

Celiaki som modell för autoimmun sjukdom

Transglutaminas har nyckelroll – stressreaktion sätter fart på ond cirkel



BODIL ROTH, biomedicinsk analytiker (BMA), doktorand, institutionen för kliniska vetenskaper, Malmö, Lunds universitet, och Apoteket
 bodil.roth@apoteket.se
KLAS SJÖBERG, docent, överlä-

kare, medicinska kliniken klas.sjoberg@med.lu.se
PÅL STENBERG, docent, apotekschef, Apoteket
 pal.stenberg@apoteket.se;
 samtliga Universitetssjukhuset MAS, Malmö

Typ 1-diabetes, reumatoid artrit, multipel skleros, myasthenia gravis, autoimmun tyreoidit och vissa vaskuliter är alla exempel på autoimmuna sjukdomar där immunsystemet angriper kroppens egna vävnader. På grund av sin långvariga, ofta kroniska, karaktär förorsakar dessa sjukdomar mycket lidande och utgör dessutom en betydande belastning på sjukvården.

Orsakerna till autoimmunitet är i många avseenden okända. Ett ljus i mörkret tändes dock 1997 när en tysk forskargrupp publicerade sensationella data kring den autoimmuna tarmsjukdomen celiaki (glutenintolerans).

Celiaki – klinik

Gluten är glutaminrika proteiner som finns i våra vanligaste sädeslag. Vid intag av gluten leder celiaki till inflammation och villusatrofi i tunntarmen, varvid upptaget av näringsämnen, vitaminer och spårmetaller försämras. Magont, utspänd buk, diarré eller förstoppning kan vara initiala symtom. Malabsorptionen kan leda till viktnedgång, långsam tillväxt hos barn, järnbristanemi, zinkbrist och trötthet. Dessutom kan CNS-effekter förekomma.

Diagnos av celiaki kan ställas när som helst i livet, men de flesta fall påvisas i småbarnsåren. Obehandlad celiaki hos barn ökar risken för andra autoimmuna sjukdomar, t ex typ 1-diabetes [1]. I modern tid har det framkommit att celiaki också förekommer i »tysta« former som leder till diagnos först i vuxen ålder.

Liksom vid de flesta andra autoimmuna sjukdomar är kvinnor oftare drabbade än män. Orsaken till denna könsskillnad är fortfarande okänd. I Europa uppgår prevalensen för celiaki till cirka 1 procent. I Japan, Kina och inre Afrika är sjukdomen sannolikt sällsynt, medan däremot Nordafrika är hårt drabbat med en prevalens på upp mot 5 procent [2]. Skillnaderna kan delvis förklaras av genetiska aspekter.

Genombrottet när vävnadstransglutaminas identifierades

Biomarkörerna vid celiaki är antikroppar riktade mot endomysium (EMA) och mot gliadin. EMA påvisas genom att patientserum inkuberas med vävnad från matstrupe tagen från apa eller från human navelsträng. Vid positivt resultat bildar en molekyl i vävnaden ett påvisbart komplex med antikroppen i patientens serum. Antigenets identitet har länge varit okänd. År 1997 rapporterade dock en tysk grupp att antigenet är ett enzym, vävnadstransglutaminas [3].

Transglutaminaser, en familj kalciumberoende enzymer

Transglutaminaser är en familj kalciumberoende enzymer där

en cysteinrest i det aktiva centrumet är essentiell. Vävnadstransglutaminas finns i de flesta mänskliga celler, sannolikt med uppgift att stabilisera cellmatrix [4, 5].

Enzymets fysiologiska roll är dock fortfarande delvis oklar. Möss som saknar genen för transglutaminas har reducerad glukostolerans men förefaller i övrigt fungera väl [6]. Det är dock möjligt att andra transglutaminaser tar över vävnadsenzymets roll i denna djurmodell.

Plasmafaktor XIII är ett annat, trombinberoende transglutaminas med uppgift att förstärka blodkoaglet genom att katalysera bildningen av tvärbryggor mellan glutamin och lysin i fibrin. Faktor XIII finns även i trombocyter och monocyter, medan makrofager innehåller vävnadstransglutaminas [7].

Principen för transglutaminaskatalyserade reaktioner vid celiaki framgår av Figur 1. Vid transamideringen är det första steget i reaktionen hastighetsbestämmande, varför intermediet, tioestern bildad av enzymets tiolgrupp och en glutamingrupp i substratet, blir kortlivat [8]. I frånvaro av en amin som sekundärt substrat kommer däremot det andra steget med vatten som en svag nukleofil att bli hastighetsbestämmande [9]. Vid transglutaminaskatalyserad hydrolys kommer därför den intermedieära tioestern att föreligga i relativt höga koncentrationer.

Transglutaminaser och celiaki

Den sensationella tyska upptäckten ledde till en dramatisk ökning av intresset för transglutaminas. Spelar detta enzym, vars antikroppar finns hos patienter med glutenintolerans, någon roll vid uppkomsten av celiaki?

Tidigt kunde flera forskargrupper visa att transglutaminas, förutom en gängse transamidering mellan olika proteiner, i en given ordning kan katalysera deamideringen av specifika glutaminrester i gliadiner till glutaminsyra [10-12]. Gliadinerna får därigenom en förändrad karaktär med flera, specifikt lokaliserade, negativa laddningar. Sådana modifierade gliadiner passar se-

SAMMANFATTAT

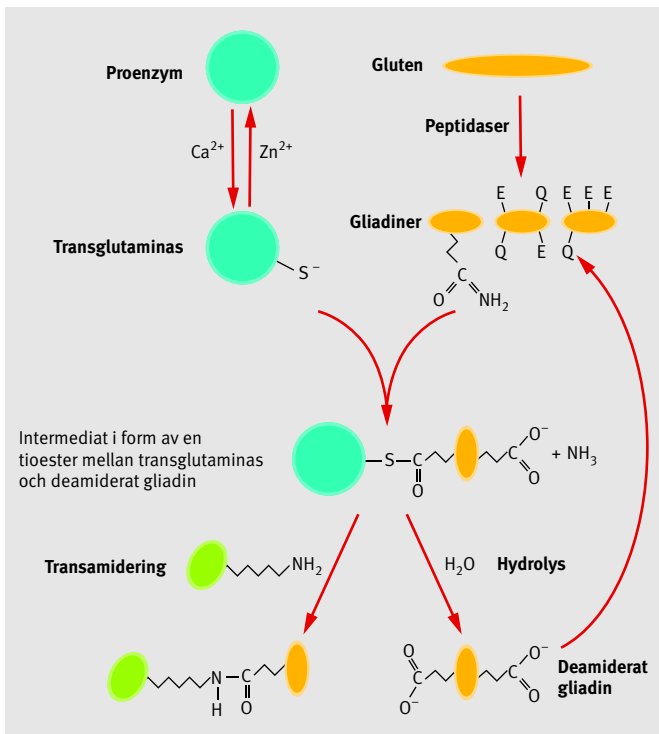
Autoantigenet till endomysieantikropparna (EMA) vid celiaki utgörs av vävnadstransglutaminas. Zink hämmar den kalciumberoende aktiveringen av detta tiolenzym och reducerar också affiniteten mellan transglutaminas och antikropparna.

Accidentellt aktiverat transglutaminas, t ex på grund av stressutlöst zinkbrist i tarmväggen, deamiderar specifika glutaminrester i gliadiner. Ett onormalt långlivat intermediet mellan enzymet och partiellt modifierat gliadin kan aktive-

ra T-celler hos personer med haplotypen HLA DQ2/DQ8.

Immunreaktionen leder till antikroppar mot såväl enzymet som gliadinet och till villusatrofi, vilket medför reducerad zinkabsorption – den onda cirkeln sluts.

Vid reumatoid artrit ses en liknande bild med antikroppar mot såväl citrullin som ett citrullinerande, kalciumberoende tiolenzym – peptidylarginin-deiminase – som för övrigt också hämmas av zink.



Figur 1. Principen för en transglutaminaskatalyserad reaktion vid celiaki. Det kalciumaktiverade enzymet bildar en tioester med en specifik glutaminrest i gliadin. I närvaro av en lysinrest sker en transamidering där produkten hålls ihop av en pseudopeptidbindning mellan lysin och glutamin. I frånvaro av en primär amin sker däremot en onormal hydrolysis där tioestern deamideras till modifierade former av gliadin. Vid transamideringen är bildningen av tioestern hastighetsbestämmande. Vid hydrolysen, däremot, är det sista steget i reaktionen hastighetsbestämmande, varför koncentrationen av tioestern blir relativt hög och kan upplevas som artfrämmande. När tillräckligt många glutaminrester (Q) har deamiderats till glutaminsyra (E) passar tioestern mellan enzym och modifierat substrat in i HLA DQ2/DQ8-molekylen, varefter fragment av tioestern presenteras för T-cellerna.

dan in i HLA-molekylen, som presenterar peptider från de omvandlade gliadinerna för T-lymfocyterna [13, 14]. Affiniteten är högst mellan modifierat gliadin och HLA DQ2/DQ8, som förekommer hos 95 procent av personer med celiaki. Cirka 30 procent av den vita befolkningen har endera av dessa haplotyper, vilket alltså förefaller vara en förutsättning för att utveckla celiaki.

Kalcium inducerar en konformationsändring i vävnadstransglutaminas, varvid det aktiva centrumets cysteinrest exponeras. Närvaro av kalcium ökar också affiniteten mellan enzymet och antikroppar i serum hos personer med celiaki [15, 16]. De första resultaten varierade dock mycket mellan olika forskargrupper i detta avseende. Vävnadstransglutaminas kan isoleras från olika djurorgan, t ex marsvinslever, men också produceras i en human form med rekombinant bioteknik. Initialt förklarades de divergerande resultaten av speciesskillnader mellan de olika enzymer som användes i försöken. En oförsiktig hantering av dessa labila enzymer torde dock vara en bättre förklaring [15].

Aktiverat vävnadstransglutaminas kan polymeriseras in vitro genom att enzymet som substrat använder glutamin- och lysinrester i andra enzymmolekyler. Gliadiner kan också enzymatiskt via en amidbrygga bindas till en lysinrest i vävnadstransglutaminas [17]. Initialt trodde man att detta komplex var den enda möjliga förklaringen till uppkomsten av antikroppar mot såväl transglutaminas som gliadin. Vid reaktioner katalyserade av transglutaminas bildas ett intermediat i form av en tioester mellan en-

zym och substrat. Vi anser att denna tioester utgör ett mer sannolikt neoantigen än komplexet bildat via en amidbrygga [15].

Immunologiska aspekter

Om transglutaminas deltar i den patofysiologiska mekanismen vid uppkomsten av celiaki kan man förvänta sig att detta kalciumberoende enzym har varit aktiverat i något led i processen. I motsats till kalcium hämmar zinkjoner i fysiologiska koncentrationer aktiveringen av enzymet. In vitro eliminerar zink också i mycket låga koncentrationer den kalciuminducerade ökningen av affiniteten mellan antikropp och transglutaminas [15].

En annan viktig frågeställning är om antikroppen hämmar den enzymatiska aktiviteten hos transglutaminaset. Med hjälp av korsad immunoelektrofores och specifik färgning för transglutaminasaktivitet har vi kunnat visa att ett immunkomplex mellan antikroppar i serum från patient med celiaki och vävnadstransglutaminas har full enzymatisk aktivitet [15]. Antikroppen hämmar alltså inte enzymet.

Zinkets betydelse

Hos en vuxen människa finns 2–3 gram zink med höga koncentrationer i hud, naglar, hår, de langerhanska cellöarna och i specifika delar av prostatakörteln och ögat. Kroppens zinkbalans regleras huvudsakligen i mag-tarmkanalen [18]. Cirka 300 enzymer, varav många i immunsystemet, behöver zink för full aktivitet [19]. Rapporten om att zink hämmar fysiologiska enzym-system är däremot sällsynta. Liksom transglutaminas inhiberas dock prostataspecifikt antigen, den omdebatterade biomarkören för prostatacancer, av zink [20]. Brist på zink anses vara ett stort problem i de flesta u-länder [21, 22]. Däremot är hyperzinkemi sällsynt.

Alla spårmetaller är mer eller mindre proteinbundna i organismen, och för zink finns flera bärarproteiner. Bindningarna är dock i allmänhet reversibla, vilket innebär att metallen kommer att bindas till den proteinstruktur som just för tillfället har den högsta affiniteten. Från djurförsök är det känt att zink kan omfördelas mellan kroppens vävnader vid belastning på organismen [23].

Hypotes för uppkomsten av celiaki

Med hjälp av våra och andras resultat har vi satt upp en hypotes för hur celiaki kan uppkomma:

- En stressreaktion, t ex i form av en inflammation, leder till en omfördelning av zink och därmed minskad zinkkoncentration i tarmväggen.
- Den reducerade zinknivån tillåter kalcium att aktivera transglutaminas i tarmslemhinna, alternativt i makrofager som lockats till platsen för inflammationen.
- Aktiverat transglutaminas katalyserar hydrolysen av specifika glutaminrester till glutaminsyra i gliadiner, tillförda via födan.
- Med hjälp av HLA DQ2/HLA DQ8 presenteras nu fragment av tioestern mellan enzym och substrat för T-lymfocyter. Detta intermedieära komplex mellan transglutaminas och gliadin kan förväntas vara relativt långlivat, eftersom det sista steget i enzymreaktionen utgörs av en onormal deamidering i stället för en transamidering med en reaktiv nukleofil amin.
- T-lymfocyterna aktiveras och producerar cytokiner.
- Detta leder till att B-lymfocyter stimuleras att producera antikroppar mot såväl gliadin som transglutaminas.
- Immunaktiveringen leder till inflammation och aktivering av metalloproteinaser, vilket i sin tur medför villusatrofi i tarmslemhinnan.
- Påföljande malabsorption leder till en reducerad kroppspool

av zink, varför transglutaminas i nya reaktioner lättare kan aktiveras. Den onda cirkeln är därmed sluten.

Kliniska tillämpningar

De nya resultaten har möjliggjort att antikroppar mot transglutaminas nu enkelt kan påvisas vid celiaki med ELISA- eller RIA-teknik. Metoderna är känsliga och fungerar även på små barn med omoget immunförsvar [24, 25]. Dessutom är nya test under utveckling. Dessa ger svar inom några minuter och kommer förmodligen att kunna användas på mottagning eller vårdavdelning.

Glutenfri kost är i nuläget den enda behandlingen vid celiaki. De nya fynden har dock aktiverat utvecklingen i andra riktningar. I USA, där celiaki tidigare i stort sett varit ett okänt begrepp, har myndigheten »Food and Drug Administration« (FDA) nu tillsatt en arbetsgrupp med uppgift att belysa nya möjligheter för diagnos och behandling. EU har beviljat anslag för utveckling av hämmare mot transglutaminas.

Tyvärr saknas en relevant djurmodell för celiaki. Däremot provas redan specifika transglutaminasinhämmare i olika djurmodeller mot t ex CAPD-inducerad peritoneal skleros (CAPD = continuous ambulatory peritoneal dialysis) eller mot fibrotisering och ärrbildning vid progressiv njursjukdom. I ett pilotprojekt testar vi om zinkberikat vetemjöl kan lindra besvären hos personer som i vuxen ålder har fått diagnosen celiaki.

Andra autoimmuna sjukdomar

Vid dermatitis herpetiformis kan IgA mot epidermalt transglutaminas påvisas [26]. Parallellerna mellan celiaki och andra autoimmuna sjukdomar är också uppenbara. I flera fall kan förekomst av antikroppar mot såväl ett enzym som dess substrat påvisas. Enzymerna är i allmänhet kalciumberoende tiolenzymer som ra-

dikalt kan förändra substratens elektriska laddningar. Den nya biomarkören vid reumatoid artrit är t ex antikroppar mot citrullin, en produkt som uppstår när arginin deimineras [27].

För att bättre förstå den autoimmuna processen pågår projekt för att klargöra vilka proteiner i lederna som innehåller de argininrester som citrullineras. Olika typer av kollagen och fibrin, fibrinogen, fibronektin, vimentin och alfa-enolas har alla påvisats i citrullinerad form hos patienter med reumatoid artrit.

Men vad som är än mer intressant, men kanske ännu inte lika uppmärksammat, är att dessa patienter också har antikroppar mot det kalciumberoende tiolenzym som katalyserar deimeringen, peptidylarginindeimineras [28, 29]. Behandling med metotrexat minskar denna antikropsutveckling [28]. Flera grupper arbetar också med utvecklingen av specifika inhibitorer mot peptidylarginindeimineras. Nyligen har en amerikansk grupp visat att detta enzym, liksom vävnadstransglutaminas, hämmas av zinkjoner in vitro [30].

Glutaminsyradekarboxylas (GAD) är ett annat kalciumberoende tiolenzym. Vid typ 1-diabetes utvecklas antikroppar mot bl a GAD. Kliniska försök pågår nu för att undersöka om injektioner med GAD i låga doser kan inducera immuntolerans [31].

Nya tankebanor för att förstå autoimmun sjukdom

Studierna på celiaki illustrerar hur genomik och proteomik kompletterar varandra så att nya tankebanor kan initieras för att förstå mekanismerna vid autoimmun sjukdom. Vår hypotes är att en yttre belastning – inflammation, infektion, stress – leder till att kroppsegna enzymer accidentellt aktiveras i felaktig miljö, vilket leder till onormala, posttranslatoriska förändringar av proteiner, varvid autoimmunitet kan induceras hos personer med specifika genuppställningar.

I fallet med celiaki kan en omfördelning av zink förklara var-

för transglutaminas aktiveras. På grund av att det sekundära substratet – en primär amin – saknas blir sedan det intermediära komplexet, tioestern mellan transglutaminas och en glutaminrest, abnormt långlivat och upplevs som kroppsfrämmande, varför immunsystemet aktiveras. Den inducerade villus-

atrofin ger malabsorption och därmed zinkbrist, varvid den onda cirkeln har uppstått.

■ *Potentiella bindningar eller jävsförhållanden: Inga uppgivna.*

REFERENSER

- Ventura A, Magazzu G, Greco L. Duration of exposure to gluten and risk for autoimmune disorders in patients with celiac disease. *Gastroenterology*. 1999;117:297-303.
- Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U, Riecken EO, et al. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med*. 1997;3:797-801.
- Aeschlimann D, Paulsson M. Transglutaminases: protein cross-linking enzymes in tissues and body fluids. *Thromb Haemost*. 1994;71:402-15.
- Aeschlimann D, Thomazy V. Protein crosslinking in assembly and remodelling of extracellular matrices: the role of transglutaminases. *Connect Tissue Res*. 2000;41:1-27.
- Seiving B, Ohlsson K, Linder C, Stenberg P. Transglutaminase differentiation during maturation of human blood monocytes to macrophages. *Eur J Haematol*. 1991;46:263-71.
- Stenberg P, Curtis CG, Wing D, Tong YS, Credo RB, Gray A, et al. Transamidase kinetics. Amide formation in the enzymic reactions of thiol esters with amines. *Biochem J*. 1975;147:155-63.
- Curtis CG, Stenberg P, Brown KL, Baron A, Chen K, Gray A, et al. Kinetics of transamidating enzymes. Production of thiol in the reactions of thiol esters with fibrinolygase. *Biochemistry*. 1974;13:3257-62.
- Sjostrom H, Lundin KE, Molberg O, Korner R, McAdam SN, Anthonson D, et al. Identification of a gliadin T-cell epitope in coeliac disease: general importance of gliadin deamidation for intestinal T-cell recognition. *Scand J Immunol*. 1998;48:111-5.
- Molberg O, McAdam SN, Korner R, Quarsten H, Kristiansen C, Madsen L, et al. Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells in celiac disease. *Nat Med*. 1998;4:713-7.
- Roth EB, Sjöberg K, Stenberg P. Biochemical and immuno-pathological aspects of tissue transglutaminase in coeliac disease. *Autoimmunity*. 2003;36:221-6.
- Sulkanen S, Halttunen T, Laurila K, Kolho KL, Korponay-Szabo IR, Sarnesto A, et al. Tissue transglutaminase autoantibody enzyme-linked immunosorbent assay in detecting celiac disease. *Gastroenterology*. 1998;115:1322-8.
- Krebs NF. Overview of zinc absorption and excretion in the human gastrointestinal tract. *J Nutr*. 2000;130:1374S-7S.
- Prasad AS. Zinc deficiency. *BMJ*. 2003;326:409-10.
- Srinivas U, Jeppsson B, Braconier JH. Superoxide production of peritoneal macrophages in experimental gram-negative sepsis; influence of in vitro and in vivo supplements of zinc. *Apmis*. 1989;97:682-8.
- Agardh D, Roth B, Lernmark A, Stenberg P. Calcium activation of tissue transglutaminase in radioligand binding and enzyme-linked autoantibody immunoassays in childhood celiac disease. *Clin Chim Acta*. 2005;358:95-103.
- Agardh D, Dahlbom I, Daniels T, Lorinc E, Ivarsson SA, Lernmark A, et al. Autoantibodies against soluble and immobilized human recombinant tissue transglutaminase in children with celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2005;41:322-7.
- van Gaalen F, Ioan-Facsinay A, Hui-zinga TW, Toes RE. The devil in the details: the emerging role of anticitrulline autoimmunity in rheumatoid arthritis. *J Immunol*. 2005;175:5575-80.
- Roth EB, Stenberg P, Book C, Sjöberg K. Antibodies against transglutaminases, peptidylarginine deiminase and citrulline in rheumatoid arthritis – new pathway to epitope spreading. *Clin Exp Rheumatol*. 2006;24(1):12-8.
- Nissinen R, Paimela L, Julkunen H, Tienari PJ, Leirisalo-Repo M, Palosuo T, et al. Peptidylarginine deiminase, the arginine to citrulline converting enzyme, is frequently recognized by sera of patients with rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus and primary Sjogren syndrome. *Scand J Rheumatol*. 2003;32:337-42.
- Kearney PL, Bhatia M, Jones NG, Yuan L, Glascock MC, Catchings KL, et al. Kinetic characterization of protein arginine deiminase 4: a transcriptional corepressor implicated in the onset and progression of rheumatoid arthritis. *Biochemistry*. 2005;44:10570-82.