



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΝΔΟΚΡΙΝΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ PASTEUR
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑΣ**

Ανίχνευση B- και T-επιτόπων της θυρεοσφαιρίνης:
συσχέτιση με την ανθρώπινη νόσο (θυρεοειδίτιδα Hashimoto) και
την πειραματική νόσο στον ποντικό

Ιωάννης Κάνιστρας
Βιοχημικός, MSc

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ιωάννινα 2013



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΝΔΟΚΡΙΝΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ PASTEUR
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑΣ**

Ανίχνευση B- και T-επιτόπων της θυρεοσφαιρίνης:
συσχέτιση με την ανθρώπινη νόσο (θυρεοειδίτιδα Hashimoto) και
την πειραματική νόσο στον ποντικό

Ιωάννης Κάνιστρας
Βιοχημικός, MSc

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ιωάννινα 2013

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος).

Ημερομηνία αίτησης του κ. Κάνιστρα Ιωάννη: 26-1-2006

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 601^α/27-3-2007

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Τσατσούλης Αγαθοκλής Καθηγητής Παθολογίας –Ενδοκρινολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Φιλίππου Γεώργιος Επίκουρος Καθηγητής Ενδοκρινολογίας με εξειδίκευση στο Σακχαρώδη Διαβήτη, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Λυμπέρη Πηγή Ερευνήτρια Α΄ Ινστιτούτο Pasteur Αθηνών

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 3-12-2007

«Ανίχνευση Β και Τ επιτόπων της θυραιοσφαιρίνης συσχέτιση με την ανθρώπινη νόσο (Θυρεοειδίτιδα Hashimoto) και την πειραματική νόσο στον ποντικό»

Ημερομηνία Ανασυγκρότησης της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 620^α/20-11-2007

Επιβλέπων

Τσατσούλης Αγαθοκλής Καθηγητής Παθολογίας –Ενδοκρινολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Βούλγαρη Παρασκευή Επίκουρη Καθηγήτρια Ρευματολογίας με έμφαση στην Ανοσολογία, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Λυμπέρη Πηγή Ερευνήτρια Α΄ Ινστιτούτο Pasteur Αθηνών

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 753^α/18-6-2013

Δρόσος Αλέξανδρος	Καθηγητής Παθολογίας -Ρευματολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Τσατσούλης Αγαθοκλής	Καθηγητής Παθολογίας -Ενδοκρινολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Βούλγαρη Παρασκευή	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ρευματολογίας με έμφαση στην Ανοσολογία Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Κωνσταντινίδης Αθανάσιος	Επίκουρος Καθηγητής Πνευμονολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Τίγκας Στυλιανός	Επίκουρος Καθηγητής Ενδοκρινολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Τσαμπούρη Σοφία	Λέκτορα Παιδιατρικής , Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Λυμπέρη Πηγή	Ερευνήτρια Α΄, Ινστιτούτο Pasteur Αθήνα

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 27-6-2013

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Μαργαρίτα Τζαφλίδου

Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσικής



Γραμματέας της Σχολής

ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΤΟΠΟΥΛΟΥ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ανοσολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ, υπό την επίβλεψη της διευθύντριας του εργαστηρίου, Δρ. Λυμπέρη Πηγή.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή Τσατσούλη Αγαθοκλή, για την ευκαιρία που μου προσέφερε να πραγματοποιήσω τη διατριβή αυτή στην Ενδοκρινολογική Κλινική της Ιατρικής Σχολής Ιωαννίνων, καθώς και όλα τα μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής για την ετήσια, στενή παρακολούθηση της προόδου μου.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην Δρ Λυμπέρη Πηγή, για τη μοναδική ευκαιρία που μου προσέφερε να εργαστώ στο εργαστήριό της ως μέλος της ερευνητικής της ομάδας, αλλά και την υποτροφία που μου εξασφάλισε από το Ινστιτούτο Παστέρ κατά τη διάρκεια της διατριβής. Η ίδια υπήρξε αρωγός σε όλα τα στάδια της μελέτης και με την πολύχρονη εμπειρία της στον κλάδο της Ανοσολογίας συνέβαλλε καθοριστικά στην ολοκλήρωσή της. Υπό την επίβλεψή της εκπαιδεύτηκα σε ανοσολογικές και βιοχημικές τεχνικές, όμως πέρα από το επιστημονικό σκέλος, απέκτησα κριτική σκέψη, εμβάθυνα σε μεγάλο βαθμό το γραπτό και προφορικό επιστημονικό μου λόγο και γνώρισα καταξιωμένους παγκοσμίως ερευνητές. Μεταξύ αυτών, εξέχουσα θέση κατέχει ο Δρ. Αβραμέας Στρατής, τον οποίο είχα την τιμή και το ιδιαίτερο προνόμιο να συμβουλευόμαι ανά πάσα στιγμή.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη μεταδιδακτορική συνεργάτιδα Χατζηϊωάννου Αικατερίνη, για την εκπαίδευση, την οργάνωση αλλά και τη συνδρομή σε αρκετές τεχνικές που εφαρμόστηκαν στην παρούσα μελέτη, την ερευνήτρια του εργαστηρίου Λιακατά Ελισάβετ για την καθοδήγησή της όποτε αυτό κρίθηκε απαραίτητο, τους υπόλοιπους διδακτορικούς φοιτητές του εργαστηρίου, κα Σαλή Αγγελική και κα Ζαννίκου Μαρκέλλα για την άριστη συνεργασία και τέλος τον παρασκευαστή του εργαστηρίου κ Μπαλάφα Απόστολο για την άμεση τεχνική στήριξη που μου προσέφερε. Στο σύνολό της, η ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου συνετέλεσε στη δημιουργία ενός εξαιρετικού εργασιακού περιβάλλοντος, ένα καθοριστικό στοιχείο της εύρυθμης λειτουργίας του εργαστηρίου.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένειά μου και τους φίλους μου για την κατανόηση και την ψυχολογική υποστήριξή τους, με σημαντικότερο όλων τη σύζυγό μου Αγγελική, στην οποία και αφιερώνω το διδακτορικό αυτό.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1. ΑΥΤΟΑΝΟΣΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΤΟΥ ΘΥΡΕΟΕΙΔΗ ΑΔΕΝΑ	10
1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
1.2 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΑΥΤΟΑΝΟΣΩΝ ΘΥΡΕΟΕΙΔΙΚΩΝ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ	11
1.2.1 Θυρεοειδίτιδα Hashimoto.....	11
1.2.2 Νόσος Graves	12
1.2.3 Κοινά χαρακτηριστικά των αυτοάνοσων θυρεοειδικών νοσημάτων	12
1.2.3.1 Διήθηση θυρεοειδή αδένα	12
1.2.3.2 Παραγωγή αυτοαντισωμάτων	13
1.3 ΑΙΤΙΟΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΘΥΡΕΟΕΙΔΙΚΩΝ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ	15
1.3.1 Γενετικοί παράγοντες.....	15
1.3.1.1 Μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας	15
1.3.1.2 Το γονίδιο του αντιγόνου 4 των κυτταροτοξικών Τ-κυττάρων	17
1.3.1.3 Το γονίδιο της θυρεοσφαιρίνης.....	17
1.3.1.4 Το γονίδιο του υποδοχέα της θυρεοειδοτρόπου ορμόνης	18
1.3.2 Περιβαλλοντικοί παράγοντες.....	19
1.3.2.1 Ιώδιο.....	19
1.3.3 Φύλο.....	19
1.3.4 Φαρμακευτικές ουσίες.....	20
1.3.5 Χημικές ουσίες	21
1.3.6 Συνυπάρχουσες ασθένειες.....	21
1.3.6.1 Αυτοάνοσα νοσήματα	21
1.3.6.2 Γενετικές ασθένειες.....	21
1.3.6.3 Ιικές ασθένειες	22
1.3.6.4 Βακτηριακές λοιμώξεις	22
2. ΚΥΡΙΑ ΑΥΤΟΑΝΤΙΓΟΝΑ ΘΥΡΕΟΕΙΔΗ ΑΔΕΝΑ.....	24
2.1 Η ΘΥΡΕΟΣΦΑΙΡΙΝΗ ΩΣ ΑΥΤΟΑΝΤΙΓΟΝΟ	24
2.2 Η ΘΥΡΕΟΕΙΔΙΚΗ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΑΣΗ ΩΣ ΑΥΤΟΑΝΤΙΓΟΝΟ	26
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΜΕΛΕΤΗΣ ΑΥΤΟΑΝΟΣΩΝ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ ΘΥΡΕΟΕΙΔΗ ΑΔΕΝΑ	28
3.1 ΑΥΘΟΡΜΗΤΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΕΚΔΗΛΩΣΗΣ ΕΑΤ	29
3.1.1 Αρουραίοι Buffalo	29
3.1.2 Αρουραίοι Bio-Breeding/Worcester	29
3.1.3 Όρνια Obese.....	29
3.1.4 Ποντικοί NOD-H-2 ^{h4}	30
3.2 ΑΥΘΟΡΜΗΤΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΕΑΤ ΜΕ ΠΑΡΑΛΛΗΛΗ ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΙΩΔΙΟΥ.....	31
3.3 ΕΠΑΓΟΜΕΝΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΕΑΤ	32

3.3.1 Άμεση ανοσοποίηση	32
3.3.2 Παθητική μεταφορά.....	34
3.4 ΕΠΑΓΩΓΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΑΥΤΟΑΝΟΣΗΣ ΘΥΡΕΟΕΙΔΙΤΙΔΑΣ ΜΕ ΘΥΡΕΟΣΦΑΙΡΙΝΗ ΣΕ ΠΟΝΤΙΚΟΥΣ	35
3.4.1 Στάδια επαγωγής EAT	35
3.4.1.1 Επιλογή ανοσοευσχιστικού	36
3.4.1.2 Προέλευση θυρεοσφαιρίνης	37
3.4.1.3 Επιλογή σημείου ανοσοποίησης και ηλικίας πειραματόζων.....	37
3.4.1.4 Ενεργοποίηση T-λεμφοκυττάρων	37
3.4.1.5 Διήθηση θυρεοειδή αδένα	39
3.4.2 Παράγοντες που συμμετέχουν στην παθογένεια της EAT	40
3.4.2.1 Κυτταροκίνες	40
3.4.2.2 T-λεμφοκύτταρα.....	41
3.4.2.3 Αντιγονοπαρουσιαστικά	43
3.4.2.4 B λεμφοκύτταρα.....	44
3.5 ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΩΝ ΣΕ ΕΥΑΙΣΘΗΤΑ ΚΑΙ ΑΝΘΕΚΤΙΚΑ	44
3.5.1 Κριτήρια διαφοροποίησης	44
3.5.1.1 Χρήση ανοσοευσχιστικού.....	44
3.5.1.2 Προέλευση Tg.....	45
3.5.1.3 Ρυθμιστικά T λεμφοκύτταρα	45
3.5.1.4 Παθογονικά T λεμφοκύτταρα	46
3.5.2 MHC γονίδια.....	46
3.5.3 Γονίδιο της Tg	47
4. ΑΝΟΣΟΓΟΝΙΚΑ ΚΑΙ ΠΑΘΟΓΟΝΙΚΑ ΠΕΠΤΙΔΙΑ ΤΗΣ ΘΥΡΕΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ	48
4.1 ΤΡΟΠΟΙ ΕΠΙΛΟΓΗΣ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ	48
4.1.1 Πεπτίδια που περιλαμβάνουν τις ορμονογονικές περιοχές της Tg.....	49
4.1.2 Πεπτίδια που περιλαμβάνουν κοινές αλληλουχίες της Tg με άλλα αυτοαντιγόνα	49
4.1.3 Πεπτίδια που προσδιορίστηκαν μέσω αλγόριθμων.....	50
5. ΠΑΘΟΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΚΔΗΛΩΣΗΣ EAT	51
5.1 ΓΝΩΣΤΑ ΑΝΟΣΟΓΟΝΙΚΑ ΚΑΙ ΠΑΘΟΓΟΝΙΚΑ ΠΕΠΤΙΔΙΑ ΤΗΣ ΘΥΡΕΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ	58
5.1.1 Επαγωγή EAT σε ευαίσθητα στελέχη.....	58
5.1.2 Επαγωγή EAT σε ανθεκτικά στελέχη.....	60
5.1.3 Επαγωγή EAT σε διαγονιδιακούς ποντικούς που φέρουν το μόριο E ^b	60
5.1.4 Επαγωγή EAT σε ανθρωποποιημένους ποντικούς	61
5.1.5 Συσχέτιση EAT με την ανθρώπινη νόσο.....	61
5.1.6 Συνθετικά πεπτίδια της θυρεοσφαιρίνης που αναγνωρίζονται από αντισώματα.....	62
5.2 ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΙΜΕΡΟΥΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ EAT	63

5.2.1 Ρόλος ιωδίσωσης.....	63
5.2.2 Ρόλος αντι-TG.....	64
5.2.3 Ρόλος μοριακής μίμησης.....	65
5.2.4 Ρόλος των Α και Ε γονιδίων.....	65
5.2.5 Ρόλος πρωτεολυτικών ενζύμων.....	66
6. ΠΕΠΤΙΔΙΑ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	68
ΣΚΟΠΟΣ.....	73
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	77
1. ΣΥΛΛΟΓΗ ΟΡΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΑΥΤΟΑΝΟΣΑ ΘΥΡΕΟΕΙΔΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΥΓΙΩΝ ΜΑΡΤΥΡΩΝ.....	78
2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΘΥΡΕΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ ΑΠΟ ΘΥΡΕΟΕΙΔΙΚΟ ΙΣΤΟ.....	79
3. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ SDS-PAGE.....	86
4. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΟΥ ΤΙΤΛΟΥ ΤΩΝ ΑΝΤΙ-TG ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΑΥΤΗΣ ΜΕ ELISA.....	92
5. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΤΑΞΗΣ G ΑΠΟ ΤΟΝ ΟΛΙΚΟ ΟΡΟ.....	99
6. ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ.....	102
7. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΟΣ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΣΗΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΩΝ.....	104
8. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΕΝΔΙΩΡΗΜΑΤΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΛΕΜΦΑΔΕΝΩΝ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΠΟΝΤΙΚΩΝ ΓΙΑ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ.....	106
9. ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΟΣΟΓΟΝΙΚΟΤΗΤΑΣ ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ ΣΕ ΕΠΙΠΕΔΟ Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΟΥ <i>IN VITRO</i> ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΡΑΔΙΕΝΕΡΓΗΣ ΘΥΜΙΔΙΝΗΣ.....	109
10. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΩΝ ΠΟΥ ΕΚΚΡΙΝΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ ΜΕ ELISA.....	114
11. ΕΠΑΓΩΓΗ ΑΜΕΣΗΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΑΥΤΟΑΝΟΣΗΣ ΘΥΡΕΟΕΙΔΙΤΙΔΑΣ (ΑΜΕΣΗ ΕΑΤ).....	119
12. ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΠΑΓΩΓΗΣ ΕΑΤ.....	121
13. ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΟΣΟΓΟΝΙΚΟΤΗΤΑΣ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΣΕ ΕΠΙΠΕΔΟ Β ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ELISA.....	127
14. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΝΟΣΟΠΡΟΣΡΟΦΗΤΗ ΚΑΙ ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΤΩΝ ΕΙΔΙΚΩΝ ΓΙΑ ΤΟ P2208 ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ.....	131
15. ΕΛΕΓΧΟΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΤΩΝ ΟΡΩΝ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΠΟΝΤΙΚΩΝ ΜΕ ELISA.....	135
16. ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ <i>IN SILICO</i> ΜΕΛΕΤΗΣ.....	138
16.1 RANKREP.....	138
16.2 Altuvia.....	139
16.3 ProtParam.....	140
16.4 NetSurfP.....	141
16.5 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).....	142

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	143
1. ΣΥΛΛΟΓΗ ΟΡΩΝ ΑΠΟ ΥΓΙΕΙΣ ΜΑΡΤΥΡΕΣ ΚΑΙ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΗΤ ΚΑΙ GD.....	144
2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΘΥΡΕΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ ΑΠΟ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΙΣΤΟ	145
3. ΠΑΡΑΜΕΤΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ Tg	148
3.1 Ομοιότητες του p2208 με άλλες πρωτεΐνες	148
3.2 Φυσικο-χημικές ιδιότητες.....	151
3.3 Πρόσδεση πεπτιδίων σε μόρια τάξης II του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας	157
4. ΕΛΕΓΧΟΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΟΡΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ΤΗΣ ΘΥΡΕΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ ΚΑΙ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΤΗΣ	160
4.1 Βαθμονόμηση ορών.....	160
4.2 Επιλογή συνθηκών ELISA	162
4.2.1 Συγκέντρωση αντιγόνων	162
4.2.2 Επιλογή συζευγμένου δεύτερου αντισώματος.....	166
4.2.3 Σύγκριση της ικανότητας των ορών να διαχωρίζουν μεταξύ των διαφορετικών μορφών της Tg	168
4.3 Έλεγχος δραστικότητας ορών από ασθενείς με ΗΤ και GD, έναντι των πεπτιδίων p2208, p2352 και p2472	170
4.5 Απομόνωση αντισωμάτων τάξης G από ορούς ασθενών.....	172
4.6 Σύγκριση δραστικότητας ολικών ορών και κλασμάτων IgG έναντι της Tg και πεπτιδίων αυτής.....	174
5. <i>IN VITRO</i> ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΟΣΟΓΟΝΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ p2208 και p2352 ΣΕ Τ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΕΠΙΠΕΔΟ	179
5.1 Έλεγχος των T-λεμφοκυττάρων ειδικών για τα πεπτίδια της μελέτης.....	179
5.2 Μέτρηση κυτταροκινών σε υπερκείμενα T-λεμφοκυττάρων ειδικών για το πεπτίδιο.....	185
5.3 Χαρακτηρισμός T-επιτόπου του πεπτιδίου p2208	187
6. ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΑΘΟΓΟΝΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΠΕΠΤΙΔΙΟΥ p2208 ΣΕ ΕΥΑΙΣΘΗΤΕΣ ΚΑΙ ΑΝΘΕΚΤΙΚΕΣ ΦΥΛΕΣ ΠΟΝΤΙΚΩΝ.....	190
6.1 Προσδιορισμός βαθμού διήθησης του θυρεοειδή αδένος	190
7. ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΟΡΩΝ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΠΟΝΤΙΚΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ΘΥΡΕΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΠΕΠΤΙΔΙΟΥ P2208.....	193
7.1 Έλεγχος δραστικότητας των ολικών ορών ανοσοποιημένων ποντικών.....	193
7.2 Έλεγχος για ενδομοριακή επέκταση επιτόπων μέσω της ανοσοποίησης με το πεπτίδιο p2208	196
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	199
1. ΣΥΝΟΠΤΙΚΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	200
2. ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	201
2.1 Τα πεπτίδια p2208 και p2352 δεν αποτελούν διαγνωστικούς δείκτες των θυρεοειδικών νοσημάτων.....	201

2.2 Το πεπτίδιο p2208 είναι ανοσογονικό σε T-κυτταρικό επίπεδο σε ποντικούς ευαίσθητων και ανθεκτικών στελεχών	204
2.3 Το πεπτίδιο p2208 είναι παθογονικό σε ποντικούς ευαίσθητων και ανθεκτικών στελεχών	208
2.4 Το πεπτίδιο p2208 επάγει την παραγωγή ειδικών αντισωμάτων σε ευαίσθητα και ανθεκτικά στελέχη ποντικών	211
2.5 Τα αντι-p2208 αντισώματα αναγνωρίζουν έναν επιφανειακό επίτοπο στο μόριο της Tg	212
ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ	215
1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΕΛΛΗΝΙΚΗ.....	216
2. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΑΓΓΛΙΚΗ	219
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	223
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ.....	243



ΕΙΣΑΓΩΓΗ

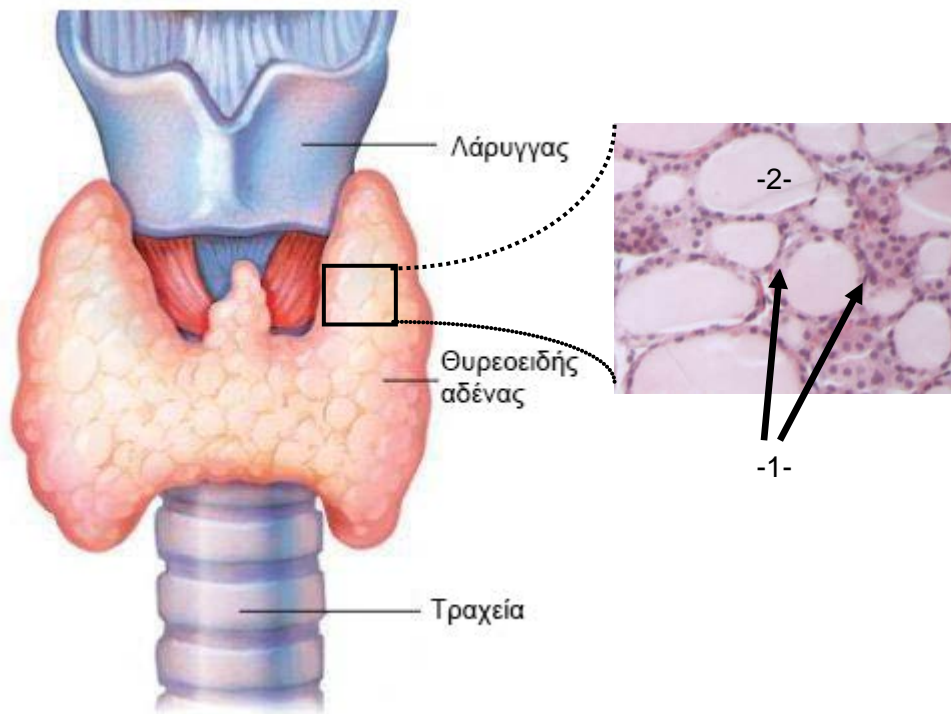
1. ΑΥΤΟΑΝΟΣΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΤΟΥ ΘΥΡΕΟΕΙΔΗ ΑΔΕΝΑ

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα αυτοάνοσα νοσήματα του θυρεοειδή αδένος κατατάσσονται μεταξύ των αυτοάνοσων οργανοειδικών νοσημάτων και διαχωρίζονται κυρίως στην αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα (υποθυρεοειδισμός – Θυρεοειδίτιδα Hashimoto – Hashimoto’s Thyroiditis – HT) η οποία εκδηλώνεται με ή χωρίς βρογχοκήλη και στη νόσο του Graves (υπερθυρεοειδισμός – Graves’ Disease – GD). Τα κοινά χαρακτηριστικά που καταγράφονται και στις δύο αυτές ασθένειες αφορούν στην ενεργοποίηση Τ λεμφοκυττάρων, στη διήθηση του θυρεοειδή αδένος από μονοπύρνα κύτταρα και στην παραγωγή αντισωμάτων έναντι των θυρεοειδικών αυτοαντιγόνων (1). Στην εικόνα 1 απεικονίζεται ένας τυπικός θυρεοειδής αδένος και τα θυλάκιά του. Η θυρεοειδίτιδα Hashimoto είναι μία κυτταρο-μεσολαβούμενη νόσος στην οποία παρατηρείται ενεργοποίηση Τ λεμφοκυττάρων έναντι της θυροσφαιρίνης (Thyroglobulin – Tg) και της θυρεοειδικής υπεροξειδάσης (Thyroid peroxidase - TPO). Τα κύτταρα αυτά διηθούν και καταστρέφουν το θυρεοειδή αδένος, με την κλινική εικόνα της νόσου να χαρακτηρίζεται από χαμηλά επίπεδα θυροξίνης (T4) και τριιωδοθυρονίνης (T3) και υψηλά επίπεδα της θυρεοειδοτρόπου ορμόνης (TSH) στον ορό. Η νόσος του Graves είναι μία νόσος που χαρακτηρίζεται από την παραγωγή αυτοαντισωμάτων έναντι του υποδοχέα της TSH που μιμούνται τη δράση της και παρουσιάζει την ακριβώς αντίθετη εικόνα από κλινικής απόψεως (2) [πίνακας 1].

Πίνακας 1: Ορολογικοί δείκτες για τη διάγνωση των δύο βασικών θυρεοειδικών νοσημάτων. Και στις δύο νόσους ανιχνεύονται συχνά αντισώματα έναντι της Tg, όμως ο ρόλος τους στην παθογένεια δεν έχει διευκρινιστεί.

Νόσος	Ορολογικός δείκτης			Αντισώματα	
Υποθυρεοειδισμός	TSH ↑	T3 ↓	T4 ↓	Αντι-TPO ↑	Αντι-Tg
Υπερθυρεοειδισμός	TSH ↓	T3 ↑	T4 ↑	Αντι-TSH-R ↑	Αντι-Tg



Εικόνα 1: Ο θυρεοειδής αδένας εντοπίζεται στην πρόσθια περιοχή της τραχείας, πλησίον του χόνδρου του λάρυγγα και αποτελείται από δύο λοβούς (αριστερό και δεξιό), οι οποίοι συνδέονται μεταξύ τους από τον ισθμό. Στην εικόνα δεξιά βλέπουμε μία τομή σε μεγέθυνση ενός φυσιολογικού θυρεοειδική αδένα. Τα θυλάκια -1- του θυρεοειδή αδένα είναι οι δομικές μονάδες του, στο εσωτερικό των οποίων βρίσκεται το κολλοειδές -2-. Κάθε θυλάκιο απαρτίζεται από τα θυρεοκύτταρα, τα οποία εκκρίνουν τις ορμόνες του αδένα (3).

1.2 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΑΥΤΟΑΝΟΣΩΝ ΘΥΡΕΟΕΙΔΙΚΩΝ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ

1.2.1 Θυρεοειδίτιδα Hashimoto

Η ΗΤ αποτελεί την πιο συχνή αυτοάνοση ενδοκρινολογική νόσο στο γενικό πληθυσμό (10%), με αναλογία 7:1 μεταξύ γυναικών και ανδρών (4;5). Το 1956 η ομάδα των Rose N.R. και Witebsky E. παρατήρησε ότι η ανοσοποίηση πειραματόζων με θυρεοειδικά αντιγόνα και ανοσοενισχυτικό είχε ως αποτέλεσμα τη δημιουργία φλεγμονής στο θυρεοειδή αδένα (6;7). Σε παράλληλη μελέτη την ίδια περίοδο, η ομάδα του Roitt I.M. ανίχνευσε για πρώτη φορά αυτοαντισώματα ειδικά για θυρεοειδικά αντιγόνα σε ορούς ασθενών με ΗΤ (8). Με την πάροδο των χρόνων όμως έγινε σαφές ότι η έναρξη της νόσου συνδέεται άμεσα με την ενεργοποίηση αυτοδραστικών Τ λεμφοκυττάρων έναντι των δύο κύριων αυτοαντιγόνων του αδένα, της Tg και της TPO (9). Τα αυτοδραστικά Τ λεμφοκύτταρα συμμετέχουν ενεργά στην εξέλιξη της νόσου μέσω της

κυτταροτοξικότητάς τους, της παραγωγής κυτταροκινών και της παροχής βοήθειας σε Β λεμφοκύτταρα [εικόνα 2].

1.2.2 Νόσος Graves

Η GD είναι ένα οργανοειδικό αυτοάνοσο νόσημα, το οποίο έχει όργανο-στόχο το θυρεοειδή αδέν. Εμφανίζεται σε Καυκάσιους με συχνότητα 0.5-2% και με αναλογία 10:1 μεταξύ γυναικών και ανδρών (10). Η παθογένειά της βασίζεται σε αντισώματα που αναγνωρίζουν τον υποδοχέα της TSH (TSH-R) στην επιφάνεια των θυρεοειδικών κυττάρων. Το 1956, μία χρονιά ορόσημο στην πειραματική εξέλιξη της αυτοάνοσης θυρεοειδίτιδας, οι Adams και Purves κατάφεραν να προσδιορίσουν πως αυτό που επί σειρά ετών χαρακτηριζόταν “thyroid stimulator” δεν ήταν τίποτα άλλο από τα αντισώματα αυτά (11). Η νόσος χαρακτηρίζεται από ενεργοποίηση Β λεμφοκυττάρων ειδικών για τον TSH-R, τα οποία με τη σειρά τους παράγουν τα αντισώματα που μιμούνται τη δράση της και συνεπώς ευθύνονται για την υπερ-λειτουργία και σταδιακή καταστροφή του αδέν. Ως αποτέλεσμα, παρατηρείται τόσο η υπερπλασία των θυρεοκυττάρων, όσο και ολόκληρου του αδέν, καθώς και αυξημένη παραγωγή των θυρεοειδικών ορμονών (2).

1.2.3 Κοινά χαρακτηριστικά των αυτοάνοσων θυρεοειδικών νοσημάτων

1.2.3.1 Διήθηση θυρεοειδή αδέν

Και τα δύο νοσήματα χαρακτηρίζονται από διήθηση του θυρεοειδή αδέν από μονοπύρρηνα κύτταρα [εικόνα 2]. Ενώ στη GD η διήθηση είναι μικρής έκτασης και επάγει την παραγωγή των αντι-TSH-R αντισωμάτων, στη HT η διήθηση είναι εκτενής και οδηγεί στην καταστροφή των θυλακίων του αδέν και σε υποθυρεοειδισμό (12). Τα πιο συνήθη διηθητικά κύτταρα είναι τα βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα (CD4+), τα κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα (CD8+), τα Β λεμφοκύτταρα και τα μακροφάγα. Κατά την εκδήλωση της νόσου ο αριθμός των CD8+ κυττάρων στην περιφέρεια μειώνεται και συνεπώς αυξάνεται η αναλογία CD4 : CD8. Από την άλλη, οι δύο αυτοί πληθυσμοί κυττάρων συσσωρεύονται στον αδέν με τη βοήθεια χημειοκινών, μία κατηγορία κυταροκινών με την ικανότητα να κατευθύνουν τη μετακίνηση των λεμφοκυττάρων, όπως η πρωτεΐνες φλεγμονής των μακροφάγων (Macrophage Inflammation Protein – MIP) –1α (CCL3) και –β

(CCL4), η επαγόμενη από ιντερφερόνη γ (IFN-γ) πρωτεΐνη-10 (CXCL-10), -19 (CXCL19) και RANTES, αλλά και μέσω της έκφρασης των σελεκτινών και ιντεγκρινών. Αποτέλεσμα της διήθησης του αδένου είναι η μετατροπή των θυρεοειδικών κυττάρων σε αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα που φέρουν μόρια τάξης II του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) στην επιφάνειά τους, η επαγωγή απόπτωσης και η καταστροφή του αδένου (13-15).

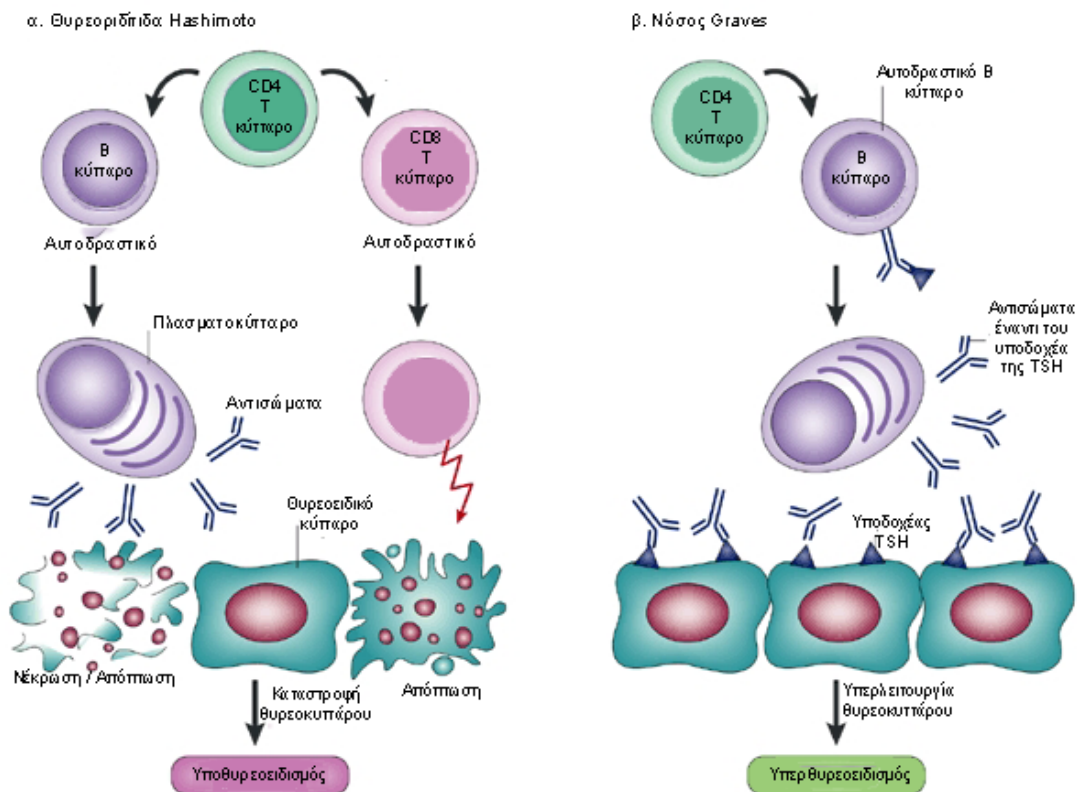
Ενώ στα πολύ αρχικά και τελικά στάδια των αυτοάνοσων θυρεοειδικών νοσημάτων ανιχνεύονται κυτταροκίνες που παράγονται από βοηθητικά T λεμφοκύτταρα τύπου 2 (T helper 2 lymphocytes - Th2) όπως ιντερλευκίνη 4 (IL-4) και 10 (IL-10), οι κυτταροκίνες που εκκρίνονται κατά τη διάρκεια των HT και GD προέρχονται από βοηθητικά T λεμφοκύτταρα τύπου 1 (Th1), όπως ιντερλευκίνη 2 (IL-2) και IFN-γ (16). Τα T λεμφοκύτταρα που συσσωρεύονται στον αδένου συμμετέχουν στην καταστροφή του είτε μέσω κυτταροτοξικών T κυττάρων, είτε μέσω της παραγωγής κυτταροκινών, οδηγώντας έτσι στην καταστροφή της δομής του και στη δυσλειτουργία του (17).

1.2.3.2 Παραγωγή αυτοαντισωμάτων

Στον ορό των ασθενών με αυτοάνοσα νοσήματα του θυρεοειδούς ανιχνεύονται αντισώματα κυρίως έναντι της TPO και του υποδοχέα της TSH, με σημαντική διαγνωστική αξία, αλλά και έναντι της Tg.

Τα αντισώματα έναντι της TPO ανιχνεύονται στα αρχικά στάδια της HT, είναι κυρίως τάξης G1 και G4, και προηγούνται της εκδήλωσης του υποθυρεοειδισμού (18). Αρχικά, παράγονται από B λεμφοκύτταρα προερχόμενα από γειτονικούς με το θυρεοειδή αδένου λεμφαδένες, και στη συνέχεια συμμετέχουν στην παραγωγή τους και τα B λεμφοκύτταρα που διηθούν τον αδένου (19). Η πλειοψηφία των ασθενών με HT διαθέτουν στον ορό τους αντισώματα έναντι της TPO με ποσοστό μεγαλύτερο του 95% (19), με το αντίστοιχο ποσοστό αυτών που φέρουν αντισώματα έναντι της Tg να ανέρχεται στο 80-90% (10), και είναι τάξης G1 και G2 (20). Στους ασθενείς με GD τα αντισώματα έναντι του υποδοχέα της TSH είναι αυτά που παίζουν πρωταγωνιστικό ρόλο στη νόσο και ανιχνεύονται σε ποσοστό 93%. Και στη νόσο αυτή παρουσιάζονται αντισώματα έναντι της Tg, που ανιχνεύονται μόνο στο 50-70% των περιπτώσεων (10). Ο ρόλος των αντισωμάτων έναντι της Tg στην παθολογία δεν έχει διευκρινιστεί, ενώ υπάρχουν ενδείξεις για

συμμετοχή τους τόσο σε στην καταστροφή των θυρεοειδικών κυττάρων μέσω επαγωγής του συστήματος του συμπληρώματος, όσο και σε καρκίνους του θυρεοειδούς (21). Αξίζει τέλος να σημειωθεί πως ενώ τα ανθρώπινα αντισώματα έναντι του υποδοχέα της TSH αντιδρούν με υποδοχείς από χοίρο, αρουραίο και ποντικό, το ίδιο δεν ισχύει για τα αντισώματα έναντι της Tg, τα οποία παρουσιάζουν μεγάλη ειδικότητα (22;23).



Εικόνα 2: Οι παθογονικοί μηχανισμοί και η κλινική εικόνα των δύο κύριων θυρεοειδικών νοσημάτων. α. Στην θυρεοειδίτιδα Hashimoto αυτοδραστικά CD4+ T λεμφοκύτταρα του θυρεοειδή αδένος προσελκύουν και παρέχουν βοήθεια σε B κύτταρα και CD8+ T λεμφοκύτταρα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή αυτοαντισωμάτων και τη σταδιακή καταστροφή των θυρεοειδικών κυττάρων από τα κυτταροτοξικά CD8+ κύτταρα. β. Στη νόσο Graves ενεργοποιημένα CD4+ T λεμφοκύτταρα παρέχουν βοήθεια σε B λεμφοκύτταρα για την έκκριση αυτοδραστικών αντισωμάτων έναντι του υποδοχέα της θυρεοειδοτρόπου ορμόνης TSH. Τα αντισώματα αυτά μιμούνται τη δράση της ορμόνης και οδηγούν σε υπερλειτουργία των θυρεοκυττάρων και υπερθυρεοειδισμό (24).

1.3 ΑΙΤΙΟΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΘΥΡΕΟΕΙΔΙΚΩΝ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ

1.3.1 Γενετικοί παράγοντες

Τα τελευταία χρόνια, μελέτες σε μονοζυγωτικούς και διζυγωτικούς διδύμους έχουν αποδώσει σαφή γενετικό έλεγχο της κληρονομικότητας των αυτοάνοσων νοσημάτων του θυρεοειδούς αδένου. Πράγματι, γενετικοί παράγοντες δείχνουν να επηρεάζουν την εκδήλωσή τους με ποσοστό 75% σε μονοζυγωτικούς διδύμους, αλλά με πολύ μικρότερο ποσοστό στους διζυγωτικούς διδύμους. Η αποτυχία όμως της πλήρους ταύτισης έκφρασης της νόσου μεταξύ των μονοζυγωτικών υποδεικνύει την ύπαρξη και άλλων παραγόντων, με σημαντικότερους τους περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως κάπνισμα, βάρος και μολύνσεις (25).

1.3.1.1 Μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας

Ο προσδιορισμός των γενετικών παραγόντων που επηρεάζουν άμεσα τα θυρεοειδικά νοσήματα έχει επιτευχθεί με τη χρήση μελετών συσχέτισης τόπων γονιδίων (linkage analysis), με τη σύγκριση συγκεκριμένων γονιδίων μαρτύρων της νόσου μεταξύ ομάδων ασθενών και υγιών ατόμων και τέλος με την ανάλυση πολυμορφισμών ενός νουκλεοτιδίου (single-nucleotide polymorphism) σε μικροσυστοιχίες (microchip) (26-29). Η πρώτη μέθοδος βασίζεται στην αρχή πως η πιθανότητα ανασυνδυασμού μεταξύ δύο γονιδιακών τόπων είναι ανάλογη της απόστασης μεταξύ τους. Παρά την μεγάλη ειδικότητα που προσφέρει η μέθοδος αυτή, δεν είναι αρκετά ευαίσθητη για τα συγκεκριμένα νοσήματα. Από την άλλη, τόσο οι συγκρίσεις ομάδων μεγάλου αριθμού ατόμων, όσο και οι αναλύσεις των πολυμορφισμών ενός νουκλεοτιδίου σε μικροσυστοιχίες έχουν προσφέρει τα μέγιστα στην ανίχνευση και συσχέτιση γονιδίων με την εκδήλωση των θυρεοειδικών νοσημάτων. Μέχρι σήμερα τα γονίδια που φαίνεται να συνεισφέρουν στην παθογένεια εμπίπτουν σε δύο κατηγορίες: γονίδια ανοσορρύθμισης – μεταξύ των οποίων τα γονίδια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (major histocompatibility complex – MHC) τα οποία στον άνθρωπο ονομάζονται αντιγόνα των ανθρώπινων λευκοκυττάρων (human leukocyte antigen – HLA), και το γονίδιο του αντιγόνου 4 των κυτταροτοξικών Τ λεμφοκυττάρων (Cytotoxic T lymphocyte antigen 4, CTLA-4) – και γονίδια άμεσα συνδεδεμένα με το θυρεοειδή αδένου, όπως

τα γονίδια της Tg και του υποδοχέα της TSH (30;31). Παρά τα πολύ σημαντικά αυτά ευρήματα, κανένα από αυτά τα γονίδια δεν είναι ικανά να αυξήσουν το ενδεχόμενο εμφάνισης τέτοιων νοσημάτων περισσότερο από 4 φορές. Είναι προφανές ότι πληθώρα γονιδιακών αλληλεπιδράσεων προκαλεί την εκδήλωση της νόσου, αλλά η επίδραση των περιβαλλοντικών παραγόντων στην γονιδιακή έκφραση είναι καθοριστική (32).

Τα γονίδια του HLA διαχωρίζονται σε τρεις τάξεις: I, II, και III. Τα HLA τάξης I κωδικοποιούνται από τα γονίδια A, B, C, εκφράζονται από όλα τα εμπύρηννα κύτταρα και παρουσιάζουν επίτοπους αντιγόνων στα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα. Τα HLA τάξης II κωδικοποιούνται από τα γονίδια DR, DP, DQ, εκφράζονται στην επιφάνεια των επαγγελματιών αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (δενδριτικά, μακροφάγα, B λεμφοκύτταρα) και παρουσιάζουν επίτοπους αντιγόνων στα βοηθητικά T λεμφοκύτταρα. Τα HLA τάξης III κωδικοποιούνται από γονίδια υπεύθυνα για την έκφραση διάφορων ανοσολογικών πρωτεϊνών, όπως τις πρωτεΐνες του συμπληρώματος (33).

Αναφορικά με τη HT, σε μελέτες Καυκάσιων παρατηρείται σε σημαντικό ποσοστό ασθενών αύξηση έκφρασης των γονιδίων DR3, DR4, DR5, DQB1*3 και DQw7 της τάξης II του HLA, ενώ σε αντίστοιχες μελέτες από πληθυσμό Ιαπώνων τα γονίδια DRB4*0101 και HLA-A2 συσχετίζονται με τη νόσο. Αντίθετα, τα γονίδια DR1 και DR8 βρέθηκαν σε μεγαλύτερο ποσοστό στους υγιείς συγκριτικά με τους ασθενείς και πιθανά να παίζουν προστατευτικό ρόλο. Συνολικά, η προσπάθεια της σύνδεσης των HLA γονιδίων με τη HT εμφανίζει αρκετές δυσκολίες λόγω της ποικιλίας των γονιδίων που κωδικοποιούν τα HLA μόρια και διαφορών ανάμεσα στα έθνη (34-37).

Στην περίπτωση της GD η αυξημένη έκφραση του γονιδίου DR3 δείχνει να είναι άμεσα συνδεδεμένη με την απόδοση ευαισθησίας στη νόσο, και σε μικρότερο βαθμό τα γονίδια DRB1*3, DQA1*05 και DQB1*02. Από την άλλη, το γονίδιο DRB1*07 κατέχει προστατευτικό ρόλο στην εκδήλωση της νόσου, όπως φαίνεται από μελέτες Καυκάσιων (38;39).

Από πρόσφατες μελέτες πολυμορφισμών γονιδίων προκύπτει ότι η μεταγραφή και μετάφραση του εξωνίου 2 του γονιδίου DRB1 παράγει πολυμορφικά αλληλία κυρίως στις θέσεις 26, 30, 70, 71 και 74, που όταν φέρουν κατάλληλα αμινοξέα

σχετίζονται με την εκδήλωση των αυτοάνοσων θυρεοειδικών νοσημάτων (40). Συγκεκριμένα, η αργινίνη στη θέση 74 δείχνει να συνεισφέρει σε πολύ μεγάλο βαθμό στην αύξηση της εκδήλωσης και των δύο νοσημάτων, μέσω της αλλαγής στη θέση πρόσδεσης πεπτιδίων που επιφέρει. Αντικατάσταση της αργινίνης στη θέση 74 με γλουταμίνη ή αλανίνη προσδίδει προστατευτικό χαρακτήρα στην εκδήλωση της GD (41;42). Αντίστοιχοι πολυμορφισμοί με προστατευτικό χαρακτήρα για τη HT δεν έχουν εντοπιστεί.

1.3.1.2 Το γονίδιο του αντιγόνου 4 των κυτταροτοξικών T-κυττάρων

Το CTLA-4 εκφράζεται στην επιφάνεια των ενεργοποιημένων T λεμφοκυττάρων και συνδεόμενο με το μόριο B7 των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων αναστέλλει την περαιτέρω ενεργοποίησή τους. Από τους κυριότερους πολυμορφισμούς που έχουν ανιχνευτεί στην αλληλουχία του γονιδίου του CTLA-4, το αλληλόμορφο CTLA-4(ATn) που περιέχει μεγάλες επαναλήψεις AT (αδενίνης – θυμίνης) μειώνει τη σταθερότητα του CTLA-4 mRNA και συνεπώς την ικανότητά του να ελέγχει τον πολλαπλασιασμό των T λεμφοκυττάρων προσδίδει τη μεγαλύτερη ευαισθησία στην εκδήλωση της HT αλλά και της νόσου Graves (43;44). Παράλληλα, σε μελέτες πολυμορφισμού ενός νουκλεοτιδίου, αλλά σε μικρό αριθμό δείγματος ατόμων, έχει βρεθεί ότι η αντικατάσταση της θρεονίνης με αλανίνη στο πεπτιδίο σήματος (signal peptide) του CTLA-4 συσχετίζεται άμεσα με τα αυτοάνοσα νοσήματα του θυρεοειδούς αδένου.

Από το σύνολο των μελετών συσχέτισης του CTLA-4 με τη HT και τη νόσο GD δε έχει διαπιστωθεί κάποιος σαφής μηχανισμός υπεύθυνος για την εκδήλωση των νοσημάτων αυτών. Μάλιστα, σε μελέτη της εκδήλωσης HT αποδείχτηκε ότι το γονίδιο του CTLA-4 δε σχετίζεται με την εκδήλωση της νόσου, αλλά με την παραγωγή αντι-θυρεοειδικών αντισωμάτων (αντι-Tg και αντι-TPO) (45-47).

1.3.1.3 Το γονίδιο της θυρεοσφαιρίνης

Το γονίδιο της Tg βρίσκεται στο τμήμα q24 του χρωμοσώματος 8 και έχει συνδεθεί με την εκδήλωση αυτοάνοσων νοσημάτων του θυρεοειδούς αδένου και με την παραγωγή αυτοαντισωμάτων (47-49). Οι πολυμορφισμοί στην έκφραση του γονιδίου όμως δείχνουν να επηρεάζουν κυρίως την εκδήλωση της HT και όχι τόσο της νόσου Graves (50). Συνολικά έχουν εντοπιστεί 14 πολυμορφισμοί ενός νουκλεοτιδίου, 10 σε εξώνια και τέσσερις σε εσώνια, που επηρεάζουν την

εκδήλωση της HT. Από αυτούς, οι πολυμορφισμοί των εξωνίων 10, 11, 12 και 33 συγκεντρώνουν το μεγαλύτερο ενδιαφέρον (51).

Πειράματα σε ανθρωποποιημένους διαγονιδιακούς ποντικούς που φέρουν μόνο τα HLA συσχέτισαν τον πολυμορφισμό του εξώνιο 33, που έχει ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση της υδροφοβικής τρυπτοφάνης με την υδρόφιλη αργινίνη, με την εκδήλωση της HT. Όταν μάλιστα ο πολυμορφισμός αυτός συνυπάρχει με τον προαναφερθέντα πολυμορφισμό της θέσης 74 του γονιδίου του HLA με αργινίνη, τότε η πιθανότητα εκδήλωσης GD αυξάνεται κατά 16.1 φορές (51;52). Γίνεται, λοιπόν, σαφές πως η αλληλεπίδραση μεταξύ γονιδίων ανοσορρύθμισης και αυτοαντιγόνων του θυρεοειδούς κατέχουν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία ευαίσθητου γενετικού υπόβαθρου. Οι διαφοροποιήσεις που έχουν εντοπιστεί στην αλληλουχία του γονιδίου της Tg των ασθενών, σε σύγκριση με αυτήν των υγιών ατόμων, μεταφράζονται σε διαφορές στην αμινοξική αλληλουχία της, οι οποίες μπορεί να αυξάνουν την ανοσογονικότητά της ή να τροποποιούν την αλληλεπίδρασή της με τα HLA μόρια τάξης II.

1.3.1.4 Το γονίδιο του υποδοχέα της θυρεοειδοτρόπου ορμόνης

Τα αντισώματα έναντι του υποδοχέα της TSH κατέχουν πρωταγωνιστικό ρόλο στη διάγνωση της νόσου του Graves. Για το λόγο αυτό το γονίδιο που κωδικοποιεί τον υποδοχέα αυτό έχει αποτελέσει αντικείμενο μελέτης σχετικά με την εκδήλωση της νόσου Graves. Το γονίδιο αυτό εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 14, τμήμα q31 και αποτελείται από 13 εξώνια (53-55). Από τις αναλύσεις πολυμορφισμών ενός νουκλεοτιδίου σε μεγάλο δείγμα από Καυκάσιους ασθενείς και υγιείς ξεχωρίζει μία μελέτη σε δείγμα 768 ατόμων από κάθε ομάδα. Από τη μελέτη αυτή έχουν βρεθεί 98 πολυμορφισμοί, με τους rs179247 (αντικατάσταση μίας γλυκίνης από αλανίνη) και rs12101255 (αντικατάσταση μίας θρεονίνης από κυστεΐνη) να παρουσιάζουν αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης νόσου GD κατά 1.5 φορές (56). Οι δύο αυτοί πολυμορφισμοί έχουν ως αποτέλεσμα την έκφραση μικρότερου σε μεγέθους mRNA της υπομονάδας A του υποδοχέα, που συνεπάγεται τη μετάφραση μικρότερων υπομονάδων A αλλά πιθανά με μεγαλύτερη συχνότητα. Η προτεινόμενη αυτή αύξηση της μετάφρασης του τμήματος αυτού συνδέεται και με την εμφάνιση των αντισωμάτων έναντι του υποδοχέα της TSH στον ορό, και συνεπώς με την εκδήλωση της νόσου Graves (57).

1.3.2 Περιβαλλοντικοί παράγοντες

1.3.2.1 Ιώδιο

Η παραγωγή των ορμονών T4 και T3 στο θυρεοειδή αδένα βασίζεται στο ιώδιο, και μείωση της πρόσληψής του από τον οργανισμό οδηγεί σε αντίστοιχη μειωμένη παραγωγή τους (58). Επιδημιολογικές μελέτες έδειξαν ότι η αύξηση της πρόσληψης ιωδίου τόσο στον πληθυσμό της Αμερικής, όσο και σε αυτόν της Ιαπωνίας, οδήγησε σε αύξηση στην καταγραφή εκδήλωσης κυρίως της αυτοάνοσης θυρεοειδίτιδας, και δευτερευόντως της νόσου GD, κατά 17 ποσοστιαίες μονάδες (59). Επιπλέον, η προσθήκη ιωδίου στη διατροφή των κατοίκων μιας περιοχής της νοτιο-δυτικής Ελλάδας αύξησε κατά τρεις φορές τη συχνότητα εμφάνισης της HT, ενώ ο περιορισμός του οδήγησε σε θεραπεία του αυτοάνοσου υποθυρεοειδισμού σε 12 από 22 ασθενείς. Όταν οι ασθενείς αυτοί κατανάλωσαν εκ νέου ιώδιο εκδήλωσαν και πάλι υποθυρεοειδισμό (60). Από τους μηχανισμούς που έχουν προταθεί στην προσπάθεια ερμηνείας των παρατηρήσεων αυτών, οι επικρατέστεροι αφορούν: 1) την αύξηση των ελευθέρων ριζών που προκαλεί το ιώδιο, οι οποίες καταστρέφουν τα θυρεοκύτταρα και αναστέλλουν την αντλία νατρίου-ιωδίου, 2) την αύξηση της ανοσογονικότητας που επάγει η ιωδίωση της Tg και 3) την τροποποίηση που προκαλεί το ιώδιο στη λειτουργία των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος (μακροφάγα, δένδριτικά, B- και T-λεμφοκύτταρα) (59;61;62).

1.3.3 Φύλο

Όπως φαίνεται από πολυάριθμες μελέτες που έχουν διεξαχθεί παγκοσμίως, οι γυναίκες παρουσιάζουν με μεγαλύτερη συχνότητα αυτοάνοσα νοσήματα θυρεοειδούς αδένος σε σχέση με τους άνδρες (63-66). Μία πιθανή εξήγηση του ευρήματος αυτού έγκειται στον εντοπισμό γονιδίων με ανοσορυθμιστικό χαρακτήρα στο X χρωμόσωμα, που συντελούν στη διατήρηση της ανοχής (67). Παράλληλα, ένας ακόμη μηχανισμός που οδηγεί σε διαταραχή της ανοχής στις γυναίκες είναι το φαινόμενο της μη τυχαίας αδρανοποίησης του X χρωμοσώματος (skewed X-chromosome inactivation – XCI). Στις γυναίκες, ένα από τα δύο X χρωμοσώματα αδρανοποιείται τυχαία, με την έννοια ότι τόσο το πατρικό όσο και το μητρικό χρωμόσωμα έχουν την ίδια πιθανότητα να αδρανοποιηθούν (50%). Διαταραχή της

αναλογίας αυτής οδηγεί σε αδυναμία παρουσίασης στο θύμο αδένα αυτοαντιγόνων που εντοπίζονται στο X χρωμόσωμα και ως εκ τούτου απώλεια ανοχής για τα αντιγόνα αυτά. Είναι χαρακτηριστικό ότι 34% των γυναικών με HT φέρουν τέτοια XCI διαταραχή, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό σε υγιείς ήταν μόλις 8% (68-70).

1.3.4 Φαρμακευτικές ουσίες

Πολλές φαρμακευτικές ουσίες έχουν ενοχοποιηθεί στην εκδήλωση αυτοάνοσων θυρεοειδικών νοσημάτων, με διαφορετικούς προτεινόμενους μηχανισμούς δράσης και με εξέχουσες τις κυτταροκίνες και ένα μονοκλωνικό αντίσωμα, το οποίο αναστέλλει τη δράση του CTLA-4.

Η ιντερφερόνη α (IFN-α) χρησιμοποιείται στη θεραπεία της ηπατίτιδας C. Κατά τη διάρκεια της θεραπείας, ή και μετά το πέρας αρκετών μηνών από την ολοκλήρωσή της, μεγάλο ποσοστό ασθενών εκδηλώνει αυτοάνοσα θυρεοειδικά νοσήματα (71;72). Παράγοντες που αυξάνουν την πιθανότητα εμφάνισης θυρεοειδικών νοσημάτων είναι το φύλο, με τις γυναίκες να κατέχουν μεγαλύτερη πιθανότητα, και η ανίχνευση αντισωμάτων έναντι της TPO πριν τη θεραπεία (72;73). Αξιοσημείωτο είναι επίσης ότι σε ποσοστό άνω του 50% τα συμπτώματα απαλείφονται με τη λήξη της θεραπείας, ενώ η νόσος παραμένει στους ασθενείς με προ-υπάρχοντα αντισώματα έναντι της TPO (74). Ο μηχανισμός με τον οποίο η IFN-α επάγει την εκδήλωση της HT και της νόσου GD είναι άγνωστος. Πιθανά συσχετίζεται με την αύξηση των Th1 κυττάρων που επάγει, την αύξηση της παραγωγή περφορίνης στα φυσικά φονικά κύτταρα (natural killer cells – NK) και την έκφραση των μορίων τάξης I του MHC στα θυρεοειδικά κύτταρα (75;76).

Η IL-2 είναι μια ακόμα κυτταροκίνη, της οποίας η θεραπευτική χρήση σε ασθενείς με μεταστατικό μελάνωμα, καρκίνο του νεφρού και λοίμωξη από τον ιό της ανοσοανεπάρκειας του ανθρώπου (human immunodeficiency virus, HIV) έχει συσχετιστεί με την εκδήλωση της HT, αφού 16% των ασθενών που τη λαμβάνουν εμφανίζει τη νόσο αυτή (77). Από την άλλη, οι ασθενείς με HIV που βρίσκονται υπό αντιρετροϊκή θεραπεία υψηλής δραστηριότητας με ταυτόχρονη χορήγηση τριών και άνω αντιρετροϊκών φαρμάκων εκδηλώνουν τη νόσο GD 16-19 μήνες μετά την έναρξη της αγωγής (78-80).

Επιπρόσθετα, υψηλό ποσοστό ασθενών που πάσχουν, είτε από μεταστατικό καρκίνο του νεφρού, είτε από μελάνωμα και έχουν λάβει το θεραπευτικό μονοκλωνικό αντίσωμα Ipilimumab (συνδέεται στο CTLA-4 και εμποδίζει τη δράση του) εκδηλώνουν ΗΤ αλλά και άλλα αυτοάνοσα νοσήματα (81).

1.3.5 Χημικές ουσίες

Ένα ευρύ φάσμα περιβαλλοντικών ρύπων έχει βρεθεί ικανό να επηρεάζει τα θυρεοειδικά κύτταρα και να προκαλεί αυτοάνοσα θυρεοειδικά νοσήματα (82). Μεταξύ αυτών είναι και οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες, όπως πολυχλωριωμένα διφαινύλια (polychlorinated biphenyls – PCB) και πολυαλογονομένα διφαινύλια (polyhalogenated biphenyls – PHB). Οι ουσίες αυτές είναι οργανικές ενώσεις που παράγονται από γαιάνθρακα και ανιχνεύονται στον αέρα και στο νερό. Η εφαρμογή τους είναι διαδεδομένη σε κόλλες, λιπαντικά, επιβραδυντικά φωτιάς και πλαστικοποιητές και η χρόνια έκθεση σε αυτά συσχετίζεται κυρίως με την εκδήλωση ΗΤ αλλά και με την παραγωγή αντιθυρεοειδικών αντισωμάτων (83).

1.3.6 Συνυπάρχουσες ασθένειες

1.3.6.1 Αυτοάνοσα νοσήματα

Η εκδήλωση ενός αυτοάνοσου νοσήματος σε ένα άτομο αυξάνει τις πιθανότητες εμφάνισης ενός δεύτερου αυτοάνοσου νοσήματος από ότι σε έναν υγιή, ενώ το ίδιο ισχύει και για τους συγγενείς του, που παρουσιάζουν αυξημένες πιθανότητες εκδήλωσης του ίδιου ή διαφορετικού αυτοάνοσου νοσήματος (43). Έτσι, οι συγγενείς ασθενών, κυρίως με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1, αλλά και με σύνδρομο Sjögren, σκλήρυνση κατά πλάκας, ιδιοπαθή φλεγμονώδη μυοπάθεια, πρωτοπαθή χολική κίρρωση (biliary cirrhosis), ρευματοειδή αρθρίτιδα και νόσο του Addison, εκδηλώνουν ΗΤ σε υψηλό ποσοστό, και νόσο GD σε πολύ χαμηλότερο (84).

1.3.6.2 Γενετικές ασθένειες

Το 15-20% των ασθενών με σύνδρομο Down (τρισωμία στο χρωμόσωμα 21) και το 15% των ασθενών με σύνδρομο Turner (μερική ή ολική έλλειψη του χρωμοσώματος X σε φαινοτυπικά θηλυκά άτομα) εκδηλώνουν ΗΤ. Επιπρόσθετα,

το 50% των ασθενών με σύνδρομο το οποίο οφείλεται σε μεταλλαγή στο γονίδιο FOXP3 και σε λανθασμένη ενεργοποίηση και πολλαπλασιασμό των Τ λεμφοκυττάρων, πάσχουν από ΗΤ (43).

1.3.6.3 Ιικές ασθένειες

Μεταξύ των ιικών μολύνσεων που έχουν μελετηθεί σε συνάρτηση με την εκδήλωση ΗΤ και νόσου GD, η ηπατίτιδα C συσχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με την εκδήλωση τέτοιων αυτοάνοσων νοσημάτων (85). Ασθενείς με ηπατίτιδα C, που δεν έχουν λάβει θεραπεία με IFN-α παρουσιάζουν αντι-θυρεοειδικά αντισώματα και δυσλειτουργία του θυρεοειδή αδένος τους σε σχέση με υγιή άτομα. Άλλες επιδημιολογικές μελέτες έδειξαν τη σχέση της ΗΤ με την ανεμοβλογιά και τη λοίμωξη από παραμυξοϊούς. Οι μηχανισμοί με τους οποίους κάποια ιική λοίμωξη μπορεί να προκαλέσει την εκδήλωση ενός αυτοάνοσου νοσήματος δεν είναι πλήρως κατανοητοί αλλά μία πιθανή εξήγηση έγκειται στην αύξηση της παραγωγής IFN-γ από τα ηπατοκύτταρα και λεμφοκύτταρα των ασθενών με ηπατίτιδα C, και την Th1 ανοσολογική απόκριση που επάγει. Άλλοι μηχανισμοί που ενδεχομένως να ευθύνονται για την παράλληλη εκδήλωση αυτοάνοσων νοσημάτων είναι η μοριακή μίμηση, όπου στην περίπτωση του ιού της ηπατίτιδας C παρατηρείται ομοιότητα με τα θυρεοειδικά αντιγόνα, αλλά και ο εκφυλισμός Τ λεμφοκυττάρων, η επέκταση επιτόπων, η απελευθέρωση περιορισμένων αντιγόνων και η γενική επαγωγή φλεγμονής στον θυρεοειδή αδένος λόγω της μόλυνσης (86-88).

1.3.6.4 Βακτηριακές λοιμώξεις

Έχει παρατηρηθεί πως οι βακτηριακές λοιμώξεις από τα *Borrelia burgdorferi* και *Yersinia enterocolitica* δίνουν συχνά το έναυσμα για την εκδήλωση αυτοάνοσων νοσημάτων του θυρεοειδή αδένος (71;89-91). Από τα αποτελέσματα των μελετών, εντοπίζονται περιοχές με ομολογία μεταξύ των θυρεοειδικών αντιγόνων και πρωτεϊνών των βακτηρίων αυτών, που μέσω του μηχανισμού της μοριακής μίμησης ενδεχομένως να ευθύνονται για παράλληλη εμφάνιση θυρεοειδικών διαταραχών. Συγκεκριμένα, βρέθηκαν ομοιότητες 16 πρωτεϊνών από τα *Borrelia* και 19 πρωτεϊνών από τα *Yersinia* βακτήρια με τμήματα του υποδοχέα της TSH, Tg και TPO. Από τις ίδιες μελέτες προέκυψε πως πεπτιδία κυρίως των *Y. enterocolitica* βακτηρίων περιέχουν πιθανά μοτίβα πρόσδεσης σε HLA-DR μόρια,

με μεγαλύτερη πιθανότητα πρόσδεσης στα μόρια DR3, DR4 και DR7. Επειδή τα μόρια DR3 και DR4 προσδίδουν ευαισθησία στην εκδήλωση αυτοάνοσων νοσημάτων του θυρεοειδούς, μία μόλυνση από *Y. enterocolitica* ενδέχεται να προκαλεί παράλληλα υπο- ή υπερθυρεοειδισμό σε άτομα με κατάλληλο γενετικό υπόβαθρο (89).

2. ΚΥΡΙΑ ΑΥΤΟΑΝΤΙΓΟΝΑ ΘΥΡΕΟΕΙΔΗ ΑΔΕΝΑ

2.1 Η ΘΥΡΕΟΣΦΑΙΡΙΝΗ ΩΣ ΑΥΤΟΑΝΤΙΓΟΝΟ

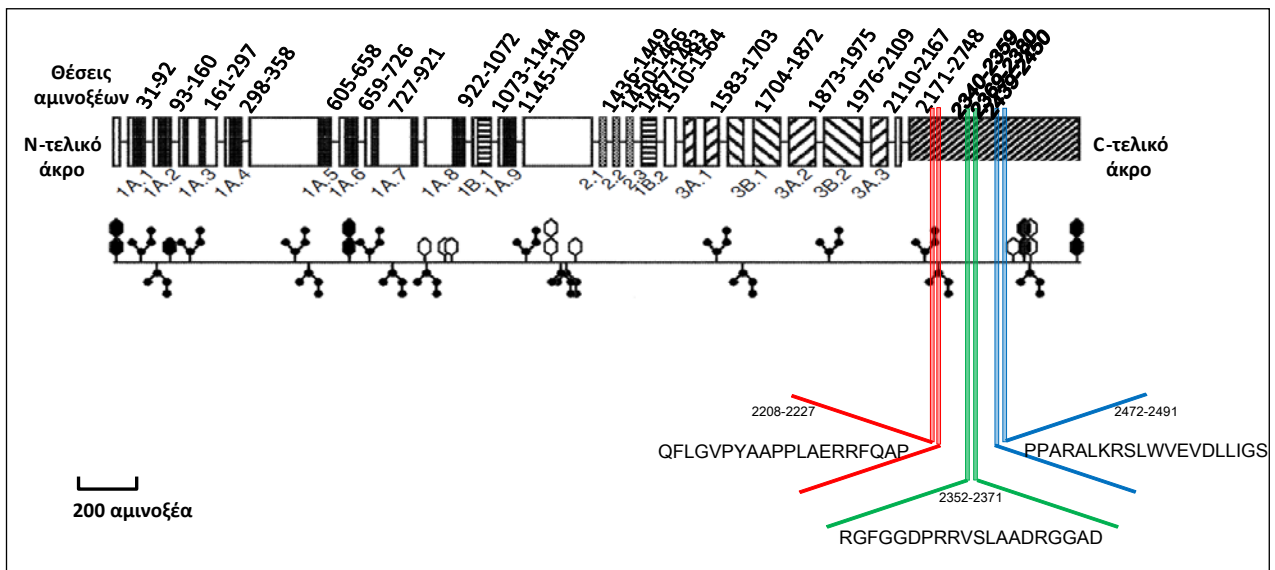
Η Tg είναι μια μεγάλου μεγέθους διμερής ιωδο-γλυκο-πρωτεΐνη με μοριακό βάρος (M.B.) 660 KDa, αποτελείται από δύο ίδιες υπομονάδες των 330 KDa και έχει συντελεστή καθίζησης 19S. Εντοπίζεται στο εσωτερικό των θυλακίων του θυρεοειδή αδένος και αποτελεί το υπόστρωμα για τη σύνθεση των ορμονών T4 και T3 (92). Στο σύνολο των 2748 αμινοξέων, η σερίνη και η γλυκίνη εντοπίζονται στην αμινοξική αλληλουχία της αλυσίδας της σε μεγάλο ποσοστό (9.7% και 7.6% αντίστοιχα), ενώ η λυσίνη σε μικρότερο (3.3%). Ενώ οι κυστεΐνες και τυροσίνες εντοπίζονται κυρίως σε συγκεκριμένες περιοχές της αλυσίδας της Tg, τα υπόλοιπα φορτισμένα αμινοξέα (ασπαρτικό οξύ, γλουταμινικό οξύ, λυσίνη, αργινίνη, ιστιδίνη), καθώς και τα υδρόφοβα (ισολευκίνη, λευκίνη, λυσίνη, ιστιδίνη, τρυπτοφάνη, αλανίνη, μεθειονίνη, βαλίνη, φαινυλαλανίνη, θρεονίνη), είναι ομοιογενώς διαμοιρασμένα σε όλη την αλυσίδα. Πιο ειδικά, στην περίπτωση των τυροσινών, από τις 66 (2.4%), μόνο το 25% είναι ιωδιωμένο και έτσι οι τυροσίνες που παίζουν ρόλο στην ορμονογένεση τελικά . Μόνο τέσσερις τυροσίνες ανά μονομερές (θέσεις 5, 2553, 2567 και 2746) παίζουν ρόλο στην ορμονογένεση. Αυτές οι τέσσερις τυροσίνες έχουν υψηλή συγγένεια για το ιώδιο.

Η αμινοξική αλληλουχία της Tg χαρακτηρίζεται από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, πλούσιες στα αμινοξέα κυστεΐνη, προλίνη και τυροσίνη. Οι αλληλουχίες αυτές κατηγοριοποιούνται σε τρεις ομάδες (1, 2, 3) και σε δυο υποομάδες (A, B), ανάλογα με τις θέσεις που καταλαμβάνουν τα παραπάνω αμινοξέα και τη σειρά εμφάνισής τους [εικόνα 3]. Οι δύο αυτές υπομονάδες ενώνονται είτε με μη ισχυρές αλληλεπιδράσεις που επιτρέπουν τη διάσπαση του διμερούς σε δύο μονομερή, είτε με ομοιοπολικούς δεσμούς, κυρίως δισουλφιδικούς, οι οποίοι επιτρέπουν τη σταθερή σύνδεση των δύο υπομονάδων. Χαρακτηριστική είναι η εικόνα που εμφανίζει η ηλεκτροφόρηση της Tg σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου με τον αποδιατακτικό παράγοντα SDS (sodium dodecyl sulfate) όπου οι δύο αυτές μορφές της (μονομερής και διμερής μορφή) είναι εμφανής. Η προσθήκη μερκαπτοαιθανόλης στο πήκτωμα, που έχει την ικανότητα να διασπά

τους δισουλφιδικούς δεσμούς, έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση όχι μόνο των μονομερών μορίων της Tg, αλλά επιπρόσθετα αποκαλύπτει μία ταινία των 270 Kda που αντιπροσωπεύει τα μονομερή της Tg από τα οποία έχει αφαιρεθεί ένα τμήμα που αποκόπτεται πολύ εύκολα και περιέχει μια θέση σχηματισμού ορμόνης T4.

Από τις 100 τυροσίνες του μορίου, μόνο το 25% είναι ιωδιωμένες, ανάλογα με την προσβασιμότητά τους, τις γειτονικές πλευρικές ομάδες τους και τη διαθεσιμότητα του ιωδίου. Η ποσότητα της Tg που σχηματίζεται από μονομερή με ομοιοπολικό δεσμό, είναι ανάλογη των ατόμων ιωδίου που περιέχει. Οι ιωδιωμένες τυροσίνες που βρίσκονται στις θέσεις ορμονογένεσης ενώνονται με άλλες ιωδιωμένες τυροσίνες (τυροσίνες-δότες) για το σχηματισμό των ορμονών.

Η ιωδιωμένη Tg αποθηκεύεται στο κολλοειδές των θυλακίων του αδένα και η απελευθέρωση των ορμονών στην κυκλοφορία λαμβάνει χώρα από τα θυροειδικά κύτταρα, έπειτα από την ενδοκυττάρωσή της και την αποκοπή των ορμονών.



Εικόνα 3: Η πολυπεπτιδική αλυσίδα της θυροσφαιρίνης. Κάθε περιοχή της που παρουσιάζει ένα μοτίβο επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών απεικονίζεται από πλαίσια με διαφορετική σκίαση: μαύρο για τύπου 1A επαναλήψεις, οριζόντιες γραμμές για τύπου 1B, τελείες για τύπου 2, πλάγιες ανιούσες γραμμές για τύπου 3A και πλάγιες κατιούσες γραμμές για τύπου 3B. Στο καρβοξυ-τελικό άκρο της με πυκνή σκίαση ανιούσων γραμμών βρίσκεται η περιοχή που είναι ομόλογη με την ακετυλοχολινεστεράση (AChE). Τέλος, στην αλληλουχία της θυροσφαιρίνης αναπαρίστανται και οι θέσεις που υπόκεινται σε μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις με τα παρακάτω σύμβολα:

☉ θέσεις γλυκοζυλίωσης, ♣ θέσεις ορμονογένεσης, ♣ θέσεις δωτών-τυροσινών

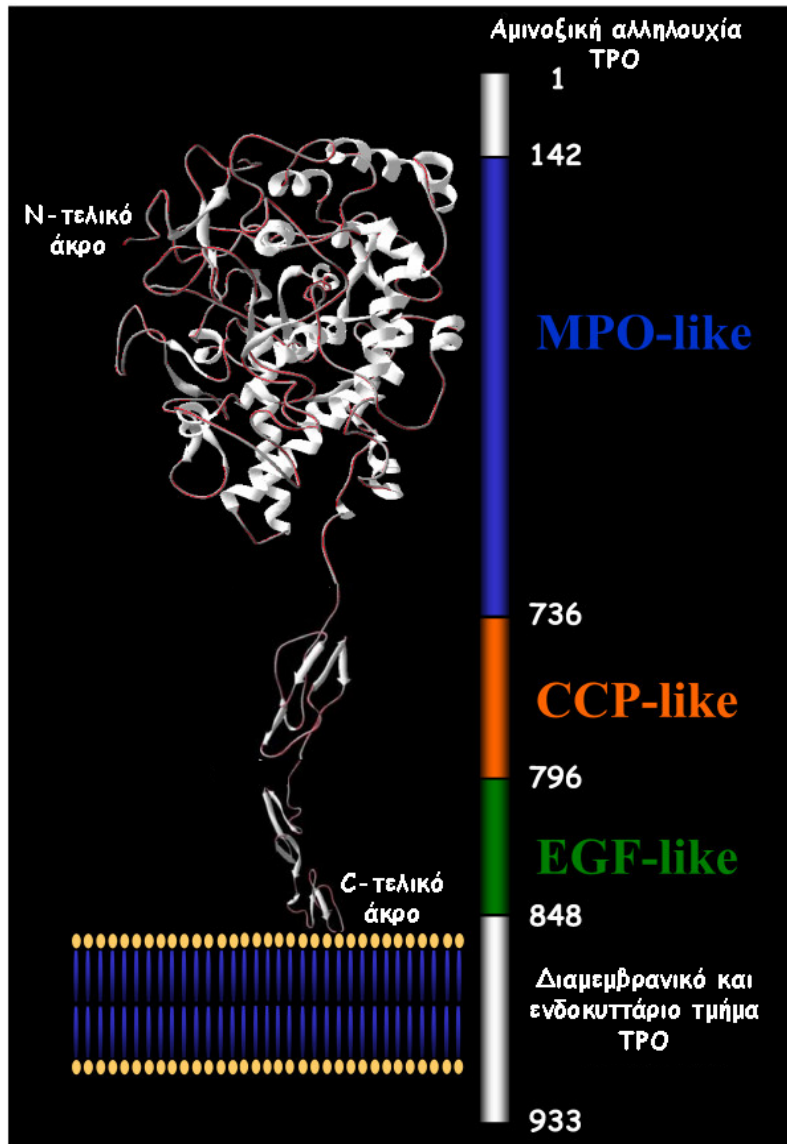
Τα κενά σύμβολα αντιπροσωπεύουν τις αντίστοιχες θέσεις στις θυροσφαιρίνες από άλλα είδη.

Με κόκκινες, πράσινες και μπλε γραμμές απεικονίζονται τα πεπτιδία της παρούσας μελέτης στην αλυσίδα της θυροσφαιρίνης, τα οποία θα αναλυθούν στο κεφάλαιο Ι-6.

2.2 Η ΘΥΡΕΟΕΙΔΙΚΗ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΑΣΗ ΩΣ ΑΥΤΟΑΝΤΙΓΟΝΟ

Η ΤΡΟ είναι μία σφαιρική, διαμεμβρανική, γλυκοζυλιωμένη αιμοπρωτεΐνη και αποτελείται από 933 αμινοξέα με Μ.Β. 107 KDa. Εντοπίζεται στην κορυφαία κυτταροπλασματική μεμβράνη των θυρεοειδικών κυττάρων και καταλύει την ιωδίωση της Τg και τη σύνδεση των ιωδιωμένων τυροσινών για το σχηματισμό των ορμονών Τ3 και Τ4 (93). Το μεγαλύτερο τμήμα της είναι εξωκυτταρικό και κατευθύνεται προς το θυλακικό αυλό, ένα μικρό της τμήμα διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη και το υπόλοιπό της μέρος (61 αμινοξέα) είναι κυτταροπλασματικό. Η εξωκυτταρική περιοχή της ΤΡΟ απαρτίζεται από 848 αμινοξέα και περιέχει πέντε πιθανές θέσεις γλυκοζυλίωσης (94).

Η υψηλή ομολογία τμημάτων της ΤΡΟ με άλλες πρωτεΐνες οδήγησε στο διαχωρισμό της σε τρεις επιμέρους υπομονάδες: τη μονάδα που προσομοιάζει τη μυελο-υπεροξειδάση (MPO-like domain), την πρωτεΐνη ελέγχου του συμπληρώματος (CCP-like domain) και τη μονάδα που έχει υψηλή ομολογία με τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (EGF-like domain) [εικόνα 4]. Με τη χρήση ενός πάνελ μονοκλωνικών αντισωμάτων η ομάδα των Ruf και Carayon κατέληξαν πως τμήματα των υπομονάδων αυτών σχηματίζουν 4 κύριες αντιγονικές περιοχές (Α, Β, C, D), με την πλειοψηφία όμως των αντισωμάτων από ασθενείς να κατευθύνονται στις περιοχές Α και Β, που χαρακτηρίστηκε ως ανοσοεπικρατής (95).



Εικόνα 4: Η τριτοταγής δομή της θυρεοειδικής υπεροξειδάσης. Στη δεξιά μεριά της εικόνας απεικονίζονται με μπλε χρώμα το τμήμα που προσομοιάζει τη μυελο-υπεροξειδάση (MPO-like), με πορτοκαλί αυτό που προσομοιάζει την πρωτεΐνη ελέγχου του συμπληρώματος (CCP-like) και τέλος με πράσινο τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (EGF-like) (93).

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΜΕΛΕΤΗΣ ΑΥΤΟΑΝΟΣΩΝ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ **ΘΥΡΕΟΕΙΔΗ ΑΔΕΝΑ**

Η μελέτη της αιτιο-παθολογίας της ΗΤ σε ασθενείς εμφανίζει αρκετές δυσκολίες, διότι αφενός τα Τ λεμφοκύτταρα που κατέχουν πρωταγωνιστικό ρόλο στην έναρξη και παθολογία της νόσου δεν απομονώνονται εύκολα από το περιφερικό αίμα και αφετέρου η αφαίρεση του αδένου για άμεση μελέτη δεν αποτελεί ενδεδειγμένη θεραπευτική πρακτική. Για το λόγο αυτό η νόσος μελετάται σε πειραματόζωα, που αποτελούν τα πειραματικά μοντέλα της νόσου. Τα μοντέλα αυτά διαφοροποιούνται ως προς τον τρόπο έκφρασης της νόσου σε αυθόρμητα (spontaneous autoimmune thyroiditis – SAT) και επαγόμενα (experimental autoimmune thyroiditis – EAT). Μάλιστα, όταν τα πειραματόζωα που εκδηλώνουν αυθόρμητα θυρεοειδίτιδα προσλάβουν ιώδιο, τότε η εμφάνιση της νόσου επιταχύνεται και με αυξημένη σοβαρότητα. Τα πειραματόζωα αυτά ανήκουν σε μία τρίτη κατηγορία πειραματικών μοντέλων της ΗΤ. Κανένα από τα υπάρχοντα πειραματικά μοντέλα δεν προσομοιάζει απόλυτα την ανθρώπινη νόσο. Για παράδειγμα, στα περισσότερα από αυτά δεν παρατηρείται υποθυρεοειδισμός. Παρόλα αυτά, η μελέτη των πειραματικών μοντέλων της ΗΤ στο σύνολό της έχει βοηθήσει ιδιαίτερα στην κατανόηση των παθογενετικών μηχανισμών της νόσου και αποτελούν πρότυπα μοντέλα για τη μελέτη όλων των οργανοειδικών κυτταρο-μεσολαβούμενων αυτοάνοσων νοσημάτων.

Αντίστοιχες απόπειρες ανάπτυξης μοντέλων μελέτης της GD παρουσιάζουν αρκετές δυσκολίες, με σημαντικότερη την αποτυχία λεμφοκυτταρικής διήθησης. Από τις πειραματικές προσεγγίσεις που έχουν αναφερθεί, ξεχωρίζει η χορήγηση κυττάρων που εκφράζουν τον TSH-R – όπως ινοβλάστες, Β λεμφοκύτταρα και δένδριτικά (96;97) – καθώς και η ενδομυϊκή ή υποδερμική ανοσοποίηση με πλασμιδιακό DNA που τον κωδικοποιεί (98;99). Παρά την ικανότητα των ανοσοποιημένων πειραματόζωων να εκφράζουν αντισώματα έναντι του μορίου ανοσοποίησης, φαίνεται πως άλλοι, κυρίως περιβαλλοντικοί παράγοντες καθορίζουν το τελικό φαινότυπο.

Στα επόμενα κεφάλαια θα ακολουθήσει αναλυτική περιγραφή των πειραματικών μοντέλων της ΗΤ, που αποτέλεσε και μέρος του αντικειμένου της διατριβής αυτής.

3.1 ΑΥΘΟΡΜΗΤΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΕΚΔΗΛΩΣΗΣ ΕΑΤ

3.1.1 Αρουραίοι Buffalo

Οι θηλυκοί αρουραίοι του στελέχους Buffalo εμφανίζουν αυθόρμητη θυρεοειδίτιδα κατά 14% στην ηλικία των 9-12 εβδομάδων, και κατά 48% στην ηλικία του ενός έτους. Η συχνότητα της νόσου μπορεί να αυξηθεί αν οι αρουραίοι υποστούν θυμεκτομή κατά τη νεογνική ηλικία, όπου οι αρουραίοι εκδηλώνουν μεγάλης έκτασης διήθηση του θυρεοειδή αδένα (100;101). Με τον τρόπο αυτό το πειραματικό μοντέλο στους αρουραίους παρουσιάζει τα περισσότερα κοινά χαρακτηριστικά με την ανθρώπινη νόσο, δηλαδή, υψηλούς τίτλους αντι-Tg αντισωμάτων, αύξηση του βάρους του αδένα και των επιπέδων της TSH στον ορό. Τα χαμηλά όμως εν γένει ποσοστά των νοσούντων ζώων δεν τα καθιστά κατάλληλα για τη μελέτη της HT και τα ζώα αυτά έχουν χρησιμοποιηθεί σε περιορισμένο αριθμό μελετών, οι οποίες διερευνούσαν το ρόλο περιβαλλοντικών ερεθισμάτων και αντι-ιδιοτυπικών αντισωμάτων στην αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα.

3.1.2 Αρουραίοι Bio-Breeding/Worcester

Ένα άλλο στέλεχος αρουραίων που εμφανίζει λεμφοκυτταρική διήθηση σε όργανα συμπεριλαμβανομένου του θυρεοειδή αδένα, είναι το Bio-Breeding/Worcester. Το στέλεχος αυτό αρουραίων εκδηλώνει αυθόρμητα κυρίως σακχαρώδη διαβήτη τύπου I (102). Το ποσοστό καθώς και η ηλικία των αρουραίων που εκδηλώνουν θυρεοειδίτιδα εξαρτάται από το υποστέλεχος που ανήκουν: το υποστέλεχος NB εκδηλώνει θυρεοειδίτιδα σε ποσοστό 100% ενώ το BE σε ποσοστό 4.9% (103). Σε κανένα υποστέλεχος δεν παρατηρείται υποθυρεοειδισμός, ενώ ανιχνεύονται αντισώματα έναντι της Tg. Το μοντέλο αυτό είναι ιδανικό για τη συσχέτιση των αυτοάνοσων και ενδοκρινολογικών παθήσεων και συγκεκριμένα του σακχαρώδη διαβήτη τύπου I και της αυτοάνοσης θυρεοειδίτιδας.

3.1.3 Όρνιθες Obese

Το παχύσαρκο στέλεχος ορνίθων προέκυψε αυθόρμητα από το στέλεχος Cornell C και αποτελείται από όρνιθες, οι οποίες είναι μικρόσωμες, διαθέτουν μεταξένια φτερά, συσσωρεύουν λίπος κοιλιακά και υποδόρια, εμφανίζουν αυξημένο βάρος,

λιπαιμία και χαμηλή γονιμότητα (104). Σε αρσενικά και θηλυκά παρατηρείται διήθηση του αδένου, η οποία αρχίζει στην ηλικία των 2-4 ημερών και φτάνει στο μέγιστο στις 4-5 εβδομάδες. Στο τελικό στάδιο της νόσου (ηλικία 6-10 εβδομάδων) παρατηρείται πλήρης καταστροφή του αδένου και ως εκ τούτου τα ζώα εκδηλώνουν υποθυρεοειδισμό. Παράλληλα ανιχνεύονται αντισώματα έναντι της Tg στην ηλικία των 3-4 εβδομάδων και οι τίτλοι τους αυξάνονται με την ηλικία (105). Τα αντισώματα όμως αυτά αναγνωρίζουν μόνο το αυτόλογο αντιγόνο και όχι την Tg από άλλα θηλαστικά (106). Σε μελέτες ανάλυσης γονιδίων βρέθηκε ότι στο παχύσαρκο στέλεχος των ορνίθων παρατηρείται αύξηση της έκφρασης των γονιδίων του MHC στην επιφάνεια των θυρεοειδικών κυττάρων, καθιστώντας έτσι το θυρεοειδή αδένου ευαίσθητο (106). Παρά τη μεγάλη ομοιότητα με την ανθρώπινο νόσο, η συμμετοχή της TPO στην παθογένεια δεν είναι διευκρινισμένη και δεν εκδηλώνεται υποθυρεοειδισμός. Η συμβολή του μοντέλου αυτού έγκειται στη συσχέτιση της υπερλιπιδαιμίας και της παχυσαρκίας με τη HT.

3.1.4 Ποντικοί NOD-H-2^{h4}

Οι ποντικοί του στελέχους NOD εκδηλώνουν αυθόρμητα διαβήτη τύπου I και ορισμένοι από αυτούς εκδηλώνουν και θυρεοειδίτιδα, ανεξαρτήτως φύλου. Ο βαθμός διήθησης του αδένου δεν αυξάνει με την ηλικία και σε κανένα από τους ποντικούς αυτούς δεν παρουσιάζεται υποθυρεοειδισμός. Από την άλλη, ανιχνεύονται αντισώματα έναντι της Tg, και οι τίτλοι τους σχετίζονται με το βαθμό διήθησης του αδένου (102;107). Το στέλεχος αυτό έχει αξιοποιηθεί για τη μελέτη της κατανόησης του ρόλου κυτταροκινών και των υποδοχέων της σταθερής περιοχής των αντισωμάτων τάξης G (Fcγ υποδοχείς) στην παθογένεια της αυτοάνοσης θυρεοειδίτιδας (108).

Τα ποντίκια του στελέχους αυτού έχουν αξιοποιηθεί για την παραγωγή ενός άλλου στελέχους, το NOD-H-2^{h4}, με τη διασταύρωσή τους με τους διαγονιδιακούς ποντικούς B10.A(4R). Οι ποντικοί του στελέχους NOD-H-2^{h4} δεν εκδηλώνουν διαβήτη, αλλά το 5% αυτών εκδηλώνει αυθόρμητα θυρεοειδίτιδα στην ηλικία των 7-10 μηνών. Τα πειραματόζωα παράγουν αυθόρμητα αντισώματα τάξης M ειδικά για την Tg αλλά όχι για την TPO και έχουν αξιοποιηθεί για τη μελέτη της επίδρασης

περιβαλλοντικών παραγόντων (πρόσληψη ιωδίου, χημικές ουσίες) στην εκδήλωση της αυτοάνοσης θυρεοειδίτιδας από γενετικά ευαίσθητα άτομα (109).

3.2 ΑΥΘΟΡΜΗΤΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΕΑΤ ΜΕ ΠΑΡΑΛΛΗΛΗ ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΙΩΔΙΟΥ

Τα πειραματόζωα τα οποία λαμβάνουν παράλληλα ιώδιο εκδηλώνουν SAT σε μεγαλύτερο ποσοστό και με αυξημένη βαρύτητα. Το ιώδιο φαίνεται να επιταχύνει την εκδήλωση της νόσου, αλλά δεν είναι ικανό να προκαλέσει υποθυρεοειδισμό στα ζώα αυτά (110;111). Η αυθόρμητη εκδήλωση αυτοάνοσης θυρεοειδίτιδας μετά από πρόσληψη ιωδίου έχει μελετηθεί εκτενώς σε ποντικούς του υποστελέχους NOD-H-2^{h4}. Οι ποντικοί αυτοί αναπτύσσουν θυρεοειδίτιδα 6-8 εβδομάδες μετά την έναρξη της κατανάλωσης νερού που περιέχει 0.05% ιωδιούχου νατρίου (NaI) και η αύξηση της ποσότητάς του συνεπάγεται την αύξηση του βάρους του αδένα, του μεγέθους των θυλακίων, της διήθησης και καταστροφής του αδένα καθώς και τον αριθμό των πειραματόζωων που νοσούν, ενώ μειώνεται το μέγεθος των θυρεοειδικών κυττάρων και ο χρόνος εμφάνισης της νόσου (112). Το ιώδιο φαίνεται να ενισχύει τη δράση της μυελοϋπεροξειδάσης των μακροφάγων, να αυξάνει τον αριθμό των κυκλοφορούντων T-κυττάρων, να επάγει την ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων και την παραγωγή ανοσοσφαιρινών από τα B λεμφοκύτταρα (113). Παρά την αυξημένη διήθηση του θυρεοειδή αδένα, τα επίπεδα της T4 στον ορό των ποντικών αυτών παραμένουν φυσιολογικά. Δύο με τέσσερις εβδομάδες μετά την έναρξη της πρόσληψης ιωδίου ανιχνεύονται αντισώματα ειδικά για την Tg αλλά όχι για την TPO, και οι τίτλοι τους παραμένουν υψηλοί μέχρι και τις 23 εβδομάδες, χωρίς όμως να συνδέονται με το βαθμό διήθησης του αδένα (109). Όπως και στα υπόλοιπα στελέχη, δεν εκδηλώνεται υποθυρεοειδισμός, ενώ τα αρσενικά φαίνεται να είναι πιο ευαίσθητα για τη νόσο από ότι τα θηλυκά (114). Συνολικά, το μοντέλο αυτό είναι κατάλληλο για τη μελέτη της επίδρασης ενός περιβαλλοντικού ερεθίσματος στην εκδήλωση αυτοάνοσης από πειραματόζωα με κατάλληλο γενετικό υπόβαθρο και έχει βοηθήσει στην κατανόηση των μηχανισμών ανάπτυξης των χρόνιων οργανοειδικών αυτοάνοσων νοσημάτων.

3.3 ΕΠΑΓΟΜΕΝΑ ΜΟΝΤΕΛΑ EAT

Η λεμφοκυτταρική EAT μπορεί να επαχθεί σε πειραματόζωα είτε με άμεση ανοσοποίηση εκχυλισμάτων θυρεοειδή αδένων, Tg, ή και πεπτίδια αυτής, είτε με παθητική μεταφορά κυττάρων λεμφαδένων πειραματόζωων που έχουν ανοσοποιηθεί με εκχύλισμα αδένων, Tg, ή πεπτίδια αυτής.

3.3.1 Άμεση ανοσοποίηση

Η επαγωγή άμεσης λεμφοκυτταρικής EAT αναφέρεται για πρώτη φορά σε κουνέλια το 1956, με τη χρήση εκχυλίσματος θυρεοειδή αδένων. Η ανοσοποίηση αυτή των πειραματόζωων είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή αντι-θυρεοειδικών αντισωμάτων και τη διήθηση του θυρεοειδή τους αδένων (6). Στη συνέχεια, και άλλες μελέτες κατέληξαν στο ίδιο αποτέλεσμα στον ποντικό, σκύλο, ινδικό χοιρίδιο, πιθηκοειδή και όρνιθες (115-118). Σε γενικές γραμμές όμως έχουν χρησιμοποιηθεί μικρόσωμα ζώα, διότι ο χειρισμός τους και η συντήρησή τους είναι ευκολότεροι. Η επαγωγή της EAT μπορεί να πραγματοποιηθεί τόσο με εκχυλίσματα θυρεοειδή αδένων όσο και με απομονωμένη Tg αυτόλογη ή ετερόλογη (119). Μέχρι σήμερα στους ποντικούς έχει με επιτυχία δοκιμαστεί η επαγωγή άμεσης EAT με την TPO, με πεπτίδια της Tg και με αποδιαταγμένη Tg (120;121). Σε κάθε περίπτωση ανιχνεύεται *in vitro* πολλαπλασιασμός των λεμφοκυττάρων, σπληνοκυττάρων ή και περιφερικών μονοκυττάρων παρουσία των αντιγόνων ανοσοποίησης, παραγωγή κυτταροκινών τύπου Th1 στον αδένων και στον ορό, διήθηση του θυρεοειδή αδένων κυρίως CD4+ CD8+ T λεμφοκύτταρα και παραγωγή αντισωμάτων έναντι των θυρεοειδικών αντιγόνων (115;122;123). Η εκδήλωση της νόσου δείχνει να είναι και εδώ, όπως και στον άνθρωπο, εξαρτώμενη από το φύλο των πειραματόζωων, με τα θηλυκά να παρουσιάζουν αυξημένη ευαισθησία. Σε μελέτη με αρσενικούς ποντικούς από τους οποίους είχαν αφαιρεθεί τα γεννητικά όργανα και είχαν χορηγηθεί οιστρογόνα διαπιστώθηκε η αύξηση της ευαισθησίας στην επαγωγή άμεσης EAT σε σχέση με τους φυσιολογικούς ποντικούς (124).

Τα στάδια ανάπτυξης της άμεσης λεμφοκυτταρικής EAT έχουν μελετηθεί αναλυτικά σε ποντικούς που έχουν ανοσοποιηθεί με Tg ποντικού και διαχωρίζονται σε:

- i. φυσιολογική φάση όπου ο θυρεοειδής αδένας διατηρεί τη δομή του (0-10 ημέρες μετά την ανοσοποίηση)
- ii. οξεία φάση με διήθηση και καταστροφή του αδένα από μονοπύρρηνα κύτταρα, μειωμένα επίπεδα T4 στον ορό και παραγωγή αντι-Tg αντισωμάτων (14-28 ημέρες μετά την ανοσοποίηση)
- iii. φάση αναγέννησης με χαμηλότερου βαθμού διήθηση του αδένα, εντοπισμό μακροφάγων στα σημεία της διήθησης, πολλαπλασιασμό θυρεοκυττάρων, αποκατάσταση των επιπέδων της T4 και σε ορισμένα πειραματόζωα υπερθυρεοειδισμός (35-42 ημέρες μετά την ανοσοποίηση)
- iv. φάση επαναφοράς με σημαντική μείωση στο μέγεθος των εστιών διήθησης, επαναφορά της δομής του αδένα, μείωση του πολλαπλασιασμού των θυρεοειδικών κυττάρων, πλήρης αποκατάσταση των επιπέδων της T4 και μείωση της παραγωγής αντι-Tg αντισωμάτων (70-100 ημέρες μετά την ανοσοποίηση) (125).

Συνοψίζοντας, η άμεση EAT προσομοιάζει την ανθρώπινη νόσο τόσο στην παραγωγή αντισωμάτων που αναγνωρίζουν την Tg ή την TPO, όσο στη διήθηση και καταστροφή του αδένα από μονοπύρρηνα κύτταρα, στον *in vitro* πολλαπλασιασμό T λεμφοκυττάρων παρουσία αυτοαντιγόνων του αδένα και στην παραγωγή κυτταροκινών τύπου Th1. Σε αντίθεση με την ανθρώπινη νόσο, η EAT υποχωρεί αυθόρμητα, τα πειραματόζωα δεν εκδηλώνουν υποθυρεοειδισμό και δεν παρατηρείται σημαντική καταστροφή των θυρεοκυττάρων (126). Με τη χρήση του μοντέλου αυτού έχουν προσδιοριστεί B- και T-επίτοποι της Tg, μηχανισμοί ανοχής, ο ρόλος του ιωδίου στη νόσο καθώς και τα γονίδια που προσδίδουν ευαισθησία στην εκδήλωση της αυτοάνοσης θυρεοειδίτιδας (127-130). Η ανάλυση των γονιδίων με τη βοήθεια διαγονιδιακών ποντικών που φέρουν μόρια HLA έδειξε ότι το μόριο DR3 προσδίδει ευαισθησία στους ποντικούς στην επαγωγή EAT (131), τα DR2, DR4 και DQ6 ανθεκτικότητα, ενώ το μόριο DQ8 εμφανίζει ενδιάμεσης βαρύτητας EAT μόνο μετά από ανοσοποίηση με ανθρώπινη Tg και όχι με την Tg ποντικού (132). Παράλληλα, η παρουσία του DQ6 σε διαγονιδιακούς ποντικούς που φέρουν το DQ8 δεν έχει καμία επίδραση στην εκδήλωση της θυρεοειδίτιδας (131) και η παρουσία του DQ8 σε ποντικούς που εκφράζουν το DR3 φαίνεται να έχει προστατευτικό ρόλο (133).

3.3.2 Παθητική μεταφορά

Η επαγωγή παθητικής EAT σε πειραματόζωα μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα είτε την εκδήλωση λεμφοκυτταρικής EAT, είτε την εκδήλωση κοκκιωματώδους EAT.

Το μοντέλο της παθητικής EAT δημιουργήθηκε με τη ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση κυττάρων λεμφαδένων πειραματόζωων ανοσοποιημένων με εκχύλισμα αδένων και ανοσοενισχυτικό (πειραματόζωα-δότες) σε υγιή πειραματόζωα-δέκτες. Με τον τρόπο αυτό, αρουραίοι, ινδικά χοιρίδια και κουνέλια, εκδήλωσαν παθητική λεμφοκυτταρική EAT (134-137). Η χορήγηση αντι-ορού, ο οποίος περιείχε αντισώματα ειδικά για τα θυρεοειδικά αντιγόνα δεν είχε τα αντίστοιχα αποτελέσματα. Μόνο η συνδυαστική χορήγηση αντι-ορού και κυττάρων λεμφαδένων, *in vivo* ενεργοποιημένων με θυρεοειδικά αντιγόνα, σε πειραματόζωα-δέκτες είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση τόσο της συχνότητας εμφάνισης της νόσου, όσο και του βαθμού διήθησης στο θυρεοειδή αδένους τους, σε σχέση με τη χορήγηση μόνο κυττάρων λεμφαδένων, με χαμηλότερη όμως βαρύτητα συγκρινόμενη με την άμεση EAT (138). Όταν όμως τα *in vivo* ενεργοποιημένα κύτταρα των λεμφαδένων ή του σπλήνα καλλιεργηθούν *in vitro* παρουσία της Tg τότε αυξάνεται τόσο ο αριθμός των ζώων που νοσούν όσο και ο βαθμός διήθησης του θυρεοειδή αδένους τους, ακόμα και με χορήγηση μικρότερου αριθμού κυττάρων. Επιπλέον, με αυτή την πειραματική διαδικασία επάγεται παθητική λεμφοκυτταρική EAT και σε ποντικούς (139).

Συνολικά, η παθητική λεμφοκυτταρική EAT μπορεί να επαχθεί με επιτυχία με την *in vivo* και *in vitro* ενεργοποίηση των χορηγούμενων λεμφοκυττάρων με θυρεοειδικά αντιγόνα, κυρίως Tg και τη μετέπειτα χορήγηση των ζωντανών αυτών κυττάρων σε πειραματόζωα-δέκτες του ίδιου στελέχους. Οι δέκτες εκδηλώνουν διήθηση του θυρεοειδή αδένους τους 4 ημέρες μετά τη χορήγηση των ενεργοποιημένων κυττάρων και φτάνει στο μέγιστο στις 18 ημέρες. Σε σύγκριση με την άμεση λεμφοκυτταρική EAT, παρατηρείται ίδιος και υψηλότερος βαθμός διήθησης του αδένου, σε ίδιο ή και μεγαλύτερο αριθμό πειραματόζωων, με κοινή ιστολογική εικόνα του αδένου, δίχως όμως την παραγωγή αντι-θυρεοειδικών αντισωμάτων (140).

Σε μελέτες επαγωγής λεμφοκυτταρικής παθητικής EAT, τα *in vivo* ενεργοποιημένα T και B λεμφοκύτταρα απενεργοποιήθηκαν σε *in vitro* καλλιέργεια με τη χρήση αντισώματος που αναγνώριζε τον υποδοχέα της IL-2. Στόχος των μελετών αυτών

ήταν η διερεύνηση του ρόλου διαφορετικών κυτταρικών υποπληθυσμών στην εκδήλωση της νόσου (141;142). Η χορήγηση των κυττάρων αυτών σε ποντικούς-δέκτες είχε ως αποτέλεσμα την εκδήλωση διήθησης ινώδους μορφής στο θυρεοειδή αδένα τους που ονομάστηκε παθητική κοκκιωματώδης EAT (143). Η καλλιέργεια των κυττάρων με αντίσωμα που αναγνωρίζει την IL-2, την IFN- γ , ή με συνδυασμό IL-12 με αντίσωμα που αναγνωρίζει τον υποδοχέα της IL-2, είχε το ίδιο αποτέλεσμα, τροποποιώντας τα χορηγούμενα κύτταρα με τέτοιο τρόπο που δεν επηρέαζε τους ανοσολογικούς μηχανισμών των ποντικών-δεκτών (144).

Οι δέκτες τέτοιων τροποποιημένων κυττάρων εκδηλώνουν διήθηση του θυρεοειδή αδένα τους 7 ημέρες αργότερα, η οποία φτάνει στη μέγιστη έκτασή της 10-21 ημέρες ανάλογα με το στέλεχος των ποντικών. Επίσης παρατηρείται υψηλός βαθμός διήθησης που οδηγεί σε σχεδόν πλήρη καταστροφή του αδένα. Η ίνωση που δημιουργείται εμφανίζεται μετά τις 21 ημέρες από τη χορήγηση των κυττάρων και αποτελείται από κολλαγόνο και μυο-ινοβλάστες (143;145;146). Το μοντέλο αυτό διαφοροποιείται από τα υπόλοιπα μοντέλα EAT, διότι ανιχνεύεται εκτεταμένη απόπτωση των θυρεοειδικών κυττάρων (145). Επιπλέον, στους ποντικούς με μεγάλη διήθηση ανιχνεύονται η ορμόνη T4, σε χαμηλά όμως επίπεδα, καθώς και αντισώματα έναντι της Tg με μέγιστο τίτλο στις 19-21 ημέρες μετά την επαγωγή της νόσου. Τα αντισώματα αυτά, όπως και τα B λεμφοκύτταρα, δε συμμετέχουν στην εκδήλωση της νόσου, σε αντίθεση με τα CD4+ T λεμφοκύτταρα (143;145). Συνολικά, το μοντέλο αυτό διαθέτει αρκετά κοινά χαρακτηριστικά με την HT, με σημαντικότερο την εκδήλωση υποθυρεοειδισμού, διαφέρει όμως στην ιστολογική εικόνα του αδένα. Η παθητική κοκκιωματώδης EAT έχει χρησιμοποιηθεί κυρίως για τη μελέτη του ρόλου της απόπτωσης στην εκδήλωση της αυτοάνοσης θυρεοειδίτιδας.

3.4 ΕΠΑΓΩΓΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΑΥΤΟΑΝΟΣΗΣ ΘΥΡΕΟΕΙΔΙΤΙΔΑΣ ΜΕ ΘΥΡΕΟΣΦΑΙΡΙΝΗ ΣΕ ΠΟΝΤΙΚΟΥΣ

3.4.1 Στάδια επαγωγής EAT

Η επαγωγή της EAT, είτε άμεση είτε με παθητική μεταφορά, προκαλείται με την αρχική ανοσοποίηση των πειραματόζωνων ή των πειραματόζωνων-δοτών με Tg και

ανοσοενισχυτικό. Όλοι οι ποντικοί εκδηλώνουν λεμφοκυτταρική EAT όταν ανοσοποιηθούν με Tg και ανοσοενισχυτικό, με διαφορετική όμως βαρύτητα. EAT μπορεί να εκφραστεί και δίχως την ταυτόχρονη χορήγηση ανοσοενισχυτικού, μόνο όμως σε ορισμένα στελέχη και έπειτα από επαναλαμβανόμενες δόσεις ομόλογης ή ετερόλογης Tg (147). Για την επαγωγή της EAT χρησιμοποιούνται συνήθως τα ανοσοενισχυτικά πλήρες έκδοχο του Freund (Complete Freund's Adjuvant - CFA) και ο λιποπολυσακχαρίτης του βακτηρίου *Salmonella enteritidis* (Lipopolysaccharitis - LPS) (148;149).

3.4.1.1 Επιλογή ανοσοενισχυτικού

Το CFA περιέχει απενεργοποιημένα βακτήρια του είδους *Mycobacterium tuberculosis*, λάδι παραφίνης και έναν γαλακτωματοποιητή και επιδρά κυρίως στα T λεμφοκύτταρα και στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Όλα τα συστατικά του συμμετέχουν στην ενίσχυση της δράσης του, που έχει ως αποτέλεσμα την επιμήκυνση του χρόνου παρουσίας του αντιγόνου στο σημείο της ανοσοποίησης, την αργή απελευθέρωση του αντιγόνου, την επαγωγή ωρίμανσης καθώς και την αύξηση της φαγοκυττάρωσης και πινοκυττάρωσης των δενδριτικών κυττάρων, την παραγωγή κυτταροκινών TNF- α , IFN- γ , IL-12 και IL-6 και χημειοκινών, την ενεργοποίηση T λεμφοκυττάρων ειδικών για συστατικά του μυκοβακτηριδίου και την πολυκλωνική διέγερση λεμφοκυττάρων (148) .

Το LPS αποτελεί συστατικό του τοιχώματος των Gram-αρνητικών βακτηρίων και αποτελεί ένα μιτογόνο των B λεμφοκυττάρων, το οποίο επάγει την παραγωγή αντισωμάτων τάξης M και G, την αλλαγή τάξης των αντισωμάτων από M σε G και την παραγωγή των κυτταροκινών IL-12 και IFN- γ από τα δενδριτικά κύτταρα. Η δράση του ως ανοσοενισχυτικό έγκειται στην ενίσχυση της ανοσογονικότητας των αυτοαντιγόνων και στην άμεση αλληλεπίδραση με το όργανο-στόχο. Στην περίπτωση του θυρεοειδή αδένος, επάγει την παραγωγή παραγόντων από τα θυρεοειδικά κύτταρα, οι οποίοι προσελκύουν τα T λεμφοκύτταρα και ενισχύουν τη διήθησή του (150-152).

Για ορισμένα στελέχη ποντικών, το CFA είναι πιο αποτελεσματικό ανοσοενισχυτικό για την επαγωγή EAT από ότι το LPS, όμως σε κανένα στέλεχος δεν εκδηλώνεται EAT μετά από ανοσοποίηση μόνο με CFA ή LPS, ενώ η χορήγηση Tg με το ατελές έκδοχο του Freund (Incomplete Freund's Adjuvant - IFA), τα άλατα αλουμινίου, το

πυρίτιο, το πολυμερές ριβονουκλεοτιδίων αδενίνης-ουρακίλης (A-U), το μπεντονίτη (bentonite) και το λάδι σιλικόνης δεν καταλήγει στην εκδήλωση EAT, αλλά μόνο στην παραγωγή αντι-Tg αντισωμάτων (153).

3.4.1.2 Προέλευση θυρεοσφαιρίνης

Οι Tg όλων των ζωικών ειδών που έχουν δοκιμαστεί (ποντικός, χοίρος, άνθρωπος, βοοειδή, αρουραίος) μπορούν να επάγουν άμεση EAT σε ποντικούς μετά από χορήγησή τους με ανοσοενισχυτικό, η Tg όμως που προέρχεται από ποντικούς συγκεκριμένων στελεχών επάγει μεγαλύτερης βαρύτητας EAT από ότι η Tg άλλων στελεχών (154). Η βαρύτητα της EAT καθώς και η παραγωγή των αντι-Tg αντισωμάτων επηρεάζεται και από την ποσότητα της θυρεοσφαιρίνης που χορηγείται, η οποία αυξάνεται με τη αύξηση της χορηγούμενης ποσότητας (155). Η ελάχιστη ποσότητα ικανή να προκαλέσει EAT και παραγωγή αντι-Tg αντισωμάτων είναι τα 5 µg και η μέγιστη τα 200 µg. Η χορήγηση μεγαλύτερης ποσότητας έχει ως αποτέλεσμα χαμηλότερου βαθμού διήθησης ή καθόλου. Το ίδιο ισχύει και για την παραγωγή αντι-Tg αντισωμάτων (156).

3.4.1.3 Επιλογή σημείου ανοσοποίησης και ηλικίας πειραματόζωων

Άλλοι παράγοντες που παίζουν ρόλο στην επαγωγή τόσο της άμεσης όσο και της παθητικής λεμφοκυτταρικής EAT είναι η ηλικία καθώς και το σημείο ανοσοποίησης. Η επαγωγή άμεσης EAT πραγματοποιείται συνήθως σε ποντικούς ηλικίας 6-12 εβδομάδων και η ανοσοποίηση μεγαλύτερης ηλικίας ποντικών (6-9 μηνών) με Tg και CFA οδηγεί σε χαμηλότερο βαθμό διήθησης του θυρεοειδή αδένα και τίτλο αντι-Tg αντισωμάτων (157). Ποντικοί ηλικίας 12-20 μηνών δεν εκδηλώνουν άμεση EAT. Παράλληλα, έχει δειχθεί ότι η υποδόρια ανοσοποίηση στη βάση της ουράς ή στη ράχη των ποντικών με Tg ποντικού δίνει υψηλότερους τίτλους αντι-Tg αντισωμάτων και υψηλότερο βαθμό διήθησης σε σχέση με την αντίστοιχη ανοσοποίηση στα πέλματα των ποντικών (122). Στην περίπτωση της παθητικής EAT σπληνοκύτταρα ποντικών ανεξαρτήτου ηλικίας μπορούν να διηθήσουν τον αδένα των ποντικών-δεκτών αλλά εκείνα των νεαρότερων ποντικών προκαλούν διήθηση μεγαλύτερης έκτασης (158).

3.4.1.4 Ενεργοποίηση T-λεμφοκυττάρων

Η ανοσοποίηση των πειραματόζωων έχει ως αποτέλεσμα την πρόσληψη της Tg από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και την παρουσίαση επιτόπων στους

πλησιέστερους λεμφαδένες του σημείου ανοσοποίησης ή στο σπλήνα. Αποτέλεσμα της παρουσίασης αυτής είναι η ενεργοποίηση και ο πολλαπλασιασμός αυτοδραστικών T λεμφοκυττάρων, βοηθητικά και κυτταροτοξικά, τα οποία είτε εγκαταλείπουν τους λεμφαδένες και το σπλήνα και κατευθύνονται στο θυρεοειδή αδένες (άμεση λεμφοκυτταρική EAT), είτε απομονώνονται, καλλιεργούνται *in vitro* παρουσία Tg και χορηγούνται σε ποντικούς-δέκτες για την επαγωγή παθητικής EAT (156).

Μέσω του κλασσικού πρωτόκολλου μέτρησης πολλαπλασιασμού κυττάρων με χρήση ραδιενεργών βάσεων του DNA βρέθηκε ότι τα βοηθητικά CD4+ T κύτταρα ενεργοποιούνται τρεις μέρες μετά την ανοσοποίηση ποντικών με Tg και CFA και εντοπίζονται στους λεμφαδένες και στο σπλήνα. Τα ενεργοποιημένα αυτά κύτταρα πολλαπλασιάζονται *in vitro* παρουσία του αντιγόνου ανοσοποίησης και όχι παρουσία άλλων αντιγόνων. Εξάλειψη των CD4+ T κυττάρων ή των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων έχει ως αποτέλεσμα το μη πολλαπλασιασμό (158;159). Ο *in vitro* πολλαπλασιασμός των κυττάρων αυτών είναι μέγιστος 8-14 ημέρες μετά την ανοσοποίηση και παραμένει σε υψηλά επίπεδα μέχρι και 21-28 ημέρες μετά την ανοσοποίηση. Επιπλέον, είναι απολύτως ειδικά για το αντιγόνο ανοσοποίησης γιατί δεν παρατηρείται πολλαπλασιασμός παρουσία άλλων αντιγόνων. Τα κύτταρα των λεμφαδένων ή του σπλήνα, τα οποία δεν πολλαπλασιάζονται *in vitro*, δεν μπορούν να επάγουν παθητική EAT (156).

Τα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα (CD8+T-κύτταρα) εκκρίνουν IFN-γ αλλά δεν πολλαπλασιάζονται *in vitro*, πιθανά γιατί εκφράζουν στην επιφάνειά τους πολύ χαμηλά επίπεδα του υποδοχέα της IL-2. Η ειδικότητά τους όμως έναντι της Tg είναι απαραίτητη για την επίτευξη της λύσης των θυρεοειδικών κυττάρων, αφού κυτταροτοξικά T-κύτταρα, τα οποία αναγνωρίζουν αλβουμίνη δεν μπορούν να προκαλέσουν λύση (160). Τα κύτταρα αυτά απομονώνονται από τα πειραματόζωα και καλλιεργούνται για πέντε με έξι ημέρες *in vitro* παρουσία της Tg και η κυτταροτοξική τους δράση ανιχνεύεται βάσει της ικανότητά τους να προκαλούν λύση σε θυρεοκύτταρα ή σε κύτταρα λεμφώματος, τα οποία περιέχουν, είτε ραδιενεργό χρώμιο, είτε ραδιενεργό ίνδιο. Με τον τρόπο αυτό ανιχνεύθηκαν ενεργοποιημένα CD8+T-κύτταρα στους λεμφαδένες ποντικών 12 ημέρες μετά την ανοσοποίησή τους με Tg (161).

3.4.1.5 Διήθηση θυρεοειδή αδένος

Ο θυρεοειδής αδένος διηθείται από CD4+, CD8+ T λεμφοκύτταρα, B λεμφοκύτταρα και μακροφάγα. Τα CD4+ και CD8+ T λεμφοκύτταρα εκφράζουν στην επιφάνειά τους τον υποδοχέα της IL2 και τον επιφανειακό δείκτη CD44. Τα περισσότερα CD8+ T λεμφοκύτταρα και ένα χαμηλό ποσοστό CD4+ T λεμφοκυττάρων εκφράζουν επιπλέον τα μόρια ICAM+, LFA-1+ και CD45RB+ (146). Ο αδένος διηθείται κυρίως από τα T λεμφοκύτταρα, ενώ τα B λεμφοκύτταρα και τα μακροφάγα αποτελούν ένα πολύ χαμηλό ποσοστό. Η διήθηση έχει ως αποτέλεσμα τη μετατροπή των θυρεοκυττάρων σε αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα-«επαγγελματίες» και την έκφραση μορίων τάξης II του MHC στην επιφάνειά τους. Παράλληλα, στα πρώτα στάδια αυξάνονται τα επίπεδα των αντισωμάτων τάξης M, στα επόμενα στάδια τα αντισώματα τάξης G, ενώ τα αντισώματα τάξης A παραμένουν σε χαμηλά επίπεδα (162;163).

Σημαντικό ρόλο στη διήθηση παίζουν οι χημειοκίνες, πρωτεΐνες χαμηλού M.W. που προσελκύουν τα ειδικά για την Tg λεμφοκύτταρα στο θυρεοειδή αδένος. Αρχικά ανιχνεύονται οι πρωτεΐνες RANTES (regulated on activation normal T-cell expressed and secreted protein), που προσελκύει τα ειδικά για την Tg παθογονικά T λεμφοκύτταρα, και η πρωτεΐνη χημειοτακτισμού των μονοκυττάρων 1 (monocyte chemotactic protein-1, MCP-1), η οποία προσελκύει τα ειδικά για την Tg ρυθμιστικά T λεμφοκύτταρα (164).

Κατά την εξέλιξη της EAT στον ποντικό παρατηρείται διαφοροποίηση των T λεμφοκυτταρικών κλώνων από τους οποίους διηθείται ο αδένος, ανάλογα με το στάδιο της νόσου. Στα πρώτα στάδια τα διηθητικά T λεμφοκύτταρα φέρουν TCR που κωδικοποιούνται από τα γονίδια Vβ4, 11 και 14, ενώ σε προχωρημένα στάδια της νόσου από τα γονίδια Vβ1, 2, 4, 7, 8, 11, 13, 14 και 15 (165-167). Φαίνεται πως οι κλώνοι που ανιχνεύονται στα τελευταία στάδια της νόσου αναγνωρίζουν κρυπτικούς επιτόπους της Tg, διαφορετικούς από εκείνους που αναγνώριζαν τα διηθητικά T λεμφοκύτταρα στα πρώτα στάδια, ή αντιγόνα διαφορετικά της Tg. Η ενεργοποίηση T-κλώνων ειδικών έναντι κρυπτικών επιτόπων της Tg πραγματοποιείται μέσω του μηχανισμού επέκτασης επιτόπων, όπου λόγω αύξησης της συγκέντρωσης των διαθέσιμων θυρεοειδικών αντιγόνων στη διηθημένη περιοχή του θυρεοειδή αδένος και λόγω δημιουργίας συμπλόκων της Tg

με τα αντι-Tg αντισώματα που παράγονται κατά την ανάπτυξη της νόσου, παρουσιάζονται κρυπτικοί επίτοποι της Tg από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Από την άλλη η ενεργοποίηση T-κλώνων που αναγνωρίζουν διαφορετικά αντιγόνα πραγματοποιείται κυρίως μέσω μη ειδικών μηχανισμών που περιλαμβάνουν τη διαταραχή των επιπέδων των κυτταροκινών στον αδένα. Αποτέλεσμα της διαταραχής αυτής είναι η μη ειδική ενεργοποίηση T λεμφοκυττάρων και ο χημειοτακτισμός αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων που παρουσιάζουν αντιγόνα διαφορετικά από την Tg (168).

3.4.2 Παράγοντες που συμμετέχουν στην παθογένεια της EAT

3.4.2.1 Κυτταροκίνες

Οι κυτταροκίνες που παράγονται κατά την ανάπτυξη της EAT είναι τύπου Th1, κυρίως η IFN- γ , η IL-12, που επάγει τη μετατροπή των T-κυττάρων σε Th1 και ο παράγοντας ανάπτυξης αποικιών κοκκιωδών μακροφάγων (granulocyte macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) (169).

Η IFN- γ παράγεται από τα ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα και τα NK κύτταρα. Οι κύριες δράσεις της έγκεινται στην ενεργοποίηση των μονοκύτταρων φαγοκυττάρων, στην επαγωγή της έκφρασης των μορίων τάξης I και II του MHC, στην επαγωγή ωρίμανσης των κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων και στη ρύθμιση της παραγωγής των ανοσοσφαιρινών από τα B λεμφοκύτταρα. Σε πειράματα με ποντικούς στους οποίους έχει χορηγηθεί ενδοθυρεοειδικά IFN- γ παρατηρείται λεμφοκυτταρική διήθηση του θυρεοειδή αδένα τους χωρίς να έχει προηγηθεί ανοσοποίηση με Tg (170). Επιπρόσθετα, η δράση της IFN- γ διαφοροποιείται και στα διαφορετικά στάδια ανάπτυξης της νόσου, αφού η χορήγηση αντισώματος αντι-IFN- γ σε ποντικούς κατά τη διαδικασία ανάπτυξης της άμεσης EAT οδηγεί σε επιδείνωση της νόσου, ενώ σε ποντικούς με εκδηλωμένη νόσο παρατηρείται το αντίθετο, με μείωση των ειδικών για την Tg CD8+T-κυττάρων, το βαθμό διήθησης του αδένα και τον τίτλο των αντι-Tg αντισωμάτων (171). Από τα παραπάνω φαίνεται ότι η IFN- γ κατέχει ρυθμιστικό ρόλο κατά την έναρξη της νόσου και ανασταλτικό μετά την εκδήλωση. Αντίστοιχες μελέτες σε γενετικά τροποποιημένους ποντικούς που δεν εκφράζουν το γονίδιο του υποδοχέα της IFN- γ , και συνεπώς η δράση της αναστέλλεται, οδήγησαν σε εκδήλωση άμεσης EAT σε συντομότερο

χρονικό διάστημα (19 ημέρες, σε αντίθεση με τους φυσιολογικούς που νοσούν στις 22 ημέρες), με ταχύτερη διήθηση του αδένου, καθώς και με συντομότερη υποχώρηση των συμπτωμάτων. Επίσης, ανιχνεύονται λιγότερα αντι-Tg αντισώματα και μειωμένη *in vitro* ικανότητα πολλαπλασιασμού και κυτταροτοξική δράση των σπληνοκυττάρων παρουσία Tg, σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς ποντικούς (170).

Η IL-12 παράγεται από τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα και ο ρόλος της είναι η ενεργοποίηση των NK κυττάρων και η επαγωγή της διαφοροποίησης των T κυττάρων σε Th1. Και στην περίπτωση της IL-12 παρατηρείται διαφοροποίηση του ρόλου της στα διαφορετικά στάδια της EAT, κατέχοντας παθογενετικό ρόλο στην έναρξη και ρυθμιστικό σε ήδη εκδηλωμένη νόσο. Σε πειράματα με ποντικούς στα πρώτα στάδια νόσου, χορηγώντας αντι-IL12 αντισώματος διαπιστώθηκε μείωση της έκτασης διήθησης του θυρεοειδή αδένου. Αντίθετα, η χορήγηση IL-12 σε ποντικούς με EAT μειώνει το βαθμό διήθησης του θυρεοειδή αδένου τους (172;173). Τέλος, ο GM-CSF παράγεται από τα μακροφάγα και τα T λεμφοκύτταρα και εμπλέκεται στην ενεργοποίηση των δενδριτικών κυττάρων αυξάνοντας τον αριθμό τους. Ο ρόλος του στην EAT είναι προστατευτικός, καθώς χορήγησή του σε ποντικούς κατά τη διάρκεια επαγωγής άμεσης EAT αποτρέπει την εκδήλωση της νόσου. Τα δενδριτικά κύτταρα που παράγονται μετατρέπουν τα ειδικά για την Tg περιφερικά T λεμφοκύτταρα σε ρυθμιστικά T λεμφοκύτταρα, τα οποία στη συνέχεια αναστέλλουν τη δράση των αυτοδραστικών T λεμφοκυττάρων, εκκρίνοντας IL-10 (33;174).

3.4.2.2 T-λεμφοκύτταρα

Η ικανότητα των T λεμφοκυττάρων από ποντικούς-δότες να επάγουν παθητική EAT σε ποντικούς-δέκτες, καθώς και η αδυναμία αθυμικών ποντικών (*nude mice*) που διαθέτουν μόνο B λεμφοκύτταρα να εκδηλώσουν EAT μετά από ανοσοποίηση με εκχύλισμα θυρεοειδή αδένου και ανοσοενισχυτικό, απέδειξε ότι τα T λεμφοκύτταρα ήταν υπεύθυνα για τη νόσο (175;176). Τα κύτταρα αυτά είναι τα βοηθητικά, τα κυτταροτοξικά και τα ρυθμιστικά(177;178) .

Τα T βοηθητικά λεμφοκύτταρα κατέχουν καθοριστικό ρόλο στην εκδήλωση της EAT. Σε πειράματα εξάλειψής τους πριν και κατά τη διάρκεια εκδήλωσης της EAT με τη χορήγηση αντισώματος που αναγνωρίζει τα CD4+ T λεμφοκύτταρα σε

ποντικούς παρατηρήθηκε αναστολή της παραγωγής αντι-Tg αντισωμάτων και της διήθησης στο θυρεοειδή αδένα, ενώ η χορήγηση του αντισώματος αυτού μετά την εκδήλωση EAT οδηγεί σε μείωση των τίτλων των αντι-Tg αντισωμάτων καθώς και του βαθμού διήθησης του αδένα. Αντίστοιχα ήταν και τα ευρήματα στην περίπτωση της επαγωγής παθητικής EAT. Ο κύριος ρόλος των βοηθητικών κυττάρων στη παθογένεια της νόσου αφορά στη λύση των θυρεοκυττάρων, μέσω των παραγόμενων κυτταροκινών, και στην παροχή βοήθειας σε B και κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα (177;179).

Τα κυτταροτοξικά T-κύτταρα είναι καθοριστικά στο βαθμό διήθησης του θυρεοειδή αδένα και όχι στην εκδήλωση της EAT. Η χορήγηση αντισώματος, το οποίο εξαλείφει *in vivo* τα CD8+ T λεμφοκύτταρα, σε ποντικούς πριν ή και κατά τη διάρκεια της επαγωγής άμεσης EAT δεν επηρεάζει τον τίτλο των παραγόμενων αντι-Tg αντισωμάτων και το ποσοστό των πειραματόζων που νοσούν, αλλά μειώνει το βαθμό διήθησης του αδένα τους (177). Αντίθετα, στο μοντέλο της ενδοπεριτοναϊκής μεταφοράς δεν είναι ξεκάθαρο αν τα κύτταρα αυτά είναι σε θέση να αυξήσουν ή να μειώσουν τη βαρύτητα της EAT. Συγκεκριμένα, σε μία μελέτη έχει δειχθεί ότι εξάλειψη των CD8+ T λεμφοκυττάρων των ποντικών-δοτών, ή των αντίστοιχων κυττάρων των ποντικών-δεκτών, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του βαθμού διήθησης του θυρεοειδή αδένα των ποντικών-δεκτών, ενώ σε άλλες μελέτες έχει δειχθεί ότι η αντίστοιχη εξάλειψή τους, είτε δεν επιδρά καθόλου, είτε μειώνει τη βαρύτητα της EAT (180). Όπως και τα βοηθητικά κύτταρα, ο μηχανισμός δράσης τους έγκειται στην καταστροφή των θυρεοειδικών κυττάρων.

Τα ρυθμιστικά T λεμφοκύτταρα που φέρουν τους δείκτες CD4 και CD25 στην επιφάνειά τους παίζουν σημαντικό ρόλο στην αναστολή της αυθόρμητης ενεργοποίησης των αυτοδραστικών T-κυττάρων (178). Σε πειράματα ποντικών που δεν εκφράζονται παρατηρείται αυθόρμητη εκδήλωση EAT και παραγωγή αντι-θυρεοειδικών αντισωμάτων. Σε αντίστοιχα πειράματα σε φυσιολογικούς ποντικούς και ποντικούς δέκτες, η προηγούμενη αύξηση του αριθμού των ρυθμιστικών T-κυττάρων πριν την επαγωγή άμεσης ή παθητικής EAT έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη διήθηση του θυρεοειδή αδένα τους, ενώ η εξάλειψή τους την αύξηση του βαθμού διήθησης (181;182). Σημαντικός φαίνεται να είναι και ο ρόλος τους στην επαγωγή ανοχής για την Tg, η οποία επιτυγχάνεται με τη χορήγηση μικρής

ποσότητας Tg χωρίς ανοσοενισχυτικό. Η ανάπτυξη ανοχής μπορεί να ανασταλεί με τη χορήγηση αντισώματος έναντι του δείκτη CD25, ή με την εξάλειψη των ρυθμιστικών T λεμφοκυττάρων πριν την επαγωγή (161). Η ίδια διαδικασία δεν μπορεί όμως να αποτρέψει ή να μειώσει τη βαρύτητα της νόσου κατά την επαγωγή παθητικής EAT (183). Υπό φυσιολογικές συνθήκες φαίνεται πως τα ρυθμιστικά κύτταρα βρίσκονται σε ισορροπία με τα αυτοδραστικά T λεμφοκύτταρα, και όταν η αύξηση της κυκλοφορούσας Tg – λόγω ανοσοποίησης – διαταράσσει την ισορροπία αυτή, επιδρούν εμποδίζοντας τον πολλαπλασιασμό των αυτοδραστικών T λεμφοκυττάρων επάγοντας ανοχή. Αντιθέτως, η ανοσοποίηση με Tg παρουσία ανοσοενισχυτικού αυξάνει τον αριθμό των αυτοδραστικών T λεμφοκυττάρων με αποτέλεσμα την εκδήλωση της θυρεοειδίτιδας (161).

3.4.2.3 Αντιγονοπαρουσιαστικά

Τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα παίζουν σημαντικό ρόλο στην EAT και συμμετέχουν στη διήθηση του θυρεοειδή αδένα των ποντικών, ανάλογα με το βαθμό ωρίμανσής τους, τις κυτταροκίνες που εκκρίνουν και τα αντιγόνα που παρουσιάζουν (184). Όλα τα εμπύρνηνα κύτταρα μπορούν να λειτουργήσουν ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα αν φέρουν μόρια τάξης I του MHC στην επιφάνειά τους, όμως μόνο τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα-«επαγγελματίες» φέρουν στην επιφάνειά τους μόρια τάξης II του MHC και παρουσιάζουν επιτόπους αντιγόνων στα βοηθητικά T λεμφοκύτταρα. Το πιο αντιπροσωπευτικό παράδειγμα επαγγελματικών αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων είναι τα δενδριτικά κύτταρα.

Η εκδήλωση της EAT καθώς και ο βαθμός διήθησης του αδένα συσχετίζεται άμεσα με τα δενδριτικά κύτταρα και μάλιστα με το βαθμό ωρίμανσής τους (185). Όταν ημίωριμα δενδριτικά κύτταρα που παρουσιάζουν επιτόπους της Tg χορηγηθούν σε ποντικούς πριν την ανοσοποίησή τους με Tg και ανοσοενισχυτικό, παρατηρείται αναστολή της εκδήλωσης της άμεσης EAT, ενώ όταν χορηγούνται ώριμα κύτταρα, που εκφράζουν στην επιφάνειά τους μόρια τάξης II του MHC, CD80, CD86, CD40 και παράγουν IL-12, παρατηρείται εκδήλωση νόσου (186).

Ο ρόλος των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων στην έναρξη και εξέλιξη της EAT έχει περιγραφεί κυρίως με τη χρήση αντισώματος που αναστέλλει τη λειτουργία των μορίων τάξης II. Όταν το αντίσωμα αυτό χορηγείται σε ποντικούς πριν την επαγωγή άμεσης EAT δεν εκδηλώνεται νόσος, ενώ όταν η χορήγηση αυτή

λαμβάνει χώρα κατά την ανάπτυξη της νόσου έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του ποσοστού των πειραματόζων που νοσούν, του βαθμού διήθησης του θυρεοειδή αδένου και του τίτλου των αντι-Tg αντισωμάτων τους. Τέλος, μετά την εκδήλωση EAT η χορήγηση του αντισώματος αυτού δεν έχει καμία επιρροή (187). Αντίστοιχα, η χορήγηση του αντισώματος που αναστέλλει τη λειτουργία των μορίων τάξης II σε κύτταρα ποντικών-δοτών παρουσία Tg εξαλείφει την ικανότητά τους να επάγουν παθητική EAT σε ποντικούς-δέκτες (188). Σε παρόμοια μελέτη με τη χρήση αντισώματος έναντι των μορίων τάξης I του MHC περιγράφηκε η παρεμπόδιση επιτόπων της Tg και η κατ'επέκταση αναστολή της δράσης των κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων, μόνο όμως σε *in vitro* σύστημα (160).

3.4.2.4 Β λεμφοκύτταρα

Στην EAT τα Β λεμφοκύτταρα φαίνεται να κατέχουν δευτερεύων ρόλο, κυρίως λόγω της αδυναμίας συσχέτισης με τα επίπεδα των αντισωμάτων (189). Σε πειράματα εξάλειψης των κυττάρων αυτών πριν την επαγωγή EAT δεν επηρεάστηκε η εκδήλωση της νόσου (190). Ο ρόλος τους ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα παρουσιάζοντας επιτόπους της Tg στα βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα είναι ενδεχομένως πιο σημαντικός στην εξέλιξη της νόσου (191). Επιπλέον, τα αντισώματα που παράγουν, σχηματίζουν σύμπλοκα με την Tg και έτσι τροποποιούν την αντιγονοπαρουσίασή της, συχνά καταλήγοντας στην παρουσίαση και κρυπτικών επιτόπων (192).

3.5 ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΩΝ ΣΕ ΕΥΑΙΣΘΗΤΑ ΚΑΙ ΑΝΘΕΚΤΙΚΑ

3.5.1 Κριτήρια διαφοροποίησης

Τα στελέχη των πειραματόζων που έχουν δοκιμαστεί ως προς την εκδήλωση της EAT έχουν διαχωριστεί σε ευαίσθητα και ανθεκτικά, λόγω της σοβαρότητας εκδήλωσης της πειραματικής νόσου, σε συνάρτηση πάντα με το βαθμό διήθησης του θυρεοειδή αδένου, καθώς και την παραγωγή ειδικών αντι-Tg αντισωμάτων.

3.5.1.1 Χρήση ανοσοενισχυτικού

Όπως αναφέρθηκε και στο κεφάλαιο 3.4.1, η EAT μπορεί να εκφραστεί και δίχως την ταυτόχρονη χορήγηση ανοσοενισχυτικού. Αυτό όμως ισχύει μόνο στους

ποντικούς που ανήκουν στα ευαίσθητα στελέχη και μετά από χορήγηση επαναλαμβανόμενων δόσεων Tg (ομόλογης από το ίδιο ή διαφορετικό στέλεχος ή ετερόλογης). Αντίθετα, η ανοσοποίηση ποντικών ανθεκτικών στελεχών με Tg προϋποθέτει την ταυτόχρονη χορήγηση ανοσοενισχυτικού για την ανάπτυξη διήθησης του θυρεοειδή αδένου. Έτσι, η χρήση LPS έχει ως αποτέλεσμα διήθηση μικρότερης έκτασης και χαμηλότερου τίτλου αντισωμάτων από ότι η ανοσοποίηση των ποντικών αυτών με Tg και CFA (193).

3.5.1.2 Προέλευση Tg

Μία ακόμη διαφοροποίηση που παρατηρείται, που πιθανά να είναι απόρροια των γονιδιακών πολυμορφισμών της Tg αλλά και των διαφορετικών MHC μορίων, έγκειται στην ανοσογονικότητα του μορίου μεταξύ ανθεκτικών και ευαίσθητων στελεχών. Η ανοσοποίηση ποντικών ευαίσθητων στελεχών με Tg από ανθεκτικά στελέχη έχει ως αποτέλεσμα χαμηλότερου βαθμού διήθησης του αδένου τους συγκρινόμενη με την Tg ευαίσθητων στελεχών. Παράλληλα, η διήθηση του θυρεοειδή αδένου ποντικών ανθεκτικών στελεχών ήταν μεγαλύτερη όταν σε αυτά χορηγήθηκε Tg προερχόμενη από ευαίσθητα στελέχη. Συμπεραίνουμε λοιπόν πως τα ανθεκτικά στελέχη διαθέτουν Tg χαμηλότερης ανοσογονικότητας σε σχέση με τα ευαίσθητα στελέχη (154).

3.5.1.3 Ρυθμιστικά T λεμφοκύτταρα

Σε μελέτες επαγωγής άμεσης EAT με Tg και ανοσοενισχυτικό, έπειτα από αύξηση των ρυθμιστικών T λεμφοκυττάρων μέσω της χορήγησης ρυθμιστικών T-κυττάρων φυσιολογικών ποντικών, αποδείχθηκε ότι στους ποντικούς που ανήκουν στα ευαίσθητα στελέχη μειώθηκε η βαρύτητα της νόσου. Αντίθετα, η εξάλειψη των ρυθμιστικών T λεμφοκυττάρων ποντικών ευαίσθητων στελεχών μέσω της χορήγησης αντισώματος που αναγνωρίζει το δείκτη επιφανείας τους CD25, οδήγησε σε αυθόρμητη εκδήλωση της θυρεοειδίτιδας (181;182). Στα ανθεκτικά στελέχη, η αντίστοιχη εξάλειψη οδήγησε σε αύξηση του βαθμού διήθησης του θυρεοειδή αδένου τους (162). Από τα παραπάνω γίνεται φανερό ότι τα ρυθμιστικά T-κύτταρα παίζουν σημαντικό ρόλο στην ευαισθησία ή ανθεκτικότητα των ποντικών στην επαγωγή της EAT.

3.5.1.4 Παθογονικά T λεμφοκύτταρα

Και στην περίπτωση των παθογονικών T λεμφοκυττάρων έχει παρατηρηθεί διαφοροποίηση μεταξύ ευαίσθητων και ανθεκτικών στελεχών ποντικών (139;175). Σε πειράματα με ανθεκτικά στελέχη που έχουν υποστεί θυμεκτομή, βρέθηκε πως η επανασύσταση των T λεμφοκυτταρικών πληθυσμών τους, με παθητική μεταφορά T λεμφοκυττάρων από ευαίσθητα στελέχη, είχε ως συνέπεια την εκδήλωση EAT – μέσω της χορήγησης Tg και ανοσοενισχυτικού – αυξημένης όμως βαρύτητας. Παράλληλα, τα T λεμφοκύτταρα των ανθεκτικών στελεχών που έχουν ενεργοποιηθεί *in vivo* με ετερόλογες Tg, πολλαπλασιάζονται *in vitro* μόνο παρουσία των ετερόλογων Tg, ενώ το αντίστοιχο εύρημα δεν ισχύει στην περίπτωση των ευαίσθητων στελεχών (139).

3.5.2 MHC γονίδια

Ο απλότυπος των γονιδίων του MHC που φέρουν οι ποντικοί έχει συνδεθεί με τη βαρύτητα της EAT. Τα μόρια των MHC των ποντικών ονομάζονται H2, και χωρίζονται σε τάξης I, που κωδικοποιούνται από τα γονίδια K και D και τάξης II, από τα γονίδια A και E (33). Ο διαχωρισμός των στελεχών σε ευαίσθητα και ανθεκτικά για την EAT έγινε με την ανοσοποίηση ποντικών με εκχυλίσματα θυρεοειδή αδένων και ανοσοενισχυτικό, και τον μετέπειτα χαρακτηρισμό του βαθμού διήθησης του θυρεοειδή αδένων, καθώς και τον τίτλο των αντι-θυρεοειδικών αντισωμάτων. Με τον τρόπο αυτό βρέθηκε πως τα ευαίσθητα για την EAT στελέχη ποντικών διαθέτουν τους απλότυπους H2^k, H2^q και H2^s και εκδηλώνουν υψηλό βαθμό διήθησης στον αδένων τους και υψηλούς τίτλους αντι-θυρεοειδικών αντισωμάτων, ενώ τα ανθεκτικά στελέχη διαθέτουν τους απλότυπους H2^b, H2^d και H2^v και εκδηλώνουν EAT, η οποία χαρακτηρίζεται από μικρής έκτασης διήθηση του θυρεοειδή αδένων και από χαμηλούς τίτλους αντι-θυρεοειδικών αντισωμάτων (189). Η ίδια διαφοροποίηση των στελεχών ισχύει και όταν το αντιγόνο ανοσοποίησης είναι η Tg.

Τα μόρια τάξης II του MHC είναι άμεσα συνδεδεμένα με την εκδήλωση της EAT και η πλειοψηφία των μελετών εστιάζει στο ρόλο δύο διαφορετικών γονιδίων που κωδικοποιούν τα μόρια τάξης II του MHC των ποντικών (A και E). Με τη χρήση διαγονιδιακών ποντικών ως προς το γονίδιο A ή E, τόσο από ευαίσθητα, όσο και

από ανθεκτικά στελέχη, βρέθηκε ότι όταν ανοσοποιούνταν ποντικοί που έφεραν το γονίδιο E ευαίσθητων στελεχών με απλότυπο H2^k με εκχύλισμα θυρεοειδή και ανοσοενισχυτικό, η διήθηση του θυρεοειδή τους αδένες ήταν μεσαίου ή υψηλού βαθμού και παράλληλα ανιχνεύονταν υψηλοί τίτλοι αντι-Tg αντισωμάτων. Όταν όμως οι ποντικοί έφεραν το γονίδιο A ανθεκτικών στελεχών με απλότυπο H2^b και H2^d η διήθηση του αδένος ήταν πολύ χαμηλότερη (194;195). Συμπεραίνουμε λοιπόν πως το γονίδιο A παίζει σημαντικό ρόλο στον καθορισμό της ευαισθησίας.

Σε μία προσπάθεια εντοπισμού των αμινοξικών θέσεων που πιθανά να ευθύνονται για τη διαφοροποίηση των στελεχών σε ανθεκτικά και ευαίσθητα, βρέθηκε πως από τις 92 αμινοξικές θέσεις των μεταβλητών περιοχών του MHC μορίου του E γονιδίου, 27 παρουσιάζουν πολυμορφισμό, με τις θέσεις 86, 88 και 28 να ξεχωρίζουν αισθητά μεταξύ των δύο στελεχών. Πιο ειδικά, στα ανθεκτικά στελέχη στη θέση 86 ανιχνεύτηκε η σερίνη ενώ τα ευαίσθητα στελέχη φέρουν φαινυλαλανίνη, στη θέση 88 ανιχνεύτηκε η λυσίνη με τα ευαίσθητα να φέρουν αντίστοιχα ασπαραγίνη και στη θέση 28 πιο συχνό ήταν το γλουταμικό οξύ ενώ στα ευαίσθητα στελέχη η βαλίνη. Σε μικρότερο βαθμό συνδέθηκαν και τα αμινοξέα των θέσεων 26, 30, 47, 70, 71 και 74 με τον καθορισμό ευαισθησίας ή ανθεκτικότητας για την EAT (40). Από την παραπάνω μελέτη διατυπώθηκε η υπόθεση ότι οι επίτοποι της Tg ενδεχομένως να συνδέονται με υψηλότερη συγγένεια με τα MHC μόρια από ευαίσθητα στελέχη ποντικών, σε σχέση με τα ανθεκτικά στελέχη.

3.5.3 Γονίδιο της Tg

Τα στοιχεία που έχουν έως σήμερα συλλεχθεί σχετικά με το ρόλο του γονιδίου της Tg στο διαχωρισμό των φυλών σε ευαίσθητες και ανθεκτικές δεν έχουν κάποια σαφή ένδειξη ως προς αυτό. Αξιοσημείωτο είναι όμως πως η αλληλουχία αμινοξέων σερίνης-μεθειονίνης-θρεονίνης, που κωδικοποιούνται από το εξώνιο 10, ανευρίσκεται στο 50% των ευαίσθητων στελεχών και σε κανένα από τα ανθεκτικά στελέχη. Μάλιστα, η μεθειονίνη στη θέση 808 δείχνει να είναι το αμινοξύ-κλειδί στη διαφοροποίηση αυτή (51).

4. ΑΝΟΣΟΓΟΝΙΚΑ ΚΑΙ ΠΑΘΟΓΟΝΙΚΑ ΠΕΠΤΙΔΙΑ ΤΗΣ ΘΥΡΕΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ

Οι πρώτες μελέτες στις παθήσεις του θυρεοειδή αδένος περιορίζονταν μόνο στα ανοσολογικά χαρακτηριστικά των Τ-επιτόπων της Τg αφού μέχρι τη δεκαετία του '90 η αλληλουχία της Τg δεν ήταν γνωστή. Η ανακοίνωση αρχικά τμημάτων της Τg και αργότερα ο πλήρης χαρακτηρισμός του μορίου, επέτρεψε τη μελέτη της νόσου στον ποντικό με τη χρήση συνθετικών πεπτιδίων.

4.1 ΤΡΟΠΟΙ ΕΠΙΛΟΓΗΣ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ

Η διερεύνηση Τ-επιτόπων της Τg παρουσιάζει σημαντικές δυσκολίες, κυρίως λόγω του τεράστιου μεγέθους της που καθιστά απαγορευτική την εφαρμογή κλασικών τεχνικών χαρακτηρισμού Τ-επιτόπων, όπως η σύνθεση αλληλοεπικαλυπτόμενων πεπτιδίων κατά μήκος ολόκληρης της αλληλουχίας της. Έτσι, προέκυψε η ανάγκη εξεύρεσης «έξυπνων» τρόπων επιλογής πιθανών ανοσογονικών ή/και παθογονικών επιτόπων.

Μετά την επιλογή των πεπτιδίων προς μελέτη, η συνήθης πρακτική είναι ο έλεγχος της ανοσογονικότητάς τους. Τα πειραματόζωα ανοσοποιούνται με το πεπτίδιο παρουσία ανοσοενισχυτικού και τα λεμφοκύτταρα ή τα σπληνοκύτταρά τους καλλιεργούνται παρουσία πεπτιδίου *in vitro* έτσι ώστε να αξιολογηθεί η ικανότητα του πεπτιδίου να επάγει τον πολλαπλασιασμό τους. Σε αρκετές μελέτες διερευνάται παράλληλα και η ικανότητα των πεπτιδίων να επάγουν τον *in vitro* πολλαπλασιασμό Τ λεμφοκυττάρων, που έχουν προηγουμένως ενεργοποιηθεί *in vivo* με Τg ή και το αντίστροφο, έτσι ώστε να χαρακτηριστεί ο επίτοπος του πεπτιδίου ως επικρατής, ημι-επικρατής ή κρυπτικός. Όταν πληρούνται όλες οι παραπάνω συνθήκες τότε πρόκειται για επικρατή επίτοπο – κάτι που μέχρι σήμερα δεν έχει ανιχνευτεί – ενώ όταν ισχύει μόνο μία τότε πρόκειται για ημι-επικρατή επίτοπο. Τα ανοσογονικά πεπτίδια είναι αυτά που συνήθως επιλέγονται για μελέτη παθογονικότητας (157).

Για το σκοπό αυτό, δοκιμάζεται η ικανότητα του πεπτιδίου να προκαλεί νόσο μετά από ανοσοποίηση των πειραματόζωων με αυτό (άμεση ΕΑΤ), ή μετά από

παθητική μεταφορά *in vivo* και *in vitro* ενεργοποιημένων T λεμφοκυττάρων σε ποντικούς-δέκτες.

4.1.1 Πεπτίδια που περιλαμβάνουν τις ορμονογονικές περιοχές της Tg

Όπως αναφέρθηκε και στο κεφάλαιο 1.3.2.1, υπάρχουν σαφείς ενδείξεις από επηδμιολογικές μελέτες ότι η αύξηση της πρόσληψης ιωδίου οδηγεί σε αύξηση της καταγραφής εκδήλωσης της αυτοάνοσης θυρεοειδίτιδας. Επιπλέον, η προσθήκη ιωδίου στη διατροφή έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση κατά τρεις φορές της συχνότητας εμφάνισης της ΗΤ. Δεν αποτελεί λοιπόν έκπληξη ότι πολλές ερευνητικές ομάδες επέλεξαν προς μελέτη συνθετικά πεπτίδια, τα οποία περιείχαν ορμονογονικές περιοχές. Το γεγονός ότι οι ορμονογονικές περιοχές είναι κοινές στις Tg των διαφορετικών ειδών έκανε ακόμη πιο ελκυστική την επιλογή αυτή. Έτσι, σε αντίστοιχες μελέτες επιλέχθηκαν T-κλώνοι ποντικού, οι οποίοι αναγνώριζαν τις Tg διαφορετικών ειδών, και ελέγχθηκε η ικανότητα των κλώνων αυτών να αναγνωρίζουν αλληλεπικαλυπτόμενα πεπτίδια μήκους 12 αμινοξέων από τις ορμονογονικές περιοχές της ανθρώπινης Tg. Με τη προσέγγιση αυτή προσδιορίστηκαν τα πεπτίδια hT4(5), hT4(2553) και hT4(2567) και βρέθηκε ότι δύο από αυτά, τα hT4(5) και hT4(2553), περιείχαν T-επίτοπο ικανό να επάγει EAT (196;197). Συμπεραίνουμε λοιπόν πως ο συγκεκριμένος τρόπος επιλογής πεπτιδίων αν και σωστός, περιορίζει τον αριθμό των δυνητικών T-επιτόπων της Tg στις ορμονογονικές της περιοχές.

4.1.2 Πεπτίδια που περιλαμβάνουν κοινές αλληλουχίες της Tg με άλλα αυτοαντιγόνα

Μία ακόμη παρατήρηση που βοήθησε στην επιλογή ανοσογονικών πεπτιδίων της Tg ήταν η ικανότητα τόσο της Tg, όσο και της TPO να επάγουν θυρεοειδίτιδα σε πειραματόζωα. Η πιθανή εξήγηση που αποδόθηκε ήταν πως τα μόριά τους έχουν κοινούς αντιγονικούς καθοριστές και συνεπώς η σύγκριση των αμινοξικών αλληλουχιών τους θα οδηγούσε σε νέα παθογονικά πεπτίδια. Σε μία τέτοια μελέτη επιλέχθηκαν τα πεπτίδια που περιείχαν τουλάχιστον πέντε συνεχόμενα κοινά αμινοξέα και εντοπίστηκαν τα TgP1, TgP2, TgP3, TgP4, από τα οποία μόνο το

TgP4 προκαλούσε EAT (198). Με τη στρατηγική αυτή, για άλλη μία φορά, περιορίζεται κατά πολύ ο αριθμός των δυνητικών T-επιτόπων.

4.1.3 Πεπτίδια που προσδιορίστηκαν μέσω αλγόριθμων

Η ανάλυση αλληλουχιών μεγάλου αριθμού πεπτιδίων, γνωστά για την ικανότητά τους να συνδέονται σε εκάστοτε μόρια MHC, αλλά και να αναγνωρίζονται από T λεμφοκύτταρα, οδήγησε στη δημιουργία αλγόριθμων ικανών να προβλέπουν την πιθανή πρόσδεση αμινοξέων στα συγκεκριμένα MHC μόρια. Έτσι, βρέθηκαν οι αλγόριθμοι της ομάδας του Altuvia Y. (199), του Leighton J. (200), αλλά και οι βάσεις δεδομένων RANKPEP (201-203) και SYFPEITHI (204). Η προσέγγιση αυτή αποτελεί την πιο ενδεδειγμένη μέθοδο επιλογής πεπτιδίων, δεν καταλήγει σε περιορισμένο αριθμό επιτόπων, και αυτός είναι και ο κύριος λόγος που συχνά εφαρμόζεται από πολλές πειραματικές ομάδες. Από την άλλη, η πληθώρα των δυνητικών επιτόπων προϋποθέτει συγκεκριμένα κριτήρια επιλογής πεπτιδίων, όπως η επιλογή συντηρημένων αλληλουχιών μεταξύ Tg διαφορετικών ειδών, η επιλογή πεπτιδίων που περιέχουν άνω των δύο μοτίβων πρόσδεσης καθώς και η επιλογή πεπτιδίων που περιέχουν τυροσίνη, που αποτελεί πιθανό σημείο πρόσδεσης ιωδίου. Η μεθοδολογία αυτή έχει αναδείξει 72 πεπτίδια, από τα οποία 22 περιέχουν T-επίτοπο της Tg και είναι παθογονικά. Συμπεραίνουμε πως ενώ οι αλγόριθμοι είναι ένα παντοδύναμο εργαλείο, η προγνωστική τους αξία είναι τελικά μικρή.

Πίνακας 2: ...συνέχεια στην επόμενη σελίδα

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ															ΑΝΟΣΟΓΟΝΙΚΟΤΗΤΑ				ΠΑΘΟΓΟΝΙΚΟΤΗΤΑ				Βιβλιογραφία
No	Όνομα	Θέση	Είδος	Αλληλουχία	Τρόπος επιλογής	Στέλεχος	MHC	In vivo & in vitro		In vivo πεπτιδίο, in vitro Tg		In vivo Tg, in vitro πεπτιδίο		Άμεση EAT	ΠΑΘΗΤΙΚΗ EAT		Αντισώματα έναντι πεπτιδίου	Αντισώματα έναντι Tg					
								peptide	peptide	peptide	peptide	In vivo Tg, in vitro peptide	In vivo & in vitro peptide										
31	mTg1241 hTg1241	1241-1254 1241-1255	m h	GPLICSLESQHWVT GPLICSLESGRWESQ	ομολογία με hTg αλγόριθμος & ομολογία με mTg	A-E+/B10-tg	b b	- Δ.Π.	Δ.Π. Δ.Π.	- +	Δ.Π. Δ.Π.	Δ.Π. -	Δ.Π. Δ.Π.	Δ.Π. Δ.Π.	Δ.Π. Δ.Π.	Δ.Π. Δ.Π.	(210) (130)						
32	hTg1288	1288-1310	h	SADYAGLLQTFQVFILDELTAQ	αλγόριθμος & ομολογία με mTg	DR3-tg	DR3	Δ.Π.	Δ.Π.	-	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	(206)						
33	hTg1342	1342-1361	h	RLGVNVTWKSRLLEDIPVASL	αλγόριθμος & ομολογία με mTg	DR3-tg	DR3	Δ.Π.	Δ.Π.	-	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	(206)						
34	hTg1379	1379-1398	h	RFTDLIQSGSFQLHLDSKTF	αλγόριθμος & ομολογία με mTg	DR3-tg	DR3	Δ.Π.	Δ.Π.	-	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	(206)						
35	p1390 l-p1390	1390-1406	m	LHLDSKIFSadTTLYFL LHLDSKIFSadTTLY(I)FL	αλγόριθμος & τυροσίνη ανάλογο +I	CBA/J	k	- -	Δ.Π. Δ.Π.	Δ.Π. Δ.Π.	Δ.Π. Δ.Π.	Δ.Π. Δ.Π.	Δ.Π. Δ.Π.	Δ.Π. Δ.Π.	Δ.Π. Δ.Π.	Δ.Π. Δ.Π.	(208)						
36	hTg1425	1425-1439	h	FYQVLTSEASQDGLG	αλγόριθμος & ομολογία με mTg	DR3-tg	DR3	Δ.Π.	Δ.Π.	-	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	(206)						
37	hTg1500	1500-1514	h	AGLQCDQNGQYRASQ	αλγόριθμος & ομολογία με mTg	DR3-tg	DR3	Δ.Π.	Δ.Π.	-	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	(206)						
38	hTg1518	1518-1532	h	GSGKAFCVDGEGRRRL	αλγόριθμος & ομολογία με mTg	DR3-tg DQ8-tg	DR3 DQ8	Δ.Π. Δ.Π.	Δ.Π. Δ.Π.	+ -	Δ.Π. Δ.Π.	+	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	(206)						
39	hTg1555	1555-1569	h	VPESKVIQFDANAPVA	αλγόριθμος & ομολογία με mTg	DR3-tg	DR3	Δ.Π.	Δ.Π.	-	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	(206)						
40	p1579	1579-1591	m	LVQCLTDSANDEA	αλγόριθμος	CBA/J	k	+	-	-	+	Δ.Π.	+	-	Δ.Π.	(207)							
41	hTg1618	1618-1632	h	VACMTSDQKRDALGN	αλγόριθμος & ομολογία με mTg	DR3-tg	DR3	Δ.Π.	Δ.Π.	-	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	(206)						
42	hTg1638	1638-1652	h	FGSLRCQVKVRSHGQ	αλγόριθμος & ομολογία με mTg	DR3-tg	DR3	Δ.Π.	Δ.Π.	-	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	(206)						
43	mTg1646	1646-1660	m	RNSGKDSLAVYVKKG	αλγόριθμος	C57BL/10 A+E+B10-tg	b b	-(-Tregs) -(-Tregs)	Δ.Π. Δ.Π.	-(-Tregs) -(-Tregs)	Δ.Π. Δ.Π.	Δ.Π. Δ.Π.	Δ.Π. Δ.Π.	Δ.Π. Δ.Π.	Δ.Π. Δ.Π.	Δ.Π. Δ.Π.	(210)						
44	mTg1677	1677-1692	m	QNVLSGLYSPVVFASAS	αλγόριθμος	C57BL/10 A+E+B10-tg	b b	+(-Tregs) +(-Tregs)	Δ.Π. Δ.Π.	-(-Tregs) -(-Tregs)	- +	Δ.Π. Δ.Π.	+(-Tregs)	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	(210)						
45	hTg1738 mTg1744	1738-1752 1744-1758	h m	VLLCNVKDWMPSEA WRDTSATQANATCAG	αλγόριθμος & ομολογία με mTg αλγόριθμος	DR3-tg C57BL/10 A+E+B10-tg	DR3 b b	Δ.Π. +(-Tregs) +(-Tregs)	Δ.Π. Δ.Π.	- -(-Tregs) -(-Tregs)	Δ.Π. Δ.Π.	Δ.Π. Δ.Π.	Δ.Π. Δ.Π.	Δ.Π. Δ.Π.	Δ.Π. Δ.Π.	Δ.Π. Δ.Π.	(206) (210)						

Πίνακας 2: ...συνέχεια στην επόμενη σελίδα

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ														ΑΝΟΣΟΓΟΝΙΚΟΤΗΤΑ		ΠΑΘΟΓΟΝΙΚΟΤΗΤΑ		Βιβλιογραφία		
No	Όνομα	Θέση	Είδος	Αλληλουχία	Τρόπος επιλογής	Στέλεχος	MHC	In vivo & in vitro		In vivo Tg, in vitro	Άμεση EAT	ΠΑΘΗΤΙΚΗ EAT		Αντισώματα έναντι πεπτιδίου	Αντισώματα έναντι Tg					
								in vitro πεπτιδίο	in vivo πεπτιδίο, in vitro Tg			In vivo Tg, in vitro	Άμεση EAT			In vivo Tg, in vitro πεπτιδίο	In vivo & in vitro πεπτιδίο			
63	p2369	2369-2380	m	DVASIHLLISRP	αλγόριθμος & πρόσδεση ενζύμου	CBA/J	k	+	-	-	+	Δ.Π.	+	-	-	(212)				
64	P40	2384-2748	h	...	οξειδωτική διάσπαση Tg	CBA/J	k	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	-	Δ.Π.	Δ.Π.	+	+	(218)				
65	p2439	2439-2450	m	NILNDAQTKLLA	αλγόριθμος & πρόσδεση ενζύμου	CBA/J	k	+	-	-	+	Δ.Π.	+	-	-	(212)				
66	TgP1	2495-2511	r	GLINRAKAVKQFEESQG	αλγόριθμος	B10.BR	k	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	+	+	(219)			
							k	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	+	+	(220)
							b	-	Δ.Π.	Δ.Π.	-	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	-	-		
							k	+	Δ.Π.	Δ.Π.	+	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	+	+		
							s	+	-	-	+	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	+	+		
2496-2504	LINRAKAVK	ελάχιστος επίτοπος	C3H/HeJ	k	+	Δ.Π.	Δ.Π.	+	Δ.Π.	Δ.Π.	+	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	(221)			
				d	-	Δ.Π.	Δ.Π.	-	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	+	-						
				k	+	Δ.Π.	Δ.Π.	+	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.				
				s	+	Δ.Π.	Δ.Π.	+	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.				
2499-2507	RAKAVKQFE	ελάχιστος επίτοπος	C3H/HeJ	k	-	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.					
				s	-	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.				
67	p2529 l-p2529	2529-2545	m	EDSDARILAAAVWYSL EDSDARILAAAVWY (I) Y (I) SL	αλγόριθμος & τυροσίνη ανάλογο +I	CBA/J	k	+	Δ.Π.	Δ.Π.	+	Δ.Π.	Δ.Π.	+	-	(129; 208)				
68	p2540	2540-2555	m	VWYYSLEERSTDDYAS	αλγόριθμος & τυροσίνη ανάλογο +I	CBA/J	k	+	Δ.Π.	Δ.Π.	+	Δ.Π.	Δ.Π.	+	-	(129; 208)				
69	hT4(2553) hT0(2553) hT4(2553)	2549-2560	h	STDDT4ASF SRAL	ορμονογονική περιοχή & αναγνώριση από T κλώνους	CBA/J	k	Δ.Π.	Δ.Π.	+	-	+	+	Δ.Π.	-	(196)				
							k	Δ.Π.	Δ.Π.	+	Δ.Π.	+	+	+	+	+	+	(197)		
							k	+	Δ.Π.	+	-	+	+	+	+	+	+	Δ.Π.	(205)	
							k	+	Δ.Π.	+	+	+	+	+	+	+	+	Δ.Π.	(205)	
							s	-	Δ.Π.	+	-	+	+	+	+	+	+	Δ.Π.	(205)	
							k	+	Δ.Π.	+	-	+	+	+	+	+	+	Δ.Π.	(205)	
							s	-	Δ.Π.	-	-	+	+	+	+	+	+	Δ.Π.	(205)	
							k	-	Δ.Π.	-	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	(222)
							k	-	Δ.Π.	-	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	(205)
							k	+	Δ.Π.	-	+	+	+	+	+	+	+	Δ.Π.	Δ.Π.	(205)
hT0(2553)	h/m	STDDT0ASF SRAL	CBA/J	k	+	Δ.Π.	-	+	+	+	+	+	+	+	Δ.Π.	(205)				
s				-	Δ.Π.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Δ.Π.	(205)				
hT0(2553)	h/m	STDDT0ASF SRAL	CBA/J	k	+	Δ.Π.	-	+	+	+	+	+	+	+	Δ.Π.	(205)				
s				-	Δ.Π.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Δ.Π.	(205)			
k				-	Δ.Π.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Δ.Π.	(205)			
hT0(2553)	h/m	STDDT0ASF SRAL	A.SW/J	k	-	Δ.Π.	-	+	+	+	+	+	+	+	Δ.Π.	(205)				
s				-	Δ.Π.	-	+	+	+	+	+	+	+	+	Δ.Π.	(205)				
s				-	Δ.Π.	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Δ.Π.	(205)			

Πίνακας 2: Συνοπτική παρουσίαση των γνωστών πεπτιδίων της Tg. Η κόκκινη σκίαση υποδηλώνει την ύπαρξη παθογονικού πεπτιδίου.

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ														ΑΝΟΣΟΓΟΝΙΚΟΤΗΤΑ		ΠΑΘΟΓΟΝΙΚΟΤΗΤΑ		Βιβλιογραφία
No	Όνομα	Θέση	Είδος	Αλληλουχία	Τρόπος επιλογής	Στέλεχος	MHC	In vivo & in vitro πεπτιδίο	In vivo πεπτιδίο, in vitro Tg	In vivo Tg, in vitro πεπτιδίο	Άμεση EAT	ΠΑΘΗΤΙΚΗ EAT		Αντισώματα έναντι πεπτιδίου	Αντισώματα έναντι Tg			
												In vivo Tg, in vitro πεπτιδίο	In vivo & in vitro πεπτιδίο					
70	hT4(2567)	2559-2570	h/m	ASF5RALENATRDT4FIICP	ορμονογονική περιοχή	CBA/J	k	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	-	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	(205)		
	hT0(2567)			ASF5RALENATRDT0FIICP		SJL/J	s	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	-	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	(197)		
						C57BR/J	k	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	-	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	(205)		
						A.SW/J	s	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	-	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.			
						CBA/JCr	k	-	Δ.Π.	-	-	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.			
						CBA/J	k	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	-	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.			
						SJL/J	s	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	-	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.			
						C57BR/J	k	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	-	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.			
						A.SW/J	s	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	-	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.			
						CBA/JCr	k	-	Δ.Π.	-	-	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	(197)		
71	hTg2574	2574-2588	h	IIDMASAWAKRARGN	αλγόριθμος & ομολογία με mTg	DR3-tg	DR3	Δ.Π.	Δ.Π.	-	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	(206)		
72	p2596	2594-2608	m	YGHGSLELLADVQ	αλγόριθμος	CBA/J	k	+	Δ.Π.	Δ.Π.	+	Δ.Π.	+	+	-	(207)		
						AKR/J	k	+	Δ.Π.	Δ.Π.	+	Δ.Π.	Δ.Π.	+	Δ.Π.	(223)		
						B10.BR	k	+	Δ.Π.	Δ.Π.	+	Δ.Π.	Δ.Π.	+	Δ.Π.			
						C3H/HeJ	k	+	Δ.Π.	Δ.Π.	+	Δ.Π.	Δ.Π.	+	Δ.Π.			
						CBA/J	k	+	Δ.Π.	Δ.Π.	+	Δ.Π.	Δ.Π.	+	Δ.Π.			
						DBA/1J	q	-	Δ.Π.	Δ.Π.	-	Δ.Π.	Δ.Π.	-	Δ.Π.			
						SJL/J	s	-	Δ.Π.	Δ.Π.	-	Δ.Π.	Δ.Π.	-	Δ.Π.			
						DBA/2J	d	-	Δ.Π.	Δ.Π.	-	Δ.Π.	Δ.Π.	-	Δ.Π.			
						C57BL/6	b	-	Δ.Π.	Δ.Π.	-	Δ.Π.	Δ.Π.	-	Δ.Π.			
73	p2617	2617-2630	m	SAYQQQFSTEEQSL	αλγόριθμος & τυροσίνη ανάλογο +I	CBA/J	k	-	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	(208)		
	l-p2617							-	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.			
74	Tg2	2695-2713	r	CSFWSKYIQTLKDADGAK	αλγόριθμος & ομολογία με rTg, bTg, hTg	C57BL/10J	b	-	Δ.Π.	Δ.Π.	-	Δ.Π.	Δ.Π.	+	+(αποδιάταξη)	(224)		
						B10.BR/SgSn	k	-	Δ.Π.	Δ.Π.	-	Δ.Π.	Δ.Π.	+	+(αποδιάταξη)			
						SJL/J	s	+	Δ.Π.	-	+	Δ.Π.	+	+	+(αποδιάταξη)			
						C3H/HeJ	k	-	Δ.Π.	Δ.Π.	-	Δ.Π.	Δ.Π.	+	+(αποδιάταξη)			
						BALB/c	d	-	Δ.Π.	Δ.Π.	-	Δ.Π.	Δ.Π.	+	+(αποδιάταξη)			
	hTg(2695-2713)	2695-2713	h	CSFWSKYISSLKTSADGAK	ομολογία με rTg	SJL/J	s	-	Δ.Π.	Δ.Π.	-	Δ.Π.	+	+	Δ.Π.	(225)		
	hTg(2695-2706)	2695-2706	h	CSFWSKYISSLK	ελάχιστος επίτοπος	SJL/J	s	-	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.			
	rTg(2695-2706)		r	CSFWSKYIQTLK	ελάχιστος επίτοπος	SJL/J	s	+	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	+	+	Δ.Π.			
	rTg(2698-2709)	2698-2709		WSKYIQTLKDAD	ελάχιστος επίτοπος	SJL/J	s	-	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.			
	rTg(2701-2713)	2701-2713		YIQTLKDADGAK	ελάχιστος επίτοπος	SJL/J	s	-	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.			
75	hTg2729	2729-2743	h	GSGLRDRLSLQEPG	αλγόριθμος & ομολογία με mTg	DR3-tg	DR3	Δ.Π.	Δ.Π.	-	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	(206)		
	TgP4	2730-2743		GLREDLLSLQEPG	ομολογία με hTPO	CBA/N	k	+	+	+	-	+	-	Δ.Π.	Δ.Π.	(211)		

5. ΠΑΘΟΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΚΔΗΛΩΣΗΣ ΕΑΤ

Ο χαρακτηρισμός των T-επιτόπων της Tg έχει πραγματοποιηθεί σε συμβατικά αμιγή στελέχη ποντικών που είναι ομόζυγα ως προς τους απλότυπους των γονιδίων του MHC που προσδίδουν ευαισθησία ή ανθεκτικότητα και σε διαγονιδιακούς ποντικούς που φέρουν μόρια του MHC του ποντικού ή του ανθρώπου. Τα πεπτίδια αυτά έχουν αποτελέσει τη βάση για τις μελέτες των παθογενετικών μηχανισμών της HT, συμπεριλαμβανομένων του ρόλου του ιωδίου στην αντιγονικότητα, την επίδραση αντισωμάτων στην αντιγονοπαρουσίαση, των κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων, του ρόλου της μοριακής μίμησης στην έναρξη της νόσου και της επίδρασης των γονιδίων A και E στην ΕΑΤ.

5.1 ΓΝΩΣΤΑ ΑΝΟΣΟΓΟΝΙΚΑ ΚΑΙ ΠΑΘΟΓΟΝΙΚΑ ΠΕΠΤΙΔΙΑ ΤΗΣ ΘΥΡΕΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ

5.1.1 Επαγωγή ΕΑΤ σε ευαίσθητα στελέχη

Οι περισσότερες μελέτες της ΕΑΤ αφορούν ποντικούς ευαίσθητων στελεχών με τους απλότυπους k και s των γονιδίων του MHC. Έχουν δοκιμαστεί συνολικά 34 πεπτίδια, από τα οποία τα 18 [hT4(5)/hT0(5), I-p117, p179/I-p179, I-p304/p306, p1579, p1826, I-p1931, p2102, p2340, p2369, p2439, TgP1 (2495-2511), p2529/I-p2529, p2540/I-p2540, hT4(2553)/hT0(2553), p2596, TgP2 (2695-2713), TgP4] είναι παθογονικά και 15 από αυτά (τα πεπτίδια με υπογράμμιση) επάγουν άμεση ΕΑΤ (196;197;205;207;208;211;212;216;223;224;226). Από τα υπόλοιπα τρία, το p2102 επάγει ΕΑΤ μόνο μετά από παθητική μεταφορά *in vivo* και *in vitro* ενεργοποιημένων με το πεπτίδιο T λεμφοκυττάρων (207), το TgP4 με παθητική μεταφορά *in vivo* ενεργοποιημένων με Tg και *in vitro* με το πεπτίδιο (211), ενώ η παθογονικότητα του p179/I-p179 δεν διερευνήθηκε (209). Οι T-επίτοποι που φέρουν 8 από τα παραπάνω πεπτίδια [p306, p1579, p1826, p2102, p2369, p2439, TgP1(2495-2511), p2596] χαρακτηρίστηκαν ως κρυπτικοί (207;212;226), ενώ οι επίτοποι τεσσάρων πεπτιδίων [hT4(5)/hT0(5), p179, p2340, hT4(2553)] χαρακτηρίστηκαν ως ημι-επικρατείς (197;205;209;216). Τα υπόλοιπα πεπτίδια είτε δε διερευνήθηκαν, είτε δεν χαρακτηρίστηκαν διότι δεν επάγουν άμεση, ούτε

παθητική EAT, όπως το TgP4 του οποίου οι επίτοποι αν και θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν ως επικρατείς, δεν επάγει EAT. Από τους δύο απλότυπους των γονιδίων του MHC k και s που φέρουν τα ευαίσθητα στελέχη ποντικών, έχουν βρεθεί πεπτίδια που είτε είναι παθογονικά μόνο σε ένα από αυτούς, είτε και στους δύο, ή είναι παθογονικά μόνο σε ένα από τα στελέχη του ίδιου απλότυπου.

Σε ορισμένες μελέτες σε ευαίσθητα στελέχη ήταν αναγκαίος ο προσδιορισμός της ελάχιστης αλληλουχίας των πεπτιδίων που ήταν υπεύθυνη για τη δράση των αντίστοιχων πεπτιδίων. Για το σκοπό αυτό έχουν δοκιμαστεί δυο τεχνικές:

1) Η πρώτη τεχνική περιλάμβανε τη δημιουργία υβριδωμάτων T λεμφοκυττάρων ειδικών για ολόκληρο το πεπτίδιο και τη περαιτέρω δοκιμή ως προς την ικανότητά τους να αναγνωρίζουν μικρότερα πεπτίδια της αλληλουχίας τους. Τα μικρότερα πεπτίδια ήταν, είτε μικρότερα κατά ένα αμινοξύ από το καρβοξυ- ή το αμινο-τελικό άκρο ολόκληρου του πεπτιδίου, είτε αλληλεπικαλυπτόμενα κατά ένα αμινοξύ σταθερού μεγέθους. Με την παραπάνω μεθοδολογία βρέθηκε ότι η ικανότητα του πεπτιδίου TgP1(2495-2511) να παρουσιάζεται, τόσο από μόρια A^k, όσο και από μόρια E^k, οφειλόταν στην παρουσία δύο διαφορετικών ελάχιστων επιτόπων στην αλληλουχία του (221). Επιπλέον, βρέθηκε ότι ο ελάχιστος επίτοπος του πεπτιδίου p184 (184-194) περιέχει την τυροσίνη στη θέση 192 (209) και ο ελάχιστος επίτοπος του πεπτιδίου hT4(2553) περιέχει την ορμόνη T4 (227).

2) Η δεύτερη τεχνική βασιζόταν στην ίδια μεθοδολογία ως προς την επιλογή των ελάχιστων επιτόπων, δίχως όμως τη χρήση υβριδωμάτων T λεμφοκυττάρων. Πιο ειδικά, για τον προσδιορισμό της θέσης του/ων T-επιτόπου/ων του παθογονικού πεπτιδίου p2340 χρησιμοποιήθηκαν επτά συνθετικά πεπτίδια (μήκους οκτώ με εννέα αμινοξέα). Τα πεπτίδια αυτά ήταν αλληλοεπικαλυπτόμενα και το ένα προέκυπτε από το άλλο αφαιρώντας δυο αμινοξέα από το αμινο-τελικό άκρο και προσθέτοντας δυο αμινοξέα στο καρβοξυ-τελικό άκρο. Με τον τρόπο αυτό βρέθηκαν δύο T-επίτοποι, ο p2344 (LTWVQTHIR) που ήταν ανοσογονικό μόνο στους ποντικούς των ευαίσθητων και όχι των ανθεκτικών στελεχών, και ο p2350 (HIRGFGGDP) που ενώ δεν ήταν ανοσογονικό αναγνωριζόταν μόνο από T λεμφοκύτταρα *in vivo* ενεργοποιημένων με το p2340 και μόνο των ποντικών SJL/J. Μάλιστα, το πεπτίδιο p2344 (LTWVQTHIR) ήταν ικανό να επάγει άμεση EAT στους ποντικούς των ευαίσθητων στελεχών (217).

5.1.2 Επαγωγή EAT σε ανθεκτικά στελέχη

Όσον αφορά στους T-επίτοπους της Tg που αναγνωρίζονται από T λεμφοκύτταρα ποντικών ανθεκτικών στελεχών, έχουν δοκιμαστεί 9 πεπτίδια [mTg691, mTg1646, mTg1677, mTg1744, mTg2051, mTg2086, TgP1(2495-2511), p2596, TgP2(2695-2713)] (210;223;224;226) και από αυτά 4 [mTg1677, mTg1744, mTg2051, mTg2086] βρέθηκαν να είναι ανοσογονικά σε ποντικούς που ανήκουν στο στέλεχος C57BL/10 (φέρει τον απλότυπο b), και ένα [mTg1677] ήταν και παθογονικό (άμεση EAT), μόνο όμως μετά από εξάλειψη των ρυθμιστικών T-κυττάρων τους (210). Τα πεπτίδια αυτά δεν έχουν χαρακτηριστεί ως προς το είδος του/ων επιτιπόπου/ων τους (κρυπτικός, ημι-επικρατής ή επικρατής). Σε πιο πρόσφατη μελέτη βρέθηκε πως άλλο ένα πεπτίδιο, το p2340, ήταν ανοσογονικό και παθογονικό τόσο στα ευαίσθητα στελέχη AKR/J, CBA/J (H-2^k) και SJL/J (H-2^s), όσο και στα ανθεκτικά C57BL/6 και BALB/c (H-2^d). Αν και η συγκεκριμένη μελέτη – που έχει διεξαχθεί στο Εργαστήριο Ανοσολογίας του Ε.Ι.Π. – αποτελεί την πρώτη διεθνή αναφορά επαγωγής EAT σε ευαίσθητα στελέχη, η εκδήλωση της νόσου παρατηρήθηκε μόνο μετά από παθητική μεταφορά *in vivo* και *in vitro* ενεργοποιημένων λεμφοκυττάρων με το πεπτίδιο αυτό (216).

5.1.3 Επαγωγή EAT σε διαγονιδιακούς ποντικούς που φέρουν το μόριο E^b

Έχουν δημιουργηθεί διαγονιδιακοί ποντικοί, οι οποίοι έφεραν τα μόρια του MHC που κωδικοποιούνται από το γονίδιο E του απλότυπου b (E^b) και διέθεταν το γενετικό υπόβαθρο των ποντικών του στελέχους C57BL/10. Το μόριο E^b δεν εκφράζεται στους φυσιολογικούς ποντικούς. Με αυτό τον τρόπο έχουν δημιουργηθεί, είτε ποντικοί οι οποίοι εξέφραζαν τόσο το μόριο που κωδικοποιείται από το γονίδιο A του απλότυπου b (A^b) όσο και το E^b (H2A+E+/B10), είτε ποντικοί οι οποίοι εξέφραζαν μόνο το μόριο E^b (H2A-E+/B10) (130;210). Έχουν δοκιμαστεί έξι πεπτίδια [mTg691, mTg1646, mTg1677, mTg1744, mTg2051, mTg2086] στους ποντικούς H2A+E+/B10 και τέσσερα [mTg/hTg179, mTg/hTg409, hTg410, mTg/hTg1241] στους ποντικούς H2A-E+/B10. Τέσσερα πεπτίδια [mTg1677, mTg1744, mTg2051, mTg2086] ήταν ανοσογονικά στους ποντικούς H2A+E+/B10 μετά από εξάλειψη των ρυθμιστικών T λεμφοκυττάρων τους και δύο [mTg/hTg179, mTg409] ήταν ανοσογονικά στους ποντικούς H2A-E+/B10 (210;228). Στους

ποντικούς H2A-E+/B10 χαρακτηρίστηκαν επιπλέον δύο πεπτίδια [hTg410, hTg1241] ως ανοσογονικά, γιατί αναγνωρίζονταν *in vitro*, από T λεμφοκύτταρα *in vivo* ενεργοποιημένα με Tg (210). Ένα από τα τέσσερα ανοσογονικά πεπτίδια [mTg1677] των ποντικών H2A+E+/B10 ήταν παθογονικό με άμεση EAT μετά από εξάλειψη των ρυθμιστικών T-κυττάρων, και δύο από τα πέντε συνολικά ανοσογονικά πεπτίδια [mTg/hTg179, mTg/hTg410] των ποντικών H2A-E+/B10 ήταν παθογονικά, το ένα όμως [mTg/hTg179] μόνο μετά από εξάλειψη των ρυθμιστικών T-κυττάρων (228). Ο επίτοπος που φέρει το πεπτίδιο hTg410 χαρακτηρίστηκε ως ημι-επικρατής, και ικανός να επάγει την ενεργοποίηση κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων των ποντικών H2A-E+/B10, αλλά και να παρουσιάζεται από τα μόρια τάξης I του MHC, μετά από *in vitro* και *in vivo* επεξεργασία της Tg από κύτταρα των ποντικών αυτών (161;210).

5.1.4 Επαγωγή EAT σε ανθρωποποιημένους ποντικούς

Σε μία προσπάθεια αναγωγής της πειραματικής θυρεοειδίτιδας στην ανθρώπινη νόσο δοκιμάστηκαν στελέχη διαγονιδιακών ποντικών που εκφράζουν τα MHC μόρια DR3 ή DQ8 του ανθρώπου. Στα στελέχη αυτά χορηγήθηκαν συνολικά 39 πεπτίδια της Tg, 4 από τα οποία δοκιμάστηκαν και στα δύο διαγονιδιακά ζώα, ενώ τα υπόλοιπα μόνο στα DR3. Από τη μελέτη αυτή βρέθηκαν πέντε ανοσογονικά πεπτίδια στους DR3 διαγονιδιακούς ποντικούς, Tg2098, hTg181, hTg418, hTg1518 και hTg2079, τα οποία αναγνωρίζονταν *in vitro* από T λεμφοκύτταρα *in vivo* ενεργοποιημένα με Tg (υπο-επικρατείς επίτοποι). Δύο από αυτά, hTg181 και hTg2079, ήταν και παθογονικά στους συγκεκριμένους ποντικούς με άμεση EAT (206;213).

5.1.5 Συσχέτιση EAT με την ανθρώπινη νόσο

Τα τελευταία τέσσερα χρόνια αρκετό ενδιαφέρον συγκεντρώνει ο προσδιορισμός παθογονικών T-επιτόπων της Tg που αναγνωρίζονται από T λεμφοκύτταρα ασθενών με HT. Μέσω της επεξεργασίας της ανθρώπινης Tg σε όξινο pH με καθεψίνες, που εκφράζονται φυσιολογικά στο θυρεοειδή αδένα, χαρακτηρίστηκαν οι αμινοξικές αλληλουχίες των πεπτιδίων που προέκυψαν και ελέγχθηκε με αλγόριθμους η δυνατότητα παρουσιάσής τους από το μόριο HLA (DRβ-Arg-74)

που έχει συνδεθεί με ευαισθησία ως προς τη ΗΤ. Στη συνέχεια τα μόρια του ΜΗC εκφράστηκαν από κύτταρα του βακτηρίου *Escherichia coli* και τα πεπτίδια ελέγχθηκαν *in vitro* ως προς την ικανότητά τους να συνδέονται στα παραπάνω μόρια. Με τον τρόπο αυτό χαρακτηρίστηκαν τα πεπτίδια 2100-2111, 1571-1597, 1951-1964 και 1409-1424 (229). Από αυτά, το 2100-2111 περιέχει το ήδη γνωστό πεπτίδιο p2102 και το 1571-1597 περιέχει το πεπτίδιο p1579. Και τα δύο αυτά πεπτίδια είναι παθογονικά σε ποντικούς του ευαίσθητου ως προς την ΕΑΤ στελέχους CBA/J (207).

Μία ακόμη μελέτη συσχέτισης της ΕΑΤ με την ανθρώπινη νόσο είχε ως αντικείμενο τα πεπτίδια που παρουσιάζονται στον ανθρώπινο θυρεοειδή αδένα. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν ιστοί από το θυρεοειδή αδένα ασθενών με νόσο GD και εκλούστηκαν τα πεπτίδια από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Η μελέτη αυτή χαρακτήρισε τα πεπτίδια Tg2098 (2098-2112), Tg2508 (2508-2519), Tg2520 (2520-2536) και Tg2756 (2756-2765) (230). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το πεπτίδιο Tg2098 που ήταν ανοσογονικό σε διαγονιδιακούς DR3 ποντικούς (231) αλλά αναγνωριζόταν επίσης *in vitro* από Τ λεμφοκύτταρα από ασθενείς με ΗΤ (213).

5.1.6 Συνθετικά πεπτίδια της θυρεοσφαιρίνης που αναγνωρίζονται από αντισώματα

Μελέτες χαρακτηρισμού των Τ-επιτόπων της Tg έχουν αναδείξει πεπτίδια που περιέχουν και Β-επιτόπους, λόγω της ικανότητάς τους να επάγουν την παραγωγή αντισωμάτων. Μεταξύ των παθογονικών πεπτιδίων της Tg, σε 10 πεπτίδια των ευαίσθητων φυλών [hT4(5), I-p117, p2102, p2340, TgP1 (2495-2511), p2529/I-p2529, p2540/I-p2540, hT4(2553), p2596, TgP2(2695-2713)] και σε ένα των διαγονιδιακών ποντικών A-E+/B10 [mTg409] ανιχνεύτηκαν ειδικά αντισώματα (129;197;207;208;216;219;220;223;224;226). Το πεπτίδιο p2340 προκάλούσε την παραγωγή ειδικών αντισωμάτων και στις ανθεκτικές φυλές ποντικών που δοκιμάστηκε (216). Η ίδια παρατήρηση έχει γίνει και σε μη-παθογονικά πεπτίδια, σε ποντικούς που ανήκουν σε ευαίσθητα στελέχη [P40, TgP2 (2695-2713)] (218;224) και σε ποντικούς που ανήκουν σε ανθεκτικά στελέχη [TgP1 (2495-2511)]

και TgP2(2695-2713)] (224;226). Από αυτά τα αντικρουόμενα αποτελέσματα ενισχύεται ο δευτερεύων ρόλος των αντισωμάτων στην EAT.

Αξιοσημείωτο είναι πως τέσσερα από τα παραπάνω πεπτίδια [I-p117, P40, TgP1(2495-2511), hT42553] αναγνώριζαν και ολόκληρο το μόριο της Tg (197;208;218;226), ενώ ένα [TgP2(2695-2713)] μόνο μετά από τη μετουσίωση της Tg με αύξηση της θερμοκρασίας (224).

5.2 ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΙΜΕΡΟΥΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ EAT

5.2.1 Ρόλος ιωδίσωσης

Η αύξηση της πρόσληψης του ιωδίου έχει συνδεθεί με την αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα σε γενετικά ευαίσθητα άτομα. Η παρατήρηση αυτή έχει αποτελέσει σε αρκετές μελέτες το εναρκτήριο λάκτισμα για την ανάλυση της ανοσογονικότητας και παθογονικότητας πεπτιδίων της Tg που φέρουν, ορμονογονικές περιοχές, ή τυροσίνες, σε αμιγή στελέχη ποντικών, με σκοπό τη σύγκριση των ιδιοτήτων πεπτιδίων της Tg με ή χωρίς ιώδιο.

Συνολικά, τα αποτελέσματα των μελετών αυτών είναι αντικρουόμενα. Έχουν εντοπιστεί τα πεπτίδια p117, p304, p1931 και hT4(2553) των οποίων η ανοσογονικότητα ή/και παθογονικότητά τους ήταν συνδεδεμένη με την ύπαρξη του ιωδίου (205;208), και μάλιστα μετέτρεπε τον κρυπτικό επίτοπο του hT4(2553) σε ημι-επικρατή (205), ενώ στα πεπτίδια p179, p2529, p2540, hT4(5) hT4(2553), hT4(2567) η ύπαρξη ιωδίου δεν τροποποιούσε την ανοσογονικότητα ή/και παθογονικότητά τους (129). Ο ρόλος της ιωδίσωσης στην ανοσογονικότητα της Tg έχει περιγραφεί με πειράματα ανταγωνισμού, όπου βρέθηκε πως για ορισμένα πεπτίδια το ιώδιο παίζει σημαντικό ρόλο στην πρόσδεσή τους στα μόρια του MHC. Μέσω της δημιουργίας T λεμφοκυτταρικών κλώνων από ποντικούς ανοσοποιημένους με Tg, οι οποίοι αναγνώριζαν είτε το πεπτίδιο hT4(2553) με ιώδιο, είτε το πεπτίδιο p2498 χωρίς ιώδιο προσδιορίστηκε η ικανότητα παρεμπόδισης της πρόσδεσης των παραπάνω πεπτιδίων στα μόρια του MHC από το μη ιωδιωμένο ανάλογο του hT4(2553) ή από τα πεπτίδια από τα ιωδιωμένα και μη, ανάλογα των πεπτιδίων p117, p304 και p1931 (232). Διαπιστώθηκε ότι τα ανάλογα χωρίς ιώδια T0(2553), p117 και p304 δεν μπορούσαν να αναστείλουν την

παρουσίαση των πεπτιδίων T4(2553) και p2498 από τα μόρια του MHC αναδεικνύοντας έτσι τη σημασία του ιωδίου στην πρόσδεσή τους στα μόρια του MHC. Από την άλλη, η πρόσδεση στα μόρια του MHC των πεπτιδίων p179 και p1931 δεν επηρεαζόταν από την ύπαρξη ή μη ιωδίου (208). Σε μία δεύτερη μελέτη με το πεπτίδιο p179 παράχθηκαν υβριδώματα T λεμφοκυττάρων για το ιωδιωμένο και μη ιωδιωμένο ανάλογό του, και βρέθηκε πως η αναγνώριση των πεπτιδίων από τους κλώνους δε συνδεόταν με την παρουσία ή μη του ιωδίου (209).

Αντίστοιχες μελέτες με ολόκληρο το μόριο της Tg και τη σημασία της ιωδίωσής της στην αντιγονοπαρουσίαση, έχουν οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι η υπεριωδίωση της Tg τροποποιεί την επεξεργασία της από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και οδηγεί στην παρουσίαση κρυπτικών επιτόπων. Πιο ειδικά, ενώ το πεπτίδιο p2495 (2495-2511) περιλαμβάνει έναν κρυπτικό παθογονικό επίτοπο, όταν T λεμφοκύτταρα *in vivo* ενεργοποιημένα με υπεριωδιωμένη Tg (>60 άτομα ιωδίου/μονομερές Tg σε σχέση με τη φυσιολογική που περιέχει 15-20 άτομα/μονομερές Tg) καλλιεργηθούν παρουσία αυτού, τότε το πεπτίδιο επάγει τον πολλαπλασιασμό τους. Αντίστοιχα, η δημιουργία T κυτταρικού κλώνου ειδικού για το πεπτίδιο αυτό, έδειξε πως μόνο τα υπεριωδιωμένα μόρια της Tg μπορούσαν να επάγουν τον *in vitro* πολλαπλασιασμό τους (233).

Από όλα τα παραπάνω φαίνεται πως τα μόρια του ιωδίου μπορούν να τροποποιούν την επεξεργασία της Tg από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, να εμπλέκονται στη σύνδεση πεπτιδίων της Tg με μόρια MHC, και στην αναγνώριση πεπτιδίων της Tg από T λεμφοκύτταρα.

5.2.2 Ρόλος αντι-TG

Ο ρόλος των αντισωμάτων έναντι Tg μελετήθηκε σε συνάρτηση με την αντιγονοπαρουσίαση του μορίου και τις αλλαγές που μπορεί να επιφέρει ένα ανοσοσύμπλοκο μεταξύ της Tg και των αντι-Tg αντισωμάτων. Σε μία τέτοια μελέτη παράχθηκαν υβριδώματα T λεμφοκυττάρων και μονοκλωνικά αντισώματα από ποντικούς ανοσοποιημένους με Tg ποντικού και ελέγχθηκε η δραστηρότητά τους έναντι παθογονικών πεπτιδίων της Tg. Αναλύθηκαν 2 πεπτίδια, το T4(2553) – με έναν ημι-επικρατή επίτοπο που παρουσιάζεται μετά από την *in vivo* επεξεργασία της Tg από αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα ποντικών – και το TgP1(2495-2511) –

που περιέχει κρυπτικό επίτοπο και είναι παθογονικό σε ποντικούς ευαίσθητων στελεχών. Βρέθηκε πως η *in vitro* επεξεργασία των συμπλόκων της Tg με τα παραπάνω μονοκλωνικά αντισώματα από τα B-κύτταρα είχε ως αποτέλεσμα την παρουσίαση του ημι-επικρατή επιτόπου του T4(2553), όχι όμως του κρυπτικού TgP1(2495-2511). Φαίνεται πως η παρουσία αντισωμάτων ευθύνεται για την τροποποίηση της επεξεργασίας της Tg από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, επηρεάζοντας την επικράτεια ενός επιτόπου (192).

5.2.3 Ρόλος μοριακής μίμησης

Η μοριακή μίμηση έχει στο παρελθόν προταθεί ως πιθανός μηχανισμός για την παράλληλη εκδήλωση της αυτοάνοσης θυρεοειδίτιδας παρουσία κάποιας μικροβιακής μόλυνσης. Σε μία προσπάθεια διερεύνησης αυτής της παραδοχής, αναλύθηκε το πεπτίδιο hTg(2695-2713), το οποίο είχε βρεθεί να είναι παθογονικό σε ποντικούς του στελέχους SJL/J. Η αμινοξική αλληλουχία του συγκρίθηκε με τις αλληλουχίες πρωτεϊνών από μικρόβια για τυχόν ομοιότητες με αυτά. Από τις κοινές αλληλουχίες, επιλέχθηκαν αυτές με ομολογία μεγαλύτερη του 30% και βρέθηκαν πέντε πρωτεΐνες που πληρούσαν αυτά τα κριτήρια: η DNA-κατευθυνόμενη RNA πολυμεράση, η πρωτεΐνη του αδενοϊού E1B, η πρωτεΐνη ροί του ρετροϊού και η πρωτεΐνη θερμικού στρες. Ειδικά για το πεπτίδιο E1B368-381, η υψηλή του ομοιότητα με το hTg(2695-2713) με 14 συνεχόμενα ίδια αμινοξέα οδήγησε στην επιλογή του για περαιτέρω ανάλυση. Έτσι, βρέθηκε πως το E1B368-381 μπορούσε να επάγει τον *in vitro* πολλαπλασιασμό T λεμφοκυττάρων ποντικών του στελέχους SJL/J *in vivo* ενεργοποιημένων με το hTg(2695-2713), ενώ η χορήγηση του ιικού πεπτιδίου προκαλούσε μικρής έκτασης ενεργοποίηση T λεμφοκυττάρων και δεν ήταν παθογονικό. Ένα λοιπόν ιικό πεπτίδιο με ομοιότητα αλληλουχίας με πεπτίδιο της Tg είναι ικανό να αυξήσει τον αριθμό των παθογονικών T-κυττάρων, όχι όμως και να επιδείνωση την εκδήλωση της νόσου (234).

5.2.4 Ρόλος των A και E γονιδίων

Όπως περιγράφηκε από τις πρώτες μελέτες συσχέτισμού των MHC γονιδίων με την ευαισθησία στην εκδήλωση της EAT από το κεφάλαιο 3.5.2, το γονίδιο A δείχνει να παίζει σημαντικό ρόλο στον καθορισμό της. Από την άλλη, σε ζώα που

φέρουν μόρια του γονιδίου E, ενώ παρουσιάζουν διήθηση του θυρεοειδή τους αδένες και υψηλούς τίτλους αντι-Tg αντισωμάτων, ο ρόλος των μορίων αυτών είναι αμφιλεγόμενος.

Η μελέτη του ρόλου των γονιδίων A και E στην ανάπτυξη της EAT έχει γίνει με τη χρήση παθογονικών πεπτιδίων της Tg. Έτσι, το παθογονικό πεπτίδιο TgP1(2495-2511) ελέγχθηκε σε διαγονιδιακούς ποντικούς, οι οποίοι έφεραν συνδυασμούς από διαφορετικά γονίδια A και E. Στο μοντέλο αυτό δημιουργήθηκαν οι ποντικοί B10.BR που εκφράζουν τα μόρια A^k και E^k , οι B10.A(4R) που εκφράζουν τα μόρια A^k και E^b και οι B10.A(5R) τα μόρια A^b και E^k και βρέθηκε πως το TgP1(2495-2511) ήταν ανοσογονικό και παθογονικό μόνο στους ποντικούς B10.BR (A^k και E^k). Το γονίδιο λοιπόν E^k όταν εκφράζεται δεν είναι ικανό να μετατρέψει τους διαγονιδιακούς αυτούς ποντικούς σε ευαίσθητους (219). Σε άλλη παρόμοια μελέτη διερευνήθηκε η αλληλεπίδραση των γονιδίων A και E στην επαγωγή της EAT. Βάση της παρατήρησης ότι ορισμένα μόρια του MHC μπορούν να παρουσιάσουν πεπτίδια που προέρχονται από άλλα μόρια του MHC, ελέγχθηκε η ικανότητα πεπτιδίων να ανταγωνίζονται την πρόσδεση άλλων πεπτιδίων στα ίδια μόρια MHC. Έτσι, το πεπτίδιο Eα52-68, το οποίο προέρχεται από μόρια E^b και παρουσιάζεται από τα μόρια A^b του MHC, δοκιμάστηκε ως προς τον ανταγωνισμό του με τα πεπτίδια mTg1677, mTg2051, mTg2086, τα οποία παρουσιάζονται από τα μόρια A^b διαγονιδιακών ποντικών και είναι ανοσογονικά σε αυτούς. Όταν σπληνοκύτταρα ανοσοποιημένων διαγονιδιακών ποντικών με τα παραπάνω πεπτίδια καλλιεργήθηκαν *in vitro* παρουσία των πεπτιδίων ανοσοποίησης και του πεπτιδίου Eα52-68 παρατηρήθηκε πως το πεπτίδιο αυτό ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων που ήταν ειδικά για το mTg1677, όμως *in vivo* δεν παρεμπόδιζε την εκδήλωση EAT στους ποντικούς αυτούς από το mTg1677. Η επίδραση λοιπόν ενός ανταγωνιστικού πεπτιδίου στην πρόσδεση στα MHC μόρια ποντικού, ενδεχομένως να μην είναι αρκετή για την προστασία από την εκδήλωση EAT (228).

5.2.5 Ρόλος πρωτεολυτικών ενζύμων

Η διαπίστωση πως η Tg υπόκειται σε ενζυμική επεξεργασία από διάφορα πρωτεολυτικά ένζυμα, για την απελευθέρωση των ορμονών που φέρει, οδήγησε μία ερευνητική ομάδα στη μελέτη αλληλουχιών που εντοπίζονται κοντά στις θέσεις

πρόσδεσης των πρωτεολυτικών ενζύμων. Πιο ειδικά, η συγκεκριμένη μελέτη βασίστηκε στην ιδέα πως οι αλληλουχίες αυτές ενδέχεται να αποτελούν διατηρημένες, προσβάσιμες περιοχές της Tg, και ο πιθανός εντοπισμός ενός επιτόπου σε μία τέτοια θέση αυξάνει την πιθανότητα ο επιτόπος αυτός να είναι ανοσογονικός και επικρατής. Ο εντοπισμός των θέσεων έγινε σε συνδυασμό με την ικανότητά τους να προσδένονται σε μόρια A^k ποντικών και επιλέχθηκαν 5 12μερή πεπτίδια για την ανάλυση της ανοσογονικότητάς τους [557-568, 771-781, 1822-1832, 2369-2380, 2439-2450]. Από αυτά, μόνο τα 2 [2369-2380, 2439-2450] ήταν ανοσογονικά και παθογονικά στη φυλή CBA/J που δοκιμάστηκαν, με άμεση EAT αλλά και με παθητική μεταφορά *in vivo* ενεργοποιημένων T λεμφοκυττάρων με το πεπτίδιο (212). Βλέπουμε λοιπόν πως ο εντοπισμός ενός επιτόπου κοντά σε παρόμοιες θέσεις αποκοπής των πρωτεολυτικών ενζύμων ενδέχεται να προάγει την επεξεργασία και παρουσίασή τους από τα μόρια του MHC και έτσι να τα καθιστά ανοσογονικά και παθογονικά.

6. ΠΕΠΤΙΔΙΑ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Το πεπτίδιο p2208 έχει μήκος 20 αμινοξέων και καταλαμβάνει τις αμινοξικές θέσεις 2208 έως 2227 της πολυπεπτιδικής αλυσίδας της ανθρώπινης Tg. Διαφέρει κατά τέσσερα αμινοξέα από το ομόλογο πεπτίδιο της Tg του ποντικού, και παρουσιάζει συνεπώς 80% ομολογία [πίνακας 3]. Πιο συγκεκριμένα, διαθέτει στις θέσεις 2208, 2221, 2222 και 2225 τα αμινοξέα γλουταμίνη (Q), γλουταμικό οξύ (E), αργινίνη (R) και Q, όπου στις αντίστοιχες θέσεις το ομόλογο πεπτίδιο διαθέτει τα αμινοξέα R, ασπαρτικό οξύ (D), ασπαραγίνη (N) και R. Είναι αξιοσημείωτο ότι τρία από τα τέσσερα διαφορετικά αμινοξέα (Q, E, Q) αποτελούν συντηρητικές αλλαγές. Τα αμινοξέα διαχωρίζονται σε τέσσερις κατηγορίες, βασικά, όξινα, υδρόφιλα και υδρόφοβα, και κάθε αλλαγή ενός αμινοξέος σε άλλο της ίδιας ομάδας ονομάζεται συντηρητική. Το p2208 περιέχει μία τυροσίνη στην αλληλουχία του, η οποία ενδεχομένως να ιωδιώνεται αν το πεπτίδιο είναι αρκετά εκτεθειμένο στο μόριο της Tg και επίσης φαίνεται να γλυκοζυλιώνεται. Παράλληλα, περιέχει συνολικά τέσσερις προλίνες, στις θέσεις 6, 10, 11 και 20 της αλληλουχίας του, γεγονός που του προσδίδει μία ιδιαίτερη δευτεροταγή δομή, κυρίως λόγω της κεντρικής θέσης που καταλαμβάνουν. Η προλίνη είναι ένα αλειφατικό, κυκλικό αμινοξύ και επηρεάζει ιδιαίτερα την πρωτεϊνική αρχιτεκτονική και ιδιαίτερα την δευτεροταγή δομή μιας πεπτιδικής αλυσίδας. Ο δακτύλιός της δεσμεύει το επόμενο αμινοξύ δύο φορές, προσδίδοντας έτσι ακαμψία και διακοπή της αναδίπλωσης της πεπτιδικής αλυσίδας σε α-έλικα καθώς και το σχηματισμό στροφής. Οι ιδιότητες αυτές συχνά είναι ο λόγος που οι προλίνες εντοπίζονται στην επιφάνεια των περισσότερων πρωτεϊνών.

Το πεπτίδιο p2352 έχει μήκος 20 αμινοξέων και καταλαμβάνει τις αμινοξικές θέσεις 2352 έως 2371 της πολυπεπτιδικής αλυσίδας της ανθρώπινης Tg. Διαφέρει κατά πέντε αμινοξέα από το ομόλογο πεπτίδιο της Tg του ποντικού, και παρουσιάζει συνεπώς 75% ομολογία [πίνακας 3]. Πιο συγκεκριμένα, διαθέτει στις θέσεις 2352, 2353, 2359, 2362 και 2368 τα αμινοξέα R, γλυκίνη (G), R, σερίνη (S) και G, ενώ το ομόλογο πεπτίδιο διαθέτει τα αμινοξέα G, αλανίνη (A), Q, θρεονίνη (T) και S. Μόνο δύο (R, S) από τα πέντε διαφορετικά αμινοξέα αποτελούν συντηρητικές αλλαγές. Το p2352 δεν περιέχει τυροσίνη στην αλληλουχία του και συνεπώς δεν ιωδιώνεται,

και κατά πάσα πιθανότητα φαίνεται να μη γλυκοζυλιώνεται. Και αυτό το πεπτίδιο διαθέτει προλίνη στο κεντρικό του τμήμα, η οποία προκαλεί τη διακοπή της αναδίπλωσης σε α-έλικα.

Το πεπτίδιο p2472 έχει και αυτό μήκος 20 αμινοξέων, καταλαμβάνει τις αμινοξικές θέσεις 2472 έως 2491 της πολυπεπτιδικής αλυσίδας της ανθρώπινης Tg και διαφέρει κατά επτά αμινοξέα από το ομόλογο πεπτίδιο της Tg του ποντικού, με ομολογία 65% [πίνακας 3]. Πιο ειδικά, διαθέτει στις θέσεις 2472, 2474, 2476, 2480, 2482, 2484 και 2491 τα αμινοξέα προλίνη (P), A, A, S, τρυπτοφάνη (W), E και S ενώ το ομόλογο πεπτίδιο διαθέτει τα αμινοξέα λευκίνη (L), S, R, P, P, λυσίνη (K) και G. Μόνο δύο (A, E) από τα επτά διαφορετικά αμινοξέα αποτελούν συντηρητικές αλλαγές. Το p2472 δεν περιέχει τυροσίνη στην αλληλουχία του και συνεπώς δεν ιωδιώνεται, και κατά πάσα πιθανότητα φαίνεται να μη γλυκοζυλιώνεται. Τέλος, φέρει δύο προλίνες, οι οποίες όμως λόγω της θέσης τους στην αρχή του μορίου (θέσεις 1 και 2), δεν κατέχουν σημαντικό ρόλο στη μορφολογία του πεπτιδίου.

Πίνακας 3: Τα πεπτίδια της παρούσας μελέτης και η σύγκρισή τους με την θυρεοσφαίρινη του ποντικού. Κάθε διαφορετικό αμινοξύ φέρει είτε διπλή υπογράμμιση, ένδειξη συντηρητικής αλλαγής, είτε είναι κόκκινου χρώματος, ένδειξη μη-συντηρητικής αλλαγής. Η συνολική ομολογία των πεπτιδίων με τα αντίστοιχα των ποντικών υπολογίστηκε σε ποσοστιαίες μονάδες και δε συμπεριλαμβάνει τα συντηρητικά αμινοξέα.

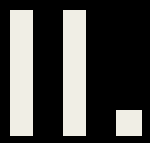
	Αμινοξική αλληλουχία	Ομολογία
p2208 ανθρώπου	<u>Q</u> FLGV P YAAPPLA <u>E</u> R RF <u>Q</u> AP	80%
ποντικού	RFLGV P YAAPPLADNRFRAP	
p2352 ανθρώπου	R GFGGDP <u>RR</u> V <u>S</u> LAADRGGAD	75%
ποντικού	GAFGGDPQRVTLAADRSGAD	
p2472 ανθρώπου	P <u>P</u> AR A LKRSL W <u>V</u> EVDLLIGS	65%
ποντικού	LPSRRLKRPLPVKVDLLIGG	

Τα παραπάνω πεπτίδια εντοπίστηκαν για πρώτη φορά σε μελέτη χαρακτηρισμού Β-επιτόπων του καρβοξυ-τελικού τμήματος της Tg, που επιλέχθηκε λόγω της υψηλής ομολογίας (28%) και κοινής τεταρτοταγής δομής με την καταλυτική υπομονάδα της AChE. Η AChE είναι ένζυμο, το οποίο βρίσκεται στις χολινεργικές

συνάψεις του κεντρικού και περιφερικού νευρικού συστήματος και είναι το αυτοαντιγόνο των οφθαλμών που έχει ενοχοποιηθεί για την εκδήλωση οφθαλμοπάθειας σε ασθενείς με νόσο του Graves. Στόχος της παραπάνω μελέτης ήταν ο προσδιορισμός των B-επιτόπων της Tg, οι οποίοι αναγνωρίζονταν από τα αντισώματα των ασθενών με νόσο του Graves, οι οποίοι έπασχαν και από οφθαλμοπάθεια. Για το σκοπό αυτό συντέθηκαν αλληλεπικαλυπτόμενα πεπτίδια (αλληλοεπικάλυψη κατά 8 αμινοξέα) μεγέθους 20 αμινοξέων, που κάλυπταν το καρβοξυ-τελικό τμήμα της Tg (από αμινοξική θέση 2171 μέχρι αμινοξική θέση 2748), με την τεχνική των ραβδίων. Στη συνέχεια, επιλέχθηκαν οι οροί τεσσάρων ασθενών με νόσο του Graves, οι οποίοι αντιδρούσαν, τόσο με την Tg, όσο και την AChE και τριών υγιών μαρτύρων, από τους οποίους απομονώθηκαν τα αντισώματα τάξης G και μελετήθηκε η ικανότητά τους να αναγνωρίζουν τα παραπάνω πεπτίδια με ELISA. Δεκαεπτά από τα 48 συνολικά πεπτίδια αναγνωρίζονταν από τα αντισώματα και των τεσσάρων ορών ασθενών με νόσο του Graves, εννέα αναγνωρίζονταν από τα αντισώματα τριών από τους τέσσερις, εννέα από τα αντισώματα δύο από τους τέσσερις και έντεκα από τα αντισώματα ενός από τους τέσσερις. Στη συνέχεια, προς επιβεβαίωση του ποια από τα παραπάνω πεπτίδια αποτελούσαν όντως επιτόπους της Tg, ελέγχθηκε η αναγνώριση τους από τα ειδικά για την Tg αντισώματα των ορών των παραπάνω ασθενών καθώς και από αντισώματα των ίδιων ορών απαλλαγμένα από τα αντι-Tg. Τα παραπάνω αντι-Tg αντισώματα βρέθηκε να αναγνωρίζουν τα πεπτίδια p2208, p2340 (αμινοξικές θέσεις: 2340-2359), p2472 p2652 (αμινοξικές θέσεις: 2652-2671), ενώ τα αντισώματα, τα οποία είχαν απαλλαγεί από τα ειδικά για την Tg αντισώματα δεν αναγνώριζαν καθόλου τα πεπτίδια αυτά. Στη συνέχεια, τα τρία από αυτά τα πεπτίδια (p2340, p2472 και p2652) μελετήθηκαν ως προς την αναγνώριση τους από 99 ορούς ασθενών με νόσο του Graves, 32 με HT και 45 υγιών αντίστοιχης ηλικίας και φύλου. Συγκεκριμένα, για το p2340 βρέθηκε ότι το 22,2% των ασθενών με νόσο του Graves (22/99), 0% των ασθενών με HT (0/32) και 0% των υγιών (0/45) αναγνώριζαν το πεπτίδιο αυτό. Δεν βρέθηκε καμία συσχέτιση του πεπτιδίου αυτού με τους ορούς των ασθενών με νόσο του Graves, οι οποίοι έπασχαν και από οφθαλμοπάθεια. Άρα, το p2340 αποτελεί έναν B-επίτοπο της Tg, ο οποίος αναγνωρίζεται από ορούς ασθενών με νόσο του Graves.

Με έναυσμα τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής, επιλέξαμε τα τρία προαναφερθέντα πεπτίδια, με κριτήριο την προβλεπόμενη ικανότητά τους να προσδένονται σε μόρια τάξης A^s, A^b και E^k, τα οποία εμπλέκονται στη παθογένεια της EAT. Η ανάλυση διενεργήθηκε με τη χρήση ειδικών αλγόριθμων με βάση τις αλληλουχίες μεγάλου αριθμού πεπτιδίων, τα οποία είναι γνωστό ότι συνδέονται στα εκάστοτε μόρια του MHC και αναγνωρίζονται από T λεμφοκύτταρα.

Πιο ειδικά, ο αλγόριθμος της ομάδας του Altuvia δημιουργήθηκε μέσω μίας βιβλιοθήκης βοηθητικών T-λεμφοκυττάρων με τη διερεύνηση της ικανότητας διάφορων πεπτιδίων να προσδένονται στα κύτταρα αυτά. Στα πεπτίδια αναγνωρίστηκαν αμινοξέα ικανά να προσδεθούν σε MHC μόρια, τα οποία βάση των φυσικο-χημικών και δομικών ιδιοτήτων τους (υδροφοβικότητα, φορτίο κ.ά.) διαχωρίστηκαν σε τρία μοτίβα για τα μόρια A^k και πέντε για τα μόρια E^k. Αντίστοιχα, η βάση δεδομένων RANKPEP δημιουργήθηκε από μία σειρά γνωστών πεπτιδίων που προσδένονται σε MHC μόρια, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τον ορισμό κλίμακας πιθανής πρόσδεσης αμινοξέων (position specific score). Σύμφωνα με την κλίμακα αυτή, ένα πεπτίδιο δύναται να προσδεθεί σε ένα μόριο MHC αν η σύγκριση της αλληλουχίας του με τα γνωστά πεπτίδια-προσδέτες για το μόριο αυτό, καταλήγει σε σκορ που ξεπερνάει το κατώφλι πρόσδεσης της αντίστοιχης MHC κλίμακας.



ΣΚΟΠΟΣ

Τα δύο κύρια αυτοάνοσα νοσήματα του θυρεοειδή αδένος είναι η θυρεοειδίτιδα Hashimoto (Hashimoto's thyroiditis - HT) και η νόσος Graves' (Graves' disease - GD). Η HT χαρακτηρίζεται από μειωμένη παραγωγή των ορμονών T3 και T4, που οδηγεί σε υποθυρεοειδισμό και είναι κυτταρο-μεσολαβούμενη νόσος, αφού ο αδένος καταστρέφεται από διηθητικά αυτοδραστικά T λεμφοκύτταρα έναντι της θυρεοσφαιρίνης (Tg) [ιωδογλυκοπρωτεΐνη 660 kDa, στο εσωτερικό των θυλακίων του θυρεοειδή αδένος, υπόστρωμα για τη σύνθεση των ορμονών T3 και T4]. Αντίθετα, η GD χαρακτηρίζεται από αυξημένη παραγωγή των θυρεοειδικών ορμονών και οφείλεται σε παθογονικά αυτοαντισώματα έναντι του υποδοχέα της θυρεοειδοτρόπου ορμόνης. Ένα από τα κοινά χαρακτηριστικά των δύο νοσημάτων είναι η ύπαρξη κυκλοφορούντων αυτοαντισωμάτων έναντι της Tg (με υψηλότερους τίτλους στη HT), τα οποία ενώ δε φαίνεται να έχουν κυρίαρχο παθογονικό ρόλο, αποτελούν αξιολογικό ορολογικό δείκτη, ευρέως χρησιμοποιούμενο στη διαγνωστική ρουτίνα. Από τις μέχρι σήμερα μελέτες, δεν έχει καταδειχθεί σαφής ορολογική διαφοροποίηση μεταξύ των δύο αυτοάνοσων νοσημάτων του αδένος με τη χρήση πεπτιδίων (<100 αμινοξέα) της Tg. Τα παραπάνω καθιστούν την Tg ελκυστικό μόριο μελέτης των επιτόπων της σε επίπεδο B-κυττάρων.

Η υπάρχουσα γνώση γύρω από τους μηχανισμούς παθογένειας των δύο αυτοάνοσων ασθενειών έχει προέλθει την τελευταία 20ετία από την ανάπτυξη και μελέτη πειραματικών ζωικών μοντέλων. Για τη HT, έχει εφαρμοστεί με επιτυχία η λεμφοκυτταρική πειραματική αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα (Experimental Autoimmune Thyroiditis-EAT), που επάγεται στον ποντικό με τη χορήγηση πεπτιδίων της Tg, που φέρουν T-επιτόπους. Τα στελέχη των ποντικών διαφοροποιούνται ως προς την εκδήλωση της νόσου σε ευαίσθητα (high responders-HR) και ανθεκτικά (low responders-LR), με τεράστιο όγκο δεδομένων για τα πρώτα (21 παθογονικά πεππίδια), ενώ για τα δεύτερα υπάρχει περιορισμένη γνώση [1 παθογονικό πεππίδιο, p2340(2340-2359)] και προέρχεται από το Εργαστήριο Ανοσολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ. Τα παραπάνω καθιστούν την Tg ελκυστικό μόριο μελέτης όχι μόνο των B-, αλλά και των T-επιτόπων της.

Στο πρώτο μέρος της διατριβής έγινε προσπάθεια ανίχνευσης πεπτιδίων-στόχων στην ανθρώπινη Tg, που πιθανά θα διαχωρίζουν ορολογικά τα δύο αυτοάνοσα θυρεοειδικά νοσήματα, και θα αποτελούν δείκτες της HT. Η ταυτοποίηση νοσο-

ειδικών επιτόπων στο μόριο της Tg θα μπορούσε να οδηγήσει στην ανάπτυξη ενός αξιόπιστου και χαμηλού κόστους διαγνωστικού εργαλείου, με τη χρήση μικρών συνθετικών πεπτιδίων αυτής. Στο Εργαστήριο Ανοσολογίας, στην προσπάθεια χαρτογράφησης B-επιτόπων της Tg που να αναγνωρίζονται από ασθενείς με HT ή GD, είχαν συντεθεί πριν από 11 χρόνια με τη μέθοδο των ραβδίων 48 εικοσαμερή πεπτίδια (με επικάλυψη κατά 8 αα) που κάλυπταν το καρβοξυ-τελικό τμήμα της. Από τη μελέτη αυτή, είχαν ξεχωρίσει τρία πεπτίδια ως στόχος αυτοαντισωμάτων ασθενών με GD, που όμως δεν αναγνωρίζονταν από στατιστικά σημαντικό ποσοστό ασθενών με HT. Στην παρούσα διατριβή επιλέχθηκαν τρία νέα πεπτίδια από την παραπάνω μελέτη, με σκοπό τον έλεγχο της δραστηριότητας -έναντι αυτών- ορών αλλά και απομονωμένων ολικών IgG από ασθενείς με HT ή GD, με ανοσοενζυμική δοκιμασία ELISA. Τα τρία πεπτίδια χρησιμοποιήθηκαν ως αντισωματικοί στόχοι, τόσο ξεχωριστά όσο και αναμειγμένα. Απώτερος στόχος ήταν η ορολογική διαφοροποίηση των δύο νοσημάτων.

Στο δεύτερο σκέλος της διατριβής έγινε προσπάθεια προσδιορισμού νέων ανοσογονικών και παθογονικών πεπτιδίων της Tg ικανών να επάγουν EAT με άμεση ανοσοποίηση ευαίσθητων ή/και ανθεκτικών ποντικών. Σε ανθεκτικά στελέχη ποντικών έχει μέχρι σήμερα αναπτυχθεί ένα μόνο μοντέλο μελέτης της νόσου, με παθητική μεταφορά *in vivo* και *in vitro* ενεργοποιημένων T λεμφοκυττάρων. Η δημιουργία ενός νέου μοντέλου EAT με άμεση ανοσοποίηση ανθεκτικών στελεχών ποντικών θα βοηθούσε σημαντικά στην κατανόηση των ανοσορρυθμιστικών μηχανισμών που λαμβάνουν χώρα κατά την εκδήλωση της νόσου. Για τον εντοπισμό δυνητικών παθογονικών πεπτιδίων της Tg, εφαρμόστηκαν κατάλληλοι αλγόριθμοι για την ανάλυση των 48 διαθέσιμων από το Εργαστήριο πεπτιδίων και τον εντοπισμό μοτίβων πρόσδεσης σε μόρια MHC τάξης II από HR και LR ποντικούς. Με τον τρόπο αυτό επιλέχθηκαν δύο υποψήφια πεπτίδια της Tg, για τα οποία ελέγχθηκε η ικανότητά τους να ενεργοποιούν T λεμφοκύτταρα ποντικών ευαίσθητων και ανθεκτικών στελεχών και να επάγουν EAT, και τέλος προσδιορίστηκε η φύση του/ων επιτόπου/ων (επικρατής/κρυπτικός) που φέρουν.

Συνολικά, η διατριβή αυτή πραγματεύτηκε διαφορετικά πεπτίδια της ανθρώπινης Tg, με στόχο τόσο τη βελτίωση της διαγνωστικής πρακτικής στον άνθρωπο, όσο και την κατανόηση των παθογενετικών μηχανισμών της νόσου στον ποντικό.



ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΣΥΛΛΟΓΗ ΟΡΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΑΥΤΟΑΝΟΣΑ ΘΥΡΕΟΕΙΔΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΥΓΙΩΝ ΜΑΡΤΥΡΩΝ

Υλικά

Αναλώσιμα

- ✓ Σύριγγες 10ml (BD Plastipak, Spain)
- ✓ Vacutainer 8.5ml (BD, Spain)

Χημικά

- ✓ Αζίδιο του νατρίου, NaN_3 , M.B.=65.01 gr/mol (*Merck, Γερμανία*)
Φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου (Θ.Δ.) (22 – 25°C)

Παρασκευή διαλυμάτων

- ✓ **NaN_3 2% w/v**
2 gr NaN_3 διαλυτοποιούνται σε 100 ml απεσταγμένου νερού.
Φυλάσσεται στους 4°C.

Μηχανήματα – Συσκευές

- ✓ Φυγόκεντρος Sigma 4K10 (*Sigma -Aldrich*)

Διαδικασία:

Συλλέχθηκαν οροί από ασθενείς με HT ή νόσο GD. Οι ασθενείς, άνδρες και γυναίκες, ήταν νεοδιαγνωσμένοι, ανεξαρτήτου ηλικίας. Το δείγμα αίματος που συλλέχθηκε τοποθετήθηκε για μια ώρα στο ψυγείο (4°C) στα Vacutainer και για την ανάκτηση του ορού το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στα 1300 g για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο που προέκυψε είναι ο ορός, ο οποίος μεταφέρθηκε σε νέα κωνικά σωληνάρια τύπου errendorf και φυλάχθηκε στους -30°C. Η συλλογή ορού έγινε με τη συγκατάθεση των δοτών.

2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΘΥΡΕΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ ΑΠΟ ΘΥΡΕΟΕΙΔΙΚΟ ΙΣΤΟ

Υλικά

Αναλώσιμα

- ✓ Λεπίδα νυστεριού (*ALBION Medicals, ΗΠΑ*)
- ✓ Βαθμονομημένα γυάλινα ποτήρια ζέσεως (*ILMABOR, Γερμανία*)
- ✓ Σωλήνες υπερφυγοκέντρου
- ✓ Γυάλινη μπαγκέτα
- ✓ Σάκος διαπίδυσης (dialysis tubing) με διαπερατότητα για μόρια με M.B. \leq 12.000 Da. Πλάτος: 23 mm και διάμετρος: 15 mm (*Sigma -Aldrich, Γερμανία*)
- ✓ Πλαστικά κωνικά σωληνάρια τύπου falcon χωρητικότητας 50 ml (*Greiner, Γερμανία*)
- ✓ Γυάλινη στήλη χρωματογραφίας ύψους 110 cm και διαμέτρου 2,5 cm
- ✓ Γυάλινο χωνί στήλης χωρητικότητας 500 ml (*Rasotherm, Γερμανία*)
- ✓ Σωληνάρια πολυστυρενίου 75 x 12 mm (*Sarstedt*)
- ✓ Γυάλινες κυψελίδες τύπου Quartz (*HELLMA, Ηνωμένο Βασίλειο*)
- ✓ Μεμβράνη συμπύκνωσης διαμέτρου 43 mm, PM30 (*Amicon, ΗΠΑ*)
- ✓ Ογκομετρικοί κύλινδροι (*Brand, Γερμανία*)
- ✓ Πιπέτες πλαστικές των 10 ml (*Sarstedt, Γερμανία*)
- ✓ Ρύγχη για αυτόματες πιπέτες για όγκους 200 μ l και 1 ml (*Greiner*)

Χημικά

- ✓ Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), $C_7H_7FO_2S$, M.B.=174.2 gr/mol (*Merck*)
Φυλάσσεται σε Θ.Δ.
- ✓ Χλωριούχο κάλιο, KCl, M.B.= 74.56 gr/mol (*Merck*)
Φυλάσσεται σε Θ.Δ.
- ✓ Αζίδιο του νατρίου
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ Θειικό αμμώνιο, $(NH_4)_2SO_4$, M.B.= 132.14 gr/mol (*Merck*)
Φυλάσσεται σε Θ.Δ.
- ✓ Σφαιρίδια δεξτράνης και δισακρυλαμιδίου 25-75 μ m (*Sephacryl S.300*) (*Pharmacia, Ηνωμένο Βασίλειο*)

- Φυλάσσεται στους 4°C.
- ✓ Δισόξινο φωσφορικό κάλιο, KH_2PO_4 , M.B.=136.09 gr/mol (*Merck*)
Φυλάσσεται σε Θ.Δ.
 - ✓ Μονόξινο φωσφορικό κάλιο, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, M.B.=228.23 gr/mol (*Merck*)
Φυλάσσεται σε Θ.Δ.
 - ✓ Χλωριούχο νάτριο, NaCl , M.B.=58.44 gr/mol (*Merck*)
Φυλάσσεται σε Θ.Δ.
 - ✓ Καυστικό νάτριο, NaOH , M.B.=40 gr/mol (*Merck*)
Φυλάσσεται σε Θ.Δ.
 - ✓ Μεθανόλη, CH_3OH , πυκνότητα=0.791 g/ml (*Sigma Aldrich*)
Φυλάσσεται σε Θ.Δ.
 - ✓ Πυκνό διάλυμα θειικού οξέως 95-97%, H_2SO_4 , πυκνότητα=1.84 g/ml (*Merck*)
Φυλάσσεται σε Θ.Δ.
 - ✓ Υδροξείδιο του αμμωνίου, NH_4OH , έτοιμο υδατικό διάλυμα 30% (*Sigma Aldrich*)
Φυλάσσεται σε Θ.Δ.

Παρασκευή διαλυμάτων

- ✓ **KCl 0.15 M**
1.12 gr KCl διαλυτοποιούνται σε 100 ml απεσταγμένου νερού.
Φυλάσσεται στους 4°C
- ✓ **PMSF 0.1 M**
2.6 g PMSF διαλυτοποιούνται σε τελικό όγκο 150 ml μεθανόλης.
Φυλάσσεται στους 4°C σε σκουρόχρωμο μπουκάλι και παρασκευάζεται σε απαγωγό.
(Η επιλογή της μεθανόλης ως διαλύτη έγινε λόγω της χαμηλής διαλυτοποίησης του PMSF στο νερό – ο χρόνος ημιζωής του είναι 15 με 60 λεπτά – εναλλακτικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν άλλοι άνυδροι διαλύτες, όπως μεθανόλη, αιθανόλη, 2-προπανόλη)
- ✓ **NaN_3 2% w/v**
Όπως περιγράφηκε παραπάνω

✓ **H₂SO₄ 2N**

Το πυκνό διάλυμα H₂SO₄ (95-97%) έχει κανονικότητα 35.6 N, οπότε 10 ml από το διάλυμα αυτό αραιώνονται σε τελικό όγκο απεσταγμένου νερού 178 ml.

Φυλάσσεται σε Θ.Δ.

✓ **(NH₄)₂SO₄ 3.75 M**

Για την παρασκευή του διαλύματος αυτού διαλυτοποιούνται 750gr (NH₄)₂SO₄ σε τελικό όγκο 1 L απεσταγμένου νερού με εφαρμογή ήπιας θέρμανσης και συνεχή ανάδευση. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 7 με προσθήκη NH₄OH ή H₂SO₄ 2N.

Φυλάσσεται σε Θ.Δ. σε σκουρόχρωμο μπουκάλι, όπου δημιουργείται ίζημα με αποτέλεσμα το υπερκείμενο να έχει συγκέντρωση 4.1 M, δηλαδή 541.24 gr/L και είναι κορεσμένο διάλυμα (100%). Πριν τη χρήση αναδεύεται καλά και αφού καθιζάνει το ίζημα ο απαραίτητος όγκος υπερκείμενου τοποθετείται στους 0°C για τουλάχιστον 16 ώρες. Οι κρύσταλλοι που δημιουργούνται έχουν ως αποτέλεσμα η τελική συγκέντρωση του διαλύματος να είναι 3.75 M. Πριν από κάθε χρήση το διάλυμα πρέπει να αναδεύεται καλά και να καθιζάνει ίζημα.

✓ **NaOH 0.2 M**

8 gr NaOH διαλυτοποιούνται σε τελικό όγκο 1 L απεσταγμένου νερού

✓ **K₂HPO₄ 1 M**

228.23 gr K₂HPO₄ διαλυτοποιούνται σε τελικό όγκο 1 L απεσταγμένου νερού

✓ **KH₂PO₄ 1 M**

136.09 gr KH₂PO₄ διαλυτοποιούνται σε τελικό όγκο 1 L απεσταγμένου νερού

✓ **Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων καλίου 1 M, pH 7.4**

Σε 1 L διαλύματος K₂HPO₄ 1 M προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα διαλύματος KH₂PO₄ 1 M, έτσι ώστε το pH του τελικού διαλύματος να γίνει 7.4

Φυλάσσεται στους 4°C

✓ **Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων καλίου που περιέχει NaCl (Phosphate Buffered Saline - PBS)**

Σε 5 L απεσταγμένου νερού που περιέχουν 50 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων καλίου 1 M διαλυτοποιούνται 45 g NaCl. Το pH του διαλύματος πρέπει να είναι 7.4

Φυλάσσεται στους 4°C

- ✓ **KCl 0.15 M + PMSF 1 mM + NaN₃ 0.01% w/w (KCl+PMSF+NaN₃)**
1 ml PMSF 0.1 M και 0.5 ml NaN₃ 2% προστίθενται σε τελικό όγκο 100 ml KCl 0.15 M
Φυλάσσεται στους 4°C
- ✓ **PBS + PMSF 1 mM + NaN₃ 0.01% w/w (Διάλυμα έκλουσης)**
100 ml PMSF 0.1 M και 50 ml NaN₃ 2% προστίθενται σε τελικό όγκο 10 L PBS.
Φυλάσσεται στους 4°C

Μηχανήματα

- ✓ Απλή φυγόκεντρος Sigma 4K10 (*Sigma Aldrich*)
- ✓ Αυτόματες πιπέτες τύπου Gilson (*Gilson, ΗΠΑ*)
- ✓ Ζυγός (*METTLER, ΗΠΑ*)
- ✓ Μαγνητικοί αναδευτήρες, θερμαινόμενοι και μη
- ✓ Ομογενοποιητής
- ✓ Περισταλτική αντλία, Pump P3 (*Pharmacia*)
- ✓ Συλλέκτης κλασμάτων (*Pharmacia*)
- ✓ Συμπυκνωτής χωρητικότητας 50 ml (*Amicon, ΗΠΑ*)
- ✓ Υπερυφύκεντρος Sorval RC 28S (*DUPONT, ΗΠΑ*)
- ✓ Φασματοφωτόμετρο κυψελίδων ULTROSPEC II (200 – 900 nm) (*Biochrom, Ηνωμένο Βασίλειο*)
- ✓ Φιάλη αζώτου
- ✓ ρΗμετρο, Orion 2 star (*Thermo Scientific, ΗΠΑ*)

Μέθοδος

Για να απομονωθεί η Tg από θυρεοειδικό ιστό αρχικά απαιτείται η κλασμάτωση πρωτεϊνών με τη χρήση αλάτων, και συγκεκριμένα θειικού αμμωνίου, λόγω της ιδιότητας των πρωτεϊνών να καθιζάνουν όταν αυξάνει η ιοντική ισχύς του μέσου στο οποίο βρίσκονται. Οι υδρόφιλες ομάδες των πρωτεϊνών αφυδατώνονται και έτσι μειώνεται η διαλυτότητά τους. Στη συνέχεια η Tg διαχωρίζεται από τις υπόλοιπες προσμίξεις με μοριακή διήθηση. Για το λόγο αυτό επιλέγονται ανενεργά σφαιρίδια μεγέθους ανάλογου με την Tg, τα οποία διαθέτουν πόρους. Το μείγμα τοποθετείται στο πάνω μέρος της στήλης και εφαρμόζεται πίεση, η οποία αναγκάζει τις πρωτεΐνες να κινηθούν μέσα από τους πόρους. Όσο μικρότερο είναι

το προς απομόνωση μόριο, τόσο περισσότερο παραμένει στους πόρους των σφαιριδίων και συνεπώς τόσο αργότερα εκλούεται από τη χρωματογραφική στήλη, ενώ τα μεγάλα μόρια που δεν χωρούν στους πόρους των σφαιριδίων εκλούνται γρηγορότερα. Τέλος, τα κλάσματα που προκύπτουν από την παραπάνω διαδικασία που περιέχουν την T_g συμπυκνώνονται με χρήση μεμβράνης με πόρους συγκεκριμένης διαμέτρου που επιτρέπουν στο διαλύτη και στις υπόλοιπες ουσίες συγκεκριμένου μοριακού βάρους να διαπερνούν με εφαρμογή πίεσης. Όλη η παραπάνω διαδικασία λαμβάνει χώρα σε ψυχρό θάλαμο 4°C .

Ο ιστός φυλάσσεται στους -80°C πριν χρησιμοποιηθεί. Αρχικά, τεμαχίστηκε σε μικρά κομμάτια με τη βοήθεια λεπίδας νυστεριού, αφού πρώτα προσδιορίστηκε το βάρος του. Τα κομμάτια αυτά τοποθετήθηκαν σε γυάλινο ποτήρι ζέσεως και προστέθηκαν πέντε όγκοι παγωμένου διαλύματος $\text{KCl}+\text{PMSF}+\text{NaN}_3$. Το PMSF χρησιμοποιήθηκε ως αναστολέας πρωτεασών σερίνης (π.χ. τρυψίνης, χυμοτρυψίνης) και το NaN_3 ως βακτηριο- και μυκητο-στατικό. Στη συνέχεια με τη χρήση του ομογενοποιητή παράχθηκε το εκχύλισμα που φυγοκεντρήθηκε στην υπερφυγόκεντρο στα 10000 g για 30 λεπτά στους 4°C , σε κατάλληλους σωλήνες. Το υπερκείμενο που προέκυψε (Y1) επαναφυγοκεντρήθηκε στα 78.000 g για 90 λεπτά στους 4°C , ενώ το ίζημα (I1) απορρίφθηκε. Το νέο υπερκείμενο (Y2) μεταφέρθηκε σε γυάλινο ποτήρι ζέσεως και προσδιορίστηκε ο όγκος του, ενώ το ίζημα (I2) απορρίφθηκε. Σε Y2 προστέθηκε στάγδην και υπό ανάδευση όσος όγκος διαλύματος $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.75 M ήταν απαραίτητος ώστε το $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ να αποκτήσει τελική συγκέντρωση ίση με 1.52 M. Στη συγκέντρωση αυτή επιτυγχάνεται η κατακρήμνιση της περιεχόμενης στο διάλυμα αλβουμίνης. Το υπόλοιπο διάλυμα τοποθετήθηκε στον ειδικό σωλήνα υπερφυγόκεντρου, αφέθηκε για μια ώρα σε πάγο και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε στην υπερφυγόκεντρο στα 5000 g για 20 λεπτά στους 4°C . Η κατακρήμνιση επαναλήφθηκε στο Y3 με τον ίδιο τρόπο όπως προηγουμένως, μόνο που αυτή τη φορά προστέθηκε η απαραίτητη ποσότητα σκόνης $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση να ήταν ίση με 1.76 M, για την κατακρήμνιση της T_g . Το διάλυμα που προέκυψε, μεταφέρθηκε σε σωλήνα υπερφυγόκεντρου, αφέθηκε στον πάγο για μια ώρα και φυγοκεντρήθηκε στα 1000 g για 30 λεπτά. Αυτή τη φορά, η T_g βρίσκεται στο I4, το οποίο και επαναδιαλυτοποιήθηκε προσεκτικά σε απεσταγμένο νερό με γυάλινη μπαγκέτα και

τοποθετήθηκε σε σάκο διαπίδυσης έναντι μεγάλου όγκου (1 L) απεσταγμένου νερού με συχνές αλλαγές του για 3 ώρες. Ύστερα, το νερό αντικαταστάθηκε με διάλυμα έκλουσης και το διάλυμα του σάκου διαπίδυσης τοποθετήθηκε σε πλαστικό σωληνάριο τύπου falcon και φυγοκεντρήθηκε σε απλή φυγόκεντρο στα 1100 g (3000 στροφές ανά λεπτό) για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης αναλύθηκε με μοριακή διήθηση.

Για τη μοριακή διήθηση χρησιμοποιήθηκαν τα σφαιρίδια Sephacryl S.300 όγκου 550 ml, τα οποία τοποθετήθηκαν σε γυάλινο ποτήρι ζέσεως και αφέθηκαν να καθιζάνουν σε θερμοκρασία δωματίου. Αφού αφαιρέθηκε το υπερκείμενο διάλυμα, προστέθηκαν 2 L PBS και τα σφαιρίδια ανακινήθηκαν με τη βοήθεια γυάλινης μπαγκέτας. Η διαδικασία επαναλήφθηκε με προσθήκη 1 L PBS, ανακινήθηκαν προσεκτικά και τοποθετήθηκαν σιγά - σιγά σε γυάλινη στήλη χρωματογραφίας ύψους 110 cm και διαμέτρου 2.5 cm με τη βοήθεια ειδικού χωνιού, έτσι ώστε να επιτευχθεί η ομοιόμορφη στοίβαξη των σφαιριδίων για τη δημιουργία πόρων ομοιόμορφου μεγέθους. Με την τοποθέτηση όλου του υλικού των σφαιριδίων στη στήλη ανοίχθηκε το κάτω μέρος της και η ροή του εξερχόμενου υγρού διατηρήθηκε μικρή, μέχρις ότου στάθμη του όγκου των σφαιριδίων παρέμεινε σε σταθερό ύψος για μια ώρα. Η στήλη μεταφέρθηκε στον ψυχρό θάλαμο και εφαρμόστηκε στο πάνω μέρος της περισταλτική αντλία που διοχέτευε με τη μέγιστη ταχύτητα λειτουργίας της διάλυμα έκλουσης για 16 ώρες, όπου και έκλεισε το κάτω μέρος της στήλης. Έπειτα αφαιρέθηκε το υπερκείμενο των σφαιριδίων και προσεκτικά και υπό κλίση, ώστε να μη στεγνώσει και διαταραχθεί η επιφάνεια του υλικού πλήρωσης τοποθετήθηκε το εμπλουτισμένο σε Tg ιστικό εκχύλισμα με πιπέτα των 10 ml. Το εμπλουτισμένο σε Tg ιστικό εκχύλισμα αφέθηκε να εισχωρήσει στους πόρους και χωρίς να στεγνώσει η επιφάνεια του υλικού, προστέθηκε με πιπέτα των 10 ml διάλυμα έκλουσης. Με τη χρήση της περισταλτικής αντλίας εξασφαλίστηκε η συνεχής διοχέτευση διαλύματος έκλουσης, ενώ στο κάτω μέρος της στήλης συλλέγονταν σε σωληνάρια πολυστυρενίου χωρητικότητας 5 ml κλάσματα όγκου 2 ml με τη βοήθεια συλλέκτη κλασμάτων. Η ροή έκλουσης της στήλης ήταν 1 ml ανά 3 λεπτά και 15 δευτερόλεπτα. Για να ολοκληρωθεί η μοριακή διήθηση απαιτήθηκαν περίπου 20 ώρες, όσος χρόνος δηλαδή απαιτείται για να περάσει μέσα από τη στήλη όγκος διαλύματος έκλουσης ίσος με τον όγκο της στήλης (550 ml). Η οπτική

πυκνότητα (O.D.) κάθε δείγματος έκλουσης της στήλης μετρήθηκε στα 280 nm στο φασματοφωτόμετρο, σε γυάλινες κυψελίδες τύπου Quartz. Η στήλη φυλάχθηκε στον ψυχρό θάλαμο μέσα σε διάλυμα έκλουσης. Σχηματίστηκε γραφική παράσταση της O.D. των κλασμάτων που προέκυψαν από τη μοριακή διήθηση. Από την γραφική παράσταση επιλέχθηκαν τα κλάσματα που περιείχαν Tg, τα οποία συμπυκνώθηκαν σε ειδικό συμπυκνωτή όγκου 50 ml που έφερε μεμβράνη συμπύκνωσης PM 30 που επιτρέπει τη διέλευση μορίων με M.B.<30 KDa. Ο συμπυκνωτής τοποθετήθηκε στον ψυχρό θάλαμο πάνω σε μαγνητικό αναδευτήρα και εφαρμόστηκε πίεση ίση με 5 atm από φιάλη αερίου αζώτου. Το διάλυμα που διαπερνούσε τη μεμβράνη συλλέχθηκε σε ποτήρι ζέσεως και μετρήθηκε η απορρόφησή του στα 280 nm ανά τακτά χρονικά διαστήματα, ώστε να εξασφαλίζεται η σωστή λειτουργία του συμπυκνωτή και να διαπιστωθούν τυχόν διαρροές. Όταν το διάλυμα της Tg απέκτησε τον επιθυμητό όγκο αφαιρέθηκε από το συμπυκνωτή για να προσδιοριστεί η συγκέντρωσή της με μέτρηση της O.D., αφού πρώτα φυγοκεντρήθηκε σε απλή φυγόκεντρο στα 1100 g (3000 στροφές ανά λεπτό) για 10 λεπτά για την απομάκρυνση τυχόν ιζήματος Tg.

3. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ SDS-PAGE

Υλικά

Αναλώσιμα

- ✓ Πλαστικό ποτήρι ζέσεως (*Nalgene, Δανία*)
- ✓ Ογκομετρικός κύλινδρος χωρητικότητας 1 L (*Brand*)
- ✓ Πιπέτες πλαστικές 10 ml (*Sarstedt*)
- ✓ Ρύγχη για αυτόματες πιπέτες όγκου 200 μl και 1 ml (*Greiner*)
- ✓ Πλαστικά κωνικά σωληνάρια τύπου erpendorf χωρητικότητας 1.5 ml (*Sarstedt*)
- ✓ Ειδικές γυάλινες πλάκες για ηλεκτροφόρηση διαστάσεων 8 cm x 10 cm, τα οποία σχηματίζουν το καλούπι (πάχος 0.75 mm) για τη δημιουργία του πηκτώματος και συσκευή στήριξής τους (*BioRad, ΗΠΑ*)
- ✓ Πλαστικά εξαρτήματα με σχήμα «χτένας» πάχους 0.75 mm για τη δημιουργία δέκα θέσεων εναπόθεσης δειγμάτων (χτενάκια) (*BioRad*)
- ✓ Σύριγγα 10 ml (*Pic Indolor, Ιταλία*)
- ✓ Σύριγγα τύπου Hamilton 50 μl (*Hamilton, ΗΠΑ*)
- ✓ Πλαστικό λεκανάκι

Χημικά

- ✓ Βάση Tris, $C_4H_{11}NO_3$, M.B.=121.14 gr/mol (*Fluka, Γερμανία*)
Φυλάσσεται σε Θ.Δ.
- ✓ Υδροχλωρικό οξύ 37%, HCl, πυκνότητα=1.19 gr/ml (*Merck*)
Φυλάσσεται σε Θ.Δ.
- ✓ Ακρυλαμίδιο, C_3H_5NO , M.B. =71.07 gr/mol (*Merck*)
Φυλάσσεται στους -80°C.
- ✓ Δισακρυλαμίδιο (N,N´Methylenediacrylamide), $C_7H_{10}N_2O_2$, M.B.=154.17 gr/mol (*Merck*)
Φυλάσσεται στους 4°C
- ✓ Υπερθειικό αμμώνιο, $(NH_4)_2S_2O_8$, M.B.=228.2 gr/mol (*Sigma-Aldrich*)
Φυλάσσεται σε μικρές ποσότητες (0.05 gr) στους 4°C
- ✓ N, N, N´, N´ τετραμεθυλο-αιθυλενοδιαμίνη (Temed), $C_6H_{16}N_2$, M.B.=116.21 gr/mol (*Serva*).
Φυλάσσεται σε Θ.Δ. και χρησιμοποιείται στον απαγωγό

- ✓ Θειικό δωδεκυλικό νάτριο (SDS), $C_{12}H_{25}O_4S$, M.B. =286.4 gr/mol (*Serva*)
Φυλάσσεται σε Θ.Δ.
- ✓ Γλυκερόλη, $C_3H_8O_3$, πυκνότητα=1.26 gr/ml (*Merck*)
Φυλάσσεται σε Θ.Δ.
- ✓ Χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης, $C_{19}H_9Br_4O_5SNa$, M.B.=692 gr/mol (*Sigma-Aldrich*)
Φυλάσσεται σε Θ.Δ.
- ✓ Μονόξινο φωσφορικό κάλιο
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ Δισόξινο φωσφορικό κάλιο
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ Γλυκίνη, $C_6H_5NO_2$, M.B. =75.1 gr/mol (*Serva*)
Φυλάσσεται σε Θ.Δ.
- ✓ Χρωστική Brilliant blue R, $C_{45}H_{44}N_3O_7S_3Na$, M.B.=825.99 gr/mol (*Sigma-Aldrich*)
Φυλάσσεται σε Θ.Δ.
- ✓ Αιθανόλη 100%, C_2H_6O , πυκνότητα=0.788 gr/ml (*Sigma Aldrich*)
Φυλάσσεται σε Θ.Δ.
- ✓ Οξικό οξύ 100%, CH_3COOH , M.B.=60.05 gr/mol (*Sigma-Aldrich*)
Φυλάσσεται σε Θ.Δ.
- ✓ Χλωριούχο νάτριο
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ Μάρτυρες M.B. (43-170 KDa), PageRuler prestained protein Ladder Fermentas (*Thermo Scientific*)

Παρασκευή διαλυμάτων

✓ Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8

Για την παρασκευή διαλυτοποιούνται 90.88 gr Tris σε 400 ml απεσταγμένου νερού. Το pH ρυθμίζεται στο 8.8 με προσθήκη HCl 37%. Ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τα 500 ml με απεσταγμένο νερό.

Φυλάσσεται σε Θ.Δ.

✓ **Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8**

Διαλυτοποιούνται 30.28 gr Tris σε 400 ml απεσταγμένου νερού. Το pH ρυθμίζεται στο 6.8 με προσθήκη HCl 37% και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τα 500 ml με προσθήκη απεσταγμένου νερού.

Φυλάσσεται σε Θ.Δ.

✓ **Διάλυμα ακρυλαμιδίου (30%) - δισακρυλαμιδίου (0.8%)**

Διαλυτοποιούνται 300 gr ακρυλαμιδίου και 0.8 gr δισακρυλαμιδίου σε τελικό όγκο 1 L απεσταγμένου νερού. Στη συνέχεια το διάλυμα φιλτράρεται με διηθητικό χαρτί.

Φυλάσσεται στους 4°C και παρασκευάζεται στον απαγωγό

✓ **Υπερθειικό αμμώνιο 10%**

Διαλυτοποιούνται 0.05 gr υπερθειικού αμμωνίου σε 500 ml απεσταγμένου νερού μόλις πριν τη χρήση.

✓ **Πήκτωμα διαχωρισμού δειγμάτων 7.5%**

Αναμιγνύονται:

4.9 ml απεσταγμένου νερού

2.5 ml Tris-HCl 1.5 M pH 8.8 (τελική συγκέντρωση 0.375 M)

2.49 ml διαλύματος ακρυλαμιδίου - δισακρυλαμιδίου (τελική συγκέντρωση 7.5% και 0.2%, αντίστοιχα)

100 ml υπερθειικού αμμωνίου 10 % (τελική συγκέντρωση 0.1%)

10 ml Temed

Η ανάμιξη των συστατικών πραγματοποιείται λίγο πριν τη χρήση του

✓ **Πήκτωμα συμπύκνωσης δειγμάτων 3%**

Αναμιγνύονται:

3.2 ml απεσταγμένου νερού

1.25 ml Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8 (τελική συγκέντρωση 0.125 M)

0.5 ml διαλύματος ακρυλαμιδίου - δισακρυλαμιδίου (τελική συγκέντρωση 3% και 0.08%, αντίστοιχα)

60 ml υπερθειικού αμμωνίου 10 % (τελική συγκέντρωση 0.1%)

10 ml Temed

Η ανάμιξη των παραπάνω συστατικών του πήκτωματος πραγματοποιείται λίγο πριν τη χρήση του.

✓ **Διάλυμα δειγμάτων σε μη αναγωγικές συνθήκες (6x)**

Αναμιγνύονται:

1.25 ml Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8 (τελική συγκέντρωση 0.0625 M)

0.995 gr SDS (τελική συγκέντρωση 10% w/v)

3 ml γλυκερόλης (τελική συγκέντρωση 30% v/v)

0.01 gr χρωστικής μπλε βρωμοφαινόλης (τελική συγκέντρωση 0,1% w/v)

Ο όγκος συμπληρώνεται με απεσταγμένο νερό μέχρι τα 10 ml

Φυλάσσεται στους 4°C

✓ **Διάλυμα ηλεκτροφόρησης (4x)**

Διαλυτοποιούνται 60 gr Tris, 280 gr γλυκίνης και 20 gr SDS σε τελικό όγκο 5 L

απεσταγμένου νερού και pH 8.3

Φυλάσσεται στους 4°C

✓ **Διάλυμα χρωματισμού πηκτώματος**

Διαλυτοποιούνται 1.25 gr χρωστικής Brilliant blue R σε 225 ml αιθανόλης, 45 ml οξικού οξέος και 230 ml απεσταγμένου νερού.

Το διάλυμα φιλτράρεται με διηθητικό χαρτί και φυλάσσεται σε Θ.Δ.

✓ **Διάλυμα αποχρωματισμού πηκτώματος**

Αναμιγνύονται:

40 ml αιθανόλης

20 ml οξικού οξέως

140 ml απεσταγμένου νερού

✓ **PBS**

Όπως περιγράφηκε παραπάνω

Μηχανήματα - Συσκευές

✓ Αυτόματες πιπέτες τύπου Gilson (*Gilson*)

✓ Συσκευή ανάδευσης

✓ Συσκευή ηλεκτροφόρησης Mini Protean III BioRad (*BioRad*)

✓ Τροφοδοτικό (*BioRad*)

Μέθοδος

Το SDS έχει την ιδιότητα να φορτίζει αρνητικά τις πρωτεΐνες, οι οποίες με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος αναγκάζονται να μετακινηθούν προς το θετικό πόλο μέσα στο πήκτωμα ακρυλαμιδίου. Το πήκτωμα έχει συγκεκριμένο μέγεθος πόρων, ανάλογα με τη συγκέντρωσή του, με αποτέλεσμα οι πρωτεΐνες με μεγάλο M.B. να κινούνται αργά μέσα σε αυτό, και αυτές με μικρό M.B. γρήγορα. Μέσω, λοιπόν, ενός τέτοιου πηκτώματος ο διαχωρισμός ενός μείγματος από πρωτεΐνες είναι εφικτός. Επιπρόσθετα, στο δείγμα προς ανάλυση μπορεί να προστεθεί και β-μερκαπτοαιθανόλη, η οποία έχει ως αποτέλεσμα τη διάσπαση των δισουλφιδικών δεσμών των πρωτεϊνών. Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων της Tg επιλέχθηκε πήκτωμα με περιεκτικότητα ακρυλαμιδίου 7.5% λόγω του μεγάλου M.B., και δεν προστέθηκε β-μερκαπτοαιθανόλη, ώστε να παρατηρηθούν όλοι οι διαφορετικοί τρόποι σύνδεσης των μονομερών της Tg (ομοιοπολική και μη-ομοιοπολική σύνδεση).

Το πήκτωμα διαχωρισμού παρασκευάστηκε σε ποτήρι ζέσεως και 4 ml από αυτό τοποθετήθηκαν ανάμεσα στις ειδικές γυάλινες πλάκες της συσκευής ηλεκτροφόρησης. Στον υπολειπόμενο χώρο προστέθηκε 1.5 ml απεσταγμένου νερού, έτσι ώστε το άνω μέρος του πηκτώματος να αποκτήσει επίπεδη επιφάνεια, και αφέθηκε να πολυμεριστεί σε Θ.Δ. για μια ώρα. Στη συνέχεια, παρασκευάστηκε το πήκτωμα συμπύκνωσης, αφού πρώτα αφαιρέθηκε όλο το νερό που είχε προστεθεί, και ακολούθησε ο σχηματισμός των φρεατίων εναπόθεσης δειγμάτων χωρητικότητας 25 ml στο πήκτωμα, με την τοποθέτηση της πλαστικής χτένας. Το τελικό πήκτωμα αφέθηκε να πολυμεριστεί για μια ώρα σε Θ.Δ..

Τα δείγματα προς ανάλυση αραιώθηκαν κατάλληλα σε PBS και 20 ml από τις αραιώσεις τους (2 - 40 μg πρωτεΐνης) τοποθετήθηκαν σε πλαστικά σωληνάρια χωρητικότητας 1.5 ml τύπου erpendorf. Σε κάθε δείγμα τοποθετήθηκαν 4 ml από το 6x συμπυκνωμένο διάλυμα δειγμάτων (τελική συγκέντρωση 1x) και ακολούθησε προσεκτική ανάδευση.

Το διάλυμα ηλεκτροφόρησης αραιώθηκε 4 φορές, με την ανάμιξη 250 ml με 750 ml απεσταγμένου νερού. Από το πήκτωμα συμπύκνωσης αφαιρέθηκαν τα «χτενάκια» και οι γυάλινες πλάκες που περιείχαν τα παραπάνω πηκτώματα τοποθετήθηκαν στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Στη συνέχεια η συσκευή συμπληρώθηκε με το

διάλυμα ηλεκτροφόρησης μέχρι να καλυφθεί πλήρως το πήκτωμα. Τα υπολείμματα μη πολυμερισμένου ακρυλαμιδίου αφαιρέθηκαν με τη βοήθεια σύριγγας των 10 ml και διοχέτευση διαλύματος ηλεκτροφόρησης με πίεση. Τα δείγματα και οι μάρτυρες M.B. τοποθετήθηκαν στα φρεάτια του πηκτώματος συμπύκνωσης με σύριγγα τύπου Hamilton. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 120 V για περίπου μιάμιση ώρες μέχρι το «μέτωπο» που δημιουργεί η χρωστική του διαλύματος των δειγμάτων να φτάσει στην άκρη του πηκτώματος. Με την ολοκλήρωση του διαχωρισμού, αφαιρέθηκε το πήκτωμα από τις γυάλινες πλάκες και μεταφέρθηκε σε πλαστικό λεκανάκι, όπου χρωματίστηκε με διάλυμα χρωματισμού για δύο ώρες, υπό ανάδευση. Το χρωματισμένο πήκτωμα πλύθηκε με νερό βρύσης και αποχρωματίστηκε με το διάλυμα αποχρωματισμού για περίπου 16 ώρες, υπό ανάδευση ή μέχρις ότου επιτευχθεί ο πλήρης αποχρωματισμός του πηκτώματος, πλην των πρωτεϊνικών ταινιών.

4. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΟΥ ΤΙΤΛΟΥ ΤΩΝ ΑΝΤΙ-TG ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΑΥΤΗΣ ΜΕ ELISA

Υλικά

Αναλώσιμα

- ✓ Πλάκες πολυστυρενίου 96 φρεατίων για ELISA (*Nunc*)
- ✓ Πλαστικά κωνικά σωληνάρια τύπου erpendorf χωρητικότητας 1.5 ml (*Sarstedt*)
- ✓ Ποτήρια ζέσεως (*ILMABOR*)
- ✓ Ρύγχη για αυτόματες πιπέτες για όγκο 200 μl και 1 ml (*Greiner*)

Χημικά

- ✓ Μονόξινο φωσφορικό κάλιο
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ Δισόξινο φωσφορικό κάλιο
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ Χλωριούχο νάτριο
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ Μονόξινο ανθρακικό νάτριο, NaHCO_3 , M.B.=84.01 gr/mol (*Merck*)
Φυλάσσεται σε Θ.Δ.
- ✓ Ανθρακικό νάτριο, Na_2CO_3 , M.B. =105.99 gr/mol (*Merck*)
Φυλάσσεται σε Θ.Δ.
- ✓ Tween 20 (*Merck*)
Φυλάσσεται σε Θ.Δ.
- ✓ Βόεια αλβουμίνη ορού-κλάσμα V (Bovine serum albumin - BSA) (*Sigma-Aldrich*)
Φυλάσσεται στους 4°C
- ✓ Βόειος ορός συλλεγμένος από κρεαταγορά (BS)
- ✓ Ζελατίνη (Gelatine) (*Merck*)
- ✓ Καυστικό νάτριο
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ Γλυκίνη, $\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$, M.B. =75.1 gr/mol (*Serva*)
Φυλάσσεται σε Θ.Δ.
- ✓ Χλωριούχο μαγνήσιο, MgCl_2 , M.B.=95.21 gr/mol (*Merck*)

Φυλάσσεται σε Θ.Δ.

- ✓ Χλωριούχος ψευδάργυρος, $ZnCl_2$, M.B.=136.3 gr/mol (*Merck*)
Φυλάσσεται σε Θ.Δ.
- ✓ Εμπορικό αντίσωμα από κατσίκια, το οποίο αναγνωρίζει αντισώματα ανθρώπου τάξης G συζευγμένο με αλκαλική φωσφατάση (Δεύτερο αντίσωμα). Παρέχεται από την εταιρία παραγωγής αραιωμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris pH 8.0, το οποίο περιέχει επιπλέον 1% BSA, 1 mM $MgCl_2$ και 15 mM αζίδιο του νατρίου (*Sigma-Aldrich*)
- ✓ Εμπορικό αντίσωμα από κατσίκια, το οποίο αναγνωρίζει αντισώματα ανθρώπου τάξης G συζευγμένο με υπεροξειδάση (Δεύτερο αντίσωμα). Παρέχεται από την εταιρία παραγωγής αραιωμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS pH 7.4, το οποίο περιέχει επιπλέον 1% BSA και 0.01% thimerosal (ethyl-mercury-thio-salicylate) (*Sigma-Aldrich*)
- ✓ Εμπορικό αντίσωμα από κατσίκια, το οποίο αναγνωρίζει αντισώματα ανθρώπου τάξης M συζευγμένο με υπεροξειδάση (Δεύτερο αντίσωμα). Παρέχεται από την εταιρία παραγωγής αραιωμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS pH 7.4, το οποίο περιέχει επιπλέον 0.01% thimerosal (*Sigma-Aldrich*)
- ✓ Εμπορικό δείγμα αναφοράς δοτών με δραστηριότητα έναντι της Tg ίση με 1000 iu, του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ) για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας των ορών από ασθενείς (*NIBSC*)
- ✓ 4-Nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate σε ταμπλέτες των 20 mg (pNPP), $C_6H_4NNa_2O_6P \cdot 6H_2O$, M.B.=371.14 gr/mol (*Sigma-Aldrich*)
Φυλάσσεται στους $-30^\circ C$
- ✓ 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) σε υγρή μορφή έτοιμο προς χρήση, $C_{16}H_{20}N_2$, M.B.=240.3482 g/mol (*Seramun*)
- ✓ Γλυκερόλη, $C_3H_8O_3$, πυκνότητα=1.26 gr/ml (*Merck*)
Φυλάσσεται σε Θ.Δ.
- ✓ Διαιθυλαιθέρας, $C_4H_{10}O$, πυκνότητα=0.713 gr/ml (*Riedel*)
Φυλάσσεται σε Θ.Δ. στον απαγωγό

Αντιγόνα - Πεπτιδία

- ✓ Tg ανθρώπου

- ✓ Πεπτίδια της ανθρώπινης Tg

Όνομα πεπτιδίου	Αμινοξική αλληλουχία
p2208 (2208-2227)	QFLGVPYAAPPLAERRFQAP
p2352 (2352-2371)	RGFGGDPRRVSLAADRGGAD
P2472 (2472-2491)	PPARALKRSLWVEVDLLIGS
p2652 (2652-2671) (πεπτίδιο-μάρτυρας)	PVEFSRKVPTFATPWPDFVP

Όλα τα πεπτίδια συντέθηκαν από την εταιρία JPT Peptide Technologies GmbH, Γερμανία, με καθαρότητα $\geq 80\%$ με μια ακετυλική ομάδα στο N-τελικό άκρο και μια αμιδική στο C-τελικό άκρο τους.

Παρασκευή διαλυμάτων

- ✓ **K₂HPO₄ 1 M**
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ **KH₂PO₄ 1 M**
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ **Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων καλίου 1 M, pH 7.4**
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ **PBS**
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ **Ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικού-διττανθρακικού νατρίου 1M, pH 9,5 (cbc)**
Διαλυτοποιούνται 35 gr Na₂CO₃ και 56 gr NaHCO₃ σε 800 ml απεσταγμένου νερού και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι το 1 L.
Φυλάσσεται στους 4°C και πριν τη χρήση του αραιώνεται 10 φορές με απεσταγμένο νερό
- ✓ **Διάλυμα PBS-Tween**
Αραιώνονται 5ml Tween 20 σε 5 L PBS (τελική συγκέντρωση Tween 0.1% v/v).
Φυλάσσεται στους 4°C
- ✓ **Διάλυμα PBS-BSA**
Για μια μικροπλάκα ELISA διαλυτοποιούνται 0.2 gr BSA σε 20 ml διαλύματος PBS (τελική συγκέντρωση BSA 1% w/v)

- ✓ **Διάλυμα PBS-Tween-BSA**
Για μια μικροπλάκα ELISA διαλυτοποιούνται 0.4 gr BSA σε 40 ml διαλύματος PBS-Tween (τελική συγκέντρωση BSA 1% w/v)
- ✓ **Διάλυμα PBS-BS**
Για μια μικροπλάκα ELISA αναμιγνύουμε 1 ml BS με 20 ml διαλύματος PBS (τελική συγκέντρωση BS 5% v/v)
- ✓ **Διάλυμα PBS-Tween-BS**
Για μια μικροπλάκα ELISA αναμιγνύουμε 2 ml BS αραιώνονται με 40 ml διαλύματος PBS-Tween (τελική συγκέντρωση BS 5% v/v)
- ✓ **NaOH 19 N**
Διαλυτοποιούνται 76 gr NaOH σε τελικό όγκο 100 ml απεσταγμένου νερού
- ✓ **Διαλύτης pNPP**
Αναμιγνύονται:
7.51 gr γλυκίνης
0.2 gr MgCl₂
0.136 gr ZnCl₂
900 ml απεσταγμένου νερού
Το pH ρυθμίζεται στο 10.4 με διάλυμα NaOH 19 N. Ο όγκος συμπληρώνεται με απεσταγμένο νερό μέχρι το 1 L.
Φυλάσσεται σε κωνικά σωληνάρια τύπου falcon των 50 ml στους -30°C
- ✓ **Αρχικό διάλυμα δεύτερου αντισώματος**
Στο 1 ml του έτοιμου διαλύματος του δεύτερου αντισώματος προστίθεται 1 ml γλυκερόλης.
Φυλάσσεται ανά 200 μl στους -30°C
- ✓ **Διάλυμα υποστρώματος αλκαλικής φωσφατάσης**
Για δυο πλάκες ELISA διαλυτοποιούμε 1 ταμπλέτα pNPP (20 mg) σε 20 ml διαλύτη pNPP, χωρίς να έρθει σε επαφή με φως
- ✓ **Διάλυμα υποστρώματος υπεροξειδάσης**
Για κάθε πλάκα ELISA χρησιμοποιούνται 11 ml έτοιμου διαλύματος TMB

Μηχανήματα - Συσκευές

- ✓ Αυτόματες πιπέτες τύπου Gilson (*Gilson*)

- ✓ Ξηρός κλίβανος (37°C)
- ✓ Πολυκάναλη αυτόματη πιπέτα 20-200 μl (*Brand*)
- ✓ Συσκευή ανάδευσης σωλήνων (*Vortex*)
- ✓ Φυγόκεντρος *Sigma 4K10 (Sigma -Aldrich)*
- ✓ Φασματοφωτόμετρο για πλάκες 96 φρεατίων *Expert Plus (ASYS Hitech, Αυστρία)*

Μέθοδος

Τα φρεάτια πολυστυρενίου της μικροπλάκας ELISA έχουν την ιδιότητα να προσδένουν ποικίλα μόρια/αντιγόνα μέσω ηλεκτροστατικών και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Ένα αντίσωμα που είναι ειδικό έναντι του επιστρωμένου αντιγόνου συνδέεται σε αυτό και έτσι, μέσω της χρήσης δεύτερου αντισώματος που αναγνωρίζει το αντίσωμα προς διερεύνηση (ανθρώπου ή ποντικού) και είναι συζευγμένο σε ένζυμο (αλκαλική φωσφατάση ή υπεροξειδάση) είναι εφικτή η ανίχνευσή του. Η αντίδραση του ενζύμου με το υπόστρωμα χρωματίζει το διάλυμα και η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη με τον αριθμό των συμπλόκων που έχουν δημιουργηθεί ανάμεσα στο επιστρωμένο αντιγόνο και στα αντισώματα προς διερεύνηση.

Τα βήματα μίας ELISA έχουν ως εξής:

i) Επίστρωση αντιγόνων

Τα πεπτίδια της μελέτης και η Tg του ανθρώπου επιστρώνονται σε μικροπλάκες πολυστυρενίου, σε συγκέντρωση 2 ή 10 μg/ml (πεπτίδια) και 10 μg/ml (Tg) σε cbc και στα 100 μl. Στη συνέχεια ακολουθεί επώαση για μια ώρα σε ξηρό κλίβανο στους 37°C και για μία ημέρα, τουλάχιστον, στους 4 °C.

ii) Πλήρωση κενών θέσεων

Αφαιρούμε το διάλυμα της επίστρωσης και πλένουμε τα φρεάτια 4 φορές με PBS. Για την πλήρωση των κενών θέσεων των φρεατίων της μικροπλάκας προστίθενται 150 μl διαλύματος PBS-BSA, ή PBS-BS και ακολουθεί επώαση για μια ώρα σε ξηρό κλίβανο στους 37°C και πλύσιμο 4 φορές PBS-Tween.

iii) Προσθήκη δειγμάτων

Στα επιστρωμένα φρεάτια προσθέτουμε:

Εμπορικό δείγμα αναφοράς του ΠΟΥ αραιωμένο σε διάλυμα PBS-BSA-Tween ή PBS-BS-Tween τελικού όγκου 250μl για κάθε πλάκα, σε κωνικά πλαστικά σωληνάρια τύπου erpendorf και με τελική συγκέντρωση 6.25 διεθνείς μονάδες αναφοράς (iu)/ml. Από το διάλυμα αυτό μεταφέρονται 200 μl σε δύο φρεάτια ενώ τα επόμενα φρεάτια περιέχουν 100 μl του διαλύματος αραιώσεως. Με τη βοήθεια πολυκάναλης πιπέτας πραγματοποιούνται έξι διαδοχικές αραιώσεις (1/2) μεταφέροντας 100 μl από τα φρεάτια των δύο αρχικών φρεατίων στα επόμενα φρεάτια, και ύστερα από ανάδευση επαναλαμβάνεται η διαδικασία μέχρι να επιτευχθεί η μεγαλύτερη επιθυμητή αραιώση δειγμάτων (0.1 iu/ml).

Ορούς από ασθενείς με HT, ή νόσο GD, ή αντι-ορούς ποντικών. Οι οροί αραιώνονται σε διάλυμα αραιώσεως και σε τελικό όγκο 500 μl σε κωνικά πλαστικά σωληνάρια τύπου erpendorf (1/25), ώστε να δημιουργηθούν οι αρχικές αραιώσεις για την πραγματοποίηση των διαδοχικών αραιώσεων (1/2) στην μικροπλάκα ELISA. 100 μl από κάθε αραιωμένο διάλυμα ορού μεταφέρονται σε δύο φρεάτια της 1^{ης} σειράς της μικροπλάκας ELISA και στα επόμενα φρεάτια προσθέτουμε 100 μl διαλύματος PBS-Tween. Με τη βοήθεια πολυκάναλης πιπέτας μεταφέρονται 100 μl από τα φρεάτια της 1^{ης} σειράς στα επόμενα φρεάτια, αναδεύουμε και επαναλαμβάνεται η διαδικασία μέχρι να επιτευχθεί η μεγαλύτερη επιθυμητή αραιώση ορού (1/200). Στα φρεάτια της 1^{ης} στήλης της μικροπλάκας τοποθετούμε 100 μl διαλύματος PBS-BSA-Tween. Τέλος, ακολουθεί επώαση για δύο ώρες σε ξηρό κλίβανο στους 37°C και 4 πλύσεις των φρεατίων με διάλυμα PBS-Tween.

iv) Προσθήκη δεύτερου αντισώματος

Για την ανίχνευση των αντισωμάτων προς διερεύνηση χρησιμοποιείται δεύτερο αντίσωμα που αναγνωρίζει τα αντισώματα ανθρώπου ή ποντικού τάξης G και είναι συζευγμένο με το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση ή υπεροξειδάση. Σε μία άλλη δοκιμασία χρησιμοποιήθηκε και δεύτερο αντίσωμα που αναγνώριζε τα αντισώματα ανθρώπου τάξης M, συζευγμένο με υπεροξειδάση. Το αρχικό διάλυμα του δεύτερου αντισώματος αραιώθηκε 1:1000 με κατάλληλο διάλυμα PBS σε τελικό όγκο 11 ml για μία μικροπλάκα ELISA. 100 μl του διαλύματος αυτού προστίθενται σε κάθε φρεάτιο και ακολουθεί επώαση για 1 ή 2 ώρες σε ξηρό κλίβανο στους 37°C, 4 πλύσεις με PBS-Tween και μια φορά με PBS.

ν) Προσθήκη υποστρώματος

Αφού ολοκληρωθεί η πρόσδεση του δεύτερου, συζευγμένου αντισώματος, προστίθεται το υπόστρωμα του ενζύμου: 100 μl διαλύματος υποστρώματος αλκαλικής φωσφατάσης ή υπεροξειδάσης σε κάθε φρεάτιο. Στη συνέχεια η μικροπλάκα παραμένει για μιάμιση με 2 ώρες σε Θ.Δ. στο σκοτάδι ή για περίπου είκοσι λεπτά στην περίπτωση της υπεροξειδάσης. Το τελικό αποτέλεσμα αξιολογείται με μέτρηση της O.D. των φρεατίων στα 405 nm στην περίπτωση της αλκαλικής φωσφατάσης και στα 450 nm στην περίπτωση της υπεροξειδάσης. Για κάθε ζεύγος φρεατίων υπολογίζεται ο μέσος όρος της O.D. και αφαιρείται ο μέσος όρος της O.D. των φρεατίων που δεν περιέχουν δείγμα.

5. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΤΑΞΗΣ G ΑΠΟ ΤΟΝ ΟΛΙΚΟ ΟΡΟ

Υλικά

Αναλώσιμα

- ✓ Σάκος διαπίδωσης (dialysis tubing) με διαπερατότητα για μόρια με M.B. \leq 12.000 Da. Πλάτος: 23 mm και διάμετρος: 15 mm (*Sigma -Aldrich, Γερμανία*)
- ✓ Ογκομετρικός κύλινδρος χωρητικότητας 2 L (*Brand*)
- ✓ Στήλη Sepharose πρωτεΐνης G (Protein G Sepharose 4 Fast Flow) 5ml (*GE Healthcare, Uppsala, Σουηδία*)
- ✓ Γυάλινη πιπέτα Pasteur με κλειστό άκρο (*CEB, Γαλλία*)
- ✓ Μembrάνη συμπύκνωσης διαμέτρου 43 mm, PM30 (*Amicon, ΗΠΑ*)
- ✓ Πλαστικά κωνικά σωληνάρια τύπου falcon χωρητικότητας 15 και 50 ml (*Greiner, Γερμανία*)
- ✓ Ρύγχη για αυτόματες πιπέτες όγκου 200 μ l και 1 ml (*Greiner*)

Χημικά

- ✓ Γλυκίνη
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ Υδροχλωρικό οξύ
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ Βάση Tris
Όπως περιγράφηκε παραπάνω

Παρασκευή διαλυμάτων

- ✓ **Διάλυμα έκπλυσης - PBS**
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ **Διάλυμα έκλουσης αντισωμάτων γλυκίνης-HCl 0.1 M, pH2.7**
75.1 gr γλυκίνης διαλυτοποιούνται σε 100 ml απεσταγμένου νερού. Το διάλυμα αναμιγνύεται με 1N HCl έως ότου το pH είναι ίσο με 2.7. Ο όγκος συμπληρώνεται με απεσταγμένο νερό μέχρι το 1 L.
- ✓ **Tris 2 M**
24.2 gr Tris διαλυτοποιούνται σε 100 ml απεσταγμένου νερού.

Μηχανήματα – Συσκευές

- ✓ Αυτόματες πιπέτες τύπου Gilson (*Gilson*)
- ✓ Συσκευή ανάδευσης
- ✓ Φασματοφωτόμετρο κυψελίδων ULTROSPEC II (200 – 900 nm) (*Biochrom, Ηνωμένο Βασίλειο*)
- ✓ Φιάλη αζώτου
- ✓ Συμπυκνωτής χωρητικότητας 50 ml (*Amicon*)
- ✓ Φυγόκεντρος Sigma 4K10 (*Sigma Aldrich*)

Μέθοδος

Η πρωτεΐνη G είναι μία επιφανειακή πρωτεΐνη των στρεπτόκοκκων ομάδας G. Η πρωτεΐνη αυτή έχει την ικανότητα να προσδένει την Fc περιοχή των ανοσοσφαιρινών τάξης G, καθώς και τις υποτάξεις αυτής, από διάφορα θηλαστικά, με την ικανότητα πρόσδεσης να ποικίλλει μεταξύ των διαφορετικών ειδών. Με τον τρόπο αυτό μπορούν να απομονωθούν ανοσοσφαιρίνες τάξης G με μεγάλη καθαρότητα. Τα προσδεδωμένα αντισώματα μπορούν να εκλουστούν με όξινο διάλυμα pH 3 - 2.5, εφόσον ακολουθήσει άμεση εξουδετέρωση της εκλουόμενης ανοσοσφαιρίνης με την προσθήκη μικρής ποσότητας ισχυρής βάσης, για την διατήρηση της δραστητικότητάς της. Όλη η διαδικασία λαμβάνει χώρα σε ψυχρό θάλαμο 4°C.

Για την απομόνωση των αντισωμάτων τάξης G από τους ορούς ασθενών της μελέτης, χρησιμοποιήθηκαν 4-5 ml από κάθε ορό και με τη χρήση σάκου διαπίδυσης που επιτρέπει τη διέλευση μορίων με M.B. \leq 12.000 Da, το δείγμα ήρθε σε επαφή με το διάλυμα έκπλυσης (PBS). Ο σάκος βυθίστηκε σε ογκομετρικό κύλινδρο χωρητικότητας 2 L που περιείχε το διάλυμα έκπλυσης και αφέθηκε υπό ανάδευση στους 4°C για 12 ώρες. Στη συνέχεια, το περιεχόμενο του σάκου μεταφέρθηκε σε πλαστικό κωνικό σωληνάριο τύπου falcon χωρητικότητας 15 ml και φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά στα 500g (2000 στροφές ανά λεπτό) για την απομάκρυνση τυχόν ιζήματος αντισωμάτων. Ο ορός τοποθετήθηκε στη στήλη και αφού αναδεύτηκε προσεκτικά με γυάλινη πιπέτα Pasteur με κλειστό άκρο, επώαστηκε για 1 ώρα στους 4°C. Μετά την επώαση, το κάτω μέρος της στήλης ανοίχθηκε και ο ορός αφέθηκε να διαπεράσει τη στήλη. Στο στάδιο αυτό, όλα τα

αντισώματα τάξης G που περιέχονται στο δείγμα έχουν προσδεθεί στη στήλη. Με συνεχή παροχή διαλύματος έκπλυσης από το πάνω μέρος της στήλης, έγινε συλλογή του κλάσματος του ορού που δεν προσδέθηκε, μέχρις ότου η οπτική του απορρόφηση στα 280 nm ήταν <0.050 .

Στη συνέχεια, ακολούθησε η έκλουση της προσδεδεμένης ανοσοσφαιρίνης τάξης G. Προστέθηκαν 1-2 ml διαλύματος έκλουσης pH2.7 στο πάνω μέρος της στήλης, το μίγμα αναδεύτηκε προσεκτικά με γυάλινη πιπέτα Pasteur με κλειστό άκρο και επώαστηκε για 10 λεπτά. Μετά την επώαση, το κάτω μέρος της στήλης ανοίχθηκε και το διάλυμα αφέθηκε να διαπεράσει τη στήλη. Συλλέχθηκαν κλάσματα των 2ml που περιείχαν τα αντισώματα τάξης G και το pH τους εξουδετερώθηκε αμέσως με προσθήκη μικρής ποσότητας Tris 2M. Σε όλα τα κλάσματα μετρήθηκε η οπτική τους απορρόφηση στα 280 nm και εντοπίστηκαν αυτά που περιείχαν τα αντισώματα για συμπύκνωσή τους σε μικρό όγκο υπό πίεση, όπως περιγράφηκε παραπάνω.

6. ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ

Για τον έλεγχο της ανοσογονικότητας και παθογονικότητας των πεπτιδίων της μελέτης χρησιμοποιήθηκαν θηλυκοί ποντικοί, 6-8 εβδομάδων σε ηλικία, αμιγών στελεχών C57BL/6, BALB/c, SJL/J, AKR/J και CBA/J, οι οποίοι εκτρέφονταν στο Τμήμα Ζωικών Προτύπων και Βιοϊατρικής Έρευνας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ.

Πιο ειδικά, οι ποντικοί C57BL/6 διαθέτουν τον απλότυπο b του MHC. Είναι ομόζυγα ως προς το γονίδιο *Cdh23^{ahl}*, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια ακοής σε ηλικία 10 μηνών (235).

Οι ποντικοί BALB/c διαθέτουν τον απλότυπο d του MHC. Το στέλεχος αυτό είναι γνωστό για την παραγωγή πλασματοκυττάρων μετά από χορήγηση στους ποντικούς παραφινέλαιο (mineral oil), το οποίο αποτελεί τη βάση για την παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων. Σε μεγάλη ηλικία αναπτύσσουν πρωτογενείς όγκους στους πνεύμονες και καρκίνο του νεφρού (235).

Οι ποντικοί SJL/J διαθέτουν τον απλότυπο s του MHC και είναι ομόζυγα ως προς τη μεταλλαγή *Pde6b^{rd1}*, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την τύφλωση των ποντικών στην ηλικία του απογαλακτισμού. Εμφανίζουν σε υψηλή συχνότητα σαρκώματα που μοιάζουν με αυτά της νόσου του Hodgkin σε ηλικία ενός έτους. Τα σαρκώματα εμφανίζονται αρχικά στις πλάκες του Peyer και στους μεσεντέριους λεμφαδένες και αργότερα στον σπλήνα, στο ήπαρ, στο θύμο και στους υπόλοιπους λεμφαδένες (235).

Οι ποντικοί AKR/J διαθέτουν τον απλότυπο k του MHC και χρησιμοποιούνται κυρίως σε μελέτες καρκίνου, λόγω της αυξημένης συχνότητας εκδήλωσης λευκαιμίας (60-90%). Ένα από τα χαρακτηριστικά τους είναι η μετάλλαξη *hid* (hair interior defect) που φέρουν, που ευθύνεται για τις αλλαγές στην ανάπτυξη του τριχώματός τους. Παράλληλα, είναι ανθεκτικά σε σχηματισμό αλλοιώσεων της αορτής (235).

Οι ποντικοί CBA/J διαθέτουν τον απλότυπο k του MHC και είναι και αυτοί ομόζυγοι ως προς τη μεταλλαγή *Pde6b^{rd1}*. Το στέλεχος των ποντικών αυτών χρησιμοποιείται συνήθως για τη μελέτη της G-EAT, είναι ιδιαίτερα ανθεκτικό στην επαγόμενη από διατροφή αθηροσκλήρυνση και χάνουν την ακοή τους σε μεγάλη ηλικία. Σε υψηλό

ποσοστό ποντικών CBA/J παρατηρείται χαμηλός βαθμός διήθησης των ουροφόρων σωληναρίων (235).

7. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΟΣ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΣΗΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΩΝ

Υλικά

Αναλώσιμα

- ✓ Πλαστικά κωνικά σωληνάρια τύπου erpendorf χωρητικότητας 1.5 ml (*Sarstedt*)
- ✓ Ρύγχη για αυτόματες πιπέτες για όγκο 200 μl και 1 ml (*Greiner*)
- ✓ Βελόνες 20 G x 1'', 0.9 x 25 mm (*Pic Indolor*)
- ✓ Βελόνες 22 G x ½'', 0.45 x 12.7 mm (*Pic Indolor*)
- ✓ Γυάλινες σύριγγες χωρητικότητας 1 και 2 ml (*Becton, Dickinson & Co, ΗΠΑ*)
- ✓ Πλαστικός συνδέτης για σύριγγες τύπου H, (Luer-Lock H) (*Sigma-Aldrich*)
- ✓ Πλαστική σύριγγα 1 ml (*Becton, Dickinson & Co*)

Χημικά

- ✓ Αντιγόνα ανοσοποίησης
- ✓ Δισόξινο φωσφορικό κάλιο
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ Μονόξινο φωσφορικό κάλιο
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ Χλωριούχο νάτριο
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ Πλήρες έκδοχο του Freund (Complete Freund's Adjuvant - CFA) (*Sigma-Aldrich*)
Φυλάσσεται στους 4°C
- ✓ Ατελές έκδοχο του Freund (Incomplete Freund's Adjuvant – IFA) (*Sigma-Aldrich*).
Φυλάσσεται στους 4°C

Παρασκευή διαλυμάτων

- ✓ PBS
Όπως περιγράφηκε παραπάνω

Μηχανήματα - Συσκευές

- ✓ Αυτόματες πιπέτες τύπου Gilson (*Gilson*)

- ✓ Συσκευή ανάδευσης σωλήνων (Vortex)

Διαδικασία

Το γαλάκτωμα ανοσοποίησης παρασκευάζεται με την ανάμιξη του αντιγόνου με PBS και το CFA ή IFA. Πιο αναλυτικά, ο συνολικός όγκος του αντιγόνου-PBS πρέπει να είναι σε αναλογία 1:1 με το ανοσοενισχυτικό και σε τελικό όγκο 100 μl για κάθε ζώο. Η ανάμιξη των συστατικών σε γυάλινες σύριγγες υπό πίεση, έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια 200-300 μl ανά γαλάκτωμα, λόγω συμπύκνωσης του υλικού και απώλειες στα τοιχώματα των συριγγών. Η ποσότητα αυτή πρέπει να προστίθεται πάντα στους υπολογισμούς για να εξασφαλιστεί η επάρκεια σε γαλάκτωμα ανοσοποίησης.

Για τον έλεγχο της ανοσογονικότητας ανοσοποιούνται 3-5 ποντικοί με 100 nml πεπτιδίου ή 75 μg Tg υποδορίως. Η κατάλληλη ποσότητα του αντιγόνου τοποθετείται σε πλαστικό σωληνάριο τύπου erpendorf, έπειτα ακολουθεί η προσθήκη της κατάλληλης ποσότητας PBS και τέλος το CFA ή το IFA. Το CFA πρέπει πριν την χρήση να αναμιχθεί καλά με vortex, έτσι ώστε να εξασφαλιστεί η λήψη αρκετής ποσότητας μυκοβακτηριδίων, τα οποία βρίσκονται σε μορφή ιζήματος στο ανοσοενισχυτικό. Η πρόσληψη του ανοσοενισχυτικού γίνεται με ρύγχος του οποίου το άκρο είναι κομμένο, λόγω της παχύρευστης υφής του. Στο άκρο της μεγαλύτερης γυάλινης σύριγγας τοποθετείται βελόνα 20 G και αναρροφάται το διάλυμα από το erpendorf. Στη συνέχεια, αφαιρείται η βελόνα και η σύριγγα ενώνεται με τη δεύτερη γυάλινη σύριγγα με τη βοήθεια του πλαστικού συνδέτη. Ακολουθεί ανάμιξη των υλικών μετακινώντας τα αρκετές φορές από τη μια σύριγγα στην άλλη μέχρι να επιτευχθεί ένα παχύρευστο άσπρο γαλάκτωμα, το οποίο να ξεκολλάει από τα έμβολα. Όταν το γαλάκτωμα είναι έτοιμο, μεταφέρεται στην πιο λεπτή σύριγγα, απομακρύνεται η μεγαλύτερη σύριγγα χωρίς το συνδέτη και εφαρμόζεται η πλαστική σύριγγα στο συνδέτη για τη μεταφορά του υλικού με αναρρόφηση. Τέλος, τοποθετείται βελόνα 22 G και αφαιρείται ο αέρας από το εσωτερικό της σύριγγας.

8. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΕΝΑΙΩΡΗΜΑΤΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΛΕΜΦΑΔΕΝΩΝ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΠΟΝΤΙΚΩΝ ΓΙΑ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Υλικά

Αναλώσιμα

- ✓ Ψαλίδια ανατομίας (*Thermo Scientific*)
- ✓ Λαβίδες (*Thermo Scientific*)
- ✓ Πλαστικά κωνικά σωληνάρια τύπου falcon χωρητικότητας 15 και 50 ml (*Greiner*)
- ✓ Τρυβλία Petri διαμέτρου 9 cm (*Sterilin Limited, Ηνωμένο Βασίλειο*)
- ✓ Σίτα με οπές διαμέτρου 50 μm (mesh 50) χωρητικότητας 85 ml (*Sigma -Aldrich*)
- ✓ Έμβολο πλαστικής σύριγγας των 5 ml (*Pic Indolor*)
- ✓ Πλαστικές πιπέτες μιας χρήσης των 5 και 10 ml (*Sarstedt*)
- ✓ Ρύγχη για αυτόματες πιπέτες για όγκο 200 μl και 1 ml (*Greiner*)
- ✓ Αιμοκυτταρόμετρο (*Sigma -Aldrich*)

Χημικά

- ✓ Διάλυμα Dulbecco's Modified Eagle's Minimal essential medium (10x) που περιέχει 4.5 g/L D-γλυκόζης (DMEM) (*Biochrom*)
Φυλάσσεται στους 4°C.
- ✓ Διάλυμα L-γλουταμίνης 200 mM (*Gibco*)
Το διάλυμα διαχωρίζεται ανά 5 ml σε κωνικά πλαστικά σωληνάρια τύπου falcon χωρητικότητας 15 ml και φυλάσσεται στους -30°C.
- ✓ Ρυθμιστικό διάλυμα Hepes 1 M (*Biochrom*)
Φυλάσσεται στους 4°C.
- ✓ Διάλυμα διττανθρακικού νατρίου 7.5% (*Gibco, ΗΠΑ*)
Φυλάσσεται σε Θ.Δ.
- ✓ Διάλυμα πυροσταφυλικού νατρίου 100 mM (*Gibco*)
Φυλάσσεται στους 4°C.
- ✓ Διάλυμα πενικιλίνης 10.000 units/ml - στρεπτομυκίνης 10000 μg/ml (*Gibco*)
Το διάλυμα διαχωρίζεται ανά 5 ml σε κωνικά πλαστικά σωληνάρια τύπου falcon χωρητικότητας 15 ml και φυλάσσεται στους -30°C.
- ✓ β-Μερκαπτοαιθανόλη (2-ME), HSCH₂CH₂OH, M.B. =78.13 gr/mol (*Fluka*)

Φυλάσσεται σε Θ.Δ.

- ✓ Διάλυμα χρωστικής trypan blue 0.4% w/v σε χλωριούχο νάτριο (0.81%) και μονόξινο φωσφορικό κάλιο (0.06%), $C_{34}H_{24}N_6NaO_{14}S_4$ (*Sigma -Aldrich*)
Το διάλυμα διαχωρίζεται ανά 0.5 ml σε κωνικά πλαστικά σωληνάρια τύπου errendorf και φυλάσσεται στους 4°C. Πριν τη χρήση φυγοκεντρείται στα 5500 g (8000 στροφές ανά λεπτό) για 5 λεπτά.

Παρασκευή διαλυμάτων

- ✓ **β-Μερκαπτοαιθανόλη 5×10^{-5} M**

Αραιώνονται 35 ml β-μερκαπτοαιθανόλης σε 10 ml απεσταγμένου και αποστειρωμένου νερού. Το διάλυμα χωρίζεται σε μέρη των 0.5 ml, σε αποστειρωμένα κωνικά πλαστικά σωληνάρια τύπου errendorf και φυλάσσεται στους -30°C. Όλη η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιείται στον απαγωγό.

- ✓ **Θρεπτικό υλικό κυτταροκαλλιέργειας**

Αναμιγνύονται:

50 ml DMEM (τελική συγκέντρωση 1x)

420 ml απεσταγμένου και αποστειρωμένου νερού

5 ml διαλύματος L-γλουταμίνης (τελική συγκέντρωση 2 mM)

5 ml ρυθμιστικού διαλύματος Hepes (τελική συγκέντρωση 10 mM)

13.5 ml διαλύματος διττανθρακικού νατρίου (τελική συγκέντρωση 24 mM)

5 ml διαλύματος πυροσταφυλικού νατρίου (τελική συγκέντρωση 1 mM)

5 ml διαλύματος πενικιλίνης - στρεπτομυκίνης (τελική συγγκέντρωση πενικιλίνης 100 units/ml – στρεπτομυκίνης 100 µg/ml)

0.5 ml διαλύματος 2-ME 5×10^{-5} M (τελική συγκέντρωση 5×10^{-8} M)

Παρασκευάζεται στο θάλαμο νηματικής ροής. Το pH του διαλύματος είναι σωστό όταν έχει ένα πορτοκαλο-κόκκινο χρώμα.

Φυλάσσεται στους 4°C.

Μηχανήματα

- ✓ Αυτόματες πιπέτες τύπου Gilson (*Gilson*)
- ✓ Θάλαμος νηματικής ροής (*FluFrance, Γαλλία*)
- ✓ Φυγόκεντρος Sigma 4K10 (*Sigma -Aldrich*)

Μέθοδος

Εννέα με 11 ημέρες μετά την ανοσοποίηση των ποντικών με τα αντιγόνα της μελέτης σε ανοσοενισχυτικό, αφαιρέθηκαν από κάθε ποντικό οι δυο βουβωνικοί και οι τέσσερις μασχालιαίοι λεμφαδένες και τοποθετήθηκαν όλοι μαζί σε πλαστικό σωληνάριο χωρητικότητας 15 ml τύπου falcon, το οποίο περιείχε θρεπτικό υλικό. Στη συνέχεια, στο θάλαμο νηματικής ροής ομογενοποιήθηκαν με τη χρήση αποστειρωμένης σίτας και άσκηση πίεσης με εμβόλου σύριγγας 5 ml. Ο ομογενοποιημένος ιστός τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένο τρυβλίο Petri και προστέθηκε μικρός όγκος θρεπτικού υλικού. Η σίτα ξεπλύθηκε με θρεπτικό υλικό και το μίγμα των κυττάρων στο τρυβλίο Petri συλλέχθηκε με πιπέτα μιας χρήσης των 10 ml σε ένα πλαστικό σωληνάριο τύπου falcon χωρητικότητας 50 ml. Το υλικό αυτό φυγοκεντρήθηκε για 5 λεπτά στα 300 g (1560 στροφές ανά λεπτό). Το ίζημα που προέκυψε περιείχε τα κύτταρα των λεμφαδένων, τα οποία και επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε επαρκή ποσότητα θρεπτικού υλικού, αναδεύτηκαν και φυγοκεντρήθηκαν εκ νέου στις ίδιες συνθήκες. Το τελικό ίζημα που προέκυψε επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 5 ml θρεπτικού υλικού, αναδεύτηκε προσεκτικά με πιπέτα μίας χρήσης και μετρήθηκε ο αριθμός των κυττάρων.

Η μέτρηση των κυττάρων σε εναιώρημα έγινε με ανάμιξη μικρής ποσότητας από τα κύτταρα (10-20 μl) με κατάλληλο όγκο χρωστικής trypan blue, η οποία έχει την ιδιότητα να βάφει τα νεκρά κύτταρα με μπλε χρώμα. Η κατάλληλη αραιώση των κυττάρων με τη χρωστική (1:2 ή 1:5) επιλέγεται ανάλογα με την ποσότητα του ιζήματος από την τελευταία φυγοκέντρηση. Το μείγμα αναδεύθηκε καλά με αυτόματη πιπέτα και 5-10 μl τοποθετήθηκαν σε αιμοκυτταρόμετρο, στο χώρο που δημιουργείται μεταξύ του αιμοκυτταρόμετρου και της καλυπτρίδας τοποθετήθηκε μικρός όγκος του παραπάνω μείγματος. Τέλος, μετρήθηκε στο μικροσκόπιο ο αριθμός των ζωντανών και νεκρών κυττάρων στα 25 τετράγωνα του αιμοκυτταρόμετρου που περιβάλλονται από τριπλή γραμμή και υπολογίστηκε το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων επί του συνόλου των κυττάρων και η συγκέντρωσή τους. Η συγκέντρωση υπολογίζεται βάσει του παρακάτω τύπου:

Αριθμός ζωντανών κυττάρων/ml = Αριθμός ζωντανών κυττάρων στα 25 τετράγωνα x συντελεστή αραιώσης με trypan blue x 10^4

9. ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΟΣΟΓΟΝΙΚΟΤΗΤΑΣ ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ ΣΕ ΕΠΙΠΕΔΟ Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΟΥ *IN VITRO* ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΡΑΔΙΕΝΕΡΓΗΣ ΘΥΜΙΔΙΝΗΣ

Υλικά

Αναλώσιμα

- ✓ Πλαστικά κωνικά σωληνάρια τύπου erpendorf χωρητικότητας 1.5 ml (*Sarstedt*)
- ✓ Ρύγχη για αυτόματες πιπέτες για όγκο 200 µl και 1 ml (*Greiner*)
- ✓ Βελόνες 20 G x 1'', 0.9 x 25 mm (*Pic Indolor*)
- ✓ Βελόνες 22 G x ½'', 0.45 x 12.7 mm (*Pic Indolor*)
- ✓ Γυάλινες σύριγγες χωρητικότητας 1 και 2 ml (*Becton, Dickinson & Co, ΗΠΑ*)
- ✓ Πλαστικός συνδέτης για σύριγγες τύπου H, (Luer-Lock H) (*Sigma-Aldrich*)
- ✓ Πλαστική σύριγγα 1 ml (*Becton, Dickinson & Co*)
- ✓ Ψαλίδια ανατομίας (*Thermo Scientific*)
- ✓ Λαβίδες (*Thermo Scientific*)
- ✓ Πλαστικά κωνικά σωληνάρια τύπου falcon χωρητικότητας 15 και 50 ml (*Greiner*)
- ✓ Τρυβλία Petri διαμέτρου 9 cm (*Sterilin Limited, Ηνωμένο Βασίλειο*)
- ✓ Σίτα με οπές διαμέτρου 50 µm (mesh 50) χωρητικότητας 85 ml (*Sigma - Aldrich*)
- ✓ Έμβολο πλαστικής σύριγγας των 5 ml (*Pic Indolor*)
- ✓ Πλαστικές πιπέτες μιας χρήσης των 5 και 10 ml (*Sarstedt*)
- ✓ Αιμοκυτταρόμετρο (*Sigma -Aldrich*)
- ✓ Ειδικά σακουλάκια για μετρητή β-ακτινοβολίας διαστάσεων 90 x 120 mm (*Perkin Elmer, ΗΠΑ*)
- ✓ Μιροπλάκα κυτταροκαλλιέργειας 96 φρεατίων με επίπεδο πυθμένα (*Orange Scientific, Βέλγιο*)
- ✓ Φίλτρο με γυάλινες ίνες (Glass fiber filter) 102 x 258 mm (*Perkin Elmer*)

Χημικά

- ✓ Διάλυμα Dulbecco's Modified Eagle's Minimal essential medium (10x)
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ Διάλυμα L-γλουταμίνης 200 mM

- Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ Ρυθμιστικό διάλυμα Hepes 1 M
- Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ Διάλυμα διπτανθρακικού νατρίου
- Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ Διάλυμα πυροσταφυλικού νατρίου 100 mM
- Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ Διάλυμα πενικιλίνης 10.000 units/ml - στρεπτομυκίνης 10.000 µg/ml
- Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ β-Μερκαπτοαιθανόλη
- Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ Διάλυμα χρωστικής trypan
- Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ Διαιθυλαιθέρας, $C_4H_{10}O$, πυκνότητα=0,713 gr/ml (*Riedel, Γερμανία*)
Φυλάσσεται σε Θ.Δ. στον απαγωγό.
- ✓ Διμεθυλ-σουλφοξείδιο (DMSO), C_2H_6OS , M.B. =78.1 gr/mol (*Serva*)
Φυλάσσεται σε Θ.Δ.
- ✓ Δισόξινο φωσφορικό κάλιο
- Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ Μονόξινο φωσφορικό κάλιο
- Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ Χλωριούχο νάτριο
- Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ Ορός εμβρύων βοοειδών (Foetal Bovine Serum – FBS) (*Gibco*)
Φυλάσσεται στους $-30^{\circ}C$.
- ✓ Τριτωμένη θυμιδίνη ((methyl- 3H) thymidine), υδατικό διάλυμα 5 mCi / 5 ml,
ειδική ενεργότητα 25 Ci/mmol (*Amersham Pharmacia, Σουηδία*)
Φυλάσσεται στους $4^{\circ}C$
- ✓ Υγρό σπινθηρισμού OptiPhase SuperMix (*Perkin Elmer*)
Φυλάσσεται σε Θ.Δ.
- ✓ CFA
- Όπως περιγράφηκε παραπάνω

Αντιγόνα-Πεπτίδια

- Tg ανθρώπου, η οποία παρασκευάστηκε όπως περιγράφηκε παραπάνω
- Πεπτίδια της ανθρώπινης Tg

Όνομα πεπτιδίου	Αμινοξική αλληλουχία
p2208 (2208-2227)	QFLGVPYAAPPLAERRFQAP
p2352 (2352-2371)	RGFGGDPRRVSLAADRGGAD
P2472 (2472-2491)	PPARALKRSLWVEVDLLIGS
p2652 (2652-2671) (πεπτίδιο-μάρτυρας)	PVEFSRKVPTFATPWPDFVP

Όλα τα πεπτίδια συντέθηκαν από την εταιρία JPT Peptide Technologies GmbH (Γερμανία) με καθαρότητα $\geq 80\%$ και φέρουν μια ακετυλική ομάδα στο N-τελικό άκρο και μια αμιδική στο C-τελικό άκρο τους.

Παρασκευή διαλυμάτων

✓ Θρεπτικό υλικό κυτταροκαλλιέργειας

Όπως περιγράφηκε παραπάνω

✓ Θερμική απενεργοποίηση FBS

Ο ορός τοποθετείται σε προθερμασμένο στους 56°C υδατόλουτρο για 30 λεπτά και αναδεύεται ανά 10 λεπτά. Έπειτα, παραμένει σε Θ.Δ. μέχρι να μειωθεί η θερμοκρασία του μοιράζεται σε πλαστικά κωνικά σωληνάρια τύπου falcon χωρητικότητας 50 ml και φυλάσσεται στους -30°C. Μία μέρα πριν τη χρήση του τοποθετείται στους 4 °C για να ξεπαγώσει και φυγοκεντρείται στα 1100 g (3000 στροφές ανά λεπτό). Η παραπάνω διαδικασία ακολουθείται για την απενεργοποίηση του συμπληρώματος και την εξάλειψη πιθανής μόλυνσης με μυκόπλασμα.

✓ Αρχικά διαλύματα πεπτιδίων

Τα συνθετικά πεπτίδια βρίσκονται σε λυοφιλιωμένη μορφή. Για τη χρήση τους διαλυτοποιούνται σε DMSO και σε τελική συγκέντρωση 20-25 mg/ml. Το διάλυμα χωρίζεται σε 100-200 μl και φυλάσσεται στους -30 °C.

Μηχανήματα

- ✓ Θάλαμος νηματικής ροής (*FluFrance*)

- ✓ Υδατόλουτρο (*Julabo, Γερμανία*)
- ✓ Φυγόκεντρος Sigma 4K10 (*Sigma -Aldrich*)
- ✓ Κλίβανος κυτταροκαλλιέργειας (37°C, 5% CO₂) (*Heraeus, Γερμανία*)
- ✓ Πολυκάναλη αυτόματη πιπέτα 20 - 200 μl (*Brand*)
- ✓ Αυτόματες πιπέτες τύπου Gilson (*Gilson*)
- ✓ Ημι-αυτόματος συλλέκτης κυττάρων / Semi-automatic cell harvester (*Skatron Inc., Νορβηγία*)
- ✓ Ξηρός κλίβανος 40 °C
- ✓ Μετρητής β-ακτινοβολίας (Liquid scintillation counter (1450 microbeta Trilux) (*Wallac, Φιλανδία*)

Μέθοδος

Για τη μελέτη της ανοσογονικότητας των πεπτιδίων πραγματοποιείται *in vivo* ενεργοποίηση των ειδικών λεμφοκυττάρων με το αντιγόνο, με ανοσοποίηση των πειραματόζων, απομόνωση και καλλιέργεια *in vitro* των κυττάρων των λεμφαδένων των πειραματόζων παρουσία του προς μελέτη αντιγόνου και μέτρηση του πολλαπλασιασμού των λεμφοκυττάρων. Ένα πεπτίδιο είναι ανοσογονικό όταν επάγει τον πολλαπλασιασμό λεμφοκυττάρων *in vivo*, και συνεπώς η *in vitro* παρουσίαση του ίδιου αντιγόνου από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα των λεμφαδένων να συνεπάγεται τον εκ νέου πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων. Με την προσθήκη της τριτωμένης θυμιδίνης στην καλλιέργεια επιτυγχάνεται η ενσωμάτωσή της στο DNA των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων και έτσι μπορεί να προσδιοριστεί ο βαθμός πολλαπλασιασμού των κυττάρων.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε ανοσοποίηση 3-4 ποντικών με τα αντιγόνα: p2208, p2352 και Tg ανθρώπου μαζί με CFA, όπως περιγράφηκε παραπάνω: 50 μl γαλακτώματος χορηγήθηκαν υποδορίως στη βάση της ουράς και 50 μl γαλακτώματος στη ράχη κάθε ποντικού. Σε κάθε ποντικό χορηγήθηκαν 100 nmol πεπτιδίου ή 75 μg = 0.114 nmol Tg ανθρώπου και 9 με 11 ημέρες αργότερα, απομονώθηκαν οι βουβωνικοί και μασχαλιαίοι λεμφαδένες για την παρασκευή εναιωρήματος λεμφοκυττάρων, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Το ίζημα που προέκυψε επαναδιαλυτοποιήθηκε σε κατάλληλη ποσότητα πλήρους θρεπτικού υλικού, έτσι ώστε η τελική του συγκέντρωση να ήταν 4×10^6 κύτταρα/ml.

Στα τρία φρεάτια της 1^{ης} σειράς της μικροπλάκας κυτταροκαλλιέργειας τοποθετήθηκαν 200 μl από τα αντιγόνα στις αρχικές τους συγκεντρώσεις και σε πλήρες θρεπτικό: 40 μg/ml (20 μM – διπλάσια από επιθυμητή, διότι η προσθήκη 100 μl κυττάρων θα τα αραιώσει 1:2) για τα πεπτίδια και 660 μg/ml (1 μM) για την Tg ανθρώπου. Στα φρεάτια των υπόλοιπων σειρών τοποθετήθηκαν 100 μl πλήρους θρεπτικού υλικού με πολυκάναλη αυτόματη πιπέτα, και ακολούθησαν διαδοχικές αραιώσεις 1:2, μεταφέροντας 100 μl από τα φρεάτια της 1^{ης} σειράς στα φρεάτια της 2^{ης} σειράς. Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται στην επόμενη σειρά μέχρι την επίτευξη της επιθυμητής τελικής αραιώσης των αντιγόνων, αφού αναδευτεί καλά το περιεχόμενο των φρεατίων με την πολυκάναλη πιπέτα. Στα φρεάτια της τελευταίας σειράς της μικροπλάκας δεν τοποθετήθηκε αντιγόνο, αλλά μόνο 100 μl πλήρους θρεπτικού υλικού.

Από το εναιώρημα των κυττάρων που προετοιμάστηκε πιο πάνω, τοποθετήθηκαν 100 μl σε κάθε φρεάτιο της μικροπλάκας με την πολυκάναλη πιπέτα και η πλάκα παρέμεινε στον κλίβανο στους 37°C με παροχή 5% CO₂ για 3 ημέρες.

Δεκαέξι ώρες πριν την ολοκλήρωση της επώασης προστέθηκε 1μCi τριτιωμένης θυμιδίνης ανά φρεάτιο κυτταροκαλλιέργειας σε 20 μl πλήρους θρεπτικού. Με την ολοκλήρωση της επώασης, τα κύτταρα συλλέχθηκαν, θραυσματοποιήθηκαν και τοποθετήθηκαν σε ειδικό φίλτρο με ίνες γυαλιού, με τη βοήθεια του ημιαυτόματου συλλέκτη κυττάρων. Το φίλτρο αφέθηκε να στεγνώσει για μία ώρα σε κλίβανο 40 °C. Ακολούθησε κόψιμο του φίλτρου σε μέγεθος αντίστοιχο με τα ειδικά σακουλάκια αποθήκευσής του και τα σακουλάκια με το φίλτρο πληρώθηκαν με το υγρό σπινθηρισμού και τοποθετήθηκαν στον μετρητή β-ακτινοβολίας για την μέτρηση των κρούσεων ανά λεπτό (c.p.m.) κάθε δείγματος. Για τον προσδιορισμό του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, εκφράστηκε ο δείκτης πολλαπλασιασμού (S.I. – stimulation index) ως εξής: το κλάσμα c.p.m. παρουσία αντιγόνου/ μέσος όρος των c.p.m. των φρεατίων που δεν περιείχαν αντιγόνο. Παράλληλα, υπολογίστηκε ο μέσος όρος του δείκτη πολλαπλασιασμού για κάθε αραιώση του κάθε αντιγόνου, καθώς και η τυπική απόκλιση.

10. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΩΝ ΠΟΥ ΕΚΚΡΙΝΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ ΜΕ ELISA

Υλικά

Αναλώσιμα

- ✓ Πλαστικά κωνικά σωληνάρια τύπου erpendorf χωρητικότητας 1.5 ml (*Sarstedt*)
- ✓ Ρύγχη για αυτόματες πιπέτες για όγκο 200 µl και 1 ml (*Greiner*)
- ✓ Βελόνες 20 G x 1'', 0.9 x 25 mm (*Pic Indolor*)
- ✓ Βελόνες 22 G x ½'', 0.45 x 12.7 mm (*Pic Indolor*)
- ✓ Γυάλινες σύριγγες χωρητικότητας 1 και 2 ml (*Becton, Dickinson & Co, ΗΠΑ*)
- ✓ Πλαστικός συνδέτης για σύριγγες τύπου H, (Luer-Lock H) (*Sigma-Aldrich*)
- ✓ Πλαστική σύριγγα 1 ml (*Becton, Dickinson & Co*)
- ✓ Ψαλίδια ανατομίας (*Thermo Scientific*)
- ✓ Λαβίδες (*Thermo Scientific*)
- ✓ Πλαστικά κωνικά σωληνάρια τύπου falcon χωρητικότητας 15 και 50 ml (*Greiner*)
- ✓ Τρυβλία Petri διαμέτρου 9 cm (*Sterilin Limited, Ηνωμένο Βασίλειο*)
- ✓ Σίτα με οπές διαμέτρου 50 µm (mesh 50) χωρητικότητας 85 ml (*Sigma - Aldrich*)
- ✓ Έμβολο πλαστικής σύριγγας των 5 ml (*Pic Indolor*)
- ✓ Πλαστικές πιπέτες μιας χρήσης των 5 και 10 ml (*Sarstedt*)
- ✓ Αιμοκυτταρόμετρο (*Sigma -Aldrich*)
- ✓ Μικροπλάκα πολυστυρενίου για κυτταροκαλλιέργεια 24 φρεατίων (*Costar, ΗΠΑ*)
- ✓ Φίλτρο με γυάλινες ίνες (Glass fiber filter) 102 x 258 mm (*Perkin Elmer*)
- ✓ Ειδικά σακουλάκια για μετρητή β-ακτινοβολίας διαστάσεων 90 x 120 mm (*Perkin Elmer, ΗΠΑ*)
- ✓ Εμπορική δοκιμασία για τον προσδιορισμό συγκέντρωσης κυτταροκινών τύπου Th1 και Th2 (Th1/Th2 ELISA Ready-Set-Go!) (*eBioscience, ΗΠΑ*)

Χημικά

- ✓ Διάλυμα Dulbecco's Modified Eagle's Minimal essential medium (10x)
Όπως περιγράφηκε παραπάνω

- ✓ Διάλυμα L-γλουταμίνης 200 mM
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ Ρυθμιστικό διάλυμα HEPES 1 M
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ Διάλυμα διττανθρακικού νατρίου
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ Διάλυμα πυροσταφυλικού νατρίου 100 mM
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ Διάλυμα πενικιλίνης 10.000 units/ml - στρεπτομυκίνης 10.000 µg/ml
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ β-Μερκαπτοαιθανόλη
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ Διάλυμα χρωστικής trypan blue
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ Διαιθυλαιθέρας, C₄H₁₀O
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ Διμεθυλ-σουλφοξειδίο (DMSO)
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ Δισόξινο φωσφορικό κάλιο
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ Μονόξινο φωσφορικό κάλιο
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ Χλωριούχο νάτριο
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ Ορός εμβρύων βοοειδών (Foetal Bovine Serum – FBS) (*Gibco*)
Φυλάσσεται στους -30°C.
- ✓ Τριτωμένη θυμιδίνη ((methyl-³H) thymidine), υδατικό διάλυμα 5 mCi / 5 ml,
ειδική ενεργότητα 25 Ci/mmol (*Amersham Pharmacia, Σουηδία*)
Φυλάσσεται στους 4°C
- ✓ Υγρό σπινθηρισμού OptiPhase SuperMix (*Perkin Elmer*)
Φυλάσσεται σε Θ.Δ.

- ✓ CFA
Όπως περιγράφηκε παραπάνω

Αντιγόνα

- ✓ p2208

Παρασκευή διαλυμάτων

- ✓ **Θρεπτικό υλικό κυτταροκαλλιέργειας**
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ **Θερμική απενεργοποίηση FBS**
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ **Αρχικά διαλύματα πεπτιδίων**
Όπως περιγράφηκε παραπάνω

Μηχανήματα

- ✓ Φυγόκεντρος Sigma 4K10 (*Sigma -Aldrich*)
- ✓ Θάλαμος νηματικής ροής (*FluFrance*)
- ✓ Αυτόματες πιπέτες τύπου Gilson (*Gilson*)
- ✓ Κλίβανος κυτταροκαλλιέργειας (37°C, 5% CO₂) (*Heraeus*)
- ✓ Συσκευή ανάδευσης σωλήνων (*Vortex*)
- ✓ Φασματοφωτόμετρο για πλάκες 96 φρεατίων Expert Plus (*ASYS Hitech, Αυστρία*)

Μέθοδος

Η ανοσοποίηση των πειραματόζων με το προς μελέτη αντιγόνο επάγει μεταξύ άλλων και την παραγωγή κυτταροκινών. Για τον έλεγχο του τύπου των παραγόμενων κυτταροκινών απομονώθηκαν λεμφαδένες από ανοσοποιημένα πειραματόζωα όπως περιγράφηκε παραπάνω, καλλιεργήθηκαν *in vitro* παρουσία αντιγόνου ανοσοποίησης, και συλλέχθηκε υπερκείμενο από κάθε φρεάτιο της μικροπλάκας κυτταροκαλλιέργειας. Στη συνέχεια με ELISA προσδιορίστηκε ο τύπος και η συγκέντρωση των κυτταροκινών που εκκρίνονται.

Πιο συγκεκριμένα, το διάλυμα των κυττάρων από τους λεμφαδένες που προέκυψε, αραιώθηκε με πλήρες θρεπτικό υλικό έτσι ώστε να αποκτήσει συγκέντρωση ίση με 2×10^6 κύτταρα/ml. Σε 9 φρεάτια μικροπλάκας κυτταροκαλλιέργειας 24 φρεατίων τοποθετήθηκε 1 ml από το διάλυμα των κυττάρων. Σε τρία από αυτά τοποθετήθηκε το πεπτιδίο p2208 με τελική συγκέντρωση 10 µg/ml, σε άλλα τρία το πεπτιδίο-μάρτυρας p2652 και στα υπόλοιπα τρία κανένα αντιγόνο. Η μικροπλάκα τοποθετήθηκε σε κλίβανο κυτταροκαλλιέργειας για δύο ημέρες και συλλέχθηκε υπερκείμενο που μεταφέρθηκε σε κωνικά πλαστικά σωληνάρια τύπου errendorf και φυγοκεντρήθηκε στα 5500 g για 5 λεπτά για να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα κυττάρων. Το τελικό υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέα κωνικά πλαστικά σωληνάρια τύπου errendorf και φυλάχθηκε στους -30°C μέχρις ότου μετρηθεί με ELISA.

Η μέτρηση των κυτταροκινών IL-2, IL-4, IL-10 και IFN- γ έγινε με χρήση προτυποποιημένης εμπορικής δοκιμασίας ELISA, όπως περιγράφεται παραπάνω και στο πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Σύμφωνα με αυτό, το ειδικό αντίσωμα που αναγνωρίζει κάθε μια από τις παραπάνω κυτταροκίνες αραιώθηκε στο διάλυμα επίστρωσης και 100 µl του αραιωμένου διαλύματος τοποθετήθηκαν στα φρεάτια μιας μικροπλάκας πολυστυρενίου και επώαστηκαν για 16 ώρες στους 4°C . Στη συνέχεια πλύθηκαν τα φρεάτια 5 φορές με το διάλυμα πλύσεων και ακολούθησε προσθήκη 200 µl διαλύματος επικάλυψης μη ειδικών θέσεων και επώαση για μια ώρα σε Θ.Δ.. Έπειτα από πλύσιμο 5 φορές των επιστρωμένων φρεατίων, προστέθηκαν στην μικροπλάκα τα παρακάτω δείγματα:

Δείγματα πρότυπης καμπύλης: χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταροκίνες IL-2, IL-4, IL-10 και IFN- γ οι οποίες αραιώθηκαν σε 440 µl διαλύματος επικάλυψης μη ειδικών θέσεων, με τελική συγκέντρωση 200 pg/ml (IL-2), 500 pg/ml (IL-4), 4000 pg/ml (IL-10) και 2000 pg/ml (IFN- γ). Από το διάλυμα αυτό, 200 µl μεταφέρθηκαν σε 2 φρεάτια, έτσι ώστε να ακολουθήσει διαδοχική αραιώση αυτών 1:2 στα επόμενα φρεάτια, όπως περιγράφηκε παραπάνω.

Δείγματα υπερκειμένων: υπερκείμενα από την καλλιέργεια των λεμφοκυττάρων, αφού αναδεύτηκαν καλά με vortex και φυγοκεντρήθηκαν σε 5500 g (8000 στροφές ανά λεπτό) για 5 λεπτά αραιώθηκαν 1:5 σε διάλυμα επικάλυψης μη ειδικών θέσεων.

Η μικροπλάκα αφέθηκε για 2 ώρες σε Θ.Δ. και τα φρεάτια πλυθήκαν 5 φορές με το διάλυμα έκπλυσης. Στη συνέχεια προστέθηκε το δεύτερο αντίσωμα που είναι συζευγμένο με βιοτίνη και αραιώθηκε σε διάλυμα επικάλυψης μη ειδικών θέσεων σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και 100 μl προστέθηκαν σε όλα τα φρεάτια. Η μικροπλάκα επώαστηκε για 1 ώρα σε Θ.Δ. και τα φρεάτια πλύθηκαν 5 φορές με το διάλυμα πλύσεων. Στη συνέχεια προστέθηκαν 100 μl από την κατάλληλη αραιώση διαλύματος συζεύγματος αβιδίνης-υπεροξειδάσης και ακολούθησε επώαση για 30 λεπτά σε Θ.Δ.. πραγματοποιήθηκε έκπλυση των φρεατίων της μικροπλάκας, 5 φορές, με το διάλυμα πλύσεων και ακολούθησε η προσθήκη 100 μl/φρεάτιο διαλύματος υποστρώματος υπεροξειδάσης.

Η ανάπτυξη της αντίδρασης διαπιστώθηκε σε φασματοφωτόμετρο με μέτρηση της O.D. κάθε φρεατίου στα 260 nm και τερματίστηκε όταν η πρότυπη καμπύλη είχε αναπτυχθεί πλήρως, με προσθήκη 50 μl διαλύματος τερματισμού και μέτρηση των φρεατίων στα 450 nm. Για κάθε αραιώση υπολογίστηκε ο μέσος όρος των O.D.. Από αυτόν αφαιρέθηκε ο μέσος όρος της O.D. στα φρεάτια που περιείχαν μόνο διάλυμα επικάλυψης μη ειδικών θέσεων.

11. ΕΠΑΓΩΓΗ ΑΜΕΣΗΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΑΥΤΟΑΝΟΣΗΣ ΘΥΡΕΟΕΙΔΙΤΙΔΑΣ (ΑΜΕΣΗ ΕΑΤ)

Υλικά

Αναλώσιμα

- ✓ Πλαστικά κωνικά σωληνάρια τύπου erpendorf χωρητικότητας 1,5 ml (*Sarstedt*)
- ✓ Ρύγχη για αυτόματες πιπέτες για όγκο 200 µl και 1 ml (*Greiner*)
- ✓ Βελόνα 20 G x 1'', 0,9 x 25 mm (*Pic Indolor*)
- ✓ Βελόνα 22 G x ½'', 0.45 x 12.7 mm (*Pic Indolor*)
- ✓ Γυάλινες σύριγγες χωρητικότητας 1 και 2 ml (*Becton, Dickinson & Co*)
- ✓ Πλαστικός συνδέτης για σύριγγες τύπου H (Luer-Lock H) (*Sigma-Aldrich*)
- ✓ Πλαστική σύριγγα 1 ml (*Becton, Dickinson & Co*)

Χημικά

- ✓ Δισόξινο φωσφορικό κάλιο
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ Μονόξινο φωσφορικό κάλιο
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ Χλωριούχο νάτριο
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ CFA
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ IFA (*Sigma-Aldrich*)
Φυλάσσεται στους 4°C.

Αντιγόνα

- ✓ Πεπτιδίιο p2208

Παρασκευή διαλυμάτων

- ✓ **PBS**
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ **Αρχικά διαλύματα πεπτιδίων**
Όπως περιγράφηκε παραπάνω

Μηχανήματα

- ✓ Αυτόματες πιπέτες τύπου Gilson (*Gilson*)
- ✓ Συσκευή ανάδευσης σωλήνων (*Vortex*)

Μέθοδος

Για την επαγωγή EAT, ακολουθείται το ίδιο πρωτόκολλο με τον έλεγχο της ανοσογονικότητας με τη διαφορά ότι στα πειραματόζωα χορηγείται αναμνηστική δόση αντιγόνου, και η διάρκεια του πειράματος είναι μεγαλύτερη.

Πιο ειδικά, το γαλάκτωμα του αντιγόνου p2208 με CFA παρασκευάστηκε όπως περιγράφηκε παραπάνω και χορηγήθηκε υποδόρια στη ράχη 8-10 πειραματόζωων από κάθε στέλεχος (100 μl/πειραματόζωο που περιείχαν 100 nmol p2208). Μετά από διάστημα τριών εβδομάδων παρασκευάστηκε γαλάκτωμα με το ίδιο αντιγόνο αλλά με IFA και χορηγήθηκαν υποδόρια στη ράχη 50 nmol πεπτιδίου σε 100 μl ανά πειραματόζωο. Δυο εβδομάδες μετά τη δεύτερη ανοσοποίηση ακολούθησε ο έλεγχος της επαγωγής EAT.

12. ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΠΑΓΩΓΗΣ ΕΑΤ

Υλικά

Αναλώσιμα

- ✓ Ψαλίδια ανατομίας (*Thermo Scientific*)
- ✓ Λαβίδες (*Thermo Scientific*)
- ✓ Πλαστικά κωνικά σωληνάρια τύπου erpendorf χωρητικότητας 1.5 ml (*Sarstedt*)
- ✓ Τρυβλία Petri διαμέτρου 60 mm (*Costar, ΗΠΑ*)
- ✓ Διάτρητες πλαστικές θήκες ιστών (*Thermo Scientific*)
- ✓ Γυάλινα ποτήρια ζέσεως (*ILMABOR*)
- ✓ Ογκομετρικοί κύλινδροι (*Brand*)
- ✓ Ρύγχη για αυτόματες πιπέτες για όγκο 200 μl και 1 ml (*Greiner*)
- ✓ Μεταλλικά καλούπια (*Thermo Scientific*)
- ✓ Λεπίδες μικροτόμου N35H (*Feather, Ηνωμένο Βασίλειο*)
- ✓ Αντικειμενοφόρες πλάκες θετικά φορτισμένες (Superfrost Plus) (*Menzel Gläser, Γερμανία*)
- ✓ Καλυπτρίδες 24x50 (*Knittel Gläser, Γερμανία*)

Χημικά

- ✓ Διάλυμα Dulbecco's Modified Eagle's Minimal essential medium (10x)
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ Διάλυμα L-γλουταμίνης 200 mM
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ Ρυθμιστικό διάλυμα Hepes 1 M
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ Διάλυμα διπτανθρακικού νατρίου
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ Διάλυμα πυροσταφυλικού νατρίου 100 mM
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ Διάλυμα πενικιλίνης 10.000 units/ml - στρεπτομικίνης 10000 μg/ml
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ β-Μερκαπτοαιθανόλη
Όπως περιγράφηκε παραπάνω

- ✓ Φορμαλδεΰδη πυκνό διάλυμα (*Sigma- Aldrich*)
Φυλάσσεται σε Θ.Δ.
- ✓ Αιθανόλη 100%, C₂H₆O, πυκνότητα=0.788 gr/ml (*Sigma- Aldrich*)
Φυλάσσεται σε Θ.Δ.
- ✓ Αιματοξυλίνη (Haematoxylin Harris) (*BDH, Ηνωμένο Βασίλειο*)
Φυλάσσεται σε Θ.Δ.
- ✓ Διάλυμα διπτανθρακικού νατρίου 7.5% (*Gibco*)
Φυλάσσεται σε Θ.Δ.
- ✓ Ηωσίνη (υδατικό διάλυμα 0.5% w/v) (*BDH*)
Φυλάσσεται σε Θ.Δ.
- ✓ Ξυλόλη (*Techline, Ιρλανδία*)
Φυλάσσεται σε Θ.Δ. στον απαγωγό.
- ✓ Παραφίνη (paraplast) (*BDH*)
Φυλάσσεται σε Θ.Δ. στον απαγωγό.
- ✓ Υδροχλωρικό οξύ 37%, HCl, πυκνότητα=1.19 gr/ml (*Merck*)
Φυλάσσεται σε Θ.Δ.
- ✓ DePex mounting medium (*BDH*)
Φυλάσσεται σε Θ.Δ.

Παρασκευή διαλυμάτων

- ✓ **Θρεπτικό υλικό**
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ **Αιθανόλη 96% v/v**
1.9 L αιθανόλης 100% και 100 ml νερό βρύσης
- ✓ **Αιθανόλη 85% v/v**
850 ml αιθανόλης 100% και 150 ml νερό βρύσης
- ✓ **Αιθανόλη 80% v/v**
160 ml αιθανόλης 100% και 40 ml νερό βρύσης
- ✓ **Αιθανόλη 70% v/v**
1.4 L αιθανόλης 100% και 600 ml νερό βρύσης
- ✓ **Αιθανόλη 50% v/v**
500 ml αιθανόλης 100% και 500 ml νερό της βρύσης

✓ **Οξυνισμένο οινόπνευμα**

2 ml HCl 10 N σε 200 ml διαλύματος αιθανόλης 70%

Μηχανήματα - Συσκευές

- ✓ Στερεοσκόπιο
- ✓ Ιστοκινέτα (*Leica, Γερμανία*)
- ✓ Δοχείο τήξης παραφίνης που αποτελείται από δοχείο 60°C και πλάκα 20°C (*Leica*)
- ✓ Πλάκα πήξης παραφίνης με θερμοκρασία -15°C (*Leica*)
- ✓ Υδατόλουτρο (*Julabo*)
- ✓ Μικροτόμος (*Leica*)
- ✓ Κλίβανος 60°C (*Memmert, Γερμανία*)
- ✓ Φωτονικό μικροσκόπιο

Μέθοδος

Για τη μελέτη της επαγωγής EAT, απομονώνονται οι θυρεοειδής αδένες και πραγματοποιούνται τομές, έτσι ώστε να διαπιστωθεί τυχόν διήθησή τους από μονοπύρρηνα κύτταρα. Για το λόγο αυτό, απαιτείται ο εγκλεισμός τους σε ένα σκληρό υλικό, όπως η παραφίνη, η αφυδάτωσή τους μέσω της αλκοόλης, η αντικατάσταση της αλκοόλης από ξυλόλη και τέλος η αντικατάσταση αυτής από παραφίνη. Η όλη διαδικασία αντιστρέφεται έπειτα από τον τεμαχισμό του αδένα στη μικροτόμο και την τοποθέτηση των τομών σε αντικειμενοφόρες πλάκες, έτσι ώστε να ακολουθήσει η χρώση τους με αιματοξυλίνη και ηωσίνη.

Πιο συγκεκριμένα, απομονώθηκε τμήμα της τραχείας που φέρει το θυρεοειδή αδένα και τοποθετήθηκε σε πλαστικά σωληνάρια τύπου errendorf με περιείχαν θρεπτικό υλικό. Με τη βοήθεια στερεοσκοπίου και σε μικρά τρυβλία Petri πραγματοποιήθηκε αφαίρεση του οισοφάγου και των υπόλοιπων ιστών που περιβάλλουν το θυρεοειδή αδένα. Ο καθαρισμένος θυρεοειδής αδένας και το υπόλοιπο τμήμα της τραχείας τοποθετήθηκε σε πλαστικά σωληνάρια τύπου errendorf που περιείχαν διάλυμα φορμόλης 10% v/v και παρέμειναν σε Θ.Δ. για 24 ώρες. Στη συνέχεια οι ιστοί πλύθηκαν με νερό βρύσης και τοποθετήθηκαν σε

πλαστικές διάτρητες θήκες για να μεταφερθούν στην ιστοκινέτα, όπου ακολουθήθηκε το παρακάτω πρωτόκολλο:

i) Αφυδάτωση ιστού

Η ιστοκινέτα που αποτελείται από ένα κεντρικό ρότορα μετέφερε τους ιστούς διαδοχικά σε αυξανόμενη συγκέντρωση διαλυμάτων αιθανόλης για την

αφυδάτωση των ιστών:

Αιθανόλη 50% - 30 λεπτά

Αιθανόλη 70% - 30 λεπτά

Αιθανόλη 70% - 30 λεπτά

Αιθανόλη 85% - 45 λεπτά

Αιθανόλη 96% - 45 λεπτά

Αιθανόλη 96% - 45 λεπτά

Αιθανόλη 100% - 45 λεπτά

Αιθανόλη 100% - 45 λεπτά

ii) Διαφανοποίηση ιστού:

Ξυλόλη για 45 λεπτά

Ξυλόλη για 30 λεπτά

iii) Παραφινοποίηση ιστού:

Παραφίνη (60°C) για 1 ώρα

Παραφίνη (60°C) - μπορεί να παραμείνει όσο χρειάζεται μέχρι να προχωρήσουμε στο επόμενο βήμα

Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας οι ιστοί μεταφέρθηκαν στα μεταλλικά καλούπια, καλύφθηκαν με το κάτω μέρος των πλαστικών θηκών και προστέθηκε λιωμένη παραφίνη. Η πήξη της παραφίνης ολοκληρώθηκε στην πλάκα πήξης της παραφίνης που βρισκόταν στους -15°C και μετά από περίπου 10 λεπτά αφαιρέθηκαν τα μεταλλικά καλούπια. Με τον τρόπο αυτό οι αδένες ήταν έτοιμοι για τεμαχισμό στη μικροτόμο (4 μm). Οι ιστολογικές τομές βυθίστηκαν σε κρύο νερό για τόσο χρόνο όσο χρειάζεται για να γίνει η διαλογή τους και στη συνέχεια σε ζεστό νερό (43°C) για 10 δευτερόλεπτα προκειμένου να επιτευχθεί η διάνοιξή τους και η προσκόλληση στις αντικειμενοφόρες πλάκες, όπου και παρέμειναν για περίπου 12 ώρες μέχρι να στεγνώσουν.

Οι αντικειμενοφόρες πλάκες με τους ιστούς τοποθετήθηκαν σε σε ξηρό κλίβανο (60°C), ώστε να λιώσει η παραφίνη και έπειτα οι τομές εμβαπτίστηκαν διαδοχικά στα παρακάτω διαλύματα:

- 1) Ξυλόλη για 15 λεπτά
(με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η αποπαραφίνωση των τομών)
- 2) Αιθανόλη 96% για 2.5 λεπτά
Αιθανόλη 96% για 2.5 λεπτά
Πλύσιμο με νερό βρύσης
(σκοπός του σταδίου αυτού είναι η ενυδάτωση των τομών)
- 3) Αιματοξυλίνη για 5 λεπτά
Έκπλυση με νερό βρύσης
Οξυρισμένο οινόπνευμα για 5 δευτερόλεπτα
(η αιματοξυλίνη χρησιμοποιείται ως χρωστική των πυρήνων)
Έκπλυση με νερό βρύσης
- 4) Ηωσίνη για 1 λεπτό
Έκπλυση με νερό βρύσης
(με την ηωσίνη βάφονται οι κυτταρικές μεμβράνες)
- 5) Αιθανόλη 70% για 10 δευτερόλεπτα
Αιθανόλη 80% για 10 δευτερόλεπτα
Αιθανόλη 96% για 10 δευτερόλεπτα
Αιθανόλη 100% για 10 δευτερόλεπτα
Αιθανόλη 100% για 10 δευτερόλεπτα
(σταδιακά πλυσίματα με αιθανόλη εξασφαλίζουν την αφυδάτωση)
- 6) Ξυλόλη για 30 δευτερόλεπτα
(η ξυλόλη διαφανοποιεί τους ιστούς)

Μετά το τελικό στάδιο διαφανοποίησης καλύπτονται καλυπτρίδες με μικρή ποσότητα DePex και εναποθέτονται στις αντικειμενοφόρες πλάκες. Έτσι οι πλάκες είναι έτοιμες για παρατήρηση στο φωτονικό μικροσκόπιο και αξιολόγηση του βαθμού διήθησης (Infiltration Index – I.I.) σύμφωνα με την κλίμακα:

I.I. = 0 (φυσιολογική δομή αδένων)

I.I. = 1 (συσσώρευση μονοπύρηνων κυττάρων ανάμεσα σε ένα με δύο θυλάκια)

I.I. = 2 (μια με δύο εστίες μονοπύρηνων κυττάρων με έκταση ίση ενός θυλακίου)

I.I. = 3 (διήθηση που καλύπτει 10 – 40% της έκτασης της τομής)

I.I. = 4 (διήθηση που καλύπτει 40–80% της έκτασης της τομής)

I.I. = 5 (διήθηση που καλύπτει >80% της έκτασης της τομής)

13. ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΟΣΟΓΟΝΙΚΟΤΗΤΑΣ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΣΕ ΕΠΙΠΕΔΟ Β ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ELISA

Υλικά

Αναλώσιμα

- ✓ Πλαστικά κωνικά σωληνάρια τύπου erpendorf χωρητικότητας 1.5 ml (*Sarstedt*)
- ✓ Ρύγχη για αυτόματες πιπέτες για όγκο 200 μl και 1 ml (*Greiner*)
- ✓ Βελόνα 20 G x 1'', 0,9 x 25 mm (*Pic Indolor*)
- ✓ Βελόνα 22 G x ½'', 0,45 x 12,7 mm (*Pic Indolor*)
- ✓ Γυάλινες σύριγγες χωρητικότητας 1 και 2 ml (*Becton, Dickinson & Co*)
- ✓ Πλαστικός συνδέτης για σύριγγες τύπου H (Luer-Lock H) (*Sigma-Aldrich*)
- ✓ Πλαστική σύριγγα 1 ml (*Becton, Dickinson & Co*)
- ✓ Λεπίδα νυστεριού (*ALBION Medicals, ΗΠΑ*)
- ✓ Ογκομετρικοί κύλινδροι (*Brand*)
- ✓ Πλάκες πολυστυρενίου 96 φρεατίων για ELISA (*Nunc*)
- ✓ Πλαστικά κωνικά σωληνάρια τύπου falcon χωρητικότητας 15 και 50 ml (*Greiner*)
- ✓ Ποτήρια ζέσεως (*ILMABOR*)

Χημικά

- ✓ Δισόξινο φωσφορικό κάλιο
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ Μονόξινο φωσφορικό κάλιο
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ Χλωριούχο νάτριο
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ Tween 20 (*Merck*)
Φυλάσσεται σε Θ.Δ.
- ✓ Μονόξινο ανθρακικό νάτριο
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ Ανθρακικό νάτριο
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ Βόεια αλβουμίνη ορού-κλάσμα V

- Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ Γλυκερόλη, $C_3H_8O_3$, πυκνότητα=1,26 gr/ml (*Merck*)
Φυλάσσεται σε Θ.Δ.
- ✓ Γλυκίνη
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ Χλωριούχο μαγνήσιο
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ Καυστικό νάτριο
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ Χλωριούχος ψευδάργυρος
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ Εμπορικό αντίσωμα από κασίκα, το οποίο αναγνωρίζει αντισώματα ποντικού ταξης G συζευγμένο με αλκαλική φωσφατάση (Δεύτερο αντίσωμα). Παρέχεται από την εταιρία παραγωγής αραιωμένο (1 mg/ml) σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris pH 8.0, το οποίο περιέχει επιπλέον 1% BSA, 1 mM $MgCl_2$ και 15 mM αζίδιο του νατρίου (*Sigma-Aldrich*).
- ✓ ρNPP
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ CFA
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ IFA
Όπως περιγράφηκε παραπάνω

Αντιγόνα

- ✓ Πεπτίδιο p2208

Παρασκευή διαλυμάτων

- ✓ **PBS**
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ **Ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικού-διττανθρακικού νατρίου 1M, pH 9.5 (cbc)**
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ **Διάλυμα PBS-Tween**

- Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ **Διάλυμα PBS-BSA**
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ **Διάλυμα PBS-Tween-BSA**
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ **NaOH 19 N**
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ **Διαλύτης pNPP**
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ **Αρχικό διάλυμα δεύτερου αντισώματος**
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ **Διάλυμα υποστρώματος αλκαλικής φωσφατάσης**
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ **Αρχικά διαλύματα πεπτιδίων**
Όπως περιγράφηκε παραπάνω

Μηχανήματα - Συσκευές

- ✓ Αυτόματες πιπέτες τύπου Gilson (*Gilson*)
- ✓ Ξηρός κλίβανος (37°C)
- ✓ Πολυκάναλη αυτόματη πιπέτα 20-200 μl (*Brand*)
- ✓ Συσκευή ανάδευσης σωλήνων (*Vortex*)
- ✓ Φυγόκεντρος Sigma 4K10 (*Sigma -Aldrich*)
- ✓ Φασματοφωτόμετρο για πλάκες 96 φρεατίων Expert Plus (*ASYS Hitech, Αυστρία*)

Μέθοδος

Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία για την επαγωγή άμεσης EAT και ως αντιγόνο ανοσοποίησης χρησιμοποιήθηκε το p2208. Ορός από τα πειραματόζωα συλλέχθηκε πριν τη χορήγηση του γαλακτώματος ανοσοποίησης και αντι-ορός μετά το πέρας δυο εβδομάδων μετά τη δεύτερη ανοσοποίηση των πειραματόζωων προκαλώντας υπεραϊμία των ποντικών με τη βοήθεια λάμπας. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε με λεπίδα μια μικρή τομή στην ουρά των ποντικών και το αίμα

συλλέχθηκε σε κωνικά σωληνάρια τύπου erpendorf. Τα σωληνάρια τοποθετήθηκαν για μια ώρα στο ψυγείο (4°C) και φυγοκεντρήθηκαν στα 5500 g (8000 στροφές ανά λεπτό) για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και φυλάχθηκε στους -30°C μέχρι να πραγματοποιηθεί η ELISA (όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο III.4) Τα δείγματα προς ανάλυση αραιώθηκαν σε διάλυμα PBS-BSA-Tween σε αραιώση 1/50 και πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις 1/3. Πραγματοποιήθηκε επώαση για 2 ώρες σε ξηρό κλίβανο στους 37°C και τέσσερις εκπλύσεις των φρεατίων με διάλυμα PBS-Tween.

14. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΝΟΣΟΠΡΟΣΡΟΦΗΤΗ ΚΑΙ ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΤΩΝ ΕΙΔΙΚΩΝ ΓΙΑ ΤΟ P2208 ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

Υλικά

Αναλώσιμα

- ✓ Σφαιρίδια AcA 3.4 (IBF biotechnics)
- ✓ Γυάλινη κωνική φιάλη ζέσεως χωρητικότητας 50 ml (*ILMABOR*)
- ✓ Πλαστικά κωνικά σωληνάρια τύπου falcon χωρητικότητας 15 και 50 ml (*Greiner, Γερμανία*)
- ✓ Ρύγχη για αυτόματες πιπέτες όγκου 200 μl και 1 ml (*Greiner*)
- ✓ Γυάλινη πιπέτα Pasteur με κλειστό άκρο (*CEB, Γαλλία*)

Χημικά

- ✓ Γλουταραλδεϋδη 25% (*Sigma –Aldrich*)
- ✓ Μονόξινο φωσφορικό κάλιο
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ Δισόξινο φωσφορικό κάλιο
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ Χλωριούχο νάτριο
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ Γλυκίνη
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ Υδροχλωρικό οξύ
Όπως περιγράφηκε παραπάνω

Αντιγόνα

- ✓ Πεπτίδιο p2208 με ελεύθερα αμινο- και καρβόξυ-τελικά άκρα

Παρασκευή διαλυμάτων

- ✓ **PBS**
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ **Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων καλίου 0.1 M, pH 7.4 ή pH 8**
Όπως περιγράφηκε παραπάνω

- ✓ **Διάλυμα γλυκίνης 0.1 M σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων καλίου pH 8**

0.75 gr γλυκίνης διαλύονται σε 100 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων καλίου pH 8

- ✓ **Διάλυμα έκλουσης αντισωμάτων HCl-γλυκίνης 0.2 N, pH2.8**

100 ml HCl 2 N αναμιγνύονται με διάλυμα γλυκίνης 2 M έως ότου το pH είναι ίσο με 2.8. Ο όγκος συμπληρώνεται με απεσταγμένο νερό μέχρι το 1 L

Μηχανήματα

- ✓ Shaker (*Edmund Buehler, Γερμανία*)
- ✓ Ρότορας (*Bioblock Scientific*)
- ✓ Φυγόκεντρος Sigma 4K10 (*Sigma -Aldrich*)
- ✓ Συσκευή συμπύκνωσης με φυγοκέντρηση (*Amicon Ultra-0.5, Millipore, ΗΠΑ*)
- ✓ Φασματοφωτόμετρο κυψελίδων ULTROSPEC II (200 – 900 nm) (*Biochrom, Ηνωμένο Βασίλειο*)
- ✓ Αυτόματες πιπέτες τύπου Gilson (*Gilson*)

Μέθοδος

Για τη μελέτη της δραστηριότητας των αντι-ορών των ποντικών έναντι στην Tg και στο p2208, κατασκευάστηκε ανοσοπροσοροφητής με το p2208 με τη χρήση ειδικών σφαιριδίων πολυακρυλαμιδίου αγαρόζης.

Πιο αναλυτικά, 5 ml σφαιριδίων AcA 3.4 αναμίχθηκαν με 5 ml γλουταραλδεΰδης 25% και 15 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων καλίου σε κωνική φιάλη των 50 ml. Η φιάλη κλείστηκε ερμητικά, καλύφθηκε με αλουμινόχαρτο και αφέθηκε στους 37°C για 12 ώρες υπό ανάδευση. Στη συνέχεια, αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και τα σφαιρίδια μεταφέρθηκαν σε κωνικά σωληνάρια τύπου falcon χωρητικότητας 50 ml. Ακολούθησαν 20 πλύσεις με 50 ml τη φορά ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων καλίου pH7.4 και 2 πλύσεις με 50 ml τη φορά ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων καλίου pH8,. Μετά από κάθε πλύση ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 2000g (3000 στροφές ανά λεπτό) για 5 λεπτά και προσεκτική αφαίρεση του υπερκείμενου.

Από τα σφαιρίδια αυτά χρησιμοποιήθηκε 1 ml, το οποίο αναμίχθηκε με 800 µg p2208 σε 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων καλίου pH8. Το πεπτιδίο είχε ελεύθερα τα αμινο- και καρβόξυ-τελικά άκρα που του επέτρεπαν έτσι την πρόσδεση στα σφαιρίδια. Το μίγμα αυτό μεταφέρθηκε σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα και αφέθηκε υπό ανάδευση σε ρότορα σε Θ.Δ. για 3 ημέρες. Λόγω της μεγάλης διάρκειας της επώασης, όλα τα διαλύματα ήταν αποστειρωμένα.

Μετά το πέρας των 3 ημερών, αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και ακολούθησαν 6 πλύσεις με 1 ml τη φορά ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων καλίου pH8, μέχρις ότου το υπερκείμενο δεν παρουσίαζε οπτική απορρόφηση στα 280 nm. Στα σφαιρίδια προστέθηκαν 2-3 ml 0.1 M γλυκίνης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων καλίου pH8 και το μίγμα επωάστηκε στους 4°C για 12 ώρες. Τέλος, το μίγμα πλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων καλίου pH7.4 και ελέγχθηκε η επιτυχής πρόσδεση του πεπτιδίου με προσθήκη διαλύματος έκλουσης και έλεγχο υπερκείμενου. Το pH της στήλης εξουδετερώθηκε με προσθήκη 0.1 M μονόξινου φωσφορικού καλίου και η στήλη πλύθηκε με PBS που περιείχε αζίδιο του νατρίου και φυλάχθηκε στους 4°C.

και 1 με pH7.4

Με την ολοκλήρωση της πρόσδεσης του πεπτιδίου στον ανοσοπροσροφητή επωάστηκαν 300 µl αντι-ορού από 4 C57BL/6 ποντικούς που είχαν ανοσοποιηθεί με το p2208 και παρουσίαζαν υψηλή δραστικότητα έναντι του πεπτιδίου και της Tg. Το δείγμα αρχικά αραιώθηκε με 2 όγκους PBS και επωάστηκε για 2 ώρες σε Θ.Δ.. Με τη βοήθεια γυάλινης πιπέτας Pasteur με κλειστό άκρο και κάθε 15 λεπτά, το μίγμα αναδεύονταν, έτσι ώστε να εξασφαλιστεί η μέγιστη πρόσδεση των ατισωμάτων από τον ανοσοπροσροφητή. Στη συνέχεια ακολούθησαν πλύσεις με PBS μέχρις ότου το υπερκείμενο (έκπλυση) να μην παρουσιάζει οπτική απορρόφηση στα 280 nm. Όλα τα υπερκείμενα από το στάδιο αυτό συλλέχθηκαν και συμπυκνώθηκαν με φυγοκέντρηση με τη χρήση συσκευής συμπύκνωσης με φυγοκέτρηση.

Τα αντισώματα που προσδέθηκαν στον ανοσοπροσροφητή εκλούστηκαν με την προσθήκη όξινου διαλύματος 0.2N HCl-glycine pH2.8. Το μίγμα αναδεύτηκε, αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκε εκ νέου διάλυμα οξέως, μέχρις ότου το υπερκείμενο δεν είχε οπτική απορρόφηση στα 280 nm.

Τα συμπυκνωμένα κλάσματα των αντι-ορών απουσία p2208 που συλλέχθηκαν, επωάστηκαν με τον ανοσοπροσροφητή 4 φορές, για να εξασφαλιστεί η μέγιστη απομάκρυνση των ειδικών αντι-p2208 αντισωμάτων. Τέλος, τα απομονωμένα αντισώματα καθώς και το κλάσμα της έκπλυσης αναλύθηκαν με ELISA, όπως περιγράφηκε παραπάνω, για τον έλεγχο της ειδικότητάς τους.

15. ΕΛΕΓΧΟΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΤΩΝ ΟΡΩΝ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΠΟΝΤΙΚΩΝ ΜΕ ELISA

Αναλώσιμα

- ✓ Πλαστικά κωνικά σωληνάρια τύπου erpendorf χωρητικότητας 1.5 ml (*Sarstedt*)
- ✓ Ρύγχη για αυτόματες πιπέτες για όγκο 200 μl και 1 ml (*Greiner*)
- ✓ Ογκομετρικοί κύλινδροι (*Brand*)
- ✓ Πλάκες πολυστυρενίου 96 φρεατίων για ELISA (*Nunc*)
- ✓ Πλαστικά κωνικά σωληνάρια τύπου falcon χωρητικότητας 15 και 50 ml (*Greiner*)
- ✓ Ποτήρια ζέσεως (*ILMABOR*)

Χημικά

- ✓ Δισόξινο φωσφορικό κάλιο
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ Μονόξινο φωσφορικό κάλιο
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ Χλωριούχο νάτριο
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ Tween 20 (*Merck*)
Φυλάσσεται σε Θ.Δ.
- ✓ Μονόξινο ανθρακικό νάτριο
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ Ανθρακικό νάτριο
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ Βόεια αλβουμίνη ορού-κλάσμα V
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ Γλυκερόλη, $C_3H_8O_3$, πυκνότητα=1,26 gr/ml (*Merck*)
Φυλάσσεται σε Θ.Δ.
- ✓ Γλυκίνη
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ Χλωριούχο μαγνήσιο
Όπως περιγράφηκε παραπάνω

- ✓ Καυστικό νάτριο
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ Χλωριούχος ψευδάργυρος
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ Εμπορικό αντίσωμα από κατσίκια, το οποίο αναγνωρίζει αντισώματα ανθρώπου τάξης G συζευγμένο με υπεροξειδάση (Δεύτερο αντίσωμα). Παρέχεται από την εταιρεία παραγωγής αραιωμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS pH 7.4, το οποίο περιέχει επιπλέον 1% BSA και 0.01% thimerosal (ethyl-mercury-thio-salicylate) (*Sigma-Aldrich*)
- ✓ TMB
Όπως περιγράφηκε παραπάνω

Αντιγόνα

- ✓ Πεπτίδιο p2208
- ✓ Tg ανθρώπου

Παρασκευή διαλυμάτων

- ✓ **PBS**
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ **Ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικού-διττανθρακικού νατρίου 1M, pH 9.5 (cbc)**
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ **Διάλυμα PBS-Tween**
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ **Διάλυμα PBS-BSA**
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ **Διάλυμα PBS-Tween-BSA**
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ **NaOH 19 N**
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ **Αρχικό διάλυμα δεύτερου αντισώματος**
Όπως περιγράφηκε παραπάνω
- ✓ **Διάλυμα υποστρώματος υπεροξειδάσης**

Για κάθε πλάκα ELISA χρησιμοποιούνται 11 ml έτοιμου διαλύματος TMB

✓ **Αρχικά διαλύματα πεπτιδίων**

Όπως περιγράφηκε παραπάνω

Μηχανήματα

- ✓ Αυτόματες πιπέτες τύπου Gilson (*Gilson*)
- ✓ Ξηρός κλίβανος (37°C)
- ✓ Πολυκάναλη αυτόματη πιπέτα 20-200 µl (*Brand*)
- ✓ Συσκευή ανάδευσης σωλήνων (*Vortex*)
- ✓ Φυγόκεντρος Sigma 4K10 (*Sigma -Aldrich*)
- ✓ Φασματοφωτόμετρο για πλάκες 96 φρεατίων Expert Plus (*ASYS Hitech, Αυστρία*)

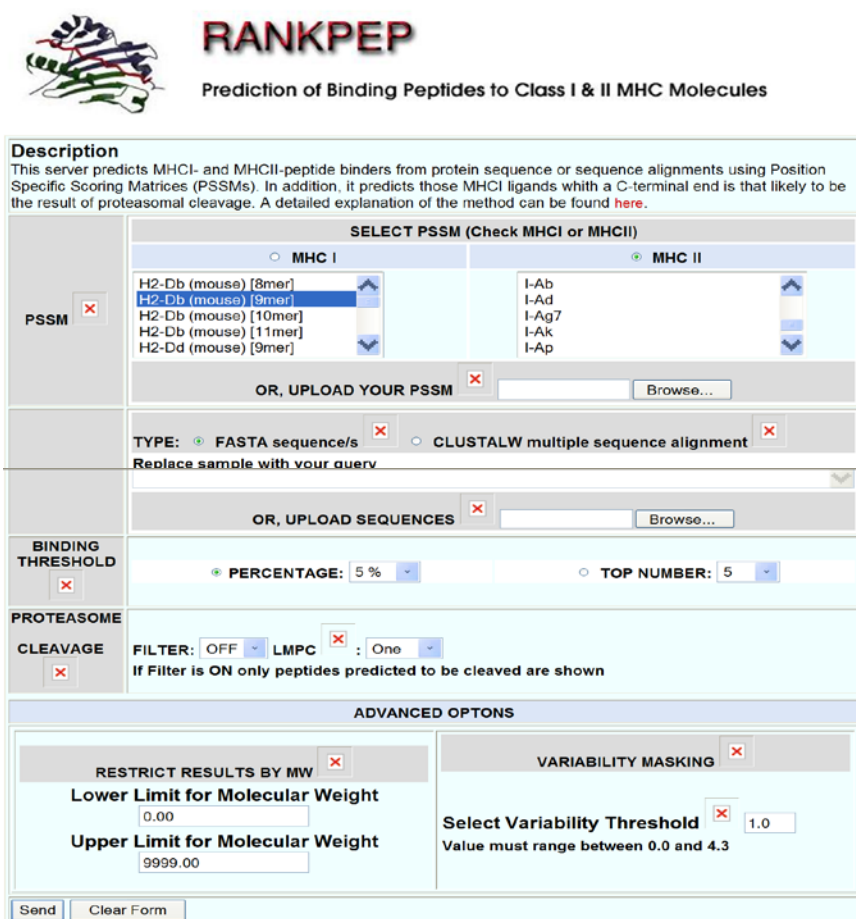
Μέθοδος

Η ELISA για τον έλεγχο της δραστηριότητας του κλάσματος του αντι-ορού των ποντικών και των απομονωμένων αντισωμάτων έγινε όπως περιγράφηκε παραπάνω στο κεφάλαιο III.4. Τα πεπτιδία επιστρώθηκαν σε συγκέντρωση 10 µg/ml και η Tg σε 5 µg/ml. Τα δείγματα προς ανάλυση αραιώθηκαν σε διάλυμα PBS-BSA-Tween σε αραιώση 1/50 και πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις 1/3. Πραγματοποιήθηκε επώαση για 2 ώρες σε ξηρό κλίβανο στους 37°C και τέσσερις εκπλύσεις των φρεατίων με διάλυμα PBS-Tween.

16. ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ *IN SILICO* ΜΕΛΕΤΗΣ

16.1 RANKPEP

Ο αλγόριθμος RANKPEP είναι διαθέσιμος στην ιστοσελίδα <http://bio.dfci.harvard.edu/RANKPEP/> και χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη της αμινοξικής αλληλουχίας των πεπτιδίων p2208, p2352, p2472. Αναλυτικά, στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν όλα τα διαφορετικά μόρια τάξης II του MHC που διαθέτει ο αλγόριθμος (MHC II). Η ικανότητα των πεπτιδίων να συνδέονται στα εκάστοτε μόρια του MHC υπολογίστηκε με βάση το 5% των πεπτιδίων εκείνων που εμφανίζουν υψηλότερη βαθμολογία (Binding threshold), ενώ δεν χρησιμοποιήθηκαν οι επιλογές πρόβλεψης σημείου διάσπασης από το πρωτεάσωμα (proteasome cleavage) καθώς και οι εξειδικευμένες επιλογές για πρωτεΐνες που μεταλλάσσονται (advanced options).



RANKPEP
Prediction of Binding Peptides to Class I & II MHC Molecules

Description
This server predicts MHC I- and MHCII-peptide binders from protein sequence or sequence alignments using Position Specific Scoring Matrices (PSSMs). In addition, it predicts those MHC I ligands which a C-terminal end is that likely to be the result of proteasomal cleavage. A detailed explanation of the method can be found [here](#).

PSSM **SELECT PSSM (Check MHC I or MHCII)**

MHC I MHC II

H2-Db (mouse) [8mer]
H2-Db (mouse) [9mer]
H2-Db (mouse) [10mer]
H2-Db (mouse) [11mer]
H2-Dd (mouse) [9mer]

I-Ab
I-Ad
I-Ag7
I-Ak
I-Ap

OR, UPLOAD YOUR PSSM Browse...

TYPE: FASTA sequence/s CLUSTALW multiple sequence alignment

Replace sample with your query

OR, UPLOAD SEQUENCES Browse...

BINDING THRESHOLD

PERCENTAGE: 5% TOP NUMBER: 5

PROTEASOME CLEAVAGE

FILTER: OFF LMPC : One

If Filter is ON only peptides predicted to be cleaved are shown

ADVANCED OPTIONS

RESTRICT RESULTS BY MW

Lower Limit for Molecular Weight
0.00

Upper Limit for Molecular Weight
9999.00

VARIABILITY MASKING

Select Variability Threshold 1.0
Value must range between 0.0 and 4.3

Send Clear Form

Εικόνα 5: Ο αλγόριθμος RANKPEP με τις επιμέρους επιλογές αναζήτησης.

16.2 Altuvia

Ο αλγόριθμος της ομάδας Altuvia βασίζεται σε γνωστά αμινοξέα, ικανά να προσδεθούν σε MHC μόρια και τα αμινοξέα αυτά έχουν διαχωριστεί βάση των φυσικο-χημικών και δομικών ιδιοτήτων τους σε τρία μοτίβα για τα μόρια A^k και πέντε για τα μόρια E^k. Τα μοτίβα αυτά είναι:

MHC μόρια A^k

Μοτίβο A:

[D,E,H,N,Q]-{N,Q}-X-[I,L,T,V]-X-{F,H,W,Y}-[A,C,F,I,L,M,P,T,V,W,Y]¹

Μοτίβο B:

[C,D,E,H,N,Q,Y]-{D,E}-X-[I,L,T,V]-[D,E,H,N,Q]

Μοτίβο C:

[C,I,L,N,P,T,V]-[C,H,N,Q,S,T,Y]-[C,H,K,N,Q,R,S,T,Y]

MHC μόρια E^k

Μοτίβο A:

[A,C,F,I,L,M,P,T,V,W,Y]-X-[A,C,F,I,L,M,P,T,V,W,Y]-{D,E}-{D,E}-{H,K,R}-
{F,H,N,Q,W,Y}-{D,E,F,H,N,Q,W,Y}-[K,R]

Μοτίβο B:

[A,F,I,L,P,V,W]-X-[A,C,F,I,L,M,P,T,V,W,Y]-{A,D,E,G,S}-[H,K,Q,R,Y]-X-{N,Q}-
{F,H,N,Q,W,Y}-[D,E,K,N,Q,R]

Μοτίβο C:

[A,I,L,S,T,V]-{N,Q}-[A,C,F,I,L,M,P,T,V,W,Y]-{D,E}-[A,C,F,I,L,M,P,T,V,W,Y]-{N,Q}-
[D,E,K,N,Q,R]

Μοτίβο D:

[A,I,L,S,T,V]-{H,K,R}-X-[C,H,K,N,Q,R,W,Y]-{D,E,F,H,W,Y}-[E,F,H,K,M,R,W,Y]

Μοτίβο E:

A-{H,K,R}-{A,C,F,I,L,M,P,T,V,W,Y}-{F,H,W,Y}-[C,H,K,N,Q,R,W,Y,]

¹ Επεξήγηση συμβόλων:

[]: μπορεί να εντοπίζεται οποιοδήποτε από αυτά τα αμινοξέα

{ } : μπορεί να εντοπίζεται οποιοδήποτε, πλην αυτών των αμινοξέων

X: μπορεί να εντοπίζεται οποιοδήποτε αμινοξύ

16.3 ProtParam

Το πρόγραμμα ProtParam είναι διαθέσιμο στην ιστοσελίδα <http://web.expasy.org/protparam/> και υπολογίζει τις διάφορες φυσικοχημικές ιδιότητες πρωτεϊνών και πεπτιδίων, όπως το M.B., το ισοηλεκτρικό σημείο και τη σύστασή τους σε αμινοξέα και άτομα. Με το πρόγραμμα αυτό μελετήθηκε η αμινοξική αλληλουχία των πεπτιδίων p2208, p2352, p2472.

ProtParam tool

ProtParam (References / Documentation) is a tool which allows the computation of various physical and chemical parameters for a given protein stored in Swiss-Prot or TrEMBL or for a user entered sequence. The computed parameters include the molecular weight, theoretical pI, amino acid composition, atomic composition, extinction coefficient, estimated half-life, instability index, aliphatic index and grand average of hydropathicity (GRAVY) (Disclaimer)

Please note that you may only fill out **one** of the following fields at a time.

Enter a Swiss-Prot/TrEMBL accession number (AC) (for example **P06130**) or a sequence identifier (ID) (for example **KPC1_DROME**):

Or you can paste your own sequence in the box below:

Εικόνα 6: Τα πεδία εισαγωγής αμινοξικών αλληλουχιών του προγράμματος ProtParam.

16.4 NetSurfP

Το πρόγραμμα NetSurfP είναι διαθέσιμο στην ιστοσελίδα <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetSurfP/> και υπολογίζει την επιφανειακή προσβασιμότητα αμινοξέων σε μία αλληλουχία πεπτιδίου (236). Με το πρόγραμμα αυτό μελετήθηκε η αλληλουχία του πεπτιδίου p2208.

NetSurfP ver. 1.1 - Protein Surface Accessibility and Secondary Structure Predictions

Version 1.1: Caching system has been implemented.
View the [version history](#) of this server.

NetSurfP server predicts the surface accessibility and secondary structure of amino acids in an amino acid sequence. The method also simultaneously predicts the reliability for each prediction, in the form of a Z-score. The Z-score is related to the surface prediction, and not the secondary structure.

Instructions	Output format	Article abstract
------------------------------	-------------------------------	----------------------------------

Dear user, we want your feedback!
Please fill out this two minute questionnaire [Click here to fill in the questionnaire \(opens a new window\)](#)

Speed: Approx 5 min per sequence, but much faster if sequence has been cached previously.

Paste in sequence data (maximum 2000 sequences)

QFLGVFPYAAPFLAERRFQAP

or upload sequence data

Valid format examples: [Fasta](#)

All sequences must be submitted in amino acid format and have a unique sequence id!

Do not cache sequence profile and prediction results.

Εικόνα 7: Απεικόνιση των επιλογών αναζήτησης του προγράμματος NetSurfP.

16.5 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)

Το πρόγραμμα BLAST είναι διαθέσιμο στην ιστοσελίδα <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> και χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη της αμινοξικής αλληλουχίας του πεπτιδίου p2208. Αναλυτικά, η αλληλουχία του συγκρίθηκε με τις αλληλουχίες των πρωτεϊνών, ανθρώπου και ποντικού (organism), που περιέχονται στη βάση δεδομένων (database) Swissprot protein sequences.

The screenshot displays the NCBI BLAST Standard Protein BLAST interface. The top navigation bar includes 'Home', 'Recent Results', 'Saved Strategies', and 'Help'. The main heading is 'Standard Protein BLAST'. The interface is organized into several sections:

- Enter Query Sequence:** A large text input field for 'Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s)'. To the right, there are 'Clear' and 'Query subrange' options with 'From' and 'To' input fields. Below the main input, there is an 'Or, upload file' section with a 'Browse...' button and a 'Job Title' field for a descriptive title.
- Choose Search Set:** A section for selecting search parameters. It includes a 'Database' dropdown menu set to 'Non-redundant protein sequences (nr)'. There is an 'Organism' field with a suggestion icon and an 'Exclude' checkbox. Below this, there are checkboxes for 'Models (X/MP)' and 'Uncultured/environmental sample sequences'. An 'Entrez Query' field is also present for limiting the search.
- Program Selection:** A section for choosing the BLAST algorithm. Radio buttons are provided for 'blastp (protein-protein BLAST)', 'PSI-BLAST (Position-Specific Iterated BLAST)', 'PHI-BLAST (Pattern Hit Initiated BLAST)', and 'DELTA-BLAST (Domain Enhanced Lookup Time Accelerated BLAST)'. The 'blastp' option is selected.
- BLAST Button:** A prominent blue button labeled 'BLAST' is located at the bottom left. To its right, a summary line reads 'Search database Non-redundant protein sequences (nr) using Blastp (protein-protein BLAST)'. Below this, there is a checkbox for 'Show results in a new window'.

Εικόνα 8: Το πρόγραμμα BLAST και οι διαθέσιμες επιλογές αναζήτησης.

IV.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. ΣΥΛΛΟΓΗ ΟΡΩΝ ΑΠΟ ΥΓΙΕΙΣ ΜΑΡΤΥΡΕΣ ΚΑΙ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΗΤ ΚΑΙ GD

Για το προσδιορισμό της δραστικότητας των ορών ατόμων με ΗΤ ή GD συλλέξαμε δείγματα από νεοδιαγνωσμένους ασθενείς και κατά προτίμηση όχι από πολύ ηλικιωμένους. Στα προχωρημένα στάδια της νόσου υπάρχει κίνδυνος να παρουσιάζεται επέκταση τόσο σε άλλους επίτοπους της Tg, όσο και σε άλλα αντιγόνα.

Συνολικά συλλέχθηκαν 100 οροί από ασθενείς με ΗΤ με μέσο όρο ηλικίας τα 48 έτη, 30 οροί από ασθενείς με νόσο GD με μέσο όρο ηλικίας τα 48 έτη, και 41 οροί από υγιείς μάρτυρες με μέσο όρο ηλικίας τα 43 έτη. Από τους ορούς αυτούς, μόνο οι 14/100 με ΗΤ και 10/30 με GD ήταν νεοδιαγνωσμένοι, είχαν υψηλό τίτλο αντι-Tg αντισωμάτων και ο ορός τους ήταν σε επαρκή ποσότητα για τη μελέτη της δραστικότητάς τους. Ο υψηλός τίτλος των αντι-Tg θεωρήθηκε προϋπόθεση, διότι λόγω του πολύ μεγάλου μεγέθους της Tg, μόνο ένα μικρό κλάσμα θα μπορούσε να αναγνωρίζει ένα τόσο μικρό πεπτίδιο αυτής. Συνεπώς, εάν ο συνολικός αριθμός των αντισωμάτων αυτών δεν ήταν αρκετός, τότε αντισώματα έναντι πεπτιδίων της μελέτης δε θα ήταν δυνατό να ανιχνευτούν.

Η επιλογή των υγιών μαρτύρων έγινε σε αντιστοιχία με τα δείγματα από ασθενείς, συνυπολογίζοντας την ηλικία και το φύλο.

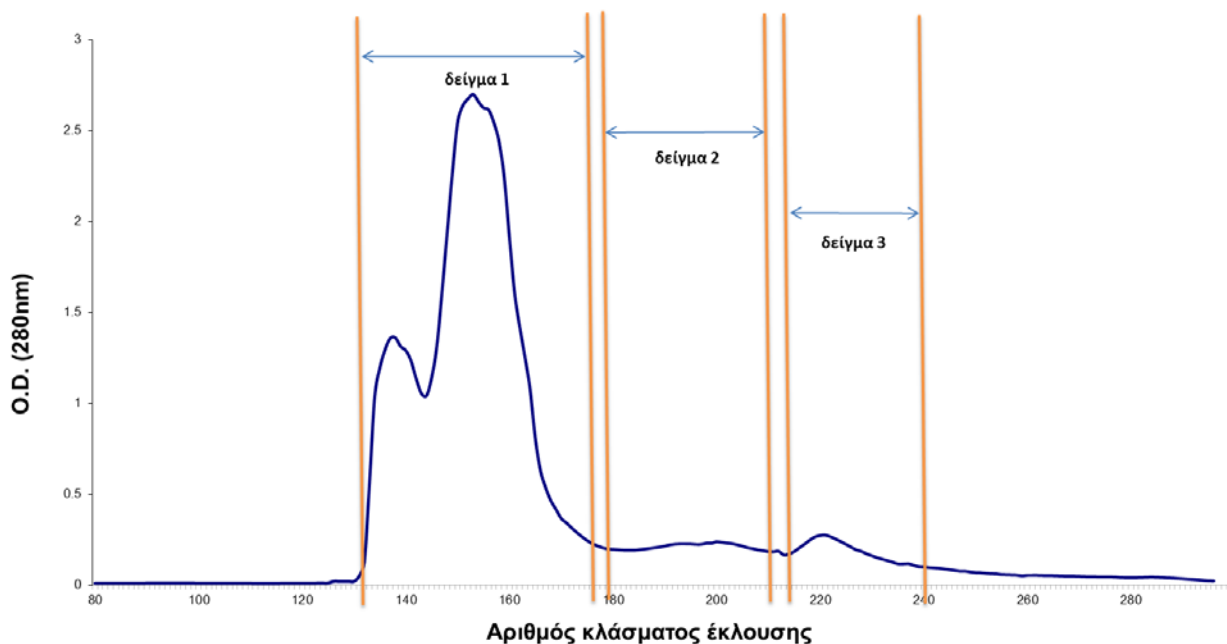
2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΘΥΡΕΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ ΑΠΟ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΙΣΤΟ

Για την απομόνωση της Tg χρησιμοποιήθηκαν θυροειδής αδένες από ασθενείς με καρκίνο θυροειδούς και απομονώθηκε το υγιές τμήμα του αδένα. Συνολικά συλλέχθηκαν ιστοί από 4 ασθενείς με ολικό βάρος 4.55 gr. Η μέτρηση της οπτικής απορρόφησης των κλασμάτων που συλλέχθηκαν έδειξε πως από τη μοριακή διήθηση καταλήξαμε με 3 διακριτά δείγματα, όπως απεικονίζεται στην εικόνα από την καμπύλη έκλυσης.

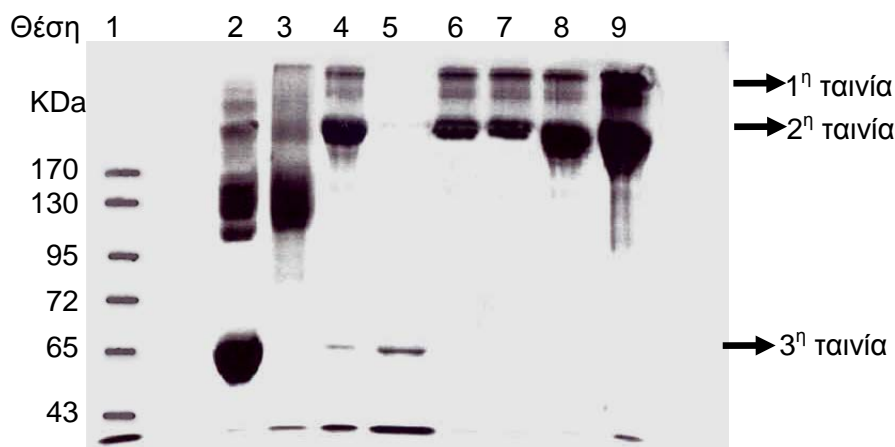
Το πρώτο δείγμα, που περιέχεται στα κλάσματα 132 έως και 173 σχημάτισε 2 συνδεδεμένες κορυφές με υψηλή οπτική απορρόφηση [διάγραμμα 1]. Σύμφωνα με τη σχετική βιβλιογραφία η Tg εκλύεται πρώτη από τη στήλη και συνεπώς περιέχεται στα κλάσματα αυτά. Ο λόγος της διπλής αυτής κορυφής είναι πιθανότητα ύπαρξης πολυμερισμένης Tg στο δείγμα, λόγω της σύνδεσης πολλών μορίων Tg με δισουλφιδικούς δεσμούς. Στη μελέτη αυτή επιλέξαμε την απομόνωση μόνο των μεμονωμένων μορίων της Tg της 2^{ης} κορυφής, δηλαδή των κλασμάτων 145 έως και 173 τα οποία συμπυκνώθηκαν σε τελικό όγκο 4 ml. Σύμφωνα με τη μέτρηση της O.D. του διαλύματος αυτού στα 280 nm, υπολογίστηκε πως η συγκέντρωση της Tg ήταν 9.12 mg/ml (ο ειδικός συντελεστής απορρόφησης της Tg είναι ίσος με 1) και έτσι απομονώθηκαν συνολικά 36.48 mg πρωτεΐνης.

Το δεύτερο δείγμα, που περιέχεται στα κλάσματα 178 έως και 210, είχε χαμηλή O.D. και κατά πάσα πιθανότητα περιέχει την αλβουμίνη. Τέλος, το τρίτο δείγμα, που περιέχεται μεταξύ των κλασμάτων 215 έως και 240 ήταν έγχρωμο και συνεπώς η μέτρηση της O.D. του δεν ήταν δυνατή. Στο δείγμα αυτό εντοπίζονται πρωτεΐνες που μοιάζουν με την αλβουμίνη και την αιμοσφαιρίνη.

Με την ολοκλήρωση της διέλευσης όλου του διαλύματος από την στήλη ακολούθησε ο έλεγχος της σύστασης των απομονωμένων δειγμάτων με ηλεκτροφόρηση SDS σε πήκτωμα πολύ-ακρυλαμιδίου. Μελετήθηκε το εκχύλισμα του ιστού πριν το διαχωρισμό με μοριακή διήθηση, δείγμα από την 1^η κορυφή της καμπύλης του 1^{ου} δείγματος, το συμπυκνωμένο διάλυμα της Tg από τη 2^η κορυφή της καμπύλης του 1^{ου} δείγματος και χρησιμοποιήθηκαν πρότυπες πρωτεΐνες με γνωστά M.B., καθώς και πολυκλωνικά αντισώματα ανθρώπου τάξης G ως δείκτης του M.B. των 150 kDa, καθαρής αλβουμίνη και Tg υψηλής καθαρότητας.



Διάγραμμα 1: Καμπύλη έκλουσης εκχυλίσματος θυρεοειδή αδένος σε στήλη μοριακής διήθησης Sephacryl S-300HR. Το διάλυμα έκλουσης ήταν PBS με pH7.4, PMSF 1 mM και 0.01% NaN_3 . Η ροή ρυθμίστηκε στο ήταν 1 ml ανά 3λεπτά και 15 δευτερόλεπτα και συλλέχθηκαν κλάσματα των 2 ml. Οι κάθετες γραμμές οριοθετούν τα 3 διαφορετικά δείγματα που προέκυψαν από το διαχωρισμό.



Εικόνα 9: Ηλεκτροφόρηση SDS σε πήκτωμα πολύ-ακρυλαμιδίου 7.5% των δειγμάτων απομόνωσης θυρεοσφαιρίνης με στήλη μοριακής διήθησης. Στο πήκτωμα εμφανίζονται τα εξής δείγματα: θέση 1 μάρτυρες μοριακών βαρών (43 – 170 kDa), θέση 2 - βόεια αλβουμίνη (20 μg), θέση 3 - πολυκλωνικά αντισώματα τάξης G (20 μg), θέση 4 - εκχύλισμα ιστού (25 μg), θέση 5 - δείγμα από το 2^ο δείγμα έκλουσης της στήλης (2 μg), θέση 6 και 7 - δείγματα από 1^η κορυφή του 1^{ου} κλάσματος (14 μg), θέση 8 - συμπυκνωμένο διάλυμα από τη 2^η κορυφή του 1^{ου} δείγματος (20 μg), θέση 9 -θυρεοσφαιρίνη υψηλής καθαρότητας (40 μg).

Από τη ανάλυση της ηλεκτροφόρησης [εικόνα 9] διαπιστώθηκε πως το εκχύλισμα ιστού που προέκυψε από τις κατακρημνίσεις της αλβουμίνης και της Tg με θειικό αμμώνιο παρουσιάζει 3 ταινίες στο πήκτωμα ακρυλαμιδίου (θέση 4). Στην πρώτη ταινία εντοπίζεται η Tg που σχηματίζεται από την ένωση δυο μονομερών της, σύμφωνα και με το δείγμα της θέσης 9 που αντιπροσωπεύει την υψηλής καθαρότητας Tg. Στη δεύτερη ταινία εντοπίζονται τα μονομερή της Tg που προέρχονται από τη διάσπαση των μη ομοιοπολικών τους δεσμών παρουσία του SDS. Στην τρίτη ταινία εντοπίζεται η αλβουμίνη, διότι βρίσκεται στο ίδιο ύψος με την αλβουμίνη της θέσης 2. Από την τελευταία αυτή παρατήρηση φαίνεται πως η Tg από την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών φέρει αλβουμίνη ως πρόσμιξη [εικόνα 9]. Στη θέση 5 που έχει τοποθετηθεί το 2^ο δείγμα της έκλουσης περιέχει την αλβουμίνη, αφού παρουσιάζει ταινία ίδιου βάρους με την αλβουμίνη της θέσης 2. Στις θέσεις 6 και 7 εντοπίζονται δείγματα από την πρώτη κορυφή του πρώτου δείγματος της έκλουσης. Στα δείγματα αυτά βρίσκονται μονομερή μόρια Tg (ταινία 2) ή από μόρια που σχηματίζονται από ένωση μονομερών με ομοιοπολικό δεσμό ή με μη-ομοιοπολικό δεσμό (ταινία 1). Επιπρόσθετα, στα δείγματα αυτά βρίσκεται και πολυμερισμένη Tg μεγάλου M.B., γεγονός που καθιστά αδύνατη την εισχώρηση στο πήκτωμα [εικόνα 9].

Τέλος, στη θέση 8 βρίσκεται το διάλυμα των κλασμάτων της 2^{ης} κορυφής του 1^{ου} δείγματος, το οποίο περιέχει την καθαρή Tg, κυρίως στη μορφή των μονομερών μορίων της [εικόνα 9]. Το τελικό προϊόν της Tg, αφού συμπυκνώθηκε σε 4 ml, το μεγαλύτερο μέρος του φυλάχθηκε με ανάμιξη 50% γλυκερόλης στους -30°C και ένα άλλο μικρότερο τμήμα χωρίστηκε σε δείγματα των 100 ml και φυλάχθηκε στους -80°C απουσία γλυκερόλης.

3. ΠΑΡΑΜΕΤΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ Tg

3.1 Ομοιότητες του p2208 με άλλες πρωτεΐνες

Η αλληλουχία του p2208 ελέγχθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) έναντι των αλληλουχιών γνωστών πρωτεϊνών του ανθρώπου και του ποντικού. Με τον τρόπο αυτό μπορούν να εντοπιστούν τμήματα πρωτεϊνών που παρουσιάζουν ομοιότητες με το p2208. Σε κάθε αποτέλεσμα αποδίδεται το ποσοστό ομοιότητας με το πεπτίδιο και η πιθανότητα το πεπτίδιο προς ανάλυση να μην ανήκει στην πρωτεΐνη αυτή.

Το πρόγραμμα BLAST χρησιμοποιεί ολόκληρη την αλληλουχία μίας πρωτεΐνης, συμπεριλαμβανομένων και τυχόν πεπτιδίων-οδηγών και συνεπώς συχνά η αρίθμηση διαφέρει από την καθιερωμένη αρίθμηση μίας πρωτεΐνης. Στην περίπτωση τη Tg έχει προστεθεί το πεπτίδιο-οδηγός μήκους 20 αμινοξέων.

Βάσει της ανάλυσης αυτής επιβεβαιώθηκε καταρχήν η πλήρης ομοιότητα του p2208 με την Tg του ανθρώπου με πολύ χαμηλή πιθανότητα το αποτέλεσμα να είναι λανθασμένο [πίνακας 4]. Παράλληλα, παρουσιάζει ομοιότητα 80% με την αντίστοιχη αλληλουχία του ποντικού. Από τα υπόλοιπα αποτελέσματα είναι αξιοσημείωτη η ομοιότητα του p2008 με την οικογένεια των νευρογλινών του ανθρώπου αλλά και του ποντικού, και μάλιστα με ποσοστό ομοιότητας που κυμαίνεται από 85 έως 70% που συνοδεύεται από μικρή πιθανότητα να μην ανήκει στις πρωτεΐνες αυτές. Οι νευρολιγίνες είναι κυτταρικά μετασυναπτικά νευροπεπτίδια που συνδέονται με βήτα-νευρεξίνες, οι οποίες αποτελούν υποδοχείς στην επιφάνεια των νευρώνων (237). Αντίστοιχα μεγάλη ομοιότητα παρουσιάζει το p2208 με διάφορες καρβοξυλ-εστεράσες του ανθρώπου και του ποντικού. Το ποσοστό ομοιότητας κυμαίνεται από 91 έως 59%, όμως οι κοινές αλληλουχίες είναι μικρού μεγέθους και η πιθανότητα οι αλληλουχίες αυτές να μην ανήκουν σε αυτές τις πρωτεΐνες είναι υψηλή (0.003 – 0.007) σε σχέση με τα προηγούμενα αποτελέσματα. Οι καρβοξυλ-εστεράσες βρίσκονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο των κυττάρων κυρίως του ήπαρ και του νεφρού. Τέλος, ένα μικρό τμήμα του p2208 με 58% ομοιότητα στον άνθρωπο και στον ποντικό παρουσιάζει κοινές αλληλουχίες με την ακετυλοχολινεστεράση, γεγονός που δικαιολογείται από το γεγονός ότι το

p2208 ανήκει στο τμήμα της T_g του ανθρώπου που είναι ομόλογο με την ακετυλοχολινεστεράση (πιθανότητα να μην ανήκει 0.006 – 0.007). Οι υπόλοιπες πρωτεΐνες με τις οποίες το p2208 παρουσιάζει ομοιότητες δεν έχουν αναλυθεί, διότι η πιθανότητα του τμήματος του p2208 να μην ανήκει σε αυτές ήταν μεγαλύτερη από 0.1 [πίνακας 4].

Πίνακας 4: Τα αποτελέσματα της σύγκρισης του πεπτιδίου p2208 με την αμινοξική αλληλουχία γνωστών πρωτεϊνών. Παρατίθενται μόνο οι πρωτεΐνες που παρουσιάζουν μικρή πιθανότητα το πεπτίδιο να μη ανήκει σε αυτές.

Πρωτεΐνη σύγκρισης	Ποσοστό ομοιότητας (%)	Πιθανότητα να μην ανήκει το στην πρωτεΐνη	Σύγκριση της αλληλουχίας του p2208 και των άλλων πρωτεϊνών
Tg ανθρώπου (hTg)	100	$1e^{-13}$	p2208 κοινά hTg 2208 QFLGVVYAAAPPLAERRFQAP 2227 QFLGVVYAAAPPLAERRFQAP 2227 QFLGVVYAAAPPLAERRFQAP 2246
Tg ποντικού (mTg) (και τα ισομερή της CRA_a, CRA_b)	80	$2e^{-08}$	p2208 κοινά mTg 2208 QFLGVVYAAAPPLAERRFQAP 2227 QFLGVVYAAAPPLA RF AP 2226 RFLGVVYAAAPPLADNRFRAP 2245
Νευρογλίνη-1 ανθρώπου (και το ισομερές της CRA_b) και -4 ποντικού	85	human $2e^{-09}$ mouse $1e^{-09}$	p2208 κοινά NLGN h79 m55 2208 QFLGVVYAAAPPLAERRFQAP 2227 QFLGVVYAAAP ERRFQ P 2227 QFLGVVYAAAPPTGERRFQPP h98 m74
Νευρογλίνη-2 ανθρώπου (και τα ισομερή της CRA_b, CRA_c) και ποντικού	80	human $6e^{-09}$ mouse $4e^{-09}$	p2208 κοινά NLGN2 2208 QFLGVVYAAAPPLAERRFQAP 2227 QFLGVVY PPL RRFQ P 68 QFLGVVYATPPLGARRFQPP 87
Νευρογλίνη-1 ποντικού (και τα ισομερή της 1, 2)	80	$3e^{-08}$	p2208 κοινά mNLGN1 2208 QFLGVVYAAAPPLAERRFQAP 2227 QFLGVVYAAAP E RFQ P 79 QFLGVVYAAAPPTGERRFQPP 98
Νευρογλίνη-4 ανθρώπου (και τα ισομερή της 1 και 2 της πρόδρομης πρωτεΐνης καθώς και τα CRA_a, b, c, e)	75	$2e^{-07}$	p2208 κοινά hNLGN4 2208 QFLGVVYAAAPPLAERRFQAP 2227 Q LGVY P P ERRFQ P 72 QYLGVPYASPTGERRFQPP 91
Νευρογλίνη-3 ανθρώπου (και τα ισομερή της 2 και 3 της πρόδρομης πρωτεΐνης καθώς και τα HNL3s, HNL3) και ποντικού	70	human $3e^{-06}$ mouse $2e^{-06}$	p2208 κοινά NLGN3 h68 m65 2208 QFLGVVYAAAPPLAERRFQAP 2227 Q LGVYAAAP E RF P 2227 QYLGVPYAAAPPIGEKRFLPP h87 m84
Καρβοξυλ-εστεράση 5A ανθρώπου (ισομερή 1, 2, 3 της πρόδρομης πρωτεΐνης - hCES5A)	75	0.003	p2208 κοινά hCES5A 2209 FLGVVYAAAPPLAERRF 2224 FLGVV AAAPL RF 57 FLGVVFAAPPLGSLRF 72
Καρβοξυλ-εστεράση 7 ανθρώπου (ισομερές CRA_a, d - hCES7)	91	0.007	p2208 κοινά hCES7 2209 FLGVVYAAAPPL 2219 FLGVV AAAPL 57 FLGVVFAAPPL 67
Καρβοξυλ-εστεράση 5A ποντικού (πρόδρομη πρωτεΐνη - mCES5A)	59	0.006	p2208 κοινά mCES5A 2209 FLGVVYAAAPPLAERRF---QAP 2224 FLG P AAAPL F Q P 57 FLGIPFAAPPLGPLRFQPP 78
Καρβοξυλ-εστεράση 7 ποντικού	59	0.006	p2208 κοινά mCES7 2209 FLGVVYAAAPPLAERRF---QAP 2227 FLG+P+AAAPL RF Q P 61 FLGIPFAAPPLGPLRFQPP 82
Ακετυλο-χολινεστεράση ανθρώπου (hAChE)	58	0.007	p2208 κοινά hAChE 2209 FLGVVYAAAPPLAERRFQAP 2227 FLG P A PP RRF P 63 FLGIPFAEPPMGRRLFP 81
Ακετυλο-χολινεστεράση ποντικού (mAChE)	58	0.006	p2208 κοινά mAChE 2209 FLGVVYAAAPPLAERRFQAP 2227 FLG P A PP RRF P 32 FLGIPFAEPPVGSRRFMPP 50
Βουτυρυλο-χολινεστεράση ανθρώπου (και το ισομερές CRA_b - hBChE)	71	0.023	p2208 κοινά hBChE 2209 FLGVVYAAAPPLAER-RF 2224 FLG PYA PPL R RF 28 FLGIPYAPPLG-RLRF 43
Καρβοξυλ-εστεράση 3 ανθρώπου (ισομερή 1, 2 της πρόδρομης πρωτεΐνης hCES3)	63	0.044	p2208 κοινά hCES3 2209 FLGVVYAAAPPLAERRFQAP 2227 FLG P A PPL RF AP 60 FLGIPFAAPPLGPDRLFAP 78
Βουτυρυλο-χολινεστεράση ποντικού	69	0.015	p2208 κοινά mBChE 2209 FLGVVYAAAPPLAERRF 2224 FLG+PYA PPL RF 57 FLGIPYAPPLGSLRF 72
Καρβοξυλ-εστεράση 1B, 1C, 1E, 1D, MH1 ποντικού (mCES1C)	68	0.028	p2208 κοινά mCES1C 2209 FLGVVYAAAPPLAERRFQAP 2227 FLGVV A PPL RF AP 50 FLGVVFAKPLGSLRF-AP 67

3.2 Φυσικο-χημικές ιδιότητες

Για τη μελέτη των φυσικο-χημικών ιδιοτήτων των πεπτιδίου p2208, p2352 και p2472 χρησιμοποιήθηκαν οι βάσεις δεδομένων ProtParam και NetSurfP. Η ProtParam υπολογίζει το M.B., το ισοηλεκτρικό σημείο, τη σύστασή τους σε αμινοξέα και σε άτομα, καθώς και το συντελεστή μοριακής απορροφητικότητας (ϵ). Η NetSurfP προβλέπει τη σχετική επιφανειακή προσβασιμότητα (relative surface accessibility) κάθε αμινοξέος.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των παραπάνω βάσεων δεδομένων, βρέθηκε ότι το M.B. του πεπτιδίου p2208 [πίνακας 5] είναι 2228.5 gr και το ισοηλεκτρικό του σημείο, δηλαδή το pH, στο οποίο το φορτίο του είναι ίσο με μηδέν, είναι το 8.75. Η αλανίνη (A) και η προλίνη αποτελούν το 20% (4/20) των αμινοξέων αντίστοιχα, η αργινίνη (R), η γλουταμίνη (Q), η λευκίνη (L) και η φαινυλαλανίνη (F) το 10% (2/20) και τέλος το γλουταμικό οξύ (E), η γλυκίνη (G), η τυροσίνη (Y) και η βαλίνη (V) το 5% (1/20). Συνολικά, περιέχει ένα αρνητικά φορτισμένο αμινοξύ, το γλουταμικό οξύ στη θέση 2221 και δύο θετικά αμινοξέα αργινίνης στις θέσεις 2222 και 2223 [πίνακας 6]. Όσον αφορά στη σύνθεσή του σε άτομα, περιέχει 105 άτομα άνθρακα, 158 άτομα υδρογόνου, 28 άτομα αζώτου και 26 άτομα οξυγόνου. Στο σύνολό του περιέχει μόνο ένα αρωματικό αμινοξύ, την τυροσίνη, και καμία τρυπτοφάνη ή κυστεΐνη και συνεπώς είναι δυνατόν να υπολογιστεί η συγκέντρωσή του στα 280 nm μήκος κύματος, με χαμηλή όμως ακρίβεια. Έτσι, ο συντελεστής ϵ , που υποδηλώνει την ποσότητα του φωτός που απορροφά σε συγκεκριμένο μήκος κύματος μία πρωτεΐνη, υπολογίστηκε βάση του αρωματικού δακτυλίου του σε $1490 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Πίνακας 5: Αμινοξική αλληλουχία του p2208.

Θέση	2208	2209	2210	2211	2212	2213	2214	2215	2216	2217	2218	2219	2220	2221	2222	2223	2224	2225	2226	2227
Αμινοξύ	Q	F	L	G	V	P	Y	A	A	P	P	L	A	E	R	R	F	Q	A	P

Πίνακας 6: Αμινοξική σύσταση του πεπτιδίου p2340.

Αμινοξύ	Αριθμός αμινοξέων	Ποσοστό (%) αμινοξέων
Αλανίνη (A)	4	20
Αργινίνη (R)	2	10
Ασπαραγίνη (N)	0	0
Ασπαρτικό οξύ (D)	0	0
Κυστεΐνη (C)	0	0
Γλουταμίνη (Q)	2	10
Γλουταμινικό οξύ (E)	1	5
Γλυκίνη (G)	1	5
Ιστιδίνη (H)	0	0
Ισολευκίνη (I)	0	0
Λευκίνη (L)	2	10
Λυσίνη (K)	0	0
Μεθειονίνη (M)	0	0
Φαινυλαλανίνη (F)	2	10
Προλίνη (P)	4	20
Σερίνη (S)	0	0
Θρεονίνη (T)	0	0
Τρυπτοφάνη (W)	0	0
Τυροσίνη (Y)	1	5
Βαλίνη (V)	1	5

■: υδροφοβικά ■: βασικά ■: υδροφιλικά ■: όξινα

Η αντίστοιχη ανάλυση για το p2352 [πίνακας 7] έδειξε ότι το M.B. του είναι 2030.1 gr και το ισοηλεκτρικό του σημείο το 9.45. Η γλυκίνη (G) αποτελεί το 25% (5/20) των αμινοξέων, η αργινίνη (R) το 20% (4/20) των αμινοξέων, η αλανίνη (A) και το ασπαρτικό οξύ (D) το 15% των αμινοξέων αντίστοιχα και τέλος η λευκίνη (L), η φαινυλαλανίνη (F), η προλίνη (P), η σερίνη (S) και η βαλίνη (V) το 5% (1/20) αντίστοιχα. Περιέχει τρία αρνητικά φορτισμένα αμινοξέα ασπαρτικού οξέος στις θέσεις 2357, 2366, 2371 και τέσσερα θετικά αμινοξέα αργινίνης στις θέσεις 2352, 2359, 2360, 2367 [πίνακας 8]. Αποτελείται από 83 άτομα άνθρακα, 136 άτομα υδρογόνου, 32 άτομα αζώτου και 28 άτομα οξυγόνου. Δεν περιέχει κανένα αρωματικό αμινοξύ και συνεπώς δεν είναι δυνατόν να υπολογιστεί η συγκέντρωσή του στα 280 nm μήκος κύματος.

Πίνακας 7: Αμινοξική αλληλουχία του p2352.

Θέση	2352	2353	2354	2355	2356	2357	2358	2359	2360	2361	2362	2363	2364	2365	2366	2367	2368	2369	2370	2371
Αμινοξύ	R	G	F	G	G	D	P	R	R	V	S	L	A	A	D	R	G	G	A	D

Πίνακας 8: Αμινοξική σύσταση του πεπτιδίου p2352.

Αμινοξύ	Αριθμός αμινοξέων	Ποσοστό (%) αμινοξέων
Αλανίνη (A)	3	15.0%
Αργινίνη (R)	4	20.0%
Ασπαραγίνη (N)	0	0.0%
Ασπαρτικό οξύ (D)	3	15.0%
Κυστεΐνη (C)	0	0.0%
Γλουταμίνη (Q)	0	0.0%
Γλουταμινικό οξύ (E)	0	0.0%
Γλυκίνη (G)	5	25.0%
Ιστιδίνη (H)	0	0.0%
Ισολευκίνη (I)	0	0.0%
Λευκίνη (L)	1	5.0%
Λυσίνη (K)	0	0.0%
Μεθειονίνη (M)	0	0.0%
Φαινυλαλανίνη (F)	1	5.0%
Προλίνη (P)	1	5.0%
Σερίνη (S)	1	5.0%
Θρεονίνη (T)	0	0.0%
Τρυπτοφάνη (W)	0	0.0%
Τυροσίνη (Y)	0	0.0%
Βαλίνη (V)	1	5.0%

■: υδροφοβικά ■: βασικά ■: υδροφιλικά ■: όξινα

Τέλος, η ανάλυση με τη βάση δεδομένων ProtParam για το p2472 [πίνακας 9] έδειξε ότι το M.B. του είναι 2220.6 gr και το ισοηλεκτρικό του σημείο το 9.17. Η λευκίνη (L) αποτελεί το 20% (4/20) των αμινοξέων του, η αλανίνη (A), η αργινίνη (R), η προλίνη (P), η σερίνη (S) και η βαλίνη (V) το 10% (2/20) των αμινοξέων του και το ασπαρτικό οξύ (D), το γλουταμικό οξύ (E), η γλυκίνη (G), η ισολευκίνη (I), η λυσίνη (K) και η τρυπτοφάνη (W) το 5% (1/20) αντίστοιχα. Περιέχει με τη σειρά του δύο αρνητικά φορτισμένα αμινοξέα, ένα ασπαρτικό οξύ και ένα γλουταμικό οξύ στις θέσεις 2486 και 2484 αντίστοιχα, και τρία θετικά φορτισμένα, δύο αργινίνες στις θέσεις 2475, 2479 και μία λυσίνη στη θέση 2478 [πίνακας 10]. Η ύπαρξη ενός αρωματικού αμινοξέως, της τρυπτοφάνης, καθιστά το πεπτίδιο ικανό να απορροφήσει φως στα 280nm, με συντελεστής ϵ ίσο με $5500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Πίνακας 9: Αμινοξική αλληλουχία του p2472.

Θέση	2472	2473	2474	2475	2476	2477	2478	2479	2480	2481	2482	2483	2484	2485	2486	2487	2488	2489	2490	2491
Αμινοξύ	P	P	A	R	A	L	K	R	S	L	W	V	E	V	D	L	L	I	G	S

Πίνακας 10: Αμινοξική σύσταση του πεπτιδίου p2472.

Αμινοξύ	Αριθμός αμινοξέων	Ποσοστό (%) αμινοξέων
Αλανίνη (A)	2	10.0%
Αργινίνη (R)	2	10.0%
Ασπαραγίνη (N)	0	0.0%
Ασπαρτικό οξύ (D)	1	5.0%
Κυστεΐνη (C)	0	0.0%
Γλουταμίνη (Q)	0	0.0%
Γλουταμινικό οξύ (E)	1	5.0%
Γλυκίνη (G)	1	5.0%
Ιστιδίνη (H)	0	0.0%
Ισολευκίνη (I)	1	5.0%
Λευκίνη (L)	4	20.0%
Λυσίνη (K)	1	5.0%
Μεθειονίνη (M)	0	0.0%
Φαινυλαλανίνη (F)	0	0.0%
Προλίνη (P)	2	10.0%
Σερίνη (S)	2	10.0%
Θρεονίνη (T)	0	0.0%
Τρυπτοφάνη (W)	1	5.0%
Τυροσίνη (Y)	0	0.0%
Βαλίνη (V)	2	10.0%

■: υδροφοβικά ■: βασικά ■: υδροφιλικά ■: όξινα

Ως προς την ανάλυση της προσβασιμότητας των πεπτιδίων στην τρισδιάστατη μορφή της Tg στο χώρο, επιλέχθηκε το p2208 λόγω της υψηλής ανοσογονικότητας που παρουσίασε στην παρούσα μελέτη. Από την ανάλυση αυτή, μέσω της βάση δεδομένων NetSurfP, διαπιστώθηκε πως το άμινο- και καρβόξυ-τελικό άκρο του πεπτιδίου αποτελούν αρκετά εκτεθειμένα τμήματα στην τεταρτοταγή δομή του πεπτιδίου, και κατ'επέκταση η πιθανότητα τα άκρα αυτά να είναι προσβάσιμα και εκτεθειμένα στο μόριο της Tg είναι υψηλή [πίνακας 11]. Συμπεραίνουμε, λοιπόν, πως το πεπτίδιο αυτό αποτελεί ένα κατάλληλο υποψήφιο μόριο και για τη μελέτη της ανοσογονικότητάς του σε Β επίπεδο.

Πίνακας 11: Προσδιορισμός της πιθανής προσβασιμότητας κάθε αμινοξέου στην αλληλουχία του p2208 σύμφωνα με τη βάση δεδομένων NetSurfP. Με το γράμμα E συμβολίζονται τα αμινοξέα που είναι εκτεθειμένα (exposed) και με το γράμμα B αυτά που δεν είναι εκτεθειμένα (buried) στη δευτεροταγή δομή του πεπτιδίου.

Θέση	2208	2209	2210	2211	2212	2213	2214	2215	2216	2217	2218	2219	2220	2221	2222	2223	2224	2225	2226	2227
Αμινοξύ	Q	F	L	G	V	P	Y	A	A	P	P	L	A	E	R	R	F	Q	A	P
Προσβασιμότητα	E	E	E	E	B	B	B	B	B	B	E	B	B	E	E	E	B	E	E	E

3.3 Πρόσδεση πεπτιδίων σε μόρια τάξης II του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας

Με τη χρήση του αλγόριθμου Rankpep μπορέσαμε να προβλέψουμε αν ένα πεππίδιο συνδέεται στο μόριο του MHC με βάση τις γνωστές αλληλουχίες-συνδέτες στα μόρια αυτά. Τα προς μελέτη τμήματα των πεπτιδίων είναι συγκεκριμένου μεγέθους, σύμφωνα με το μέγεθος της αλληλουχίας του άριστου συνδέτη. Ο αλγόριθμος αυτός προσδίδει μία βαθμολογία σε κάθε αμινοξύ ανάλογα με τη θέση τους και την αλληλουχία του άριστου συνδέτη για το εκάστοτε μόριο MHC, και έτσι προκύπτει η συνολική βαθμολογία του κάθε τμήματος. Επιπλέον, έχει οριστεί και η μικρότερη τιμή της συνολικής βαθμολογίας πεπτιδίου από τη βαθμολογία του 90% των αμινοξέων του άριστου συνδέτη. Έτσι όταν ένα πεππίδιο έχει βαθμολογία μεγαλύτερη ή ίση από την τιμή, τότε είναι δυνατή η σύνδεσή του στο μόριο του MHC. Από την άλλη, με τη χρήση του αλγόριθμου της ομάδας του Altunia η πρόβλεψη της σύνδεσης ενός πεπτιδίου σε μόρια MHC γίνεται με τη σύγκριση της αλληλουχίας του με μοτίβα, που περιέχουν γνωστά αμινοξέα-συνδέτες για κάθε θέση πρόσδεσης.

Μελετήθηκε η αμινοξική αλληλουχία των p2208, p2352 και p2472 με τον αλγόριθμο RANKPEP ως προς τη σύνδεσή τους στα μόρια του MHC A^k , E^k , A^s , A^b , E^d και A^d και με τον αλγόριθμο Altunia στα μόρια A^k και E^k . Βρέθηκε ότι το p2208 συνδέεται ικανοποιητικά στα μόρια A^s , A^b και E^k δηλαδή είναι πιθανά ανοσογονικό στους ποντικούς SJL/J, C57BL/6 και AKR/J ή CBA, αντίστοιχα [πίνακας 12].

Το τμήμα του p2208 που είναι υπεύθυνο για τη σύνδεση στο μόριο A^s περιλαμβάνεται στις θέσεις 2210-2218 (LGVPYAAPP), με συνολική βαθμολογία 23.551, αντίστοιχη συνολική βαθμολογία του άριστου συνδέτη 55.361 και κατώφλι σύνδεσης 12.65. Ως προς τη σύνδεση στο μόριο A^b , βρέθηκαν τρία πιθανά τμήματα του p2208 στις θέσεις 2212-2220 (VPYAAPPLA) με συνολική βαθμολογία 15.942, στις 2214-2222 (YAAPPLAER) με συνολική βαθμολογία 15.923 και στις θέσεις 2209-2217 (FLGVPYAAP) με συνολική βαθμολογία 9.663. Η αντίστοιχη συνολική βαθμολογία του άριστου συνδέτη για το μόριο A^b είναι 35.632 και το κατώφλι σύνδεσης 9.52. Η παράλληλη ανάλυση με τον αλγόριθμο Altunia κατέληξε σε τέσσερις πιθανές αλληλουχίες πρόσδεσης μόνο σε μόρια E^k στις θέσεις 2215-

2223 (AAPPLAERR), 2215-2221 (AAPPLAE), 2216-2222 (APPLAER) και 2219-2224 (LAERRF) [πίνακας 12].

Το πεππίδιο p2352 φαίνεται να προσδένεται μόνο σε E^k μόρια, σύμφωνα και με τους δύο αλγόριθμους ανάλυσης. Πιο ειδικά, το τμήμα 2363-2371 (LAADRGGAD) με συνολική βαθμολογία 11.58 είναι υπεύθυνο για την πρόσδεση στα μόρια αυτά, με βαθμολογία άριστου συνδέτη 69.891 και κατώφλι σύνδεσης 10.02. Η ανάλυση με τον αλγόριθμο Altunia είχε παρόμοιο αποτέλεσμα με διαφορετικό όμως τμήμα του πεππίδιου, στις θέσεις 2361-2367 (VSLAADR) [πίνακας 13].

Τέλος, το p2472 δεν περιείχε κανένα μοτίβο πρόσδεσης σε MHC μόρια με τους παραπάνω αλγόριθμους ανάλυσης.

Συμπεραίνουμε λοιπόν, πως το p2208 ενδέχεται να είναι ανοσογονικό τόσο στους ευαίσθητους ως προς την EAT ποντικούς SJL/J, AKR/J και CBA, όσο και στα ανθεκτικά στελέχη C57BL/6 και BALB/c. Από την άλλη, το p2352 ενδέχεται να είναι ανοσογονικό μόνο στις ευαίσθητες φυλές AKR/J και CBA.

Πίνακας 12: Μοτίβα πρόσδεσης του p2208 σε MHC μόρια.

Αλγόριθμος	Μοτίβο πρόσδεσης	Μόριο MHC	Συνολική βαθμολογία
Rankpep ^a	QFLGVPY AAPPLA ERRFQAP	A ^s	23.551
Rankpep	QFLG VPYAAPPLA ERRFQAP	A ^b	15.942
Rankpep	QFLGVPY AAPPLA ERRFQAP	A ^b	15.923
Rankpep	Q FLGVPYAAP PLAERRFQAP	A ^b	9.663
Altuvia μοτίβο a ^β	QFLGVPY AAPPLA ERRFQAP	E ^k	Δ.Α.
Altuvia μοτίβο c	QFLGVPY AAPPLA ERRFQAP	E ^k	Δ.Α.
Altuvia μοτίβο c	QFLGVPY AAPPLA ERRFQAP	E ^k	Δ.Α.
Altuvia μοτίβο d	QFLGVPY AAPPLA ERRFQAP	E ^k	Δ.Α.

α A^s: Ο άριστος συνδέτης για τα μόρια αυτά είναι η αλληλουχία WGKWHHPD με συνολική ιδανική βαθμολογία πρόσδεσης 55.361 και κατώτατο όριο: 12.65.

A^b: Ο άριστος συνδέτης για τα μόρια αυτά είναι η αλληλουχία YYAPWCNNA με συνολική ιδανική βαθμολογία πρόσδεσης 35.632 και κατώτατο όριο: 9.52.

β Η πρόβλεψη βασίζεται στην ανάλυση της αλληλουχίας για ύπαρξη ενός αμινοξέος από τα πιθανά αμινοξέα που μπορούν να προσδεθούν σε κάθε θέση της αύλακας του MHC. Στη μέθοδο αυτή δεν αποδίδεται (Δ.Α.) βαθμολογική κλίμακα για κάθε αμινοξύ.

Πίνακας 13: Μοτίβα πρόσδεσης του p2352 σε MHC μόρια.

Αλγόριθμος	Μοτίβο πρόσδεσης	Μόριο MHC	Συνολική βαθμολογία
Rankpep ^a	RGFGGDP ^{RRV} SLAADRGGAD	E ^k	11.58
Altuvia motif c	RGFGGDP ^{RRV} SLAADRGGAD	E ^k	Δ.Α.

α E^k: Ο άριστος συνδέτης για τα μόρια αυτά είναι η αλληλουχία IAYWKQATK με συνολική ιδανική βαθμολογία πρόσδεσης 69.831 και κατώτατο όριο: 10.02.

4. ΕΛΕΓΧΟΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΟΡΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ΤΗΣ ΘΥΡΕΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ ΚΑΙ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΤΗΣ

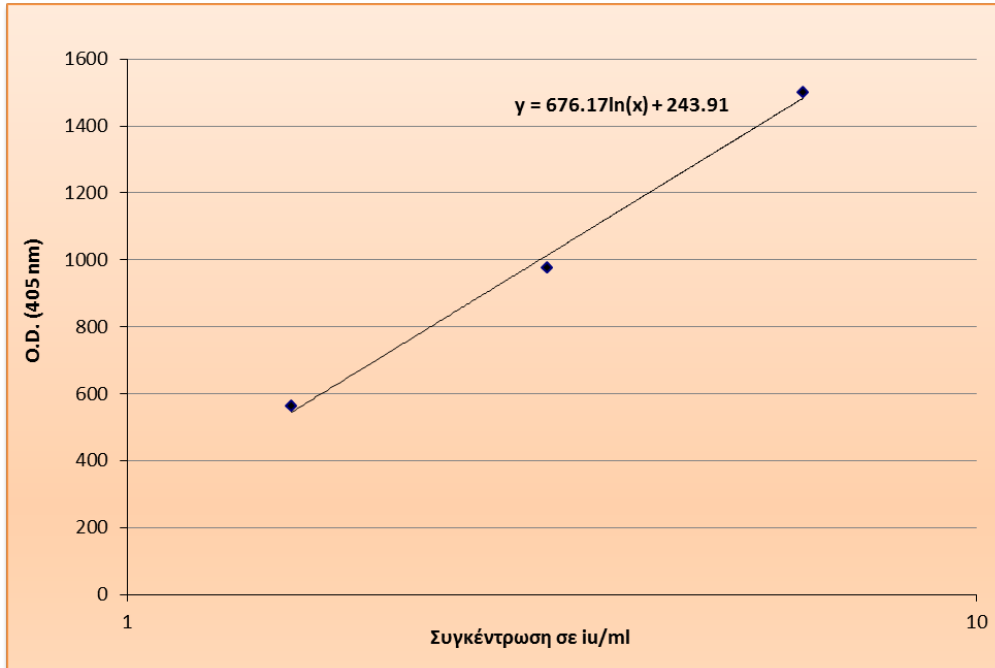
4.1 Βαθμονόμηση ορών

Με σκοπό τη σύγκριση της δραστηριότητας των ορών από ασθενείς με HT και GD έναντι της Tg και την επιλογή αυτών με υψηλή περιεκτικότητα, σε κάθε μικροπλάκα ELISA έγινε προσθήκη δείγματος διεθνών μονάδων αναφοράς δραστηριότητας 1000 iu έναντι Tg. Το εμπορικό αυτό σκεύασμα είναι αποτέλεσμα ανάμιξης μεγάλου αριθμού ορών από ασθενείς με αντισώματα έναντι Tg. Η προσθήκη διεθνών μονάδων αναφοράς σε κάθε πλάκα εξασφάλιζε την αξιοπιστία τόσο των μετρήσεων των δειγμάτων, όσο και της σύγκρισης μεταξύ δειγμάτων από διαφορετικές πλάκες ELISA, αφού σε καμία περίπτωση δεν είναι εφικτή η ακριβής αναπαραγωγή των συνθηκών της κάθε μικροπλάκας.

Η κατάλληλη επιλογή συγκέντρωσης των ορών για τη βαθμονόμησή τους επιλέχθηκε έπειτα από δοκιμή διαδοχικών αραιώσεων και σύγκρισης της οπτικής τους απορρόφησης. Από την ανάλυση αυτή προέκυψε ότι η κατάλληλη αραιώση των ορών είναι 1/250, και επιλέχθηκε για τα επόμενα στάδια της μελέτης αυτής.

Το υποστρώματα της αλκαλικής φωσφατάσης επωάστηκε με τα δείγματα έως ότου το δείγμα αναφοράς είχε O.D. ίση με 1500 nm στη συγκέντρωση των 6.25 iu/ml. Στη συνέχεια οι τιμές αυτές αποτέλεσαν τη βάση για τον υπολογισμό των συγκεντρώσεων των δειγμάτων προς έλεγχο, μέσω της πρότυπης καμπύλης που επιτεύχθηκε με τον τρόπο αυτό [διάγραμμα 2].

Από τη βαθμονόμηση επιλέχθηκαν μόνο 10 οροί κάθε ομάδας (HT, GD, υγιείς μάρτυρες) με υψηλό τίτλο αντι-Tg αντισωμάτων μεταξύ των ασθενών και συγκρίθηκαν με αντίστοιχα δείγματα υγιών μαρτύρων, ως προς το φύλο και την ηλικία. Βασική προϋπόθεση για την τελική επιλογή ήταν η διαθέσιμη ποσότητα ορού να είναι επαρκής για τα επόμενα στάδια της διατριβής (> 3 ml).



Διάγραμμα 2: Πρότυπη καμπύλη μέτρησης συγκέντρωσης αντισωμάτων έναντι Tg σε διεθνείς μονάδες αναφοράς (iu)/ml με ELISA. Σε κάθε μικροπλάκα προστέθηκαν 100 μl από το εμπορικό δείγμα του ΠΟΥ με τελική συγκέντρωση 6.25 iu/ml και σε διαδοχικές αραιώσεις 1:2 (0.1 – 6.25 iu/ml). Από τη γραφική παράσταση που προέκυπτε κάθε φορά, η εξίσωση της ευθείας υπολογίστηκε μόνο από το τμήμα που είναι γραμμικό. Κάθε αραιώση ελέγχθηκε δύο φορές σε κάθε πείραμα και υπολογίστηκε ο μέσος όρος. Εδώ παρουσιάζεται αντιπροσωπευτικό αποτέλεσμα από ένα πείραμα.

4.2 Επιλογή συνθηκών ELISA

4.2.1 Συγκέντρωση αντιγόνων

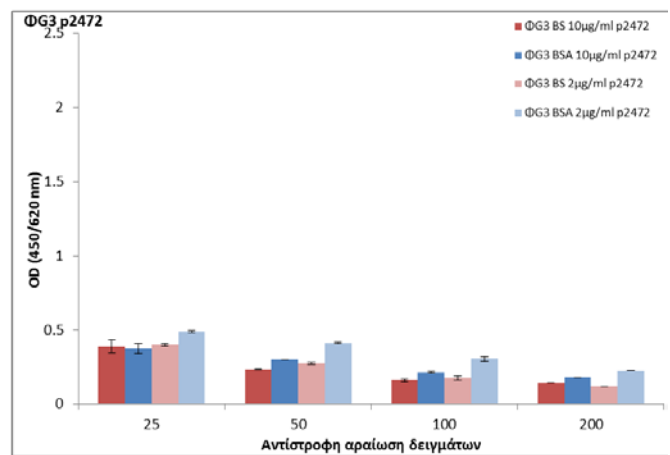
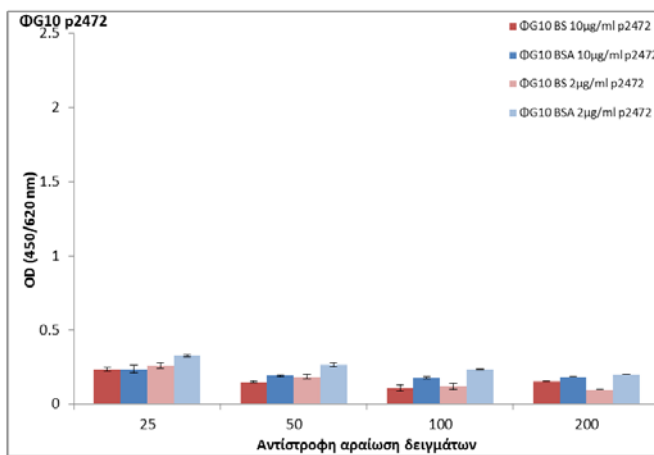
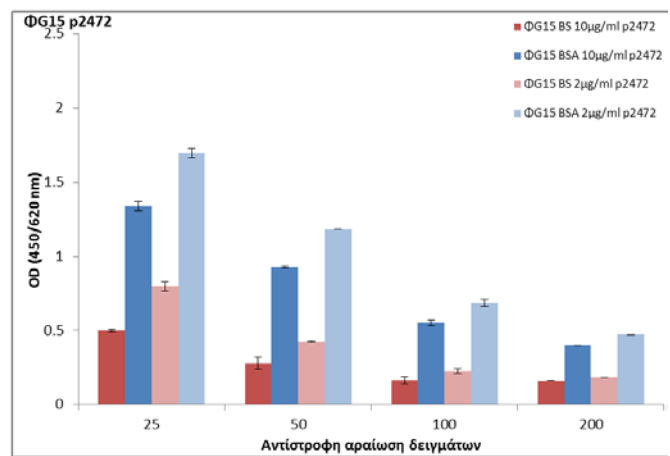
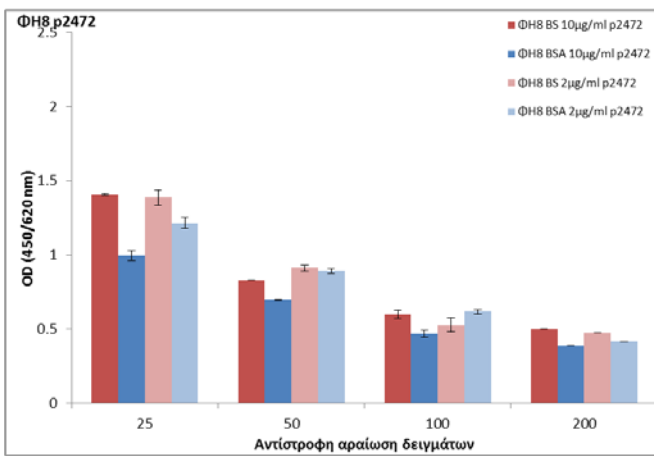
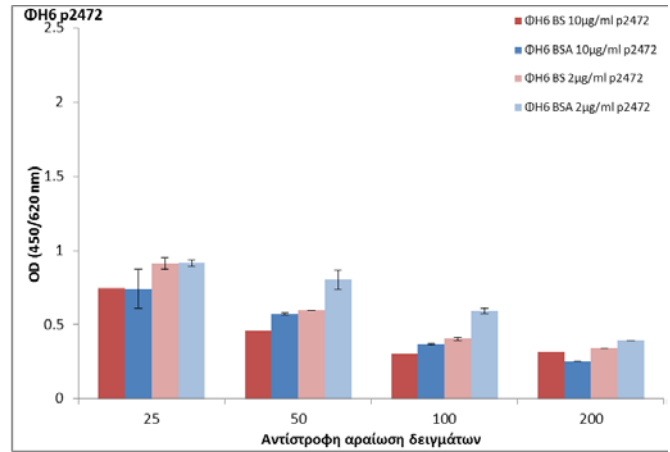
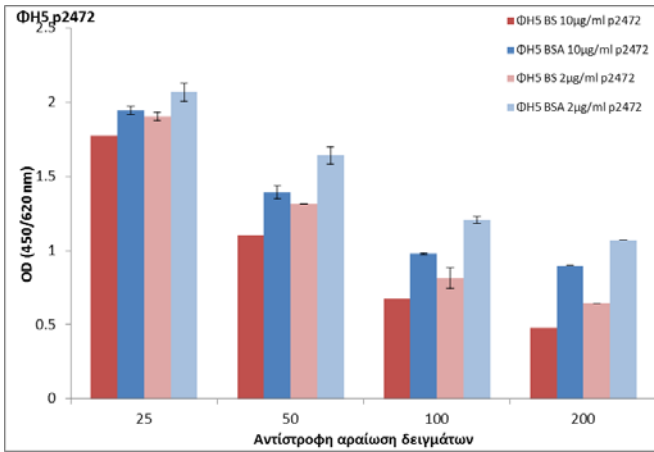
Με σκοπό τον προσδιορισμό της ειδικότητας των ορών από ασθενείς με HT ή νόσο GD έναντι των πεπτιδίων της Tg, έγινε διερεύνηση των κατάλληλων συνθηκών ELISA που θα επέτρεπαν τον αξιόπιστο έλεγχο των δειγμάτων για τις επόμενες πειραματικές διαδικασίες. Για το λόγο αυτό επιλέχθηκαν τρεις οροί από την κάθε νόσο, με κριτήριο τη δραστικότητά τους έναντι στην Tg. Πιο ειδικά, οι οροί ΦΗ5 και ΦΗ6 (HT) ήταν πολύ θετικοί έναντι της Tg, οι οροί ΦΗ8 (HT), και ΦG15 (GD) αναγνώριζαν την Tg με μέτρια ένταση, και τέλος οι οροί ΦG10 και ΦG3 (GD) δεν αναγνώριζαν την Tg.

Τα αντιγόνα προς διερεύνηση επιστρώθηκαν στην μικροπλάκα ELISA με συγκέντρωση 2 ή 10 μg/ml και ακολούθησε επίστρωση των κενών θέσεων των φρεατίων με χρήση διαλύματος PBS-BSA, ή PBS-BS. Για τον προσδιορισμό των ιδανικών συνθηκών επιλέχθηκαν τα πεπτίδια μάρτυρες p2472 και p2652 της ανθρώπινης Tg, από προηγούμενη μελέτη του Εργαστηρίου Ανοσολογίας, που είχαν βρεθεί να αναγνωρίζονται από ορούς ασθενών με HT και GD. Όλα τα πειράματα επαναλήφθηκαν δύο φορές και το κάθε δείγμα ορού τοποθετήθηκε σε δύο φρεάτια. Στα διαγράμματα παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα από ένα πείραμα.

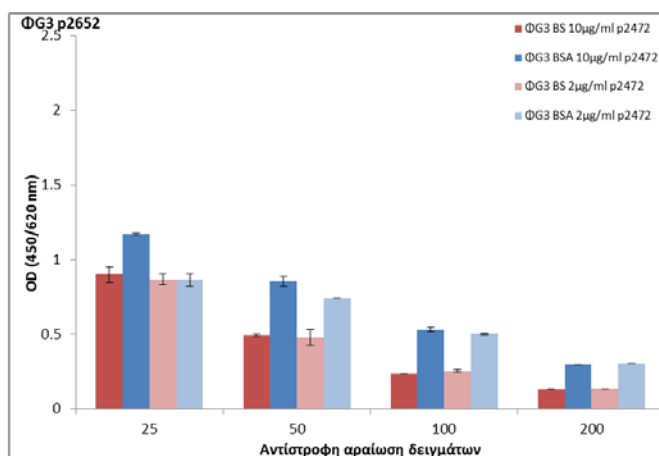
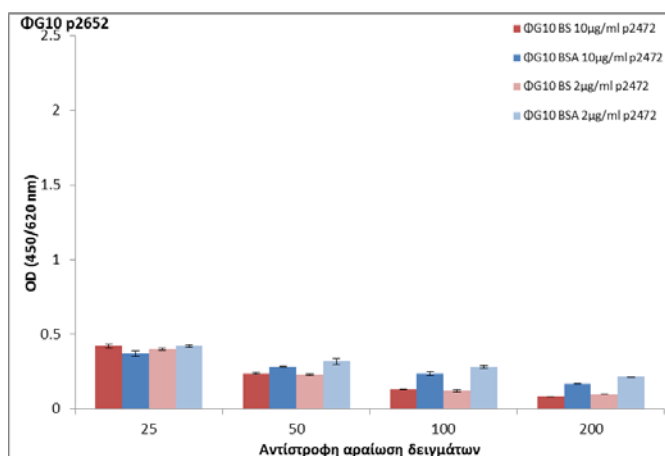
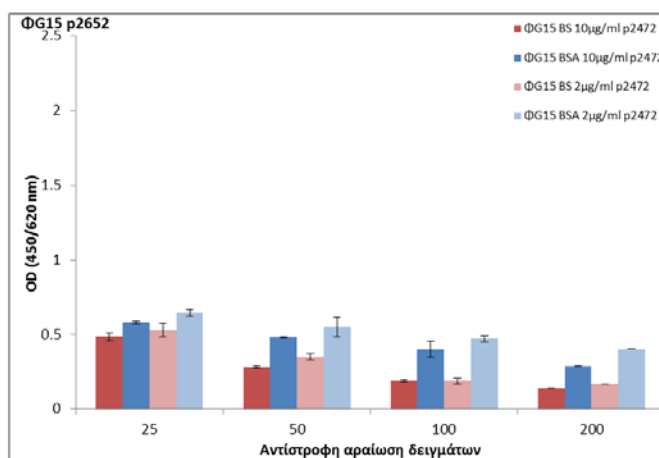
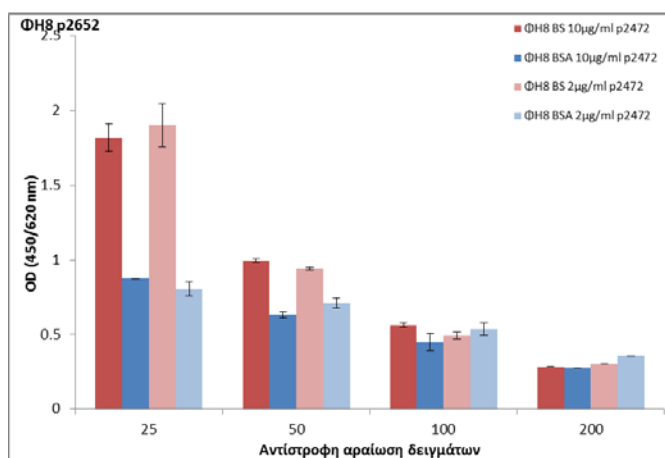
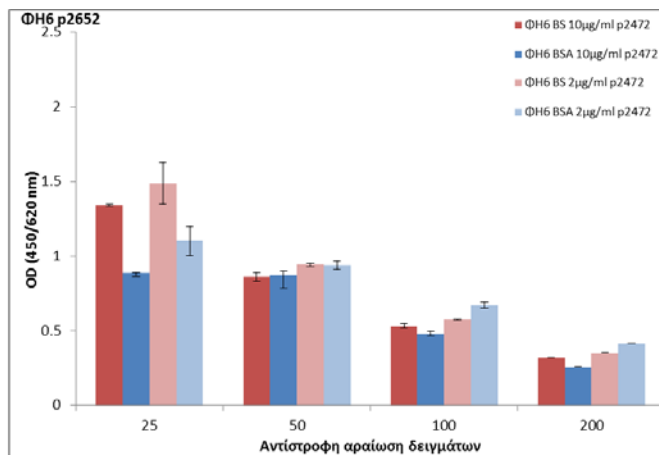
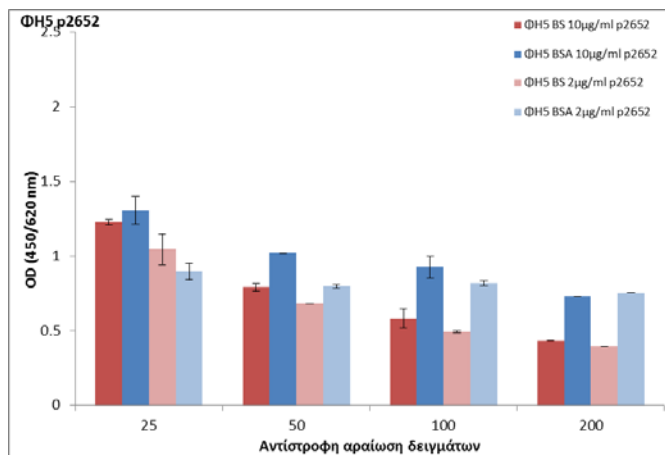
Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε πως τα αντισώματα των ορών από ασθενείς αναγνώριζαν με παρόμοια ένταση τα επιστρωμένα πεπτίδια της Tg και στις δύο συγκεντρώσεις, και μάλιστα συχνά με μεγαλύτερη ένταση στη χαμηλότερη συγκέντρωση των 2 μg/ml. Όσο μειώνεται η συγκέντρωση των ορών, μειώνεται και η δραστικότητα έναντι των πεπτιδίων, και παραμένει ανιχνεύσιμη ακόμη και στην αραίωση 1:200. Παράλληλα, δεν παρατηρήθηκε κάποια διαφορά στην οπτική απορρόφηση όταν οι μη ειδικές θέσεις των φρεατίων επιστρώθηκαν με PBS-BS ή PBS-BSA [διαγράμματα 3].

Από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει πως η δραστικότητα αντισωμάτων των ορών έναντι των πεπτιδίων της Tg είναι εμφανής ακόμη και στη χαμηλότερη συγκέντρωση των πεπτιδίων στα 2 μg/ml και με αραίωση ορών 1:200, και συνεπώς και οι δύο αυτές συγκεντρώσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε

επόμενα πειράματα για τον αντίστοιχο έλεγχο της δραστικότητας δειγμάτων. Για τις ανάγκες όμως της συγκεκριμένης μελέτης θα προτιμηθεί η αραίωση 1:100 των ορών. Η επιλογή των PBS-BS ή PBS-BSA δε είχε σημαντική επιρροή στην επίστρωση των κενών θέσεων των πλακών και έτσι το διάλυμα PBS-BSA κρίθηκε ως καταλληλότερο λόγω του εύκολου χειρισμού του. Το διάλυμα BS βρίσκεται σε υγρή μορφή, φυλάσσεται στους -20°C και η συχνή τήξη/πήξη του ενδεχομένως να οδηγήσει σε κατακρήμνιση των συστατικών του.



Διαγράμματα 3: ...συνέχεια στην επόμενη σελίδα



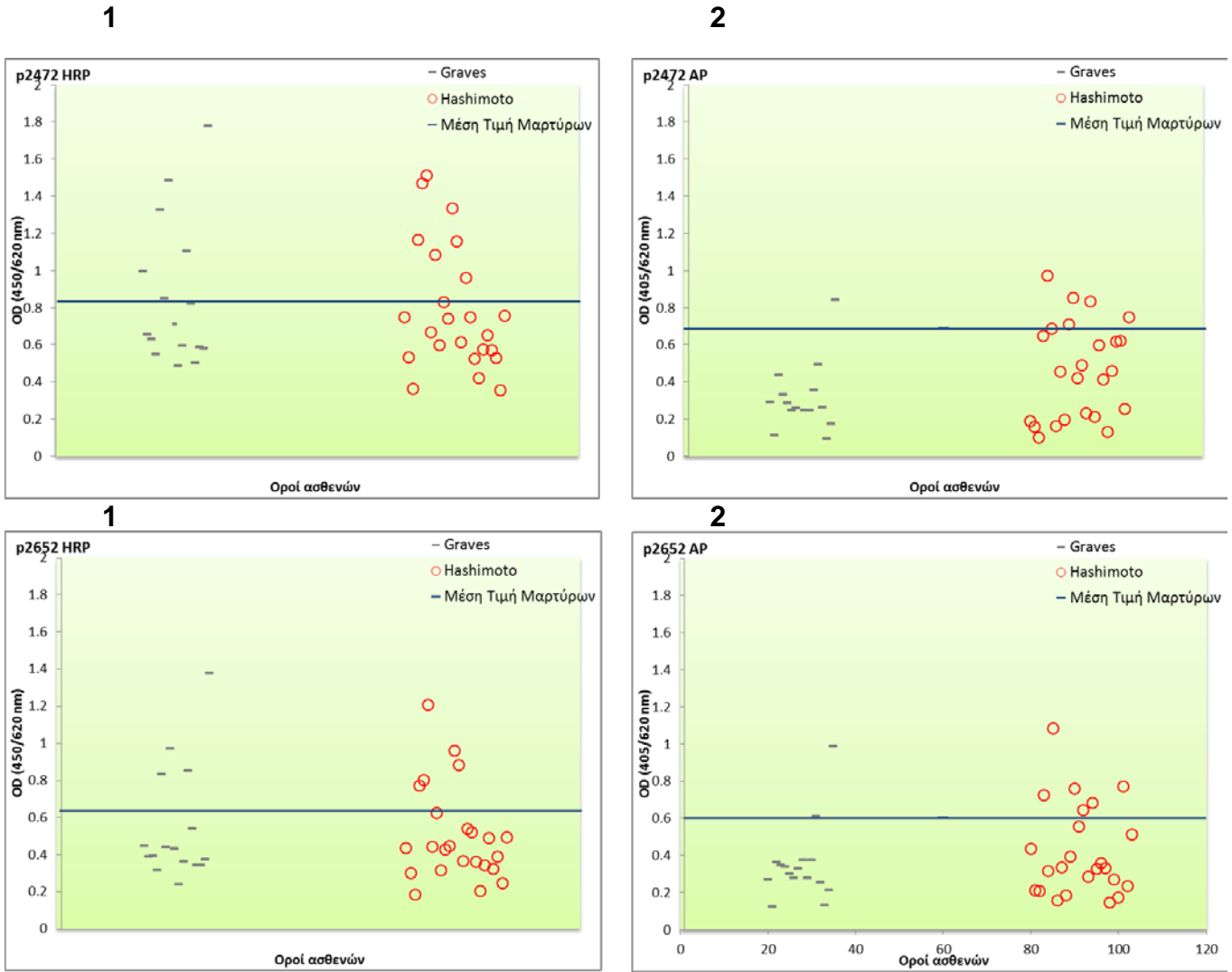
Διαγράμματα 3: Έλεγχος βέλτιστων συνθηκών επιστρώσης αντιγόνων και επικάλυψης μη-ειδικών θέσεων των φρεατίων της μικροπλάκας ELISA. Τα πεπτιδία της μελέτης επιστρώθηκαν στα φρεατία σε συγκέντρωση 10 και 2 μg/ml και οι κενές, μη-ειδικές θέσεις τους επικαλύφθηκαν με BS ή BSA. Οι οροί που δοκιμάστηκαν επωάστηκαν σε διαδοχικές αραιώσεις (1:25 – 1:200) 1:2. Στα διαγράμματα της αριστερής σελίδας απεικονίζεται η δοκιμή του πεπτιδίου p2472 στις διάφορες συνθήκες, και σε αυτά της δεξιάς σελίδας του p2652. Η δρατικότητα των ορών διαπιστώθηκε με την προσθήκη του υποστρώματος του δεύτερου αντισώματος (TMB) και μέτρηση O.D. στα 450 nm. Η κάθε αραιώση των παραπάνω ορών ελέγχθηκε δύο φορές σε κάθε πείραμα και υπολογίστηκε ο μέσος όρος και το τυπικό σφάλμα. Το πείραμα επαναλήφθηκε δύο φορές και παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα από ένα πείραμα.

4.2.2 Επιλογή συζευγμένου δεύτερου αντισώματος

Στη συνέχεια των προηγούμενων δοκιμών, διερευνήθηκε η δραστικότητα ενός μεγαλύτερου δείγματος ορών από ασθενείς με HT και GD έναντι των ίδιων πεπτιδίων της Tg, p2472 και p2652, με τις κατάλληλες πλέον συγκεντρώσεις και αραιώσεις αντιγόνου – ορού αντίστοιχα, με τη διαφορά ότι για την ανίχνευση των ορών έγινε χρήση αντισώματος από κασίκα, το οποίο αναγνωρίζει αντισώματα ανθρώπου τάξης G συζευγμένο είτε με υπεροξειδάση, είτε με αλκαλική φωσφατάση.

Από τη σύγκριση των δεύτερων αντισωμάτων προέκυψε πως η χρήση της υπεροξειδάσης είχε ως αποτέλεσμα τη γενικότερη αύξηση της οπτικής απορρόφησης όλων των δειγμάτων, συμπεριλαμβανομένων και των υγιών μαρτύρων, σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα μετά την προσθήκη του υποστρώματός της. Αυτό το χαρακτηριστικό καθιστά αδύνατη την οποιαδήποτε μελέτη των ορών και συνεπώς η αλκαλική υπεροξειδάση δείχνει να είναι καταλληλότερη στην προκειμένη περίπτωση. Ένα ακόμη πρώιμο αποτέλεσμα από την ανάλυση αυτή είναι πως τα συγκεκριμένα πεπτίδια δε ήταν σε θέση να διαχωρίσουν μεταξύ των δύο ομάδων ασθενών, HT και GD, αφού η πλειοψηφία των ασθενών δεν παρουσίαζαν δραστικότητα μεγαλύτερη της μέσης τιμής των υγιών μαρτύρων, στα συγκεκριμένα πεπτίδια της μελέτης [διαγράμματα 4].

Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε πως το σκέλος αυτό της μελέτης πρέπει να επαναληφθεί με χρήση διαφορετικών πεπτιδίων της Tg, με σκοπό τον εντοπισμό πεπτιδίων που θα διαχωρίζουν μεταξύ των δύο θυρεοειδικών παθήσεων.



Διαγράμματα 4: Σύγκριση των δεύτερων αντισωμάτων συζευγμένων με υπεροξειδάση (1) ή με αλκαλική φωσφατάση (2), με ELISA. Τα αντιγόνα (p2472 και p2652) επιστρώθηκαν σε συγκέντρωση 2 μg/ml και οροί από ασθενείς με HT ή νόσο GD επώαστηκαν με αραιώση 1:100. Η κάθε αραιώση των παραπάνω ορών ελέγχθηκε δύο φορές σε κάθε πείραμα και υπολογίστηκε ο μέσος όρος. Το πείραμα επαναλήφθηκε δύο φορές και παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα από ένα πείραμα.

4.2.3 Σύγκριση της ικανότητας των ορών να διαχωρίζουν μεταξύ των διαφορετικών μορφών της Tg

Οι οροί των ασθενών με νόσο HT ή GD ελέγχθηκαν ως προς την ικανότητά τους να διαχωρίζουν μεταξύ της ιωδιωμένης ή μη μορφής της Tg, καθώς και των Tg από διαφορετικά ζωικά είδη. Σκοπός του ελέγχου αυτού ήταν ο προσδιορισμός της επίδρασης του ιωδίου στην ικανότητα των ορών να αναγνωρίζουν την Tg, αλλά και η διερεύνηση της πιθανής αντικατάστασης της πολυδάπανης, ανθρώπινης Tg με τη βόεια.

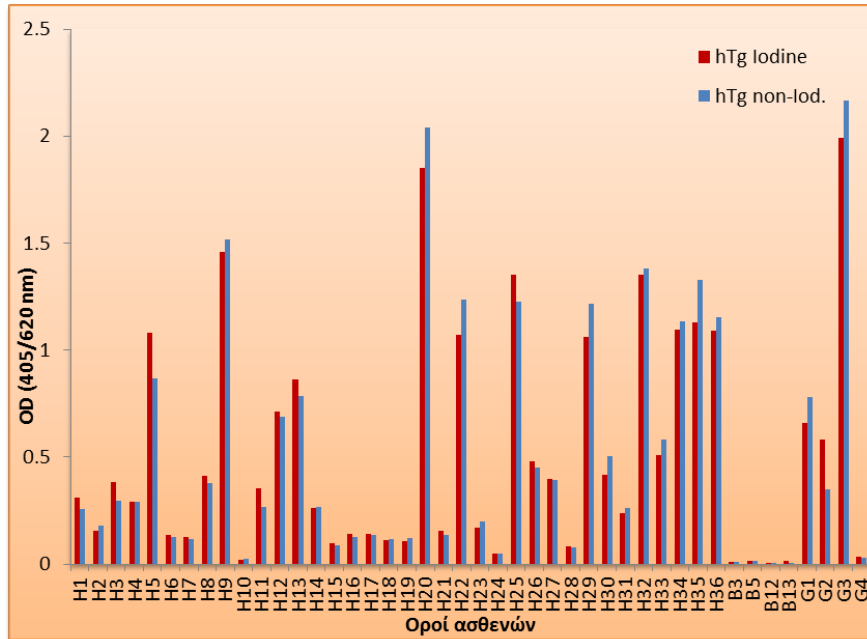
Για το λόγο αυτό, επιστρώθηκαν μικροπλάκες ELISA με 10 µg/ml Tg ανθρώπου ή βόως κανονικής περιεκτικότητας ιωδίου, ή Tg από την οποία είχαν αφαιρεθεί τα μόρια ιωδίου. Στη συνέχεια προστέθηκαν τα δείγματα των ορών, τα οποία επωάστηκαν αραιωμένα 1:50, για 1 ώρα, στους 37°C και η ανίχνευση των αντισωμάτων που προσδέθηκαν στην Tg πραγματοποιήθηκε με τη χρήση δεύτερου αντισώματος από κασίκα συζευγμένου με αλκαλική φωσφατάση, που αναγνωρίζει αντισώματα ανθρώπου τάξης G.

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στη δραστικότητα των ορών έναντι των δύο μορφών ιωδίωσης της Tg και συνεπώς μπορούμε να συμπεράνουμε πως η παρουσία ιωδίου δεν επηρεάζει την αναγνώρισή της από τα αντισώματα των ασθενών. Αντιθέτως, η σύγκριση της δραστικότητας των ορών έναντι της ανθρώπινης και της βόειας Tg είχε στατιστικά σημαντική διαφορά, και έτσι συμπεραίνουμε πως οι οροί είναι σε θέση να διαχωρίζουν μεταξύ των δύο ειδών [πίνακας 14 και διαγράμματα 5]. Η αντικατάσταση λοιπόν της ανθρώπινης Tg με βόεια δεν ενδείκνυται καθώς δεν είναι λειτουργική.

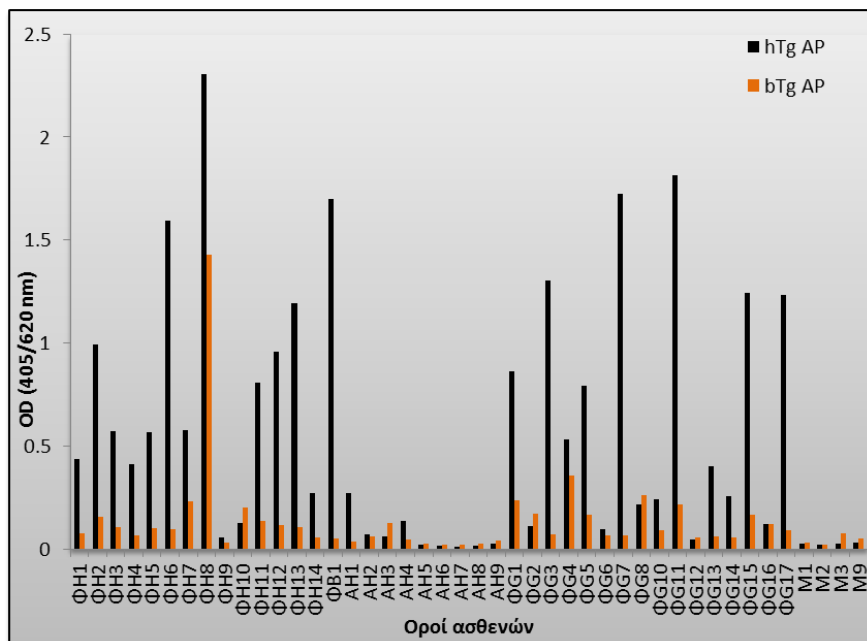
Πίνακας 14: Στατιστική ανάλυση διασποράς (ANOVA) ως προς 2 παράγοντες (2-way) για τη σύγκριση της ιωδιωμένης και μη-ιωδιωμένης, καθώς και της ανθρώπινης και βόειας Tg.

	<i>I-Tg</i>	<i>non I-Tg</i>	<i>P</i>
Μέσος όρος OD	0.522	0.531	>0.05
	<i>hTg</i>	<i>bTg</i>	<i>P</i>
Μέσος όρος OD	0.553	0.133	<0.05

A



B



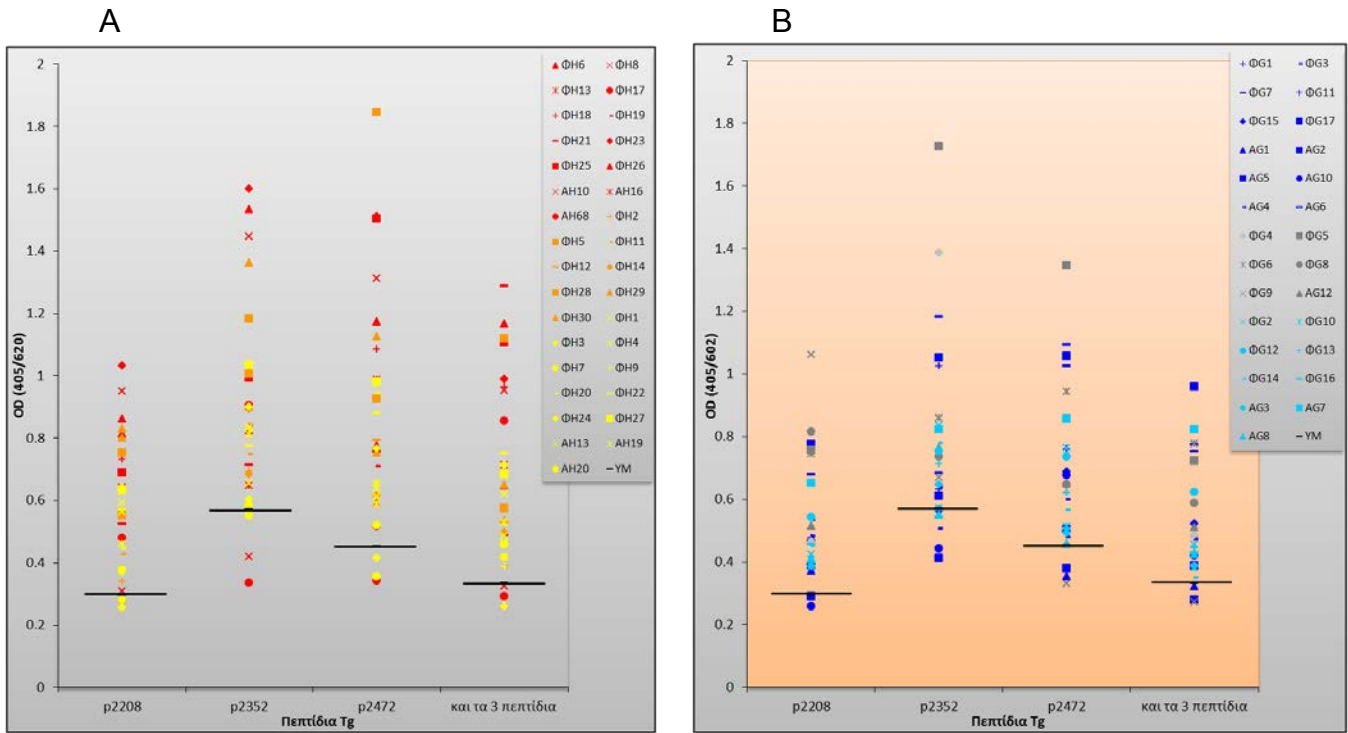
Διαγράμματα 5: Σύγκριση της δραστηριότητας των ορών από ασθενείς με HT (FH, AH) ή νόσο GD (FG) έναντι A) ιωδιωμένης και μη-ιωδιωμένης Tg και B) ανθρώπινης και βόειας προέλευσης. Οι οροί επωάστηκαν με αραιώση 1:50. Η κάθε αραιώση των παραπάνω ορών ελέγχθηκε δύο φορές σε κάθε πείραμα και υπολογίστηκε ο μέσος όρος και το τυπικό σφάλμα. Το πείραμα επαναλήφθηκε δύο φορές και παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα από ένα πείραμα.

4.3 Έλεγχος δραστηριότητας ορών από ασθενείς με HT και GD, έναντι των πεπτιδίων p2208, p2352 και p2472

Στο σκέλος αυτό ελέγχθηκε η δραστηριότητα των ορών ασθενών με HT ή νόσο GD έναντι τριών πεπτιδίων της Tg, p2208, p2352 και p2472, που επιλέχθηκαν από προηγούμενη μελέτη του Εργαστηρίου Ανοσολογίας ως στόχοι αυτοαντισωμάτων από ασθενείς με αυτοάνοσα θυρεοειδικά νοσήματα.

Επιστρώθηκαν μικροπλάκες ELISA με 1 µg/ml p2208, ή p2352, ή p2472, ή με συνδυασμό και των τριών σε κάθε φρεάτιο αυτής με τελική συγκέντρωση 1 µg/ml για κάθε πεπτίδιο. Συνολικά ελέγχθηκαν 33 οροί από ασθενείς με HT, 27 οροί από ασθενείς με GD και 28 υγιής μάρτυρες. Για τη μελέτη αυτή επιλέχθηκαν οροί από ασθενείς τόσο με υψηλό όσο και με χαμηλό τίτλο αντι-Tg αντισωμάτων, έτσι ώστε να διερευνηθεί αν η δραστηριότητα έναντι Tg συσχετίζεται με την αναγνώριση των πεπτιδίων αυτής. Στο σκέλος αυτό οι οροί επώαστηκαν με αραίωση 1:50 για πάνω από 12 ώρες, στους 4°C, έτσι ώστε να επιτευχθεί καλύτερος διαχωρισμός μεταξύ των αρνητικών και θετικών δειγμάτων.

Από τους ορούς ασθενών με HT που ελέγχθηκαν, το 91% ήταν θετικοί με τα πεπτίδια p2208 και p2352, 85% με το p2472 και το 91% με τουλάχιστον ένα από τα τρία. Αντίστοιχα, για τους ορούς από ασθενείς με GD, το 93% ήταν θετικοί με το p2208, το 74% με το p2352, το 89% με το p2472 και τέλος το 89% με τουλάχιστον ένα από τα τρία. Από τα αποτελέσματα βλέπουμε πως η πλειοψηφία των ορών και από τις δύο νόσους αναγνωρίζει όλα τα πεπτίδια της μελέτης, με ιδιαίτερη έμφαση στο p2208 που παρουσίαζε την υψηλότερη δραστηριότητα. Το εύρημα αυτό, αν και πολύ ενθαρρυντικό για τη χρήση πεπτιδίων για την ανίχνευση των αντι-Tg αντισωμάτων, δεν προσφέρει κάποια γνώση ως προς το διαχωρισμό των δύο θυρεοειδικών νοσημάτων, αφού σχεδόν όλα τα δείγματα ήταν θετικά. Με μία πιο προσεκτική ανάλυση των αποτελεσμάτων καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι ορισμένοι οροί από ασθενείς με HT και GD, ενώ διαθέτουν υψηλούς τίτλους αντι-Tg αντισωμάτων, δεν παρουσιάζουν αντίστοιχη δραστηριότητα και έναντι των πεπτιδίων της, με τιμές χαμηλότερες των υγιών μαρτύρων [διαγράμματα 6].



Διαγράμματα 6: Έλεγχος δραστηριότητας ολικών ορών από ασθενείς με HT (A) ή νόσο GD (B) έναντι των πεπτιδίων p2208, p2352 και p2472, με ELISA. Τα φρεάτια της μικροπλάκας επιστρώθηκαν με 1 μg/ml κάθε πεπτιδίου ξεχωριστά, ή και τα τρία μαζί στο ίδιο φρεάτιο. Οι οροί επώαστηκαν με αραιώση 1:50, για διάστημα μεγαλύτερο των 12 ωρών, στους 4°C. Η κάθε αραιώση των παραπάνω δειγμάτων ελέγχθηκε δύο φορές σε κάθε πείραμα και υπολογίστηκε ο μέσος όρος. Το πείραμα επαναλήφθηκε δύο φορές και παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα από ένα πείραμα.

4.5 Απομόνωση αντισωμάτων τάξης G από ορούς ασθενών

Η σύγκριση της δραστηριότητας των ορών έναντι των πεπτιδίων της Tg που δοκιμάστηκαν δεν είχε ως αποτέλεσμα το διαχωρισμό μεταξύ των δύο ασθενειών. Σε μία προσπάθειά διαφοροποίησης B επιτόπων μεταξύ των δύο αυτοάνοσων θυρεοειδικών νοσημάτων, επιλέχθηκαν οροί ασθενών με κριτήριο τον υψηλό τίτλο αντι-Tg αντισωμάτων και επαρκή όγκο, για την απομόνωση των αντισωμάτων τάξης G. Απώτερος σκοπός της προσέγγισης αυτής ήταν ο έλεγχος των αντισωμάτων αυτών, δίχως την παρουσία παραγόντων του ορού που ενδεχομένως να παρεμποδίζουν την αναγνώριση των πεπτιδίων από αυτά. Από τους ορούς που υπήρχαν διαθέσιμοι, ήταν μικρός ο αριθμός αυτών που να πληρούσε και τα δύο κριτήρια διαλογής, τα οποία ήταν απαραίτητα για το σκέλος αυτό, αφού κατά πάσα πιθανότητα από τα ολικά αντισώματα τάξης G μόνο ένα μικρό κλάσμα θα παρουσίαζε δραστηριότητα έναντι των πεπτιδίων της μελέτης.

Τα δείγματα των ορών τοποθετήθηκαν σε στήλη πρωτεΐνης G και η προσδεδεμένη ανοσοσφαιρίνη τάξης G εκλούστηκε από τη στήλη με προσθήκη όξινου διαλύματος. Όλα τα εκλούόμενα κλάσματα εξουδετερώθηκαν με την προσθήκη ισχυρής βάσης και συμπυκνώθηκαν σε μικρό όγκο. Συνολικά, απομονώθηκαν τα αντισώματα τάξης G 14 ορών από ασθενείς με HT, 10 ορών από ασθενείς με GD και 11 από υγιείς μάρτυρες. Το μέσο όρο ηλικίας όλων των ασθενών και της ομάδας ελέγχου ήταν περί τα 42 έτη. Τέλος παρατηρήθηκε πως η μέση συγκέντρωση σε αντισώματα τάξης G σε ένα άτομο κυμαινόταν από περίπου 9 έως 11 mg/ml ορού [πίνακας 15].

Πίνακας 15: Οι οροί από τους οποίους απομονώθηκαν τα αντισώματα τάξης G παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα. Σε κάθε ομάδα ο μέσος όρος ηλικίας ήταν περί τα 43 έτη. Η ολική απομονωμένη IgG ποσοτικοποιήθηκε με μέτρηση O.D. στα 280 nm και η αρχική συγκέντρωση στον ορό προσδιορίστηκε από το λόγο απομονωμένη IgG (mg) / αρχική ποσότητα ορού (ml).

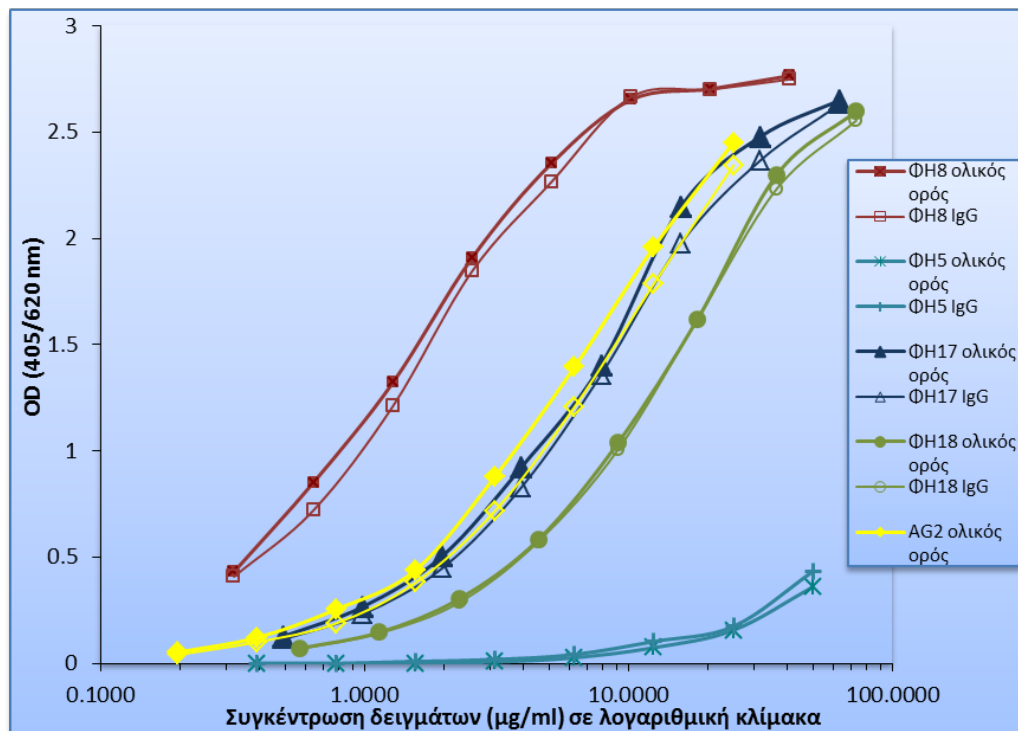
Κωδικός δείγματος	Ηλικία	Έκπλυση (ml)	Ορός (ml)	Απομονωμένη IgG (mg)	Συγκέντρωση IgG στον αρχικό ορό (mg/ml)
Υγιείς					
M1	26	14	2.3	30.72	13.08
M17	28	13.5	2.2	19.7	9.11
M20	59	15	1.8	14	7.97
M18	23	14	1.8	14	7.72
M23	52	14	2.0	19.43	9.92
M29	37	35	3.6	23.7	6.58
M27	56	45	3.0	32.27	10.93
M15	49	42.5	2.3	16.5	7.33
M12	49	37	2.0	22.59	11.58
M30	55	40	3.0	25.5	8.63
M7	35	30	2.1	20.5	9.97
Μέσος όρος	42	-	-	-	9.35
Hashimoto					
ΦΗ8	23	16	3.4	50.8	15.09
ΦΗ17	35	12	3.9	40	10.37
ΦΗ5	50	18	3.8	54.6	14.53
ΦΗ18	23	55	4.4	87.6	20.12
ΑΗ68	68	17	2.5	25.46	10.36
ΦΗ6	22	16	3.2	38.1	12.10
ΑΗ10	50	45	4.4	32.38	7.44
ΑΗ16	45	50	4.2	49.29	11.86
ΦΗ21	50	50	3.9	39.1	9.92
ΦΗ19	40	37	4.0	41.34	10.45
ΦΗ10	49	47.5	2.3	22.6	9.79
ΑΗ13	48	37	3.0	27.05	9.15
ΑΗ19	55	37.5	2.6	26.4	10.34
ΑΗ20	39	32	2.3	6.36	2.82
Μέσος όρος	42	-	-	-	11.03
Graves					
ΑG2	40	17.5	2.6	19.5	7.62
ΑG10	36	15	2.0	15.14	7.73
ΦG1	24	29	3.5	40.76	11.61
ΦG17	83	30	3.5	32.1	9.29
ΦG3	42	30	3.6	39.06	10.90
ΦG7	79	11	1.3	19.7	15.10
ΑG5	58	15	1.8	20.07	11.10
ΦG15	35	30	4.0	39.7	10.05
ΦG11	40	30	2.7	21.53	8.10
G3	22	35	2.4	26.5	11.25
Μέσος όρος	45	-	-	-	10.28

4.6 Σύγκριση δραστηριότητας ολικών ορών και κλασμάτων IgG έναντι της Tg και πεπτιδίων αυτής

Στόχος της δοκιμασίας αυτής ήταν ο αρχικός έλεγχος ενός μικρού δείγματος ορών από 4 ασθενείς με HT και 1 με GD για τυχόν διαφορές που μπορεί να παρουσιάζονταν στη δραστηριότητα έναντι της Tg, μεταξύ των ολικών ορών και των απομονωμένων IgG κλασμάτων αυτών, με ELISA. Με τον τρόπο αυτό θα διαπιστώναμε αν παράγοντες που ανευρίσκονται σε έναν ορό είναι σε θέση να παρεμποδίσουν την πρόσδεση των IgG αντισωμάτων στην Tg.

Οι μικροπλάκες επιστρώθηκαν με 10 µg/ml ανθρώπινης Tg και κάθε δείγμα ορού επωάστηκε με αρχική αραιώση 1:250 και διαδοχικές αραιώσεις 1/2. Για να είναι εφικτή η σύγκριση μεταξύ των δύο κλασμάτων του κάθε δείγματος, έγινε αναγωγή της αραιώσης 1:250 στην απομονωμένη IgG. Έτσι, σύμφωνα με τον πίνακα 15, χρησιμοποιήθηκε η συγκέντρωση IgG στον αρχικό ορό, όπως αυτή προέκυψε από την ποσότητα της IgG που απομονώθηκε στον όγκο του συγκεκριμένου ορού. Στη συνέχεια διαιρέθηκε η συγκέντρωση με το συντελεστή αραιώσης (250) και βρέθηκε η αντίστοιχη συγκέντρωση της καθαρής IgG για την αραιώση αυτή.

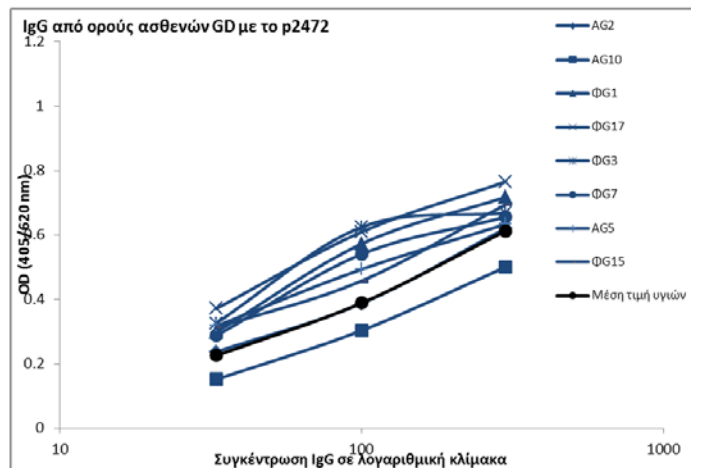
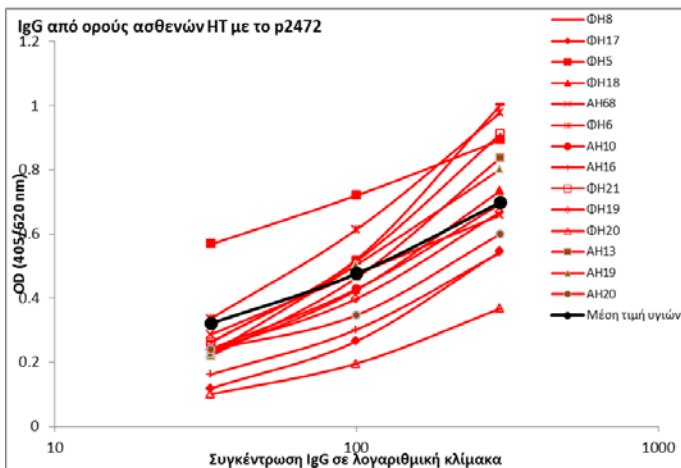
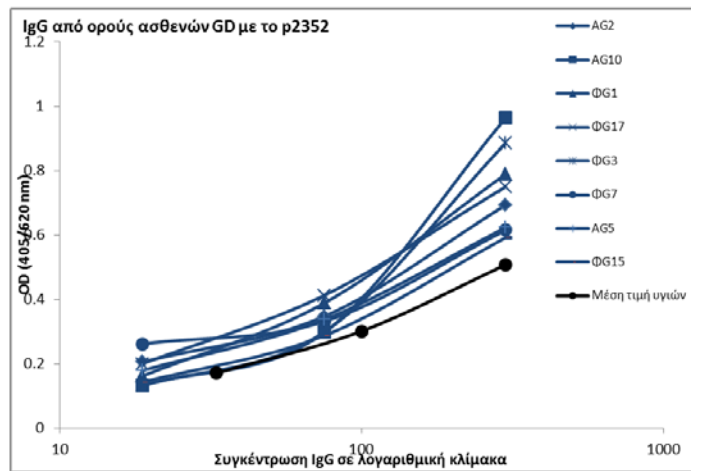
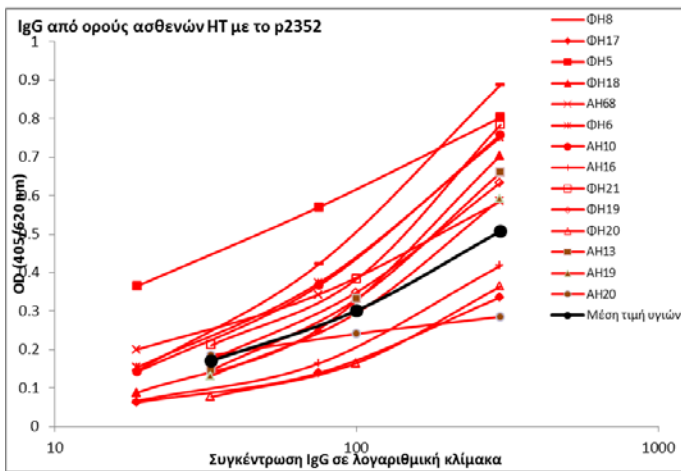
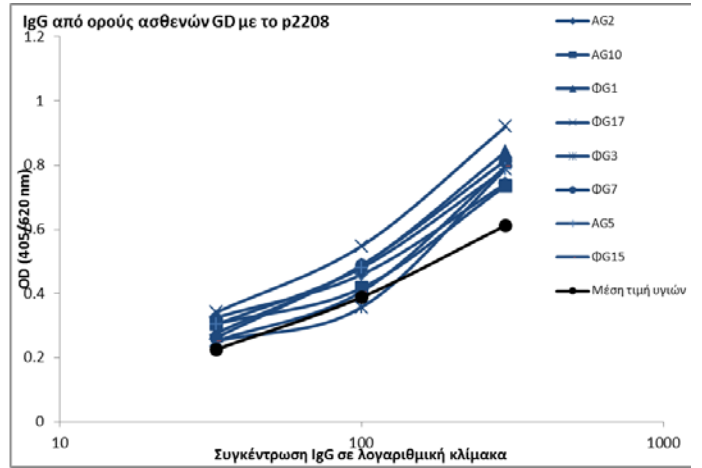
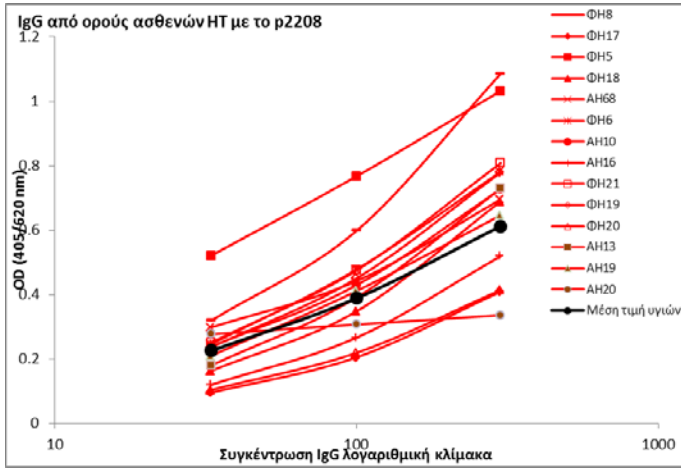
Από τα αποτελέσματα της ELISA φάνηκε πως η δραστηριότητα έναντι της Tg των ορών και των καθαρισμένων IgG κλασμάτων τους δε διαφοροποιήθηκε σε κανέναν από τους ορούς που δοκιμάστηκε [διάγραμμα 7]. Ενδεχομένως η ειδικότητα των αντι-Tg αντισωμάτων να είναι τόσο ισχυρή, που δεν επηρεάζεται από παράγοντες του ολικού ορού ή από άλλες τάξεις αντισωμάτων.



Διάγραμμα 7: Σύγκριση της δραστηριότητας των ολικών ορών και των απομονωμένων IgG αντισωμάτων τους έναντι της Tg. Η Tg επιστρώθηκε σε φρεάτια μικροπλάκας ELISA σε συγκέντρωση 10 µg/ml και οι οροί επωάστηκαν σε αραιώση 1:250. Για τη σύγκριση των ορών με τα αντίστοιχα IgG κλάσματά τους, υπολογίστηκε η συγκέντρωση στην οποία βρίσκονται οι IgG στον ολικό ορό, όταν αυτός αραιώνεται 1:250. Η κάθε αραιώση των παραπάνω δειγμάτων ελέγχθηκε δύο φορές σε κάθε πείραμα και υπολογίστηκε ο μέσος όρος. Το πείραμα επαναλήφθηκε δύο φορές και παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα από ένα πείραμα.

Στη συνέχεια, διερευνήθηκε η ικανότητα όλων των απομονωμένων IgG κλασμάτων από τους ασθενείς με ΗΤ ή GD να αναγνωρίζουν τα πεπτιδία της μελέτης, χωρίς την ύπαρξη των υπόλοιπων παραγόντων μέσα στον ορό που ενδεχομένως να παρεμποδίζουν τη δράση τους. Οι μικροπλάκες επιστρώθηκαν με 1 µg/ml πεπτιδίου και τα απομονωμένα αντισώματα επωάστηκαν σε αρχική συγκέντρωση 300 µg/ml και διαδοχικές αραιώσεις 1:3, για 1.5 ώρες.

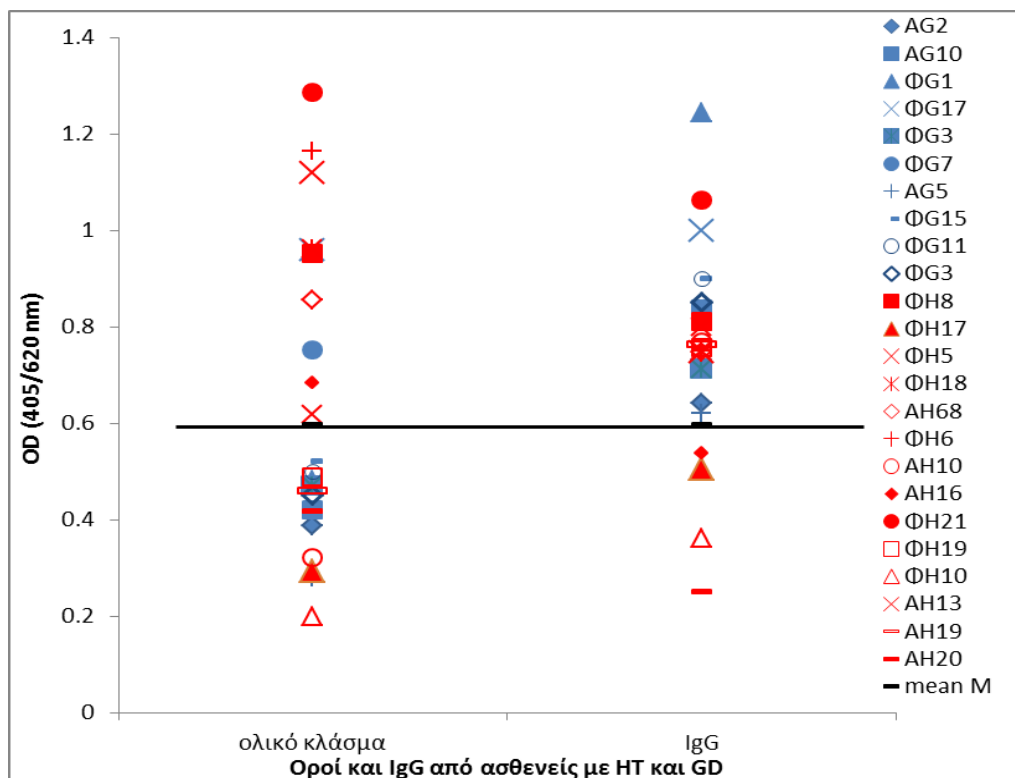
Ως προς τη νόσο ΗΤ, παρατηρήθηκε πως ενώ επιλέχθηκαν οροί με υψηλό τίτλο αντι-Tg αντισωμάτων, σε επίπεδο IgG η δραστηριότητά τους διαφοροποιήθηκε σε τέτοιο βαθμό που προσομοίαζε αυτήν των υγιών μαρτύρων και στα τρία πεπτιδία της μελέτης. Από την άλλη, τα IgG αντισώματα από ασθενείς με νόσο GD εμφάνισαν διαφορετική εικόνα από αυτήν των ολικών τους ορών, με 100% αναγνώριση των πεπτιδίων p2208 και p2352, και 88% του p2472 [διαγράμματα 8].



Διαγράμματα 8: Δοκιμασία δρασικότητας των απομονωμένων IgG αντισωμάτων από ασθενείς με HT (κόκκινες γραμμές), νόσο GD (μπλε γραμμές) και υγιείς μάρτυρες (μέσος όρος – μαύρη γραμμή), με ELISA. Τα πεπτιδία (p2208, p2352 και p2472) επιστρώθηκαν στα φρεάτια της κάθε μικροπλάκας σε συγκέντρωση 1 μg/ml και τα δείγματα IgG επωάστηκαν σε αρχική συγκέντρωση 300 μg/ml και σε διαδοχικές αραιώσεις 1:3. Οι κόκκινες γραμμές αντιπροσωπεύουν Η κάθε αραιώση των παραπάνω δειγμάτων ελέγχθηκε δύο φορές σε κάθε πείραμα και υπολογίστηκε ο μέσος όρος. Το πείραμα επαναλήφθηκε δύο φορές και παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα από ένα πείραμα.

Τέλος, επαναλήφθηκε η ίδια προσέγγιση μόνο που αυτή τη φορά τόσο οι ολικοί οροί, όσο και το κλάσμα των απομονωμένων IgG τους τοποθετήθηκαν στην ίδια μικροπλάκα ELISA, παρουσία και των 3 πεπτιδίων της μελέτης σε κάθε φρεάτιο. Με τον τρόπο αυτό εξασφαλίζεται η καλύτερη δυνατή σύγκριση της δραστικότητας των δύο αυτών δειγμάτων. Έτσι, επιστρώθηκαν μικροπλάκες με τα 3 πεπτίδια p2208, p2352 και p2472, και σε τελική συγκέντρωση 1 µg/ml σε κάθε φρεάτιο για κάθε ένα από αυτά.

Σε επίπεδο ολικού ορού, η δραστικότητα έναντι ενός τουλάχιστον από τα πεπτίδια ήταν διάχυτη, δίχως κάποια σαφή ένδειξη προτίμησης, με το 57% των ορών από HT να αναγνωρίζουν τα μίγμα των πεπτιδίων, και μόλις το 25% των ορών από GD. Όταν όμως η δραστικότητα αυτή συγκρίθηκε με αυτή των απομονωμένων IgG, τότε παρατηρήθηκε αύξηση αυτής στο 71% για τις IgG από ασθενείς με HT και στο 100% για τις IgG από ασθενείς με GD [διάγραμμα 9]. Βλέπουμε, λοιπόν, πως με το συνδυασμό και των τριών πεπτιδίων είναι δυνατός ο διαχωρισμός μόνο μεταξύ υγιών και ασθενών που πάσχουν από GD – και όχι HT – και μόνο σε επίπεδο IgG.



Διάγραμμα 9: Σύγκριση δραστηριότητας ολικών ορών και απομονωμένων IgG αντισωμάτων τους από ασθενείς με HT (κόκκινο χρώμα) και νόσο GD (μπλε χρώμα), με ELISA. Με μαύρο χρώμα απεικονίζεται η μέση τιμή από υγιείς μάρτυρες +2.5 S.D.. Κάθε φρεάτιο της μικροπλάκας επιστρώθηκε και με τα τρία πεπτιδία p2208, p2352 και p2472 σε τελική συγκέντρωση 1 $\mu\text{g/ml}$ για το κάθε ένα. Όλοι οι ολικοί οροί επωάστηκαν σε αραιώση 1:50 και αντίστοιχα αραιώθηκαν και τα IgG κλάσματά τους, βάσει της αρχικής τους συγκέντρωσης στον ορό από τον οποίο απομονώθηκαν. Η κάθε αραιώση των παραπάνω δειγμάτων ελέγχθηκε δύο φορές σε κάθε πείραμα και υπολογίστηκε ο μέσος όρος. Το πείραμα επαναλήφθηκε δύο φορές και παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα από ένα πείραμα.

5. IN VITRO ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΟΣΟΓΟΝΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ p2208 και p2352 ΣΕ Τ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΕΠΙΠΕΔΟ

Από την ανάλυση των πεπτιδίων σε Β κυτταρικό επίπεδο δεν προέκυψε κάποιο ικανό να διαχωρίζει μεταξύ των δύο αυτοάνοσων νοσημάτων του θυρεοειδούς αδένα. Για το λόγο αυτό προχωρήσαμε στον έλεγχο της ανοσογονικότητας και παθογονικότητάς τους χορηγώντας τα σε ποντικούς. Η *in silico* μελέτη των πεπτιδίων ανέδειξε μόνο τα p2208 και p2352 ως ικανά να παρουσιάζονται από MHC μόρια τόσο από ευαίσθητες (p2208 και p2352) όσο και από ανθεκτικές (p2208) ως προς την EAT φυλές ποντικών και έτσι επιλέχθηκαν για το υπόλοιπο της μελέτης.

5.1 Έλεγχος των T-λεμφοκυττάρων ειδικών για τα πεπτίδια της μελέτης

Με βάση την *in silico* μελέτη των πεπτιδίων ελέγχθηκε η ανοσογονικότητα, σε επίπεδο T-κυττάρων, του p2208 στα ευαίσθητα στελέχη SJL/J, CBA/J και στα ανθεκτικά στελέχη C57BL/6, BALB/c, και του p2352 στα ευαίσθητα στελέχη AKR/J, CBA καθώς και στο ανθεκτικό στέλεχος BALB/c, παρά τη μη ύπαρξη κάποιας ένδειξης από την *in silico* μελέτη. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η ικανότητα των μορίων του MHC των ποντικών να παρουσιάσουν τα υπό μελέτη πεπτίδια, αλλά και η ύπαρξη T λεμφοκυττάρων ειδικών για αυτά.

Πραγματοποιήθηκε ανοσοποίηση των αντίστοιχων ποντικών με 100 nmol p2208 ή p2352 και ανοσοενισχυτικό και έπειτα από 10 ημέρες απομονώθηκαν οι λεμφαδένες τους, ομογενοποιήθηκαν και τα κύτταρα που προέκυψαν καλλιεργήθηκαν παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του πεπτιδίου ανοσοποίησης (0.012 – 9 μ M), του πεπτιδίου μάρτυρα p2652 και απουσία αντιγόνου. Σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου έχει προκύψει πως το p2652 δεν είναι ανοσογονικό ή παθογονικό σε καμία από τις φυλές ποντικών που δοκιμάστηκε και συνεπώς αποτελεί ιδανικό αρνητικό μάρτυρα. Κάθε συγκέντρωση πεπτιδίου προστέθηκε σε τρία διαφορετικά φρεάτια μικροπλάκας κυτταροκαλλιέργειας, στα οποία είχε προστεθεί συγκεκριμένος αριθμός (4×10^5) κυττάρων λεμφαδένων. Στη συνέχεια, προστέθηκε στην καλλιέργεια ραδιενεργή

θυμιδίνη και μετρήθηκε ο πολλαπλασιασμός των T λεμφοκυττάρων σε κρούσεις ανά λεπτό, όπως αυτός περιγράφεται από το δείκτη πολλαπλασιασμού (Stimulation Index – S.I.) (S.I.= κρούσεις ανά λεπτό, που παρουσιάζουν τα λεμφοκύτταρα παρουσία του αντιγόνου / κρούσεις ανά λεπτό, που παρουσιάζονται απουσία αντιγόνου). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, τα T λεμφοκύτταρα που περιέχονται στους λεμφαδένες των ποντικών θεωρείται ότι αναγνωρίζουν το πεπτιδίο στην καλλιέργεια όταν το S.I. είναι μεγαλύτερο του 2, όμως στη μελέτη μας θα θεωρήσουμε θετικό το αποτέλεσμα με $S.I. \geq 3$. Το πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές και υπολογίστηκε ο μέσος όρος των κρούσεων ανά λεπτό για τα 3 διαφορετικά δείγματα κάθε συγκέντρωσης.

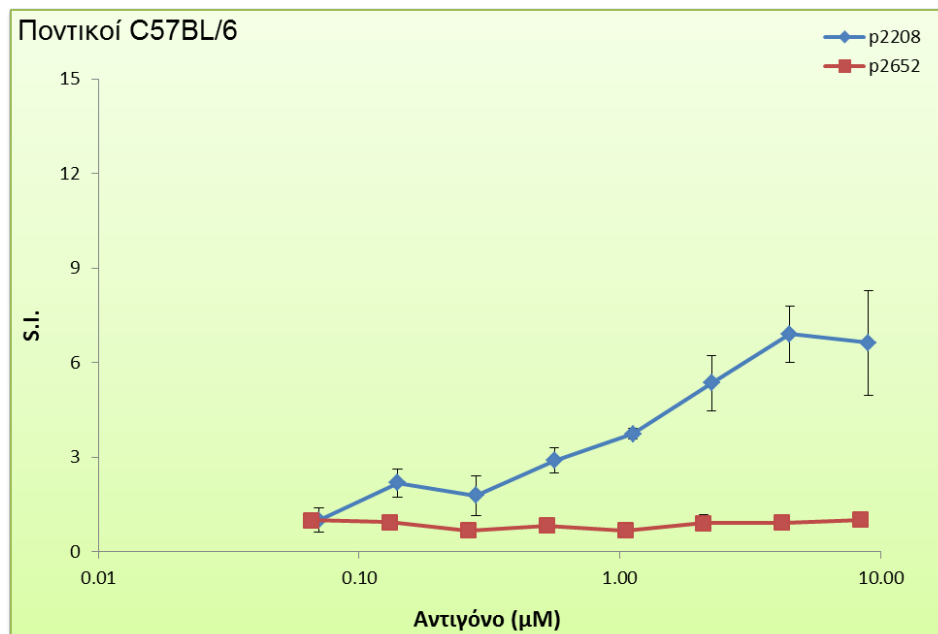
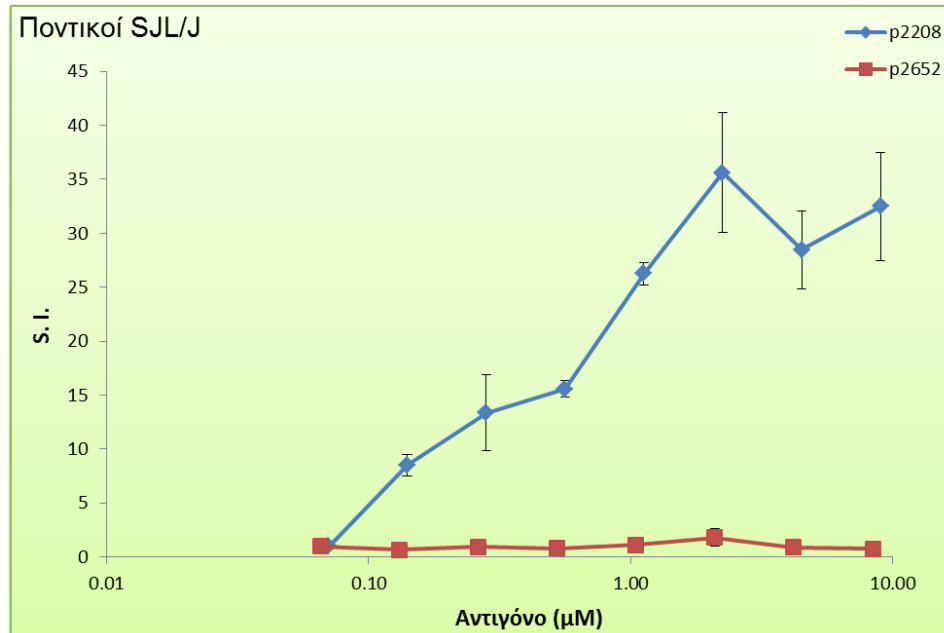
Αναφορικά με το p2208, το S.I. των T λεμφοκυττάρων των ποντικών SJL/J κυμαινόταν από 8.52 έως 11.34 παρουσία της χαμηλότερης συγκέντρωσης p2208 και από 13.10 έως 32.49 παρουσία της υψηλότερης συγκέντρωσής του. Οι αντίστοιχες τιμές S.I. για τους ποντικούς C57BL/6 στη χαμηλότερη συγκέντρωση του πεπτιδίου κυμαίνονταν από 1.24 έως 2.19 και από 5.56 έως 6.63 στην υψηλότερη συγκέντρωση. Τέλος, τόσο στους ποντικούς BALB/c όσο στους CBA/J δεν ανιχνεύτηκε S.I. μεγαλύτερο του 3 ακόμη και στη μεγαλύτερη συγκέντρωση πεπτιδίου, με μέγιστες τιμές 1.23 για τα BALB/c και 1.18 για τα CBA/J. Ο S.I. που προσδιορίστηκε για τα T λεμφοκύτταρα όλων των ποντικών για το πεπτιδίο μάρτυρα ήταν μικρότερος του 3 [*διαγράμματα 11*].

Στην περίπτωση του p2352, το S.I. των T λεμφοκυττάρων των ποντικών που δοκιμάστηκαν δεν ήταν μεγαλύτερο από 3 σε καμία συγκέντρωση αντιγόνου, με μέγιστες τιμές 1.45 για τα AKR/J, 0.55 για τα CBA/J και 1.04 για τα BALB/c. Ο S.I. που προσδιορίστηκε για τα T λεμφοκύτταρα όλων των ποντικών για το πεπτιδίο μάρτυρα ήταν μικρότερος του 3 [*διαγράμματα 12*].

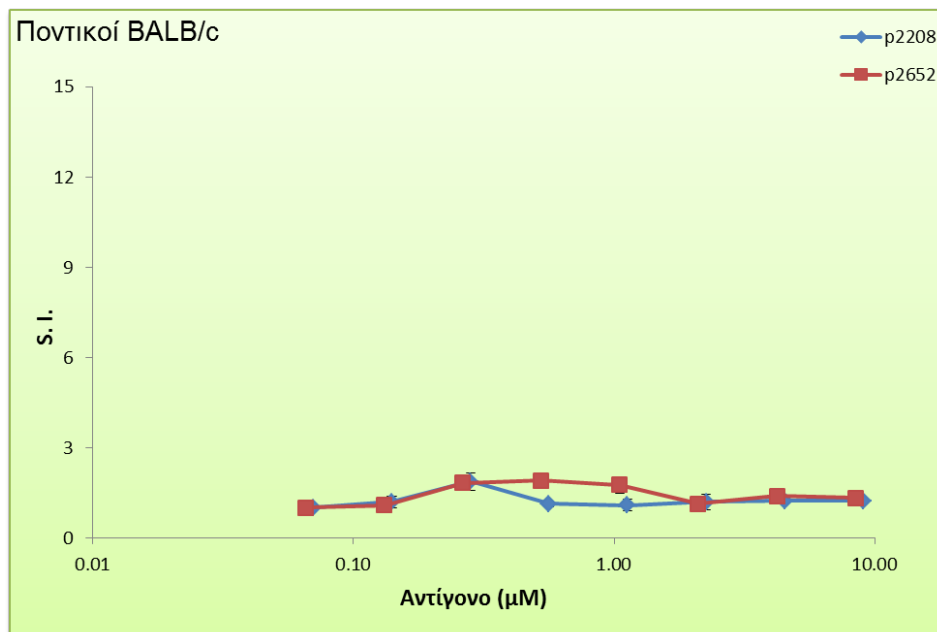
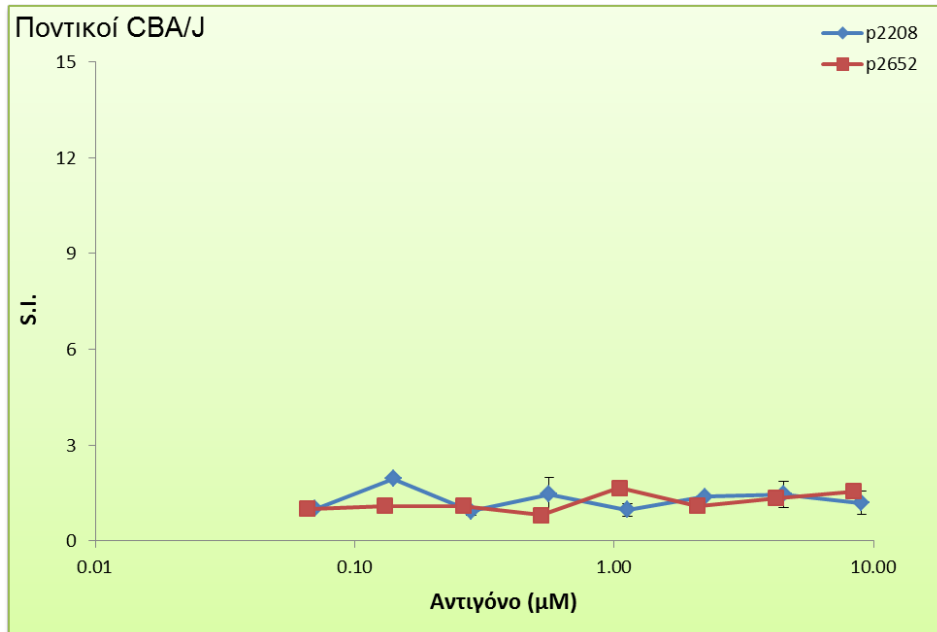
Από τα αποτελέσματα αυτά φάνηκε ότι ο S.I. και η συγκέντρωση ενός πεπτιδίου είναι μεγέθη ανάλογα, και πως στις τρεις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις οι τιμές του S.I. δε διαφέρουν αισθητά στις περισσότερες περιπτώσεις, διότι η ποσότητα του πεπτιδίου είναι μεγαλύτερη από την ποσότητα που μπορούν να παρουσιάσουν τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα.

Συνολικά συμπεραίνουμε ότι μόνο το πεπτιδίο p2208 είναι ανοσογονικό στους ποντικούς που δοκιμάστηκε και όχι το p2352, και μάλιστα είναι ικανό να επάγει

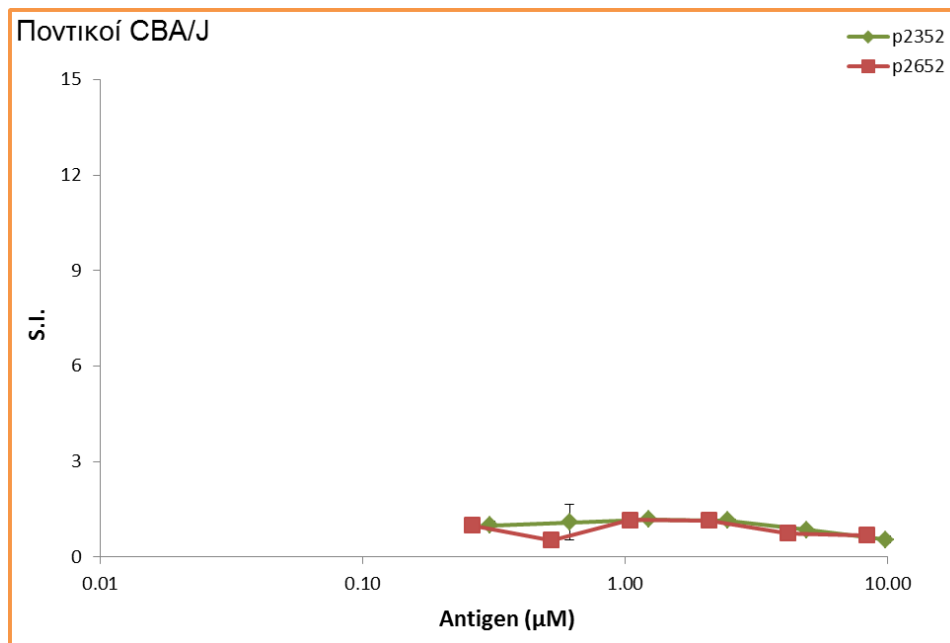
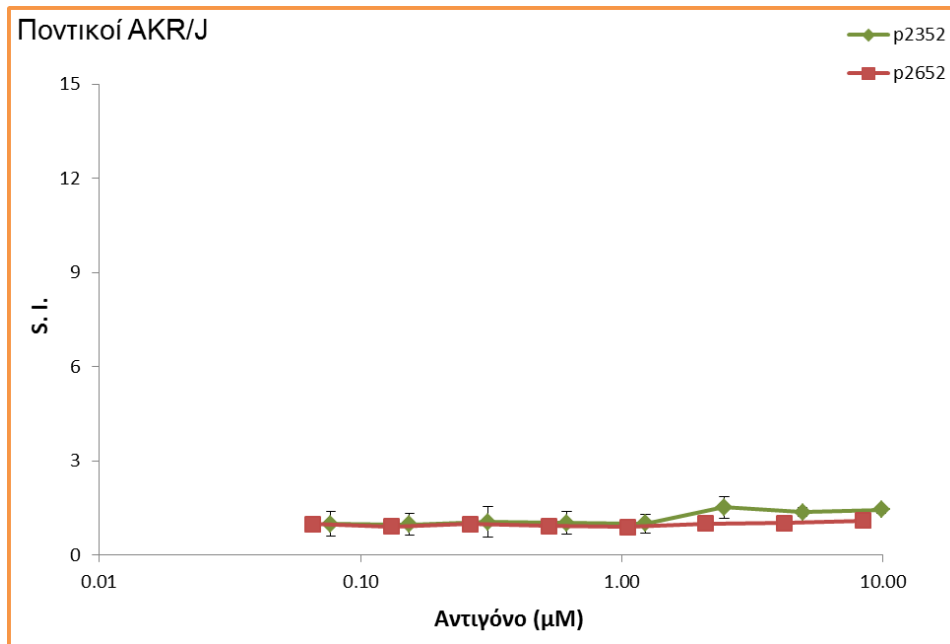
πολλαπλασιασμό ειδικών Τ-κυττάρων από ποντικούς που ανήκουν τόσο σε ευαίσθητα (SJL/J), όσο και σε ανθεκτικά στελέχη (C57BL/6).



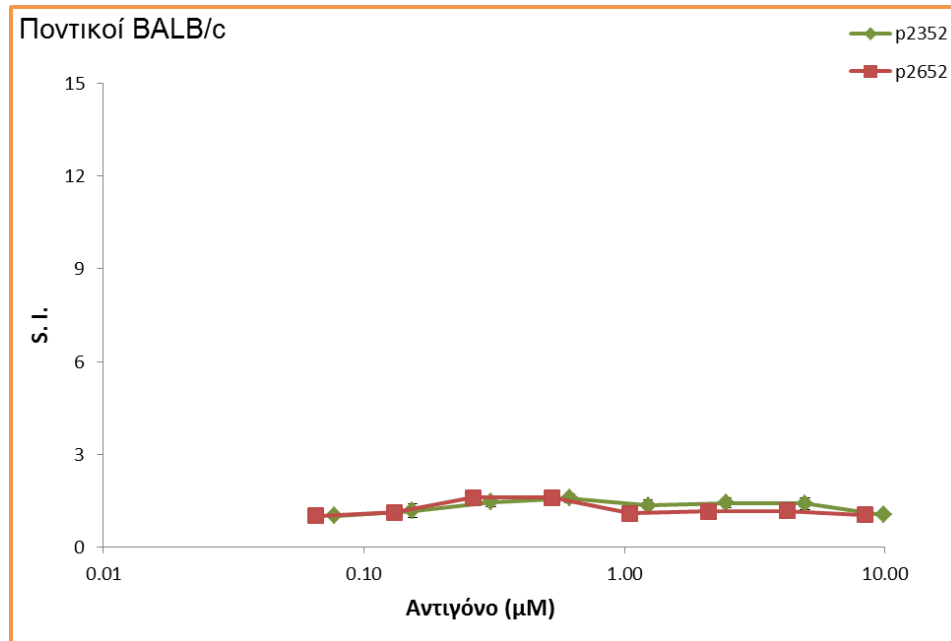
Διαγράμματα 11: ...συνέχεια στην επόμενη σελίδα



Διαγράμματα 11: Αξιολόγηση της ανοσογονικότητας του p2208 σε ποντικούς της φυλής SJL/J, C57BL/6, CBA/J και BALB/c. Οι ποντικοί ανοσοποιήθηκαν με το πεπτίδιο και κύτταρα από τους λεμφαδένες τους καλλιεργήθηκαν παρουσία διαδοχικών αραιώσεων 1:2 (0.012 - 9 μM) του p2208 (◆) και του πεπτιδίου μάρτυρα p2652 (■). Ο πολλαπλασιασμός των T λεμφοκυττάρων εκφράστηκε με το δείκτη πολλαπλασιασμού (Stimulation Index=S.I.) που υπολογίζεται από το κλάσμα κρούσεις ανά λεπτό παρουσία αντιγόνου / κρούσεις ανά λεπτό απουσία αντιγόνου. Τα T λεμφοκύτταρα που περιέχονται στους λεμφαδένες των ποντικών αναγνωρίζουν το πεπτίδιο στην καλλιέργεια όταν έχουν $S.I. \geq 3$. Κάθε διαδοχική αραιώση πεπτιδίου ελέγχθηκε τρεις φορές σε κάθε πείραμα και υπολογίστηκε ο μέσος όρος. Το πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές και παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα από ένα πείραμα.



Διαγράμματα 12: ...συνέχεια στην επόμενη σελίδα



Διαγράμματα 12: Αξιολόγηση της ανοσογονικότητας του p2352 σε ποντικούς της φυλής AKR/J, CBA/J και BALB/c. Οι ποντικοί ανοσοποιήθηκαν με το πεπτιδίιο και κύτταρα από τους λεμφαδένες τους καλλιεργήθηκαν παρουσία διαδοχικών αραιώσεων 1:2 (0.012 - 9 μM) του p2352 (◆) και του πεπτιδίου μάρτυρα p2652 (■). Ο πολλαπλασιασμός των T λεμφοκυττάρων εκφράστηκε με το δείκτη πολλαπλασιασμού (Stimulation Index=S.I.) που υπολογίζεται από το κλάσμα κρούσεις ανά λεπτό παρουσία αντιγόνου / κρούσεις ανά λεπτό απουσία αντιγόνου. Τα T λεμφοκύτταρα που περιέχονται στους λεμφαδένες των ποντικών αναγνωρίζουν το πεπτιδίιο στην καλλιέργεια όταν έχουν S.I. ≥ 3. Κάθε διαδοχική αραιώση πεπτιδίου ελέγχθηκε τρεις φορές σε κάθε πείραμα και υπολογίστηκε ο μέσος όρος. Το πείραμα επαναλήφθηκε δύο φορές και παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα από ένα πείραμα.

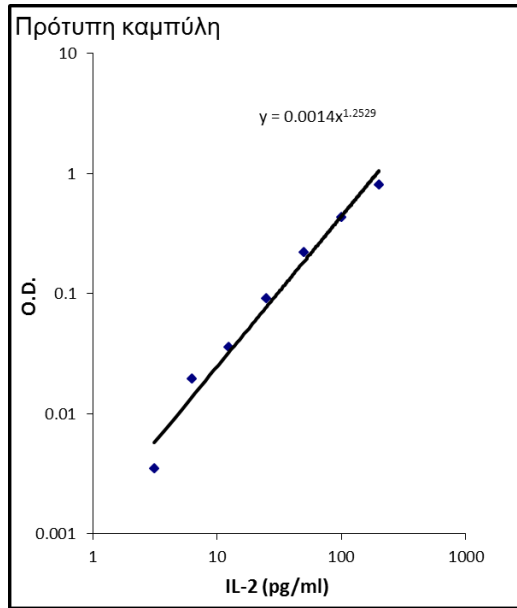
5.2 Μέτρηση κυτταροκινών σε υπερκείμενα T-λεμφοκυττάρων ειδικών για το πεππίδιο

Η διαπίστωση πως μόνο το πεππίδιο p2208 της Tg είναι ανοσογονικό σε T κυτταρικό επίπεδο στους ποντικούς των φυλών SJL/J και C57BL/6 μας ώθησε στον περαιτέρω έλεγχο του πεπτιδίου στις φυλές αυτές, ως προς την ικανότητά του να επάγει την παραγωγή κυτταροκινών σε υπερκείμενα T λεμφοκυττάρων ειδικών για το πεππίδιο. Με τον τρόπο αυτό θα μπορέσουμε να διαπιστώσουμε αν η ανοσολογική απόκριση που παρατηρείται κατά τη χορήγηση του p2208 στους ποντικούς είναι τύπου Th1- ή Th2.

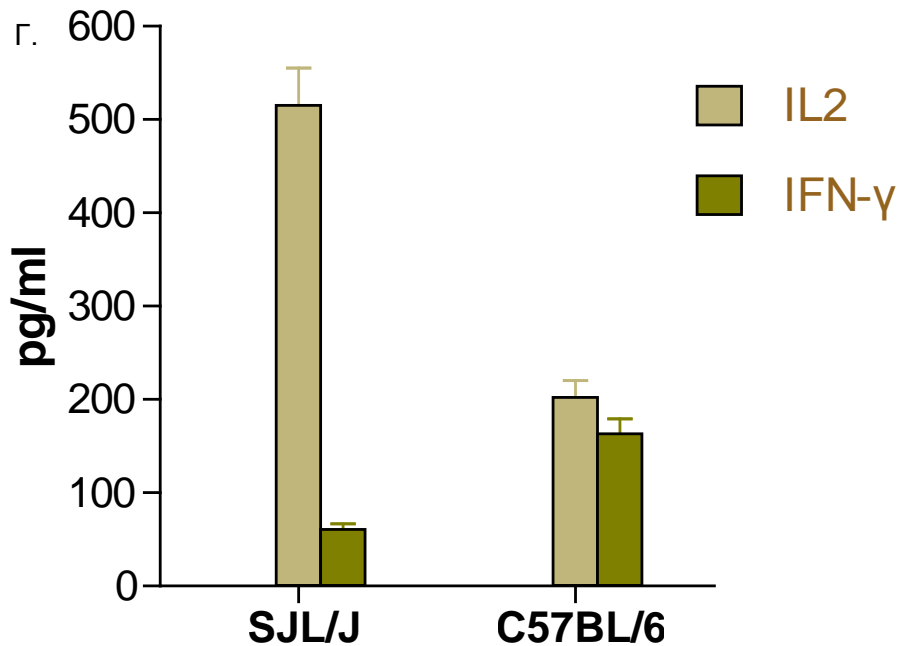
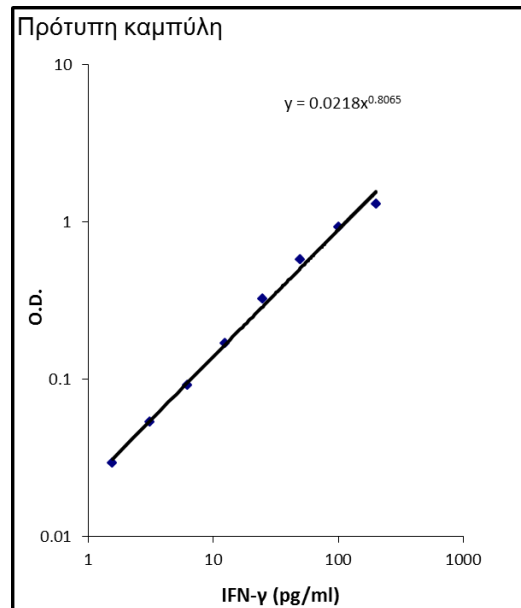
Για το λόγο αυτό προσδιορίστηκε η συγκέντρωση των κυτταροκινών IL-2, IL-4, IFN- γ και TNF- β στα υπερκείμενα καλλιέργειας των κυττάρων των λεμφαδένων ποντικών ανοσοποιημένων με το p2208, έπειτα από κατάλληλη αραίωση, παρουσία του ίδιου πεπτιδίου (9 μ M), του πεπτιδίου-μάρτυρα, ή απουσία αντιγόνου. Ο προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε με εμπορική ELISA με τη χρήση πρότυπης καμπύλης από τιμές γνωστών συγκεντρώσεων των παραπάνω κυτταροκινών. Σύμφωνα με τον κατασκευαστή, τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου κυμαίνονται σε 0.78-200 pg/ml για την IL-2, 1.9-500 pg/ml για την IL-4 και 7.8-2000 pg/ml για τις IFN- γ και TNF- β . Το πείραμα πραγματοποιήθηκε δυο φορές και κάθε δείγμα τοποθετήθηκε σε δυο διαφορετικά φρεάτια. Από τις μετρήσεις διαπιστώθηκε ότι τα T λεμφοκύτταρα των ποντικών που καλλιεργήθηκαν με το p2208 παρήγαγαν IL-2 και IFN- γ , και όχι IL-4 και TNF- β . Η παραγωγή αυτή των κυτταροκινών ήταν εξαιτίας της ειδικής αναγνώρισης του πεπτιδίου από τα T λεμφοκύτταρα, γιατί όταν στην καλλιέργεια υπήρχε το πεππίδιο-μάρτυρας ή κανένα αντιγόνο, δεν εκκρινόταν καμία κυτταροκίνη. Η υψηλότερη μέτρηση κυτταροκίνης ανιχνεύτηκε στα λεμφοκύτταρα των ποντικών SJL/J για την IL-2 στα 515 pg/ml υπερκειμένου καλλιέργειας παρουσία του p2208, ενώ η αντίστοιχη τιμή στα C57BL/6 ήταν 202 pg/ml. Ως προς την IFN- γ , στα υπερκείμενα των λεμφοκυττάρων των ποντικών SJL/J ανιχνεύτηκαν 61 pg/ml και στους C57BL/6 163 pg/ml [διαγράμματα 13].

Από τις κυτταροκίνες που εντοπίστηκαν συμπεραίνουμε πως τα ειδικά για το p2208 T λεμφοκύτταρα όλων των ποντικών της μελέτης ανήκουν στα Th1 T λεμφοκύτταρα.

A.



B.



Διαγράμματα 13: Τα επίπεδα των κυταροκινών IL-2 και IFN- γ (pg/ml) στο υπερκείμενο εναιωρήματος κυτάρων λεμφαδένων, *in vitro* ενεργοποιημένων με το p2208, παρουσία του αντίστοιχου πεπτιδίου. Γ) Πονικοί των φυλών SJL/J και C57BL/6 ανοσοποιήθηκαν με το πεπτίδιο (100nmol) και εναιώρημα κυτάρων από τους λεμφαδένες τους καλλιεργήθηκε παρουσία του πεπτιδίου ανοσοποίησης (9 μ M). Η συγκέντρωση κάθε δείγματος προσδιορίστηκε δυο φορές με βάση την πρότυπη καμπύλη (A. και B.) και παρουσιάζεται ο μέσος όρος καθώς και το τυπικό σφάλμα. Το πείραμα επαναλήφθηκε δυο φορές και παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα από ένα πείραμα.

5.3 Χαρακτηρισμός T-επιτόπου του πεπτιδίου p2208

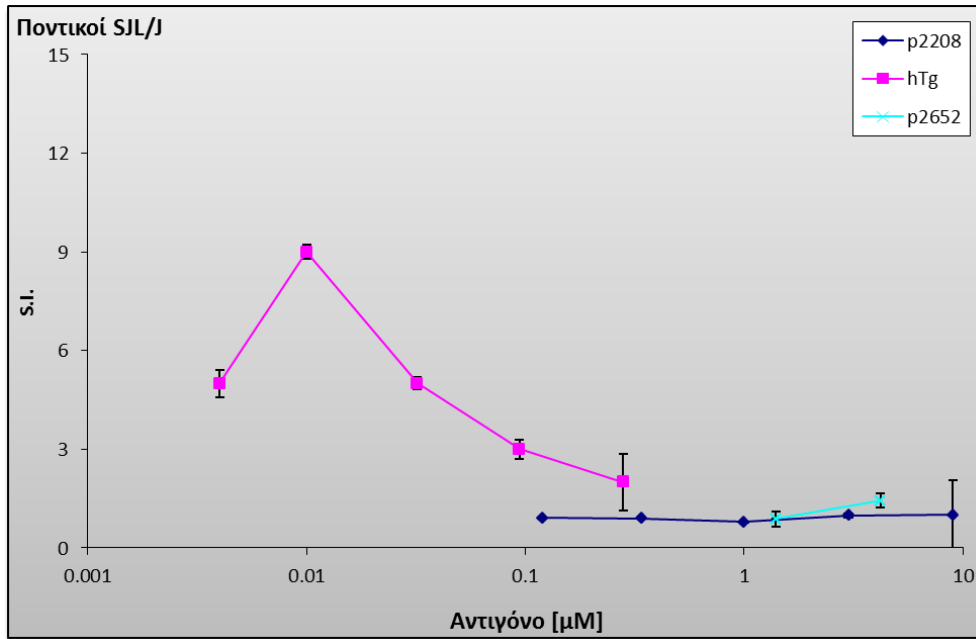
Έπειτα από τη διαπίστωση πως το p2208 περιέχει T-επίτοπο/ους που συνδέονται σε MHC μόρια τάξης II από ποντικούς των φυλών SJL/J και C57BL/6, ο/οι επίτοπος/οι του πεπτιδίου ελέγχθηκε αν είναι κρυπτικός/οί, ημι-επικρατής/είς ή επικρατής/είς.

Για να χαρακτηριστεί ο επίτοπος του p2208 καλλιεργήθηκαν κύτταρα των λεμφοδένων των ανοσοποιημένων με p2208 ποντικών παρουσία ολόκληρου του μορίου της Tg (0.004 - 0.28 μ M) καθώς και του πεπτιδίου-μάρτυρα (1.67 - 5 μ M), ή απουσία αντιγόνου και προσδιορίστηκε ο πολλαπλασιασμός των T λεμφοκυττάρων, όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο III.9. Διαπιστώθηκε πως τα ειδικά για το p2208 T λεμφοκύτταρα δεν πολλαπλασιάζονταν (S.I. \geq 3) παρουσία της Tg και συνεπώς το p2208 δε φέρει κάποιο επικρατή επίτοπο [διαγράμματα 14].

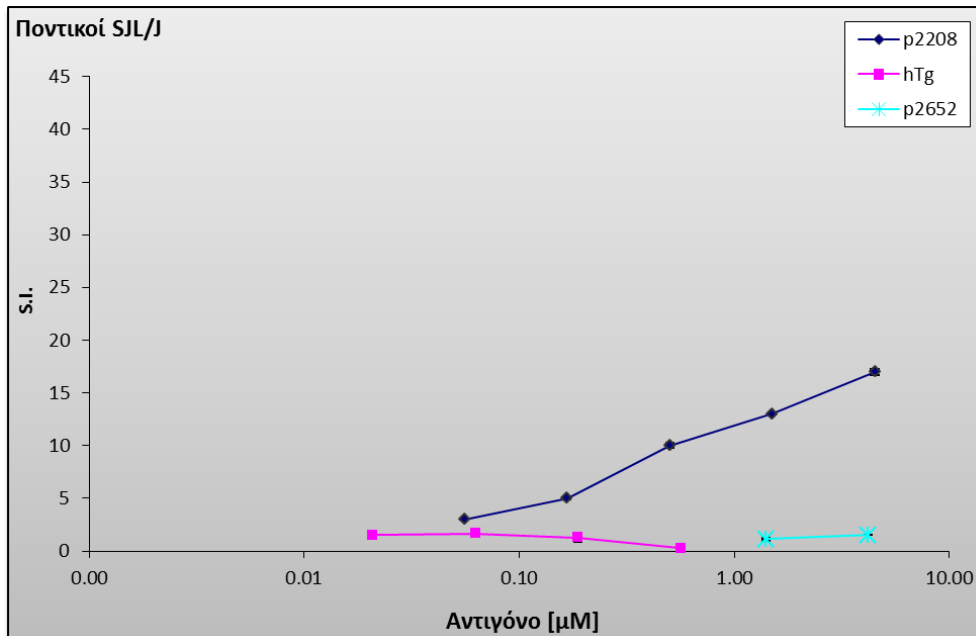
Στη συνέχεια η ίδια προσέγγιση εφαρμόστηκε έπειτα από ανοσοποίηση των παραπάνω ποντικών με ολόκληρο το μόριο της Tg και απομόνωση των λεμφοδένων τους έπειτα από 10 ημέρες. Τα κύτταρά τους καλλιεργήθηκαν παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του p2208 (0.12 - 9 μ M) καθώς και του πεπτιδίου-μάρτυρα (1.67 - 5 μ M), ή απουσία αντιγόνου. Όλα τα δείγματα προστέθηκαν σε μικροπλάκες κυτταροκαλλιέργειας σε 3 φρεάτια και προσδιορίστηκε ο πολλαπλασιασμός των T λεμφοκυττάρων τους και ο μέσος όρος του S.I. για την κάθε συγκέντρωση αντιγόνου. Και σε αυτήν την περίπτωση δεν ανιχνεύτηκε πολλαπλασιασμός των ειδικών T λεμφοκυττάρων (S.I. \geq 3) παρουσία του p2208, αλλά μόνο παρουσία του ομόλογου αντιγόνου ανοσοποίησης [διαγράμματα 14].

Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι το p2208 περιέχει κρυπτικό/ούς επίτοπο αφού δεν παρουσιάζεται/ονται μετά από *in vivo* και *in vitro* επεξεργασία της Tg από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, για τους ποντικούς SJL/J και C57BL/6.

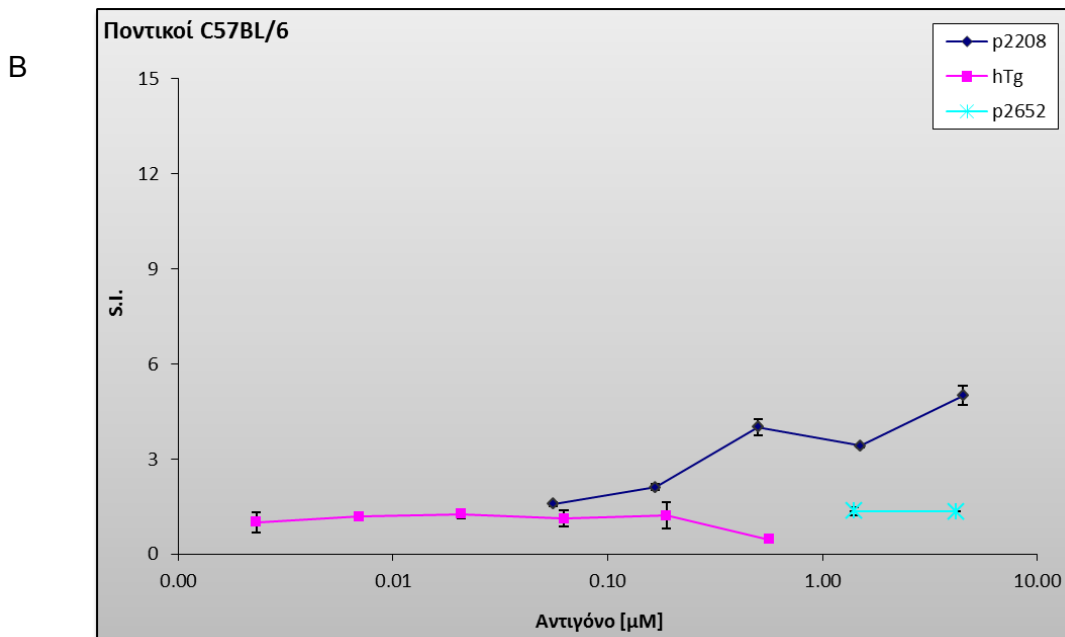
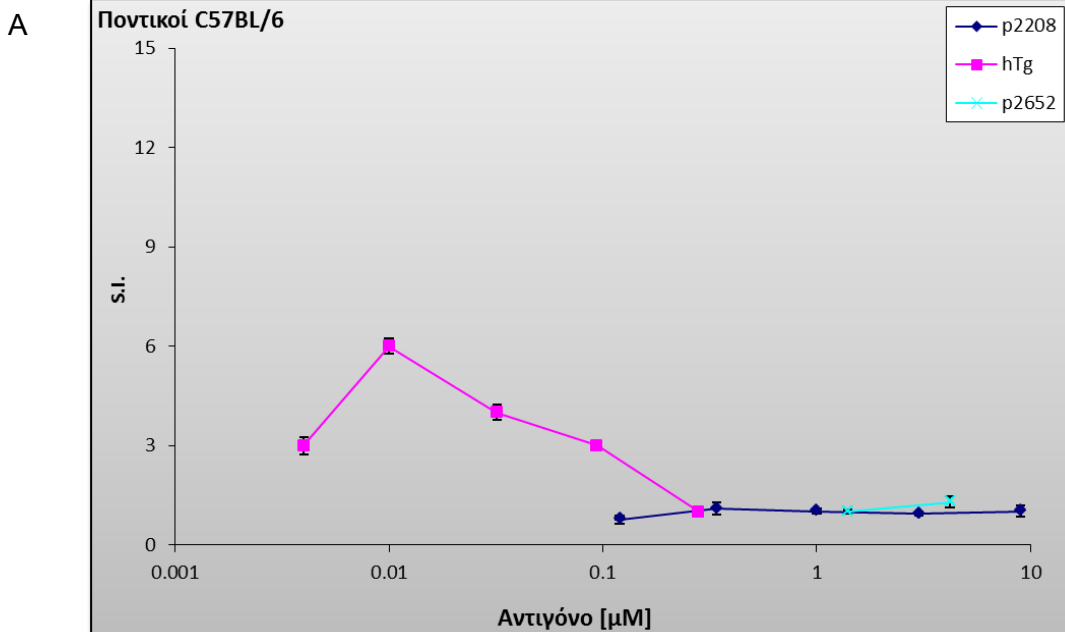
A



B



Διαγράμματα 14: ...συνέχεια στην επόμενη σελίδα



Διαγράμματα 14: Έλεγχος ανοσοεπικράτειας επιτόπου/ων του p2208. Ποντικοί των φυλών SJL/J και C57BL/6 ανοσοποιήθηκαν με A) ανθρώπινη Tg (75 μg) και B) p2208 (100 nMol). Κύτταρα των λεμφοκυττάρων τους καλλιεργήθηκαν παρουσία διαδοχικών αραιώσεων 1:3 του p2208 (\blacklozenge) (0.012 - 9 μM), της Tg (\blacksquare) (0.004 - 0.28 μM) και του πεπτιδίου μάρτυρα p2652 (\blacklozenge) (1.67 - 5 μM). Ο πολλαπλασιασμός των T λεμφοκυττάρων εκφράστηκε με το δείκτη πολλαπλασιασμού (Stimulation Index=S.I.) που υπολογίζεται από το κλάσμα κρούσεις ανά λεπτό παρουσία αντιγόνου / κρούσεις ανά λεπτό απουσία αντιγόνου. Τα T λεμφοκύτταρα που περιέχονται στους λεμφοαδένες των ποντικών αναγνωρίζουν το πεπτιδίριο στην καλλιέργεια όταν έχουν S.I. \geq 3. Κάθε διαδοχική αραιώση πεπτιδίου ελέγχθηκε τρεις φορές σε κάθε πείραμα και υπολογίστηκε ο μέσος όρος καθώς και το τυπικό σφάλμα. Το πείραμα επαναλήφθηκε δύο φορές και παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα από ένα πείραμα.

6. ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΑΘΟΓΟΝΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΠΕΠΤΙΔΙΟΥ p2208 ΣΕ ΕΥΑΙΣΘΗΤΕΣ ΚΑΙ ΑΝΘΕΚΤΙΚΕΣ ΦΥΛΕΣ ΠΟΝΤΙΚΩΝ

6.1 Προσδιορισμός βαθμού διήθησης του θυρεοειδή αδένα

Η διαπίστωση πως το p2208 ενεργοποιεί T λεμφοκύτταρα ποντικών από ευαίσθητες (SJL/J) αλλά και ανθεκτικές φυλές (C57BL/6) ποντικών μας οδήγησε στον έλεγχο της ικανότητας του πεπτιδίου να επάγει EAT στις φυλές αυτές. Σε αυτήν την περίπτωση το πεπτίδιο θα παρουσιαστεί από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και θα ενεργοποιήσει T λεμφοκυτταρικούς κλώνους που θα διηθήσουν το θυρεοειδή αδένα των ποντικών.

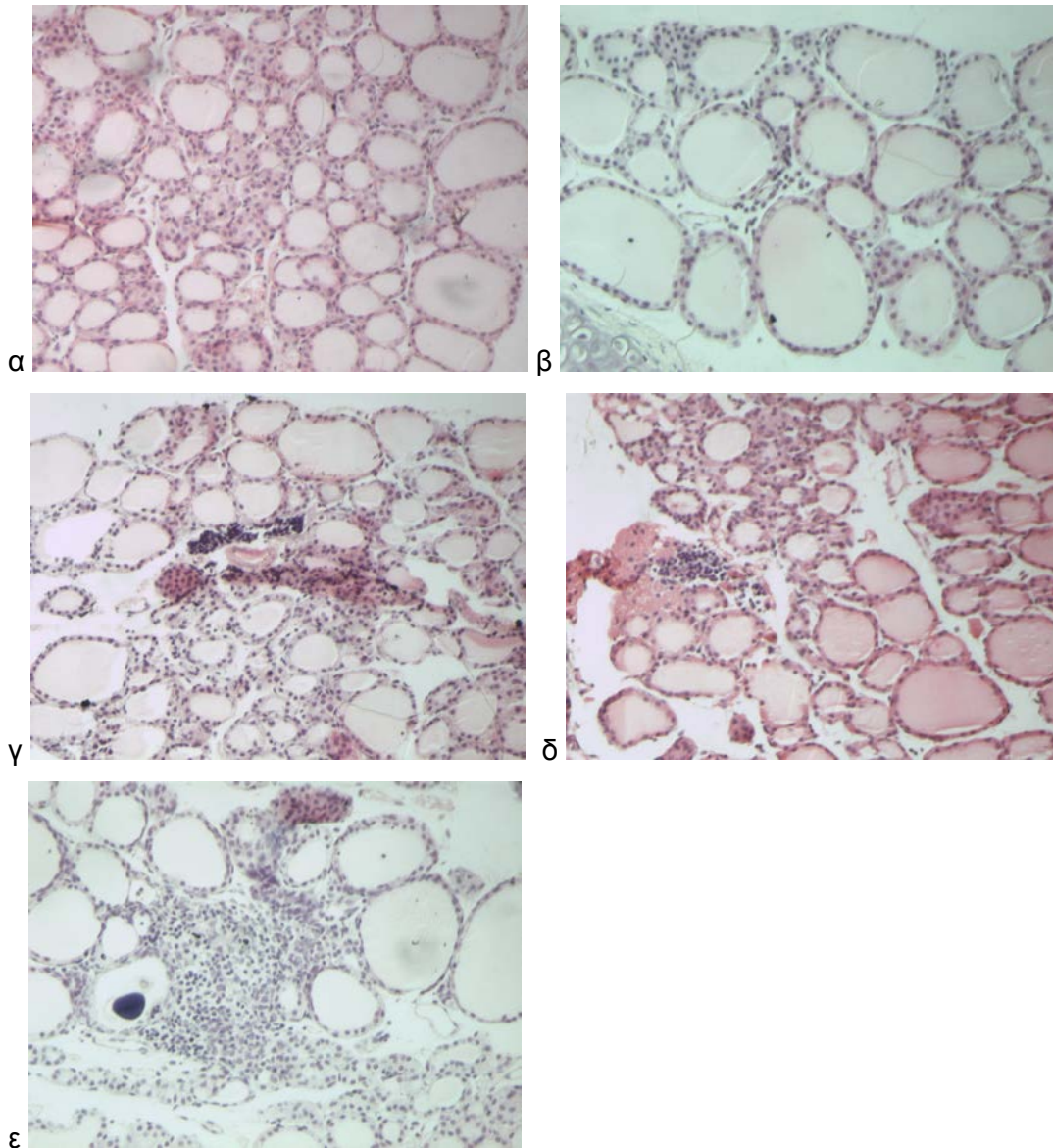
Το p2208 χορηγήθηκε υποδορίως παρουσία ανοσοενισχυτικού σε έξι ποντικούς SJL/J, επτά CBA/J, επτά C57BL/6 και επτά BALB/c. Τρεις εβδομάδες αργότερα πραγματοποιήθηκε αναμνηστική ανοσοποίηση και μετά από δύο εβδομάδες απομονώθηκαν οι θυρεοειδείς αδένες τους για ιστολογική εξέταση. Συνολικά, μελετήθηκαν περίπου 200 τομές/λοβό αδένα πάχους 4 μm . Από την παρατήρηση των τομών στο οπτικό μικροσκόπιο διαπιστώθηκε διήθηση του θυρεοειδή αδένα των ανοσοποιημένων με το p2208 ποντικών τόσο από ευαίσθητες, όσο και από ανθεκτικές φυλές. Πιο ειδικά, βρέθηκαν συσσωρευμένα μονοπύρρηνα κύτταρα σε δύο από τα έξι ευαίσθητα ως προς την εκδήλωση της EAT στελέχη SJL/J με μέγιστο βαθμό διήθησης 2, αλλά και σε δύο από τα επτά ανθεκτικά στελέχη C57BL/6 με μέγιστο βαθμό διήθησης 3 [εικόνες 10]. Στους αδένες των ευαίσθητων ποντικών CBA/J και των ανθεκτικών BALB/c δεν παρατηρήθηκε διήθηση. Ο μέσος όρος του βαθμού διήθησης των αδένων όλων των ποντικών SJL/J υπολογίστηκε στο 0.5, ενώ των C57BL/6 σε 0.57 [πίνακας 16].

Παράλληλα, πραγματοποιήθηκαν αντιπροσωπευτικές τομές από τον σπλήνα, το ήπαρ και το νεφρό των παραπάνω ποντικών, όμως δεν παρατηρήθηκε κάποια ιστολογική αλλοίωση σε κανένα ζώο.

Συμπεραίνεται, λοιπόν ότι το P2208 είναι ένα νέο παθογονικό πεπτίδιο της T α μόνο για τις φυλές SJL/J και C57BL/6. Μάλιστα είναι το πρώτο πεπτίδιο βιβλιογραφικά ικανό να επάγει EAT σε ανθεκτικές φυλές ποντικών με άμεση ανοσοποίηση.

Πίνακας 16: Προσδιορισμός βαθμού διήθησης θυρεοειδική αδένα. Ποντικοί των ευαίσθητων στελεχών SJL/J και CBA/J, αλλά και των ανθεκτικών C57BL/6 και BALB/c, ανοσοποιήθηκαν με το πεππίδιο p2208 και οι θυρεοειδής τους αδένες αφαιρέθηκαν για ιστολογική εξέταση σε φωτονικό μικροσκόπιο. Από κάθε αδένα εξετάστηκαν περίπου 300 τομές (4μm) και προσδιορίστηκε ο μέγιστος βαθμός της διήθησής του (Infiltration index = I.I.), ο μέσος όρος (M.O.) στο σύνολο των ζώων και η τυπική απόκλιση (standard deviation – SD).

Φυλή ποντικού	I.I.				M.O. ± SD	Ποντικοί με EAT
	0	1	2	3		
SJL/J	4	1	1	0	0.50 ± 0.84	2/6
CBA/J	7	0	0	0	0	0/7
C57BL/6	5	1	0	1	0.57 ± 1.13	2/7
BALB/c	7	0	0	0	0	0/7



Εικόνες 10: Ιστολογική αξιολόγηση των θυρεοειδών αδένων ποντικών ανοσοποιημένων με το p2208. Λήφθηκαν διαδοχικές τομές των 4 μm και εδώ απεικονίζονται χαρακτηριστικές τομές κάθε βαθμού διήθησης, σε μεγέθυνση 125x:

α) βαθμός διήθησης 0, φυσιολογική δομή αδένα

β) βαθμός διήθησης 1 σε ποντικό SJL/J, συσσώρευση μονοπύρηνων κυττάρων ανάμεσα σε ένα με δύο θυλάκια

γ) βαθμός διήθησης 1 σε ποντικό C57BL/6

δ) βαθμός διήθησης 2 σε ποντικό SJL/J, μια με δύο εστίες μονοπύρηνων κυττάρων με έκταση ίση ενός θυλακίου

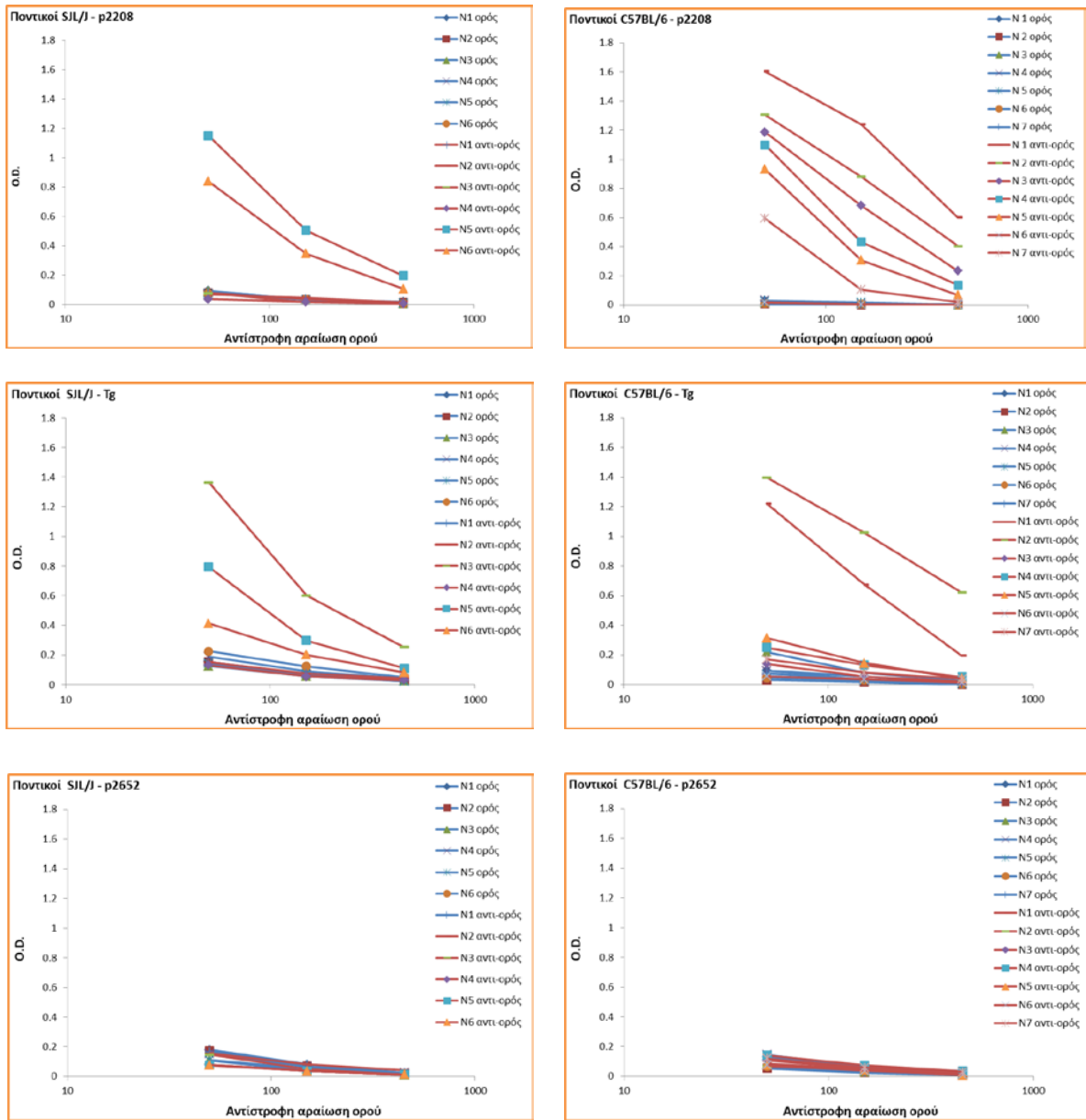
ε) βαθμός διήθησης 3 σε ποντικό C57BL/6, διήθηση που καλύπτει 10 - 40% της έκτασης της τομής

7. ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΟΡΩΝ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΠΟΝΤΙΚΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ΘΥΡΕΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΠΕΠΤΙΔΙΟΥ P2208

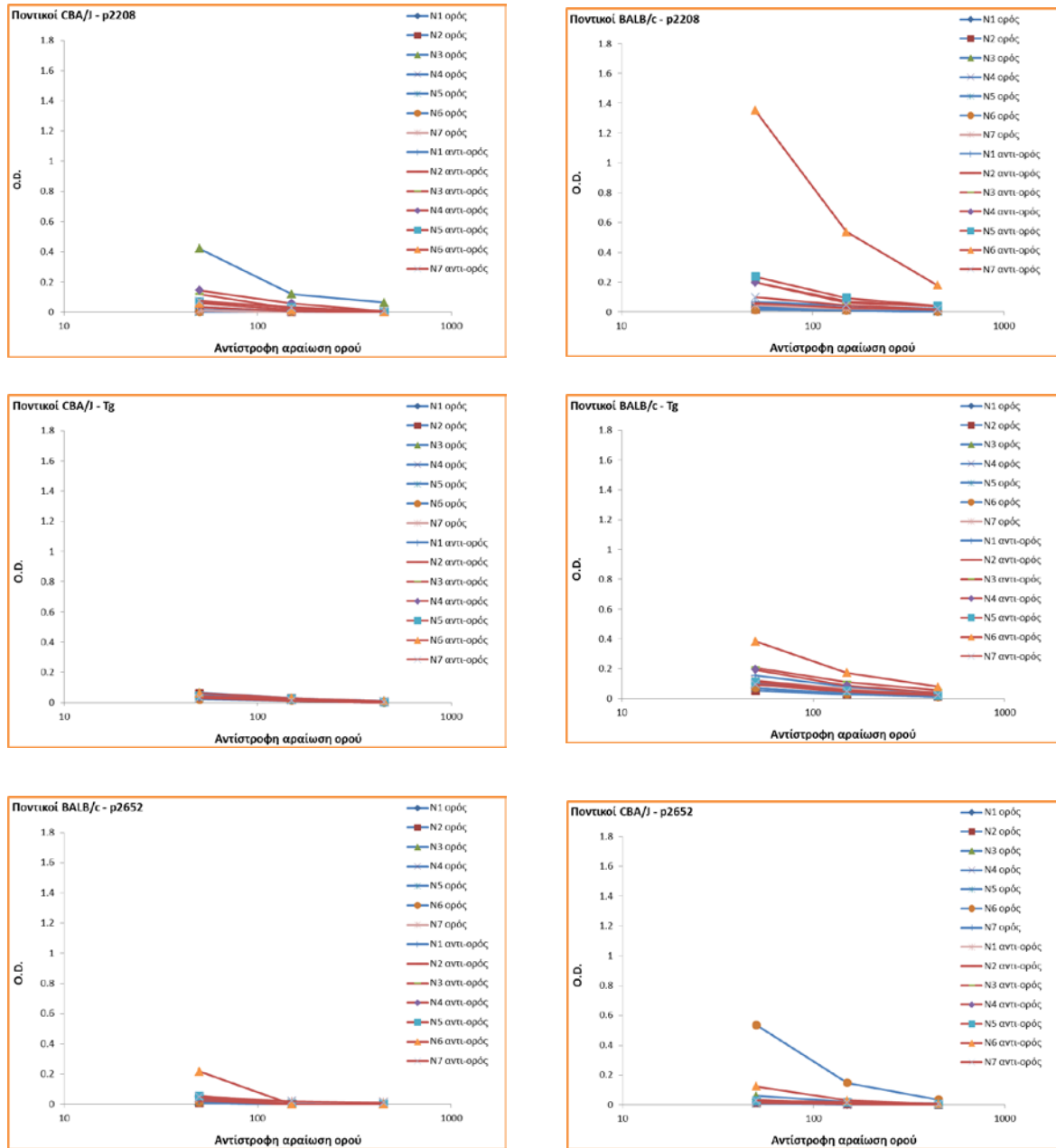
7.1 Έλεγχος δραστηριότητας των ολικών ορών ανοσοποιημένων ποντικών

Παράλληλα με τον έλεγχο της παθογονικότητας του p2208 να επάγει EAT σε ευαίσθητες (SJL/J, CBA/J) και ανθεκτικές φυλές (C57BL/6, BALB/c) ποντικών, εξετάστηκε και η ικανότητά του να επάγει την παραγωγή ειδικών για το πεπτιδίο αντισωμάτων. Πιο αναλυτικά, στα πειραματόζωα που επιλέχθηκαν για έλεγχο παθογονικότητας απομονώθηκε ορός τόσο πριν την έναρξη του πειράματος, όσο και κατά τη λήξη του πειράματος, πέντε εβδομάδες μετά την αρχική ανοσοποίηση. Οι οροί αυτοί ελέγχθηκαν με ELISA σε διαδοχικές αραιώσεις (1:50 – 1:450) ως προς την περιεκτικότητά τους σε αντισώματα τάξης G έναντι του p2208, του πεπτιδίου-μάρτυρα, καθώς και ολόκληρου του μορίου της Tg.

Βρέθηκε πως τα αντισώματα τάξης G των αντι-ορών ποντικών από τις φυλές SJL/J και C57BL/6 που είχαν ανοσοποιηθεί με το p2208 αναγνώριζαν τόσο το p2208, όσο και ολόκληρο το μόριο της Tg. Πιο ειδικά, δύο από τους έξι ποντικούς της φυλής SJL/J, έξι από τους επτά ποντικούς της φυλής C57BL/6 και ένας από τους επτά ποντικούς της φυλής BALB/c περιείχαν στον ορό τους ειδικά για το p2208 αντισώματα. Στην περίπτωση των SJL/J, ένας από τους δύο θετικούς αντι-ορούς και ένας αρνητικός αντι-ορός αντιδρούσαν με ολόκληρη την Tg, ενώ στην περίπτωση των C57BL/6, δύο από τους έξι αντι-p2208 ορών παρουσίαζαν παρόμοια αντι-Tg δραστηριότητα. Τέλος, κανένας αντι-ορός δεν αναγνώριζε το πεπτιδίο μάρτυρα, και συνεπώς τα αντισώματα που περιέχονται στους παραπάνω αντι-ορούς και αναγνωρίζουν το p2208 είναι ειδικά για το πεπτιδίο αυτό και μάλιστα όσο μειώνεται η συγκέντρωσή τους τόσο μειώνεται και η O.D. στα 405 nm. Οι οροί των ποντικών πριν την ανοσοποίηση δεν περιείχαν τέτοια αντισώματα και συνεπώς το p2208 είναι ανοσογονικό και σε επίπεδο B-κυττάρων σε ποντικούς τόσο ευαίσθητων όσο και ανθεκτικών στελεχών [διαγράμματα 15].



Διαγράμματα 15: ...συνέχεια στην επόμενη σελίδα

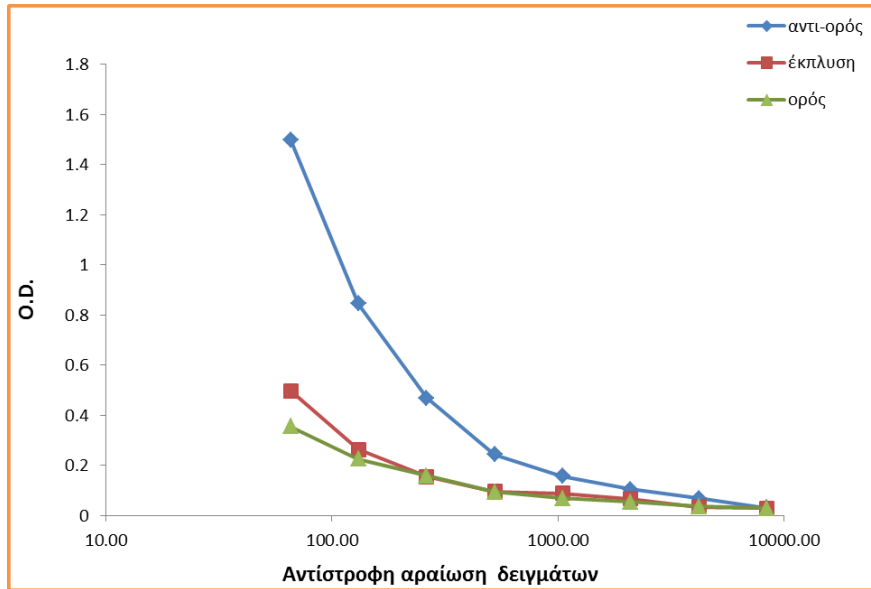


Διαγράμματα 15: Δραστικότητα ορών (μπλε γραμμή) και αντι-ορών (κόκκινη γραμμή) ποντικών ευαίσθητων (6 SJL/J, 7 CBA/J) και ανθεκτικών (7 C57BL/7, 7 BALB/c) στελεχών, ανοσοποιημένων με το p2208. Οι οροί και οι αντι-οροί επωάστηκαν σε διαδοχικές αραιώσεις 1:3 (1:50 – 1:450) και ελέγχθηκε η δραστικότητά τους έναντι του πεπτιδίου ανοσοποίησης, της Tg και του πεπτιδίου μάρτυρα p2652. Όλα τα δείγματα δοκιμάστηκαν δύο φορές σε κάθε πείραμα και η διαδικασία επαναλήφθηκε δυο φορές. Τα παραπάνω διαγράμματα είναι αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα από ένα πείραμα.

7.2 Έλεγχος για ενδομοριακή επέκταση επιτόπων μέσω της ανοσοποίησης με το πεπτίδιο p2208

Κατά τον έλεγχο της δραστικότητας των αντι-ορών από ποντικούς ανοσοποιημένους με το p2208 εντοπίστηκαν αντισώματα ικανά να αναγνωρίζουν τόσο το αυτόλογο αντιγόνο ανοσοποίησης, όσο και ολόκληρο το μόριο της Tg. Από την παρατήρηση αυτή δεν ήταν ξεκάθαρο κατά πόσο η δραστικότητα αυτή οφείλεται στον ίδιο πληθυσμό αντισωμάτων, ή το p2208 επάγει την παραγωγή και άλλων αντισωμάτων ειδικά για την Tg, δηλαδή την ενδομοριακή επέκταση επιτόπων. Για το λόγο αυτό κατασκευάστηκε ανοσοπροσοροφητής με τη χρήση σφαιριδίων πολυακρυλαμιδίου αγαρόζης 3.4, στα οποία προσδέθηκε το πεπτίδιο. Από τα συνολικά 800 µg πεπτιδίου που επώαστηκαν με τα σφαιρίδια, προδέθηκαν τα 451 µg σε 1 ml τελικού όγκου σφαιριδίων. Ο ανοσοπροσοροφητής αυτός χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση των αντι-p2208 αντισωμάτων, από τους ορούς τεσσάρων ποντικών C57BL/6 που είχαν ανοσοποιηθεί με το πεπτίδιο για τον έλεγχο της παθογονικότητάς του, και παρουσίαζαν υψηλό τίτλο αντι-p2208 αντισωμάτων. Για να εξασφαλίσουμε τη μέγιστη δυνατή πρόσδεση αντι-p2208 αντισωμάτων, κάθε διάλυμα έκπλυσης επώαστηκε συνολικά τέσσερις φορές στον ανοσοπροσοροφητή και τα τέσσερα κλάσματα έκλουσης και έκπλυσης που προέκυψαν συμπυκνώθηκαν σε πολύ μικρό όγκο.

Από το 1 ml ανοσοπροσοροφητή και 300 µl δείγματος ορών απομονώθηκαν 100 ng αντι-p2208 αντισωμάτων. Ο έλεγχος με ELISA των απομονωμένων αντισωμάτων αλλά και του υπόλοιπου κλάσματος του ορού έγινε με διαδοχικές αραιώσεις (1/50 – 1/450) των δειγμάτων και βρέθηκε πως τα αντι-p2208 αντισώματα αναγνώριζαν τόσο το ίδιο το πεπτίδιο ανοσοποίησης, όσο και ολόκληρο το μόριο της Tg. Μάλιστα, η αφαίρεση των αντι-p2208 αντισωμάτων είχε ως αποτέλεσμα και τη μείωση της δραστικότητας έναντι της Tg στα επίπεδα των μη-ανοσοποιημένων ποντικών, ένα εύρημα που μας οδήγησε στο συμπέρασμα πως η ανοσοποίηση με το p2208 δεν επάγει ενδομοριακή επέκταση επιτόπων, αλλά την παραγωγή αντισωμάτων που αναγνωρίζουν έναν επιφανειακό επίτοπο στο μόριο της Tg [διάγραμμα 16].



Διάγραμμα 16: Απομάκρυνση των ειδικών αντι-r2208 αντισωμάτων από τον ορό ανοσοποιημένων ποντικών με τη χρήση ανοσοπροσροφητή. Ο ολικός ορός από 4 C57BL/6 ποντικούς που είχαν ανοσοποιηθεί με το πεπτίδιο επωάστηκε με σήλη πολυακρυλαμιδίου αγαρόζης 3.4 που έφερε το r2208. Το κλάσμα της έκπλυσης που προέκυψε (απουσία αντι-r2208 αντισωμάτων) συγκρίθηκε με αυτό του ολικού και του αντι-ορού με ELISA.

V.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1. ΣΥΝΟΠΤΙΚΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Συνολικά, τα συμπεράσματα της παρούσας διατριβής μπορούν να συνοψιστούν ως εξής:

- Τα πεπτίδια p2208 και p2352 δεν έχουν διαγνωστική αξία στα θυρεοειδικά νοσήματα και σε επίπεδο ολικού ορού.
- Το πεπτίδιο p2208 είναι ανοσογονικό σε Β- και Τ-κυτταρικό επίπεδο σε ποντικούς τόσο ευαίσθητων όσο και ανθεκτικών ως προς την εκδήλωση της EAT στελεχών.
- Το πεπτίδιο p2208 είναι το μόνο γνωστό πεπτίδιο της Tg ικανό να επάγει άμεση EAT σε ποντικούς ευαίσθητων και ανθεκτικών στελεχών.
- Τα αντι-p2208 αντισώματα αναγνωρίζουν έναν επιφανειακό επίτοπο στο μόριο της Tg.

2. ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

2.1 Τα πεπτίδια p2208 και p2352 δεν αποτελούν διαγνωστικούς δείκτες των θυρεοειδικών νοσημάτων

Τα πεπτίδια p2208 και p2352 της ανθρώπινης Tg επιλέχθηκαν με σκοπό το διαχωρισμό μεταξύ των δύο κύριων θυρεοειδικών νοσημάτων. Αρχικά ελέγχθηκε η δραστικότητα των ολικών ορών έναντι κάθε πεπτιδίου της μελέτης ξεχωριστά, αλλά και έναντι συνδυασμού αυτών στο ίδιο φρεάτιο της μικροπλάκας ELISA. Η δραστικότητα των ορών συγκρίθηκε με αυτή των απομονωμένων τους αντισωμάτων τάξης G. Στο έλεγχο δραστικότητας συμπεριλήφθηκε και ένα ακόμη πεπτίδιο, το p2472, που είχε περιγραφεί σε παλαιότερη μελέτη του Εργαστηρίου Ανοσολογίας.

Βρέθηκε πως τα πεπτίδια αναγνωρίζονταν από την πλειοψηφία των ολικών ορών που εξετάστηκαν, μην επιτρέποντας έτσι το διαχωρισμό μεταξύ των δύο νοσημάτων, HT και GD [πίνακας 17A]. Όταν όμως όλα τα πεπτίδια ελέγχθηκαν μαζί, μόνο το 57% των ορών από ασθενείς με HT και το 25% από ασθενείς με GD τα αναγνώριζαν, δίχως κάποια σαφή ένδειξη προτίμησης. Η απομόνωση των αντισωμάτων τάξης G και ο έλεγχός τους είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της δραστικότητας για τους μεν ορούς από ασθενείς με HT στο 71%, και για αυτούς από ασθενείς με GD στο 100% [πίνακας 17B]. Μόνο στην περίπτωση της GD κρίθηκε η αύξηση αυτή στη δραστικότητα στατιστικά σημαντική. Αντίστοιχη διαφοροποίηση παρατηρήθηκε και στη σύγκριση της δραστικότητας μεταξύ των IgG κλασμάτων από ασθενείς με HT και GD, και όχι των ολικών τους ορών, έναντι του μίγματος των πεπτιδίων.

Πίνακας 17: Έλεγχος δραστηριότητας ορών από ασθενείς με HT ή GD έναντι πεπτιδίων της Tg. Η σύγκριση των ποσοστών έγινε με χρήση της δοκιμασίας Mann-Whitney. Μ.Σ.Δ.=μη σημαντική διαφορά, Σ.Δ.=σημαντική διαφορά. Α) Ολικοί οροί ελέγχθηκαν έναντι ενός πεπτιδίου τη φορά, Β) Όλα τα πεπτίδια επιστρώθηκαν στο ίδιο φρεάτιο της μικροπλάκας ELISA και ελέγχθηκε ο ολικός ορός και οι απομονωμένες IgG του.

Α	Ολικός ορός		Στατιστική ανάλυση
	HT (%)	GD (%)	HT-GD
p2208	91	93	Μ.Σ.Δ.
p2352	91	74	Μ.Σ.Δ.
p2472	85	89	Μ.Σ.Δ.

Β	HT		GD		Σύγκριση μεταξύ νοσημάτων	
	Ολικός ορός (%)	Κλάσμα IgG (%)	Ολικός ορός (%)	Κλάσμα IgG (%)	HT-GD ορός	HT-GD IgG
Συνδυασμός τριών πεπτιδίων	57	71	25	100	P>0.05	P<0.05
Σύγκριση ομάδων	P>0.05 Μ.Σ.Δ.		P<0.05 Σ.Δ.		Μ.Σ.Δ.	Σ.Δ.

Συμπεράσματα

Η χρήση των πεπτιδίων της Tg, p2208, p2352 και p2472 της παρούσας μελέτης, για το διαχωρισμό μεταξύ των δύο κύριων θυρεοειδικών νοσημάτων, σε επίπεδο ολικών ορών, δεν είχε διαγνωστική αξία. Στην περίπτωση όμως των ορών από ασθενείς με GD, η απομόνωση και ο έλεγχος των IgG αντισωμάτων τους, σε συνδυασμό με τη χρήση μίγματος των πεπτιδίων, είχε ως αποτέλεσμα τόσο τη σημαντική αύξηση στην αναγνώριση ενός τουλάχιστον από τα πεπτίδια, όσο και το

διαχωρισμό μεταξύ των δύο θυρεοειδικών νοσημάτων. Αντίστοιχη αύξηση δραστηριότητας δεν παρατηρήθηκε στις IgG ορών από ασθενείς με HT.

Στο παρελθόν έχουν αναφερθεί και άλλα πεπτίδια με την ικανότητα διαχωρισμού μεταξύ των δύο θυρεοειδικών νοσημάτων, σε επίπεδο όμως ολικών ορών και συνεπώς με μεγαλύτερη διαγνωστική αξία. Σε μία τέτοια μελέτη, είχαν παρασκευαστεί σε προηγούμενη μελέτη του Εργαστηρίου Ανοσολογίας, με τη μέθοδο των ραβδίων, 48 αλληλεπικαλυπτόμενα 20μερή πεπτίδια της ανθρώπινης Tg που κάλυπταν την περιοχή 2172-2749 (καρβοξυ-τελικό άκρο). Τα πεπτίδια αυτά, αποτελούσαν στόχο αυτοαντισωμάτων από ασθενείς με GD, και μάλιστα τα p2340(2340-2359), p2472(2472-2791) και p2652(2652-2671) είχαν αυξημένη δραστηριότητα. Ένα από αυτά χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα μελέτη ως μάρτυρας. Τα τρία αυτά πεπτίδια ελέγχθηκαν έναντι μεγάλου αριθμού ορών από ασθενείς με HT και GD και βρέθηκε πως το μίγμα τους αναγνωριζόταν από στατιστικά σημαντικό ποσοστό ολικών ορών μόνο από ασθενείς με GD (57%), και όχι από ασθενείς με HT (22%), ή τους υγιείς μάρτυρες (9%) (238). Αντίστοιχες μελέτες έχουν καταλήξει σε διαφοροποίηση επιτόπων μεταξύ των δύο νοσημάτων, όμως μόνο με τη χρήση μεγάλων, πρωτεολυτικών θραυσμάτων της Tg (239;240). Η δραστηριότητα των απομονωμένων IgG αντισωμάτων έναντι του συνδυασμού των πεπτιδίων της μελέτης ήταν αυξημένη σε σχέση με την αντίστοιχη δραστηριότητα του ολικού ορού. Η παρατήρηση αυτή ενδεχομένως να οφείλεται στην ύπαρξη άλλων παραγόντων του ορού, όπως αντισώματα τάξης M, τα οποία είναι γνωστά για την ανασταλτική δράση τους συνδεδεμένα με τις IgG.

2.2 Το πεπτίδιο p2208 είναι ανοσογονικό σε T-κυτταρικό επίπεδο σε ποντικούς ευαίσθητων και ανθεκτικών στελεχών

Τα πεπτίδια p2208 και p2352 που προέκυψαν από την ανάλυση της αλληλουχίας σαράντα οκτώ 20-μερών πεπτιδίων της Tg από το καρβοξυ-τελικό τμήμα της, επιλέχθηκαν για τη μελέτη της ανοσογονικότητάς τους με τη βοήθεια αλγόριθμων, οι οποίοι προβλέπουν την πρόσδεση πεπτιδίων σε διαφορετικά μόρια του MHC. Βρέθηκε ότι και τα δύο πεπτίδια περιείχαν μοτίβα πρόσδεσης σε MHC μόρια με απλότυπο που προσδίδει ευαισθησία στην εκδήλωση της EAT. Πιο ειδικά, το p2208 πιθανά συνδέεται σε A^s και E^k μόρια που προσδίδουν ευαισθησία στην εκδήλωση EAT, αλλά και σε μόρια A^b, που προσδίδουν ανθεκτικότητα. Αντίστοιχα, το p2352 πιθανά να συνδέεται σε E^k μόρια. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά, επιλέχθηκαν για το πεπτίδιο p2208 τα ευαίσθητα στελέχη ποντικών SJL/J (εκφράζει τα μόρια A^s) και CBA/J (εκφράζει τα μόρια A^k και E^k), καθώς και τα ανθεκτικά στελέχη C57BL/6 (εκφράζει τα μόρια A^b). Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν και οι ανθεκτικοί ποντικοί BALB/c (εκφράζει τα μόρια A^d και E^d). Ως προς το πεπτίδιο p2352, η μελέτη ανοσογονικότητάς του διετελέστηκε στα ευαίσθητα στελέχη ποντικών AKR/J (εκφράζει τα μόρια A^k και E^k) και CBA/J. Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν και οι ανθεκτικοί ποντικοί BALB/c.

Το πεπτίδιο p2208 βρέθηκε ικανό να ενεργοποιεί τα T λεμφοκύτταρα μόνο των ποντικών SJL/J και C57BL/6, τα οποία παράγαγαν κυτταροκίνες τύπου Th1, που χαρακτηρίζουν την έναρξη της EAT. Ο/οι επίτοπος/οι που περιέχει το p2208 χαρακτηρίστηκε/αν ως κρυπτικός/οί για τους ποντικούς που δοκιμάστηκε. Από την άλλη, το πεπτίδιο p2352 δεν ήταν ανοσογονικό σε καμία από τις φυλές που δοκιμάστηκε [πίνακας 18].

Πίνακας 18: Η ανοσογονικότητα των πεπτιδίων p2208 και p2352.

p2208	Ευαίσθητα στέλεχη		Ανθεκτικά στελέχη	
	SJL/J	CBA/J	C57BL/6	BALB/c
Ανοσογονικότητα (αλγόριθμοι)	+	+	+	-
Ανοσογονικότητα (<i>in vivo</i>)	+	-	+	-
Τύπος Τ-λεμφοκυττάρων	Th1	Δ.Π. ¹	Th1	Δ.Π.
Χαρακτηρισμός επιτόπου	κρυπτικός	κρυπτικός	κρυπτικός	κρυπτικός
p2352	Ευαίσθητα στέλεχη		Ανθεκτικά στελέχη	
	AKR/J	CBA/J	BALB/c	
Ανοσογονικότητα (αλγόριθμοι)	+	+	-	
Ανοσογονικότητα (<i>in vivo</i>)	-	-	-	
Τύπος Τ-λεμφοκυττάρων	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	
Χαρακτηρισμός επιτόπου	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	

1: Δ.Π. = δεν προσδιορίστηκε

Συμπεράσματα

Η αλγόριθμοι που εφαρμόστηκαν στη μελέτη αυτή προέβλεψαν την πρόσδεση του p2208 σε μόρια A^s των ποντικών SJL/J, E^k των ποντικών CBA/J και A^b των ποντικών C57BL/6. Παρόλ'αυτά το πεπτίδιο δεν ήταν ανοσογονικό στους ποντικούς της φυλής CBA/J, μίας ευαίσθητης φυλής ως προς την εκδήλωση της EAT. Ομοίως, το πεπτίδιο p2352 που σύμφωνα με τους αλγόριθμους πιθανά να συνδέεται σε μόρια E^k, δεν ήταν ανοσογονικό σε καμία από τις φυλές ποντικών που δοκιμάστηκε.

Μέχρι σήμερα, η πλειοψηφία των πεπτιδίων της Tg που έχουν χαρακτηριστεί ως ανοσογονικά έχουν προκύψει από τη χρήση αλγόριθμων που προβλέπουν την πρόσδεση σε MHC II μόρια, με εξαίρεση πέντε πεπτίδια που επιλέχθηκαν είτε λόγω της μεγάλης ομολογίας τους με την TPO (197;205;211), είτε ως προϊόντα οξειδωτικής (218) ή πρωτεολυτικής (212) διάσπασης της Tg. Η συνεισφορά τέτοιων «εργαλείων» ανάλυσης για τον εντοπισμό ανοσογονικών πεπτιδίων είναι καθοριστικής σημασίας. Στην περίπτωση όμως μεγάλων μορίων όπως η Tg, οι πιθανοί επίτοποι που μπορεί να προκύπτουν από την επεξεργασία της ενδεχομένως να είναι πολυάριθμοι και συνεπώς μία ανάλυση της αλληλουχίας της που βασίζεται σε μοτίβα MHC-πρόσδεσης ενδεχομένως να είναι καταλληλότερη για τον αποκλεισμό πεπτιδίων, παρά για την επιλογή τους. Στο παρελθόν, έχουν βρεθεί ανοσογονικά πεπτίδια της Tg που οι αλγόριθμοι δεν προέβλεπαν τη σύνδεσή τους σε ένα μόριο MHC. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το πεπτίδιο p2340, από προηγούμενη μελέτη του Εργαστηρίου Ανοσολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ, που ενώ δεν περιείχε μοτίβο πρόσδεσης σε μόρια A^s, ήταν ανοσογονικό και παθογονικό στη φυλή SJL/J που τα φέρει (216). Η προγνωστική αξία των αλγόριθμων είναι αδιαμφισβήτητη, όμως δεν αποτελούν το γενικό κανόνα επιλογής πεπτιδίων.

Παρόλο που το πεπτίδιο p2208 ανήκει στην ανθρώπινη Tg αναγνωρίζεται από τα T λεμφοκύτταρα των ποντικών της μελέτης. Αυτό υποδηλώνει πως τα αμινοξέα που διαφέρουν μεταξύ του p2208 και του αντίστοιχου αναλόγου του ποντικού δεν είναι σημαντικά στην πρόσδεσή του στα MHC μόρια και στην αναγνώρισή του από τα T λεμφοκύτταρα.

Ο/οι T-επίτοπος/οι που περιέχει το πεπτίδιο p2208 βρέθηκε να είναι κρυπτικός/οι για τους ποντικούς SJL/J, CBA/J, C57BL/6 και BALB/c, ενώ παρουσιάζεται από τα μόρια του MHC στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων των παραπάνω ποντικών τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*. Τα περισσότερα γνωστά ανοσογονικά πεπτίδια για τα αμιγή στελέχη ποντικών που έχουν περιγραφεί μέχρι σήμερα περιέχουν κρυπτικούς επίτοπους (p306, p1579, p1826, p2102, TgP1, p2596) (207;226) και δεν έχει αναφερθεί κανένα επικρατές πεπτίδιο της Tg. Αντίθετα, έχουν βρεθεί πέντε ανοσογονικά πεπτίδια που περιέχουν ημι-επικρατή επίτοπο. Πιο ειδικά, ο επίτοπος των πεπτιδίων hT4(5)/hT0(5), hT4(2553), hT0(2553) και p2340 παρουσιάζεται μετά από *in vivo* επεξεργασία της Tg (197;205;216), ενώ ο επίτοπος του p179 παρουσιάζεται μόνο μετά από την *in vitro* επεξεργασία της (209). Όπως έχει περιγραφεί και για άλλα αντιγόνα, η *in vivo* επεξεργασία ενός μορίου ενδέχεται να διαφέρει από την *in vitro* επεξεργασία του, λόγω δράσης διαφορετικών πρωτεασών (241).

2.3 Το πεπτιδίιο p2208 είναι παθογονικό σε ποντικούς ευαίσθητων και ανθεκτικών στελεχών

Το πεπτιδίιο p2208 ήταν ικανό να επάγει άμεση EAT στα ευαίσθητα στελέχη ποντικών SJL/J και στα ανθεκτικά στελέχη C57BL/6. Αξιοσημείωτο είναι πως ο μέγιστος βαθμός διήθησης στα ανθεκτικά στελέχη ήταν μεγαλύτερος από αυτόν στα ευαίσθητα [πίνακας 19]. Το p2208 αποτελεί το πρώτο πεπτιδίιο της Tg που προκαλεί άμεση EAT σε ποντικούς τόσο ευαίσθητων όσο και ανθεκτικών στελεχών. Η παθογονικότητά του όμως δε διαφέρει μεταξύ των δύο στελεχών, αφού ο μέσος βαθμός διήθησης στο σύνολο των ποντικών κάθε ομάδας κυμάνθηκε από 0.50 έως 0.57.

Πίνακας 19: Αποτελέσματα παθογονικότητας πεπτιδίου p2208 σε ευαίσθητες και ανθεκτικές φυλές.

p2208	Ευαίσθητα στέλεχη		Ανθεκτικά στέλεχη	
	SJL/J	CBA/J	C57BL/6	BALB/c
Παθογονικότητα	+	-	+	-
Τρόπος επαγωγής	άμεση EAT	άμεση EAT	άμεση EAT	άμεση EAT
Μέγιστος βαθμός διήθησης	2	0	3	0
Μέσος όρος βαθμού διήθησης	0.50	0	0.57	0

Συμπεράσματα

Μέχρι σήμερα, έχουν περιγραφεί 22 παθογονικά πεπτιδία της Tg ικανά να επάγουν EAT, από τα συνολικά 75 που έχουν εξεταστεί. Και σε επίπεδο παθογονικότητας, τα περισσότερα πεπτιδία έχουν προκύψει από την εφαρμογή αλγόριθμων στην αλληλουχία της Tg, που προβλέπουν την πιθανή πρόσδεση σε MHC μόρια II ποντικού. Εξαιρέση αποτελούν τέσσερα πεπτιδία, τα hT4(5) και hT4(2553) που επιλέχθηκαν λόγω των ορμονογονικών περιοχών που περιέχουν (205) και τα p2369 και p2439, λόγω των θέσεων πρόσδεσης πρωτεολυτικών ενζύμων αλλά και μοτίβων πρόσδεσης σε E^k μόρια που περιέχουν (212). Από τα παραπάνω πεπτιδία, κανένα δεν επάγει άμεση EAT σε ανθεκτικά, αμιγή στελέχη ποντικών. Από την άλλη, σε προηγούμενη μελέτη του Εργαστηρίου Ανοσολογίας, βρέθηκε πως η παθητική μεταφορά *in vivo* και *in vitro* ενεργοποιημένων λεμφοκυττάρων με το πεπτιδίδιο p2340 είχε ως αποτέλεσμα τη διήθηση του θυρεοειδή αδένος ανθεκτικών ποντικών (216). Η καινοτομία του πεπτιδίου p2208 της παρούσας μελέτης έγκειται στην ικανότητα επαγωγής άμεσης EAT σε ευαίσθητα αλλά και ανθεκτικά στελέχη ποντικών.

Το p2208 ήταν παθογονικό στους ποντικούς SJL/J και C57BL/6 παρόλο που περιέχει κρυπτικό/ούς T-επίτοπο/ους. Το εύρημα αυτό έχει αναφερθεί και στο παρελθόν με τα πεπτιδία της Tg p1579, p1826, p2102, TgP1, p2340 και p2596, που ενώ περιέχουν κρυπτικό επίτοπο είναι παθογονικά (207;216;226). Οι παραπάνω παρατηρήσεις οδηγούν στο συμπέρασμα πως πεπτιδία της Tg που ενώ δεν προκύπτουν μετά από επεξεργασία του μορίου της από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα των λεμφαδένων, παρουσιάζονται από αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα στο θυρεοειδή αδένος. Μία πιθανή εξήγηση αποτελεί η υπόθεση πως τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα από διαφορετικά όργανα ενδέχεται να περιέχουν διαφορετικές πρωτεάσες για την επεξεργασία των αντιγόνων και έτσι να παρουσιάζουν διαφορετικούς επίτοπους (242). Παράλληλα, η διαφορετική επεξεργασία της Tg μπορεί να οφείλεται και στη μεγάλη συγκέντρωσή της στο θυρεοειδή αδένος, γεγονός που επηρεάζει την αντιγονοπαρουσίασή της. Επίσης, στην περίπτωση της Tg η *in vivo* και *in vitro* επεξεργασία της μπορεί να διαφέρει, πράγμα που καθιστά την αναζήτηση επικρατών επιτόπων με τη χρήση των εφαρμοσμένων μεθόδων χαρακτηρισμού

αδύνατη. Σε κάθε περίπτωση, η αναζήτηση για επικρατή επίτοπο της Tg ενδέχεται να είναι ουτοπική, διότι το πολύ μεγάλο της μέγεθος μπορεί να ευθύνεται για την παραγωγή πληθώρας επιτόπων, οι οποίοι να παρουσιάζουν συνεργιστική δράση στην παθογένεια των αυτοάνοσων θυρεοειδικών νοσημάτων (207).

Όπως αναφέρθηκε και στο προηγούμενο κεφάλαιο, το γεγονός ότι ένα ανθρώπινο πεπτιδίο της Tg είναι παθογονικό στον ποντικό, υποδηλώνει ότι τα T λεμφοκύτταρα του ποντικού ενεργοποιούνται με το p2208 της ανθρώπινης Tg, αλλά στο θυρεοειδή αδένα αναγνωρίζουν το ανάλογο πεπτιδίο του ποντικού. Έτσι συμπεραίνουμε πως τα αμινοξέα που διαφέρουν μεταξύ των δύο πεπτιδίων δεν είναι σημαντικά για την παρουσίαση από τα μόρια του MHC των ποντικών, αλλά ούτε για την αναγνώριση του πεπτιδίου από τα T λεμφοκύτταρα. Παρόμοιο εύρημα έχει αναφερθεί και σε άλλες μελέτες, με το χαρακτηρισμό έξι παθογονικών πεπτιδίων της Tg. Πιο αναλυτικά, τέσσερα πεπτιδία ανήκουν στην ανθρώπινη Tg [hT4(5)/hT0(5), hT4(2553), p2340, hTg(2695-2713)] (205;216;224;243) και δύο στην Tg του αρουραίου (TgP1, TgP2) (224;226).

2.4 Το πεπτιδίιο p2208 επάγει την παραγωγή ειδικών αντισωμάτων σε ευαίσθητα και ανθεκτικά στελέχη ποντικών

Το πεπτιδίιο p2208 ήταν ικανό να επάγει την ενεργοποίηση Β λεμφοκυττάρων για την παραγωγή ειδικών αντισωμάτων στους ποντικούς τόσο των ευαίσθητων όσο και των ανθεκτικών στελεχών. Από τις φυλές που δοκιμάστηκαν, ειδικά αντι-p2208 αντισώματα ανιχνεύτηκαν μόνο στα στελέχη που εκδήλωσαν EAT, SJL/J και C57BL/6, με υψηλό τίτλο, ενώ οι αντίστοιχοι τίτλοι στους ποντικούς BALB/c ήταν πολύ χαμηλότεροι. Στους ποντικούς CBA/J δεν ανιχνεύτηκαν ειδικά αντισώματα. Αξίζει να σημειωθεί πως τη μεγαλύτερη συχνότητα παραγωγής αντι-p2208 αντισωμάτων παρουσίασαν τα ανθεκτικά στελέχη C57BL/6, με θετικά τα έξι από τα επτά ανοσοποιημένα ζώα.

Συμπεράσματα

Ο ρόλος των αντισωμάτων στην EAT φαίνεται να είναι δευτερεύων. Στις περισσότερες μελέτες που ανιχνεύονται ειδικά αντισώματα έναντι των πεπτιδίων ανοσοποίησης, δεν παρατηρείται συσχέτιση με τη βαρύτητα της νόσου. Από την άλλη, ένα παθογονικό πεπτιδίιο της Tg δε συνεπάγεται απαραίτητα την παραγωγή ειδικών αντισωμάτων έναντι αυτού. Έτσι τα πεπτιδία I-p304, p1579 και p1826, αν και είναι παθογονικά, δεν είναι ανοσογονικά σε Β-κυτταρικό επίπεδο (207;208).

Στα πρώτα στάδια της πειραματικής νόσου, τα επίπεδα των ειδικών αντισωμάτων έναντι ενός πεπτιδίου είναι χαμηλά, ενώ 5 εβδομάδες μετά την αρχική ανοσοποίηση βρίσκονται στα υψηλότερά τους επίπεδα. Η παρατήρηση αυτή δείχνει πως η δράση των αντισωμάτων στην EAT ασκείται στα τελευταία στάδια της νόσου.

2.5 Τα αντι-p2208 αντισώματα αναγνωρίζουν έναν επιφανειακό επίτοπο στο μόριο της Tg

Η ανοσοποίηση των ποντικών SJL/J και C57BL/6 είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή ειδικών αντισωμάτων έναντι του πεπτιδίου p2208 που αναγνώριζαν και ολόκληρο το μόριο της Tg. Ειδικά στην περίπτωση των αντι-ορών από ποντικούς C57BL/6, δύο από τους έξι θετικούς για το πεπτίδιο αντι-ορούς αναγνώριζαν και την Tg, ενώ αντίστοιχα στους SJL/J μόνο ένας από τους δύο θετικούς.

Με την απομάκρυνση των ειδικών αντι-p2208 αντισωμάτων από το ολικό ορό τεσσάρων ποντικών C57BL/6 παρατηρήθηκε δραστική πτώση στη δραστικότητα έναντι της Tg. Από το εύρημα αυτό γίνεται αντιληπτό πως για την αναγνώριση της Tg ευθύνονται τα ίδια αντισώματα.

Συμπεράσματα

Τα αντισώματα που παράγονται έναντι του p2208 αναγνωρίζουν ολόκληρο το μόριο της Tg του ανθρώπου. Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει είτε την ενδομοριακή επέκταση επιτόπων που το πεπτίδιο μπορεί να επάγει, είτε πως ο επίτοπός του εντοπίζεται στην επιφάνεια ολόκληρου του μορίου της Tg. Μέχρι σήμερα, από τα 22 παθογονικά πεπτίδια της Tg, μόνο πέντε αντιδρούν και με ολόκληρο το μόριό της, τα πεπτίδια I-p117, mTg/hTg179, TgP1, p2340, hT4(2553) (197;208;210;216;226). Σε κανένα από αυτά όμως δεν έχει διερευνηθεί αν η αντι-Tg δραστικότητα οφείλεται στα ειδικά για το πεπτίδιο αντισώματα ή είναι αποτέλεσμα ενδομοριακής επέκτασης επιτόπων.

Η χορήγηση σε πειραματόζωα ενός πεπτιδίου που αποτελεί τμήμα πρωτεΐνης μπορεί να προκαλέσει την παραγωγή αντισωμάτων τόσο έναντι του πεπτιδίου, όσο και έναντι άλλων περιοχών της ίδιας πρωτεΐνης (ενδομοριακή επέκταση), ή ακόμη και έναντι άλλης πρωτεΐνης (διαμοριακή επέκταση) (244;245). Στην περίπτωση της Tg, σε μία παλαιότερη μελέτη του Εργαστηρίου Ανοσολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ, βρέθηκε πως αντι-οροί από κουνέλια που είχαν ανοσοποιηθεί με το πεπτίδιο TgP41 (2651-2670) παρουσίαζαν δραστικότητα τόσο έναντι του πεπτιδίου, όσο και έναντι της Tg και της TPO. Η δραστικότητα έναντι της Tg, αλλά όχι της TPO, παρέμενε ακόμη και έπειτα από την απομάκρυνση των ειδικών αντι-

TgP41 αντισωμάτων και συνεπώς το πεπτιδίο αυτό επάγει την ενδομοριακή επέκταση επιτόπων. Από την άλλη, η ανοσοποίηση κουνελιών με το TgP41 δεν προκαλούσε EAT (238;246). Στην παρούσα μελέτη, η απομάκρυνση των ειδικών αντι-p2208 αντισωμάτων είχε ως αποτέλεσμα και την εξάλειψη της δραστικότητας έναντι της Tg. Συμπεραίνουμε λοιπόν πως ο επίτοπος του p2208 κατά πάσα πιθανότητα εντοπίζεται στην επιφάνεια της τεταρτοταγής δομής της Tg και έτσι είναι προσβάσιμος από τα ειδικά αντι-p2208 αντισώματα. Αυτό φάνηκε και από την *in silico* μελέτη του πεπτιδίου, όπου τα αμινο- και καρβόξυ-τελικά άκρα του εμφανίζουν αυξημένη προσβασιμότητα στο μόριο της Tg.

VI.

ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ

1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΕΛΛΗΝΙΚΗ

Στην παρούσα διατριβή εξετάστηκαν νέοι Β- και Τ- επίτοποι της θυρεοσφαιρίνης (Tg), του κύριου αυτοαντιγόνου στην αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα. Η Tg, λόγω του μεγάλου μεγέθους της, προσφέρεται για εκτενείς μελέτες εντοπισμού επιτόπων που αναγνωρίζονται από Β- και Τ-κύτταρα, αλλά αυτός είναι και ο κύριος λόγος που δυσχεραίνεται ο προσδιορισμός ανοσο-επικρατουσών περιοχών.

Β-επίτοποι: Κοινός παρονομαστής στις δύο κύριες αυτοάνοσες παθήσεις του θυρεοειδή αδένος [θυρεοειδίτιδα Hashimoto (Hashimoto's thyroiditis-HT) και νόσος Graves' (Graves' disease-GD)] είναι κυκλοφορούντα αντι-Tg αυτοαντισώματα, αξιόλογα στη διάγνωση, δίχως όμως κυρίαρχο παθογονικό ρόλο. Η συσχέτιση Β-επιτόπων της Tg και αυτοάνοσων θυρεοειδικών ασθενειών δεν έχει αποτελέσει συχνά αντικείμενο έρευνας. Σε παλαιότερη μελέτη του Εργαστηρίου Ανοσολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ, με βάση ένα πάνελ 48 αλληλεπικαλυπτόμενων συνθετικών πεπτιδίων (επικάλυψη 8 αμινοξέων) της καρβοξυ-τελικής περιοχής της Tg, είχαν χαρακτηριστεί 17 που αποτελούσαν στόχο αυτοαντισωμάτων από ασθενείς με GD. Τα τρία που αναγνωρίστηκαν πιο ισχυρά, μελετήθηκαν στη συνέχεια, αναμεμειγμένα ή μη, ως πιθανοί στόχοι και των αυτοαντισωμάτων από ασθενείς με HT, πράγμα που δεν επιβεβαιώθηκε.

Στο πρώτο μέρος της διατριβής διερευνήθηκαν νέα πεπτίδια-δείκτες της ανθρώπινης Tg, με σκοπό τον ορολογικό διαχωρισμό των δύο αυτοάνοσων θυρεοειδικών ασθενειών, και κυρίως για την επιλεκτική ορολογική διάγνωση της HT. Από το διαθέσιμο πάνελ των αντιγονικών πεπτιδίων του Εργαστηρίου επιλέχθηκαν προς μελέτη τρία νέα, το p2208(2208-2227), το p2352(2352-2371) και το p2472(2472-2491). Σε επίπεδο ολικού ορού βρέθηκε πως τα πεπτίδια της μελέτης αναγνωρίζονταν εξίσου από τους ορούς και των δύο ομάδων ασθενών. Μόνο όταν χρησιμοποιήθηκαν απομονωμένες ολικές IgG των ορών παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική ορολογική διαφοροποίηση των δύο κλινικών οντοτήτων, κυρίως όταν τα πεπτίδια χρησιμοποιούνται αναμεμειγμένα (71% HT και 100% GD, $p < 0.05$). Συμπερασματικά, η μελέτη καταδεικνύει την ακαταλληλότητα των εν λόγω πεπτιδίων στη διαγνωστική πρακτική της HT, όμως θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι ενδεχομένως τα αποτελέσματα έχουν επηρεαστεί από τον αρχικό τρόπο επιλογής τους, που βασίστηκε στην αναγνώρισή τους από τις IgG ασθενών με GD.

T-επίτοποι: Για την κατανόηση των παθογενετικών μηχανισμών που διέπουν τις αυτοάνοσες θυρεοειδικές ασθένειες, απαιτείται η δημιουργία κατάλληλων πειραματικών ζωικών προτύπων. Ειδικότερα για τη HT, το πρότυπο μελέτης είναι η πειραματική αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα (EAT), η οποία επάγεται στον ποντικό είτε άμεσα (ανοσοποίηση με Tg ή πεπτίδια αυτής παρουσία ανοσοενισχυτικού), είτε έμμεσα (παθητική μεταφορά *in vivo* και *in vitro* ενεργοποιημένων με Tg κυττάρων από λεμφοκύτταρα ποντικών). Η βαρύτητα εκδήλωσης της νόσου (διήθηση θυρεοειδή αδένων από μονοκύτταρα κύτταρα, παραγωγή ειδικών αντι-Tg αντισωμάτων) κατατάσσει τα ζώα σε ευαίσθητα (high responder-HR) και ανθεκτικά (low responder-LR), μία ιδιότητα που συνδέεται με τον απλότυπο των μορίων MHC τάξης II που φέρουν: H2^k, H2^q, H2^s για τα HR και H2^b, H2^d, H2^v για τα LR. Τα τελευταία 20 χρόνια, οι μελέτες γύρω από τους παθογενετικούς μηχανισμούς της EAT προέρχονται σχεδόν αποκλειστικά από τη χρήση στελεχών HR αγρίου τύπου ποντικών. Από τα 34 πεπτίδια που έχουν δοκιμαστεί στις φυλές αυτές, τα 17 είναι παθογονικά, ενώ από τα 10 πεπτίδια που έχουν δοκιμαστεί σε στελέχη LR αγρίου τύπου, μόνο ένα επάγει EAT, το 20μερές p2340 (2340-2359). Το πεπτίδιο αυτό χαρακτηρίστηκε, σε προηγούμενη μελέτη του Εργαστηρίου Ανοσολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ, ως παθογονικό στις φυλές LR ποντικών C57BL/6 (H-2^b) και BALB/c (H-2^d) μόνο μετά από παθητική μεταφορά *in vivo* και *in vitro* ενεργοποιημένων με το πεπτίδιο λεμφοκυττάρων ποντικών, ενώ στις φυλές HR SJL/J (H-2^s) και CBA/J (H-2^k) με άμεση ανοσοποίηση. Είναι λοιπόν προφανές, ότι η έλλειψη επαρκούς γνώσης σχετικά με παθογονικά πεπτίδια στις φυλές LR ποντικών δεν επιτρέπει τη σύγκριση και κατανόηση των μηχανισμών παθογένειας των δύο τύπων ποντικών.

Σκοπός του δεύτερου μέρους της διατριβής ήταν ο εντοπισμός νέων παθογονικών 20μερών πεπτιδίων της Tg με ικανότητα επαγωγής EAT σε LR φυλές. Με τη χρήση του διαθέσιμου πάνελ των 48 πεπτιδίων του Εργαστηρίου, εντοπίστηκαν δύο νέα πεπτίδια, το p2208 (2208-2227) και το p2352 (2352-2371), τα οποία περιείχαν αλληλεπικαλυπτόμενα μοτίβα πρόσδεσης σε μόρια MHC HR ποντικών. Το p2208 παρουσίασε ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς έφερε επιπλέον μοτίβα πρόσδεσης σε μόρια MHC LR ποντικών. Μετά από την άμεση χορήγησή του σε δύο HR και δύο LR φυλές, το p2208 βρέθηκε ανοσογονικό και παθογονικό σε μία HR (SJL/J) και σε

μία LR (C57BL/6) φυλή ποντικών. Επιπλέον, έφερε κρυπτικό/ούς επίτοπο/ους στην αλληλουχία του. Είναι η πρώτη φορά που ένα πεπτίδιο αναφέρεται να επάγει άμεση EAT με εκτενή διήθηση του αδένα τόσο στη φυλή HR και όσο και στη φυλή LR. Επιπρόσθετα, η ανοσοποίηση των ποντικών με το p2208 είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή ειδικών αντισωμάτων, όχι μόνο έναντι του πεπτιδίου, αλλά και ολόκληρης της Tg. Η ιδιότητά τους αυτή, υποδηλώνει ότι το πεπτίδιο είτε φέρει έναν επιφανειακό, προσβάσιμο επίτοπο στην τεταρτοταγή δομή της Tg, είτε επάγει ενδομοριακή επέκταση επιτόπων. Η απομάκρυνση των ειδικών αντισωμάτων από τους αντι-ορούς ποντικών που είχε ως αποτέλεσμα τη δραματική μείωση της δραστηριότητας έναντι της Tg, υποστηρίζει την πρώτη ερμηνεία.

Τέλος, το δεύτερο πεπτίδιο που ανέδειξε η *in silico* ανάλυση, το p2352, δεν βρέθηκε ανοσογονικό ή παθογονικό σε καμία από τις φυλές ποντικών όπου ελέγχθηκε.

Συνολικά, από την προσπάθεια εντοπισμού νέων αντιγονικών καθοριστών της Tg σε επίπεδο B- και T-κυττάρων εξάγονται τα εξής συμπεράσματα:

α) η χρήση μικρών (20μερών) πεπτιδίων ενδεχομένως να μην ενδείκνυται για τον εντοπισμό ειδικών πληθυσμών αντισωμάτων με διαγνωστική αξία στον ολικό ορό ασθενών με αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα.

β) το πεπτίδιο p2208 φέρει μοναδική ικανότητα να επάγει άμεση EAT σε LR στελέχη ποντικών. Ένα τέτοιο πειραματικό μοντέλο της EAT προσφέρεται για τη διερεύνηση των μηχανισμών που προσδίδουν ανθεκτικότητα στην εκδήλωσή της.

γ) ο εντοπισμός B- αλλά και T-επιτόπων στο πεπτίδιο p2208, καθώς και η ικανότητά του να επάγει άμεση EAT σε HR και LR φυλές ποντικών, καθιστά αναγκαίο τον προσδιορισμό της ελάχιστης αμινοξικής αλληλουχίας/θέσης των διαφορετικών επιτόπων στο πεπτίδιο.

2. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΑΓΓΛΙΚΗ

In the context of the current thesis, B- and T- cell epitopes of thyroglobulin (Tg), the main autoantigen in autoimmune thyroiditis, were investigated. The large size of Tg renders the molecule attractive for extensive epitope studies, recognised by B- and T-cells, but at the same time opposes limitations in the identifications of immunodominant regions. B-epitopes: A common denominator among the two main autoimmune thyroid diseases Hashimoto's thyroiditis (HT) and Graves' disease (GD) is the circulation of Tg autoantibodies exploited in the diagnosis, but devoid of a specific pathogenic role. The correlation of B-cell Tg epitopes and autoimmune thyroid diseases has been thoroughly examined. In an earlier study of the Immunology Laboratory of Hellenic Pasteur Institute a panel of 48 overlapping peptides (overlap by 8 aa) spanning the C-terminal end of Tg, 17 peptides were characterised as targets of autoimmune antibodies from patients with GD. Three of the above peptides that presented with the highest reactivity were studied, *per se* or mixed, as possible targets of patients with HT, a hypothesis not verified.

In the first part of the thesis new peptide-markers of human Tg were investigated, in order to serologically differentiate the two autoimmune thyroid diseases, mainly focused however in HT. From the available panel of antigenic peptides of the Laboratory, three new peptides, p2208(2208-2227), p2352(2352-2371) and p2472(2472-2491), were selected for their study. When examining whole sera, were peptides were found to be equally recognised from patients sera of both groups. Only the isolation of total IgG from the sera resulted in statistically significant differences of the two clinical entities, mainly when a mixture of the peptides was utilised. (71% HT and 100% GD, $p < 0.05$). In total, the study points towards the unsuitability of the specific peptides in the clinical practice of HT, but one should keep in mind that the results might be biased from their initial selection as targets of the IgG from GD patients.

T-epitopes: In order to apprehend the pathogenetic mechanisms that underlie the autoimmune thyroid diseases, suitable experimental animal models of the diseases have been developed. Specifically in HT, Experimental Autoimmune Thyroiditis (EAT) serves as a model of study and is induced in mice either directly (immunisation with Tg or Tg peptides), or indirectly (adoptive transfer of Tg-primed

mouse lymph node cells). The responsiveness to Tg (thyroid gland cell mononuclear infiltration, anti-Tg antibody titers) classifies the animals in high (HR) and low (LR) EAT responders, a characteristic associated with their H-2 haplotype; H-2^k, H-2^s and H-2^q for HR – the latter of intermediate susceptibility – and H-2^b, H-2^d and H-2^v for LR. Throughout the last 20 years, studies on the pathogenic mechanisms of EAT have been described almost exclusively from HR wild type mouse strains. Out of the 34 peptides examined in these strains 17 were thyroiditogenic, whereas out of the 10 peptides examined in LR wild type mouse strains only one, the 20-mer p2340 (a.a. 2340-2359), was able to induce EAT. The peptide was characterised through a previous study of the Immunology Laboratory of Hellenic Pasteur Institute, as pathogenic to the LR strains C57BL/6 (H-2^b) and BALB/c (H-2^d) via the adoptive transfer of syngeneic peptide-primed LNCs, and to HR strains SJL/J (H-2^s) and CBA/J (H-2^k) by direct challenge. It is therefore prominent that the lack of adequate knowledge on pathogenic peptides on LR mouse strains, hampers the study and comparison of the disease mechanisms in these two types of mice.

The goal of the second part of the thesis was the identification of new pathogenic 20mer Tg peptides that are able to induce direct EAT in LR mouse strains. Through the use of the available panel of the 48 peptides of the Laboratory, two new peptides were identified, p2208 (2208-2227) and p2352 (2352-2371), that were predicted to contain overlapping binding motifs to HR MHC molecules. P2208 was of particular interest, since it contained additional binding motifs to LR MHC molecules. The direct administration in two HR and two LR strains of p2208 revealed its immunogenic and pathogenic nature in one HR (SJL/J) and one LR (C57BL/6) mouse strain. It was additionally found to bear cryptic epitope/s within its sequence. It is the first time that a peptide is reported to induce direct EAT with extensive infiltration of the thyroid gland of HR, as well as LR strains. Moreover, the immunisation of mice with p2208 resulted in the production of specific antibodies, not only against the immunising antigen, but also against the intact Tg. This property suggests that the peptide either carries a surface, accessible epitope on the tertiary structure of Tg, or induces intramolecular epitope spreading. The

removal of the specific antibodies from the mice anti-sera that resulted in the dramatic decrease of the Tg-reactivity supported the first hypothesis.

Finally, the second peptide that emerged from the *in silico* analysis, p2352, was not found to be immunogenic, nor pathogenic in the examined mouse strains.

Overall, from our effort to identify new antigenic determinants of Tg in a B- and T-cellular level the following conclusions can be drawn:

- a) the use of small (20mer) peptides might not be appropriate for the identification of specific antibody subpopulations of diagnostic value in the total sera of patients with autoimmune thyroid disease.
- b) peptide p2208 possesses the unique ability to induce direct EAT in LR mouse strains. Such an experimental EAT model is ideal for the investigation of the mechanisms that generate resistance in its expression.
- c) the identification of B-, and T-epitopes on the peptide p2208, as well as its ability to induce direct EAT in HR and LR mouse strains, imposes the assessment of the minimal responsible amino acid sequence/position of the different epitopes on the peptide.

VII.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) Gentile F, Conte M, Formisano S. Thyroglobulin as an autoantigen: what can we learn about immunopathogenicity from the correlation of antigenic properties with protein structure? *Immunology* 2004 May;112(1):13-25.
- (2) Orgiazzi J. Thyroid autoimmunity. *Presse Med* 2012 Dec;41(12 P 2):e611-e625.
- (3) Thibodeau GA, Patton KT. *The Human Body in Health & Disease*. 3rd ed. Missouri: Mosby; 2002.
- (4) Michels AW, Eisenbarth GS. Immunologic endocrine disorders.
- (5) McLeod DS, Cooper DS. The incidence and prevalence of thyroid autoimmunity. *Endocrine* 2012 Oct;42(2):252-65.
- (6) Rose NR, Witebsky E. Studies on organ specificity. V. Changes in the thyroid glands of rabbits following active immunization with rabbit thyroid extracts. *J Immunol* 1956 Jun;76(6):417-27.
- (7) Witebsky E, Rose NR. Studies on organ specificity. IV. Production of rabbit thyroid antibodies in the rabbit. *J Immunol* 1956 Jun;76(6):408-16.
- (8) Campbell P.N., Doniach D., Hudson R.V., Roitt I.M. Auto-antibodies in Hashimoto's disease (lymphadenoid goitre). *Lancet* 1956 Oct 20;271(6947):820-1.
- (9) Weetman AP, McGregor AM. Autoimmune thyroid disease: further developments in our understanding. *Endocr Rev* 1994 Dec;15(6):788-830.
- (10) Ploski R, Szymanski K, Bednarczyk T. The genetic basis of graves' disease. *Curr Genomics* 2011 Dec;12(8):542-63.
- (11) Adams DD, Purves HD. The assessment of thyroid function by tracer tests with radioactive iodine. *N Z Med J* 1956 Feb;55(305):36-41.
- (12) Armengol MP, Juan M, Lucas-Martin A, Fernandez-Figueras MT, Jaraquemada D, Gallart T, et al. Thyroid autoimmune disease: demonstration of thyroid antigen-specific B cells and recombination-activating gene expression in chemokine-containing active intrathyroidal germinal centers. *Am J Pathol* 2001 Sep;159(3):861-73.
- (13) Ashhab Y, Dominguez O, Sospedra M, Roura-Mir C, Lucas-Martin A, Pujol-Borrell R. A one-tube polymerase chain reaction protocol demonstrates CC chemokine overexpression in Graves' disease glands. *J Clin Endocrinol Metab* 1999 Aug;84(8):2873-82.
- (14) Garcia-Lopez MA, Sancho D, Sanchez-Madrid F, Marazuela M. Thyrocytes from autoimmune thyroid disorders produce the chemokines IP-10 and Mig and attract CXCR3+ lymphocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 2001 Oct;86(10):5008-16.
- (15) Kemp EH, Metcalfe RA, Smith KA, Woodroffe MN, Watson PF, Weetman AP. Detection and localization of chemokine gene expression in autoimmune thyroid disease. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2003 Aug;59(2):207-13.

- (16) Ajjan RA, Watson PF, Weetman AP. Cytokines and thyroid function. *Adv Neuroimmunol* 1996;6(4):359-86.
- (17) Weetman AP. Cellular immune responses in autoimmune thyroid disease. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004 Oct;61(4):405-13.
- (18) Parkes AB, McLachlan SM, Bird P, Rees Smith B. The distribution of microsomal and thyroglobulin antibody activity among the IgG subclasses. *Clin Exp Immunol* 1984 Jul;57(1):239-43.
- (19) McLachlan SM, Rapoport B. Thyroid peroxidase as an autoantigen. *Thyroid* 2007 Oct;17(10):939-48.
- (20) Caturegli P, Kuppers RC, Mariotti S, Burek CL, Pinchera A, Ladenson PW, et al. IgG subclass distribution of thyroglobulin antibodies in patients with thyroid disease. *Clin Exp Immunol* 1994 Dec;98(3):464-9.
- (21) Stassi G, De Maria R. Autoimmune thyroid disease: new models of cell death in autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2002 Jan 3.
- (22) Rapoport B, Chazenbalk GD, Jaume JC, McLachlan SM. The thyrotropin (TSH) receptor: interaction with TSH and autoantibodies. *Endocr Rev* 1998 Dec;19(6):673-716.
- (23) Kohno Y, Nakajima H, Tarutani O. Interspecies cross-reactive determinants of thyroglobulin recognized by autoantibodies. *Clin Exp Immunol* 1985 Jul;61(1):44-8.
- (24) Stassi G, De Maria R. Autoimmune thyroid disease: new models of cell death in autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2002 Mar;2(3):195-204.
- (25) Brix TH, Hegedus L. Twin studies as a model for exploring the aetiology of autoimmune thyroid disease. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2012 Apr;76(4):457-64.
- (26) Roman SH, Greenberg D, Rubinstein P, Wallenstein S, Davies TF. Genetics of autoimmune thyroid disease: lack of evidence for linkage to HLA within families. *J Clin Endocrinol Metab* 1992 Mar;74(3):496-503.
- (27) Weber JL. Human DNA polymorphisms and methods of analysis. *Curr Opin Biotechnol* 1990 Dec;1(2):166-71.
- (28) Frazer KA, Ballinger DG, Cox DR, Hinds DA, Stuve LL, Gibbs RA, et al. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature* 2007 Oct 18;449(7164):851-61.
- (29) Christensen K, Murray JC. What genome-wide association studies can do for medicine. *N Engl J Med* 2007 Mar 15;356(11):1094-7.
- (30) Yanagawa T, Hidaka Y, Guimaraes V, Soliman M, DeGroot LJ. CTLA-4 gene polymorphism associated with Graves' disease in a Caucasian population. *J Clin Endocrinol Metab* 1995 Jan;80(1):41-5.
- (31) Farid NR. Immunogenetics of autoimmune thyroid disorders. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1987 Jun;16(2):229-45.

- (32) Davies TF, Latif R, Yin X. New genetic insights from autoimmune thyroid disease. *J Thyroid Res* 2012;2012:623852.
- (33) Janeway CA. *The Immune System in Health and Disease*. Immunobiology. New York: Garland Science; 2005. p. 183-4.
- (34) Tandon N, Zhang L, Weetman AP. HLA associations with Hashimoto's thyroiditis. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1991 May;34(5):383-6.
- (35) Bogner U, Badenhop K, Peters H, Schmieg D, Mayr WR, Usadel KH, et al. HLA-DR/DQ gene variation in nongoitrous autoimmune thyroiditis at the serological and molecular level. *Autoimmunity* 1992;14(2):155-8.
- (36) Hunt PJ, Marshall SE, Weetman AP, Bunce M, Bell JI, Wass JA, et al. Histocompatibility leucocyte antigens and closely linked immunomodulatory genes in autoimmune thyroid disease. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2001 Oct;55(4):491-9.
- (37) Badenhop K, Schwarz G, Walfish PG, Drummond V, Usadel KH, Bottazzo GF. Susceptibility to thyroid autoimmune disease: molecular analysis of HLA-D region genes identifies new markers for goitrous Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab* 1990 Nov;71(5):1131-7.
- (38) Heward JM, Allahabadia A, Daykin J, Carr-Smith J, Daly A, Armitage M, et al. Linkage disequilibrium between the human leukocyte antigen class II region of the major histocompatibility complex and Graves' disease: replication using a population case control and family-based study. *J Clin Endocrinol Metab* 1998 Oct;83(10):3394-7.
- (39) Chen QY, Huang W, She JX, Baxter F, Volpe R, Maclaren NK. HLA-DRB1*08, DRB1*03/DRB3*0101, and DRB3*0202 are susceptibility genes for Graves' disease in North American Caucasians, whereas DRB1*07 is protective. *J Clin Endocrinol Metab* 1999 Sep;84(9):3182-6.
- (40) Menconi F, Monti MC, Greenberg DA, Oashi T, Osman R, Davies TF, et al. Molecular amino acid signatures in the MHC class II peptide-binding pocket predispose to autoimmune thyroiditis in humans and in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008 Sep 16;105(37):14034-9.
- (41) Inaba H, Martin W, De Groot AS, Qin S, De Groot LJ. Thyrotropin receptor epitopes and their relation to histocompatibility leukocyte antigen-DR molecules in Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2006 Jun;91(6):2286-94.
- (42) Sawai Y, DeGroot LJ. Binding of human thyrotropin receptor peptides to a Graves' disease-predisposing human leukocyte antigen class II molecule. *J Clin Endocrinol Metab* 2000 Mar;85(3):1176-9.
- (43) Vaidya B, Kendall-Taylor P, Pearce SHS. The genetics of autoimmune thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2002 Dec;87(12):5385-97.
- (44) Kotsa K, Watson PF, Weetman AP. A CTLA-4 gene polymorphism is associated with both Graves disease and autoimmune hypothyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1997 May;46(5):551-4.

- (45) Tomer Y, Greenberg DA, Barbesino G, Concepcion E, Davies TF. CTLA-4 and not CD28 is a susceptibility gene for thyroid autoantibody production. *J Clin Endocrinol Metab* 2001 Apr;86(4):1687-93.
- (46) Ban Y, Davies TF, Greenberg DA, Kissin A, Marder B, Murphy B, et al. Analysis of the CTLA-4, CD28, and inducible costimulator (ICOS) genes in autoimmune thyroid disease. *Genes Immun* 2003 Dec;4(8):586-93.
- (47) Ban Y, Greenberg DA, Davies TF, Jacobson E, Concepcion E, Tomer Y. 'Linkage analysis of thyroid antibody production: evidence for shared susceptibility to clinical autoimmune thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2008 Sep;93(9):3589-96.
- (48) Tomer Y, Ban Y, Concepcion E, Barbesino G, Villanueva R, Greenberg DA, et al. Common and unique susceptibility loci in Graves and Hashimoto diseases: results of whole-genome screening in a data set of 102 multiplex families. *Am J Hum Genet* 2003 Oct;73(4):736-47.
- (49) Sakai K, Shirasawa S, Ishikawa N, Ito K, Tamai H, Kuma K, et al. Identification of susceptibility loci for autoimmune thyroid disease to 5q31-q33 and Hashimoto's thyroiditis to 8q23-q24 by multipoint affected sib-pair linkage analysis in Japanese. *Hum Mol Genet* 2001 Jun 15;10(13):1379-86.
- (50) Collins JE, Heward JM, Howson JM, Foxall H, Carr-Smith J, Franklyn JA, et al. Common allelic variants of exons 10, 12, and 33 of the thyroglobulin gene are not associated with autoimmune thyroid disease in the United Kingdom. *J Clin Endocrinol Metab* 2004 Dec;89(12):6336-9.
- (51) Ban Y, Greenberg DA, Concepcion E, Skrabanek L, Villanueva R, Tomer Y. Amino acid substitutions in the thyroglobulin gene are associated with susceptibility to human and murine autoimmune thyroid disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 Dec 9;100(25):15119-24.
- (52) Hodge SE, Ban Y, Strug LJ, Greenberg DA, Davies TF, Concepcion ES, et al. Possible interaction between HLA-DRbeta1 and thyroglobulin variants in Graves' disease. *Thyroid* 2006 Apr;16(4):351-5.
- (53) Akamizu T, Ikuyama S, Saji M, Kosugi S, Kozak C, McBride OW, et al. Cloning, chromosomal assignment, and regulation of the rat thyrotropin receptor: expression of the gene is regulated by thyrotropin, agents that increase cAMP levels, and thyroid autoantibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990 Aug;87(15):5677-81.
- (54) Rousseau-Merck MF, Misrahi M, Loosfelt H, Atger M, Milgrom E, Berger R. Assignment of the human thyroid stimulating hormone receptor (TSHR) gene to chromosome 14q31. *Genomics* 1990 Oct;8(2):233-6.
- (55) Kakinuma A, Nagayama Y. Multiple messenger ribonucleic acid transcripts and revised gene organization of the human TSH receptor. *Endocr J* 2002 Apr;49(2):175-80.

- (56) Brand OJ, Barrett JC, Simmonds MJ, Newby PR, McCabe CJ, Bruce CK, et al. Association of the thyroid stimulating hormone receptor gene (TSHR) with Graves' disease. *Hum Mol Genet* 2009 May 1;18(9):1704-13.
- (57) Chen CR, Pichurin P, Nagayama Y, Latrofa F, Rapoport B, McLachlan SM. The thyrotropin receptor autoantigen in Graves disease is the culprit as well as the victim. *J Clin Invest* 2003 Jun;111(12):1897-904.
- (58) Burek CL, Talor MV. Environmental triggers of autoimmune thyroiditis. *J Autoimmun* 2009 Sep 10.
- (59) Rose NR, Rasooly L, Saboori AM, Burek CL. Linking iodine with autoimmune thyroiditis. *Environ Health Perspect* 1999 Oct;107 Suppl 5:749-52.
- (60) Zois C, Stavrou I, Kalogera C, Svarna E, Dimoliatis I, Seferiadis K, et al. High prevalence of autoimmune thyroiditis in schoolchildren after elimination of iodine deficiency in northwestern Greece. *Thyroid* 2003 May;13(5):485-9.
- (61) Allen EM, Appel MC, Braverman LE. The effect of iodide ingestion on the development of spontaneous lymphocytic thyroiditis in the diabetes-prone BB/W rat. *Endocrinology* 1986 May;118(5):1977-81.
- (62) Weetman AP, McGregor AM, Campbell H, Lazarus JH, Ibbertson HK, Hall R. Iodide enhances IgG synthesis by human peripheral blood lymphocytes in vitro. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1983 Jun;103(2):210-5.
- (63) Aghini-Lombardi F, Antonangeli L, Martino E, Vitti P, Maccherini D, Leoli F, et al. The spectrum of thyroid disorders in an iodine-deficient community: the Pescopagano survey. *J Clin Endocrinol Metab* 1999 Feb;84(2):561-6.
- (64) Hollowell JG, Staehling NW, Flanders WD, Hannon WH, Gunter EW, Spencer CA, et al. Serum TSH, T(4), and thyroid antibodies in the United States population (1988 to 1994): National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *J Clin Endocrinol Metab* 2002 Feb;87(2):489-99.
- (65) Kasagi K, Takahashi N, Inoue G, Honda T, Kawachi Y, Izumi Y. Thyroid function in Japanese adults as assessed by a general health checkup system in relation with thyroid-related antibodies and other clinical parameters. *Thyroid* 2009 Sep;19(9):937-44.
- (66) Hoogendoorn EH, Hermus AR, de VF, Ross HA, Verbeek AL, Kiemeny LA, et al. Thyroid function and prevalence of anti-thyroperoxidase antibodies in a population with borderline sufficient iodine intake: influences of age and sex. *Clin Chem* 2006 Jan;52(1):104-11.
- (67) McCombe PA, Greer JM, Mackay IR. Sexual dimorphism in autoimmune disease. *Curr Mol Med* 2009 Dec;9(9):1058-79.
- (68) Brix TH, Knudsen GP, Kristiansen M, Kyvik KO, Orstavik KH, Hegedus L. High frequency of skewed X-chromosome inactivation in females with autoimmune thyroid disease: a possible explanation for the female predisposition to thyroid autoimmunity. *J Clin Endocrinol Metab* 2005 Nov;90(11):5949-53.

- (69) Ozcelik T, Uz E, Akyerli CB, Bagislar S, Mustafa CA, Gursoy A, et al. Evidence from autoimmune thyroiditis of skewed X-chromosome inactivation in female predisposition to autoimmunity. *Eur J Hum Genet* 2006 Jun;14(6):791-7.
- (70) Yin X, Latif R, Tomer Y, Davies TF. Thyroid epigenetics: X chromosome inactivation in patients with autoimmune thyroid disease. *Ann N Y Acad Sci* 2007 Sep;1110:193-200.
- (71) Tanda ML, Piantanida E, Lai A, Lombardi V, Dalle M, I, Liparulo L, et al. Thyroid autoimmunity and environment. *Horm Metab Res* 2009 Jun;41(6):436-42.
- (72) Tomer Y, Menconi F. Interferon induced thyroiditis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2009 Dec;23(6):703-12.
- (73) Mandac JC, Chaudhry S, Sherman KE, Tomer Y. The clinical and physiological spectrum of interferon-alpha induced thyroiditis: toward a new classification. *Hepatology* 2006 Apr;43(4):661-72.
- (74) Antonelli A, Ferri C, Pampana A, Fallahi P, Nesti C, Pasquini M, et al. Thyroid disorders in chronic hepatitis C. *Am J Med* 2004 Jul 1;117(1):10-3.
- (75) Farrar JD, Murphy KM. Type I interferons and T helper development. *Immunol Today* 2000 Oct;21(10):484-9.
- (76) Tomer Y. Hepatitis C and interferon induced thyroiditis. *J Autoimmun* 2010 May;34(3):J322-J326.
- (77) Vial T, Descotes J. Immune-mediated side-effects of cytokines in humans. *Toxicology* 1995 Dec 20;105(1):31-57.
- (78) Chen F, Day SL, Metcalfe RA, Sethi G, Kapembwa MS, Brook MG, et al. Characteristics of autoimmune thyroid disease occurring as a late complication of immune reconstitution in patients with advanced human immunodeficiency virus (HIV) disease. *Medicine (Baltimore)* 2005 Mar;84(2):98-106.
- (79) Jubault V, Penfornis A, Schillo F, Hoen B, Izembart M, Timsit J, et al. Sequential occurrence of thyroid autoantibodies and Graves' disease after immune restoration in severely immunocompromised human immunodeficiency virus-1-infected patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2000 Nov;85(11):4254-7.
- (80) Madeddu G, Spanu A, Chessa F, Calia GM, Lovigu C, Solinas P, et al. Thyroid function in human immunodeficiency virus patients treated with highly active antiretroviral therapy (HAART): a longitudinal study. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006 Apr;64(4):375-83.
- (81) Michels AW, Eisenbarth GS. Immunologic endocrine disorders. *J Allergy Clin Immunol* 2010 Feb;125(2 Suppl 2):S226-S237.
- (82) Brent GA. Environmental exposures and autoimmune thyroid disease. *Thyroid* 2010 Jul;20(7):755-61.
- (83) Bahn AK, Mills JL, Snyder PJ, Gann PH, Houten L, Bialik O, et al. Hypothyroidism in workers exposed to polybrominated biphenyls. *N Engl J Med* 1980 Jan 3;302(1):31-3.

- (84) Eaton WW, Rose NR, Kalaydjian A, Pedersen MG, Mortensen PB. Epidemiology of autoimmune diseases in Denmark. *J Autoimmun* 2007 Aug;29(1):1-9.
- (85) Tomer Y, Villanueva R. Hepatitis C and thyroid autoimmunity: is there a link? *Am J Med* 2004 Jul 1;117(1):60-1.
- (86) Hsieh MC, Yu ML, Chuang WL, Shin SJ, Dai CY, Chen SC, et al. Virologic factors related to interferon-alpha-induced thyroid dysfunction in patients with chronic hepatitis C. *Eur J Endocrinol* 2000 May;142(5):431-7.
- (87) Bartolome J, Rodriguez-Inigo E, Quadros P, Vidal S, Pascual-Miguelanez I, Rodriguez-Montes JA, et al. Detection of hepatitis C virus in thyroid tissue from patients with chronic HCV infection. *J Med Virol* 2008 Sep;80(9):1588-94.
- (88) Rose NR. The adjuvant effect in infection and autoimmunity. *Clin Rev Allergy Immunol* 2008 Jun;34(3):279-82.
- (89) Benvenga S, Santarpia L, Trimarchi F, Guarneri F. Human thyroid autoantigens and proteins of *Yersinia* and *Borrelia* share amino acid sequence homology that includes binding motifs to HLA-DR molecules and T-cell receptor. *Thyroid* 2006 Mar;16(3):225-36.
- (90) Volzke H, Werner A, Guertler L, Robinson D, Wallaschofski H, John U. Putative association between anti-*Borrelia* IgG and autoimmune thyroid disease? *Thyroid* 2005 Nov;15(11):1273-7.
- (91) Prummel MF, Strieder T, Wiersinga WM. The environment and autoimmune thyroid diseases. *Eur J Endocrinol* 2004 May;150(5):605-18.
- (92) van de Graaf SA, Ris-Stalpers C, Pauws E, Mendive FM, Targovnik HM, de Vijlder JJ. Up to date with human thyroglobulin. *J Endocrinol* 2001 Aug;170(2):307-21.
- (93) Bresson D, Rebuffat SA, Peraldi-Roux S. Localization of the immunodominant region on human thyroid peroxidase in autoimmune thyroid diseases: an update. *J Autoimmune Dis* 2005 Mar 15;2(1):2.
- (94) McLachlan SM, Rapoport B. Thyroid peroxidase as an autoantigen. *Thyroid* 2007 Oct;17(10):939-48.
- (95) Ruf J, Toubert ME, Czarnocka B, Durand-Gorde JM, Ferrand M, Carayon P. Relationship between immunological structure and biochemical properties of human thyroid peroxidase. *Endocrinology* 1989 Sep;125(3):1211-8.
- (96) Shimojo N, Kohno Y, Yamaguchi K, Kikuoka S, Hoshioka A, Niimi H, et al. Induction of Graves-like disease in mice by immunization with fibroblasts transfected with the thyrotropin receptor and a class II molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996 Oct 1;93(20):11074-9.
- (97) Kita-Furuyama M, Nagayama Y, Pichurin P, McLachlan SM, Rapoport B, Eguchi K. Dendritic cells infected with adenovirus expressing the thyrotrophin receptor induce Graves' hyperthyroidism in BALB/c mice. *Clin Exp Immunol* 2003 Feb;131(2):234-40.

- (98) Costagliola S, Rodien P, Many MC, Ludgate M, Vassart G. Genetic immunization against the human thyrotropin receptor causes thyroiditis and allows production of monoclonal antibodies recognizing the native receptor. *J Immunol* 1998 Feb 1;160(3):1458-65.
- (99) Barrett K, Liakata E, Rao PV, Watson PF, Weetman AP, Lymberi P, et al. Induction of hyperthyroidism in mice by intradermal immunization with DNA encoding the thyrotropin receptor. *Clin Exp Immunol* 2004 Jun;136(3):413-22.
- (100) Silverman DA, Rose NR. Autoimmunity in methylcholanthrene-induced and spontaneous thyroiditis in Buffalo strain rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 1971 Nov;138(2):579-84.
- (101) Silverman DA, Rose NR. Neonatal thymectomy increases the incidence of spontaneous and methylcholanthrene-enhanced thyroiditis in rats. *Science* 1974 Apr 12;184(4133):162-3.
- (102) Krogh Rasmussen A, Hartoft-Nielsen ML, Feldt-Rasmussen U. Models to study the pathogenesis of thyroid autoimmunity.
- (103) Rajatanavin R, Appel MC, Reinhardt W, Alex S, Yang YN, Braverman LE. Variable prevalence of lymphocytic thyroiditis among diabetes-prone sublines of BB/W or rats. *Endocrinology* 1991 Jan;128(1):153-7.
- (104) Dietrich HM, Cole RK, Wick G. The natural history of the obese strain of chickens--an animal model for spontaneous autoimmune thyroiditis.
- (105) Wick G, Brezinschek HP, Hala K, Dietrich H, Wolf H, Kroemer G. The obese strain of chickens: an animal model with spontaneous autoimmune thyroiditis. *Adv Immunol* 1989;47:433-500.
- (106) Wick G, Sundick RS, Albini B. A review: The obese strain (OS) of chickens: an animal model with spontaneous autoimmune thyroiditis.
- (107) Damotte D, Colomb E, Cailleau C, Brousse N, Charreire J, Carnaud C. Analysis of susceptibility of NOD mice to spontaneous and experimentally induced thyroiditis. *Eur J Immunol* 1997 Nov;27(11):2854-62.
- (108) Many MC, Maniratunga S, Deneff JF. The non-obese diabetic (NOD) mouse: an animal model for autoimmune thyroiditis. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1996;104 Suppl 3:17-20.
- (109) Rasooly L, Burek CL, Rose NR. Iodine-induced autoimmune thyroiditis in NOD-H-2h4 mice. *Clin Immunol Immunopathol* 1996 Dec;81(3):287-92.
- (110) Allen EM, Braverman LE. The effect of iodine on lymphocytic thyroiditis in the thymectomized buffalo rat. *Endocrinology* 1990 Oct;127(4):1613-6.
- (111) Sharp X., Shan Z, Teng W, Fan C, Wang H, Guo R. Experimental study on the effects of chronic iodine excess on thyroid function, structure, and autoimmunity in autoimmune-prone NOD.H-2h4 mice. *Clin Exp Med* 2009;9:51-9.

- (112) Kolypetri P, Noel NA, Carayanniotis KA, Carayanniotis G. Iodine content of thyroglobulin in Nod.H2h4 mice developing iodine-accelerated autoimmune thyroiditis. *Hormones (Athens)* 2010 Apr;9(2):151-60.
- (113) Rose NR, Bonita R, Burek CL. Iodine: an environmental trigger of thyroiditis. *Autoimmun Rev* 2002 Feb;1(1-2):97-9103.
- (114) Bonita RE, Rose NR, Rasooly L, Caturegli P, Burek CL. Kinetics of mononuclear cell infiltration and cytokine expression in iodine-induced thyroiditis in the NOD-H2h4 mouse. *Exp Mol Pathol* 2003 Feb;74(1):1-12.
- (115) Choi EW, Shin IS, Bhang DH, Lee DH, Bae BK, Kang MS, et al. Hormonal change and cytokine mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells during the development of canine autoimmune thyroiditis.
- (116) Witebsky E., Rose N.R., Terplan K., Paine J.R., Egan R.W. Chronic thyroiditis and autoimmunization. *J Am Med Assoc* 1957 Jul 27;164(13):1439-47.
- (117) Rose NR, Kite JH, Doebbler TK, Spier R, Skelton FR, Witebsky E. Studies on experimental thyroiditis. *Ann N Y Acad Sci* 1965 Jun 30;124(1):201-30.
- (118) Jankovic BD, Mitrovic K. Experimental Allergic Thyroiditis in the Chicken. *Nature* 1963 Oct 12;200:186-7.
- (119) Charreire J. Immune mechanisms in autoimmune thyroiditis. *Adv Immunol* 1989;46:263-334.
- (120) Ng HP, Banga JP, Kung AW. Development of a murine model of autoimmune thyroiditis induced with homologous mouse thyroid peroxidase.
- (121) Flynn JC, Gardas A, Wan Q, Gora M, Alsharabi G, Wei WZ, et al. Superiority of thyroid peroxidase DNA over protein immunization in replicating human thyroid autoimmunity in HLA-DRB1*0301 (DR3) transgenic mice. *Clin Exp Immunol* 2004 Sep;137(3):503-12.
- (122) Simon LL, Krco CJ, David CS, Kong YM. Characterization of the in vitro murine T-cell proliferative responses to murine and human thyroglobulins in thyroiditis-susceptible and -resistant mice. *Cell Immunol* 1985 Aug;94(1):243-53.
- (123) Kong YC. Experimental autoimmune thyroiditis in the mouse. *Curr Protoc Immunol* 15.7. 2007.
- Ref Type: Generic
- (124) Okayasu I, Kong YM, Rose NR. Effect of castration and sex hormones on experimental autoimmune thyroiditis. *Clin Immunol Immunopathol* 1981 Aug;20(2):240-5.
- (125) Chen CY, Kimura H, Landek-Salgado MA, Hagedorn J, Kimura M, Suzuki K, et al. Regenerative potentials of the murine thyroid in experimental autoimmune thyroiditis: role of CD24. *Endocrinology* 2009 Jan;150(1):492-9.
- (126) Braley-Mullen H, Sharp GC. Adoptive transfer murine model of granulomatous experimental autoimmune thyroiditis. *Int Rev Immunol* 2000;19(6):535-55.

- (127) Kong YM, Okayasu I, Giraldo AA, Beisel KW, Sundick RS, Rose NR, et al. Tolerance to thyroglobulin by activating suppressor mechanisms. *Ann N Y Acad Sci* 1982;392:191-209.
- (128) Dawe KI, Hutchings PR, Geysen M, Champion BR, Cooke A, Roitt IM. Unique role of thyroxine in T cell recognition of a pathogenic peptide in experimental autoimmune thyroiditis.
- (129) Li HS, Jiang HY, Carayanniotis G. Modifying effects of iodine on the immunogenicity of thyroglobulin peptides. *J Autoimmun* 2007 Jun;28(4):171-6.
- (130) Kong YC, Flynn JC, Wan Q, David CS. HLA and H2 class II transgenic mouse models to study susceptibility and protection in autoimmune thyroid disease. *Autoimmunity* 2003 Sep;36(6-7):397-404.
- (131) Wan Q, Shah R, Panos JC, Giraldo AA, David CS, Kong Y. HLA-DR and HLA-DQ polymorphism in human thyroglobulin-induced autoimmune thyroiditis: DR3 and DQ8 transgenic mice are susceptible. *Hum Immunol* 2002 Apr;63(4):301-10.
- (132) Kong YC, Lomo LC, Motte RW, Giraldo AA, Baisch J, Strauss G, et al. HLA-DRB1 polymorphism determines susceptibility to autoimmune thyroiditis in transgenic mice: definitive association with HLA-DRB1*0301 (DR3) gene. *J Exp Med* 1996 Sep 1;184(3):1167-72.
- (133) Flynn JC, Wan Q, Panos JC, McCormick DJ, Giraldo AA, David CS, et al. Coexpression of susceptible and resistant HLA class II transgenes in murine experimental autoimmune thyroiditis: DQ8 molecules downregulate DR3-mediated thyroiditis. *J Autoimmun* 2002 May;18(3):213-20.
- (134) Twarog FJ, Rose NR. Transfer of autoimmune thyroiditis of the rat with lymph node cells. *J Immunol* 1970 Jun;104(6):1467-75.
- (135) Okayasu I. Transfer of experimental autoimmune thyroiditis to normal syngeneic mice by injection of mouse thyroglobulin-sensitized T lymphocytes after activation with concanavalin A. *Clin Immunol Immunopathol* 1985 Jul;36(1):101-9.
- (136) Jankovic BD, Mitrovic K, Popeskovic L, Milosevic D. Passive transfer of experimental allergic thyroiditis, delayed hypersensitivity to thyroglobulin and anti-thyroglobulin antibody formation in inbred Lewis rats. *Clin Exp Immunol* 1969 Jul;5(1):29-41.
- (137) McMaster PR, Lerner EM. The transfer of allergic thyroiditis in histocompatible guinea pigs by lymph node cells. *J Immunol* 1967 Jul;99(1):208-13.
- (138) Paterson PY, Drobish DG. Rapid induction of experimental allergic thyroiditis in rats sensitized to thyroid-adjuvant and pertussis vaccine. *J Immunol* 1968 Nov;101(5):1098-101.
- (139) Braley-Mullen H, Johnson M, Sharp GC, Kyriakos M. Induction of experimental autoimmune thyroiditis in mice with in vitro activated splenic T cells. *Cell Immunol* 1985 Jun;93(1):132-43.

- (140) Braley-Mullen H, Sharp GC, Kyriakos M. Differential requirement for autoantibody-producing B cells for induction of lymphocytic versus granulomatous experimental autoimmune thyroiditis. *J Immunol* 1994 Jan 1;152(1):307-14.
- (141) Braley-Mullen H, Sharp GC, Bickel JT, Kyriakos M. Induction of severe granulomatous experimental autoimmune thyroiditis in mice by effector cells activated in the presence of anti-interleukin 2 receptor antibody. *J Exp Med* 1991 Apr 1;173(4):899-912.
- (142) Stull SJ, Sharp GC, Kyriakos M, Bickel JT, Braley-Mullen H. Induction of granulomatous experimental autoimmune thyroiditis in mice with in vitro activated effector T cells and anti-IFN-gamma antibody. *J Immunol* 1992 Sep 15;149(6):2219-26.
- (143) Chen K, Wei Y, Sharp GC, Braley-Mullen H. Characterization of thyroid fibrosis in a murine model of granulomatous experimental autoimmune thyroiditis. *J Leukoc Biol* 2000 Dec;68(6):828-35.
- (144) Braley-Mullen H, Sharp GC, Tang H, Chen K, Kyriakos M, Bickel JT. Interleukin-12 promotes activation of effector cells that induce a severe destructive granulomatous form of murine experimental autoimmune thyroiditis. *Am J Pathol* 1998 May;152(5):1347-58.
- (145) Chen K, Wei Y, Sharp GC, Braley-Mullen H. Balance of proliferation and cell death between thyrocytes and myofibroblasts regulates thyroid fibrosis in granulomatous experimental autoimmune thyroiditis (G-EAT). *J Leukoc Biol* 2005 Feb;77(2):166-72.
- (146) McMurray RW, Sharp GC, Braley-Mullen H. Intrathyroidal cell phenotype in murine lymphocytic and granulomatous experimental autoimmune thyroiditis. *Autoimmunity* 1994;18(2):93-9102.
- (147) ElRehewy M, Kong YM, Giraldo AA, Rose NR. Syngeneic thyroglobulin is immunogenic in good responder mice. *Eur J Immunol* 1981 Feb;11(2):146-51.
- (148) Billiau A, Matthys P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *J Leukoc Biol* 2001 Dec;70(6):849-60.
- (149) Yoshino S, Sasatomi E, Ohsawa M. Bacterial lipopolysaccharide acts as an adjuvant to induce autoimmune arthritis in mice. *Immunology* 2000 Apr;99(4):607-14.
- (150) Skidmore BJ, Chiller JM, Morrison DC, Weigle WO. Immunologic properties of bacterial lipopolysaccharide (LPS): correlation between the mitogenic, adjuvant, and immunogenic activities. *J Immunol* 1975 Feb;114(2 pt 2):770-5.
- (151) Ness DB, Smith S, Talcott JA, Grumet FC. T cell requirements for the expression of the lipopolysaccharide adjuvant effect in vivo: evidence for a T cell-dependent and a T cell-independent mode of action. *Eur J Immunol* 1976 Sep;6(9):650-4.

- (152) Damotte D, Goulvestre C, Charreire J, Carnaud C. LPS and Freund's adjuvant initiate different inflammatory circuits in experimental autoimmune thyroiditis. *Eur Cytokine Netw* 2003;14(1):52-9.
- (153) Twarog FJ, Kenney E, Rose NR. Adjuvants for the production of autoimmune thyroiditis in the rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 1970 Jan;133(1):185-9.
- (154) Tomazic V, Rose NR. Autoimmune murine thyroiditis. VIII. Role of different thyroid antigens in the induction of experimental autoimmune thyroiditis. *Immunology* 1976 Jan;30(1):63-8.
- (155) Vladutiu AO. Does the amount of thyroglobulin antigen influence the severity and genetic control of murine autoimmune thyroiditis? *Immunol Lett* 1983 Mar;6(3):155-9.
- (156) Simon LL, Justen JM, Giraldo AA, Krco CJ, Kong YC. Activation of cytotoxic T cells and effector cells in experimental autoimmune thyroiditis by shared determinants of mouse and human thyroglobulins. *Clin Immunol Immunopathol* 1986 May;39(2):345-56.
- (157) Kong YC. Experimental autoimmune thyroiditis in the mouse. *Curr Protoc Immunol* 2007 Aug;Chapter 15:Unit.
- (158) Okayasu I, Hatakeyama S, Kong YC. Long-term observation and effect of age on induction of experimental autoimmune thyroiditis in susceptible and resistant mice. *Clin Immunol Immunopathol* 1989 Nov;53(2 Pt 1):254-67.
- (159) Romball CG, Weigle WO. T cell competence to heterologous and homologous thyroglobulins during the induction of experimental autoimmune thyroiditis. *Eur J Immunol* 1984 Oct;14(10):887-93.
- (160) Creemers P, Rose NR, Kong YM. Experimental autoimmune thyroiditis. In vitro cytotoxic effects of T lymphocytes on thyroid monolayers. *J Exp Med* 1983 Feb 1;157(2):559-71.
- (161) Kong YC, Morris GP, Brown NK, Yan Y, Flynn JC, David CS. Autoimmune thyroiditis: a model uniquely suited to probe regulatory T cell function. *J Autoimmun* 2009;33(3-4):239-46.
- (162) Sugihara S, Izumi Y, Yoshioka T, Yagi H, Tsujimura T, Tarutani O, et al. Autoimmune thyroiditis induced in mice depleted of particular T cell subsets. I. Requirement of Lyt-1 dull L3T4 bright normal T cells for the induction of thyroiditis. *J Immunol* 1988 Jul 1;141(1):105-13.
- (163) Leyan VR, Norambuena L, Mena M, Folch H, Esquivel P. Experimental autoimmune thyroiditis. I. Participation of IgA, IgM and IgG in the development of the disease. *Zentralbl Veterinarmed B* 1989 Jun;36(4):250-6.
- (164) Goulvestre C, Batteux F, Charreire J. Chemokines modulate experimental autoimmune thyroiditis through attraction of autoreactive or regulatory T cells. *Eur J Immunol* 2002 Dec;32(12):3435-42.

- (165) Matsuoka N, Unger P, Ben-Nun A, Graves P, Davies TF. Thyroglobulin-induced murine thyroiditis assessed by intrathyroidal T cell receptor sequencing. *J Immunol* 1994 Mar 1;152(5):2562-8.
- (166) McMurray RW, Hoffman RW, Tang H, Braley-Mullen H. T cell receptor V beta usage in murine experimental autoimmune thyroiditis. *Cell Immunol* 1996 Aug 25;172(1):1-9.
- (167) Nakashima M, Kong YM, Davies TF. The role of T cells expressing TcR V beta 13 in autoimmune thyroiditis induced by transfer of mouse thyroglobulin-activated lymphocytes: identification of two common CDR3 motifs.
- (168) Arata N, Ando T, Unger P, Davies TF. By-stander activation in autoimmune thyroiditis: studies on experimental autoimmune thyroiditis in the GFP+ fluorescent mouse.
- (169) Trinchieri G., Perussia B. Immune interferon: a pleiotropic lymphokine with multiple effects. *Immunol Today* 1985 Jan 4;6(4):131-6.
- (170) Alimi E, Huang S, Brazillet MP, Charreire J. Experimental autoimmune thyroiditis (EAT) in mice lacking the IFN-gamma receptor gene. *Eur J Immunol* 1998 Jan;28(1):201-8.
- (171) Stafford EA, Rose NR. Newer insights into the pathogenesis of experimental autoimmune thyroiditis. *Int Rev Immunol* 2000;19(6):501-33.
- (172) Zaccone P, Hutchings P, Nicoletti F, Penna G, Adorini L, Cooke A. The involvement of IL-12 in murine experimentally induced autoimmune thyroid disease. *Eur J Immunol* 1999 Jun;29(6):1933-42.
- (173) Zhang W, Flynn JC, Kong YC. IL-12 prevents tolerance induction with mouse thyroglobulin by priming pathogenic T cells in experimental autoimmune thyroiditis: role of IFN-gamma and the costimulatory molecules CD40l and CD28. *Cell Immunol* 2001 Feb 25;208(1):52-61.
- (174) Ganesh BB, Cheatem DM, Sheng JR, Vasu C, Prabhakar BS. GM-CSF-induced CD11c+CD8a--dendritic cells facilitate Foxp3+ and IL-10+ regulatory T cell expansion resulting in suppression of autoimmune thyroiditis. *Int Immunol* 2009 Mar;21(3):269-82.
- (175) Vladutiu AO, Rose NR. Cellular basis of the genetic control of immune responsiveness to murine thyroglobulin in mice. *Cell Immunol* 1975 May;17(1):106-13.
- (176) Clagett JA, Weigle WO. Roles of T and B lymphocytes in the termination of unresponsiveness to autologous thyroglobulin in mice. *J Exp Med* 1974 Mar 1;139(3):643-60.
- (177) Kong YM, Waldmann H, Cobbold S, Giraldo AA, Fuller BE, Simon LL. Pathogenic mechanisms in murine autoimmune thyroiditis: short- and long-term effects of in vivo depletion of CD4+ and CD8+ cells. *Clin Exp Immunol* 1989 Sep;77(3):428-33.

- (178) Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008 May 30;133(5):775-87.
- (179) Fuller BE, Giraldo AA, Waldmann H, Cobbold SP, Kong YC. Depletion of CD4+ and CD8+ cells eliminates immunologic memory of thyroiditogenicity in murine experimental autoimmune thyroiditis. *Autoimmunity* 1994;19(3):161-8.
- (180) Flynn JC, Conaway DH, Cobbold S, Waldmann H, Kong YC. Depletion of L3T4+ and Lyt-2+ cells by rat monoclonal antibodies alters the development of adoptively transferred experimental autoimmune thyroiditis. *Cell Immunol* 1989 Sep;122(2):377-90.
- (181) Morris GP, Yan Y, David CS, Kong YC. H2A- and H2E-derived CD4+CD25+ regulatory T cells: a potential role in reciprocal inhibition by class II genes in autoimmune thyroiditis. *J Immunol* 2005 Mar 1;174(5):3111-6.
- (182) Wei WZ, Jacob JB, Zielinski JF, Flynn JC, Shim KD, Alsharabi G, et al. Concurrent induction of antitumor immunity and autoimmune thyroiditis in CD4+ CD25+ regulatory T cell-depleted mice. *Cancer Res* 2005 Sep 15;65(18):8471-8.
- (183) Fuller BE, Okayasu I, Simon LL, Giraldo AA, Kong YM. Characterization of resistance to murine experimental autoimmune thyroiditis: duration and afferent action of thyroglobulin- and TSH-induced suppression. *Clin Immunol Immunopathol* 1993 Oct;69(1):60-8.
- (184) Canning MO, Ruwhof C, Drexhage HA. Aberrancies in antigen-presenting cells and T cells in autoimmune thyroid disease. A role in faulty tolerance induction. *Autoimmunity* 2003;36(6-7):429-42.
- (185) Voorby HA, Kabel PJ, de Haan M, Jeucken PH, van der Gaag RD, de Baets MH, et al. Dendritic cells and class II MHC expression on thyrocytes during the autoimmune thyroid disease of the BB rat. *Clin Immunol Immunopathol* 1990 Apr;55(1):9-22.
- (186) Verginis P, Li HS, Carayanniotis G. Tolerogenic semimature dendritic cells suppress experimental autoimmune thyroiditis by activation of thyroglobulin-specific CD4+CD25+ T cells. *J Immunol* 2005 Jun 1;174(11):7433-9.
- (187) Vladutiu AO, Steinman L. Inhibition of experimental autoimmune thyroiditis in mice by anti-I-A antibodies. *Cell Immunol* 1987 Oct 1;109(1):169-80.
- (188) Kawakami Y, Kuzuya N, Watanabe T, Uchiyama Y, Yamashita K. Induction of experimental thyroiditis in mice by recombinant interferon gamma administration. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1990 Jan;122(1):41-8.
- (189) Vladutiu AO, Rose NR. Autoimmune murine thyroiditis relation to histocompatibility (H-2) type. *Science* 1971 Dec 10;174(4014):1137-9.
- (190) Vladutiu AO. Experimental autoimmune thyroiditis in mice chronically treated from birth with anti-IgM antibodies. *Cell Immunol* 1989 Jun;121(1):49-59.

- (191) Hutchings P, Rayner DC, Champion BR, Marshall-Clarke S, Macatonia S, Roitt I, et al. High efficiency antigen presentation by thyroglobulin-primed murine splenic B cells. *Eur J Immunol* 1987 Mar;17(3):393-8.
- (192) Dai Y, Carayanniotis KA, Eliades P, Lymberi P, Shepherd P, Kong Y, et al. Enhancing or suppressive effects of antibodies on processing of a pathogenic T cell epitope in thyroglobulin. *J Immunol* 1999 Jun 15;162(12):6987-92.
- (193) Esquivel PS, Rose NR, Kong YC. Induction of autoimmunity in good and poor responder mice with mouse thyroglobulin and lipopolysaccharide. *J Exp Med* 1977 May 1;145(5):1250-63.
- (194) Tomazic V, Rose NR, Shreffler DC. Autoimmune murine thyroiditis. IV. Localization of genetic control of the immune response. *J Immunol* 1974 Mar;112(3):965-9.
- (195) Kong YM, David CS, Lomo LC, Fuller BE, Motte RW, Giraldo AA. Role of mouse and human class II transgenes in susceptibility to and protection against mouse autoimmune thyroiditis. *Immunogenetics* 1997;46(4):312-7.
- (196) Hutchings PR, Cooke A, Dawe K, Champion BR, Geysen M, Valerio R, et al. A thyroxine-containing peptide can induce murine experimental autoimmune thyroiditis. *J Exp Med* 1992 Mar 1;175(3):869-72.
- (197) Kong YC, McCormick DJ, Wan Q, Motte RW, Fuller BE, Giraldo AA, et al. Primary hormonogenic sites as conserved autoepitopes on thyroglobulin in murine autoimmune thyroiditis. Secondary role of iodination. *J Immunol* 1995 Dec 15;155(12):5847-54.
- (198) Hoshioka A, Kohno Y, Katsuki T, Shimojo N, Maruyama N, Inagaki Y, et al. A common T-cell epitope between human thyroglobulin and human thyroid peroxidase is related to murine experimental autoimmune thyroiditis.
- (199) Altuvia Y, Berzofsky JA, Rosenfeld R, Margalit H. Sequence features that correlate with MHC restriction. *Mol Immunol* 1994 Jan;31(1):1-19.
- (200) Leighton J, Sette A, Sidney J, Appella E, Ehrhardt C, Fuchs S, et al. Comparison of structural requirements for interaction of the same peptide with I-Ek and I-Ed molecules in the activation of MHC class II-restricted T cells. *J Immunol* 1991 Jul 1;147(1):198-204.
- (201) Reche PA, Glutting JP, Reinherz EL. Prediction of MHC class I binding peptides using profile motifs. *Hum Immunol* 2002 Sep;63(9):701-9.
- (202) Reche PA, Glutting JP, Zhang H, Reinherz EL. Enhancement to the RANKPEP resource for the prediction of peptide binding to MHC molecules using profiles. *Immunogenetics* 2004 Sep;56(6):405-19.
- (203) Reche PA, Reinherz EL. Prediction of peptide-MHC binding using profiles. *Methods Mol Biol* 2007;409:185-200.

- (204) Rammensee H, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, Stevanovic S. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 1999 Nov;50(3-4):213-9.
- (205) Wan Q, Motte RW, McCormick DJ, Fuller BE, Giraldo AA, David CS, et al. Primary hormonogenic sites as conserved autoepitopes on thyroglobulin in murine autoimmune thyroiditis: role of MHC class II. *Clin Immunol Immunopathol* 1997 Nov;85(2):187-94.
- (206) Flynn JC, McCormick DJ, Brusica V, Wan Q, Panos JC, Giraldo AA, et al. Pathogenic human thyroglobulin peptides in HLA-DR3 transgenic mouse model of autoimmune thyroiditis. *Cell Immunol* 2004 Jun;229(2):79-85.
- (207) Verginis P, Stanford MM, Carayanniotis G. Delineation of five thyroglobulin T cell epitopes with pathogenic potential in experimental autoimmune thyroiditis. *J Immunol* 2002 Nov 1;169(9):5332-7.
- (208) Li HS, Carayanniotis G. Iodination of tyrosyls in thyroglobulin generates neoantigenic determinants that cause thyroiditis. *J Immunol* 2006 Apr 1;176(7):4479-83.
- (209) Jiang HY, Li HS, Carayanniotis K, Carayanniotis G. Variable influences of iodine on the T-cell recognition of a single thyroglobulin epitope. *Immunology* 2007 Jul;121(3):370-6.
- (210) Brown NK, McCormick DJ, Brusica V, David CS, Kong YC. A novel H2A-E+ transgenic model susceptible to human but not mouse thyroglobulin-induced autoimmune thyroiditis: identification of mouse pathogenic epitopes. *Cell Immunol* 2008 Jan;251(1):1-7.
- (211) Hoshioka A, Kohno Y, Katsuki T, Shimojo N, Maruyama N, Inagaki Y, et al. A common T-cell epitope between human thyroglobulin and human thyroid peroxidase is related to murine experimental autoimmune thyroiditis. *Immunol Lett* 1993 Aug;37(2-3):235-9.
- (212) Kolypetri P, Jiang H, Carayanniotis G. Identification of pathogenic T cell epitopes near cathepsin cleavage sites in thyroglobulin. *J Immunol* 2013 Feb 15;190(4):1466-71.
- (213) Menconi F, Huber A, Osman R, Concepcion E, Jacobson EM, Stefan M, et al. Tg.2098 is a major human thyroglobulin T-cell epitope. *J Autoimmun* 2010 Aug;35(1):45-51.
- (214) Karras E, Carayanniotis G, Lymberi P. Induction of murine thyroiditis by a non dominant E(k)-restricted peptide of human thyroglobulin. *Immunology* 2003 Apr;108(4):556-61.
- (215) Karras E, Yang H, Lymberi P, Christadoss P. Human thyroglobulin peptide p2340 induces autoimmune thyroiditis in HLA-DR3 transgenic mice. *J Autoimmun* 2005 Jun;24(4):291-6.

- (216) Hatzioannou A, Liakata E, Karras E, Thrasyvoulides A, Alevizaki M, Lymberi P. Pathogenicity of a human thyroglobulin peptide (2340-2359) in mice with high or low genetic susceptibility to thyroiditis. *Immunology* 2007 Nov;122(3):343-9.
- (217) Hatzioannou A, Alevizaki M, Carayanniotis G, Lymberi P. Fine epitope mapping within the pathogenic thyroglobulin peptide 2340-2359: minimal epitopes retaining antigenicity across various MHC haplotypes are not necessarily immunogenic. *Immunology* 2012 Mar;135(3):245-53.
- (218) El Hassani RA, Estienne V, Blanchin S, Durand-Gorde JM, Mallet B, De MC, et al. Antigenicity and immunogenicity of the C-terminal peptide of human thyroglobulin. *Peptides* 2004 Jun;25(6):1021-9.
- (219) Chronopoulou E, Carayanniotis G. H-2E(k) expression influences thyroiditis induction by the thyroglobulin peptide (2495-2511). *Immunogenetics* 1993;38(2):150-3.
- (220) Texier B, Bedin C, Tang H, Camoin L, Laurent-Winter C, Charreire J. Characterization and sequencing of a 40-amino-acid peptide from human thyroglobulin inducing experimental autoimmune thyroiditis. *J Immunol* 1992 Jun 1;148(11):3405-11.
- (221) Rao VP, Balasa B, Carayanniotis G. Mapping of thyroglobulin epitopes: presentation of a 9mer pathogenic peptide by different mouse MHC class II isotypes. *Immunogenetics* 1994;40(5):352-9.
- (222) Braley-Mullen H, Sharp GC. A thyroxine-containing thyroglobulin peptide induces both lymphocytic and granulomatous forms of experimental autoimmune thyroiditis. *J Autoimmun* 1997 Dec;10(6):531-40.
- (223) Verginis P, Carayanniotis G. Experimental autoimmune thyroiditis (EAT) induced by the thyroglobulin peptide (2596-2608): influence of H-2 and non H-2 genes. *Autoimmunity* 2004 Sep;37(6-7):529-33.
- (224) Carayanniotis G, Chronopoulou E, Rao VP. Distinct genetic pattern of mouse susceptibility to thyroiditis induced by a novel thyroglobulin peptide. *Immunogenetics* 1994;39(1):21-8.
- (225) Rao VP, Carayanniotis G. Contrasting immunopathogenic properties of highly homologous peptides from rat and human thyroglobulin. *Immunology* 1997 Feb;90(2):244-9.
- (226) Chronopoulou E, Carayanniotis G. Identification of a thyroiditogenic sequence within the thyroglobulin molecule. *J Immunol* 1992 Aug 1;149(3):1039-44.
- (227) Champion BR, Page KR, Parish N, Rayner DC, Dawe K, Biswas-Hughes G, et al. Identification of a thyroxine-containing self-epitope of thyroglobulin which triggers thyroid autoreactive T cells. *J Exp Med* 1991 Aug 1;174(2):363-70.
- (228) Brown NK, McCormick DJ, David CS, Kong YC. H2E-derived Ealpha52-68 peptide presented by H2Ab interferes with clonal deletion of autoreactive T cells in autoimmune thyroiditis. *J Immunol* 2008 May 15;180(10):7039-46.

- (229) Jacobson EM, Yang H, Menconi F, Wang R, Osman R, Skrabanek L, et al. Employing a recombinant HLA-DR3 expression system to dissect major histocompatibility complex II-thyroglobulin peptide dynamism: a genetic, biochemical, and reverse immunological perspective. *J Biol Chem* 2009 Dec 4;284(49):34231-43.
- (230) Muixi L, Alvarez I, Jaraquemada D. Peptides presented in vivo by HLA-DR in thyroid autoimmunity. *Adv Immunol* 2008;99:165-209.
- (231) Flynn JC, McCormick DJ, Brusica V, Wan Q, Panos JC, Giraldo AA, et al. Pathogenic human thyroglobulin peptides in HLA-DR3 transgenic mouse model of autoimmune thyroiditis. *Cell Immunol* 2004 Jun;229(2):79-85.
- (232) Dawe KI, Hutchings PR, Geysen M, Champion BR, Cooke A, Roitt IM. Unique role of thyroxine in T cell recognition of a pathogenic peptide in experimental autoimmune thyroiditis. *Eur J Immunol* 1996 Apr;26(4):768-72.
- (233) Dai YD, Rao VP, Carayanniotis G. Enhanced iodination of thyroglobulin facilitates processing and presentation of a cryptic pathogenic peptide. *J Immunol* 2002 Jun 1;168(11):5907-11.
- (234) Rao VP, Kajon AE, Spindler KR, Carayanniotis G. Involvement of epitope mimicry in potentiation but not initiation of autoimmune disease. *J Immunol* 1999 May 15;162(10):5888-93.
- (235) The Jackson Laboratory. JAX Mice database. <http://jaxmice.jax.org/query> . 2013.
Ref Type: Online Source
- (236) Petersen B, Petersen TN, Andersen P, Nielsen M, Lundegaard C. A generic method for assignment of reliability scores applied to solvent accessibility predictions. *BMC Struct Biol* 2009;9:51.
- (237) Chubykin AA, Liu X, Comoletti D, Tsigelny I, Taylor P, Sudhof TC. Dissection of synapse induction by neuroligins: effect of a neuroligin mutation associated with autism. *J Biol Chem* 2005 Jun 10;280(23):22365-74.
- (238) Thrasyvoulides A, Sakarellos-Daitsiotis M, Philippou G, Souvatzoglou A, Sakarellos C, Lymberi P. B-cell autoepitopes on the acetylcholinesterase-homologous region of human thyroglobulin: association with Graves' disease and thyroid eye disease. *Eur J Endocrinol* 2001 Aug;145(2):119-27.
- (239) Caturegli P, Mariotti S, Kuppers RC, Burek CL, Pinchera A, Rose NR. Epitopes on thyroglobulin: a study of patients with thyroid disease. *Autoimmunity* 1994;18(1):41-9.
- (240) Saboori AM, Caturegli P, Rose NR, Mariotti S, Pinchera A, Burek CL. Tryptic peptides of human thyroglobulin: II. Immunoreactivity with sera from patients with thyroid diseases. *Clin Exp Immunol* 1994 Dec;98(3):459-63.
- (241) Matthews SP, Werber I, Deussing J, Peters C, Reinheckel T, Watts C. Distinct protease requirements for antigen presentation in vitro and in vivo. *J Immunol* 2010 Mar 1;184(5):2423-31.

- (242) Vidard L, Rock KL, Benacerraf B. Heterogeneity in antigen processing by different types of antigen-presenting cells. Effect of cell culture on antigen processing ability. *J Immunol* 1992 Sep 15;149(6):1905-11.
- (243) Hutchings PR, Verma S, Phillips JM, Harach SZ, Howlett S, Cooke A. Both CD4(+) T cells and CD8(+) T cells are required for iodine accelerated thyroiditis in NOD mice. *Cell Immunol* 1999 Mar 15;192(2):113-21.
- (244) James JA, Gross T, Scofield RH, Harley JB. Immunoglobulin epitope spreading and autoimmune disease after peptide immunization: Sm B/B'-derived PPPGMRPP and PPPGIRGP induce spliceosome autoimmunity. *J Exp Med* 1995 Feb 1;181(2):453-61.
- (245) Deshmukh US, Lewis JE, Gaskin F, Dhakephalkar PK, Kannapell CC, Waters ST, et al. Ro60 peptides induce antibodies to similar epitopes shared among lupus-related autoantigens. *J Immunol* 2000 Jun 15;164(12):6655-61.
- (246) Thrasyvoulides A, Lymberi P. Evidence for intramolecular B-cell epitope spreading during experimental immunization with an immunogenic thyroglobulin peptide. *Clin Exp Immunol* 2003 Jun;132(3):401-7.

VIII.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Title: A novel pathogenic peptide of thyroglobulin (aa 2208-2207) able to induce direct experimental autoimmune thyroiditis in both, high and low responder mouse strains. [*Submitted for publication*]

Short Title: Direct EAT induction to high and low responder mice

Authors: Ioannis Kanistras, Aikaterini Hatzioannou, Peggy Lymberi

Affiliations: Immunology laboratory, Department of Biochemistry, Hellenic Pasteur Institute, 127 Vas. Sofias av., 11521 Athens, Greece

Corresponding Author: Dr. P. Lymberi

Postal address: Immunology laboratory, Department of Biochemistry, Hellenic Pasteur Institute, 127 Vas. Sofias av., 11521 Athens, Greece

Tel./Fax: +30 210 6478808

e-mail: plymberi@pasteur.gr

Keywords: experimental autoimmune thyroiditis, resistant/susceptible strains, high/low responders, pathogenic Thyroglobulin peptides, T-cell epitopes

Abstract

We have previously reported the first human Tg (hTg) peptide [p2340 (amino acids 2340-2359)] able to induce EAT in low responder (LR) mouse strains, by adoptive transfer of peptide-primed lymph node cells; the specific peptide was also pathogenic in high responder (HR) mice, after direct challenge. In this study we investigated the immunogenic and pathogenic potential of another 20mer hTg peptide, p2208 (amino acids 2208-2227), selected for its content in overlapping A^s, Ek, and Ab MHC class II binding motifs. We immunized LR BALB/c (H-2^d) and C57BL/6 (H-2^b) strains, as well HR CBA/J (H-2^k) and SJL/J (H-2^s) with 100nmol of p2208 in complete Freund's adjuvant (CFA) and collected their antisera, lymph nodes, and thyroid glands for further evaluation. The p2208 peptide was found to contain B-cell and non-dominant T-cell epitope(s) in two out of the four strains examined, one HR and one LR. Specifically, it elicited direct EAT in C57BL/6 (2/7 mice, infiltration index/I.I. 1-3) and in SJL/J (2/6, I.I. 1-2) mice, rendering it the first reported peptide able to induce EAT after direct challenge of LR mice. Such an EAT model could provide insights into the immunoregulatory cascades taking place in resistant hosts.

Introduction

Experimental Autoimmune Thyroiditis (EAT) is a T-cell mediated disease-model that resembles Hashimoto's thyroiditis (HT), in humans. EAT can be induced in mice upon immunisation with intact thyroglobulin (Tg) of any origin [1] (e.g. human Tg (hTg), mouse Tg (mTg)) or with Tg peptides in the presence of adjuvant [2, 3], or by adoptive transfer of Tg-primed lymph node cells (LNC). The responsiveness to mTg (thyroid gland cell mononuclear infiltration, anti-Tg antibody titers) classifies the animals in HR (susceptible) and LR (resistant) EAT responders, a characteristic associated with their H-2 haplotype; H-2^k, H-2^s and H-2^q for HR – the latter of intermediate susceptibility – and H-2^b, H-2^d and H-2^v for LR [4].

Throughout the last 20 years, studies on the pathogenic mechanisms of EAT have been described almost exclusively from HR wild type mouse strains. Out of the 34 peptides examined in these strains 17 were thyroiditogenic, whereas out of the 10 peptides examined in LR wild type mouse strains only 1, the 20-mer p2340 (a.a. 2340-2359), was able to induce EAT [5-17]. The specific peptide was identified in our laboratory among a panel of 48 available peptides spanning the C-terminal end of Tg and synthesised in the context of a previous study as targets of autoantibodies in patients with autoimmune thyroid disease [18]. P2340 was pathogenic to the LR strains C57BL/6 (H-2^b) and BALB/c (H-2^d) via the adoptive transfer of syngeneic peptide-primed LNCs and to HR strains SJL/J (H-2^s) and CBA/J (H-2^k) by direct challenge [17]. The above data demonstrate the lack of pathogenic peptides in LR strains, which in turn hampers the study of the EAT mechanisms in these mice and their comparison with the mechanisms that define the HR strains.

In the present study we investigated the induction of EAT in LR and HR strains by the use of another 20mer peptide, namely p2208 (aa 2208-2227). This peptide was previously characterised as target of autoantibodies in patients with autoimmune thyroid diseases [18] and was considered to be the most appropriate candidate for the study, due to the predicted rich content in overlapping LR MHC- and HR MHC-binding motifs it encompassed.

Materials and Methods

Animals and Antigens

BALB/c (H-2^d), C57BL/6 (H-2^b), CBA/J (H-2^k) and SJL/J (H-2^s) mice were kept under specific pathogen-free conditions in the Experimental Animal Unit of the Hellenic Pasteur Institute. All animal procedures were approved by National Authorities and conformed to European Community guidelines. The hTg peptide QFLGVPYAAPPLAERRFQAP (p2208) (a.a.2208-2227) was synthesized by JPT Peptide Technologies GmbH (Berlin, Germany) and the control hTg peptide PYEFSRKVPTFATPWPDPFVP (p2652) (a.a. 2652-2671) by Genosys Biotechnologies (Cambridge, UK). Both peptides were synthesized in >80% purity, as verified by High Performance Liquid Chromatography (HPLC), with their N- and C-terminal ends either blocked by acetyl and amide groups, respectively, for use in immunisations and assays, or, unblocked for production of immunoabsorbent. The amino acid sequences are assigned in accordance with the revised hTg sequence by Van de Graaf et al. [19]. Tg was purified from surgically removed human thyroid glands as previously described [20].

MHC binding prediction and accessibility analysis of p2208

The ability of p2208 to bind to MHC molecules was predicted by the use of the specific motifs described by Altuvia et al. [21], as well as the online database RANKPEP [22]. The peptide was further analysed according to its chemical composition, in terms of its accessibility on the tertiary structure of the Tg molecule, by NetSurfP, a computational protein surface accessibility analysis [23].

T-cell proliferation assays

Proliferation assays of LNCs were performed as previously described [17]. Briefly, mice were immunised subcutaneously (s.c.) at both the tail base and the back with 100 nmol p2208, or with 75 µg hTg emulsified in complete Freund's adjuvant (CFA) (Sigma, MO, USA). Nine days later, their inguinal, brachial and axillary lymph nodes (LNs) (pooled from three mice) were aseptically collected and single-cell suspensions were prepared in Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium (DMEM) (Biochrom, Cambridge, UK) supplemented with 10% heat-

inactivated fetal bovine serum (Gibco, Scotland, UK) (complete medium – cDMEM), 20 mM HEPES buffer (Biochrom, Berlin, Germany), 2 mM L-glutamine (Gibco, Scotland, UK), 0.5 mM sodium pyruvate (Gibco, Scotland, UK), 0.2% sodium bicarbonate (Gibco), 5x10⁵ IU streptomycin (KOPER, Athens, GR), 5x10⁵ IU penicillin (KOPER, Athens, GR), 5x10⁻⁵ M β-mercaptoethanol (Sigma). Cells were centrifuged, washed and subsequently cultured at 37°C in a 5% CO₂, 95% air humidified incubator, either for the measurement of cytokine production (2x10⁶ p2208-primed cells/well in 1 ml) in 24-well culture plates for 48 h with antigen (p2208, or control p2652), or for proliferation assays (4x10⁵ cells/well in 200 µl) in flat-bottomed 96-well plates (Orange Scientific, Braine-l' Alleud, Belgium) for 3 days with serial two-fold dilutions of antigens (p2208, or hTg, or the control peptide). Eighteen hours prior the the 3 day incubation, 1 µCi [3H]thymidine (25 Ci/mmol – Amersham Pharmacia, Stockholm, Sweden) in 20 µl cDMEM was added per well. The incorporated radioactivity was measured using the 1450 microbeta Trilux counter (Wallac, Turku, Finland). The Stimulation Index (S.I.) was assessed by the fraction of counts per minute (cpm) in the presence of antigen divided by the cpm in the absence of antigen, and any differences above or equal to 3 orders of magnitude were regarded as positive.

Measurement of cytokines by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Cytokine production in harvested supernatants of p2208-primed LNC cultures was determined by ELISA. The levels of interleukin (IL)- 2, IL-4, interferon-γ (IFN-γ) and tumour necrosis factor alpha (TNF-α) were determined by the ELISA-Ready-SET-Go kit (eBioscience, San Diego, CA. USA) according to the manufacturer's protocol.

Induction and evaluation of EAT

Mice were challenged (s.c.) at the tail base with 100nmol of p2208 in CFA emulsion, and boosted 21 days later with 50 nmol of peptide in incomplete Freund's adjuvant (IFA) (Sigma). Thirty-five days after the initial immunisation, antisera were collected for ELISA, and the thyroid glands were removed for EAT assessment, along with the kidney, liver and spleen. Organs were fixed in 10%

formalin fixative for 24 h at room temperature and then placed to a fluid-transfer tissue processor (Leica, Solms, Germany). Samples were then dehydrated in increasing concentrations of ethanol solutions, cleaned in xylene (Surgipath, Richmond, UK) and embedded in paraffin (Paraplast, Tyco Healthcare Group LP, Mansfield, MA) for sectioning. Serial 4 μm sections were produced across the entire gland with a microtome blade RM2135 (Leica) and stained with haematoxylin Harris and eosin (BDH, Poole, UK) for observation under the optical microscope. The mononuclear cell infiltration index (I.I.) of the thyroid gland was scored as follows: 0 = no infiltration, 1 = interstitial accumulation of cells between two or three follicles, 2 = one or two foci of cells at least the size of one follicle, 3 = extensive infiltration 10-40% of total area, 4 = 40-80% of total area, and 5 = >80% of total area.

Detection of peptide-specific antibodies by ELISA

Sera collected from p2208-immunised mice were tested with ELISA for their reactivity against the autologous (immunising) antigen, intact hTg and control p2652 peptide. Briefly, the wells of polystyrene microtitre plates (Nunc, Roskilde, Denmark) were coated with 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of p2208 and control peptides or 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of intact hTg in carbonate-bicarbonate buffer 0.1 M, pH 9.3, (incubated for 1 h at 37°C and overnight at 4°C), washed with PBS and blocked for 1 h with 0.1% bovine serum albumin (BSA) in PBS. Samples were incubated at three-fold dilutions (1/50, 1/150, 1/450) for 2 h at 37°C, the wells were washed and then 100 μl of an alkaline phosphatase-conjugated goat anti-mouse IgG secondary antibody (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS-BSA-Tween) (Merck) were added per well, followed by 1 h incubation at 37°C. The enzymic chromogen substrate p-nitrophenyl phosphate (Sigma) was added and the light absorbance at 405 nm of the p-nitrophenolate product was measured on an Expert Plus microplate reader (Asys, Eugendorf, Austria)

Depletion of p2208 specific antibodies from antisera

In order to examine the reactivity of antisera derived from the p2208-immunised LR C57BL/6 mice against hTg, a p2208 immunoadsorbent was produced, according to an established protocol [24-26]. Briefly, 1 ml of glutaraldehyde activated

polyacrylamide-agarose beads Ultrogel AcA3.4 (IBF biotechnics, Villeneuve-la-Garenne, France) were incubated with 800 µg of p2208, for 3 days, at room temperature. The final amount of bound peptide was evaluated by O.D. measurement of the resulting supernatant at 280 nm. 300 µl of pooled sera from 4 p2208-immunised C57BL/6 mice were incubated with gentle stirring for 2 h at room temperature with the immunoabsorbent. The bound anti-p2208 antibodies were eluted by 0.2 N HCl-glycine pH 2.8 treatment (Merck), until no significant OD (<0.040) was detected. The whole procedure was repeated four times in order to ensure all anti-p2208 antibodies were removed from the pooled sera. The reactivity of the remainder anti-p2208-depleted pooled sera against hTg was evaluated by ELISA.

Statistical analysis

The Mann-Whitney U-test was used to identify significant differences in cellular proliferation between experimental and control wells. A P-value ≤ 0.05 was considered to be statistically significant.

Results

P2208 is a potential T-cell epitope

In order to examine the suitability of the peptide for this particular study, as well as to select potentially responsive to the peptide mouse strains, two computational analyses were conducted on p2208, namely RANKPEP and the algorithms described by Altuvia et al.. The concept of RANKPEP is that peptides that bind to a given MHC molecule share sequence similarities that can be classified, according to given scoring profiles and predict the MHC-peptide binding [22]. On the other hand, the algorithms described by Altuvia et al. indicate the existence of A^k and E^k binding motifs. The specific algorithms are also based on a similar notion to RANKPEP, they are only, however, restricted to Ak and Ek MHC molecules [21]. The analysis on p2208 predicted that it contains three A^b and one A^s binding motifs according to the online RANKPEP database (table 1). The motifs were highly overlapping and particularly the As and one of the Ab motifs which differed by one amino acid. On the other hand, the algorithms described by Altuvia et al. indicated

the existence of four E^k binding motifs, three of which are almost identical to each other, and no A^k binding motifs. In general, the two analyses, despite revealing partially overlapping epitopes when compared to each other, indicated that p2208 may bind to MHC molecules of both HR and LR strains.

Peptide p2208 is immunogenic at the T-cell level

Based on the above findings, 100 nmol p2208 were primarily administered s.c. to the SJL/J (H-2^s), C57BL/6 (H-2^b) and CBA/J (H-2^k) strains, but also to one more resistant [BALB/c (H-2^d)] mouse strain. Their LNCs were cultured in vitro in the presence of serial dilution of p2208 and control peptide. P2208 was found to induce significant (9 µM of p2208 have an S.I. of 32.49 on SJL/J mice and 6.63 on C57BL/6 mice), dose-dependent proliferation of LNC only from SJL/J and C57BL/6 mice, as shown in Figure 1 (U=9, p<0.05), whereas no response was detected on the LNC from CBA/J and BALB/c mice (data not shown). The proliferation was specific for p2208, as no response was detected in the presence of the control peptide (maximum S.I. obtained on both strains was 1.8). Similarly, LNCs from p2208-primed mice did not proliferate in the presence of mTg and hTg (figure 1), excluding, therefore, the possibility of a dominant epitope being present within its sequence. Indeed, the epitope contained within its sequence is a cryptic epitope, since hTg-primed LNCs did not proliferate in the presence of p2208 (data not shown). We conclude that p2208 is immunogenic in both HR and LR mouse strains.

P2208 elicits a Th1 type of response

In order to elucidate the subset of the in vitro proliferating T-cells (type 1/2 T-helper cells – Th1/Th2), LNC from p2208-primed SJL/J and C57BL/6 mice were cultured in the presence or absence of p2208 or control peptide p2652, 48 h later supernatants were gathered and the levels of IL-2, IL-4, IFN-γ and TNF-β were determined by ELISA. IL-2 and IFN-γ were detected on both strains examined, whereas no IL-4 and TNF-β was measured (figure 2), as expected, since the onset of the disease is defined by a Th1 response [27]. On the SJL/J mice 515.26 pg/ml IL-2 and 60.73 pg/ml IFN-γ were detected, whereas the respective levels on

C57BL/6 mice were 202.42 pg/ml and 163.45 pg/ml, suggesting no clear correlation among high and low responder mouse strains and their cytokines production and no safe conclusion could be drawn on the significance of an over-/under-expression of a certain cytokine to the p2208-induced EAT.

P2208 can induce direct EAT in HR and LR mouse strains

The immunogenicity elicited by p2208 encouraged further testing towards its pathogenicity in HR (SJL/J), as well as in LR (C57BL/6) mouse strains. Six to seven mice were tested per strain and their thyroid gland I.I. was assessed 5 weeks post immunisation with p2208 (figure 3). P2208 conferred direct EAT not only to the HR SJL/J (2/6, highest I.I.=2, mean I.I.=0.5), but also to the LR C57BL/6 (2/7, highest I.I.=3, mean I.I.=0.54) (table 2). Representative thyroid gland sections are shown in figure 3. The pathology was organ-specific due to the absence of any mononuclear infiltrating cells in kidney, liver and spleen (data not shown). It is evident that p2208 is thyroiditogenic in both HR and LR mouse strains.

Antibody production against p2208 by HR and LR peptide-primed mice

Preimmune sera and sera from immunised mice with p2208 collected at day 0 and day 35 of EAT induction were investigated by ELISA in terms of their antibody reactivity against p2208 and hTg. Specific anti-p2208 antibodies were detected in five out of the seven C57BL/6 mice, and in two out of the six SJL/J mice inspected, the latter presenting, though, lower reactivity (figure 4B). Pre-immune sera, or sera from p2208-primed mice presented no reactivity against the control peptide. Noticeably, two out of the five seropositive LR C57BL/6 mice also exhibited reactivity against the whole hTg molecule (figure 4A). The above findings clearly reveal the existence of B-cell epitopes within p2208 sequence.

P2208 does not induce B-cell epitope spreading

In order to investigate whether the anti-p2208 antibodies in the sera collected from immunised mice recognise p2208 on the epitope of the whole Tg molecule, or other surface epitopes due to epitope spreading, anti-sera from C57BL/6 mice presenting with the higher reactivity against p2208 were pooled and depleted from

p2208-specific antibodies using an immunoabsorbent. Out of the 800 µg of p2208, 451 µg were bound on the beads of the immunoabsorbent, as measured by O.D. In order to compensate for the small volume of the beads (1 ml) each elution was followed by a new incubation of the washed sample for a total of four times. The efficacy of the anti-p2208 removal from the anti-sera was documented by the minimal reactivity against p2208 of the unbound portion of the anti-sera (figure 5). Interestingly, when the specific anti-p2208 antibodies were removed from the anti-sera, the reactivity against hTg was minimised and was similar to the pre-immune reactivity (figure 5). This suggests that the anti-p2208 antibodies are solely accounted for the hTg recognition, their removal eliminates any reactivity, and no epitope spreading is induced by p2208.

Discussion

The goal of the present study was the investigation of the pathogenic potential of the peptide p2208 to HR and LR mouse strains, driven by the rich HR- and LR-MHC binding motifs it encompassed. The particular peptide was found to be immunogenic and pathogenic on HR (SJL/J, H-2^s), as well as on LR (C57BL/6, H-2^b) mouse strains, bearing, however, cryptic epitopes. Moreover, the immunisation of mice with p2208 triggered the production of specific anti-p2208. Such a model can provide the basis for the understanding of the defences breached in LR strains and lead to EAT induction.

Up to date, 22 pathogenic peptides able to induce EAT have been described, out of the total 70 that have been analysed. The candidate peptides were principally obtained by the use of algorithms predicting the binding of peptides to mouse MHC II molecules, with the exception of 2 pathogenic peptides, hT4(5) (a.a. 1-12) and hT4(2553) (a.a. 2549-2560), which were chosen due to the homonogenic site that laid within their sequence [9]. Recently, 5 new Tg peptides were chosen for further analysis, due to their localisation near cathepsin cleavage sites, along with their Ak binding motif content, bringing the total number of examined peptides up to 75. Two out of the above 5 peptides induced EAT to HR mouse strains [28]. The predictive value of such tools appears evident; however, in large molecules such as Tg the potential epitopes that may rise from its processing are numerous and

therefore a motif-based analysis may be more appropriate for screening-out peptides, rather than for selecting them. In our case, the algorithms applied to p2208 predicted its potential binding to three different MHC molecules, but it turned out to be immunogenic only in two of the corresponding mouse strains that carry these haplotypes. Another candidate peptide that was tested in our laboratory and has emerged from the same study as p2208 and selected by the use of algorithm-based analysis, p2352 (a.a. 2352-2371), despite bearing E^k motifs, was not immunogenic in the corresponding mouse strains (AKR/J and CBA/J) (data not shown). Remarkably, the vast majority of the non-immunogenic peptides studied up to date, also emerged by similar computational analyses, with the exception of only 3 peptides, chosen either due to the sequence similarity to thyroid peroxidase (TPO) [8, 9, 29], or as products of oxidative cleavage of the Tg molecule [30]. All the above findings are not in disparagement of the predictive values of the algorithms, but indicate that they are not a rule of thumb.

In this study a Tg peptide is found for the first time to induce direct EAT with the same severity and without discriminating between HR and LR mouse strains. Only one more peptide has been reported up to date to induce EAT to LR mice, however not in a direct manner. Specifically, in a previous study of our laboratory the peptide p2340 (2340-2359) has been described to induce proliferative responses to peptide-primed LNCs from CBA/J, SJL/J, BALB/c and C57BL/6 mice, as well as direct EAT to the HR CBA/J and SJL/J strains. Adoptive transfer of syngeneic LNCs, in vivo and in vitro primed with p2340, induced EAT to the LR BALB/c and C57BL/6 [17]. The group of Kong has described the induction of EAT by peptides mTg409 (aa 409-423) and mTg1677 (aa 1677-1692) to an H2A-E+ transgenic mouse model on LR (C57BL/10) genetic background, that carries the otherwise not normally expressed Eb MHC molecule [31].

Since p2208 is a 20mer peptide, the possibility exists that shorter, minimal epitopes within its sequence are responsible for the pathogenicity observed to both HR and LR mice. Such an epitope mapping has been performed by our laboratory on another hTg peptide, p2340 (a.a. 2340-2359), where overlapping nonamer and octamer peptides spanning its sequence were synthesised and analysed in terms of their immunogenicity and antigenicity. This study revealed a distinct minimal

epitope of p2340, namely 2344-2352, that was, however, antigenic and pathogenic only in HR strains [32]. It seemed that the flanking residues of the specific epitope were essential in retaining its pathogenic nature in the LR strains, pointing, therefore, towards a 20mer approach of EAT pathogenesis.

P2208 was not found to encompass any dominant epitopes in the examined SJL/J and C57BL/6 mouse strains, since peptide- or Tg-primed LNC did not proliferate in the presence of Tg or peptide respectively. Such a finding is in accordance with other reports on the field where a dominant epitope was not detected [12, 13, 33]. Perhaps in the case of Tg, the in vivo and in vitro processing may differ, rendering thus the detection of such dominant epitopes by the use of the established methods very difficult. In any case, a dominant epitope might seem utopic, due to the possibility of a synergistic effect of numerous epitopes taking place, compensating, therefore, for the large size of Tg and the low concentration of a certain peptide to be presented after processing [12].

In terms of immunogenicity at the B-cell level, it seems that p2208 was able to initiate the production of antibodies recognising the immunising peptide. Moreover, anti-sera from immunised mice also reacted with the whole Tg molecule. Similar results from five Tg-peptides described by other research teams, have also documented anti-sera reactivity against both the immunising peptide and the whole Tg molecule [8, 15, 30, 34, 35]. The above data indicate that a given peptide is either highly accessible on the quaternary structure of Tg, or it induces B-cell epitope spreading. In the case of p2208, the recognition of both antigens was not due to epitope spreading, since removal of the anti-p2208 antibodies from the pooled serum of four peptide-immunised C57BL/6 mice resulted in a dramatic decrease of reactivity against the whole hTg molecule. Interestingly, as depicted by the NetSurfP analysis on p2208, the amino- and carboxy-terminal of the peptide are highly exposed and possibly easily accessible on the quaternary structure of Tg (data not shown), which can account for the production of the specific antibodies.

Our effort to identify a new pathogenic determinant of hTg led to the highly potent p2208 peptide, which does not discriminate between the EAT-HR and LR mouse strains. Through further investigation of the autoimmune reaction mounted by

p2208, a new EAT model for resistant mouse strains can emerge, providing the understanding of the pathogenic mechanisms involved in EAT in LR strains.

References

1. Charreire J. Immune mechanisms in autoimmune thyroiditis. *Adv Immunol* 1989;46:263-334.
2. Rose NR, Twarog FJ, Crowle AJ. Murine thyroiditis: importance of adjuvant and mouse strain for the induction of thyroid lesions. *J Immunol* 1971;106:698-704.
3. Esquivel PS, Rose NR, Kong YC. Induction of autoimmunity in good and poor responder mice with mouse thyroglobulin and lipopolysaccharide. *J Exp Med* 1977;145:1250-63.
4. Vladutiu AO, Rose NR. Autoimmune murine thyroiditis relation to histocompatibility (H-2) type. *Science* 1971;174:1137-9.
5. Texier B, Bedin C, Tang H, Camoin L, Laurent-Winter C, Charreire J. Characterization and sequencing of a 40-amino-acid peptide from human thyroglobulin inducing experimental autoimmune thyroiditis. *J Immunol* 1992;148:3405-11.
6. Rao VP, Balasa B, Carayanniotis G. Mapping of thyroglobulin epitopes: presentation of a 9mer pathogenic peptide by different mouse MHC class II isotypes. *Immunogenetics* 1994;40:352-9.
7. Carayanniotis G, Chronopoulou E, Rao VP. Distinct genetic pattern of mouse susceptibility to thyroiditis induced by a novel thyroglobulin peptide. *Immunogenetics* 1994;39:21-8.
8. Kong YC, McCormick DJ, Wan Q, et al. Primary homonogenic sites as conserved autoepitopes on thyroglobulin in murine autoimmune thyroiditis. Secondary role of iodination. *J Immunol* 1995;155:5847-54.
9. Wan Q, Motte RW, McCormick DJ, et al. Primary homonogenic sites as conserved autoepitopes on thyroglobulin in murine autoimmune thyroiditis: role of MHC class II. *Clin Immunol Immunopathol* 1997;85:187-94.

10. Braley-Mullen H, Sharp GC. A thyroxine-containing thyroglobulin peptide induces both lymphocytic and granulomatous forms of experimental autoimmune thyroiditis. *J Autoimmun* 1997;10:531-40.
11. Rao VP, Carayanniotis G. Contrasting immunopathogenic properties of highly homologous peptides from rat and human thyroglobulin. *Immunology* 1997;90:244-9.
12. Verginis P, Stanford MM, Carayanniotis G. Delineation of five thyroglobulin T cell epitopes with pathogenic potential in experimental autoimmune thyroiditis. *J Immunol* 2002;169:5332-7.
13. Flynn JC, McCormick DJ, Brusic V, et al. Pathogenic human thyroglobulin peptides in HLA-DR3 transgenic mouse model of autoimmune thyroiditis. *Cell Immunol* 2004;229:79-85.
14. Verginis P, Carayanniotis G. Experimental autoimmune thyroiditis (EAT) induced by the thyroglobulin peptide (2596-2608): influence of H-2 and non H-2 genes. *Autoimmunity* 2004;37:529-33.
15. Li HS, Carayanniotis G. Iodination of tyrosyls in thyroglobulin generates neoantigenic determinants that cause thyroiditis. *J Immunol* 2006;176:4479-83.
16. Li HS, Jiang HY, Carayanniotis G. Modifying effects of iodine on the immunogenicity of thyroglobulin peptides. *J Autoimmun* 2007;28:171-6.
17. Hatzioannou A, Liakata E, Karras E, Thrasyvoulides A, Alevizaki M, Lymberi P. Pathogenicity of a human thyroglobulin peptide (2340-2359) in mice with high or low genetic susceptibility to thyroiditis. *Immunology* 2007;122:343-9.
18. Thrasyvoulides A, Sakarellos-Daitsiotis M, Philippou G, Souvatzoglou A, Sakarellos C, Lymberi P. B-cell autoepitopes on the acetylcholinesterase-homologous region of human thyroglobulin: association with Graves' disease and thyroid eye disease. *Eur J Endocrinol* 2001;145:119-27.
19. van de Graaf SA, Ris-Stalpers C, Pauws E, Mendive FM, Targovnik HM, de Vijlder JJ. Up to date with human thyroglobulin. *J Endocrinol* 2001;170:307-21.
20. Schardt CW, McLachlan SM, Matheson J, Smith BR. An enzyme-linked immunoassay for thyroid microsomal antibodies. *J Immunol Methods* 1982;55:155-68.

21. Altuvia Y, Berzofsky JA, Rosenfeld R, Margalit H. Sequence features that correlate with MHC restriction. *Mol Immunol* 1994;31:1-19.
22. Reche PA, Reinherz EL. Prediction of peptide-MHC binding using profiles. *Methods Mol Biol* 2007;409:185-200.
23. Petersen B, Petersen TN, Andersen P, Nielsen M, Lundegaard C. A generic method for assignment of reliability scores applied to solvent accessibility predictions. *BMC Struct Biol* 2009;9:51.
24. Guilbert B, Dighiero G, Avrameas S. Naturally occurring antibodies against nine common antigens in human sera. I. Detection, isolation and characterization. *J Immunol* 1982;128:2779-87.
25. Ternynck T, Avrameas S. Polyacrylamide-protein immunoabsorbents prepared with glutaraldehyde. *FEBS Lett* 1972;23:24-8.
26. Ternynck T, Weston P, Guilbert B, Avrameas S. [A new process for the preparation of insoluble proteins and of proteins coupled with peroxidase]. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 1972;123:146-7.
27. Simon LL, Krco CJ, David CS, Kong YM. Characterization of the in vitro murine T-cell proliferative responses to murine and human thyroglobulins in thyroiditis-susceptible and -resistant mice. *Cell Immunol* 1985;94:243-53.
28. Kolypetri P, Jiang H, Carayanniotis G. Identification of pathogenic T cell epitopes near cathepsin cleavage sites in thyroglobulin. *J Immunol* 2013;190:1466-71.
29. Hoshioka A, Kohno Y, Katsuki T, et al. A common T-cell epitope between human thyroglobulin and human thyroid peroxidase is related to murine experimental autoimmune thyroiditis. *Immunol Lett* 1993;37:235-9.
30. El Hassani RA, Estienne V, Blanchin S, et al. Antigenicity and immunogenicity of the C-terminal peptide of human thyroglobulin. *Peptides* 2004;25:1021-9.
31. Brown NK, McCormick DJ, Brusica V, David CS, Kong YC. A novel H2A-E+ transgenic model susceptible to human but not mouse thyroglobulin-induced autoimmune thyroiditis: identification of mouse pathogenic epitopes. *Cell Immunol* 2008;251:1-7.
32. Hatzioannou A, Alevizaki M, Carayanniotis G, Lymberi P. Fine epitope mapping within the pathogenic thyroglobulin peptide 2340-2359: minimal

- epitopes retaining antigenicity across various MHC haplotypes are not necessarily immunogenic. *Immunology* 2012;135:245-53.
33. Chronopoulou E, Carayanniotis G. Identification of a thyroiditogenic sequence within the thyroglobulin molecule. *J Immunol* 1992;149:1039-44.
34. Chronopoulou E, Carayanniotis G. H-2E(k) expression influences thyroiditis induction by the thyroglobulin peptide (2495-2511). *Immunogenetics* 1993;38:150-3.
35. Hatzioannou A, Liakata E, Karras E, Thrasyvoulides A, Alevizaki M, Lymberi P. Pathogenicity of a human thyroglobulin peptide (2340-2359) in mice with high or low genetic susceptibility to thyroiditis. *Immunology* 2007;122:343-9.

Abbreviations:

Hashimoto's thyroiditis: HT, high responder: HR, low responder: LR, Experimental Autoimmune Thyroiditis: EAT, thyroglobulin: Tg, human Tg: hTg, mouse Tg: mTg, lymph node cell: LNC, High Performance Liquid Chromatography: HPLC, Complete Freund's Adjuvant: CFA, Incomplete Freund's Adjuvant: IFA, subcutaneously: s.c., complete medium – cDMEM: DMEM supplemented with 10% heat-inactivated FBS, Enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA, interleukin-2: IL-2, interleukin-4: IL-4, interferon- γ : IFN- γ , tumour necrosis factor alpha: TNF- α , phosphate buffer saline: PBS, bovine serum albumin: BSA, type 1 T-helper cells: Th1, type 2 T-helper cells: Th2

Legends:

Figure 1: Assessment of p2208 immunogenicity on SJL/J (A) and C57BL/6 (B) mice. The proliferative responses of peptide-primed LNC (A) to serial two-fold dilutions (9-0.14 μ M) of p2208 (\blacklozenge), hTg (\blacktriangle) and control p2652 (\square) were evaluated according to their S.I. and were regarded as positive when equal to 3 or greater. Mice were challenged s.c. with 100nmol peptide or 75 μ g Tg, LNC were collected 9 days later and were cultured in vitro in the presence or absence of the antigens for 3 days. Results are representative of three separate experiments. Error bars represent S.D of duplicate wells and the results are representative of three independent experiments. Background cpm ranged from 300 to 1000.

Figure 2: IL-2 and IFN- γ levels (pg/ml) in the supernatants of p2208-primed LNC from SJL/J and C57BL/6 mouse, in the presence of the respective peptide. Mice were immunised with 100nmol of p2208 and 9 days later their LNC were collected and cultured for 48 hours at the presence of 4.4 μ M of p2208. The cytokine concentration was calculated according to the standard curve of the respective cytokine and the manufacturer's protocol. Error bars represent S.D. of duplicate wells and the results are representative of three independent experiments.

Figure 3: Histological evaluation of mouse thyroid glands post-EAT induction by p2208 on HR and LR mouse strains. Serial 4 μ m sections were obtained, with the above being the most representative examples. The mononuclear cell I.I. of the thyroid gland was scored as follows: 0 = no infiltration (a), 1 = interstitial accumulation of cells between two or three follicles (b, c), 2 = one or two foci of cells at least the size of one follicle (d), 3 = extensive infiltration 10-40% of total area (e). Magnification: x125.

Figure 4: IgG responses against p2208 and hTg. Sera were collected from A: SJL/J pre-immune (x) and p2208 immunised (●) mice and from B: C57BL/6 pre-immune (Δ) and p2208 immunised (\blacklozenge) mice and their reactivity was assessed against the immunising peptide (A1-B1) and hTg (A2-B2). Samples were incubated at three-fold dilutions (1/50 - 1/450) and in duplicate wells. Data are representative of three independent experiments. The reactivity of all pre-immune sera was undetectable.

Figure 5: Investigation of B-cell epitope spreading. Whole sera from immunised C57BL/6 mice were pooled (300 μ l) and their anti-p2208 antibodies were removed by passage through an immunoabsorbent. The reactivity of the whole sera (●) against hTg was compared with the sera depleted from anti-p2208 antibodies (non-bound sera ○) and the corresponding pre-immune pooled sample (x).

Tables

Table 1: MHC binding motifs

algorithm	binding motif	MHC molecule
Rankpep	QFLGVPYA APPLA ERRRFQAP	A ^s
Rankpep	QFLG VPYAAPPLA ERRRFQAP	A ^b
Rankpep	QFLGVPY AAPPLAER RFQAP	A ^b
Rankpep	Q FLGVPYAAP PLAERRRFQAP	A ^b
Altuvia motif a	QFLGVPY AAPPLAERR FQAP	E ^k
Altuvia motif c	QFLGVPY AAPPLAER RFQAP	E ^k
Altuvia motif c	QFLGVPYA APPLAER RFQAP	E ^k
Altuvia motif d	QFLGVPYAAP PLAERRF QAP	E ^k

Table 2: Infiltration index scoring

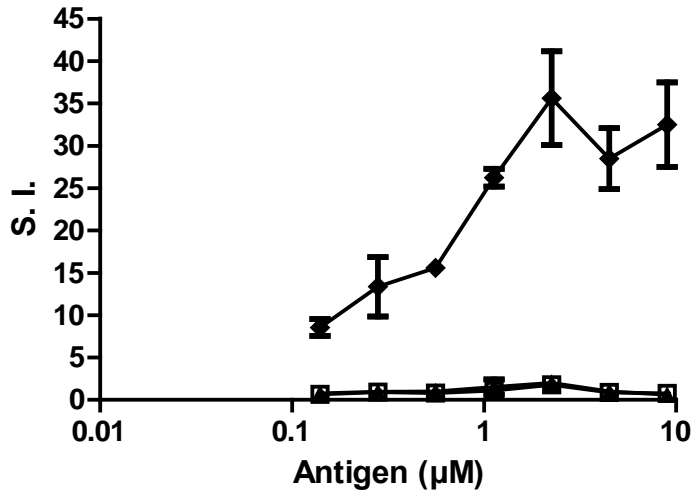
Mouse strain	I.I.				Mean ± SD	Mice with EAT
	0	1	2	3		
SJL/J	4	1	1	0	0.50 ± 0.84	2/6
CBA/J	7	0	0	0	0	0/7
C57BL/6	5	1	0	1	0.54 ± 1.13	2/7
BALB/c	7	0	0	0	0	0/7

Mice were s.c. challenged at the tale base with 100nmol of p2208 in CFA, and boosted 21 days later with 50nmol in IFA. Five weeks post the initial challenge EAT was assessed and their thyroid gland infiltration was scored as described in Material and Methods. All mice were immunised directly.

Figures

Figure 1:

A



B

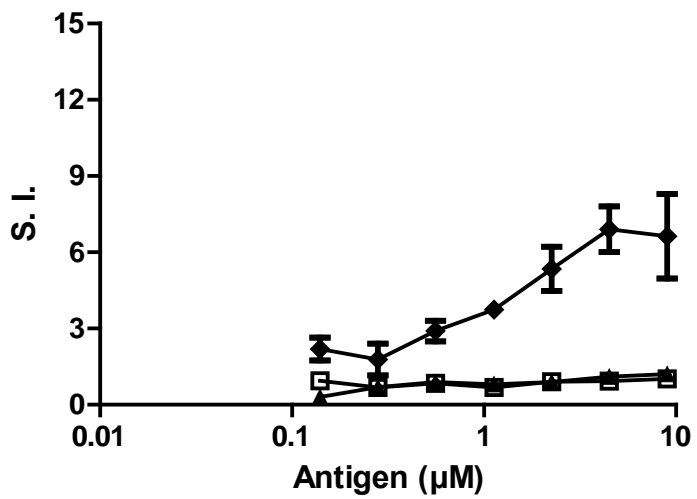


Figure 2:

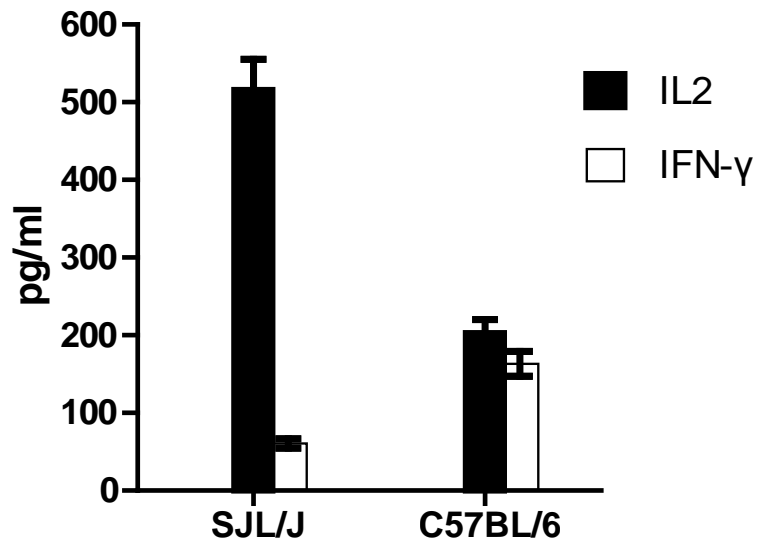


Figure 3:

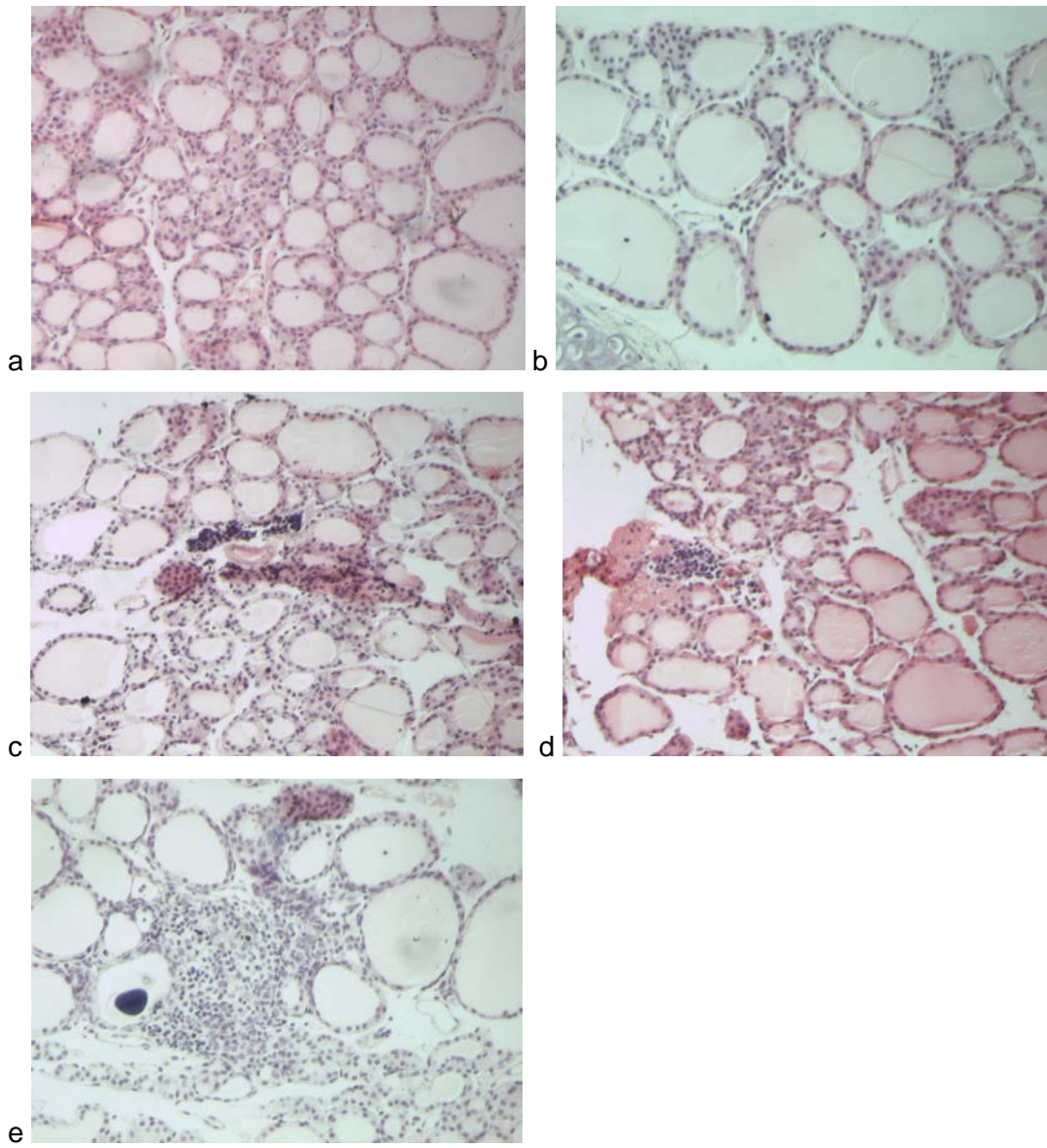


Figure 4:

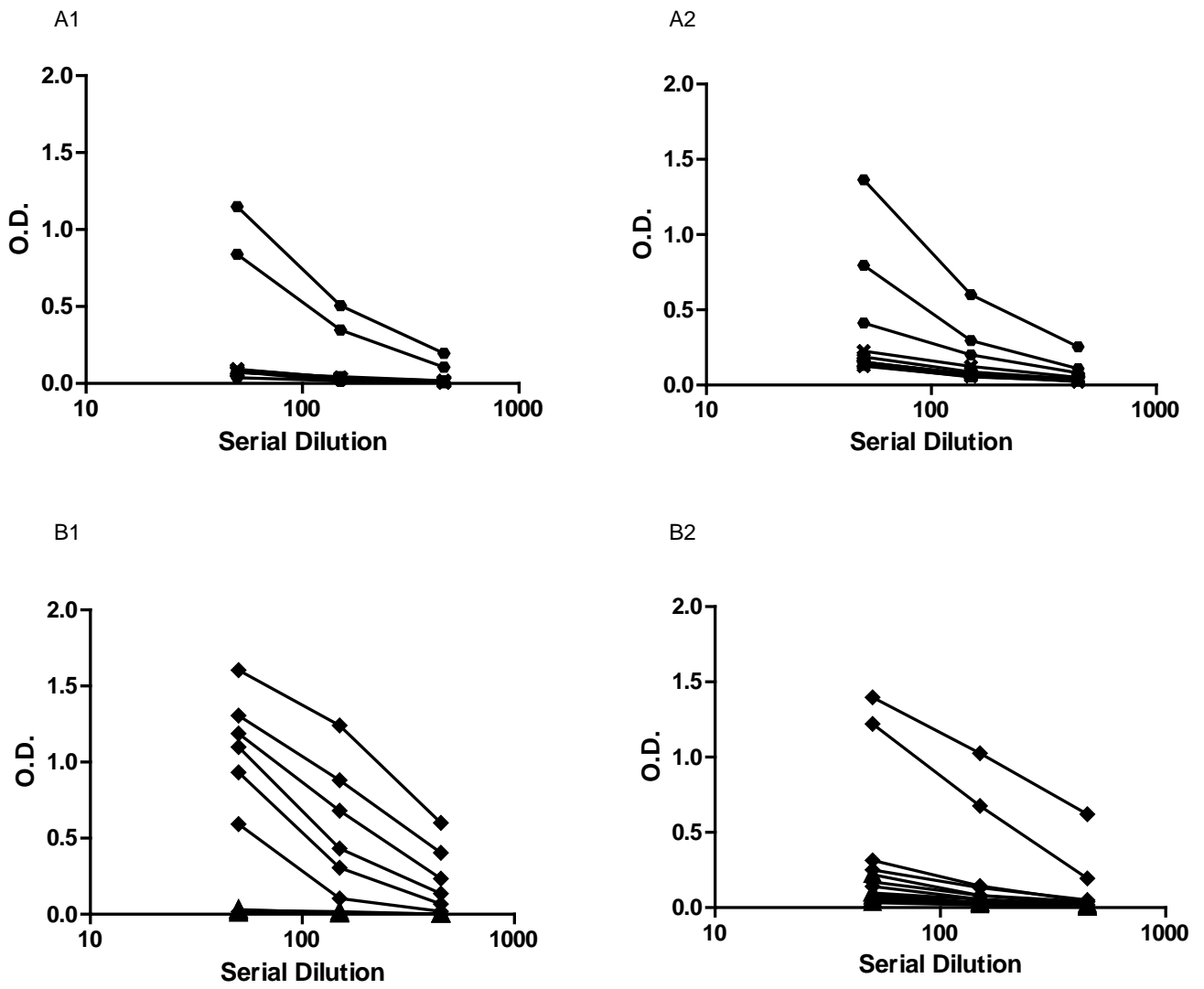


Figure 5:

