gang og derved kan fungere som et multivalent tTG-sub-

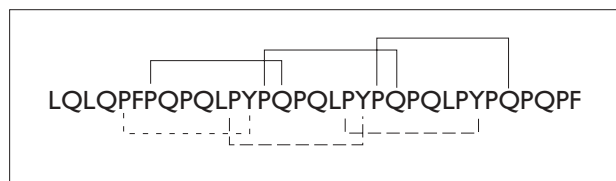


Fig. 2. 33-mer fragment af α -gliadin, der tilsyneladende er den primære igangsætter af det inflammatoriske respons mod gluten hos cøliakipatienter. Peptidfragmentet indeholder tre gentagne og overlappende (oligomeriserede) unikke T-celle-epitoper, der er til stede henholdsvis tre gange, to gange og en gang og reagerer med tTG med markant højere affinitet end noget kendt naturligt tTG-substrat.

strat. Herudover understreges peptidfragmentets centrale rolle i patogenesen ved cøliaki af, at peptidfragmentet er en meget potent stimulator af tre forskellige DQ2-restringerede T-celle-kloner og alle undersøgte T-celle-linjer isoleret fra tyndtarmsbiopsier fra cøliakipatienter. 33-mer peptid-fragmentet er modstandsdygtigt mod alle mave-, pancreas- og tarm-børstesøm-proteaser, hvilket sandsynliggør, at peptid-fragmentet kan trænge ind i tyndtarmens lamina propria hos cøliakipatienter. Til gengæld nedbrydes peptidet effektivt af visse bakterielle endopeptidaser.

Homologer til dette 33-mer peptidfragment er udelukkende fundet i de kornsorter (hvede, rug og byg), der er inflammationsinitierende hos cøliakipatienter. Dette forklarer med stor sandsynlighed, hvorfor cøliakipatienter udelukkende er intolerante over for proteiner fra disse kornsorter og ikke andre hyppigt forekommende kosttilførte proteiner.

Mekanismer involveret i dannelsen af cøliakilæsionen

Et karakteristisk træk ved cøliaki er en forøget permeabilitet af tyndtarmens slimhinde. De tidlige hændelser, der fører til denne nedsættelse af slimhindetætheden, er stort set ukendte, men menes at være initieret af en tarminfektion eller en mekanisk/kemisk skade af tyndtarmen (6). Ekspresionen af proteinet zonulin, en modulator af permeabiliteten af *tight junctions* i tarmen, er unormalt forøget i tarmbiopsier fra cøliakipatienter. Efter binding til en specifik overfladereceptor og via en kaskade af intracellulære signaleringer, menes zonulin at katalysere en proteinkinase C-afhængig polymerisering af aktin mikrofibriller, der fører til »åbning« af *tight junctions* i tarmepitelet. Zonulin medvirker dermed sandsynligvis til en rumlig forøgelse af de paracellulære *pathways* og dermed en øget permeabilitet af tyndtarmsslimhinden. Herefter kan proteinfragmenter bl.a. fra gliadin (herunder det omtalte 33-mer peptidfragment) trænge ind i lamina propria.

En vævsskade medfører frigivelse af tTG fra intracellulære depoter, hvorefter den omtalte deamidering af Q-aminosyrer i gliadinpeptider kan finde sted. Den efterfølgende CD4^+ -T-celle-aktivering igangsætter en kaskade af begivenheder, der fører til villusatrofi og krypthyperplasi.

T-cellerne syntetiserer store mængder af inflammatoriske mediatorer (cytokiner), der direkte og indirekte er medvirkende til den inflammatoriske proces. Således udskiller lamina propria T-lymfocytter, der er isoleret fra inflammert tarmvæv fra cøliakipatienter, spontant store mængder inter-

feron (IFN)- γ mRNA in vitro. IFN- γ kan aktivere makrofager og udskillelsen af proinflammatoriske cytokiner, som interleukin (IL)-1, IL-6 og *tumour necrosis factor* (TNF)- α , der opretholder og øger det lokale inflammatoriske respons. Samtidig er der en ukontrolleret høj udskillelse af IL-15 (7). Dette cytokin fremmer ekspressionen af det antiapoptotiske protein Bcl-2, hvilket gør T-cellerne modstandsdygtige over for apoptose.

I forsøg med dyr og med føtale tarmvævskulturer har man vist, at IL-2, TNF- α , IFN- γ og IFN- α/β fører til ændringer af tyndtarmsslimhinden, der minder om ændringerne ved cøliaki. Mekanismen indebærer bl.a. dannelsen af matrixmetalloproteinaser (MMP), som nedbryder kollagener i den ekstracellulære matrix. Den hurtige nedbrydning af villi, der foregår få timer efter gliadinprovokation af cøliakipatienter, skyldes sandsynligvis netop en nedbrydning af tarmkollagener.

I museforsøg kan gliadinfragmenter have en direkte stimulerende effekt på makrofager uden involvering af T-celler og tTG. Gluten, gliadin og deres proteolytiske fragmenter forøger produktionen og udskillelsen af den potente inflammatoriske mediator NO (nitrogen monooxid), TNF- α og IL-10 fra peritoneale musemakrofager, når de tilføres sammen med IFN- γ . Det aktive gliadinfragment (VS-FQQPQQYPSSQ) findes i den primære sekvens af $\alpha 2$ -gliadin (7).

I modsætning til hos raske kontrolpersoner, er der en høj ekspression af NO-syntetase i tyndtarmen hos patienter med cøliaki, ligesom man finder forhøjede niveauer af NO i urin og plasma.

In vitro kan hele den omtalte inflammatoriske kaskade inklusive nedbrydningen af tarmvævet struktur tilsyneladende initieres af IFN- α alene. Sammenholdt med den kliniske observation, at patienter i behandling med IFN- α ikke helt sjældent udvikler symptomatisk cøliaki, peger det på en central rolle for IFN- α . IFN- α er en tidlig og vigtig del af det antivirale immunologiske respons. Dette peger igen på (virus)infektion som en mulig udløsende faktor for sygdommen.

Koincidens med autoimmunsygdomme

Cøliaki optræder ofte sammen med autoimmunsygdomme og der er observeret en 10-30 gange højere end forventet forekomst af asymptomatisk cøliaki hos både børn og voksne med autoimmune lidelser såsom type 1-diabetes mellitus, autoimmun thyreoiditis og Sjögrens syndrom. Denne hyppige koincidens af autoimmunsygdomme kunne forklares ved en fælles genetisk baggrund eller ved at én autoimmun sygdom har patogene konsekvenser for en eller flere andre. Omvendt ses en forøget forekomst af andre autoimmunsygdomme hos patienter med ubehandlet cøliaki. Risikoen øges med varigheden af gluteneksposition, hvorfor tidlig diagnostisering af cøliaki og efterfølgende glutenfri diæt muligvis kan reducere udviklingen af andre autoimmunsygdomme.

Som omtalt katalyserer enzymet tTG dannelsen af irreversible krydsbindinger mellem glutamindonor- og glutaminacceptor-proteiner. Gliadin er et af de få glutaminrige proteiner, hvorimod en lang række forskelle proteiner kan

fungere som glutaminacceptorer, hvilket kan føre til dannelsen af forskellige gliadinslutaminacceptorkomplekser. Disse komplekser kan virke antigene, og hos patienter med cøliaki findes ofte en høj titer af antistoffer mod sådanne neoepitoper.

Autoantistoffer mod tTG hos cøliakipatienter kan binde tTG og muligvis inaktivere enzymets fysiologiske funktion, så bestemte vævsspecifikke proteiner ikke modificeres af tTG på normal vis. Dette kan hypotetisk føre til dannelsen af peptider, som af MHC klasse II-molekyler præsenteres for immunsystemet som autoantigener/epitoper.

Perspektiver

Den øgede forståelse af de molekylære mekanismer bag cøliakisygdommens patogenese åbner for interessante terapeutiske perspektiver. Den nærmest totale afhængighed af forekomsten af vævstypemolekylerne DQ2 eller DQ8 gør det relevant at spekulere i en blokering af disse, fx med ikkeaktiverende peptidomimetika. Identifikationen af bakterielle proteolytiske enzymer, der kan nedbryde den ellers proteolyseresistente 33-mer, giver potentielt mulighed for »detoksifikation«, ex vivo eller in vivo, af kosttilført gluten. Pga. det nu kendte antigen kan cøliaki udgøre en model for fortsat udforskning af autoimmunitet.

Summary

Christian Nielsen, Steffen Husby & Søren T. Lillevang: The molecular basis for gluten intolerance in patients with coeliac disease.

Ugeskr Læger 2003;165:917-20.

Coeliac disease is a complex inflammatory disorder of the small intestine, induced by dietary gluten in genetically susceptible individuals.

Recently, the nature of gluten-derived peptides recognized by gut-derived T cells from patients has been elucidated. It has further been established that the binding of such peptides to HLA-DQ2 and DQ8 molecules is enhanced following the modification of the peptides by the ubiquitous enzyme tissue transglutaminase. This knowledge has allowed the establishment of a molecular basis for the well-known association between coeliac disease and the expression of these HLA-molecules. This article summarizes the latest progress in coeliac disease molecular biology.

Reprints not available. Correspondence to: *Christian Nielsen*, Klinisk Immunologisk Afdeling, Odense Universitetshospital, DK-5000 Odense C.

Antaget den 15. januar 2003.

Odense Universitetshospital, Klinisk Immunologisk Afdeling og Pædiatrisk Afdeling.

Litteratur

1. Skovbjerg H, Sjöström H, Norén OB. Cøliaki – en diagnostisk og videnskabelig udfordring. Ugeskr Læger 2002;164:3329-33.
2. Sollid LM. Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. Nat Rev Immunol 2002;2:647-55.
3. Lundin KE, Qvigstad E, Sollid LM et al. Alloreactive T cells recognizing determinants dependent on the DQ beta chain of DQw2. Tissue Antigens 1989;34:312-6.
4. Anderson RP, Degano P, Godkin AJ et al. In vivo antigen challenge in celiac

- disease identifies a single transglutaminase-modified peptide as the dominant A-gliadin T-cell epitope. *Nat Med* 2000; 6:337-42.
5. Shan L, Molberg O, Parrot I et al. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science* 2002;297:2275-9.
 6. Schuppan D. Current concepts of celiac disease pathogenesis. *Gastroenterology* 2000;119:234-42.
 7. Novak P, Man P, Tuckova L et al. Monitoring of in vitro deamidation of gliadin peptic fragment by mass spectrometry may reflect one of the molecu-

lar mechanisms taking place in celiac disease development. *J Mass Spectrom* 2002;37:507-11.

Ovenstående statusartikel bygger på en større litteraturgennemgang end literaturlistens syv numre. Oplysninger om denne baggrundslitteratur kan fås fra forfatterne.

Tuberkulose og molekylærbiologi

STATUSARTIKEL

Åse Bengård Andersen, Troels Lillebæk, Christian Søborg,
Isik Somuncu Johansen & Vibeke Østergaard Thomsen

Mykobakterier er besværlige at arbejde med. I særdeleshed de sygdomsfremkaldende eksemplarer af arten *Mycobacterium tuberculosis* og de nært beslægtede medlemmer af det såkaldte *M. tuberculosis*-kompleks. Det er langsomt voksende bakterier med en fedtholdig væg, der er vanskelig at lysere, bakterierne vokser i pseudosyncytier – dvs. i »klumper«, og de skal håndteres i særlige sikkerhedslaboratorier på grund af deres smittefarlighed. *M. lepra* kan stadig ikke dyrkes in vitro. Molekylærbiologiske metoder var derfor velkomne og oplagte redskaber i tuberkulose- og lepraforskningen, og har siden begyndelsen af 1980'erne været anvendt inden for næsten alle discipliner. Det viste sig at være forholdsvis ukompliceret at klon og udtrykke mykobakterielle gener i andre prokaryote organismer, mens det at konstruere ændringer i mykobakteriers genom er mere kompliceret.

Hovedformålet med tuberkuloseforskning er ultimativt at bremse stigningen i nye tuberkulosetilfælde og at bringe sygdommen under kontrol. Sygdommen hærger med størst kraft i de dele af verden, som har færrest ressourcer (Asien, Afrika, Sydamerika og Østeuropa), og problemer med samtidig hiv-infektion og stigende forekomst af behandlingsresistent tuberkulose gør ikke problemet mindre. Overskriften på disse tiltag er derfor ikke overraskende: bedre diagnostika til hurtigere diagnoser og hurtigere behandling af smittefarlige patienter, nye antibiotika til behandling af resistente bakterier og supplement af de eksisterende (få) tilgængelige antibiotika samt en bedre og mere effektiv vaccine til erstatning for Calmette-vaccinen, der dels er vanskelig at producere og administrere og tilsyneladende heller ikke er effektiv nok. En række basale spørgsmål vedrørende sygdomsopstigning kræver fortsat belysning. Hvad skal der til for at gøre et individ immun over for tuberkulose? – Man kan jo godt få tuberkulose to gange. Hvorfor er det ikke alle, der smittes med tuberkulose, der bliver syge?

De molekylærbiologiske metoder var initialt forbeholdt de ressourcerstærke lande, men tuberkulose er et eksempel

på et sundhedsproblem, hvor teknologiudviklingen er på vej med enkle assays, der kan anvendes i teknologisk mindre veludrustede laboratorier. Påvisning af DNA fra mykobakterier med akkrediterede metoder har siden midten af 1990'erne været anerkendt i tuberkulosedagnostik både her i landet og i USA. Mikroskopi er fortsat uovertruffen med hensyn til pris og hurtighed, men sensitiviteten er selv i gode laboratorier højst 50% i forhold til sensitiviteten ved dyrkning. DNA-baserede diagnostiske test var i flere år domineret af Roches patent på området, men der konkurreres til stadighed om at udvikle andre diagnostiske assays. Analyserne er dog fortsat teknologikrævende. Selv om smitterisikoen for laboratoriepersonalet minimeres, når der arbejdes med varmedenatureret DNA, er der behov for faciliteter, der beskytter prøverne mod krydskontamination. Tendensen går alt i alt mod hurtigere og mere brugervenlige analyser, og nu venter vi blot på, at prisen skal falde.

Artsbestemmelse af mykobakterier ved klassiske mikrobiologiske metoder er begrænset af bakteriernes langsomme vækst. Nu foregår al rutinetypebestemmelse her i landet ved probeteknik, hvor DNA fra de isolerede mykobakterier *polymerase chain reaction* (PCR)-amplificeres og hybridiseres i et *dot-blot-assay* til et panel af de 90% hyppigst forekommende mykobakterier i et kommercielt tilgængeligt assay (1). Selve analysen er tilendebragt i løbet af få timer, og de resterende 10% identificeres ved sekventering af genet, der koder for 16S-RNA. Et mikro-chip-assay til påvisning og samtidig artsidentifikation af PCR-amplificeret materiale direkte fra patientprøven er under udvikling.

Resistensundersøgelser er på vej i samme retning. I de seneste år er den molekylærbiologiske basis for de fire standardantituberkulose stoffer: rifampicin, isoniazid, ethambutol og pyrazinamid blevet kortlagt. Virkningsmekanismerne er forskellige og resistensmekanismerne ligeså. Indtil videre er kun rifampicinresistensbestemmelse som PCR-baseret analyse kommercielt tilgængelig, men forslag til påvisning af resistensgivende mutationer for de tre andre stoffer er blevet publiceret.

Gennem årene har man fået delvis indblik i mykobakteriers genom gennem kloning og sekventering af stadig større fragmenter. I 1998 blev den komplette genomsekvens fra *M. tuberculosis* publiceret: laboratoriestammen H37Rv