Uloga transglutaminaza kod celijakije

Petek, Ana

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:465359

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Department of Chemistry, Osijek

SVEUČILIŠTE J.JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
ODJEL ZA KEMIJU
PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE

Ana Petek

Uloga transglutaminaza kod celijakije

The role of transglutaminase in celiac disease

ZAVRŠNI RAD

Mentor: doc. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik

Osijek,2017.

Sažetak:

Celijakija je autoimuni poremećaj netolerancije glutena koji se javlja kod ljudi s nasljednom predispozicijom. Gluten je protein koji se nalazi u žitaricama kao što su pšenica, ječam, raž i zob. Celijakija se može pojaviti u bilo kojoj životnoj dobi, a jedini način liječenja je doživotna prehrana bez glutena. Peptidi glutena se sastoje od glijadina i glutenina te sadrže oko 30-40% glutaminskih ostataka što ih čini dobrim supstratom za tkivnu transglutaminazu (tTG). tTG je enzim ovisan o kalciju koji se prvenstveno nalazi u crijevima gdje katalizira posttranslacijsku modifikaciju proteina stvaranjem izopeptidnih veza. Gluten koji je unesen u probavni sustav teško se razgrađuje crijevnim enzimima pa takve neprobavljene frakcije glutena podliježu reakcijama deamidacije ili umreženog povezivanja koje katalizira tTG. Modificirani glijadin potom potiče upalne reakcije koje dovode do aktivacije urođenog i stečenog imunosnog odgovora. tTG predstavlja ciljni autoantigen u imunosnoj reakciji čime nastaju specifična protutijela.

Ključne riječi: celijakija, tkivna transglutaminaza, gluten, imunosni odgovor, protutijela, deamidacija

Abstract:

Celiac disease is autoimmune disorder characterized by gluten intolerance and occurring in genetically predisposed people. Gluten is a protein found in cereals such as wheat, barley, rye and oats. Celiac disease can develop at any age and the only way of treatment is a life-long nutrition without gluten. Gluten is composed of gliadin and glutenin and it contains about 30-40% of glutamine residues making it a good substrate for tissue transglutaminase (tTG). tTG is calcium dependent enzyme which catalyses posttranslational modification of proteins by forming isopeptide bonds. Gluten, introduced in digestive system, is partially resistant to degradation by gastrointestinal enzymes and such undigestive fractions of gluten are susceptible for the reaction of deamidation or cross-linking, catalysed by tTG. Modified gliadin induces inflammatory reactions leading to activation of the innate and adaptive immune response. tTG represents the target autoantigen in the immune response, resulting in specific antibodies.

Key words: celiac disease, tissue transglutaminase, gluten, immune response, antibodies, deamidation

Sadržaj

Sažetak: 2
Abstract: 3
1.Uvod: 5
2.Gluten 6
3.Celijakija 7
3.1. Okolišni čimbenici 8
3.2. Komplikacije bolesti 9
3.3. Genetska predispozicija 9
4.Tkivna transglutaminaza 10
4.1.Tkivna transglutaminaza kao autoantigen kod celijakije 16
4.2. Modifikacija glutena tkivnom transglutaminazom 19
4.3. Imunosni odgovor protiv tkivne transglutaminaze 21
5.Dijagnoza celijakije 22
5.1 Dermatitis herpetiformis 24
6.Budućnost liječenja celijakije 25
7.Zaključak 26
8. Popis literature 27

1.Uvod:

Zahvaljujući velikom napretku u medicini i u razumijevanju same patogeneze bolesti, celijakija je danas poznata kao česti gastroenterološki poremećaj. Definira se kao autoimuna bolest koju izaziva gluten, glavni protein žitarica [1]. Genetska podloga celijakije vezna je uz sustav humanog leukocitnog antigena razreda II (engl. *human leukocyte antigen - HLA*), glavnog sustava tkivne snošljivosti (engl. *major histocompatibility complex* - MHC) [2]. Najveći rizik od oboljenja imaju osobe koje su nosioci HLA-DQ2 ili HLA-DQ8 gena. Transglutaminaze su velika skupina enzima koji kataliziraju selektivnu modifikaciju proteina formiranjem izopeptidnih veza. Ključni enzim kod ove bolesti je tkivna transglutaminaza (tTG). tTG modificira glijadin reakcijom deamidacije i umrežanim povezivanjem. Deamidacijom specifičnih peptida glijadina, tTG pretvara glijadin iz ne-stimulativnog u efektivni T-stanični antigen koji potiče lučenje velikog broja lokalnih citokina. Umrežano povezivanje tTG i glijadina dovodi do formacije kompleksa tTG-glijadin. Ta reakcija inicira kemijske, fizikalne i strukturalne modifikacije zbog čega dolazi do stvaranja neoepitopa na kompleksu tTG-glijadin [3]. Neoepitopi, koji su zapravo novi antigeni, potom aktiviraju crijevne T-stanice čime dolazi do stvaranja autoantitijela protiv tTG i glijadina. Dijagnosticiranje celijakije može biti otežano iz razloga što su simptomi bolesti nejasni, a nerijetko i diskretni. Pošto i mala količina glutena može uzrokovati oštećenja kod osoba koje pate od celijakije, nepridržavanje pravilne prehrane može dovesti do komplikacija i razvitka drugih bolesti [1]. S ciljem olakšanja života celijakičara, u tijeku su istraživanja koja predlažu drugačije načine liječenja u budućnosti.

2.Gluten

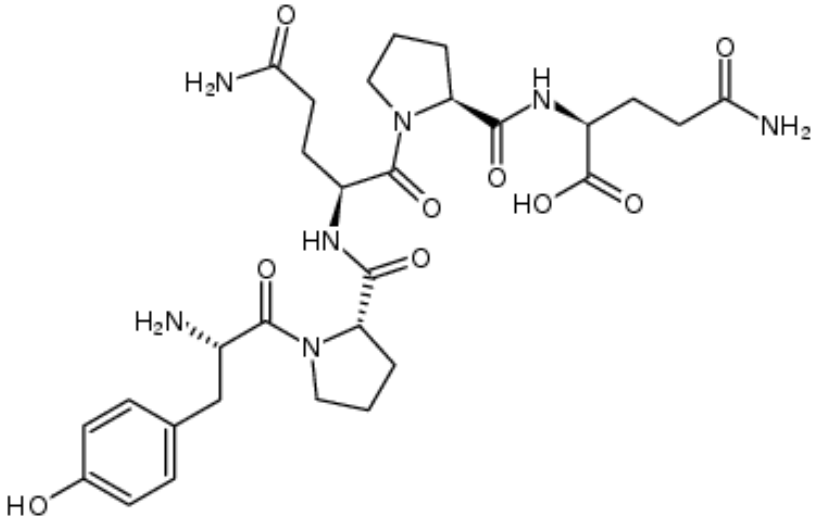
Gluten je glavni protein žitarica kao što su pšenica, ječam, raž i zob. Po fizičkim svojstvima je visokoelastičan, rastezljiv i kohezivan zbog čega se svakodnevno koristi u prehrambenoj industriji. Bogat je prolinom i glutaminom što ujedno znači da posjeduje visoki sadržaj dušika [1]. Pod pojmom gluten podrazumijeva se čitava proteinska komponenta pšenice od kojih je najvažniji glijadin. (Slika 1.)

Općenito, proteini iz žitarica dijele se u dvije skupine: prolamini i glutenini. Prolamini su proteini koji su topljivi u vodi i alkoholu te razlikujemo [4].

- Glijadine - prolamini iz pšenice
- Sekaline - prolamini iz raži
- Hordeine - prolamini iz ječma
- Avenini - prolamini iz zobi
- Zeini - prolamini iz kukuruza

Za razliku od prolamina, glutenini nisu topljivi u etanolu, vodi i fiziološkoj otopini. Interakcijom manje polarnih prolamina i polarnijih glutenina nastaje gluten. Glijadini su lančani polipeptidi koji se dijele prema mobilnosti u četiri glavne skupine (od najbržih do najsporijih): α-, β-, γ- i ω-glijadini [4,5].

Proteini iz α- i β-glijadina su slični pa se obje skupine označuju kao α-glijadini. Što se tiče njihove sekundarne strukture, α- i γ- glijadini se uglavnom sastoje od α-uzvojnice i β-ploče, dok ω-glijadini sadrže samo β-ploče i omče. Iako su monomerni, glijadini mogu stvarati intramolekulske disulfidne veze. Slobodna tiolna skupina glutenina koja je nastala β-eliminacijom iz cisteina, inicira SH-SS interlančanu reakciju između glijadina i glutenina. [6]. α- i γ-glijadini sadrže relativno visoku koncentraciju cisteina i metionina, te nekoliko glutaminskih i prolinskih ostataka. Struktura glijadina uključuje: 1) N-terminalnu domenu, 2) centralnu domenu i 3) C-terminalni segment. N-terminalna domena α-glijadina sastoji se od pet aminokiselinskih ostataka dok ih centralna domena sadrži oko 113-134. Centralna domena sadrži heptapetid PQPQPFP, bogat prolinom i glutaminom te pentapeptid PQQPY. Na toj se domeni nalazi i karakteristični 33-monomerni fragment. C-terminalni segment α- i γ-glijadina sastoji se od 150 aminokiselinskih ostataka [5].



Slika 1. Molekula glijadina ($C_{29}H_{41}N_7O_9$) [7].

Dakle, gluten predstavlja toksičnu komponentu pšenice koju celijakičari doživotno moraju izbaciti iz prehrane. Pošto je konzumacija glutenskih proizvoda visoka i iznosi 15–50 grama/dan [1], celijakija nije jedini poremećaj koji se javlja. Treba naglasiti da se bolest razlikuje od sličnih pojava kao što su alergija i osjetljivost na gluten. Alergija na gluten podrazumijeva poremećeni imunosni odgovor na antigen koji je unesen oralnim putem, dok je osjetljivost na gluten rezultat prirođene imunosti inducirane glutenom, ali bez oštećenja sluznice crijeva što je karakteristika celijakije [1,8].

3.Celijakija

Celijakija ili glutenska enteropatija je autoimuni poremećaj, a javlja se kada genetski predisponirane osobe, nosioci HLA-DQ2 ili HLA-DQ8 gena, unose gluten u organizam. Osim glutena i genetske sklonosti, na razvoj bolesti utječu i okolišni čimbenici [9]. Povijesno gledano, celijakija se smatrala rijetkom i nepoznatom bolešću. Danas je poznata kao jedan od čestih gastroenteroloških poremećaja u djetinjstvu, ali i u kasnijoj životnoj dobi. Glavno obilježje celijakije je oštećenje sluznice tankog crijeva koje nastaje zbog imunosnog odgovora na gluten. Posljedica oštećenja sluznice crijeva je nedovoljni unos hranjivih tvari u organizam. Prema istraživanjima, oko 1% stanovnika Zapadne Europe pati od celijakije [3]. Poražavajuća je činjenica da je od 8 oboljelih osoba, samo jedan prepoznati bolesnik [10]. Dakle, vrlo mali broj oboljelih od celijakije se pravilno liječi.

Postoje četiri oblika celijakije: tipična, atipična, tiha i latentna (Tablica 1) [11]. Kod tipične celijakije probavni simptomi su izraženi, dok kod atipične nisu toliko česti. Što se tiče tihe celijakije, probavnih simptoma gotovo da i nema, a kod latentnog oblika svi simptomi su odsutni, a manifestacija bolesti može nastupati kasnije. Probavni simptomi uključuju proljev, povraćanje, mučninu, gubitak apetita, gubitak na težini, a kod djece i zastoj u rastu.

Tablica 1: Oblici celijakije [11].

OBLIK BOLESTI	SIMPTOMI
Tipična	Proljev, povraćanje, gubitak apetita, gubitak na težini, opstipacija
Atipična	Umor, anemija, zastoj u rastu, autoimune bolesti ostalih organskih sustava
Tiha	Promijenjena sluznica tankog crijeva
Latentna	Normalna sluznica tankog crijeva, kasniji razvoj promjena i smetnji

3.1. Okolišni čimbenici

Epidemiološkim istraživanjima došlo se do zaključka da bitnu ulogu u razvitku bolesti imaju i okolišni čimbenici. Istraživanjima je pokazano kako dojenje smanjuje rizik od razvitka bolesti. Studije su također pokazale kako je dojenje i istovremeno uvođenja glutena u prehranu povezano s odgodom bolesti [12,13]. Kontradiktorno prethodnim činjenicama, u istraživanju koje je uključivalo djecu s velikim rizikom razvitka autoimunih bolesti, dojenje se nije potvrdilo kao prevencija od bolesti [14]. Nadalje, bitan faktor je vrijeme uvođenja glutena u prehranu. Smatra se da je optimalno vrijeme uvođenja antigena hrane, kao što je gluten, u prehranu, s ciljem povećanja tolerancije, u razdoblju između trećeg i četvrtog mjeseca starosti [13]. Važno je istaknuti i istraživanje u kojem je pokazano kako je uvođenje glutena u prehranu djeteta starog manje od 4 mjeseca povezano s većim rizikom razvitka bolesti, dok je manji rizik od oboljenja zabilježen je kod uvođenja glutena u prehranu djeteta starog 7 mjeseci [14].

Na temelju svih istraživanja može se sigurno zaključiti da dojenje smanjuje rizik od razvitka bolesti, a istovremeno dojenje i izloženost glutenu ima važnu ulogu u zaštiti od celijakije.

3.2. Komplikacije bolesti

Komplikacije bolesti uglavnom se javljaju kod osoba kojima duže vrijeme ili uopće nije otkrivena celijakija, te kod bolesnika koji ne prakticiraju pravilnu prehranu. Treba naglasiti da i najmanje količine glutena u celijakičara dovode do oštećenja crijevne sluznice i rizika od nastanka brojnih komplikacija celijakije. [1]

Posljedice bolesti su atrofija sluznice tankog crijeva i malapsorpcija. Zbog poremećaja u apsorpciji i resorpciji hranjivih tvari kod bolesnika se javlja gubitak težine, a kod djece često i zastoj u rastu. Nadalje, nedostatak željeza, folne kiseline i vitamina B_{12} posljedica su razvitka anemije. Također može doći i do razvitka osteoporoze zbog malapsorpcije vitamina D i kalcija, a nedostatak vitamina K može dovesti do komplikacije zgrušavanja krvi. Osim navedenih komplikacija, može doći i do razvitka malignih bolesti. Kod bolesnika celijakije povećan je rizik od razvitka limfoma i adenokarcinoma tankog crijeva [1,4].

3.3. Genetska predispozicija

Bez obzira na količinu unesenog glutena ili drugih okolišnih faktora, bolest se neće pojaviti u osoba koje nemaju genetsku sklonost. Celijakija je u pravilu povezana s velikim brojem gena od kojih ključnu ulogu imaju geni u sustavu humanog leukocitnog antigena (HLA-sustav) razreda II, glavnog sustava tkivne snošljivosti (engl. *major histocompatibility complex* - MHC). HLA-sustav se kod ljudi nalazi na šestom kromosomu i vrlo je polimorfan. Geni se u HLA-sustavu razreda II dijele u šest podskupina: HLA-DM, -DN, -DO, -DP, -DQ i -DR [2,4]. Svaka DQ molekula je heterodimer koji se sastoji od dva polipeptidna lanca: alfa i beta. Ti se lanci nalaze na staničnoj membrani, a njihove krajnje domene sadrže mjesta za vezanje peptida. Do celijakije dolazi uslijed promjena na HLA-DQ genima, odnosno dolazi do porasta afinitet DQ2 i DQ8-molekula za deamidirani glijadin [2].

Više od 90% bolesnika nosioci su heterodimera HLA-DQ2 (HLA-DQ (α1*0501-β1*02)) kodiranog genima HLA-DQ-2.5 (DQ-A1*05, DQ-B1*02) i HLA-DQ-2.2 (DQ-A1*0201, DQ-B1*0202). Ti geni mogu biti raspoređeni u cis-položaju, ukoliko se nalaze zajedno na jednom kromosomu ili trans-položaju ako su odvojeni te se nalaze na dva homologna kromosoma [1,2]. Izloženost glutena HLA-DQ2 homozigotnim stanicama antigena rezultira najmanje pet puta jačim staničnim upalnim odgovor u odnosu na HLA-DQ2-heterozigotne stanice. Navedene činjenice olakšavaju dijagnozu celijakije. Osobe koji su nosioci HLA-homozigotnih stanica imaju veći rizik od razvitka bolesti za razliku od heterozigota. Preostali broj bolesnika (oko 5-10%) nositelji su ili heterodimera HLA-DQ8 (HLA-DQ (α1*0301,β1*0302)) ili dijela heterodimera HLA-DQ2 [1]. Istraživanja su pokazala da od 30% DQ2 i/ili DQ8-pozitivno osoba, celijakiju će razviti samo 3% nositelja rizičnog genotipa iz razloga što je veliki dio genetičke podloge bolesti još i danas nepoznati [2].

4.Tkivna transglutaminaza

Transglutaminaze su velika skupina enzima koji kataliziraju posttranslacijsku, selektivnu modifikaciju proteina formiranjem izopeptidnih veza [15]. Sve vrste ljudskih transglutaminaza imaju istu katalitičku sposobnost, a pošto su kodirane različitim genima, imaju drugačiju specifičnost prema supstratu i različite funkcije u pojedinim dijelovima stanice. Za njihovu potpunu katalitičku aktivnost potreban je kalcij. Poznato je više vrsta transglutaminaza s određenim funkcijama u ljudskom organizmu, ali glavnu ulogu u patogenezi celijakije zauzima tkivna transglutaminaza (tTG) ili transglutaminaza 2 (Tablica 2) [3]. U ovu skupinu enzima pripada i krvni koagulacijski faktor XIII, podjedinica plazmatske transglutaminaze. Glavna funkcija faktora XIII je umrežano povezivanje fibrina i inhibitora plazmina u fibrin glutaminil-lizil čime stabilizira fibrin i štiti ga od degradacije. Na taj način sudjeluje u zacjeljivanju rana [16].

Tkivna transglutaminaza nalazi se u crijevima, preciznije, u izvanstaničnom matriksu ili unutar stanice, prvenstveno u citoplazmi [3]. Dakle, osim što djeluje unutarstanično, može se izlučiti i u izvanstanični prostor gdje doprinosi stabilizaciji i remodeliranju izvanstaničnog matriksa tako da se čvrsto veže na fibronektin. Njezina potpuna katalitička aktivnost također zahtjeva milimolarnu koncentraciju Ca^{2+}. Inhibirana je nukleotidima gvanina dok se potpuno može inaktivirati oksidacijom u izvanstaničnom prostoru.

Unutarstanična tTG nema enzimsku aktivnost pa funkcionira kao G-protein u fosofolipazi C koja sudjeluje u kaskadi prijenosa signala [17].

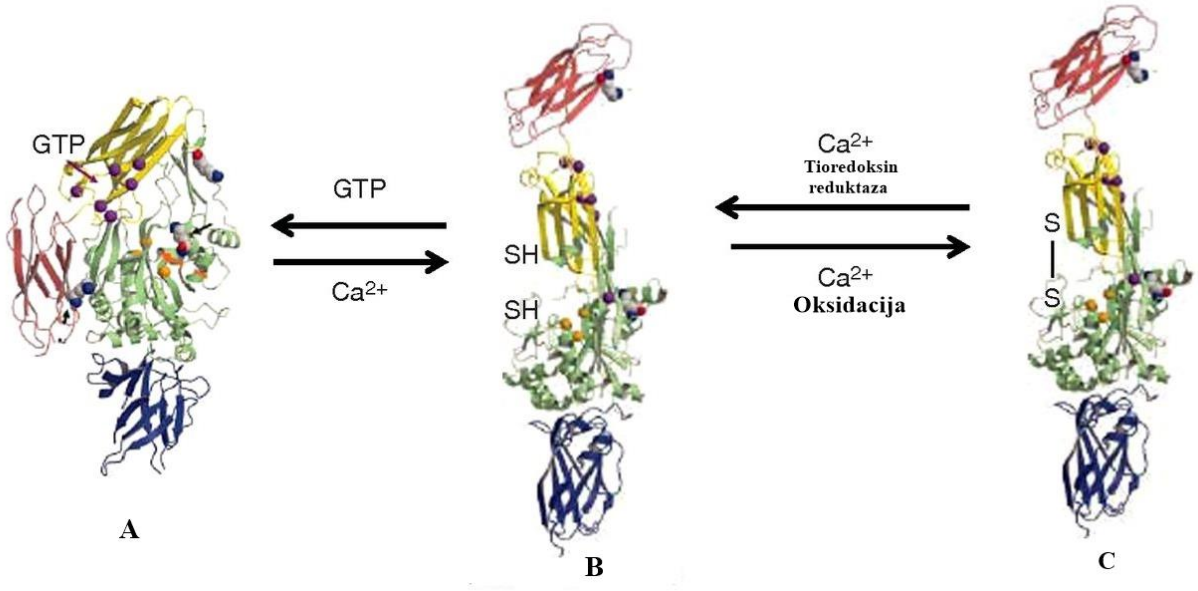
Tablica 2: Vrsta ljudskih transglutaminaza [3].

Vrsta transglutaminaza	**Uloga**
Keratinocitna transglutaminaza (transglutaminaza 1)	Terminalna diferencijacija keratinocita
Tkivna transglutaminaza (transglutaminaza 2)	Stabilizacija i remodeliranje izvanstaničnog matriksa; regulacija diferencijacije i apoptoze stanica
Epidermalna transglutaminaza (transglutaminaza 3)	Terminalna diferencijacija keratinocita
Prostatična transglutaminaza (transglutaminaza 4)	Koagulcija sjemenih vrećica
Transglutaminaza X (transglutaminaza 5)	Epidermalna diferencijacija
Krvni koagulacijski faktor XIII (transglutaminaza faktora XIIIa)	Zarastanje rana
Skupina eritrocita 4.2	Stabilizacija membranskog skeletona eritrocita

Ljudska tTG se sastoji od 686 aminokiselina i četiri domene:

1) N-terminalni β-sendvič koji sadrži veznu stranu za fibronektin
2) katalitička domena sadrži vezne džepove za supstrat i katalitičku trijadu Cys-His-Asp
3) β-bačva s veznim džepom za GTP i mjestima za interakciju s β-adrenergičkim receptorom
4) C-terminalna bačva koja uključuje mjesta za interakciju s fosfolipazom C [17].

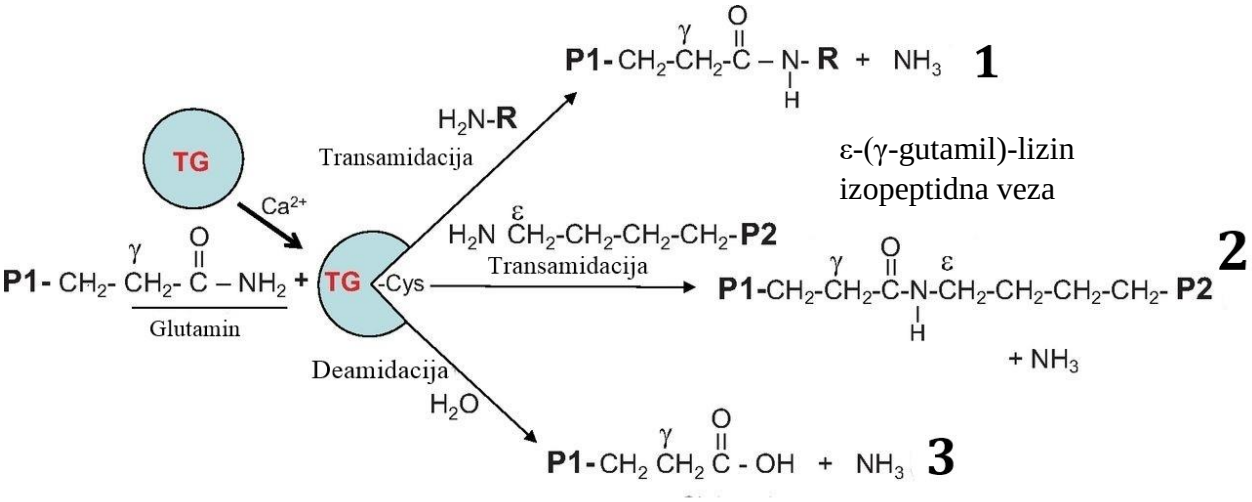
Prostorni raspored četiriju domena ovisi o interakciji s kofaktorima. U strukturi s vezanim GTP/GDP dvije C-terminalne β-bačve značajno prekrivaju katalitičku domenu i time sprečavaju vezanje supstrata u aktivno mjesto enzima, pa se tTG nalazi u zatvorenoj konformaciji (Slika 4A). Nasuprot tome, vezanjem Ca^{2+} dolazi do pomicanja treće i četvrte domene pa se tTG nalazi u otvorenoj konformaciji u kojoj je katalitičko mjesto dostupno (Slika 4B). Zbog cisteinskih ostataka koji međusobno stvaraju disulfidne veze, tTG se može nalaziti u reduciranom, aktivnom obliku, ili u oksidiranom obliku koji je katalitički neaktivan (Slika 4B i C) [18].



Slika 2. Prikaz struktura tkivne transglutaminaze 2 [18]. TG u ljudskom organizmu može poprimiti tri konformacije: A) GTP-vezana struktura je zatvorena i katalitički neaktivna B) Vezanjem Ca^{2+} enzim prelazi u otvorenu, katalitički aktivnu (reduciranu) konformaciju C) Oksidacijom cisteinskih ostataka, enzim je lišen katalitičke aktivnosti; redukcijom pomoću reduktaza kao što je tioredoksin, tTG može prijeći u aktivnu konformaciju.

Enzim je multifunkcionalan te ovisno o fiziološkim uvjetima u kojima se nalazi, može katalizirati tri reakcije. tTG katalizira kovalentno i ireverzibilno umrežavanje, odnosno stvaranje poprečnih veza između proteina s glutaminskim ostatkom (glutamin je donor) i proteina sa lizinskim ostatakom (glutamin je akceptor) što na kraju rezultira formiranjem ε-(γ-gutamil)-lizin izopeptidne veze [3].

tTG također katalizira i reakciju transamidacije, odnosno ugradnju primarnih amina u proteine. Ukoliko se nalazi u stanju niskog pH, ili ako nedostaju pravilni, odgovarajući amini, tTG može hidrolizirati peptidnu vezu glutamina u glutaminsku kiselinu, što je ujedno reakcija deamidacije.



Slika 3. Biokemijske funkcije tkivne transglutaminaze (tTG) [18]. 1) tTG katalizira ugradnju primarnih amina, kao što su poliamini i histamin u proteine (transamidacija). 2) Na relativno visokom pH (>7), tTG katalizira umrežano, povezivanje proteina koji ima glutamin (Gln) s drugim proteinom koji ima lizin (Lys), što rezultira formiranjem ε-(γ-gutamil)-lizin izopeptidne veze i otpuštanjem NH_3. 3) U odsutnosti pravilnih amina, ili u uvjetima niskog pH (<7), voda može zamijeniti amino donore pa tTG katalizira deamidaciju glutamina (Gln) u glutaminsku kiselinu (Glu) [3].

Produkti koji nastaju umrežanim povezivanjem proteina s glutaminom i proteina s lizinom imaju veliku molekularnu masu te visoku otpornost na mehaničke procese kao što je proteolitička degradacija. Nakupljaju se u tkivima gdje su takva svojstva ključna, primjerice u koži, kosi ili u kaskadi zgrušavanja krvi pomažući zacjeljivanju rana [3].

Što se tiče enzimskih svojstava transglutaminaze, važno je spomenuti njezine supstrate. tTG ima visoku specifičnost prema određenom proteinu. Supstrat može biti protein s glutaminskim ostatkom (kao supstrat donor) ili protein s lizinskim ostatkom (kao supstrat akceptor). Njezin preferirani supstrat je glijadin iz razloga što je više od 36% njegovih glutaminskih ostataka dostupno za modifikaciju, kao što je ugradnja poliamina ili oslobađanje NH_3 tijekom deamidacije glijadina [3].

tTG se ponaša kao integrirajući koreceptor za fibronektin, glikoprotein koji ima važnu ulogu u staničnoj adheziji [19]. Također je uključena u regulaciju stanične proliferacije, diferencijacije i apoptoze. Ovisno o vrsti stanice i aktivnosti enzima može poticati ili inhibirati apoptozu stanice. U slučaju povećane transamidacijske aktivnosti potiče apoptozu kao odgovor na povećani osmotski stres stanice, a štiti stanice od apoptoze kada je transamidacijska aktivnost smanjena [3].

Nedavno je predložena i imunološka funkcija tTG prvenstveno zbog njezine uloge u aktiviranju β-faktora rasta (TGF-β), vrsta citokina koji posjeduje antiupalna svojstva i štiti imunosni sustav [20]. Deregulacija enzimske aktivnosti uglavnom je uzrokovana poremećajima u staničnim mehanizmima i povezana je s razvitkom određenih bolesti. (Tablica 3) Najviše se istražuje uloga tTG kod neurodegenerativnih bolesti kao što su Huntingtonova i Alzheimerova bolest, i kod neoplastičnih bolesti, tumora [3].

Tablica 3: Poremećaji u kojima tTG ima potencijalnu ulogu [3].

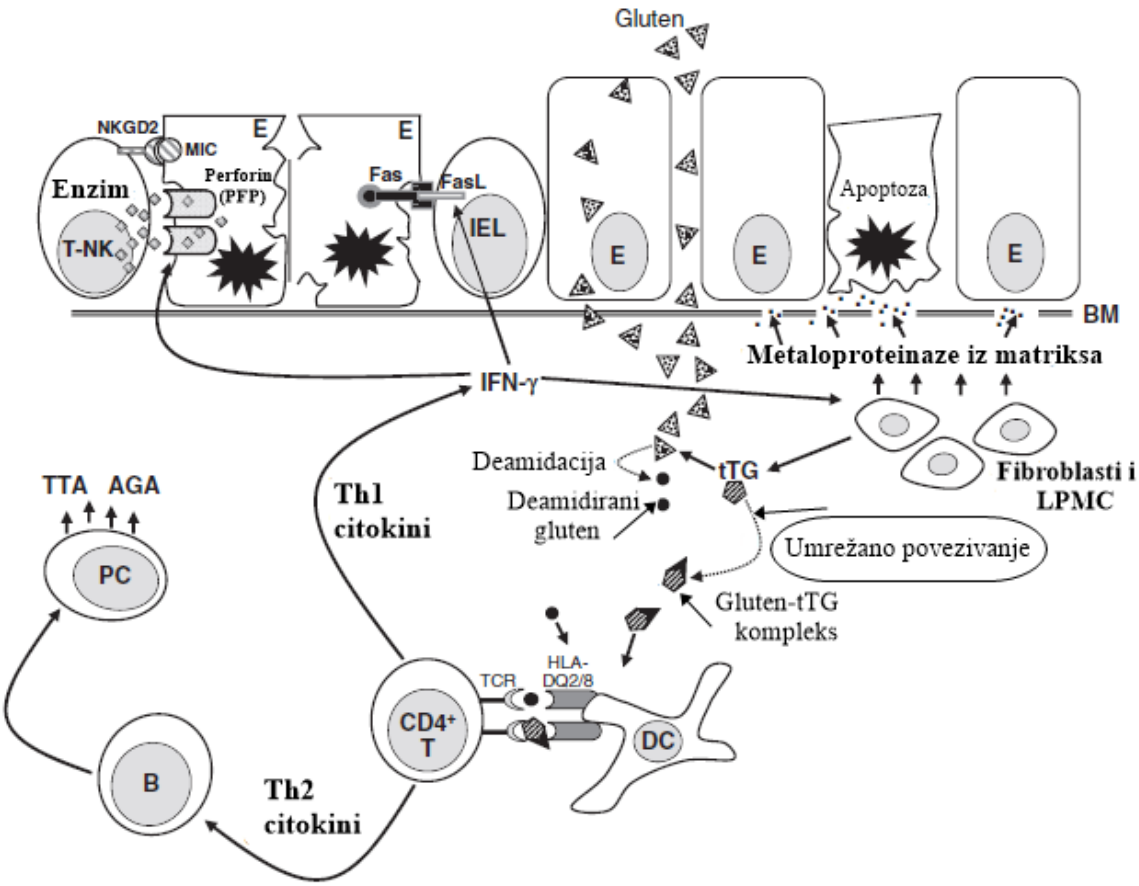
Kronične degenerativne bolesti
Huntingtonova bolest
Alzheimerova bolest
Ateroskleroza
Mrena na oku
Autoimune bolesti
Celijakija
Dijabetes mellitus
Sjögrenov sindrom
Tireoiditis
Kronični upalni poremećaji
Reumatoidni artritis
Upala crijeva
Ciroza jetre
Alkoholni hepatitis
Infektivne bolesti
Virus humane imunodeficijencije (HIV)
Hepatitis C
Humani papiloma virus (HPV infekcija)
Neoplastične bolesti

4.1.Tkivna transglutaminaza kao autoantigen kod celijakije

Iako se tTG u citoplazmi uglavnom nalazi u neaktivnom, oksidiranom stanju, upalnim reakcijama i mehaničkim procesima može se aktivirati i prijeći u unutarstanični matriks. Aktivirana tTG potom modificira glijadin na dva načina: 1) umrežanim povezivanjem (povezivanje glutaminskih ostataka glijadina s lizinskim ostacima tTG) čime nastaju kompleksi tTG-glijadin i 2) deamidacijom, reakcijom kojom mijenja strukturu glijadina. Oba mehanizma uzrokuju oštećenje sluznice crijeva.

Glijadin iz glutena koji je unesen hranom dolazi do lamina proprije (rahlo vezivno tkivo sluznice crijeva) gdje dolazi u kontakt s tTG. Enzim potom katalizira reakciju deamidacije, čime mijenja njegovu strukturu, odnosno glutamin se u peptidu glijadinu pretvara u negativno nabijenu glutaminsku kiselinu. Zbog deamidacije dolazi do jakog porasta afiniteta glijadina za HLA receptore na antigen prezentirajućim stanicama (APS) u lamini propriji [2,3]. Interakcijom takvog deamidiranog glijadina i HLA receptora dolazi do aktivacije stečenog imunosnog odgovora posredovanog intestinalnim CD4+ T-limfocitima. CD4+ (engl. *cluster of differentiation 4*) je glikoprotein koji se nalazi na površini imunosnih stanica kao što su T-pomoćne stanice, monociti i dendritičke stanice. T-pomoćne stanice imaju važnu ulogu kod stečenog imunosnog sustava. One aktiviraju ostale imunosne stanice tako da potiču lučenje citokina [21]. Tako limfociti Th1 ili Th1 pomoćne stanice dovode do aktivacije i lučenja velikog broja proupalnih citokina, od kojih je najvažniji interferon-gama (IFN-γ). IFN-γ je citokin koji ima ključnu ulogu u zaštiti organizma od patogena, virusa i bakterija, te u kontroli tumora [22]. Nadalje, Th1 limfociti potiču i upalne procese kao što su lučenje metaloproteinaza u fibroblastima, potom apoptozu epitelnih stanica koja dovodi do oštećenja crijevnih resica (atrofija vilusa) te stvaranje kroničnih upalnih stanica, što su sve tipična oštećenja kod celijakije. Limfociti Th2 ili Th2 pomoćne stanice, glavni regulatori imunosne reakcije, aktiviraju β-limfocite koji potom stvaraju protutijela na tTG – anti-tTG, antiendomizijska (EMA) i antiglijadinska protutijela [3].

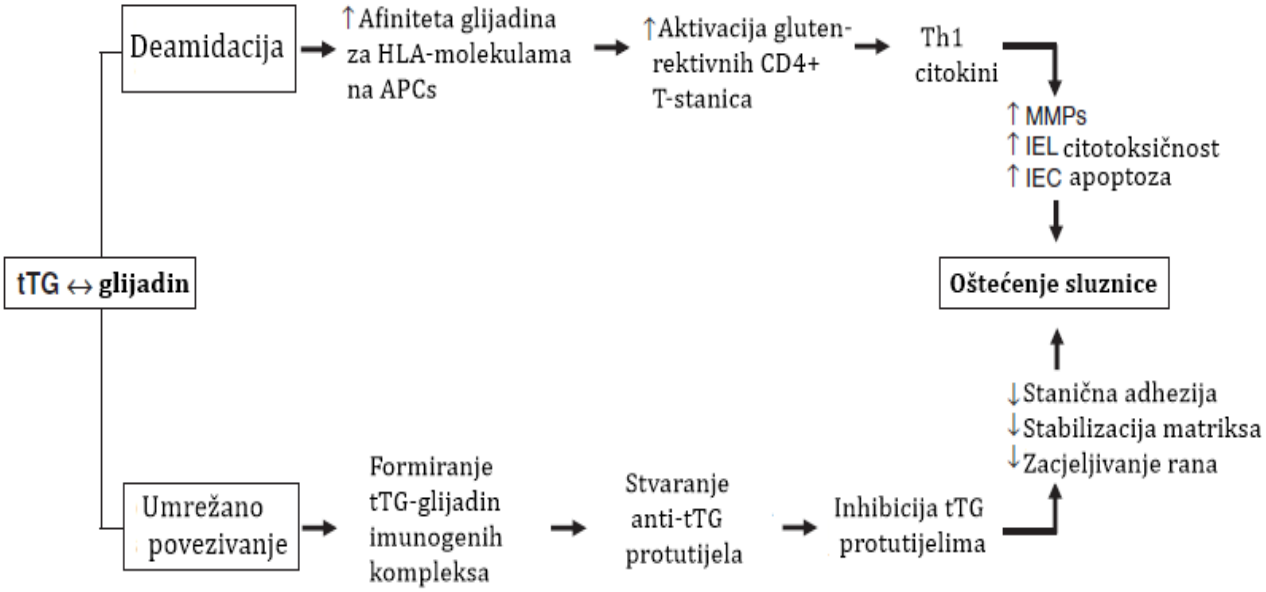
Peptidi glijadina, posebno fragment alfa-2 glijadina, uništavaju epitelne stanice što dovodi do aktivacije urođenog imunosnog sustava čime se povećava ekspresija i lučenje interleukina (IL)-15. IL-15 je glavni čimbenik koji utječe na proliferaciju intraepitelnih limfocita, produkciju IFN-γ i citotoksičnost te ima značajnu ulogu u razvoju i aktivaciji prirodnih stanica ubojica (engl. *natural killer cells*, NK) [3,18,21].



Slika 4. Mehanizam oštećenja sluznice crijeva kod celijakije [3]. Peptidi glutena transportiraju se kroz crijevnu sluznicu na dva načina: *para-* ili *trans-* staničnim putem. Deamidacijom ili umrežanim povezivanjem glutena tTG-om, dolazi do izalganja glutena dendritičkim stanicama (DC) i HLA receptorima. Aktivirane gluten-reaktivne CD4+T-stanice pomoću Th1-limfocita iniciraju lučenje velikog broja proupalnih citokina od koji je najdominantniji IFN-γ. Th1 limfociti potiču i mnoge upalne procese što uključuje stvaranje fibroblasta ili lamina propria mononuklearnih stanica (LPMC), lučenje metaloproteinaza iz matriksa, citotoksičnost intraepitelnih limfocita (IEL) ili aktivaciju NK stanica. Ovi procesi olakšavaju apoptozu enterocita na nekoliko načina: pomoću Fas/Fas ligand sustav, putem perforina ili signalnim putem NFG2D/MIC. NFG2D (engl. *natural killer group 2D*) je protein, odnosno receptor koji ima važnu ulogu u zaštiti od infekcija i tumora [23]. Molekule klase I (*engl. class I chain molecules*, MIC) glavnog sustava tkvine snošljivosti (MHC) su proteini koji se nalaze na površini epitelnih stanica i stvaraju interakcije s NFG2D čime se povećava citotoksičnost [24]. Nadalje, aktivirane CD4+T-stanice proizvode i Th2 limfocite koji dovode do aktivacije i ekspanzije β-stanica. β-stanice diferenciraju u staničnu plazmu gdje proizvode anti-glijadin protutijela (AGA) i anti-tTG protutijela (TTA) [3].

Uloga tTG kod celijakije prvi put je predložena i opisana u radu Brucea S.E. i sur. 1985. godine [25]. Pokazali su da je aktivnost tTG povećana kod pacijenta oboljelih od celijakije te da su peptidi glijadina preferirani supstrat za taj enzim. Tek je 1997. pronađena uloga tTG kao autoantigena kod celijakije. Najznačajniji je rad Dieterich i sur. [26] koji su analizirali uzorke staničnog lizata s frakcijama imunoglobulina A (IgA) pacijenta celijakije te su uspjeli izolirati protein od 85 kDa. Nakon dodatnih analiza tog proteina, dokazano je da se radi o tkivnoj transglutaminazi. Prema njihovim pretpostavkama, neoepitopi u kompleksu tTG-glijadin, koji nastaju umrežanim povezivanjem, iniciraju imunosni odgovor usmjeren protiv glijadina i tTG. Odnosno, tim procesom nastaju protutijela na tTG i glijadin. To otkriće bilo je važno iz dva razloga. Prvo, omogućena je analiza anti-tTG antitijela ELISA testom i drugo, pokazali su značajnost interakcija glijadin-tTG kod celijakije.

Daljnja istraživanja pokazala su kako deamidacija glijadina povećava njegov afinitet za HLA-DQ2 ili HLA-DQ8 molekule čime dolazi do aktivacije T-stanica. Biopsijom tkiva neliječenih pacijenta pronađena je prostorna povezanost izvanstanične tTG, DQ-stanica i T-stanica u subepitelnoj regiji crijeva kao i prisustvo supermolekulskog kompleksa gluten-tTG u sluznici crijeva [3]. Glijadin-tTG kompleksi prvenstveno su pronađeni u epitelnom i subepitelnom području crijeva, a ekspresija tTG također je zabilježena u enterocitima, što znači da peptidi glijadina mogu doći u kontakt s tTG ne samo u lamina propriji već i u enterocitima. Na temelju toga, pretpostavlja se da tTG ima minimalno dvije različite, ali ne nužno i nezavisne uloge kod celijakije. Prva je deamidacija glutena čime se mijenja njegova struktura te drugo, tTG predstavlja autoantigen što rezultira stvaranjem protutijela imunosnim sustavom (Slika 5) [3].



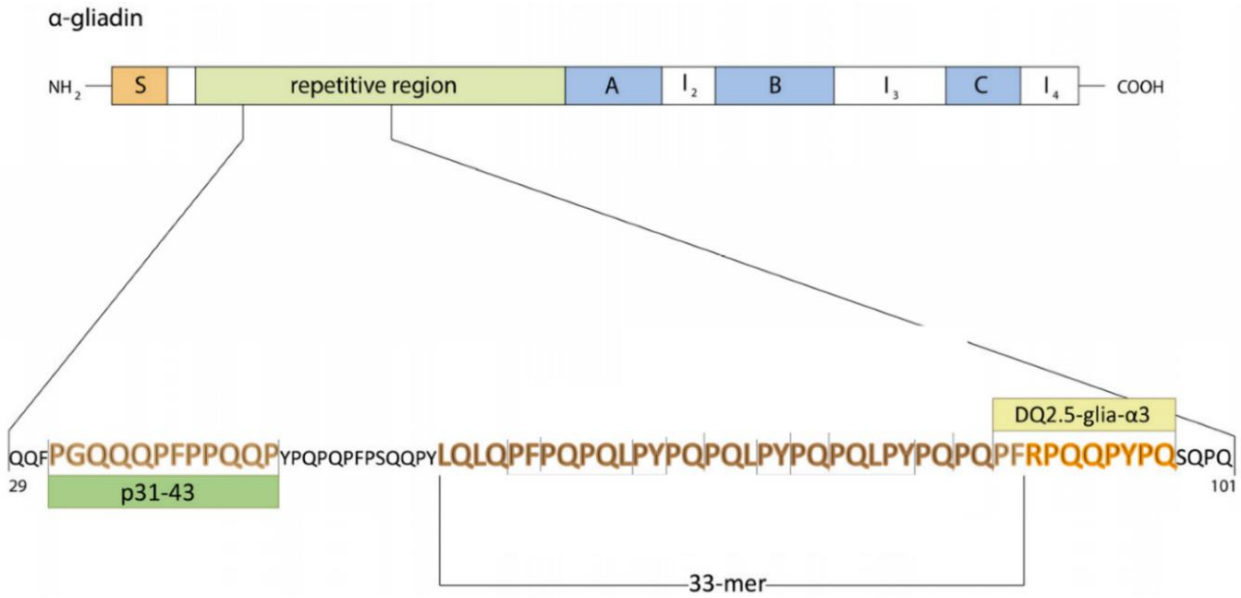
Slika 5. Uloge tkivne transglutaminaze (tTG) kod celijakije [3]. APC, antigen prezentirajuća stanica (*engl. antigen presenting cell*); IEC, crijevna epitelna stanica (*engl. intestinal epithelial cell*); IEL, intraepitelni limfociti (*engl. intraepithelial lymphocyte*); MMP, mataloproteinaze matriksa (*engl. matrix metalloproteinase*); Th1 pomoćna stanica.

4.2. Modifikacija glutena tkivnom transglutaminazom

Glavnu ulogu proteina žitarica kod celijakije zauzimaju glutenski proteini, glijadini koji se, kao što je već rečeno dijele na α, β, δ, ω subfrakcije. Poznate su dvije skupine peptida: toksični i imunogeni. Toksični peptidi oštećuju sluznicu crijeva, dok imunogeni specifično stimuliraju T-stanice. Imunogeničnost se javlja nakon reakcije deamidacije [3].

Proteini glutena (glijadin i glutenin) posjeduju određene toksične i imunogene peptide (ili epitope). Ipak, najbrojniji i najviše toksični su peptidi glijadina, pogotovo oni koji nastaju iz α- i γ- glijadina. α-glijadin se ponaša kao imunogen jer ima sposobnost vezanja na HLA-molekula. Probavljanje glijadina rezultira oslobađanjem dva fragmenta: 25-monomernog (p31-55) koji se može dalje razgraditi na manje peptide i fragmenta od 33-monomernih ostataka (p57-89). Najjači imunosni odgovor usmjeren je upravo protiv α-(2)-glijadina, 33-monomernog fragmenta. Sastoji od šest, djelomično preklapajućih kopija od tri T-stanična epitopa [5].

Pretpostavlja se da peptid p31-43 koji također nastaje iz α(2)-glijadina može direktno poticati proizvodnju interleukina-15 iz enterocita i dendritičkih stanica [5]. tTG deamidira peptid p57-89 koji se potom veže na HLA-DQ molekule. Peptidi glutenina su također uključeni u T-stanični odgovor. Peptidi ulaze u stanicu endocitozom i za njihov ulazak potrebna je temperatura od 37 °C te Ca^{2+} [5].



Slika 6. 33-monomerni fragment α-glijadina [5]. Označeni su imunogeni fragmenti: peptidi p31-43, 33-monomer i DQ2.5-gliadin-α3. Peptidni fragment od 33 monomernih jedinica nije probavljiv i predstavlja glavnu toksičnu komponentu za osobe oboljele od celijakije. Nalazi se na N-terminalnoj domeni α-glijadina.

Peptidi glijadina sadrže više mjesta koja postaju ciljnim supstratom tkivne transglutaminaze. Analizom deamidiranog glijadina masenom spektroskopijom, pokazano je da su ostaci glutaminske kiseline, nastali deamidacijom, smješteni u vezna mjesta, tzv. džepove DQ2/DQ8 molekula koje privlači negativan naboj glutaminskih ostataka. Modifikacijom glutamina tkivnom transglutaminazom nastaje veliki broj peptida glijadina koji imaju veliki afinitet vezanja za HLA-DQ2 ili HLA-DQ8 molekule. Kao što je već navedeno, tim vezanjem dolazi do aktivacije T-stanica i stvaranja proupalnih citokina od koji je najdominantniji(IFN)-γ (Slika 4) [4].

Važno je istaknuti kako je imunosni odgovor na gluten kod djece sa celijakom različit od imunosne reakcije odraslih bolesnika. Zbog heterogenosti T-stanica, imunosni odgovor kod djece usmjeren je na niz peptida glijadina i glutenina. Kod odraslih osoba, imunološka reakcija i oštećenje sluznice su vezani uz nekoliko imunodominatnih peptida glijadina, koji su preferirani supstrat za tTG i reakciju deamidacije [27].

Peptidi glutena mogu se također primarnom transamidacijom prevesti u histamin, čija je sekrecija povišena u sluznici crijeva neliječenih pacijenta. Histamin je odličan supstrat za tTG, te se efikasno prevodi u peptide glijadina *in vitro* reakcijama transamidacije [3]. tTG može hidrolizirati peptid-histamin konjugate kada je koncentracija supstrata (histamina ili glijadina) smanjena i prema tome favorizirati otpuštanje deamidiranih peptida glijadina.

4.3. Imunosni odgovor protiv tkivne transglutaminaze

Imunosni odgovor usmjeren protiv glutena posljedica je različitih mehanizama. Takva pojačana imunosna reakcija nastaje zbog stečenog odgovora na gluten te zbog stvaranja protutijela na tkivnu transglutaminazu, autotantigena celijakije [1].

Izolacijom T-stanica koje se aktiviraju modificiranim peptidima glijadina, uz prisustvo HLA-DQ2 ili HLA-DQ8 može se zaključiti da glijadin ima glavnu ulogu u razvitku oštećenja sluznice crijeva. No ovom se činjenicom ne može objasniti visoko specifični imunosni odgovor protiv tkivne transglutaminaze kao autoantigena kod celijakije. Predložen je model koji se temelji na činjenici da β-stanice proizvode antigene. U tom modelu, imunoglobulin A (IgA) i anti-tTG protutijela nastaju u samoreaktivnim β-stanicama koje su aktivirane glijadin-specifičnim T-stanicama. Pomoć od T-stanica je moguća ako glijadin (umrežano vezan s tTG-om) može služiti kao nosač proteina za enzim. Taj pretpostavljeni mehanizam rezultirao bi anti-tTG imunosnim odgovorom u odsutnosti tTG-specifičnih T-stanica. Mehanizam podupire činjenica da anti-tTG antitijela strogo ovise o unosu glutena kod pacijenta celijakije [28].

Jedna od alternativnih hipoteza predlaže da dendritičke stanice sluznice crijeva također mogu izložiti tkivnu transglutaminazu samoreaktivnim tTG-specifičnim T-stanicama. Takve tTG-specifične T-stanice mogu osigurati direktnu pomoć tTG-specifičnim β-stanicama koje potom proizvode anti-tTG protutijela [3]. Zanimljivo obilježje celijakije je mogućnost tTG da se ponaša kao hapten, mala molekula koja pobuđuje imunosni odgovor samo ako je vezana na neku molekulu nosača, npr. na protein. Dakle, tTG sudjeluje u proizvodnji autoantitijela protiv same sebe. Anti-transglutaminazna protutijela prisutna su u 98% osoba oboljelih od celijakije i vrlo su korisna u dijagnozi bolesti.

Pretpostavka da tTG ima ulogu u patogenezi celijakije i da anti-tTG protutijela mogu utjecati na funkciju same tTG još je uvijek kontroverzna tema. Ako anti-tTG antitijela djeluju kao inhibitori tTG, ujedno bi mogli blokirati njezine funkcije deamidacije i umrežanog povezivanja čime se aktivira imunosni odgovor. Inhibitorni efekt IgA i IgG anti-tTG antitijela istražen je u radu Esposito C. i sur. [29]. U tom se istraživanju promatrala aktivnost tTG u prisutnosti IgA i IgG, izoliranih iz seruma pacijenta celijakije i anti-tTG monoklonalnih antitijela koja su izolirana iz crijevnih i krvnih limfocita. Dobiveni rezultati su pokazivali kako izolirani IgA, IgG kao i anti-tTG-antitijela inhibiraju katalitičku aktivnost ljudske tkivne transglutaminaze. S druge strane, Dietrich i sur. [30] su pokazali kako je, usprkos inhibitornom učinku anti-tTG antitijela, enzimska aktivnost previsoka da bi se omogućila efikasna ugradnja kadaverina ($C_5H_{14}N_2$) u glijadin. Prema tome, predloženi inhibitorni efekt anti-tTG antitijela na enzimsku aktivnost zapravo je od manje biološke važnosti kod celijakije.

5.Dijagnoza celijakije

Sumnja na celijakiju započinje simptomima koji su već prethodno navedeni. Kod djece su simptomi jasnije definirani dok kod odraslih osoba, simptomi mogu biti vrlo diskretni pa i zanemarivi, a na to i upućuje činjenica da se u gotovo trećine odraslih bolesnika simptomi ne mogu povezati s probavnim sustavom [1]. Bolest se u takvim slučajevima većinom manifestira simptomima izvan crijeva kao što je anemija, ataksija, neplodnost i osteoporoza.

Prvi korak u dijagnozi celijakije je klinička sumnja za koju je potrebno dobro poznavanje bolesti [1]. Nakon kliničke sumnje potrebni su testovi kojima se sama dijagnoza potvrđuje. Serološki testovi, odnosno testovi kojima se određuju serumska protutijela koriste se u dijagnozi celijakije. Prvo je potrebno izmjeriti ukupnu koncentraciju specifičnih IgA protutijela u krvi radi isključivanja deficijencije imunoglobulina A-klase [11]. Vrlo visoku osjetljivost, ali znatno nižu specifičnost imaju antiglijadinska protutijela IgG-razreda (AGA-IgG), a nižu osjetljivost i višu specifičnost imaju antiglijadinska protutijela IgA-b-razreda (AGA-IgA) [4,11]. Ukoliko su dobiveni rezultati navedenih protutijela negativni, dijagnoza celijakije je malo vjerojatna. Kod odraslih osoba rijetko se koriste serološki testovi. Razlog tome je što su glijadinska protutijela manje osjetljiva kod odraslih nego kod djece. Najveću osjetljivost i specifičnost kod odraslih imaju endomizijska IgA-protutijela (EMA-IgA), ali se javljaju kod bolesnika tek nakon nekoliko godina bolesti [11].

Određivanje protutijela na tTG postala je jedna od popularnih metoda u dijagnozi. Protutijela na tkivnu transglutaminazu specifični su pokazatelji celijakije. Novija istraživanja temeljena na ELISA testu otkrila su specifična protutijela na deamidirane peptide glijadina (DGP) [11]. Ta protutijela pokazala su visoku specifičnost i osjetljivost zbog jačeg imunosnog odgovora koji dolazi zbog snažnijeg vezanja deamidiranih peptida glijadina na HLA-molekule. Prisutna su kod bolesnika već u ranoj dobi pa se koriste i u dijagnozi celijakije kod djece. Histološkom analizom koja podrazumijeva biopsiju sluznice tankog crijeva dobiva se najpouzdanija dijagnoza bolesti. Takvim pristupom moguće je direktno odrediti stupanj oštećenja sluznice crijeva. Prema Marshovoj klasifikaciji atrofije sluznice tankog crijeva razlikuju se četiri stadija patohistoliških promjena: [1,11].

- Stadij 0- uredan nalaz sluznice
- Stadij 1- broj intraepitelnih limfocita je povećan, radi se o infiltrativnoj leziji
- Stadij 2- povećan je broj intraepitelnih limfocita i debljina kripti, a crijevne resice su skraćene, radi se o hiperplastičnoj leziji
- Stadij 3- destruktivna lezija, pokazuje atrofiju resica

Nadalje, u dijagnozi bolesti mogu pomoći i genetički testovi. Kao što je već i rečeno, HLA-DQ2 i HLA-DQ8 dimeri nisu dovoljni za razvitak bolesti, ali njihova analiza je korisna kod osoba s dvojbenim serološkim i histološkim nalazima, jer negativan nalaz vjerojatno isključuje celijakiju [11]. Najčešće se koristi za dijagnozu bolesti u obitelji jer su rođaci u prvom koljenu izloženi većem riziku razvitka bolesti. Nakon donošenja pravilne dijagnoze od strane liječnika, bolesnik se upućuje na liječenje. Uklanjanje glutena iz prehrane dovodi do nestanka histoloških i kliničkih znakova bolesti što znači da se smanjuje razina protutijela u krvi, a sluznica tankog crijeva se oporavlja [4].

5.1 Dermatitis herpetiformis

Manifestacija celijakije nije ograničena samo na unutrašnje organe, primjer vanjske, odnosno kožne manifestacije ove bolesti je dermatitis herpetiformis. Kod ove gluten ovisne kožne bolesti, koja se smatra drugim oblikom celijakije, IgA dodatno cilja i epidermalnu transglutaminazu ili transglutaminazu 3 [3]. Još uvijek nije poznat razlog zbog čega se celijakija manifestira u dva različita oblika. Iako antitijela kod oba oblika glutenske enteropatije reagiraju i s tTG i srodnim enzimom, transglutaminzom 3, protutijela kod pacijenta dermatitis herpetiformisa pokazuju znatno višu aviditivnost za transglutaminazu 3. Također, ti pacijenti imaju skupinu antitijela koji su specifični za taj enzim. Nadalje, pokazano je kako IgA ostaci u površinskom dermisu ne sadrže tTG niti keratinocitnu transglutaminazu, već samo transglutaminazu 3. Prema tome, ova činjenica vodi prema zaključku da je transglutaminaza 3 dominantniji autoanitgen od tkivne transglutaminaze kod dermatitis herpetiformisa [31].

Karakteristični simptomi ove bolesti su crveni osip (mali mjehurići), koji se može pojaviti na više mjesta (ruke, noge, trup, vrat), peckanje kože te jaki svrbež. Zapravo vrlo mali broj oboljelih ima probavne simptome, ali oštećenje sluznice tankog crijeva zabilježeno je kod oko 70% bolesnika. Da bi se postavila dijagnoza ove bolesti potrebna je biopsija kože, kao i prethodno navedeni serološki testovi za celijakiju. Sama biopsija kože može biti indirektni dokaz za dermatitis herpetiformis pa u većini slučaja nije potrebna biopsija sluznice dvanaesnika [8].

6. Budućnost liječenja celijakije

Jedan od mogućih načina liječenja u budućnosti su inhibitori tkivne transglutaminaze. Inhibitori tkivne transglutaminaze dijele se u tri skupine: 1) kompetitivni aminski inhibitori, 2) reverzibilni i 3) ireverzibilni inhibitori. Najviše korišteni su kompetitivni aminski inhibitori s obzirom da su komercijalno najdostupniji, kemijski stabilni i relativno netoksični. Oni inhibiraju tTG tako da se natječu za aktivno mjesto enzima s prirodnim aminom kao što je protein s vezanim lizinskim ostatkom u reakciji transamidacije. tTG nije potpuno inhibirana kompetitivnom inhibicijom. U ovu skupinu inhibitora pripada cistamin, za kojeg se smatra da je jedinstveni inhibitor tTG jer može na više način inhibirati enzim, npr. može blokirati proliferaciju gluten-reaktivnih T-stanica. Nadalje, reverzibilni inhibitori smanjuju enzimsku aktivnost tako da blokiraju supstratu ulazak u aktivno mjesto, bez da kovalentno modificiraju enzim. Kofaktori transglutaminaze 2, kao što su GDP i GTP primjer su alosteričkih, reverzibilnih inhibitora. Također, dvovalentni metalni ion, kao što je Zn^{2+} može inhibirati enzim tako da se natječe s Ca^{2+}. Posljednji, ireverzibilni (suicidalni) inhibitori kovalentno modificiraju enzim i time sprječavaju vezanje supstrata za katalitičko mjesto [32].

Kao najbolji kandidat koji inhibira crijevnu tTG, pokazao se sintetički spoj KCCOO9, koji sadrži halo-dihidroizoksazol. Kako ima kratki životni vijek, izloženost drugih organa tom spoju je minimalna pa bi se njegovom upotrebom moglo provjeriti jesu li inhibitori tTG alternativna terapija celijakije. Ova potencijalna terapija još uvijek nije eksperimentalno istraživana kod ljudi [3].

Drugi, zanimljivi način liječenja predložio je Gianfrani temelji se detoksikaciji peptida glutena. On je svojim istraživanjem pokazao da transamidacija pšeničnog brašna s niskomolekularnom transglutaminazom, dobivena iz *Streptomyces moboraensis*, te odgovarajući amino-donor mogu blokirati gluten-reaktivne T-stanice. Na temelju toga, mogu se rasvijetliti potencijalni načini smanjivanja toksičnosti žitarica [3].

7.Zaključak

Celijakija je kronična bolest tankog crijeva koja je posljedica pojačane imunosne reakcije. Njezina genetska podloga podosta je složena i uključuje međusobni utjecaj velikog broja gena. Simptomi bolesti su širokog raspona i često nejasni zbog čega je dijagnoza otežana. Glavni protein žitarica, gluten, toksična je komponenta koja inicira neadekvatnu imunosnu reakciju kod osoba s celijakijom. Ključnu ulogu u patogenezi bolesti ima enzim tkivna transglutaminaza. tTG predstavlja autoantigen koji inicira stvaranje specifičnih protutijela. Također, reakcijama umreženog povezivanja i deamidacijom mijenja imunostimulatorni efekt gluten što dovodi do oštećenja sluznice crijeva. Unatoč velikom napretku koji je postignut u razumijevanju same patogeneze kao i uloge tkivne transglutaminaze kod celijakije, još uvijek ima nekih činjenica koje nisu potpuno razjašnjene. Potencijalni terapijski pristupi koji se temelje na protutijelima tkivne transglutaminaze, ukazali su na moguće preokrete u liječenju celijakije. Moguće su terapije koji bi služile kao zamjena u izbacivanju glutena iz prehrane ili kao pomoćni tretman u liječenju bolesti.

8. Popis literature

1. S. Čuković-Čavka, M. Crnčević Urek, M. Brinar, N. Turk, Celijakija u odrasloj dobi, *MEDICUS*, **21** (2012), 179 – 186.

2. N. Starčević-Čizmarević, B. Mijandrušić-Sinčić, V. Licul, M. Kapović, S. Ristić, Geni i celijakija, *Paediatr Croat.*, **59** (2015), 88-94.

3.A. D. Sabatino, A. Vanoli, P.Giuffrida, O. Luinetti , E. Solcia, G.R. Corazza, The function of tissue transglutaminase in celiac disease, *Autoimmun. Rev.*, **11** (2012), 746–753.

4. A. Votava-Raić, D. Tješić-Drinković, L. Omerza, Celijakija, *Pedijatrija danas*, **2** (2006), 133-153.

5. A.V. Balakireva, A. A. Zamyatnin, Properties of Gluten Intolerance: Gluten Structure, Evolution, Pathogenicity and Detoxification Capabilities, *Nutrients*, **8** (2016), 644.

6. I. Rombouts, B. Lagrain, K. Brijs, J.A. Delcour, β-Elimination reactions and formation of covalent cross-links in gliadin during heating at alkaline pH, *J. Cereal Sci.*, **52** (2010), 362–367.

7. https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/sid/0009007903 (18.9.2017)

8. Z. Mišak, Gluten u prehrani: uzrok celijakije ili nešto više, *Paediatr Croat.*, **58** (2014): 175-179.

9. P.H.R. Green, C. Cellier, Celiac Disease, *N. Engl. J. Med.*, **357**(2007), 1731-43.

10. https://www.plivazdravlje.hr/aktualno/clanak/9516/Celijakija-bolest-brojnih-lica.html (18.9.2017).

11. I. Barbarić, Dijagnostički testovi za celijakiju, *Medicina Fluminensis*, **45** (2009), 44-48.

12. A.K. Akobeng, A. Ramanan, I. Buchan, R.F. Heller, Effect of breast feeding on risk of coeliac disease: a systematic review and meta-analysis of observational studies, *Arch. Dis. Child.*, **91** (2006), 39–43.

13. N.P. Radlović, M.M. Mladenović, Z.M. Leković, Z.M. Stojšić, V.N. Radlović, Influence of early feeding practices on celiac disease in infants, *Croat. Med. J.*, **51** (2010), 417-422.

14. J.M. Norris, K. Barriga, E.J. Hoffenberg, I. Taki, D. Miao, J.E. Haas, L.M. Emery, R.J. Sokol, H.A. Erlich, G.S. Eisenbarth, M. Rewers, Risk of celiac disease autoimmunity and timing of gluten introduction in the diet of infants at increased risk of disease, *JAMA*, **293** (2005), 2343-51.

15. C.S. Greenberg, P.J. Birckbichler, R.H. Rice, Transglutaminases: multifunctional cross-linking enzymes that stabilize tissues, *FASEB J.*, **5** (1991), 3071-7.

16. C.L. Nikolajsen, T.F. Dyrlund, E.T. Poulsen, J.J. Enghild, C. Scavenius, Coagulation Factor XIIIa Substrates in Human Plasma, *J. Biol. Chem*., **289** (2014), 6526–6534.

17. D.M. Pinkas, P. Strop, A.T. Brunger, C. Khosla, Transglutaminase 2 Undergoes a Large Conformational Change upon Activation, *PLOS Biol.*, **5** (2007), 327.

18. R.L. Eckert, M.T. Kaartinen, M. Nurminskaya, A.M. Belkin, G. Colak, G.V. Johnson, K. Mehta, Transglutaminase Regulation of Cell Function, *Physiol. Rev*, **94** (2014), 383-417.

19. S.S. Akimov, A.M. Belkin, Cell surface tissue transglutaminase is involved in adhesion and migration of monocytic cells on fibronectin, *Blood Journal*, **98** (2001), 1567-76.

20. S. Kojima, K. Nara, D.B. Rifkin, Requirement for transglutaminase in the activation of latent transforming growth factor-beta in bovine endothelial cells, *J. Cell Biol.*, **121** (1993), 439–448.

21. G. Mazzarella, Effector and suppressor T cells in celiac disease, *World J. Gastroenterol*, **21** (2015), 7349-7356.

22. J.R. Schoenborn, C.B. Wilson, Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses, *Adv. Immunol*., **96** (2007), 41-101.

23. P. Spear, M.R. Wu, M.L. Sentman, C.L. Sentman, NKG2D ligands as therapeutic targets, *Cancer Immun.*, **13** (2013), 8.

24. R.W. Collins, Human MHC class I chain related (MIC) genes: their biological function and relevance to disease and transplantation, *Eur. J. Immunogene.t*, **3** (2004), 105-14.

25. S.E. Bruce, I. Bjarnason, T.J. Peters, Human jejunal transglutaminase: demonstration of activity, enzyme kinetics and substrate specificity with special relation to gliadin and coeliac disease, *Clin. Sci.* , **68** (1985), 573–9.

26. W. Dieterich, T. Ehnis, M. Bauer, P. Donner, U. Volta, E.O. Riecken, Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease, *Nat. Med.*, **3** (1997), 797-801.

27. W. Vader, Y. Kooy, W.P. Van, A.D. Ru, D. Harris, W. Benckhuijsen, S. Peña, L. Mearin, J.W . Drijfhout, F. Koning, The gluten response in children with celiac disease is directed toward multiple gliadin and glutenin peptides, *Gastroenterology*, **122** (2002), 1729-

28. L.M. Sollid, O. Molberg, S. McAdam, K.E. Lundin, Autoantibodies in coeliac disease: Tissue transglutaminase-guilt by association? *Gut*, **41** (1997), 851–2.

29. C. Esposito, F. Paparo, I. Caputo, M. Rossi, M. Maglio, D. Sblattero, Anti-tissue transglutaminase antibodies from coeliac patients inhibit transglutaminase activity both in vitro and in situ, *Gut*, **51** (2002), 177–81.

30. W. Dieterich, D. Trapp, B. Esslinger, M. Leidenberger, J. Piper, E. Hahn, Autoantibodies of patients with coeliac disease are insufficient to block tissue transglutaminase activity, *Gut*, **52** (2003), 1562-1566.

31. M. Sardy, S. Karpati, B. Merkl, M. Paulsson, N. Smyth, Epidermal transglutaminase (TGase 3) is the autoantigen of dermatitis herpetiformis, *J. Exp. Med.*, **195** (2002), 747–57.

32. M. Siegel, C. Khosla, Transglutaminase 2 inhibitors and their therapeutic role in disease states, *Pharmacol. Ther.*, **115** (2007), 232–45.