

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



025000200056



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

A
CIII

ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ PASTEUR
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑΣ

ΑΠΟΛΛΩΝΑ Α. ΘΡΑΣΥΒΟΥΛΙΔΗ
ΦΥΣΙΚΟΥ, ΒΙΟΛΟΓΟΥ, MSc

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΘΥΡΕΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ ΩΣ ΣΤΟΧΟΥ
ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΣΤΙΣ ΑΥΤΟΑΝΟΣΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΤΟΥ
ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΠΟΥ ΕΠΑΓΟΝΤΑΙ ΜΕ
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΣΗ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2002



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ PASTEUR
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑΣ

ΑΠΟΛΛΩΝΑ Α. ΘΡΑΣΥΒΟΥΛΙΔΗ
ΦΥΣΙΚΟΥ, ΒΙΟΛΟΓΟΥ, MSc

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΘΥΡΕΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ ΩΣ ΣΤΟΧΟΥ
ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΣΤΙΣ ΑΥΤΟΑΝΟΣΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΤΟΥ
ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΠΟΥ ΕΠΑΓΟΝΤΑΙ ΜΕ
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΣΗ

Η διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε

- στο Εργαστήριο Ανοσολογίας του Τμήματος Βιοχημείας του Ελληνικού Ινστιτούτου Pasteur (Υπεύθυνη Δρ ΠΗΓΗ ΛΥΜΠΕΡΗ) και
- στο Εργαστήριο Σύνθεσης, Δομής, Φασματοσκοπίας και Αλληλε-πιδράσεων των Βιομορίων του τομέα Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Καθηγήτρια ΜΑΡΙΑ ΣΑΚΑΡΕΛΛΟΥ-ΔΑΪΤΣΙΩΤΟΥ
Επιβλέπουσα Καθηγήτρια

Καθηγητής ΚΩΝ/ΝΟΣ ΣΑΚΑΡΕΛΛΟΣ

Επίκουρη Καθηγήτρια ΕΥΓΕΝΙΑ ΠΑΝΟΥ-ΠΟΜΩΝΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2002



...αποφασισμένη να μην αφήσει ποτέ την οικογένειά της, διότι η ζωή
...και η αγάπη της είναι εκεί. Η οικογένειά της είναι η βάση της ζωής της.
...και η αγάπη της είναι εκεί. Η οικογένειά της είναι η βάση της ζωής της.
...και η αγάπη της είναι εκεί. Η οικογένειά της είναι η βάση της ζωής της.
...και η αγάπη της είναι εκεί. Η οικογένειά της είναι η βάση της ζωής της.

...και η αγάπη της είναι εκεί. Η οικογένειά της είναι η βάση της ζωής της.
...και η αγάπη της είναι εκεί. Η οικογένειά της είναι η βάση της ζωής της.
...και η αγάπη της είναι εκεί. Η οικογένειά της είναι η βάση της ζωής της.
...και η αγάπη της είναι εκεί. Η οικογένειά της είναι η βάση της ζωής της.
...και η αγάπη της είναι εκεί. Η οικογένειά της είναι η βάση της ζωής της.
...και η αγάπη της είναι εκεί. Η οικογένειά της είναι η βάση της ζωής της.
...και η αγάπη της είναι εκεί. Η οικογένειά της είναι η βάση της ζωής της.
...και η αγάπη της είναι εκεί. Η οικογένειά της είναι η βάση της ζωής της.
...και η αγάπη της είναι εκεί. Η οικογένειά της είναι η βάση της ζωής της.
...και η αγάπη της είναι εκεί. Η οικογένειά της είναι η βάση της ζωής της.

Αφιερώνεται
στη μητέρα μου Ελένη
στον αδελφό μου Κώστα



Πρόλογος

Η παρούσα διδακτορική διατριβή αποτελεί τη συνέχεια της διπλωματικής εργασίας, η οποία εκπονήθηκε στα πλαίσια του μεταπτυχιακού διπλώματος ειδίκευσης στη "Χημεία Βιομορίων και Βιοχημεία" από το Τμήμα Χημείας του Παν/μίου Ιωαννίνων.

Την επίβλεψη-καθοδήγηση της διατριβής είχε η Δρ Π. Λυμπέρη, Υπεύθυνη του Εργαστηρίου Ανοσολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ, όπου και πραγματοποιήθηκε το μεγαλύτερο μέρος της εργαστηριακής εργασίας. Η εργαστηριακή εργασία που αφορούσε στη σύνθεση πεπτιδίων σε ραβδία και τη χαρτογράφηση επιτόπων στις αυτοάνοσες ασθένειες του θυρεοειδούς με χρήση αυτών των πεπτιδίων πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Σύνθεσης, Δομής, Φασματοσκοπίας και Αλληλεπιδράσεων των Βιομορίων του τομέα Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Οι οροί ασθενών προήλθαν από το Α' Ενδοκρινολογικό Τμήμα του Γενικού Νοσοκομείου "Αλεξάνδρα".

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την Δρα Πηγή Λυμπέρη για την καθοδήγηση και την στενή και πρόθυμη συνεργασία, καθώς και για την ηθική συμπαράσταση κατά την εκπόνηση της διατριβής. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την καθηγήτρια Μαρία Σακαρέλλου για την πολύτιμη βοήθεια και τη συμπαράστασή της, καθώς και τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής καθηγητή Κωνσταντίνο Σακαρέλλο και επίκουρη καθηγήτρια Ευγενία Πάνου-Πομώνη για τις σημαντικές παρατηρήσεις τους και γενικότερα τη συμβολή τους στην ολοκλήρωση της εργασίας. Τις θερμές μου ευχαριστίες απευθύνω στον Δρα Γ. Φιλίππου, Επιμελητή Α' και στον Δρα Α. Σουβατζόγλου, τέως Διευθυντή, στο Α' Ενδοκρινολογικό Τμήμα του Γενικού Νοσοκομείου "Αλεξάνδρα", για την παροχή του υλικού (οροί ασθενών) και την προθυμία τους να βοηθήσουν κάθε φορά που τους είχα ανάγκη. Ευχαριστώ ακόμα τον Δρα Δημήτρη Ματπούρα για την καθοδήγηση και τη συμπαράστασή του στο ξεκίνημα αυτής της προσπάθειας, τον καθηγητή Γιώργο Καραγιαννιώτη για τις χρήσιμες συμβουλές του, τον κ. Αποστόλη Μπαλάφα για τις συμβουλές και παρατηρήσεις του σε τεχνικά θέματα και τα



υπόλοιπα μέλη των δύο εργαστηρίων που, καθένας με τον τρόπο του, βοήθησαν στην ολοκλήρωση αυτής της προσπάθειας.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου προς την Ακαδημία Αθηνών και τον όμιλο φίλων του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ για την οικονομική υποστήριξη που μου παρείχαν.



Περιεχόμενα

Συγτομογραφίες.....	7
1. Στόχοι της διατριβής.....	9
2. Εισαγωγή.....	11
2.1 Η Θυρεοσφαιρίνη.....	11
2.1.1 Βιοσύνθεση και χαρακτηριστικά της θυρεοσφαιρίνης.....	11
2.1.2 Έκκριση και δράση των ορμονών του θυρεοειδούς.....	13
2.1.3 Γονίδιο της θυρεοσφαιρίνης.....	14
2.1.4 Πρωτοταγής δομή της θυρεοσφαιρίνης.....	14
2.1.5 Μηχανισμός ιωδίσωσης και παραγωγής ορμονών του θυρεοειδούς.....	17
2.1.6 Οι υδατανθρακικές συνιστώσες της θυρεοσφαιρίνης.....	19
2.2 Η Ακετυλοχολινεστεράση.....	19
2.2.1 Πρωτοταγής δομή της ακετυλοχολινεστεράσης.....	20
2.2.2 Πολυμορφισμός της ακετυλοχολινεστεράσης.....	22
2.2.3 Κατανομή της ακετυλοχολινεστεράσης.....	26
2.2.4 Ενεργό κέντρο και μηχανισμός κατάλυσης.....	26
2.3 Ομολογία μεταξύ θυρεοσφαιρίνης και ακετυλοχολινεστεράσης.....	28
2.4 Αυτοανοσία του θυρεοειδούς.....	29
2.4.1 Αυτοάνοσες ασθένειες του θυρεοειδούς.....	29
2.4.1.1 Θυρεοειδίτιδα Hashimoto.....	30
2.4.1.2 Νόσος Graves.....	31
2.4.1.3 Ανοσοπαθογένεια των αυτοάνοσων ασθενειών του θυρεοειδούς.....	32
2.4.1.3.1 Διαταραχή στην ανοσορρύθμιση κατά την πειραματική αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα.....	32
2.4.1.3.2 Ο ρόλος της απόπτωσης στην παθογένεια των αυτοάνοσων ασθενειών του θυρεοειδούς.....	34
2.4.1.3.3 Η μοριακή μίμηση ως μηχανισμός ανάπτυξης αυτοάνοσης θυρεοειδίτιδας.....	36
2.4.2 Αυτοαντισώματα στις αυτοάνοσες ασθένειες του θυρεοειδούς.....	37
2.4.2.1 Μέθοδοι προσδιορισμού θυρεοειδικών αυτοαντισωμάτων.....	38
2.4.2.2 Ιδιότητες και σημασία των αντισωμάτων έναντι των κύριων αυτοαντιγόνων του θυρεοειδούς στις αυτοάνοσες ασθένειες του θυρεοειδούς.....	39
2.4.2.2.1 Αυτοαντισώματα έναντι Tg.....	39
2.4.2.2.1.1 Τάξεις και υποτάξεις των αυτοαντισωμάτων έναντι θυρεοσφαιρίνης.....	42
2.4.2.2.1.2 Διασταυρούμενη αντίδραση αντισωμάτων έναντι θυρεοσφαιρίνης και θυρεοειδικής υπεροξειδάσης.....	43



2.4.2.2.1.3	Διδραστικά αντισώματα έναντι θυρεοσφαιρίνης και ακετυλο-χολινεστεράσης - Συσχέτιση με κλινική εικόνα	46
2.4.2.2.2	Αυτοαντισώματα έναντι TPO	47
2.4.2.2.3	Αυτοαντισώματα έναντι TSH-R	48
2.4.2.2.4	Αυτοαντισώματα έναντι ορμονών του θυρεοειδούς	49
2.4.3	B-επίτοποι της θυρεοσφαιρίνης	51
2.4.4	T-επίτοποι της θυρεοσφαιρίνης	55
2.4.5	Ιωδίωση της θυρεοσφαιρίνης και οι ανοσολογικές της ιδιότητες	59
3.	Υλικά και Μέθοδοι	61
3.1	Διαλύματα	61
3.2	Οροί	62
3.3	Ανοσοποιήσεις - Αντιοροί	63
3.3.1	Ανοσοποίηση με ανθρώπινη Tg	63
3.3.2	Ανοσοποίηση με το πεπτίδιο TgP41	63
3.3.3	Ανοσοποίηση με το πεπτίδιο TgP41 για ιστολογική εξέταση του θυρεοειδούς αδένος	64
3.4	Αντιδραστήρια	65
3.4.1	Θυρεοσφαιρίνη	65
3.4.2	Άλλα αντιγόνα και αντιδραστήρια	67
3.4.3	Συζεύγματα ορμονών του θυρεοειδούς (T ₃ και T ₄) με RSA	67
3.5	Συνθετικά πεπτίδια	68
3.6	Σύνθεση πεπτιδίων σε ραβδιά	68
3.7	Ενζυμική ανοσοπροσροφητική δοκιμασία (ELISA)	71
3.7.1	Μη ανταγωνιστική ELISA με ομοιοπολικά συνδεδεμένα πεπτίδια	71
3.7.2	Μη ανταγωνιστική ELISA με προσροφημένο αντιγόνο	72
3.7.3	Ανταγωνιστική ELISA	74
3.8	SDS-ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου	74
3.9	Απομόνωση ολικών ανοσοσφαιρινών τάξης IgG από ορό	76
3.10	Παρασκευή ανοσοπροσροφητών	77
3.10.1	Παρασκευή ανοσοπροσροφητή με θυρεοσφαιρίνη	77
3.10.2	Παρασκευή ανοσοπροσροφητή με το πεπτίδιο TgP41	78
3.11	Απομόνωση ειδικών αντισωμάτων	78
3.11.1	Απομόνωση ανθρώπινων αντισωμάτων τάξης IgG έναντι θυρεοσφαιρίνης	78
3.11.2	Απομόνωση αντισωμάτων κουνελιού έναντι της θυρεοσφαιρίνης	79
3.11.3	Απομόνωση αντισωμάτων κουνελιού έναντι του πεπτιδίου TgP41	79
3.12	Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων	80
3.13	Μελέτη δομικών παραμέτρων των πεπτιδίων	80

4.	Αποτελέσματα	82
4.1	<i>Μελέτη επιτόπων της θυρεοσφαιρίνης που αναγνωρίζονται από αυτοαντισώματα στις αυτοάνοσες ασθένειες του θυρεοειδούς</i>	<i>82</i>
4.1.1	Χαρτογράφηση αυτοεπιτόπων στην ομόλογη με την AChE περιοχή της Tg.....	82
4.1.2	Σύνθεση των πεπτιδίων TgP15, TgP26 και TgP41 και έλεγχος της δραστικότητας των ορών από ασθενείς με αυτοάνοσες ασθένειες του θυρεοειδούς έναντι των αυτών	87
4.1.3	Συσχέτιση της δραστικότητας έναντι των πεπτιδίων με τη θυρεοειδική οφθαλμοπάθεια.....	90
4.1.4	Αναστολή της αντι-TgP26 δραστικότητας από διαλυτό TgP26	90
4.1.5	Αύξηση της δραστικότητας έναντι TgP26 μετά την απομόνωση των ειδικών αντι-Tg αντισωμάτων	91
4.1.6	Αναστολή της δραστικότητας ορών έναντι ακινητοποιημένης AChE από διαλυτό πεπτίδιο TgP26	92
4.1.7	Δομική μελέτη των πεπτιδίων TgP15, TgP26 και TgP41.....	93
4.2	<i>Μελέτη της ειδικότητας αντισωμάτων που επάγονται κατά την πειραματική ανοσοποίηση με Tg ή με το πεπτίδιο TgP41.....</i>	<i>101</i>
4.2.1	Πειραματική ανοσοποίηση με Tg	101
4.2.1.1	Ορολογική απόκριση έναντι Tg από διάφορα ζωικά είδη.....	101
4.2.1.2	Ορολογική απόκριση έναντι ορμονών του θυρεοειδούς...	111
4.2.1.3	Δραστικότητα έναντι πεπτιδίων της Tg.....	119
4.2.2	Πειραματική ανοσοποίηση με το πεπτίδιο TgP41.....	128
4.2.2.1	Ορολογική απόκριση έναντι του πεπτιδίου TgP41	129
4.2.2.2	Ορολογική απόκριση έναντι Tg διαφόρων ζωικών ειδών και ορμονών του θυρεοειδούς	130
4.2.2.3	Απομόνωση και έλεγχος δραστικότητας έναντι Tg των ειδικών αντι-TgP41 αντισωμάτων.....	136
4.2.2.4	Έλεγχος για ενδομοριακή επέκταση επιτόπων κατά την ανοσοποίηση με το πεπτίδιο TgP41	137
4.2.2.5	Ιστολογική εξέταση των θυρεοειδών αδένων μετά από χορήγηση του TgP41	144
4.3	<i>Διαμοριακή επέκταση δραστικότητας κατά την πειραματική ανοσοποίηση με Tg ή με πεπτίδιο TgP41.....</i>	<i>144</i>
4.3.1	Διαμοριακή επέκταση δραστικότητας κατά την πειραματική ανοσοποίηση με Tg	144
4.3.1.1	Ορολογική απόκριση έναντι θυρεοειδικής υπεροξειδάσης	145
4.3.1.2	Ορολογική απόκριση έναντι μη θυρεοειδικών αντιγόνων	150
4.3.1.2.1	Διερεύνηση της δραστικότητας έναντι μυοσίνης.....	153
4.3.1.2.2	Διερεύνηση της δραστικότητας έναντι F-ακτίνης	160
4.3.1.2.3	Διερεύνηση της δραστικότητας έναντι BSA	160
4.3.2	Διαμοριακή επέκταση δραστικότητας κατά την πειραματική ανοσοποίηση με το πεπτίδιο TgP41	161

4.3.2.1	Ορολογική απόκριση έναντι θυρεοειδικής υπεροξειδάσης	161
4.3.2.2	Ορολογική απόκριση έναντι μυοσίνης και BSA	163
5.	Συζήτηση - Συμπεράσματα.....	164
5.1	Χαρτογράφηση επιτόπων αυτοαντισωμάτων που ανευρίσκονται σε αυτοάνοσα νοσήματα του θυρεοειδούς	165
5.2	Διερεύνηση ανοσογονικότητας και παθογονικότητας των νέων πεπτιδίων που φέρουν B-επίτοπους	169
5.3	Ενδομοριακή και διαμοριακή επέκταση δραστηριότητας μετά τη χορήγηση του πεπτιδίου TgP41	173
6.	Περίληψη	179
7.	Παράρτημα	188
7.1	Το πρόγραμμα "PEPTIDES"	188
7.2	Το πρόγραμμα "PCAL20"	191
8.	Βιβλιογραφία	197



Συντομογραφίες

ABTS	θειική αζινο-δι-3-αιθυλ-βενζοθειαζολίνη
AChE	ακετυλοχολινεστεράση
ATP	τριφωσφορική αδενοσίνη
Boc	t-βουτυλοξυκαρβονυλο-ομάδα
BSA	αλβουμίνη βοείου ορού (bovine serum albumin)
bTg	θυρεοσφαιρίνη βοδιού
cAMP	κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη
DIC	N,N'-διισοπροπυλοκαρβοδιιμίδιο
DMF	N,N-διμεθυλοφορμαμίδιο
ELISA	ενζυμική ανοσοπροσροφητική δοκιμασία (enzyme linked immunosorbent assay)
Fmoc	9-φλουορενυλ-μεθυλοξυκαρβονυλο-ομάδα
GD	νόσος Graves (Graves' disease)
HIV	ανθρώπινος ιός ανοσοανεπάρκειας
HOBt	1-υδροξυβενζοτρίαζόλιο
HPLC	υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης
HT	θυρεοειδίτιδα Hashimoto (Hashimoto's thyroiditis)
hTg	ανθρώπινη θυρεοσφαιρίνη
mTg	θυρεοσφαιρίνη ποντικού
Mtr	4-μεθοξυ-2,3,6-τριμεθυλοβενζοσουλφονυλο-ομάδα
nDNA	φυσικό δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
OD	οπτική πυκνότητα (optical density), απορρόφηση
PAGE	ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου
PBQ	π-βενζοκινόνη
PMSF	φαινυλομεθυλοσουλφονυλο φθορίδιο
pNPP	φωσφορική p-νιτροφαινόλη
pTg	χοιρινή θυρεοσφαιρίνη
rabTg	θυρεοσφαιρίνη κουνελιού
ratTg	θυρεοσφαιρίνη αρουραίου
RIA	ραδιο-ανοσοδοκιμασία (radio-immunoassay)
RSA	αλβουμίνη ορού κουνελιού (rabbit serum albumin)
SDS	θειικό δωδεκυλικό νάτριο

SDS-PAGE	ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου με την παρουσία SDS
spG	στήλη Sepharose - πρωτεΐνης G
TBAb	Θυρεοανασταλτικά αντισώματα (Thyroid Binding Antibodies)
TBG	θυρεοδεσμευτική σφαιρίνη (Thyroxine Binding Globulin)
TBII	Ανοσοσφαιρίνες που αναστέλλουν την πρόσδεση της TSH (TSH Binding Inhibitory Immunoglobulins)
tBu	τριτοταγής βουτυλομάδα
TED	θυρεοειδική οφθαλμοπάθεια (Thyroid Eye Disease)
TEMED	N,N,N',N'-τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη
TFA	τριφθορο-οξικό οξύ
Tg	θυρεοσφαιρίνη
TPO	θυρεοειδική υπεροξειδάση
TRAb	Αντισώματα του TSH-R (TSH Receptor Antibodies)
Tris	τρεις(υδροξυμεθυλ)αμινομεθάνιο
Trt	τριτυλο-ομάδα
TSAb	Θυρεοδιεγερτικά αντισώματα (Thyroid Stimulating Antibodies)
TSH	θυρεοτροπίνη
TSH-R	υποδοχέας της TSH



1. Στόχοι της διατριβής

Η θυρεοσφαιρίνη (Tg), μια πρόδρομη πρωτεΐνη για τη σύνθεση των ορμονών του θυρεοειδούς αδένος, είναι ένα μεγάλου μεγέθους αυτοαντιγόνο, το οποίο εμπλέκεται στις αυτοάνοσες ασθένειες του θυρεοειδούς όπως είναι η νόσος Graves (GD) και η θυρεοειδίτιδα Hashimoto (HT). Η ταυτοποίηση των αντιγονικών καθοριστών (επιτόπων) των αυτοαντισωμάτων συμβάλλει στην κατανόηση των αυτοάνοσων μηχανισμών και θα μπορούσε να οδηγήσει στην ανάπτυξη ενός χρήσιμου διαγνωστικού εργαλείου. Η χρησιμοποίηση μικρών συνθετικών πεπτιδίων αποτελεί μια συστηματική προσέγγιση για τον εντοπισμό των στόχων των αντισωμάτων με μεγάλη ακρίβεια, όμως η εφαρμογή της μεθόδου αυτής στην περίπτωση της Tg είναι δύσκολη λόγω του μεγάλου μεγέθους της πρωτεΐνης. Για την ταυτοποίηση ορολογικών επιτόπων της Tg έχουν χρησιμοποιηθεί μέχρι σήμερα ανασυνδυασμένα πεπτίδια ή πρωτεολυτικά θραύσματα της Tg. Κατά συνέπεια, οι επίτοποι που έχουν ήδη προσδιοριστεί στη Tg, λόγω της μεθοδολογίας που χρησιμοποιήθηκε, στις περισσότερες περιπτώσεις περιλαμβάνονται σε μεγάλα πεπτίδια, αρκετών δεκάδων ή και εκατοντάδων αμινοξέων. Για να μπορέσουμε να χαρτογραφήσουμε ορολογικούς επίτοπους της Tg χρησιμοποιώντας μικρά συνθετικά πεπτίδια, περιορίσαμε τη μελέτη μας σε ένα τμήμα της πρωτεΐνης μήκους 578 αμινοξέων που βρίσκεται προς το καρβοξυ-τελικό άκρο. Η καρβοξυ-τελική περιοχή της Tg παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για δύο λόγους: α) Είναι ιδιαίτερα ανοσογονική, αφού περιλαμβάνει τέσσερις από τους πέντε παθογονικούς T-επίτοπους (επίτοπους T-κυττάρων) οι οποίοι είναι γνωστοί από ζωικά μοντέλα. β) Η περιοχή αυτή της Tg (αλληλουχία 2171-2748 της ανθρώπινης Tg) είναι ομόλογη με το ένζυμο ακετυλοχολινεστεράση (AChE), ένα ένζυμο των χολινεργικών συνάψεων που ρυθμίζει τη νευροδιαβίβαση. Η ομολογία στην αλληλουχία των αμινοξέων καθώς και η ομοιότητα στην τριτοταγή δομή ανάμεσα στην Tg και την AChE, οδήγησε τους Ludgate και συν. το 1986 στην υπόθεση ότι αντισώματα με διασταυρούμενη αντίδραση έναντι της Tg και της AChE των οφθαλμικών μυών μπορεί να εμπλέκονται στην παθογένεια της θυρεοειδικής οφθαλμοπάθειας (TED), η οποία εμφανίζεται σε σημαντικό

ποσοστό των ασθενών με GD. Επιπλέον, έχει βρεθεί από τους Mappouras και συν. (1995) ότι η ύπαρξη Tg/AChE δι-δραστικών αυτοαντισωμάτων συνδέεται με την παρουσία TED σε ασθενείς με GD.

Είναι γνωστό ότι οι επίτοποι αυτοαντισωμάτων (αυτοεπίτοποι) κατά κανόνα δε συμπίπτουν με τους επίτοπους αντισωμάτων που επάγονται μετά από πειραματική ανοσοποίηση με το αντιγόνο (ετεροεπίτοποι). Στη μελέτη μας θελήσαμε να εξετάσουμε αν τα πεπτίδια που περιλαμβάνουν αυτοεπίτοπους στις αυτοάνοσες ασθένειες του θυρεοειδούς, αποτελούν και στόχους επαγόμενων αντισωμάτων κατά την πειραματική ανοσοποίηση με Tg. Επιπλέον, παρουσιάζει ενδιαφέρον η μελέτη της ανοσογονικότητας των πεπτιδίων που αποτελούν στόχους επαγόμενων αντισωμάτων, δηλαδή η ικανότητά τους να επάγουν την παραγωγή αντισωμάτων έναντι του πρωτεϊνικού αντιγόνου (Tg), καθώς και η παθογονική τους δράση, δηλαδή η ικανότητά τους να επάγουν θυρεοειδίτιδα σε πειραματόζωα.

Συνοπτικά, οι στόχοι της παρούσας μελέτης ήταν οι ακόλουθοι:

1. Η χαρτογράφηση αυτοεπιτόπων στην καρβοξυ-τελική περιοχή της ανθρώπινης Tg στις αυτοάνοσες ασθένειες του θυρεοειδούς, με τη χρήση μικρών συνθετικών πεπτιδίων και η συσχέτισή τους με την κλινική εικόνα (θυρεοειδική οφθαλμοπάθεια στην GD).
2. Η μελέτη της ανοσογονικότητας και της παθογονικότητας των πεπτιδίων που περιλαμβάνουν στόχους επαγόμενων αντισωμάτων.
3. Η διερεύνηση της επαγωγής ενδομοριακής και διαμοριακής επέκτασης της δραστηριότητας μετά από χορήγηση ανοσογονικού(ών) πεπτιδίου(ων).



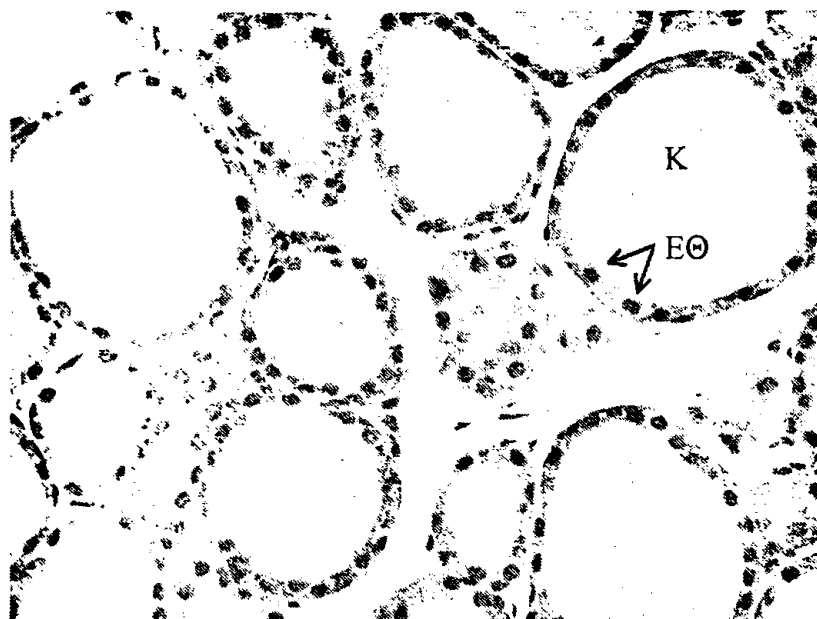
2. Εισαγωγή

2.1 Η Θυρεοσφαιρίνη

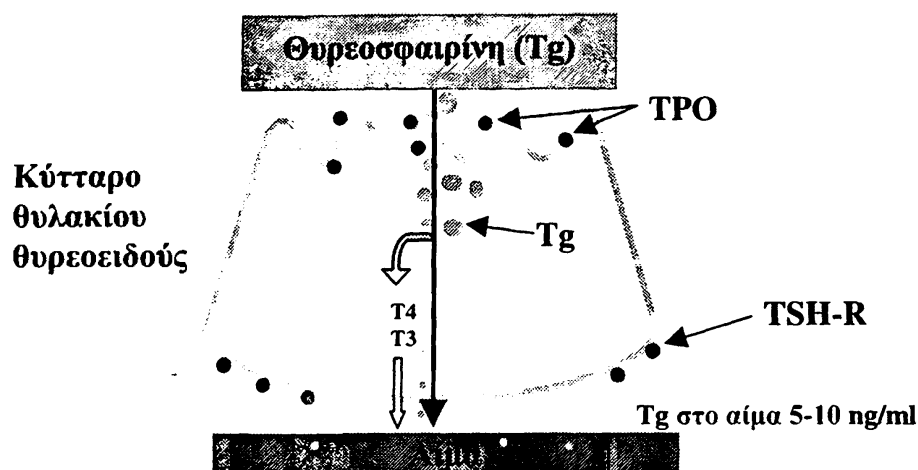
2.1.1 Βιοσύνθεση και χαρακτηριστικά της θυρεοσφαιρίνης

Η θυρεοσφαιρίνη (Tg) είναι μια μεγάλου μεγέθους ιωδογλυκοπρωτεΐνη η οποία αποτελεί υπόστρωμα για τη σύνθεση των ορμονών του θυρεοειδούς αδένος, δηλαδή της θυροξίνης (T_4) και της 3,5,3'-τριιωδοθυρονίνης (T_3), οι οποίες ρυθμίζουν το μεταβολισμό (1). Η Tg παράγεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο των κυττάρων των θυλακίων του θυρεοειδούς αδένος (θυρεοκύτταρα), τροποποιείται μετα-μεταφραστικά στο σύμπλεγμα Golgi των κυττάρων αυτών και εκκρίνεται για να αποθηκευτεί στο κοίλωμα των θυλακίων του αδένος (2) (Εικόνα 1). Αποτελεί το 20-30% του κολλοειδούς των θυλακίων (3). Η συγκέντρωση του κολλοειδούς στα θυλάκια του θυρεοειδούς κυμαίνεται από 100-400 mg/ml ανάλογα με τη δραστηριότητα του αδένος (4). Η παραγωγή της Tg ρυθμίζεται από την υποφυσιακή ορμόνη θυρεοτροπίνη (TSH). Η Tg έχει συντελεστή καθίζησης σε βαθμίδωση σακχαρόζης 19S και μοριακό βάρος 660kDa. Αποτελείται από δύο όμοιες υπομονάδες, μοριακού βάρους 330kDa η κάθε μία (5). Το ισοηλεκτρικό σημείο της πρωτεΐνης κυμαίνεται από 4.4 μέχρι 4.7 ανάλογα με το είδος (6). Τα ιόντα ιωδίου (I^-) από τον ορό συγκεντρώνονται επιλεκτικά μέσα στα θυρεοκύτταρα και μεταφέρονται στην κοιλότητα των θυλακίων (7). Το ιώδιο ενώνεται με τις τυροσίνες της Tg σε μια εξωκυτταρική αντίδραση η οποία καταλύεται από το ένζυμο θυρεοειδική υπεροξειδάση (TPO) (8). Η ιωδίωση απαιτεί επίσης την παρουσία ενός συστήματος παραγωγής H_2O_2 , το οποίο, όπως και η TPO, βρίσκεται στην κορυφαία επιφάνεια των θυρεοκυττάρων, δηλαδή προς την πλευρά της κοιλότητας (Σχήμα 1). Το ιώδιο μεταναστεύει από τη βασική μεμβράνη προς τις μικρολάχνες της κορυφαίας πλευράς των θυρεοκυττάρων, όπου υφίσταται μια οξειδωτική διεργασία με την οποία ενσωματώνεται στις τυροσίνες της Tg (9). Το ιώδιο αποτελεί το 0.1-2.0% της Tg ανάλογα με το είδος (6). Στη συνέχεια, οι μονο- και δι-ιωδοτυροσίνες αντιδρούν ενδομοριακά (§2.1.5) για να σχηματίσουν τις ορμόνες T_3 και T_4 σε συγκεκριμένες θέσεις της Tg, οι οποίες διαφέρουν ανάμεσα σε διαφορετικά ζωικά είδη (10). Όταν ο

υποδοχέας της θυρεοτροπίνης (TSH-R) λάβει το μήνυμα ότι απαιτούνται θυρεοειδικές ορμόνες, τότε η Tg προσλαμβάνεται από τα κύτταρα των θυλακίων και σχηματίζονται οι ορμόνες T_3 και T_4 με τη συμβολή του ενζύμου θυρεοειδική υπεροξειδάση (TPO). Ο TSH-R ανήκει στην κατηγορία υποδοχέων που συνδέονται με την G-πρωτεΐνη και είναι υπεύθυνος για την ενεργοποίηση του συστήματος της αδενυλικής κυκλάσης, την ενδοκυττάρια αύξηση της κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cAMP) και την πρόσληψη ιωδίου (11). Η ιωδιωμένη Tg επανεισάγεται με ενδοκυττάρωση στα θυρεοκύτταρα και κόβεται ενζυμικά μέσα στα λυσοσώματα ώστε να σχηματιστούν οι ελεύθερες ορμόνες T_3 και T_4 , οι οποίες τελικά βγαίνουν στην κυκλοφορία (12,13). Η γλυκοζυλίωση της Tg, όπως και η ιωδίωση, δεν εξαρτάται από την πρωτεϊνσύνθεση, αλλά αποτελεί μετα-μεταφραστική τροποποίηση της πρωτεΐνης (14). Η γλυκοζυλίωση προηγείται της ιωδίωσης (15). Στο φυσιολογικό ανθρώπινο ορό η Tg βρίσκεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα (της τάξης των 10 ng/ml) (16) και η έκκρισή της ρυθμίζεται από την TSH (2).



Εικόνα 1. Θυλάκια θυρεοειδούς αδένος. Διακρίνονται τα επιθηλιακά κύτταρα του θυρεοειδούς (θυρεοκύτταρα, ΕΘ) που περιβάλλουν την κοιλότητα του θυλακίου. Η θυρεοσφαιρίνη παράγεται από τα θυρεοκύτταρα και αποθηκεύεται στην κοιλότητα υπό μορφήν κολλοειδούς (Κ).



Σχήμα 1. Σχηματική αναπαράσταση ενός κυττάρου από θυλάκιο του θυρεοειδούς αδένος. Η θυρεοσφαιρίνη (Tg) παράγεται από τον αδένος και αποθηκεύεται στην κοιλότητα του θυλακίου. Όταν ο υποδοχέας της θυρεοτροπίνης (TSH-R), ο οποίος εντοπίζεται στην βασική πλευρά του κυττάρου, λάβει το μήνυμα ότι απαιτούνται θυρεοειδικές ορμόνες, τότε η Tg προσλαμβάνεται από τα κύτταρα των θυλακίων και σχηματίζονται οι ορμόνες T_3 και T_4 με τη συμβολή του ενζύμου θυρεοειδική υπεροξειδάση (TPO), το οποίο βρίσκεται στην κορυφαία πλευρά του κυττάρου. Στη συνέχεια, οι T_3 και T_4 αποκόπτονται ενζυμικά από την πρωτεΐνη και απελευθερώνονται στην κυκλοφορία του αίματος. Οι πρωτεΐνες Tg, TSH-R και TPO, αποτελούν τα κύρια αυτοαντιγόνα του αδένος στις αυτοάνοσες ασθένειες του θυρεοειδούς (§2.4).

2.1.2 Έκκριση και δράση των ορμονών του θυρεοειδούς

Ο ρυθμός έκκρισης των ορμονών του θυρεοειδούς ανέρχεται σε 80-100 μg την ημέρα και ρυθμίζεται από την TSH (17). Η δράση της T_3 είναι πέντε φορές ισχυρότερη από αυτήν της T_4 , όμως η ποσότητα στην οποία εκκρίνεται είναι σημαντικά μικρότερη (17). Οι θυρεοειδικές ορμόνες βρίσκονται στην κυκλοφορία δεσμευμένες με πρωτεΐνες σε ποσοστό μεγαλύτερο του 99.9% (18). Το 60% της T_4 δεσμεύεται στη θυρεοδεσμευτική σφαιρίνη (TBG), το 30% στην προλευκωματίνη και η υπόλοιπη T_4 δεσμεύεται στη λευκωματίνη. Η T_3 δεσμεύεται ασθενέστερα. Η δυνατότητα δέσμευσης των θυρεοειδικών ορμονών από τις πρωτεΐνες είναι πολύ μεγαλύτερη από την ποσότητα των ορμονών που συνήθως κυκλοφορούν στο αίμα. Όπως φαίνεται, από τα κύτταρα προσλαμβάνονται μόνο οι ελεύθερες ορμόνες (18).

Οι βιοχημικές δράσεις των θυρεοειδικών ορμονών μπορούν να χαρακτηριστούν γενικά ως αύξηση του μεταβολισμού. Ο τρόπος δράσης των ορμονών αυτών είναι παρόμοιος με τον τρόπο που δρουν οι στεροειδείς ορμόνες. Ο υποδοχέας των ορμονών του θυρεοειδούς είναι μια

μεταλλοπρωτεΐνη που προσδένεται στο DNA ρυθμίζοντας τη μεταγραφή (19). Στις βιοχημικές δράσεις ανήκουν η αύξηση της κατανάλωσης οξυγόνου, η αύξηση της παραγωγής θερμότητας, καθώς επίσης η βιοσύνθεση πολλών ενζύμων και άλλων πρωτεϊνών. Σημαντική είναι επίσης η δράση των ορμονών του θυρεοειδούς στη μετεμβρυϊκή ανάπτυξη (18). Ο βιολογικός χρόνος ημίσειας ζωής είναι επτά ημέρες για την T_4 και μία περίπου ημέρα για την T_3 . Η μεγάλη αυτή διαφορά οφείλεται στη διαφορετική ικανότητα δέσμευσης στην TBG. Μόνο οι ελεύθερες ορμόνες εισέρχονται στα κύτταρα και μεταβολίζονται (18).

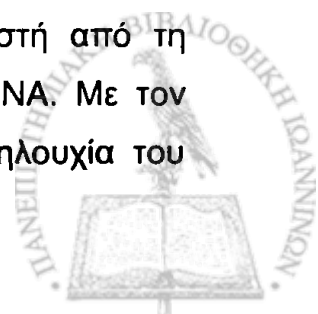
2.1.3 Γονίδιο της θυρεοσφαιρίνης

Έχει βρεθεί ότι στον άνθρωπο, το γονίδιο της Tg υπάρχει σε ένα μόνο αντίγραφο ανά απλοειδές γονιδίωμα (20) εντοπισμένο στο χρωμόσωμα 8 (21). Το γονίδιο της Tg στον άνθρωπο είναι ένα από τα μεγαλύτερα γονίδια που έχουν χαρακτηριστεί, αφού το μέγεθός του φθάνει τα 300,000 bp και περιλαμβάνει τουλάχιστο 37 εξώνια. Στον αρουραίο το αντίστοιχο γονίδιο είναι μικρότερο, περίπου 170,000 bp και περιέχει 42 εξώνια.

Στον άνθρωπο, το γονίδιο της Tg παρουσιάζει χαρακτηριστική δομή, η οποία αντιστοιχεί και στη δομή της πρωτεΐνης: 1) Ένα τμήμα 50,000 bp από το 5'-άκρο του γονιδίου, το οποίο αντιστοιχεί στο αμινο-τελικό ήμισυ της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, αποτελείται από εξώνια διαφόρων μεγεθών (100-200 bp τα περισσότερα, 1,100 bp το εξώνιο 9 και 560bp το εξώνιο 10), χωρισμένα μεταξύ τους από εσώνια μέτριου μεγέθους (μέχρι 8,000 bp). 2) Το 3' τμήμα του γονιδίου, μήκους 250,000 bp, αντιστοιχεί στο καρβοξυ-τελικό ήμισυ της πολυπεπτιδικής αλυσίδας και αποτελείται από μικρά εξώνια (100-200 bp) που χωρίζονται από μεγάλα εσώνια (μέχρι και 64,000 bp) (22).

2.1.4 Πρωτοταγής δομή της θυρεοσφαιρίνης

Η πρωτοταγής δομή της θυρεοσφαιρίνης έχει γίνει γνωστή από τη μελέτη της αλληλουχίας του mRNA, μέσω των αντίστοιχων cDNA. Με τον τρόπο αυτό έχει προσδιοριστεί ολόκληρη η νουκλεοτιδική αλληλουχία του



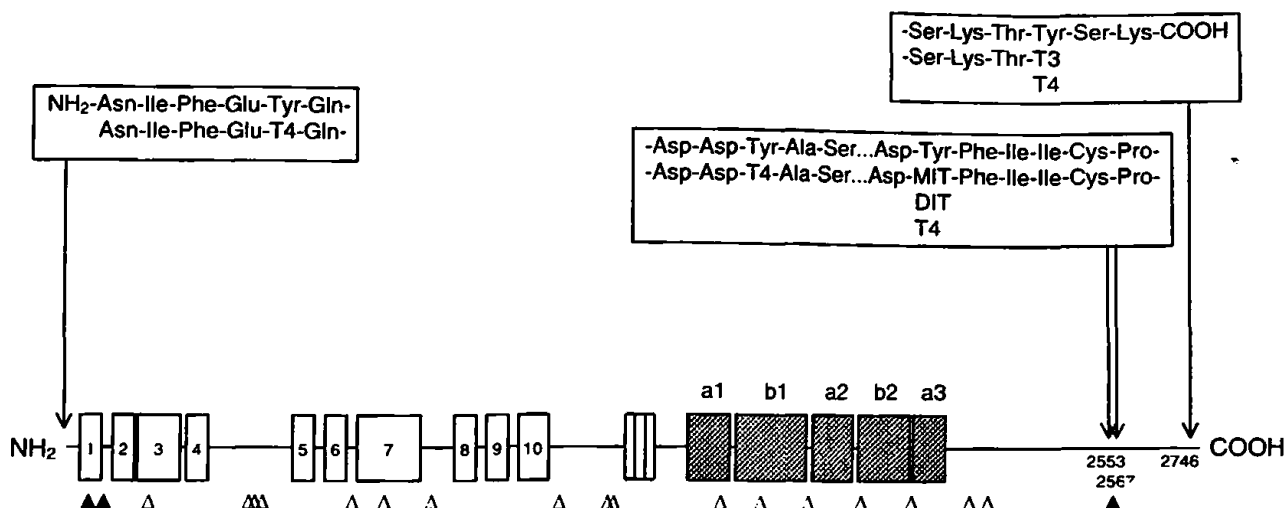
mRNA για την Tg του ανθρώπου (23), του βοδιού (5) και του ποντικού (24), καθώς και τμήματα της αλληλουχίας για την Tg της κατσίκας (25) και του αρουραίου (26). Το ανθρώπινο mRNA κωδικοποιεί για 2767 αμινοξέα ενώ το mRNA του βοδιού κωδικοποιεί για 2769 και του ποντικού για 2766. Η ομολογία ανάμεσα στην Tg του ανθρώπου και του βοδιού είναι 77.2%. Η ομολογία της Tg του ποντικού είναι 73.5% με την Tg του βοδιού και 71.8% με την αντίστοιχη του ανθρώπου.

- Η ώριμη Tg ξεκινά από τη θέση 20 της πολυπεπτιδικής αλυσίδας που κωδικοποιείται από το mRNA (27). Συνεπώς υπάρχει ένα πεπτίδιο-οδηγός 19 αμινοξικών καταλοίπων, το οποίο διαπιστώνεται ότι είναι υδρόφοβο. Άρα κάθε μονομερές της ώριμης Tg στον άνθρωπο περιλαμβάνει 2748 αμινοξικά κατάλοιπα και το μοριακό βάρος υπολογίζεται 302,773 Da. Για την Tg του βοδιού οι αντίστοιχες τιμές είναι 2750 αμινοξικά κατάλοιπα και μοριακό βάρος 302,253 Da, ενώ στον ποντικό η ώριμη Tg διαθέτει 2746 αμινοξικά κατάλοιπα και μοριακό βάρος 302,456 Da.

Η ανθρώπινη Tg εμφανίζει τρία είδη εσωτερικής ομολογίας (Σχήμα 2):

- 1) Στην αμινο-τελική περιοχή υπάρχουν δέκα ομόλογες περιοχές μήκους περίπου 60 αμινοξικών καταλοίπων η καθεμία (τύπος 1). Οι περιοχές αυτές φαίνεται να διατηρούν αμετάβλητη την τριτοταγή δομή τους, δεδομένου ότι υπάρχουν κατάλοιπα κυστεΐνης, γλυκίνης και προλίνης σε σταθερές θέσεις.
- 2) Τρεις μικρές διαδοχικές περιοχές 14-17 αμινοξικών καταλοίπων στην κεντρική περιοχή του μορίου (τύπος 2).
- 3) Η ομολογία τύπου 3 περιλαμβάνει πέντε περιοχές, οι οποίες σχετίζονται μεταξύ τους, κυρίως λόγω της οργάνωσής τους και της παρουσίας ορισμένων αμινοξικών καταλοίπων (κυρίως κυστεΐνης) σε συγκεκριμένες θέσεις. Οι πέντε αυτές περιοχές μπορούν να χωριστούν περαιτέρω σε δύο υποτύπους (Σχήμα 2).

Οι τρεις αυτοί τύποι ομολογίας βρίσκονται στο 70% του αμινο-τελικού τμήματος του μορίου. Το 30% του καρβοξυ-τελικού τμήματος του πρωτεϊνικού μονομερούς δεν εμφανίζει τέτοιου είδους εσωτερική ομολογία.



Σχήμα 2. Σχηματική αναπαράσταση ενός μονομερούς της ανθρώπινης Tg. Παρουσιάζονται οι τρεις τύποι εσωτερικής ομολογίας: δέκα περιοχές τύπου 1, τρεις περιοχές τύπου 2 και πέντε περιοχές τύπου 3. Ο τελευταίος τύπος ομολογίας χωρίζεται σε δύο υποτύπους: τρεις περιοχές τύπου 3a (a1, a2, a3) και δύο τύπου 3b (b1, b2). Τα τρίγωνα αντιστοιχούν στις δυνατές θέσεις γλυκοζυλίωσης (τα μαύρα τρίγωνα είναι οι πραγματικές θέσεις γλυκοζυλίωσης). Οι 4 ορμονογόνες θέσεις δηλώνονται με τα βέλη. Στα πλαίσια, η πάνω αλληλουχία προέρχεται από τη νουκλεοτιδική αλληλουχία, ενώ η κάτω είναι η πεπτιδική αλληλουχία, όπως χαρακτηρίστηκε από την ανθρώπινη ή χοιρινή πρωτεΐνη. MIT: μονοϊωδοτυροσίνη, DIT: διωδοτυροσίνη, T3: 3,5,3'-τριωδοθυρονίνη, T4: θυροξίνη. (28)

Τα υδρόφιλα και υδρόφοβα αμινοξικά κατάλοιπα βρίσκονται ομοιογενώς κατανεμημένα κατά μήκος της πρωτεΐνης. Τα κατάλοιπα τυροσίνης βρίσκονται κυρίως μέσα στις επαναλαμβανόμενες περιοχές και σε μεγάλη συγκέντρωση στο καρβοξυ-τελικό τμήμα. Παρόμοια γενική δομή εμφανίζει και η Tg του βοδιού (5) καθώς και η Tg του ποντικού (24).

Το καρβοξυ-τελικό τμήμα της Tg, το οποίο δεν έχει επαναλαμβανόμενες δομές, παρουσιάζει ομολογία με το ένζυμο ακετυλοχολινεστεράση (29) (§2.2). Επίσης, οι δέκα τύπου 1 επαναλαμβανόμενες περιοχές εμφανίζουν ομολογία με μια εναλλακτικά εκφραζόμενη περιοχή της αμετάβλητης αλυσίδας (invariant chain), που σχετίζεται με το Ia αντιγόνο του κύριου συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (major histocompatibility complex) (30).

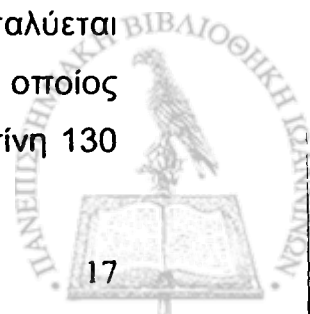
Παρά το μεγάλο μέγεθός της και τις 134 τυροσίνες που περιλαμβάνει η Tg, οι θέσεις παραγωγής ορμονών που χαρακτηρίστηκαν στην ανθρώπινη Tg είναι μόνο τέσσερις και αντιστοιχούν στις τυροσίνες 5, 2553, 2567 και 2746 (23) (Σχήμα 2). Σχηματίζονται περίπου 0.29 mol T₃ και 2.28 mol T₄ ανά mol Tg (31). Οι τέσσερις κύριες ορμονογόνες θέσεις που προσδιορίστηκαν στην Tg του βοδιού δηλώνονται ως A, B, C και D και αντιστοιχούν στις τυροσίνες

των θέσεων 5, 2553, 2746 (κοινές και στην ανθρώπινη Tg) και 1290 (αρίθμηση ως προς την ανθρώπινη αλληλουχία). Στα περισσότερα είδη σπώνδυλοζώων, η θέση A είναι υπεύθυνη για την παραγωγή του 40% των ορμονών του θυρεοειδούς και η θέση B για το 25%. Η θέση C σχετίζεται, τουλάχιστον σε μερικά είδη, με αυξημένη παραγωγή T₃. Η θέση D είναι κυρίαρχη στα κουνέλια και στους ινδόχοιρους (32).

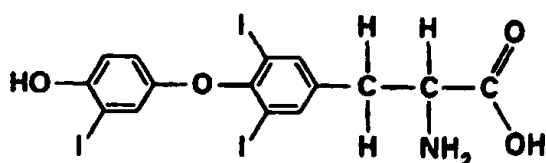
2.1.5 Μηχανισμός ιωδίωσης και παραγωγής ορμονών του θυρεοειδούς

Η θυρεοσφαιρίνη περιέχει ιώδιο υπό μορφή μονο- και δι-ιωδοτυροσίνης καθώς και ιωδοθυρονίνης (θυροξίνης και τριιωδοθυρονίνης, Σχήμα 3). Οι τελευταίες προκύπτουν από ενδομοριακή σύζευξη δύο καταλοίπων ιωδοτυροσίνης. Η σύνθεση των ορμονών του θυρεοειδούς περιλαμβάνει τροποποίηση των αμινοξικών καταλοίπων τυροσίνης σε μια αντίδραση που πραγματοποιείται σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο, κάποια κατάλοιπα τυροσίνης ιωδιώνονται για να σχηματίσουν τους πρόδρομους των ορμονών, τη μονοιωδοτυροσίνη (MIT) και τη διιωδοτυροσίνη (DIT) (33). Τα ιόντα ιωδίου προσλαμβάνονται από το αίμα και συγκεντρώνονται στα κύτταρα του θυρεοειδούς με ενεργητική μεταφορά, αφού η κυτταρική συγκέντρωση ιωδίου είναι μεγαλύτερη από τη συγκέντρωση στο αίμα. Στη συνέχεια, τα ιόντα ιωδίου οξειδώνονται σχηματίζοντας μοριακό ιώδιο και συνδέονται ομοιοπολικά στις τυροσίνες (17). Στο δεύτερο στάδιο, δύο ιωδιωμένα κατάλοιπα τυροσίνης ενώνονται για να σχηματίσουν τις βιολογικά ενεργές ορμόνες T₃ και T₄. Στο στάδιο αυτό, μία τυροσίνη δίνει το ιωδιωμένο φαινύλιο, το οποίο θα αποτελέσει τον εξωτερικό δακτύλιο της ιωδοθυρονίνης στη θέση του δέκτη. Στη θέση του δότη απομένει δεϋδροαλανίνη ή πυροσταφυλικό (34,33).

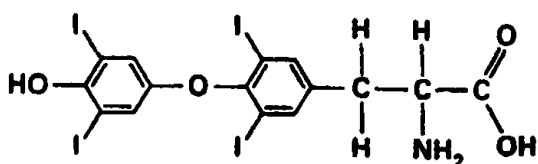
Στην ιωδίωση, συμμετέχει το ένζυμο θυρεοειδική υπεροξειδάση (TPO) που βρίσκεται στην κορυφαία θέση των θυρεοκυττάρων και παράγεται H₂O₂ μέσω μιας NADPH-εξαρτώμενης οξειδάσης. Η διαδικασία της σύζευξης δύο καταλοίπων ιωδοτυροσίνης, για το σχηματισμό ιωδοθυρονίνης, καταλύεται επίσης από τη θυρεοειδική υπεροξειδάση. Ο μηχανισμός σύζευξης, ο οποίος προτάθηκε από τον Taurog (8), παρουσιάζεται στο Σχήμα 4. Η τυροσίνη 130



στη βόεια Tg έχει δειχθεί πρόσφατα ότι αποτελεί δότη του εξωτερικού δακτυλίου της ιωδοθυρονίνης που σχηματίζεται πιθανότατα στη θέση 5, δηλαδή τη σημαντικότερη, όπως αναφέρθηκε στην §2.1.4, ορμονογόνο θέση* (35). Άλλες θέσεις δοτών του εξωτερικού δακτυλίου είναι οι τυροσίνες 926, 986 ή 1008 και 1375 (36).

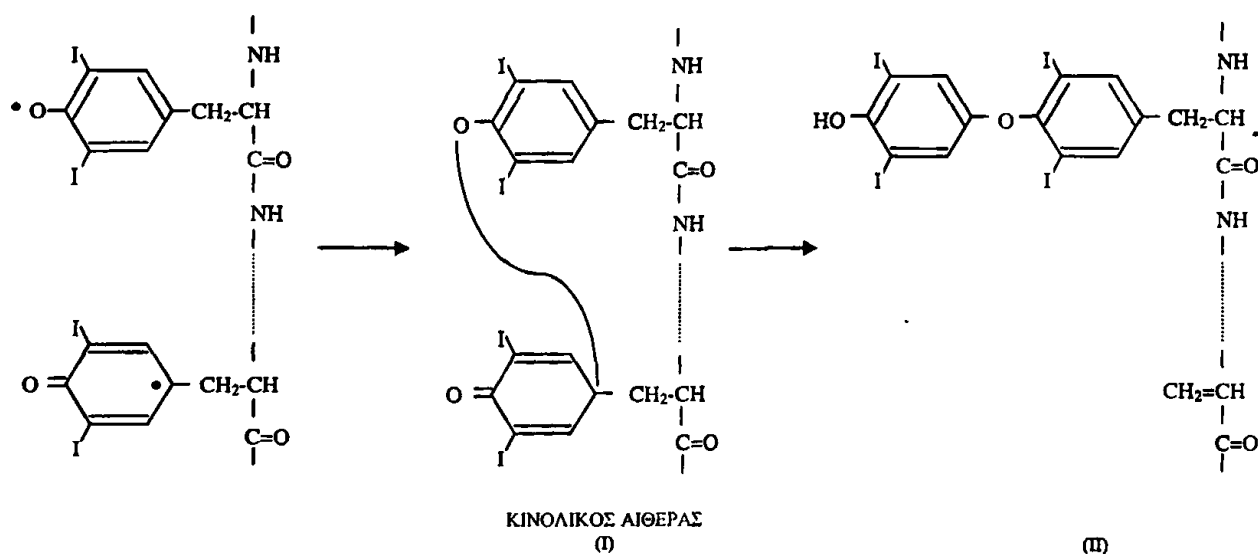


3,5,3'-τρι-ιωδοθυρονίνη (T₃)



3,5,3',5'-τετρα-ιωδοθυρονίνη
(θυροξίνη, T₄)

Σχήμα 3. Χημική δομή των ιωδοαμινοξέων T₃ και T₄ που αποτελούν τις ορμόνες του θυρεοειδούς.



Σχήμα 4. Υποθετικός μηχανισμός της ενδομοριακής σύζευξης δύο καταλοίπων διιωδοτυροσίνης (DIT) με συμμετοχή ελευθέρων ριζών. Τα κατάλοιπα DIT μπορεί να βρίσκονται στην ίδια ή σε διαφορετικές πολυπεπτιδικές αλυσίδες. (28)

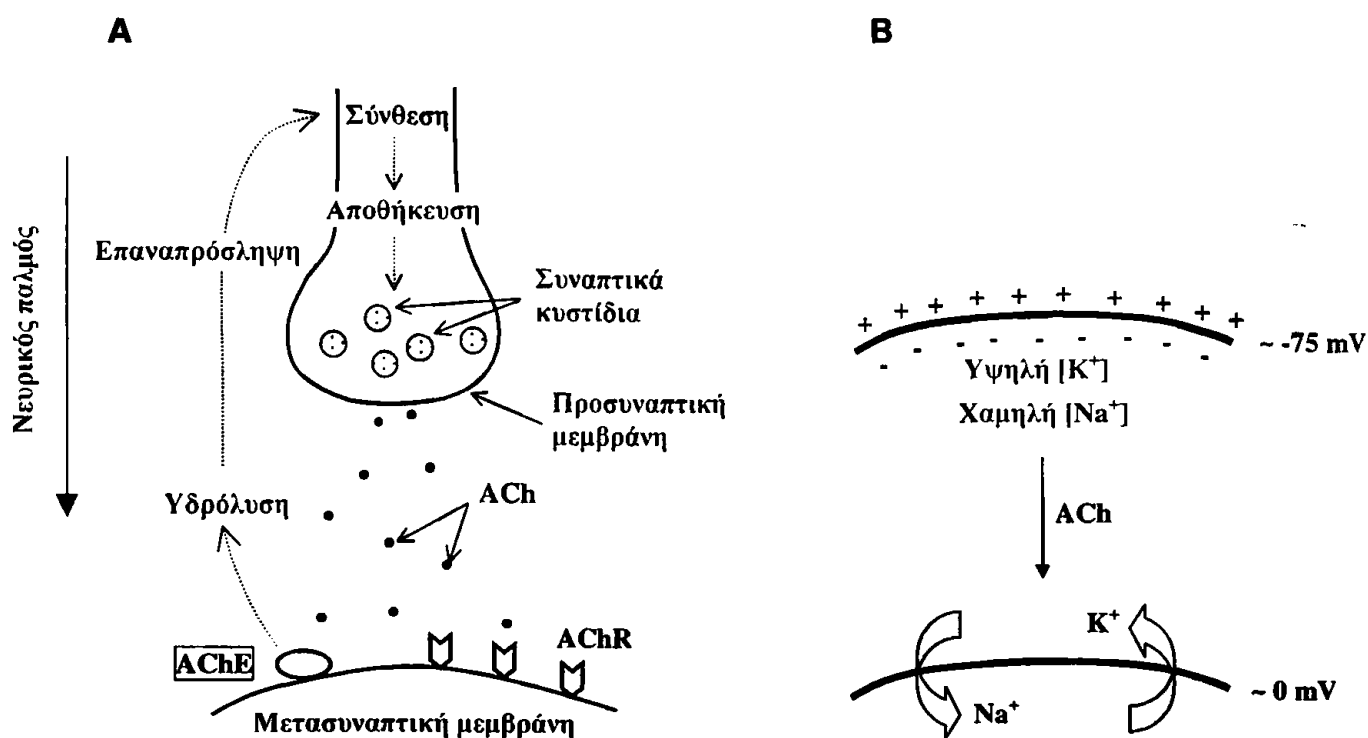
2.1.6 Οι υδατανθρακικές συνιστώσες της θυρεοσφαιρίνης

Όπως αναφέρθηκε (§2.1.1) η Tg είναι γλυκοπρωτεΐνη. Οι υδατάνθρακες που περιέχονται στην Tg είναι τα ουδέτερα σάκχαρα γαλακτόζη, μαννόζη και φουκόζη, το αμινοσάκχαρο N-ακετυλογλυκοζαμίνη και το σιαλικό οξύ. Το περιεχόμενο της Tg σε υδατάνθρακες ποικίλει μεταξύ 8 και 10% (6). Οι υδατάνθρακες στην Tg διαχωρίζονται σε δύο διακριτές μονάδες. Η μονάδα A (μοριακό βάρος 2030 Da) έχει δέκα κατάλοιπα μαννόζης και δύο N-ακετυλογλυκοζαμίνης (37), η μονάδα B (2880 Da) αποτελείται από τέσσερα κατάλοιπα γαλακτόζης, ένα κατάλοιπο φουκόζης και δύο σιαλικού οξέος (38). Τα κατάλοιπα N-ακετυλογλυκοζαμίνης των μονάδων A και B ενώνονται στην πρωτεΐνη μέσω των αμινοξικών καταλοίπων ασπαραγίνης (N-γλυκοζυλίωση). Η ανθρώπινη Tg περιέχει μία επιπλέον υδατανθρακική μονάδα, τη μονάδα C, η οποία αποτελείται από N-ακετυλογαλακτοζαμίνη ενωμένη στην πρωτεΐνη μέσω σερίνης (O-γλυκοζυλίωση) (39). Στην ανθρώπινη Tg έχει διαπιστωθεί η ύπαρξη 20 θέσεων πιθανής N-γλυκοζυλίωσης (Asn-X-Thr/Ser, όπου X είναι ένα οποιοδήποτε αμινοξύ), ενώ έχουν χαρακτηριστεί μόνο οι 15 από αυτές (28) (Σχήμα 2). Περαιτέρω μελέτες έχουν δείξει ότι η υδατανθρακική μονάδα B περιέχει σημαντική ποσότηταθειικών ομάδων, κυρίως ως τελικές β-συνδεδεμένες Gal-3-SO₄ (40). Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι οι θειικές ομάδες ρυθμίζουν τη μεταφορά της Tg, αλλά επίσης βοηθούν στη συμπυκνωμένη αποθήκευσή της στο κοίλωμα των θυλακίων του θυρεοειδούς (41). Ακόμα, στην Tg του ανθρώπου, του αρουραίου και του βοδιού, έχει αναφερθεί η παρουσία 6-φωσφορικής μαννόζης. Στα είδη αυτά υπάρχουν περίπου 10-12 mol φωσφορικών ομάδων ανά mol πρωτεΐνης (42). Η φωσφορυλίωση της Tg είναι πιθανό να επηρεάζει την ορμονογένεση (43).

2.2 Η Ακετυλοχολινεστεράση

Η ακετυλοχολινεστεράση (AChE, EC 3.1.1.7.) αποτελεί σημαντική συνιστώσα των χολινεργικών συνάψεων του κεντρικού και περιφερικού νευρικού συστήματος, καθώς και των νευρομυϊκών συνάψεων. Ρόλος του ενζύμου αυτού είναι να καταλύει την υδρόλυση του νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνης (Σχήμα 5), ελέγχοντας έτσι τη διάρκεια της παρουσίας και της

δράσης του νευροδιαβιβαστή στη σύναψη (44). Η AChE, σε μικρότερες ποσότητες, συναντάται επίσης σε εξωσυναπτικές περιοχές των μυών και των νεύρων καθώς και στις μεμβράνες των ερυθροκυττάρων (45,46). Η παρουσία της AChE διαπιστώθηκε ακόμα σε εμβρυικούς (47) και καρκινικούς ιστούς (48).



Σχήμα 5. Ο ρόλος της ακετυλοχολινεστράσης (AChE) στη νευρική και νευρομυϊκή σύναψη (A) είναι να ρυθμίζει τη νευροδιαβίβαση υδrolύοντας το νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνη (ACh). Όταν ο νευρικός παλμός, ο οποίος είναι μια αλλαγή στην πολικότητα της κυτταρικής μεμβράνης (B), φτάσει στην προσυναπτική μεμβράνη, τότε απελευθερώνεται ο νευροδιαβιβαστής, που στην περίπτωση των χολινεργικών συνάψεων είναι η ACh. Η δέσμευση της ACh στον υποδοχέα της (AChR) που βρίσκεται στη μετασυναπτική μεμβράνη οδηγεί στη συνέχιση της διάδοσης του νευρικού παλμού στο γειτονικό κύτταρο. Με την υδρόλυση της ACh από την AChE παύει η διέγερση της μετασυναπτικής μεμβράνης και έτσι ελέγχεται η διάδοση του νευρικού παλμού.

2.2.1 Πρωτοταγής δομή της ακετυλοχολινεστεράσης

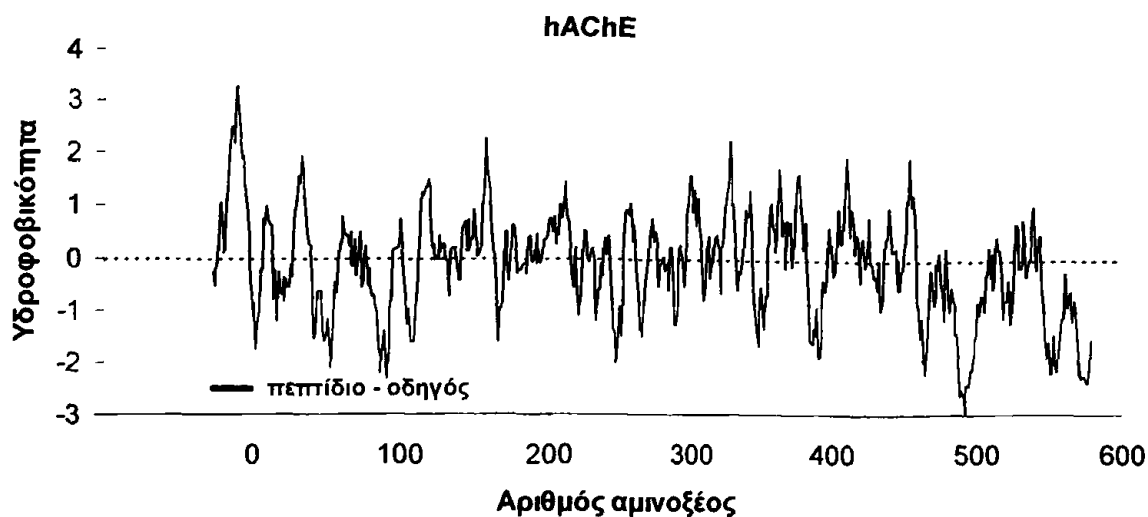
Η αλληλουχία των νουκλεοτιδίων ενός cDNA της AChE από το ηλεκτροφόρο σαλάχι *Torpedo californica* προσδιορίστηκε από τους



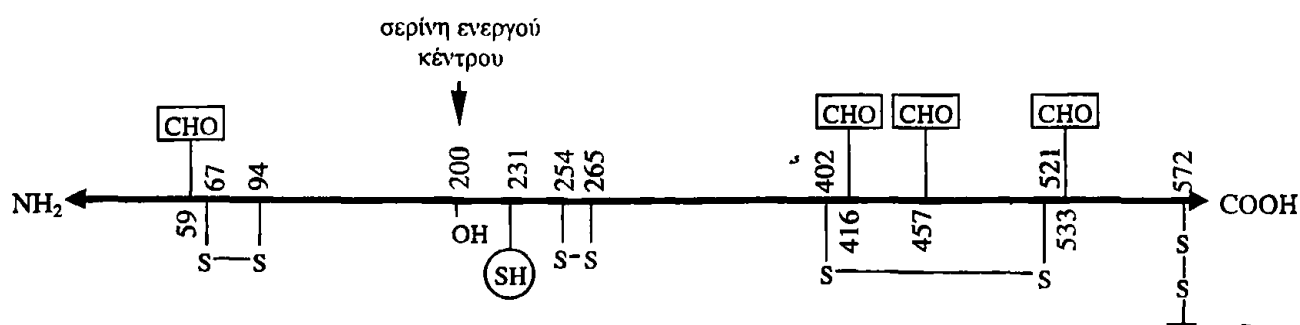
Schumacher και συν. (29). Από τη νουκλεοτιδική αλληλουχία προσδιορίστηκε η πρωτοταγής δομή της πρωτεΐνης. Η αμινοξική αλληλουχία που προκύπτει από το cDNA συγκρίθηκε με γνωστής αλληλουχίας πεπτίδια, τα οποία προέρχονται από πέψη, με θρυψίνη, της καταλυτικής υπομονάδας της μορφής 11S του ενζύμου. Από τη σύγκριση διαπιστώθηκε ότι το cDNA αντιστοιχεί στη μορφή 11S της AChE.

Πριν από την αμινοξική αλληλουχία της ώριμης πρωτεΐνης, μήκους 575 αμινοξικών κατάλοιπων, υπάρχει ένα υδρόφοβο πεπτίδιο-οδηγός το οποίο κατευθύνει την πρωτεΐνη που συντίθεται, διαμέσου της μεμβράνης. Το πρότυπο υδροφοβικότητας (Σχήμα 6) των υπολοίπων αμινοξικών κατάλοιπων είναι χαρακτηριστικό μιας εκκρινόμενης σφαιρικής πρωτεΐνης (49). Στο μόριο υπάρχουν οκτώ κατάλοιπα κυστεΐνης, από τα οποία τα έξι συμμετέχουν σε ενδομοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς (50) (Σχήμα 7). Η σερίνη του ενεργού κέντρου (§2.2.4) βρίσκεται στη θέση 200 (Σχήμα 7). Στην AChE του ψαριού *Torpedo californica*, εντοπίστηκαν τέσσερις πιθανές θέσεις N-γλυκοζυλίωσης και επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη υδατανθράκων στις τρεις από αυτές (49). Πιθανές θέσεις N-γλυκοζυλίωσης είναι οι ελεύθερες αμινομάδες των κατάλοιπων ασπαραγίνης που συμμετέχουν σε αλληλουχίες της μορφής Asn-X-Ser/Thr, όπου X είναι ένα οποιοδήποτε αμινοξύ.

Η αμινοξική αλληλουχία της AChE προσδιορίστηκε και σε άλλα είδη. Οι Doctor και συν. (51) προσδιόρισαν την πρωτοταγή δομή της AChE από ορό βοδινού εμβρύου. Η πρωτεΐνη αυτή περιλαμβάνει 583 αμινοξικά κατάλοιπα και πέντε πιθανές θέσεις N-γλυκοζυλίωσης. Η ομολογία της με την αντίστοιχη πρωτεΐνη από *T. californica* (29) είναι 60%, ενώ με την AChE από *Drosophila* (52) είναι 32%. Η ενεργή Ser της AChE του βοδιού εντοπίστηκε στη θέση 203. Η ανθρώπινη AChE βρέθηκε ότι αποτελείται από 583 αμινοξικά κατάλοιπα, περιλαμβάνει τρεις θέσεις N-γλυκοζυλίωσης και επτά κατάλοιπα κύστεΐνης, από τα οποία τα έξι σχηματίζουν ενδομοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς (53).



Σχήμα 6. Απεικόνιση υδροφοβικότητας της ακετυλοχολινεστεράσης σύμφωνα με τον αλγόριθμο των Kyte & Doolittle (54). Διακρίνεται το υδρόφοβο πεπτιδίο-οδηγός που κατευθύνει την πρωτεΐνη διαμέσου της μεμβράνης κατά την πρωτεϊνοσύνθεση. Το τμήμα αυτό δεν περιλαμβάνεται στην ώριμη πρωτεΐνη.



Σχήμα 7. Σχηματική αναπαράσταση του μορίου της AChE. Σημειώνονται οι δισουλφιδικοί δεσμοί (S-S), οι πιθανές θέσεις N-γλυκοζυλίωσης (CHO) και η σερίνη του ενεργού κέντρου. Η σουλφυδρυλομάδα της κυστεΐνης 231 βρίσκεται σε ελεύθερη μορφή, ενώ η κυστεΐνη 572 σχηματίζει διαμοριακό δισουλφιδικό δεσμό με μια διπλανή υπομονάδα. (55)

2.2.2 Πολυμορφισμός της ακετυλοχολινεστεράσης

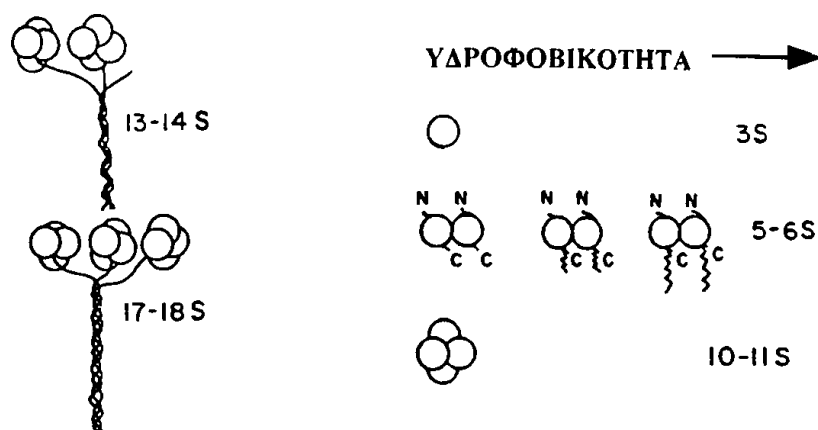
Η ύπαρξη πολυμορφισμού στο μόριο της AChE διαπιστώθηκε από τους Massoulie και Rieger (56). Επόμενες μελέτες κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι υπάρχουν δύο βασικές κατηγορίες μορίων AChE (45) (Σχήμα 8).

(i) Η πρώτη περιλαμβάνει σφαιρικές μορφές που παρουσιάζονται σαν ολιγομερή μιας καταλυτικής υπομονάδας και διαφέρουν στην έκταση της υδροφοβικότητας. Τα μόρια αυτά μπορεί να περιλαμβάνουν μία, δύο ή τέσσερις καταλυτικές υπομονάδες. Οι υρόφοβες μορφές έχουν συνδεδεμένο ένα γλυκοφωσφολιπίδιο που περιέχει ινοσιτόλη, τη γλυκοζυλ-φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη, στο καρβοξύλιο του καρβοξυ-τελικού άκρου της κάθε καταλυτικής υπομονάδας (57,58). Αυτή η υρόφοβη περιοχή είναι πιθανώς υπεύθυνη για τη συγκράτηση του ενζύμου στην κυτταρική μεμβράνη (57,59).

(ii) Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει ασύμμετρες μορφές οι οποίες αποτελούνται από τετραμερή καταλυτικών υπομονάδων ενωμένων μέσω δισουλφιδικών δεσμών με μια νηματοειδή ουρά (Σχήμα 8). Η νηματοειδής ουρά, μακριά από τις καταλυτικές υπομονάδες, συνίσταται από μια τριπλή έλικα, η οποία μοιάζει με κολλαγόνο (κολλαγονοειδής). Στην περιοχή κοντά στις καταλυτικές υπομονάδες, η νηματοειδής ουρά δεν μοιάζει με κολλαγόνο (μη κολλαγονοειδής) και κάθε αλυσίδα της τριπλής έλικας, ενώνεται με ένα τετραμερές καταλυτικών υπομονάδων μέσω δισουλφιδικού δεσμού (60). Οι αλυσίδες της τριπλής έλικας οι οποίες σχηματίζουν τη νηματοειδή ουρά δεν έχουν καταλυτική ενεργότητα και ονομάζονται δομικές υπομονάδες. Η πέψη των ασύμμετρων μορφών AChE με κολλαγενάση ή θρυψίνη απομακρύνει τις δομικές υπομονάδες, χωρίς απώλεια της ενζυμικής ενεργότητας των καταλυτικών υπομονάδων. Κάθε καταλυτική υπομονάδα έχει μοριακό βάρος 70 kDa, το δε μοριακό βάρος των ασύμμετρων μορφών AChE πλησιάζει τα 1,000 kDa. Η συγκρότηση των ασύμμετρων μορφών από καταλυτικές και δομικές υπομονάδες ολοκληρώνεται στο σύμπλεγμα Golgi πριν την έξοδο των μορίων από το κύτταρο (61,62). Στο ηλεκτροφόρο ψάρι *T. californica* βρέθηκε και ένας δεύτερος τύπος δομικής υπομονάδας υπό τη μορφή ενός μη κολλαγονοειδούς πεπτιδίου 100 kDa, ενωμένου μέσω δισουλφιδικών δέσμων, τόσο με τις καταλυτικές όσο και με τις κολλαγονοειδείς δομικές υπομονάδες (60). Τέτοια υπομονάδα δεν διαπιστώθηκε στο ηλεκτροφόρο χέλι *Electrophorus electricus*.

ΑΣΥΜΜΕΤΡΕΣ ΜΟΡΦΕΣ

ΣΦΑΙΡΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ



Σχήμα 8. Σχηματική αναπαράσταση των μοριακών μορφών της ακετυλοχολινεστεράσης. Στις ασύμμετρες μορφές οι τετραμερείς καταλυτικές υπομονάδες ενώνονται με δισουλφιδικό δεσμό με τη νηματοειδή ουρά. Οι δομικές υπομονάδες της νηματοειδούς ουράς σχηματίζουν τριπλή έλικα κολλαγονοειδούς μορφής μακριά από τις καταλυτικές υπομονάδες, ενώ κοντά σ'αυτές η δομή της νηματοειδούς ουράς είναι μη κολλαγονοειδής. Οι μορφές 17S και 13S διαφέρουν στον αριθμό των τετραμερών καταλυτικών υπομονάδων που είναι ενωμένες με τη νηματοειδή ουρά. Οι σφαιρικές μορφές μπορεί να είναι μονομερή, διμερή ή τετραμερή των καταλυτικών υπομονάδων. Η υδροφοβικότητα ορισμένων σφαιρικών μορφών οφείλεται στο φωσφολιπίδιο που είναι ενωμένο με την καρβοξυλομάδα του καρβοξυ-τελικού αμινοξικού καταλοίπου. (49)

Οι σφαιρικές και οι ασύμμετρες μορφές AChE δεν παρουσιάζουν διαφορές ως προς την καταλυτική ενεργότητα (63). Εντούτοις, σε κάποιες μελέτες, διαπιστώθηκαν μικρές διαφορές μεταξύ διμερών σφαιρικών μορφών και καταλυτικών υπομονάδων των ασύμμετρων μορίων, όσον αφορά την αμινοξική σύσταση, τη συμπεριφορά σε SDS-PAGE, την αναγνώριση από μονοκλωνικά αντισώματα και τους πεπτιδικούς χάρτες που προέκυψαν από HPLC μετά από ενζυμική πέψη (64,60).

Η ύπαρξη διαφορετικών μορφών AChE (σφαιρικές και ασύμμετρες) αποδόθηκε αρχικά σε ξεχωριστά γονίδια ή/και σε εναλλακτική ωρίμανση (splicing) του RNA. Σε *in vitro* μετάφραση ολικού mRNA και ανοσοκατακρήμνιση με αντι-AChE αντισώματα βρέθηκαν δύο προϊόντα μετάφρασης (65,66). Πολλαπλά είδη mRNA διαπιστώθηκαν σε πειράματα καθίζησης (sedimentation) ακολουθούμενα από πρωτεϊνοσύνθεση σε ωκύτταρα (67) καθώς και από ανάλυση τύπου Northern (29). Σήμερα γνωρίζουμε ότι υπάρχουν τρεις ισομορφές του ενζύμου που διαφέρουν στο καρβοξυ-τελικό άκρο τους και παράγονται με εναλλακτική ωρίμανση του RNA

που προέρχεται από το ένα και μοναδικό γονίδιο της AChE. Το γονίδιο αυτό εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 7q22 στον άνθρωπο και στο χρωμόσωμα 5 του ποντικού (68). Όλες οι ισομορφές της AChE στον άνθρωπο έχουν ένα κοινό πυρήνα που αποτελείται από 543 αμινοξέα και κωδικοποιείται από τα εξώνια E2, E3 και E4 του γονιδίου της AChE (το εξώνιο E1 δεν κωδικοποιεί για πρωτεΐνη) (69).

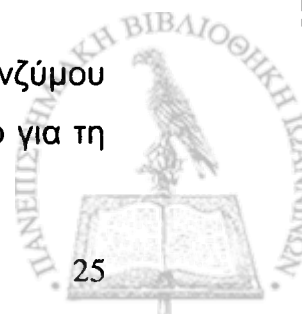
Οι τρεις ισομορφές της AChE είναι οι εξής:

α) Η *συναπτική*, (AChE-S). Αυτή προέρχεται από το mRNA που αποτελείται από τα εξώνια E1-E2-E3-E4-E6. Αυτό είναι το μετάγραφο που κυρίως συναντάται σε ιστούς του εγκεφάλου και των μυών. Η μετάφραση αυτού του mRNA οδηγεί σε μια πρωτεΐνη που φέρει 40 αμινοξέα πέρα από τον βασικό πυρήνα (εξώνια E2-E3-E4). Σε αυτή την καρβοξυ-τελική περιοχή περιλαμβάνεται και μια κυστεΐνη η οποία μπορεί να οδηγήσει σε διμερισμό της πρωτεΐνης μέσω δισουλφιδικού δεσμού (70). Η AChE-S συναντάται σε διαλυτές και υδρόφοβες μορφές, σαν μονομερές ή σε διάφορες πολυμερείς μορφές. Η AChE-S συναντάται στην κύρια συναπτική μορφή του ενζύμου που είναι η ασύμμετρη (τρία τετραμερή καταλυτικών υπομονάδων ενωμένα με νηματοειδή ουρά) (71).

β) Η μορφή *'readthrough'* (AChE-R). Στη μορφή αυτή το τελικό το ώριμο mRNA περιλαμβάνει και το εσώνιο I4, δηλαδή είναι E1-E2-E3-E4-I4-E5-E6. Το μετάγραφο αυτό συναντάται σε εμβρυϊκά και καρκινικά κύτταρα (72,73). Η AChE που προκύπτει από τη μετάφραση αυτού του mRNA περιέχει μια υδρόφιλη καρβοξυ-τελική περιοχή 26 αμινοξέων που δεν περιλαμβάνει κυστεΐνη (74). Κατά συνέπεια η AChE-R θα πρέπει να παραμένει μονομερής.

γ) Η *ερυθροκυτταρική* (AChE-E), προέρχεται από μετάφραση του mRNA που αποτελείται από τα εξώνια E1-E2-E3-E4-E5-E6. Η πρωτεΐνη που προκύπτει από τη μετάφραση περιλαμβάνει μια καρβοξυ-τελική περιοχή 43 αμινοξέων. Η περιοχή αυτή διασπάται στη συνέχεια μετά το αμινοξύ 14 του εξωνίου E5 (557 αμινοξέα από το αμινο-τελικό άκρο) και ενώνεται με γλυκοζυλ-φωσφατιδυλο ινοσιτόλη. Το λιπίδιο αυτό είναι υπεύθυνο για τη συγκράτηση του ενζύμου στις ερυθροκυτταρικές μεμβράνες (75,76).

Αφού η καταλυτική ενεργότητα των διαφόρων μορφών του ενζύμου AChE είναι ίδια, οι δομικές διαφορές φαίνεται να είναι σημαντικές μόνο για τη



ρύθμιση της κυτταρικής διαθεσιμότητας του μορίου. Είναι αρκετά πιθανό, η προσθήκη φωσφολιπιδίων να μην είναι ίδια σε όλους τους ιστούς και να καθορίζει αν τα μόρια του ενζύμου θα είναι διαλυτά ή δεσμευμένα, και σε ποιο βαθμό, στην κυτταρική μεμβράνη (55).

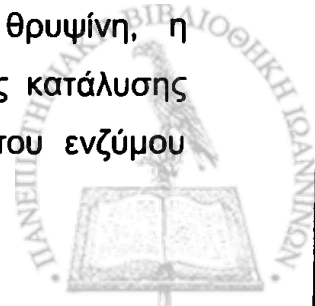
2.2.3 Κατανομή της ακετυλοχολινεστεράσης

Ο μοριακός πολυμορφισμός της AChE φαίνεται ότι σχετίζεται με την κατανομή του ενζύμου στους διάφορους ιστούς. Οι υδρόφοβες σφαιρικές μορφές είναι πολύ διαδεδομένες και εμφανίζονται τόσο σε συναπτικές όσο και σε μη συναπτικές περιοχές των μυών. Επίσης παρουσιάζονται σε μη διεγέρσιμα κύτταρα, όπως στην εξωτερική επιφάνεια των ερυθροκυττάρων. Οι ασύμμετρες μορφές περιορίζονται κυρίως στις συναπτικές περιοχές των γραμμωτών μυών και εμφανίζονται κατά τη δημιουργία των συνάψεων (77,78). Το φωσφολιπίδιο που περιέχουν οι υδρόφοβες σφαιρικές μορφές και το οποίο είναι υπεύθυνο για τη δημιουργία της υδρόφοβης περιοχής, προστίθεται στην πρωτεΐνη αμέσως μετά τη μετάφραση (79,80). Κατά συνέπεια, οι διαλυτές σφαιρικές μορφές, δε μπορεί να χρησιμεύουν ως αποθήκη πρόδρομων μορίων για την παραγωγή των υδρόφοβων μορφών. Οι διαλυτές μορφές εμφανίζονται στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό, αλλά απελευθερώνονται και από τους δένδριτες των ντοπαμινεργικών νευρώνων στη μέλαινα ουσία του Sommering (substantia nigra), στον εγκέφαλο, κατά τη νευρική διέγερση (81).

2.2.4 Ενεργό κέντρο και μηχανισμός κατάλυσης

Η AChE καταλύει την υδρόλυση της ακετυλοχολίνης με εξαιρετικά ταχύ ρυθμό. Έχει την ικανότητα να υδρολύει 4,000 μόρια ανά δευτερόλεπτο σε κάθε ενεργό κέντρο (68). Ο μηχανισμός κατάλυσης της AChE μοιάζει με τον τρόπο δράσης μιας ομάδας ενζύμων που ονομάζονται υδρολάσες σερίνης.

Στην περίπτωση των υδρολασών σερίνης, όπως η θρυψίνη, η χυμοθρυψίνη και η σουμπτιλζίνη, είναι γνωστός ο μηχανισμός κατάλυσης (82,83). Σε γενικές γραμμές, μια σερίνη στο ενεργό κέντρο του ενζύμου



πραγματοποιεί πυρηνόφιλη προσβολή στον καρβονυλικό άνθρακα του υποστρώματος, σχηματίζοντας ένα μεταβατικό, τετραεδρικό σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος. Αμέσως διασπάται το υπόστρωμα, ενώ η σερίνη του ενεργού κέντρου παραμένει ακυλιωμένη. Στη συνέχεια, το ακύλιο απομακρύνεται με υδρόλυση και το ένζυμο επανέρχεται στην αρχική του κατάσταση. Ένα κατάλοιπο ασπαρτικού οξέος και ένα κατάλοιπο ιστιδίνης, τα οποία βρίσκονται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, συμμετέχουν στη μεταφορά πρωτονίων κατά τη διάρκεια της κατάλυσης. Στην πρωτοταγή δομή της πρωτεΐνης, τα κατάλοιπα Asp και His απέχουν κάπως από την Ser του ενεργού κέντρου, όμως κατά την τρισδιάστατη διαμόρφωση του μορίου πλησιάζουν αρκετά μεταξύ τους ώστε να συμβάλουν στη διαδικασία της κατάλυσης. Για παράδειγμα στη χυμοθρυψίνη, οι θέσεις των τριών αυτών καταλοίπων είναι Asp¹⁰², His⁵⁷ και Ser¹⁹⁵.

Ένας παρόμοιος μηχανισμός κατάλυσης έχει προταθεί και για τις χολινεστεράσες (84,85), με βάση την κινητική συμπεριφορά και την ειδικότητα στους αναστολείς. Όπως φάνηκε από μελέτες περίθλασης ακτίνων-X, το ενεργό κέντρο της χυμοθρυψίνης βρίσκεται μέσα σε μια κοιλότητα του μορίου (82). Οι Ogert και συν. (86) έδειξαν ότι και στην περίπτωση της AChE, το ενεργό κέντρο πρέπει να βρίσκεται μέσα σε κοιλότητα του μορίου και όχι εκτεθειμένο. Οι ερευνητές χρησιμοποίησαν μονοκλωνικά και πολυκλωνικά αντισώματα έναντι ενός πεπτιδίου (25 αμινοξικών καταλοίπων) που αντιστοιχούσε στο ενεργό κέντρο της AChE από *T. californica*. Τα αντισώματα δεν μπορούσαν να δεσμευτούν στην AChE στη φυσική της μορφή, ενώ δεσμεύονταν σε αποδιαταγμένα μόρια.

Τα παραπάνω συμπεράσματα επιβεβαιώθηκαν όταν λύθηκε η τρισδιάστατη δομή της AChE από *T. californica* (87). Η διαφορά από τις άλλες υδρολάσες σερίνης ήταν ότι στην καταλυτική τριάδα αμινοξικών καταλοίπων συμμετέχει Glu αντί για Asp και η διάταξη των καταλοίπων αυτών ως προς την υπόλοιπη πρωτεΐνη παρουσιάζει μια κατοπτρική εικόνα σε σχέση με τη διάταξη που υπάρχει στις άλλες πρωτεάσες σερίνης. Συγκεκριμένα, στην AChE του *T. californica* η τριάδα καταλοίπων που συμμετέχουν στο ενεργό κέντρο είναι Glu³²⁷, His⁴⁴⁰ και Ser²⁰⁰ (87).

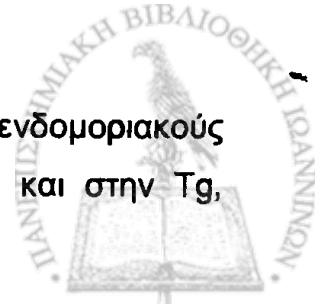
2.3 Ομολογία μεταξύ θυρεοσφαιρίνης και ακετυλοχολινεστεράσης

Ολόκληρη η αμινοξική αλληλουχία της ακετυλοχολινεστεράσης (AChE) εμφανίζει 28% ομολογία με το καρβοξυ-τελικό τμήμα της Tg (κατάλοιπα 2171-2748, αρίθμηση ως προς ανθρώπινη Tg) (29), ενώ τα κατάλοιπα 147-197 της AChE (*Torpedo*) έχουν 64% ομολογία με την αντίστοιχη περιοχή της Tg (23). Στη συνέχεια (Σχήμα 9) παρουσιάζεται μια στοίχιση που πραγματοποιήσαμε ανάμεσα στην ανθρώπινη Tg και την ανθρώπινη AChE. Όπως φαίνεται, η ομολογία ανάμεσα στην αλληλουχία 2191-2710 της ανθρώπινης Tg και της αλληλουχίας 15-544 της ανθρώπινης AChE φτάνει το 30.9%.

hTg	2191	GRSQAIQVGT	SWKQVDQFLGVPYAAPLAERRFOAPEPLN-WTGSWDASKPRASCWQ---
hAChE	15	GRLRGIRLKT	PGGPVSAFLGIPFAEPPMGPRRFLPPEPKQFPWSGVVDATTFQSVCYQYVD
		** *	* * * * * * * * * * * * * * * * * *
hTg	2247	---PGTRTST----	SPGVSEDCLYLNVFIPQNVAPNAS-VLVFFHNTMDREESEGWPAID
hAChE	75	TLYPGFEGTEMWNP	NRELSEDCLYLNVWTPYPRPTSPTPVLVWIYGGGFYSGASSLDVYD
		** *	* * * * * * * * * * * * * * * * * *
hTg	2299	GSFLAAVGNLIVVT	ASRVGVFGFLS-SGSGEVSGNWGLLDQVAALTWVQTHIRGFGGDP
hAChE	135	GRFLVQAERTVLVSM	NYRVGAFGLALPGSREAPGNVGLLDQRLALQWVENVAAGGDP
		* *	* * * * * * * * * * * * * * * * * *
hTg	2358	RRVSLAADRGGADVASI	HLLTARATNSQLFRRRAVLMMGGSALSPAAVISHERAQQAIALA
hAChE	195	TSVTLFGESAGAASV	GMHLLSPPSRG--LFHRAVLQSGAPNGPWATVGMGEARRRATQLA
		* *	* * * * * * * * * * * * * * * * * *
hTg	2418	KEVSCPMSSS----	QEVVSCLRQKPANVLNDAQTKLLAVSGPFHY-WGPVIDGHFLREPP
hAChE	253	HLVGCPPGGTGGNDT	ELVACLRTPAQVLVNHVHVLQESVFRFSFVPVVDGDFLSDTP
		* *	* * * * * * * * * * * * * * * * * *
hTg	2473	ARALKRSLWVEVDLL	IGSSQDDGLINRAKAVKQFEESRGRRTSSKTAFYQALQNSLGGEDS
hAChE	313	EALINAGDFHGLQVL	GVVKGDEGSYFLVYGAPGFSKDNESLISRAEFLAGVRVGVGP-QVS
		* *	* * * * * * * * * * * * * * * * * *
hTg	2533	DARVEAAATWYYSLEH	STDDYASFSSRALENATRDYFIICPIIDMASAWAKR-ARGNVFMY
hAChE	372	DLAAEAUVLHYTDWL	HP-EDPARLREALSDVVGDNVVCPPVAQLAGRLAAQGARVYAYVF
		* *	* * * * * * * * * * * * * * * * * *
hTg	2592	HAPENYGHGSLELLA----	DVQFALGLPFYPAYEGQFSLEEKSLSLKIMQYFSHFIRSGN
hAChE	431	EHRASTLSWPLWMGV	PHGYEIEFIFGIPLDPSR--NYTAEEKIFAQRLMRYWANFARTGD
		*	* * * * * * * * * * * * * * * * * *
hTg	2648	PNYPYEFSRKVP	TFATPWPDFVPRAGGENYKEFS-ELLPNRQGLKKADCSFWSKYISLKL
hAChE	489	PNEPRDPK-----	APQWPPYT--AGAQQYVSLDLRPLEVRRGLRAQACAFWNRFPLPKLL
		* *	* * * * * * * * * * * * * * * * * *
hTg	2707	TSAD	
hAChE	541	SATD	
		*	

Σχήμα 9. Στοίχιση των πρωτεϊνών ανθρώπινη Tg (hTg) και ανθρώπινη AChE (hAChE) με τον αλγόριθμο BLOSUM62 (<http://www.expasy.ch/tools/sim-prot.html>). Το τμήμα της hTg περιλαμβάνει 520 αμινοξέα και το τμήμα της hAChE περιλαμβάνει 530 αμινοξέα. Οι αστερίσκοι επισημαίνουν τα ταυτόσημα αμινοξέα και η ομολογία είναι 30.9%. Η αρίθμηση των αμινοξέων αντιστοιχεί στις ώριμες πρωτεΐνες, χωρίς το πεπτιδιο-οδηγό.

Τα έξι κατάλοιπα κυστεΐνης, που σχηματίζουν ενδομοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς στο μόριο της AChE, διατηρούνται και στην Tg.



γεγονός” που υποδηλώνει ότι είναι πολύ πιθανό να υπάρχει παρόμοια τρισδιάστατη διαμόρφωση των δύο πρωτεϊνών. Τα άλλα δύο κατάλοιπα κυστεΐνης της AChE, τα οποία δεν συμμετέχουν σε ενδομοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς, δεν διατηρούνται στην Tg. Ομοίως, δεν διατηρούνται η ενεργή σερίνη της AChE και οι τρεις τυροσίνες του καρβοξυτελικού άκρου της Tg, οι οποίες αποτελούν ορμονογόνες θέσεις. Ακόμα, ούτε οι θέσεις γλυκοζυλίωσης είναι συντηρητικές στα δύο μόρια (50). Στην κοινή τρισδιάστατη δομή των δύο πρωτεϊνών συνηγορεί και η ομοιότητα στο πρότυπο υδροφιλικότητας της AChE με αυτό της ομόλογης περιοχής της Tg (88).

Η ομολογία ανάμεσα στην AChE και την Tg παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς οι δύο αυτές πρωτεΐνες δεν έχουν κάποια κοινή λειτουργία. Τα στοιχεία που υπάρχουν υποστηρίζουν την υπόθεση ότι τα γονίδια που κωδικοποιούν τις δύο πρωτεΐνες προέρχονται από ένα κοινό προγονικό γονίδιο. Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό και των δύο αυτών πρωτεϊνών είναι η αλληλεπίδρασή τους με την κυτταρική μεμβράνη. Έτσι, διατυπώθηκε η υπόθεση ότι η ομόλογη με την AChE περιοχή της Tg είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση στην μεμβράνη και ίσως διαδραματίζει κάποιο ρόλο στη διαβίβαση μηνυμάτων μέσω της μεμβράνης, π.χ. στην ενδοκύττωση της Tg από τα θυρεοκύτταρα (88).

2.4 Αυτοανοσία του θυρεοειδούς

2.4.1 Αυτοάνοσες ασθένειες του θυρεοειδούς

Τρεις κυρίως παθήσεις χαρακτηρίζονται ως αυτοάνοσες ασθένειες του θυρεοειδούς: ο αυτοάνοσος υποθυρεοειδισμός (θυρεοειδίτιδα Hashimoto και πρωτοπαθές μυξοίδημα ή πρωτοπαθής υποθυρεοειδισμός), η νόσος Graves και η θυρεοειδίτιδα μετά τον τοκετό (postpartum thyroiditis). Η θυρεοειδίτιδα Hashimoto και η νόσος Graves, οι οποίες εμφανίζονται με μεγαλύτερη συχνότητα, αναλύονται περισσότερο στη συνέχεια.

2.4.1.1 Θυρεοειδίτιδα Hashimoto

Η θυρεοειδίτιδα Hashimoto είναι μια ασθένεια που εμφανίζεται κυρίως στις γυναίκες μέσης ηλικίας. Η νόσος προσβάλλει περίπου το 1% του γυναικείου πληθυσμού, ενώ η συχνότητα εμφάνισής της στους άνδρες είναι τουλάχιστον 10 φορές μικρότερη (89). Η κύρια εκδήλωσή της είναι οίδημα του θυρεοειδούς αδένος (βρογχοκήλη) και σε προχωρημένο στάδιο, ελαττωμένη παραγωγή των θυρεοειδικών ορμονών. Ο επακόλουθος υποθυρεοειδισμός οδηγεί σε διάφορα συμπτώματα, τα κυριότερα από τα οποία είναι ο αργός μεταβολισμός και η νωχελικότητα (90). Γενικά, η θυρεοειδίτιδα Hashimoto (αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα με βρογχοκήλη) διακρίνεται σε τρεις παραλλαγές, την οξύφιλη (oxyphil, η κλασσική βρογχοκήλη Hashimoto), την ινώδη (fibrous) και τη λεμφοκυτταρική (lymphocytic) (91). Αντίθετα, το πρωτοπαθές μυξοίδημα σπάνια συνοδεύεται από την παρουσία βρογχοκήλης. Η ιστολογική εικόνα της ινώδους παραλλαγής της θυρεοειδίτιδας Hashimoto είναι όμοια με αυτήν του πρωτοπαθούς μυξοιδήματος και περιλαμβάνει διήθηση λεμφοκυττάρων στο θυρεοειδή (92), ενώ η σοβαρότητα της ίνωσης σχετίζεται άμεσα με την ανάπτυξη υποθυρεοειδισμού (93). Η λεμφοκυτταρική παραλλαγή της θυρεοειδίτιδας Hashimoto δείχνει μικρή μεταβολή με το χρόνο. Σημαντική μείωση της διόγκωσης του θυρεοειδούς αδένος παρατηρείται σε λιγότερο από το ένα τρίτο των ασθενών που υφίστανται φαρμακευτική χορήγηση ορμονών του θυρεοειδούς (η οποία μειώνει τη διέγερση από TSH) και σε ακόμη μικρότερο ποσοστό ασθενών που δεν λαμβάνουν τέτοια φαρμακευτική αγωγή (94). Όπως αναλύεται παρακάτω, η θυρεοειδίτιδα Hashimoto χαρακτηρίζεται από ανοσοαπόκριση B και T-κυττάρων έναντι θυρεοειδικών αντιγόνων και ισχυρή διήθηση λεμφοκυττάρων στον θυρεοειδή αδένος, που έχει ως αποτέλεσμα την καταστροφή των κυττάρων των θυλακίων του αδένος (95). Η πλειονότητα των T-κυττάρων που βρίσκονται εντός του θυρεοειδούς αδένος έχουν φαινότυπο CD8, γεγονός που υποδηλώνει κυτταροτοξική δράση έναντι των θυρεοκυττάρων (96,97).



2.4.1.2 Νόσος Graves

Κύρια εκδήλωση της νόσου Graves είναι η αυξημένη δραστηριότητα του θυρεοειδούς αδένος, η οποία οδηγεί σε υπερκινητικότητα του ασθενούς, μυϊκό τρόμο και αϋπνία (90). Συναντάται περίπου στο 1.9% των γυναικών και 0.16% των ανδρών (89). Η νόσος Graves χαρακτηρίζεται από υπερπλασία των θυρεοκυττάρων, που είναι αποτέλεσμα της διέγερσης από αντισώματα έναντι του υποδοχέα της TSH (§2.4.1.3.3). Ένα χαρακτηριστικό που συναντάται σε σημαντικό ποσοστό των ασθενών με νόσο Graves και σε πολύ μικρότερο βαθμό στη θυρεοειδίτιδα Hashimoto, είναι η θυρεοειδική οφθαλμοπάθεια. Κοινά συμπτώματα είναι η περικογχική διόγκωση, οίδημα, εξόφθαλμος, μειωμένη κινητικότητα του βολβού και μειωμένη όραση (98). Οι παθογονικοί μηχανισμοί που οδηγούν στις κλινικές εκδηλώσεις της θυρεοειδικής οφθαλμοπάθειας αναπτύσσονται λόγω συσσώρευσης γλυκοζαμινογλυκανών στον οπισθοβολβικό χώρο. Τέτοιες γλυκοζαμινογλυκάνες είναι η θειική χονδροϊτίνη Α, η θειική δερματάνη και το υαλουρονικό οξύ (99). Η θυρεοειδική οφθαλμοπάθεια είναι κλινικά εμφανής στο 25-50% των ασθενών με νόσο Graves, ενώ υπάρχουν υποκλινικά ευρήματα οφθαλμικής παθολογίας στους περισσότερους από τους ασθενείς (100). Η παρουσία αυτοάνοσης ασθένειας του θυρεοειδούς φαίνεται να είναι προϋπόθεση για την ανάπτυξη θυρεοειδικής οφθαλμοπάθειας (101). Επιπλέον, υπάρχει μια χρονική συσχέτιση ανάμεσα στην έναρξη της νόσου Graves και την εμφάνιση της θυρεοειδικής οφθαλμοπάθειας. Οι ασθενείς μπορεί να εμφανίσουν πρώτα την οφθαλμοπάθεια ή πρώτα τη νόσο Graves. Πάντως, ανεξάρτητα από το ποια ασθένεια θα εμφανιστεί πρώτη, στο 80% των ασθενών η δεύτερη ασθένεια θα ακολουθήσει μέσα σε 18 μήνες (102).

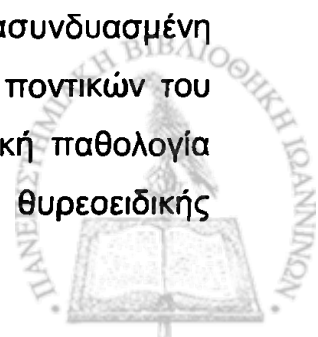
Σε μερικές περιπτώσεις, παρατηρείται επικάλυψη της νόσου Graves με τη θυρεοειδίτιδα Hashimoto. Υπάρχει περίπτωση ο αυτοάνοσος υποθυρεοειδισμός να ακολουθήσει μετά από νόσο Graves σε περιπτώσεις φαρμακευτικής αγωγής (103,104), αλλά και κατά την εγκυμοσύνη (105). Η αντίθετη διαδοχή, δηλαδή η νόσος Graves να έπεται του υποθυρεοειδισμού, παρατηρείται (106), αλλά είναι λιγότερο συνήθης.

2.4.1.3 Ανοσοπαθογένεια των αυτοάνοσων ασθενειών του θυρεοειδούς

Ο ενδεχόμενος παθογενετικός ρόλος των αυτοαντισωμάτων έναντι αυτοαντιγόνων του θυρεοειδούς στις αυτοάνοσες ασθένειες του θυρεοειδούς εξετάζεται εκτενώς στην §2.4.2.2. Στις επόμενες παραγράφους αναφέρεται το μοντέλο της πειραματικής αυτοάνοσης θυρεοειδίτιδας, καθώς επίσης ο ρόλος της απόπτωσης και της μοριακής μίμησης στην παθογένεια των αυτοάνοσων ασθενειών του θυρεοειδούς.

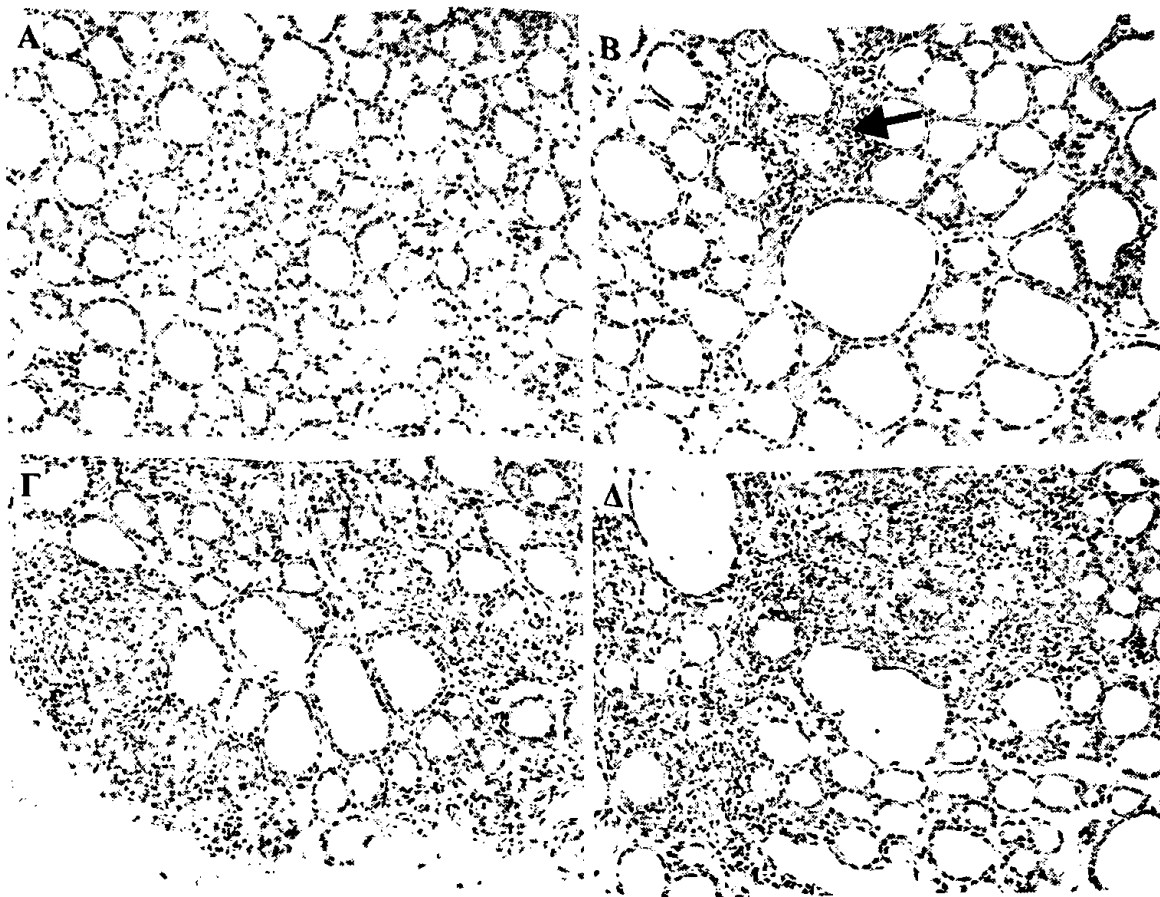
2.4.1.3.1 Διαταραχή στην ανοσορρύθμιση κατά την πειραματική αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα

Για την κατανόηση της ανοσοπαθογένειας, είναι ιδιαίτερα χρήσιμη η μελέτη πειραματικών προτύπων (μοντέλων), τα οποία μπορούν να συμβάλουν στην κατανόηση των μηχανισμών ανάπτυξης της νόσου. Η πειραματική αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα (experimental autoimmune thyroiditis, EAT) είναι μια παροδική αυτοάνοση ασθένεια του θυρεοειδούς, η οποία προκαλείται από τη χορήγηση θυρεοειδικού ιστού ή Tg σε διάφορα ζωικά είδη (107,108). Επίσης η νόσος μπορεί να προκληθεί με τη χορήγηση της θυρεοειδικής υπεροξειδάσης (TPO, μικροσωμικό κλάσμα) (109) ή του υποδοχέα της θυρεοτροπίνης (TSH-R) (110). Τα παραπάνω αντιγόνα (Tg, TPO και TSH-R) αποτελούν τα κύρια αυτοαντιγόνα του θυρεοειδούς αδένος (§2.4.2). Αυτή η νόσος εμφανίζεται κατά κανόνα σε στελέχη ζώων (ποντικών) που φέρουν κάποιο MHC απλότυπο, ο οποίος τους προσδίδει ευαισθησία στην ανάπτυξη θυρεοειδίτιδας (111-113), αποτελεί δε ζωικό μοντέλο για τη θυρεοειδίτιδα Hashimoto. Πρόσφατα προκλήθηκε EAT σε ποντίκια του στελέχους BALB/c με γενετικό εμβολιασμό του TSH-R, δηλαδή εμβολιασμό με ένα πλασμίδιο που έφερε το cDNA του ανθρώπινου TSH-R (114). Θυρεοειδίτιδα μεταφέρθηκε σε ποντίκια των στελεχών BALB/c και NOD με σπληνοκύτταρα από άλλα ποντίκια που είχαν ανοσοποιηθεί με TSH-R (115). Στα τελευταία, η ανοσοποίηση πραγματοποιήθηκε είτε με ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη, είτε με γενετικό εμβολιασμό. Στην περίπτωση των ποντικών του στελέχους BALB/c, 17 από τα 25 ζώα παρουσίασαν οφθαλμική παθολογία παρόμοια με την αντίστοιχη παθολογία της ανθρώπινης θυρεοειδικής



οφθαλμοπάθειας (116). Τα ποντίκια του στελέχους NOD δεν εμφάνισαν κάποια αλλαγή στους οφθαλμικούς ιστούς. EAT μπορεί να προκληθεί και αυθόρμητα σε συγκεκριμένα στελέχη ζώων, όπως είναι το εύσαρκο στέλεχος κοτόπουλου (OS), οι διαβητικοί αρουραίοι BB/W και τα μη εύσαρκα διαβητικά ποντίκια (NOD). Η EAT χαρακτηρίζεται από μορφολογικές αλλαγές στο θυρεοειδή αδένα (108). Κύριο χαρακτηριστικό είναι η διήθηση λεμφοκυττάρων (lymphocytic infiltration) και κακώσεις στον αδένα (Εικόνα 2). Οι μορφολογικές αλλαγές στο θυρεοειδή αδένα χρησιμοποιούνται ως κριτήριο για την ανάπτυξη της EAT. Η νόσος μπορεί ακόμα να προκληθεί με χορήγηση αντιορού έναντι Tg. Για παράδειγμα, προκλήθηκε EAT σε ινδικά χοιρίδια που εμβολιάστηκαν με αντιορό έναντι της Tg του είδους τους, ο οποίος είχε παραχθεί σε κουνέλια (117). Η χορήγηση Tg ή άλλων θυρεοειδικών αντιγόνων σε κουνέλια δεν οδηγεί πάντοτε στην ανάπτυξη EAT (108,118). Οι Champion και συν. (119) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η Tg με μικρό βαθμό ιωδίωσης δεν επάγει EAT. Επίσης οι Hoshioaka και συν. (120) συμπέραναν ότι η ιωδίωση της Tg, δηλαδή η σύνθεση μονο- και δι-ιωδοτυροσίνης πάνω στη Tg, είναι καθοριστική για την παραγωγή αντισωμάτων έναντι της Tg και για την επαγωγή EAT. Ωστόσο, όπως θα αναπτύξουμε παρακάτω (§2.4.5), άλλες εργασίες (121) κατέληξαν σε διαφορετικό συμπέρασμα, ότι δηλαδή η ιωδίωση της Tg δεν είναι απαραίτητη για την επαγωγή EAT.

Όπως θα αναπτυχθεί εκτενώς στην §2.4.4 το πειραματικό μοντέλο της EAT συνέβαλε σημαντικά στην αναγνώριση πεπτιδίων της Tg που περιέχουν T-επίτοπους (επίτοπους T-λεμφοκυττάρων) και είναι παθογονικά, δηλαδή έχουν την ικανότητα όταν χορηγούνται να επάγουν την ανάπτυξη θυρεοειδίτιδας.



Εικόνα 2. Τυπική ιστολογική εμφάνιση διήθησης λεμφοκυττάρων σε θυρεοειδή αδένες ποντικού μετά από επαγωγή EAT με χορήγηση Tg ή πεπτιδίων της Tg. (Α) κανονικός αδένας και (Β-Δ) αδένες με αυξανόμενη έκταση διήθησης. Υψηλά επίπεδα διήθησης συναντώνται μόνο μετά από χορήγηση ολόκληρης Tg, ενώ η χορήγηση παθογονικών πεπτιδίων προκαλεί μικρότερου βαθμού διήθηση (122).

2.4.1.3.2 Ο ρόλος της απόπτωσης στην παθογένεια των αυτοάνοσων ασθενειών του θυρεοειδούς

Απόπτωση είναι ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος που προκαλείται από την ελεγχόμενη ενεργοποίηση ενός προϋπάρχοντος προγράμματος, κωδικοποιημένου στο γονιδίωμα των κυττάρων. Η δυσλειτουργία ρύθμισης της απόπτωσης μπορεί να οδηγήσει σε νόσο. Μια από τις καλύτερα χαρακτηρισμένες διεργασίες απόπτωσης, είναι το μονοπάτι του Fas (Fas pathway). Το Fas είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη, η οποία μπορεί να ενεργοποιηθεί με την πρόσδεση του Fas ligand (FasL) στην εξωκυττάρια περιοχή της. Το FasL είναι μια πρωτεΐνη που μπορεί να βρίσκεται, είτε προσδεδεμένη σε κυτταρικές μεμβράνες, είτε σε ελεύθερη μορφή. Η ενεργοποίηση του Fas από το FasL επάγει στο κύτταρο μια σειρά

βιοχημικών αντιδράσεων, που οδηγούν στον προγραμματισμένο θάνατο του κυττάρου (123).

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος εμπλέκεται στην παθογένεια των αυτοάνοσων ασθενειών του θυρεοειδούς. Κύτταρα θυλακίων θυρεοειδούς αδένων σε δείγματα από ασθενείς με θυρεοειδίτιδα Hashimoto έδειξαν ισχυρή ανοσοϊστοχημική χρώση για Fas και FasL και υψηλό ρυθμό απόπτωσης (124), ενώ τα υγιή θυλάκια δείχνουν ενδιάμεση έκφραση του Fas, μικρή ή καθόλου έκφραση του FasL και μικρό ποσοστό απόπτωσης (125). Η Bcl-2 είναι μια αντιαποπτωτική πρωτεΐνη, η οποία πιστεύεται ότι παρεμποδίζει την απόπτωση που προκαλείται από ακτινοβολία, καταστροφή του DNA και φάρμακα (126). Η πρωτεΐνη αυτή δεν φαίνεται να αναστέλλει την απόπτωση που επάγεται από την αλληλεπίδραση Fas-FasL. Ανοσοϊστοχημική χρώση θυρεοκυττάρων από ασθενείς με θυρεοειδίτιδα Hashimoto, έδειξε μικρή έκφραση της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2. Η έκφραση της πρωτεΐνης αυτής ήταν υψηλή στους υγιείς μάρτυρες (125,127). Τα δεδομένα οδηγούν στην υπόθεση ότι, στη θυρεοειδίτιδα Hashimoto, τα κύτταρα των θυλακίων του θυρεοειδούς αδένων υφίστανται απόπτωση μέσω ενίσχυσης της έκφρασης των Fas και FasL και μείωσης της παραγωγής της πρωτεΐνης Bcl-2. Τα λεμφοκύτταρα που διηθούν το θυρεοειδή αδένων δεν φαίνεται να εμπλέκονται άμεσα σε αυτή τη διαδικασία, αφού εμφανίζουν χαμηλά επίπεδα Fas και FasL και υψηλά επίπεδα Bcl-2 (125,127). Όμως, είναι πιθανόν τα λεμφοκύτταρα αυτά να συμβάλλουν στην ενεργοποίηση του αποπτωτικού μηχανισμού παρέχοντας τις κατάλληλες κυτταροκίνες που απαιτούνται για την παραγωγή των Fas και FasL.

Στη νόσο Graves, τα θυρεοκύτταρα εκφράζουν τόσο το Fas όσο και το FasL *in vivo*, όμως απόπτωση σε θυρεοειδείς αυτών των ασθενών είναι περιορισμένη (128). Φαίνεται ότι κάποιοι άλλοι παράγοντες αναστέλλουν την απόπτωση που προκαλείται από την αλληλεπίδραση Fas-FasL. Ένας τέτοιος παράγοντας μπορεί να είναι η αυξημένη παρουσία διαλυτού Fas (sFas) στον ορό των ασθενών με νόσο Graves (129,130). Το sFas προσδένεται στο FasL αναστέλλοντας έτσι την αλληλεπίδραση Fas-FasL. Από την άλλη, η αυξημένη παρουσία sFas στον ορό των ασθενών με νόσο Graves είναι πιθανόν να

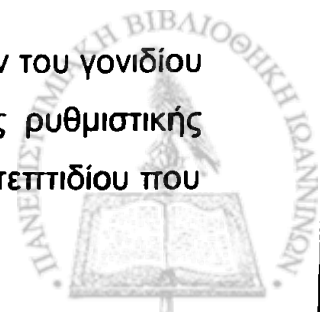


εμπλέκεται στην παθογένεια της νόσου, όπως εξηγείται στη συνέχεια. Η απόπτωση με το μηχανισμό του Fas ενδεχομένως να συμμετέχει στην εξάλειψη των Β-κυττάρων που ενεργοποιούνται από αυτοαντιγόνα. Η αυξημένη παρουσία sFas στον ορό των ασθενών με νόσο Graves είναι πιθανό να ευθύνεται για την παραγωγή των αντισωμάτων έναντι του υποδοχέα της TSH στη νόσο Graves (129).

2.4.1.3.3 Η μοριακή μίμηση ως μηχανισμός ανάπτυξης αυτοάνοσης θυρεοειδίτιδας

Η ανακάλυψη παθογονικών πεπτιδίων της Tg (§2.4.4), οδήγησε την έρευνα στην εύρεση μοριακής μίμησης (molecular mimicry) ανάμεσα στην Tg και σε μικροβιακές πρωτεΐνες, η οποία θα μπορούσε να προκαλέσει EAT σε ποντίκια. Το πεπτίδιο 368-381 της πρωτεΐνης E1B του αδενοϊού του ποντικού (MAV-1) (131) εμφανίζει 64.3% ομολογία με το πεπτίδιο 2695-2713 της Tg, το οποίο, όπως αναφέρεται στην §2.4.4, είναι παθογονικός T-επίτοπος, προκαλώντας EAT σε ποντίκια του στελέχους SJL (132). Ειδικότερα, στο τμήμα 2695-2706 της Tg, οι δύο πρωτεΐνες διαφέρουν μόνο σε τρία από τα 12 αμινοξέα. Το πεπτίδιο του αδενοϊού μετά από άμεση χορήγηση σε ποντίκια του στελέχους SJL δεν προκάλεσε EAT, ενώ έδειξε μικρή ανοσογονικότητα σε επίπεδο T και B κυττάρων. Εντούτοις, το ιικό πεπτίδιο ήταν ικανό να ενεργοποιήσει *in vitro* ένα κλώνο T-κυττάρων ειδικό για το πεπτίδιο 2695-2706 της Tg, ενώ ταυτόχρονα αντιδρούσε και με ορούς ποντικών που είχαν ανοσοποιηθεί με το πεπτίδιο της Tg (133). Το ιικό πεπτίδιο μπορούσε επίσης να επανενεργοποιήσει ισχυρά, κύτταρα λεμφαδένων από ζώα, στα οποία είχε χορηγηθεί το πεπτίδιο 2695-2706 της Tg. Η επίκτητη μεταφορά (adoptive transfer) αυτών των κυττάρων σε μη ανοσοποιημένα ποντίκια οδήγησε στην ανάπτυξη EAT (133). Συνεπώς, κάποια μη ανοσογονικά ιικά πεπτίδια μπορούν να δράσουν σαν ενισχυτές για αυτοδραστικά T-κύτταρα που έχουν ήδη διεγερθεί από κάποιο αυτοαντιγόνο, ενισχύοντας έτσι μια αυτοάνοση διεργασία.

Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι ένα τμήμα 161 ζευγών βάσεων του γονιδίου που κωδικοποιεί τον TSH-R είναι ομόλογο με το γονίδιο της ρυθμιστικής πρωτεΐνης Nef του HIV (134). Αντίσωμα κουνελιού έναντι ενός πεπτιδίου που



αντισπείρει στο τμήμα αυτό του TSH-R, παρουσίασε διασταυρούμενη αντίδραση με την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη Nef. Ασθενής αναγνώριση της Nef παρατηρήθηκε και από ορούς ασθενών με νόσο Graves. Με βάση αυτά τα ευρήματα πιθανολογείται η συμμετοχή κάποιων ρετροϊών στην παθογένεια της νόσου Graves.

2.4.2 Αυτοαντισώματα στις αυτοάνοσες ασθένειες του θυρεοειδούς

Οι αυτοάνοσες ασθένειες του θυρεοειδούς χαρακτηρίζονται από την παρουσία αυτοαντισωμάτων και αυτοδραστικών T-λεμφοκυττάρων έναντι αυτοαντιγόνων του θυρεοειδούς αδένος. Υπάρχουν τρία διαφορετικά και καλά χαρακτηρισμένα αυτοαντιγόνα του θυρεοειδούς αδένος: η θυρεοσφαιρίνη (Tg), η θυρεοειδική υπεροξειδάση (ή μικροσωμικό αντιγόνο, TPO) και ο υποδοχέας της θυρεοτροπίνης (TSH-R) (Σχήμα 1, σελ. 13). Τα θυρεοειδικά αυτοαντισώματα παρουσιάζουν ιδιαίτερο κλινικό ενδιαφέρον και ο προσδιορισμός τους αποτελεί σημαντικό διαγνωστικό εργαλείο. Τα αυτοαντισώματα έναντι Tg και TPO αποτελούν ορολογικούς δείκτες των αυτάνοσων ασθενειών του θυρεοειδούς. Έλλειψη αυτών των αυτοαντισωμάτων στον ορό μπορεί ουσιαστικά να αποκλείσει τη διάγνωση αυτοάνοσης θυρεοειδίτιδας (135). Τα αυτοαντισώματα έναντι TSH-R, όπως αναλύεται στη συνέχεια, φαίνεται ότι διαδραματίζουν σημαντικό παθογενετικό ρόλο στη νόσο Graves καθώς και σε ορισμένες περιπτώσεις υποθυρεοειδισμού. Τα τελευταία χρόνια αυξάνεται το ενδιαφέρον για τα αυτοαντισώματα έναντι ενός νέου αυτοαντιγόνου του θυρεοειδούς αδένος του συμμεταφορέα νατρίου/ιωδίου (Na^+/I^- -symporter, NIS). Εντούτοις, η παθογενετική και διαγνωστική σημασία αυτών των αυτοαντισωμάτων παραμένουν υπό διερεύνηση (136,137).

Στη συνέχεια αναπτύσσονται οι μέθοδοι προσδιορισμού των τριών κυριώτερων αυτοαντιγόνων του θυρεοειδούς (Tg, TPO και TSH-R) καθώς και η σημασία τους στις αυτοάνοσες ασθένειες του θυρεοειδούς. Επίσης εξετάζονται ειδικές κατηγορίες θυρεοειδικών αυτοαντισωμάτων που είναι σημαντικές στην παρούσα μελέτη, όπως τα αυτοαντισώματα με

διασταυρούμενη αντίδραση μεταξύ Tg και TPO, τα αντισώματα έναντι θυρεοειδικών ορμονών και τα Tg/AChE διδραστικά αυτοαντισώματα.

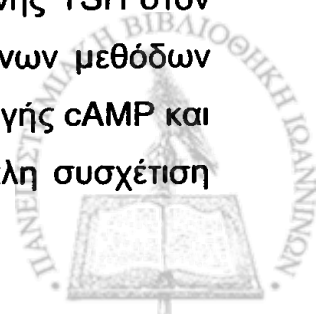
2.4.2.1 Μέθοδοι προσδιορισμού θυρεοειδικών αυτοαντισωμάτων

Η Tg αποτελεί την κύρια πρωτεΐνη του αδένος και βρίσκεται σε αφθονία, ενώ οι άλλες δύο είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες και βρίσκονται σε ελάχιστες ποσότητες. Η λεπτομερέστερη μελέτη των αυτοαντιγόνων TPO και TSH-R, αλλά και η ανάπτυξη διαγνωστικών ανοσοδοκιμασιών υψηλής ευαισθησίας και ειδικότητας για τον προσδιορισμό των αυτοαντισωμάτων, επιτεύχθηκε μετά την κλωνοποίησή τους. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται σήμερα για τον προσδιορισμό των θυρεοειδικών αυτοαντισωμάτων είναι κυρίως ραδιολογικές (RIA) και ενζυμικές (ELISA) ανοσοδοκιμασίες.

Η παθητική αιμοσυγκόλληση αποτέλεσε για πολλά χρόνια στο παρελθόν την κύρια μέθοδο προσδιορισμού αυτοαντισωμάτων έναντι Tg, ενώ τώρα πλέον χρησιμοποιούνται αποκλειστικά δοκιμασίες RIA και ELISA.

Για τον προσδιορισμό των αντι-TPO αυτοαντισωμάτων, χρησιμοποιήθηκαν αρχικά οι τεχνικές του έμμεσου ανοσοφθορισμού σε τομές θυρεοειδούς αδένος και της παθητικής αιμοσυγκόλλησης. Με τη μοριακή κλωνοποίηση της TPO το 1987 (138) και την παραγωγή ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης, έγινε δυνατή η εφαρμογή μεθόδων RIA και ELISA. Οι μέθοδοι αυτές είναι πιο ευαίσθητες από τις παλαιότερες μεθόδους ανίχνευσης του «μικροσωμιακού αντιγόνου» και είναι ικανές να ανιχνεύσουν αυτοαντισώματα χαμηλού τίτλου. Έτσι, με τις μεθόδους RIA και ELISA ανευρίσκονται υψηλότερα ποσοστά θετικών ορών από ότι με τις μεθόδους έμμεσου ανοσοφθορισμού και παθητικής αιμοσυγκόλλησης (139,140).

Για τη μέτρηση των αυτοαντισωμάτων έναντι του TSH-R, αρχικά χρησιμοποιήθηκαν βιοδοκιμασίες, οι οποίες προσδιόριζαν την απελευθέρωση ραδιενεργού ιωδίου από τον θυρεοειδή αδένος πειραματοζώων (141), ή την παραγωγή cAMP στην κυτταρική σειρά FRTL-5 αρουραίου (142). Η ιδιότητα των αντι-TSH-R να αναστέλλουν την πρόσδεση ραδιοσημασμένης TSH στον υποδοχέα, αποτέλεσε τη βάση για την ανάπτυξη των σύγχρονων μεθόδων RIA (143). Η σύγκριση της βιοδοκιμασίας μέτρησης της παραγωγής cAMP και της αναστολής πρόσδεσης ραδιοσημασμένης TSH έδειξε μεγάλη συσχέτιση



ανάμεσά στα αποτελέσματα των δύο μεθόδων (144), αν και η δεύτερη παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία. Τα αυτοαντισώματα έναντι του TSH-R, διακρίνονται στις ακόλουθες κατηγορίες, ανάλογα με τη μέθοδο ανίχνευσής τους (135):

- 1) Αντισώματα του TSH-R (TRAb - TSH Receptor Antibodies). Πρόκειται για αυτοαντισώματα που συνδέονται με τον υποδοχέα της TSH και ανιχνεύονται με RIA.
- 2)• Ανοσοσφαιρίνες που αναστέλλουν την πρόσδεση της TSH. (TBII – TSH Binding Inhibitory Immunoglobulins). Τα συγκεκριμένα αυτοαντισώματα συνδέονται με τον TSH-R και η ανίχνευσή τους γίνεται με μέτρηση της αναστολής πρόσδεσης ^{125}I -TSH στον υποδοχέα.
- 3) Θυρεοδιεγερτικά αντισώματα (TSAb – Thyroid Stimulating Antibodies). Η ανίχνευσή τους γίνεται με βιοδοκιμασία, κατά την οποία μετράται η αύξηση του cAMP ή της πρόσληψης ^{131}I από θυρεοειδικές κυτταρικές σειρές.
- 4) Θυρεοανασταλτικά αντισώματα (TBAb – Thyroid Binding Antibodies). Η ανίχνευσή τους γίνεται με βιοδοκιμασία, κατά την οποία μετράται η μείωση του cAMP ή της πρόσληψης ^{131}I από θυρεοειδικές κυτταρικές σειρές.

Σήμερα, στη διαγνωστική ρουτίνα του ενδοκρινολογικού εργαστηρίου, για τον προσδιορισμό των αυτοαντισωμάτων έναντι του TSH-R χρησιμοποιούνται μέθοδοι RIA για προσδιορισμό των TRAb και TBII.

2.4.2.2 Ιδιότητες και σημασία των αντισωμάτων έναντι των κύριων αυτοαντιγόνων του θυρεοειδούς στις αυτοάνοσες ασθένειες του θυρεοειδούς

2.4.2.2.1 Αυτοαντισώματα έναντι Tg

Οι τίτλοι των αντι-Tg αντισωμάτων είναι ιδιαίτερα υψηλοί σε ασθενείς με θυρεοειδίτιδα Hashimoto, ενώ κατά μέσο όρο είναι χαμηλότεροι σε ασθενείς με άλλα θυρεοειδικά νοσήματα. Με τη μέθοδο της παθητικής αιμόσυγκόλλησης, ανευρίσκονται κυκλοφορούντα αντι-Tg αντισώματα σε ποσοστό 76-91% των ασθενών με θυρεοειδίτιδα Hashimoto, 40-60% των

ασθενών με νόσο Graves και στο 63-82% των ασθενών με πρωτοπαθές μυξοίδημα (145). Με τη χρησιμοποίηση των μεθόδων RIA και ELISA ανιχνεύονται αντι-Tg αντισώματα σε μεγαλύτερο ποσοστό ασθενών: 86-100% των ασθενών με θυρεοειδίτιδα Hashimoto, 87-89% των ασθενών με νόσο Graves και 69-94% των ασθενών με πρωτοπαθές μυξοίδημα (146). Αντισώματα έναντι Tg εμφανίζονται και σε ένα ποσοστό περίπου 10% του υγιούς πληθυσμού. Στον υγιή πληθυσμό, η εμφάνιση αντι-Tg αντισωμάτων είναι συχνότερη στις γυναίκες από ότι στους άνδρες, ενώ η συχνότητα αυτή αυξάνεται με την αύξηση της ηλικίας. Συγκεκριμένα, σε μελέτη που έγινε στο Ηνωμένο Βασίλειο, αντι-Tg αντισώματα ανιχνεύθηκαν στο 10.6% φυσιολογικών γυναικών ηλικίας 18-24 ετών, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό για τις ηλικίες 55-64 ετών ήταν 33.3% (147). Τα αποτελέσματα αυτά προέκυψαν με τη μέθοδο της παθητικής αιμοσυγκόλλησης.

Ο σχετικός κίνδυνος να εμφανιστεί υποθυρεοειδισμός, σε διάστημα 20 ετών, σε ένα άτομο με υψηλό τίτλο αντι-Tg ή αντι-TPO αυξάνεται κατά οκτώ φορές στις γυναίκες και κατά 25 φορές στους άνδρες. Όταν μάλιστα συνυπάρχει και υποκλινικός υποθυρεοειδισμός (υψηλή τιμή TSH χωρίς παθολογικές τιμές T_3 και T_4) ο σχετικός κίνδυνος εμφάνισης υποθυρεοειδισμού αυξάνεται κατά 38 φορές στις γυναίκες και κατά 178 φορές στους άνδρες (147).

Η κλινική σημασία των αντι-Tg αυτοαντισωμάτων στις αυτοάνοσες ασθένειες του θυρεοειδούς δεν έχει ακόμα πλήρως διευκρινιστεί. Κάποια από τα δεδομένα αποκλείουν το ενδεχόμενο παθογενετικού ρόλου των αντι-Tg αυτοαντισωμάτων, ενώ άλλα το υποστηρίζουν (148,149).

Οι ενδείξεις που ενισχύουν τον μη παθογενετικό ρόλο των αντι-Tg αυτοαντισωμάτων είναι οι ακόλουθες:

- 1) Τα αντισώματα αυτά ανιχνεύονται και σε φυσιολογικά άτομα
- 2) Σε ασθενείς με μονοκλωνικές γαμμασφαιρινοπάθειες ανευρίσκονται μονοκλωνικά αντι-Tg αυτοαντισώματα, χωρίς όμως ένδειξη θυρεοειδικής νόσου.
- 3) Οι τίτλοι των αντι-Tg δεν συνδέονται με τη σοβαρότητα της αυτοάνοσης ασθένειας του θυρεοειδούς ή της πειραματικής αυτοάνοσης θυρεοειδίτιδας (§ 2.4.1.3.1).



- 4) Οί τίτλοι των αντι-Tg δεν μεταβάλλονται σημαντικά με την εφαρμογή θεραπείας και δεν σχετίζονται με την εξέλιξη της νόσου.
- 5) Σε μερικές περιπτώσεις τα αντι-Tg δεν επάγουν πειραματική αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα.
- 6) Τα αντισώματα υπόταξης IgG₃, τα οποία συνδέουν το συμπλήρωμα και συνεπώς θα μπορούσαν να είναι παθογονικά, αποτελούν πολύ μικρό ποσοστό του συνόλου των αντι-Tg αντισωμάτων.

Αντίθετα, υπάρχουν ενδείξεις που υποδηλώνουν παθογενετικό ρόλο των αντι-Tg αυτοαντισωμάτων:

- 1) Τα φυσικά αντι-Tg αυτοαντισώματα, τα οποία ανευρίσκονται σε φυσιολογικά άτομα είναι πολυκλωνικά, σε αντίθεση με τα αντι-Tg που ανιχνεύονται σε ασθενείς με αυτοάνοσες ασθένειες του θυρεοειδούς.
- 2) Η παρουσία των αντι-Tg κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης θυρεοειδίτιδας μετά από τοκετό και αποβολής.
- 3) Στις περισσότερες περιπτώσεις τα αντι-Tg επάγουν πειραματική αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα σε ζωικά πρότυπα.
- 4) Η επαγωγή αντι-Tg μέσω ιδιοτυπικών – αντι-ιδιοτυπικών αντιδράσεων, σχετίζεται με χαμηλά επίπεδα ορμονών του θυρεοειδούς.

Χαρακτηριστικό των αυτοαντισωμάτων έναντι της Tg είναι ότι δεν δεσμεύουν το συμπλήρωμα. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται σε στερεοχημική παρεμπόδιση που σχετίζεται με την κατανομή των επιτόπων πάνω στο μεγάλο μόριο της Tg (150). Εντούτοις, έχει διατυπωθεί η άποψη ότι η παθογένεια της θυρεοειδίτιδας Hashimoto ίσως οφείλεται σε εξαρτώμενη από αντισώματα κυτταροτοξικότητα, με μεσολάβηση κυττάρων (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) μέσω των αντι-Tg αυτοαντισωμάτων (151,152). Τα αντισώματα έναντι της Tg ενδέχεται να συμμετέχουν σε ένα μηχανισμό απομάκρυνσης της μεγάλης ποσότητας Tg που υπάρχει στην κυκλοφορία μετά από καταστροφή του ιστού του θυρεοειδούς αδένος (153). Τα αντισώματα αυτά μπορούν να ασκούν ουδέτερη, ανασταλτική ή ενισχυτική δράση στη δημιουργία παθογονικών καθοριστών T-κυττάρων, ανάλογα με τους επίτοπους που αναγνωρίζουν και το γενετικό υπόβαθρο (154). Τα αντι-Tg πιθανόν να επιδρούν στην επεξεργασία (processing) της Tg, κυρίως

εμποδίζοντας τους Τ-επίτοπους να προσδεθούν στα μόρια MHC τάξης II, ώστε να αναγνωριστούν από τα Τ-κύτταρα ή παρεμβαίνοντας στην ενζυμική πέψη της Tg. Οι διαφορετικές αυτές δράσεις των αντι-Tg αντισωμάτων μπορούν να ασκούνται συνεργιστικά, αναστέλλοντας τη δημιουργία κυρίαρχων καθοριστών, ενώ ταυτόχρονα ενισχύουν την παρουσίαση νέων κρυπτικών (cryptic) πεπτιδίων, προκαλώντας επέκταση της ανοσολογικής απόκρισης σε επίτοπους διαφορετικούς από αυτούς που προκάλεσαν την ανοσολογική απόκριση (155). Περισσότερα στοιχεία για τους παθογονικούς καθοριστές (επίτοπους) της Tg δίνονται στην παράγραφο 2.4.4.

Κατά τη χορήγηση Tg σε πειραματόζωα, παράγονται αντισώματα έναντι Tg καθώς και έναντι ορμονών του θυρεοειδούς (T_3 και T_4) (156). Η παραγωγή αντισωμάτων έναντι της Tg φαίνεται ότι καθορίζεται γενετικά. Στα ποντίκια, τα ζώα με απλότυπους $H-2^a$, $H-2^d$, $H-2^g$, $H-2^k$ και $H-2^l$ παρουσιάζουν υψηλή απόκριση για την παραγωγή αντισωμάτων έναντι της ανθρώπινης Tg. Αντίθετα, τα ποντίκια με απλότυπους $H-2^b$ και $H-2^s$ έχουν χαμηλή απόκριση (157).

2.4.2.2.1.1 Τάξεις και υποτάξεις των αυτοαντισωμάτων έναντι θυρεοσφαιρίνης

Τα αντισώματα που κατευθύνονται έναντι της Tg είναι κυρίως τάξης IgG (158). Τα IgA υπάρχουν σε ποσοστό μέχρι 20% και τα IgM λιγότερο από 1% (159). Η κατανομή των αντι-Tg αντισωμάτων στις υποτάξεις των IgG έχει μελετηθεί, όμως τα αποτελέσματα είναι αντιφατικά. Οι Hay και Torrigiani (160) και Spiegelberg (161), χρησιμοποιώντας μια μέθοδο συν-κατακρήμνισης (co-precipitation) με ραδιοσημασμένη Tg και πολυκλωνικό ορό κουνελιού έναντι των διαφόρων IgG υποτάξεων, έδειξαν ότι, σε ασθενείς με θυρεοειδίτιδα Hashimoto, τα αντι-Tg αντισώματα δεν περιορίζονται σε ορισμένη υπόταξη, αλλά ακολουθούν την αναλογία των υποτάξεων στον ορό των υγιών ατόμων. Άλλοι ερευνητές (162,163), χρησιμοποιώντας ELISA με μια σειρά μονοκλωνικών αντισωμάτων ποντικού έναντι των τεσσάρων υποτάξεων των IgG, βρήκαν ότι τα αντι-Tg αντισώματα σε ασθενείς με θυρεοειδίτιδα Hashimoto και νόσο Graves περιορίζονται στις υποτάξεις IgG₁ και IgG₄. Μια τρίτη ομάδα ερευνητών (150) ανέφερε ότι δεν υπάρχει περιορισμός στην

υπόταξη των αντι-Tg αντισωμάτων και οι ποσότητες των IgG₁, IgG₂ και IgG₄ ισοδυναμούν περίπου με αυτές που αντιστοιχούν στον ολικό ορό. Το προηγούμενο αποτέλεσμα επιβεβαιώθηκε με IgG και των τεσσάρων υποτάξεων που απομονώθηκαν με χρωματογραφία συγγένειας (151). Οι Caturegli και συν. (159), χρησιμοποιούν μια μέθοδο με την οποία εκφράζουν τις ποσότητες των υποτάξεων των IgG σε απόλυτες μονάδες. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά τους, τα αντι-Tg αντισώματα ασθενών με νόσο Graves και θυρεοειδίτιδα Hashimoto προέρχονταν από όλες τις υποτάξεις των IgG. Τα IgG₁ αντι-Tg αντισώματα αντιπροσωπεύονταν εξίσου στις δύο ομάδες ασθενών (Graves και Hashimoto), όπως και τα IgG₃, αν και η τελευταία υπόταξη αποτελούσε μόνο ένα πολύ μικρό ποσοστό των ολικών αντι-Tg αντισωμάτων. Η υπόταξη IgG₄ ήταν κυρίαρχη στα αντι-Tg αντισώματα ασθενών με νόσο Graves, ενώ στα αντι-Tg αντισώματα των ασθενών με θυρεοειδίτιδα Hashimoto κυριαρχούσε η υπόταξη IgG₂ (159).

2.4.2.2.1.2 Διασταυρούμενη αντίδραση αντισωμάτων έναντι θυρεοσφαιρίνης και θυρεοειδικής υπεροξειδάσης

Η σημασία και οι ιδιότητες των αυτοαντισωμάτων έναντι TPO, στις αυτοάνοσες ασθένειες του θυρεοειδούς, αναλύεται στην §2.4.2.2.2. Στο σημείο αυτό, περιγράφεται μια ιδιαίτερη ομάδα αντισωμάτων με διασταυρούμενη αντίδραση μεταξύ της Tg και της TPO.

Σε άτομα με αυτοάνοσες ασθένειες του θυρεοειδούς έχει διαπιστωθεί η ύπαρξη αντισωμάτων που είναι ταυτόχρονα δραστικά έναντι της Tg και της TPO (TGPO-αντισώματα) (164). Τέτοια αντισώματα εμφανίζονται στους περισσότερους ορούς με υψηλούς τίτλους έναντι Tg και TPO, όχι όμως και σε ορούς χωρίς δράση αντι-Tg, ανεξάρτητα από τον τίτλο των αντι-TPO αυτοαντισωμάτων (165). Ο τίτλος των TGPO-αυτοαντισωμάτων δε συσχετίζεται με τους τίτλους των αντι-Tg ή αντι-TPO αντισωμάτων (165). Τα TGPO-αντισώματα εμφανίζονται στο 1.4% του υγιούς πληθυσμού, σε ποσοστό 40.5% των ασθενών με θυρεοειδίτιδα Hashimoto και στο 34.6% των ασθενών με νόσο Graves (166). Τα TGPO-αντισώματα αντιπροσωπεύουν περίπου το 20% των αυτοαντισωμάτων που αντιδρούν με Tg και το 0.23% του ολικού κλάσματος των ανοσοσφαιρινών τάξης IgG, όπως βρέθηκε σε

μίγμα ορών με υψηλό τίτλο έναντι Tg και TPO από 25 ασθενείς με αυτοάνοσες ασθένειες του θυρεοειδούς (167).

Ανοσοποίηση CBA/J ποντικών με ανθρώπινη Tg οδήγησε στην παραγωγή όχι μόνο αντι-Tg αλλά και TGPO-αντισωμάτων, τα οποία επέδειξαν ισχυρή δραστικότητα έναντι TPO και των οποίων η πρόσδεση στην Tg και στην TPO αναστέλλεται πλήρως από διαλυτή Tg (165). Αντίθετα, η ανοσοποίηση με ανθρώπινη TPO οδήγησε στην παραγωγή ειδικών αντι-TPO συνοδευόμενη από χαμηλά επίπεδα ειδικών αντι-Tg αντισωμάτων. Στην περίπτωση αυτή δεν ανιχνεύθηκαν TGPO-αντισώματα. Συμπεραίνεται λοιπόν ότι τα TGPO-αντισώματα πιθανόν να προέρχονται από ένα πληθυσμό φυσικών B λεμφοκυττάρων, μέσω κάποιας αυτοάνοσης διεργασίας στην οποία συμμετέχει η Tg και όχι η TPO (165). Αξιοσημείωτο είναι ότι τα ανοσοποιημένα ποντίκια, είτε με Tg είτε με TPO, παρουσίασαν ανοσολογική απόκριση έναντι της δικής τους Tg, αλλά όχι και ιστολογική εικόνα θυρεοειδίτιδας. Αντίθετα, άλλοι ερευνητές βρήκαν ότι μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού, τα οποία παρασκεύασαν οι ίδιοι και ήταν ειδικά για την ανθρώπινη TPO, έδειξαν διασταυρούμενη αντίδραση με την ανθρώπινη Tg (168). Η ιδιότητα αυτή παρατηρήθηκε στα τέσσερα από τα έξι μονοκλωνικά αντισώματα που μελετήθηκαν. Αντίστροφα, μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού έναντι Tg παρουσίασαν διασταυρούμενη αντίδραση με την TPO, αλλά σε μικρότερο βαθμό. Επίσης, σε πολυκλωνικά αντι-Tg αντισώματα με TGPO-δραστικότητα, που απομονώθηκαν από ορούς ασθενών με χρόνια αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα,δείχθηκε ότι η πρόσδεσή τους στην TPO αναστέλλεται πλήρως από διαλυτή Tg (168). Τα αποτελέσματα αυτά οδήγησαν τους ερευνητές στο συμπέρασμα ότι η Tg και η TPO μοιράζονται κάποιους κοινούς αντιγονικούς καθοριστές, οι οποίοι αναγνωρίζονται από αυτοαντισώματα στον ορό ασθενών με χρόνια αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα. Τα TGPO-αντισώματα αν συγκριθούν με τα αντι-Tg αυτοαντισώματα, εμφανίζουν παρόμοια δραστικότητα έναντι της φυσικής Tg και μεγαλύτερη έναντι της αποδιαταγμένης Tg. Σε σύγκριση με τα αντι-TPO αυτοαντισώματα, τα TGPO-αντισώματα έχουν χαμηλότερη συγγένεια, τόσο για τη φυσική όσο και για την αποδιαταγμένη TPO (167).



Εντούτοις, οι προσπάθειες για εντοπισμό ενός κοινού επιτόπου, με τη μέθοδο των ανασυνδυασμένων πεπτιδίων δεν απέδωσαν (169). Ούτε και κάποια ομοιότητα διαμορφωτικών επιτόπων φαίνεται να ευθύνεται για την ύπαρξη των TGPO-αυτοαντισωμάτων, αφού μόνο η Tg και όχι η TPO, επάγει την παραγωγή τέτοιων αντισωμάτων σε πειραματικό πρότυπο ποντικού (165). Τα TGPO-αντισώματα πιθανότατα δεν κατευθύνονται έναντι της ανοσοκυρίαρχης περιοχής της TPO αφού, τέσσερα ανθρώπινα μονοκλωνικά αντι-TPO αντισώματα έναντι της περιοχής αυτής δεν έχουν διασταυρούμενη αντίδραση με την Tg (170). Τα αντι-TPO αντισώματα έναντι της ανοσοκυρίαρχης περιοχής στον ορό ενός ασθενούς αντιπροσωπεύουν περίπου το 85% των αυτοαντισωμάτων έναντι TPO (170).

Οι Ruf και συν. (171) εξάγουν το συμπέρασμα ότι τα TGPO-αυτοαντισώματα αντιδρούν με τα δύο αντιγόνα μέσω διαφορετικών θέσεων της μεταβλητής περιοχής των αντισωμάτων. Η πρόσδεση στην Tg γίνεται μέσω του παράτοπου (θέση πρόσδεσης του αντιγόνου). Αντίθετα, η TPO προσδένεται μέσω μιας ιδιότυπικής δομής, μακριά από τον παράτοπο, η οποία υπάρχει σε κάποια από τα ανθρώπινα αυτοαντισώματα έναντι Tg, καθώς και σε μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού με παρόμοια ειδικότητα ως προς τον επίτοπο. Αυτός ο ιδιότυπος, που είναι κοινός ανάμεσα στον άνθρωπο και τον ποντικό, αναγνωρίζεται από αντι-ιδιοτυπικά αντισώματα τα οποία υπάρχουν μεταξύ των φυσιολογικών ανθρώπινων ανοσοσφαιρινών τάξης IgG (171). Τα αποτελέσματα αυτά οδήγησαν τους ερευνητές στο συμπέρασμα ότι η αυτοανοσία του θυρεοειδούς μπορεί να θεωρηθεί, τουλάχιστον εν μέρει, σαν μια διαταραχή του ιδιοτυπικού δικτύου. Στην περίπτωση ενός μονοκλωνικού TGPO-αντισώματος ποντικού, ο ιδιότυπος με τον οποίο αλληλεπιδρά η TPO φαίνεται ότι φέρει μια εσωτερική εικόνα της Tg, ικανή να επάγει ορολογική ανοσολογική απόκριση έναντι της Tg, ακολουθούμενη από ανοσολογική απόκριση έναντι της TPO, χωρίς τη χορήγηση κανενός από τα αντιγόνα (172). Όταν αυτό το μονοκλωνικό αντίσωμα (mAb1) χορηγήθηκε σε ποντικό, απομονώθηκε ένα δεύτερο μονοκλωνικό αντίσωμα (mAb2) το οποίο αναγνωρίζει την Tg και την TPO, αλλά επίσης αναγνωρίζει το ανοσογόνο αντίσωμα mAb1, καθώς και τον εαυτό του (αυτοδραστικό αντίσωμα) (173). Προτείνεται ότι ένας ιδιότυπος των



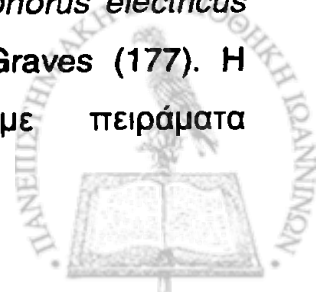
TGPO-αντισωμάτων μοιάζει με κυρίαρχους επίτοπους της Tg καθώς και με παράτοπους αντισωμάτων που κατευθύνονται έναντι κυρίαρχων επιτόπων της TPO (173). Αυτή η κατηγορία ιδιότυπων, τους οποίους ονομάζουν διάτοπους (intertopes) ίσως επάγει την παραγωγή μονοειδικών αντι-TPO αντισωμάτων από τα TGPO-αντισώματα, μέσω ιδιοτυπικά κατευθυνόμενων σωματικών μεταλλαγών.

Δεδομένου ότι σε πολλές περιπτώσεις ασθενών με αυτοάνοσες ασθένειες του θυρεοειδούς τα αντισώματα έναντι Tg και TPO εμφανίζονται ταυτόχρονα, οι McLachlan και Rapoport (174) θέλησαν να ελέγξουν κατά πόσο μπορεί να υπάρχει κοινός T-επίτοπος μεταξύ των δύο πρωτεϊνών, με πιθανό ρόλο στην παθογένεια των αυτοάνοσων ασθενειών του θυρεοειδούς. Συγκριτική ανάλυση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του cDNA έδειξε ότι υπάρχει μια αλληλουχία οκτώ αμινοξέων (Leu-Ser-Glu-Asp-Leu-Leu-Ser-Ile στην ανθρώπινη TPO) όπου τα έξι είναι πανομοιότυπα και τα δύο αποτελούν συντηρητικές αμινοξικές υποκαταστάσεις στην αντίστοιχη αλληλουχία της ανθρώπινης Tg. Η περιοχή αυτή βρίσκεται κοντά στο αμινο-τελικό άκρο της ανθρώπινης TPO (αμινοξέα 119-126) και στο καρβοξυ-τελικό άκρο της ανθρώπινης Tg (αμινοξέα 2763-2770). Επιπλέον, η περιοχή αυτή των οκτώ αμινοξέων πληρεί τα κριτήρια του αλγόριθμου του Rothbard (175) για ύπαρξη T-επίτοπου.

2.4.2.2.1.3 Διδραστικά αντισώματα έναντι θυρεοσφαιρίνης και ακετυλοχολινεστεράσης - Συσχέτιση με κλινική εικόνα

Οι Ludgate και συν. (176), με βάση την ομολογία δομής μεταξύ των πρωτεϊνών Tg και AChE (§2.3), πρότειναν ότι η παρουσία αυτοαντισωμάτων με διασταυρούμενη αντίδραση μεταξύ της Tg και της AChE των οφθαλμικών μυών, πιθανόν να παίζει ρόλο στην παθογένεια της οφθαλμοπάθειας σε ασθενείς με νόσο Graves (θυρεοειδική οφθαλμοπάθεια).

Η ύπαρξη αντισωμάτων τάξης IgG που αντιδρούν ταυτόχρονα με ανθρώπινη Tg και AChE από το ηλεκτροφόρο χέλι *Electrophorus electricus* διαπιστώθηκε σε ποσοστό 15% των ασθενών με νόσο Graves (177). Η διδραστικότητα των αντισωμάτων διαπιστώθηκε, με πειράματα



ανταγωνιστικής ELISA, με αναστολή της πρόσδεσης σε ακινητοποιημένη AChE από διαλυτή Tg. Επίσης αντι-Tg αυτοαντισώματα, απομονωμένα με χρωματογραφία συγγένειας, ήταν ικανά να προσδένονται σε ακινητοποιημένη AChE. Η αυξημένη αντι-Tg/AChE δραστηριότητα συσχετίστηκε με την παρουσία οφθαλμοπάθειας σε ασθενείς με νόσο Graves. Ένας Tg/AChE κοινός επίτοπος εντοπίστηκε από τους Ludgate και συν. (178), περισσότερο όμως για το θέμα αυτό αναφέρονται στην §2.4.3.

* Σύμφωνα με κάποια άλλη άποψη, για την οφθαλμοπάθεια στους ασθενείς με νόσο Graves ευθύνονται αυτοαντισώματα που κατευθύνονται έναντι ενός μεμβρανικού αντιγόνου του οφθαλμικού μυός, μεγέθους 64kDa, το οποίο εκφράζεται και στο θυρεοειδή αδένα (179). Το αντιγόνο 64kDa, σε μη αποδιαταγμένη μορφή, αναγνωρίζεται από το 67% των ασθενών με θυρεοειδική οφθαλμοπάθεια, 37.5% των ασθενών με νόσο Graves χωρίς οφθαλμοπάθεια, 11% των ασθενών με θυρεοειδίτιδα Hashimoto, ενώ αναγνωρίζεται επίσης από το 9% των ορών από υγιή άτομα (180). Το αντιγόνο αυτό ταυτοποιήθηκε πρόσφατα ως η φλαβοπρωτεϊνική υπομονάδα της μιτοχονδριακής αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος (181). Τέλος, διατυπώθηκε η άποψη ότι αντισώματα έναντι του υποδοχέα της θυρεοτροπίνης (TSH-R) αντιδρούν με τον οφθαλμικό λιπώδη ιστό, όπου επίσης εκφράζεται ο TSH-R (182).

2.4.2.2 Αυτοαντισώματα έναντι TPO

Αντι-TPO αυτοαντισώματα ανιχνεύονται με τη μέθοδο της παθητικής αιμοσυγκόλλησης σε ποσοστό 85-95% των ασθενών με θυρεοειδίτιδα Hashimoto και 66-86% των ασθενών με νόσο Graves ή πρωτοπαθές μυξοίδημα (145). Οι μέθοδοι RIA και ELISA δίνουν υψηλότερα ποσοστά θετικών ορών (139,140). Η διακύμανση στα ποσοστά θετικών ορών οφείλεται στην ευαισθησία της δοκιμασίας που χρησιμοποιείται, αλλά και στην επιλογή των ασθενών (στάδιο νόσου, εφαρμοζόμενη θεραπεία, κλπ.). Αυτοαντισώματα έναντι TPO ανιχνεύονται και σε υγιή άτομα. Τέτοια αυτοαντισώματα ανιχνεύθηκαν στο 15% των γυναικών ηλικίας 18-24 ετών και στο 24% των γυναικών ηλικίας 55-64 ετών (147). Οι υψηλότεροι τίτλοι αντι-

TPO αυτοαντισωμάτων ανιχνεύονται σε ασθενείς με θυρεοειδίτιδα Hashimoto, στους οποίους δεν έχει εφαρμοστεί θεραπεία. Με την εφαρμογή της κατάλληλης θεραπείας, οι τίτλοι των αντι-TPO εμφανίζουν μείωση στο 20% των ασθενών με αυτοάνοσες ασθένειες του θυρεοειδούς (149). Επιπλέον, η παρουσία αντι-TPO σε εγκυμονούσες γυναίκες αποτελεί τον ισχυρότερο παράγοντα κινδύνου για την εκδήλωση θυρεοειδίτιδας μετά τον τοκετό (183).

Τα αντι-TPO αυτοαντισώματα ενδέχεται να συμμετέχουν παθογενετικά στην αυτοάνοση διεργασία αφού:

- 1) Ενεργοποιούν *in vitro* την πρόσδεση του συμπληρώματος (184).
- 2) Τα επίπεδά τους σχετίζονται με την ενεργή φάση της νόσου (185).
- 3) Προκαλούν λύση σε θυρεοειδικά κύτταρα *in vitro*, μέσω ενός κυτταροτοξικού μηχανισμού (186).
- 4) Αναστέλλουν την ενζυμική ενεργότητα της TPO (187). Αντίθετα, τα αντι-TPO που προέρχονται από φυσιολογικούς δότες δεν έχουν αυτή την ικανότητα.

Ωστόσο, έχει διατυπωθεί και η άποψη ότι τα αυτοαντισώματα έναντι της TPO είναι απίθανο να έχουν παθογενετική σημασία, αφού η προσπέλαση της TPO από τα αντισώματα αυτά *in vivo* είναι περιορισμένη, λόγω της θέσης του αντιγόνου στην κυτταρική μεμβράνη, προς το εσωτερικό των θυλακίων του θυρεοειδούς. Η άποψη αυτή στηρίχθηκε στο γεγονός ότι δεν διαπιστώθηκε αναστολή της ενζυμικής ενεργότητας της TPO από αντι-TPO αυτοαντισώματα (188).

2.4.2.2.3 Αυτοαντισώματα έναντι TSH-R

Τα αυτοαντισώματα που προσδένονται στον TSH-R και ανιχνεύονται με ραδιοανοσολογικές μεθόδους (TRAb και TBII), ανιχνεύονται σε ποσοστό 70-90% των ασθενών με νόσο Graves (189,190). Τα θυρεοδιεγερτικά αυτοαντισώματα (TSAb), τα οποία ανιχνεύονται με βιοδοκιμασία, είναι χαρακτηριστικά της νόσου Graves και εμφανίζονται σε ποσοστό 90-100% των ασθενών με τη νόσο (135). Προκαλούν αύξηση της έκκρισης cAMP και της πρόσληψης ιωδίου από τα κύτταρα του θυρεοειδούς. Τα αντισώματα αυτά μιμούνται τη διεγερτική δράση της TSH, ενώ ταυτόχρονα η δέσμευσή τους



είναι πιο παρατεταμένη από τη δέσμευση της TSH. Έτσι, επάγεται χρόνια υπερπαραγωγή ορμονών του θυρεοειδούς (191). Η δράση αυτών των αντισωμάτων έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή υπερθυρεοειδισμού. Τα θυρεοανασταλτικά αυτοαντισώματα (TBAb) έχουν ανασταλτική δράση, παρεμποδίζοντας τη δέσμευση της TSH. Προκαλούν μείωση της έκκρισης cAMP και της πρόσληψης ιωδίου από τα κύτταρα του θυρεοειδούς. Η παρουσία τέτοιων αντισωμάτων μπορεί να οδηγήσει σε ατροφική θυρέοειδίτιδα, που συχνά συνοδεύεται από υποθυρεοειδισμό (192). Τα TBAb είναι υπεύθυνα για την πρόκληση υποθυρεοειδισμού σε αρκετούς ασθενείς, κυρίως με πρωτοπαθές μυξοίδημα (135). Πάντως, ο ρόλος των διεγερτικών αυτοαντισωμάτων έναντι του TSH-R στην παθογένεια της νόσου Graves έχει αμφισβητηθεί, εξαιτίας της μικρής συσχέτισης που υπάρχει ανάμεσα στα επίπεδα των αντισωμάτων αυτών και στην πορεία της νόσου. Η ασυμφωνία αυτή μπορεί να ερμηνευθεί από την παρουσία τόσο διεγερτικών όσο και ανασταλτικών αντισωμάτων ταυτόχρονα στο ίδιο άτομο. Η παροδική μετάβαση από αυτοαντισώματα που κυρίως αναστέλλουν, σε αυτοαντισώματα που κυρίως διεγείρουν τον TSH-R, μπορεί να ερμηνεύσει την παρουσία υπερθυρεοειδισμού σε κάποιον ασθενή, ο οποίος στη συνέχεια εμφανίζει υποθυρεοειδισμό (193).

2.4.2.2.4 Αυτοαντισώματα έναντι ορμονών του θυρεοειδούς

Η παρουσία αυτοαντισωμάτων έναντι ορμονών του θυρεοειδούς είναι συνήθης και συναντάται όχι μόνο σε θυρεοειδικές, αλλά και σε μη θυρεοειδικές ανωμαλίες (194). Η συχνότητα εμφάνισης αυτοαντισωμάτων έναντι ορμονών του θυρεοειδούς έχει βρεθεί ότι είναι 1.8% μεταξύ υγιών ατόμων, ενώ συνήθως δεν συνυπάρχουν αντι-T₃ και αντι-T₄ αντισώματα (195). Οι συγκεντρώσεις των ελεύθερων ορμονών του θυρεοειδούς και της TSH στον ορό υγιών ατόμων που είναι θετικοί για αυτοαντισώματα έναντι ορμονών του θυρεοειδούς, βρίσκονται σε φυσιολογικά επίπεδα (195). Σε άτομα με ασθένειες του θυρεοειδούς, το ποσοστό εμφάνισης αυτοαντισωμάτων έναντι ορμονών του θυρεοειδούς φθάνει το 5% (196), ενώ συχνά υπάρχει συσχέτιση με τα αντισώματα έναντι Tg. Σύμφωνα με άλλους



ερευνητές, αντισώματα έναντι ορμονών του θυρεοειδούς εμφανίζονται στο 17.5% των ασθενών με νόσο Graves που δεν έχουν λάβει θεραπευτική αγωγή (197). Η θυροξίνη και η τριιωδοθυρονίνη (776 και 650 Da, αντίστοιχα) είναι απτένια (haptens) τα οποία, όταν βρεθούν στην κυκλοφορία, δεν έχουν την ικανότητα από μόνα τους να επάγουν ανοσοαπόκριση. Κατά την ωρίμανσή τους, οι ορμόνες αυτές, είναι ομοιοπολικά προσδεδεμένες στη μεγάλου μεγέθους Tg (660 kDa το διμερές). Κάποιο ελάττωμα στη διαδικασία της παραγωγής των ορμονών ή κάποια κάκωση των κυττάρων του θυρεοειδούς αδένα, κάτω από παθολογικές συνθήκες, μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα υψηλή συγκέντρωση φυσικής Tg στην κυκλοφορία ή πεπτιδίων της Tg που φέρουν ορμόνες, ικανών να προκαλέσουν ανοσοαπόκριση (198). Οι Erregragui και συν. (199) υπέθεσαν ότι αν η Tg ή θραύσματα της Tg που φέρουν ορμόνες, είναι υπεύθυνα για την παραγωγή αντισωμάτων έναντι των ορμονών του θυρεοειδούς, τότε η παρουσία τέτοιων αντισωμάτων θα συνοδεύεται από την ύπαρξη αντισωμάτων έναντι της πεπτιδικής αλυσίδας που γειτνιάζει με τις ορμονογόνες θέσεις. Οι ερευνητές συμπεραίνουν ότι οι ορμονογόνες θέσεις της Tg δεν αποτελούν κύριες ανοσογόνες περιοχές, όμως τα αυτοαντισώματα έναντι των ορμονών του θυρεοειδούς είναι πιθανό να παράγονται, όσο οι ορμόνες είναι ομοιοπολικά προσδεδεμένες με την Tg ή με θραύσματά της. Στο συμπέρασμα ότι οι αντιγονικές θέσεις της Tg που περιέχουν θυρεοειδικές ορμόνες δεν είναι ανοσογόνες, καταλήγουν επίσης οι Sakata και συν. (198) μετά από μελέτη της σταθεράς σύνδεσης αντισωμάτων που επάγονται σε πειραματόζωα.

Στην περίπτωση ύπαρξης κυκλοφορούντων αυτοαντισωμάτων έναντι ορμονών του θυρεοειδούς, τα μετρούμενα επίπεδα ελεύθερων ορμονών του θυρεοειδούς συχνά δεν συμβαδίζουν με την κλινική εικόνα των ασθενών. Αυτό συμβαίνει γιατί τα αυτοαντισώματα επηρεάζουν τις ανοσοδοκιμασίες μέτρησης των ορμονών, δείχνοντας ασυνήθιστα υψηλές ή χαμηλές τιμές ορμονών, ανάλογα με τον τρόπο διαχωρισμού δεσμευμένων και ελεύθερων ορμονών στον οποίο βασίζεται η μέθοδος προσδιορισμού (200,194). Πάντως, οι Sakata και συν. (201) καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι η παρουσία αυτοαντισωμάτων έναντι ορμονών του θυρεοειδούς από μόνη της δεν



επηρεάζει το μηχανισμό ελέγχου του άξονα υποθαλάμου – υπόφυσης – θυρεοειδούς αδένα.

Η χορήγηση Tg σε ζώα (κουνέλια και ποντίκια) προκαλεί την παραγωγή αντισωμάτων έναντι ορμονών του θυρεοειδούς (202,198). Η μελέτη ζωικών μοντέλων έδειξε ότι η παραγωγή αντισωμάτων έναντι θυροξίνης βρίσκεται κάτω από γενετικό έλεγχο (203). Αντισώματα έναντι θυροξίνης είναι δυνατό να παραχθούν και μετά από χορήγηση Tg χαμηλής περιεκτικότητας σε ιώδιο, δηλαδή φτωχής σε ορμόνες. Στην περίπτωση αυτή όμως, ακόμη και όταν παράγονται τέτοια αντισώματα, η συγκέντρωσή τους είναι μικρή, ενώ δεν παράγονται αντισώματα έναντι T₃ (204).

2.4.3 Β-επίτοποι της θυρεοσφαιρίνης

Λόγω του μεγάλου μεγέθους του μορίου της Tg, ο αριθμός των επιτόπων που μπορούν να αναγνωριστούν από αντισώματα που επάγονται σε πειραματόζωα με υπερανοσοποίηση (ετεροαντισώματα) είναι πολύ μεγάλος (205). Εντούτοις, διατυπώθηκε η άποψη ότι ο αριθμός των επιτόπων που αναγνωρίζονται από αυτοαντισώματα σε ορούς ασθενών με θυρεοειδίτιδα Hashimoto είναι μικρός και βρίσκεται μεταξύ τέσσερα και έξι ανά διμερές μόριο (206). Οι Bouanani και συν. (207) έδειξαν, με τη βοήθεια μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι ανθρώπινης Tg σε πειράματα ανταγωνιστικής ELISA, ότι οι επίτοποι των αντι-Tg αυτοαντισωμάτων από υγιή άτομα διαφέρουν από τους αντίστοιχους αυτοεπίτοπους σε άτομα με θυρεοειδικές δυσλειτουργίες (208). Με παρόμοιο τρόπο, άλλοι ερευνητές (209,210) διαπίστωσαν ότι τα αυτοαντισώματα από ασθενείς με αυτοάνοσες ασθένειες του θυρεοειδούς αλλά και από υγιή άτομα προσδένονται σε συντηρητικές περιοχές της θυρεοσφαιρίνης, δηλαδή σε περιοχές με υψηλή ομολογία ανάμεσα σε διαφορετικά είδη. Πρόκειται κυρίως για περιοχές του μορίου που περιέχουν θυροξίνη. Οι ασθενείς όμως, αναπτύσσουν επιπλέον και αντισώματα που είναι ειδικά μόνο για την ανθρώπινη Tg, δηλαδή αναγνωρίζουν μη συντηρητικές περιοχές της ανθρώπινης Tg. Στο συμπέρασμα αυτό κατέληξαν όταν διαπιστώθηκε ότι τα μονοκλωνικά αντισώματα που προσδένονταν στις περιοχές αυτές δεν αντιδρούσαν με Tg από άλλα είδη. Οι επίτοποι που αναγνωρίζονται από αυτοαντισώματα



ασθενών με νόσο Graves διαφοροποιούνται από τους επίτοπους που αναγνωρίζονται από αντισώματα ασθενών με θυρεοειδίτιδα Hashimoto (210). Ποντίκια που ανοσοποιούνται με Tg αναπτύσσουν αντισώματα έναντι των συντηρητικών περιοχών της Tg (211). Όμως, τα στελέχη ποντικών που είναι ευαίσθητα στην ανάπτυξη θυρεοειδίτιδας (§2.4.4) παράγουν επίσης αντισώματα που προσδένονται σε επίτοπους ειδικούς για την Tg του ποντικού.

Οι αντιγονικές ιδιότητες πεπτιδίων που απομονώθηκαν μετά από πέψη της ανθρώπινης Tg με V8 πρωτεάση, μελετήθηκαν με χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων ποντικού έναντι της ανθρώπινης Tg με μέθοδο RIA (212). Διαπιστώθηκε ότι οι επίτοποι που αναγνωρίζονται από αυτοαντισώματα ασθενών με θυρεοειδίτιδα Hashimoto, διαφοροποιούνται από τους επίτοπους της Tg, οι οποίοι διεγείρουν Tg-ειδικές σειρές T-λεμφοκυττάρων (επίτοποι B και T κυττάρων αντίστοιχα).

Οι Dong και συν. (213), χρησιμοποιώντας λ-gt11 βιβλιοθήκη cDNA, αναγνώρισαν στο μόριο της ανθρώπινης Tg δέκα μη επικαλυπτόμενα τμήματα που φέρουν ετεροεπιτόπους (Σχήμα 10). Οι επίτοποι αυτοί δεν αναγνωρίζονται από ορούς ασθενών με αυτοάνοσες ασθένειες του θυρεοειδούς. Με τη χρήση της ίδιας βιβλιοθήκης και με βάση την ομολογία μεταξύ Tg και AChE, οι Ludgate και συν. (178) εντόπισαν δύο σχεδόν ταυτόσημους κλώνους, οι οποίοι αντιδρούσαν με αντισώματα κουνελιού έναντι *Torpedo* AChE. Αυτός ο Tg/AChE κοινός επίτοποςδείχθηκε ότι είναι αυτοεπίτοπος. Ανασυνδυασμένα πεπτίδια, τα οποία αντιστοιχούσαν στην περιοχή του κοινού επίτοπου, δοκιμάστηκαν με ELISA και διαπιστώθηκε ότι 64% των ασθενών με νόσο Graves και 36% των ασθενών με θυρεοειδίτιδα Hashimoto είχαν αντισώματα έναντι του κοινού επίτοπου (214). Ο κοινός επίτοπος βρίσκεται στην περιοχή 2376-2464 της ανθρώπινης Tg (Σχήμα 10) και η αντίστοιχη περιοχή στην AChE από *Torpedo* είναι 206-294.

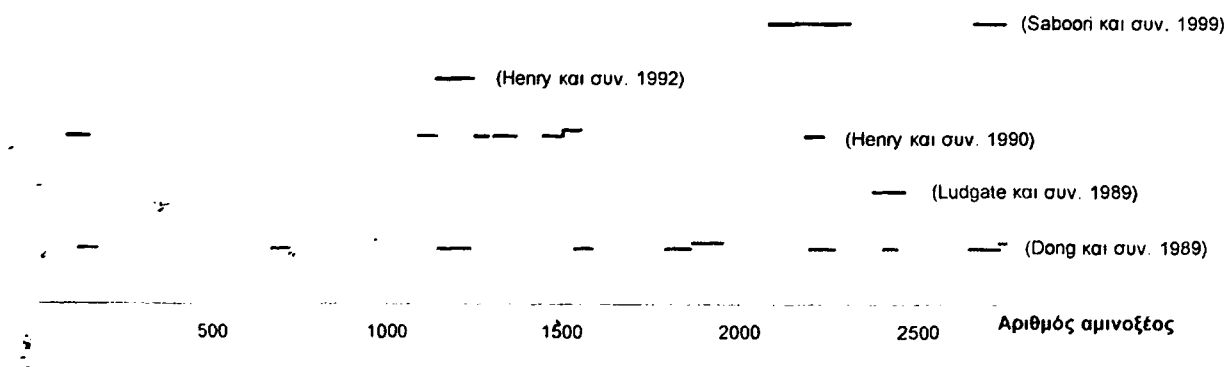
Επτά επίτοποι, οι οποίοι αναγνωρίζονταν από πολυκλωνικό ορό κουνελιού, χαρακτηρίστηκαν πάνω στο μόριο της ανθρώπινης Tg με τη βοήθεια βιβλιοθήκης cDNA σε πλασμιδικό φορέα pEX, από τους Henry και συν. (215). Πέντε από τους επίτοπους βρίσκονταν στο κεντρικό τμήμα της πρωτεΐνης, στην περιοχή 1097-1560 και ένας κοντά στο κάθε άκρο του



μορίου, στις περιοχές 84-149 και 2188-2242 (Σχήμα 10). Οι ίδιοι επίτοποι δοκιμάστηκαν με ορούς από ασθενείς με διάφορες παθήσεις του θυρεοειδούς. Οι οροί από ασθενείς με θυρεοειδίτιδα Hashimoto ήταν οι πιο δραστικοί. Υπήρχε ετερογένεια στη δραστικότητα ορών από διαφορετικές παθήσεις, καθώς και από άτομα με την ίδια πάθηση. Πάντως οι κεντρικοί επίτοποι και ο επίτοπος που βρίσκεται πλησιέστερα προς το καρβοξυ-τελικό άκρο, ήταν αυτοί που αναγνωρίζονταν συχνότερα από τους αυτοάνοσους ορούς.

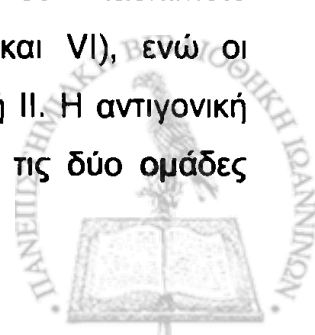
Σε επόμενη τους μελέτη, οι Henry και συν. (216) βρήκαν ότι το ανασυνδυασμένο πεπτίδιο που αντιστοιχούσε στην περιοχή 1149-1295 της ανθρώπινης Tg αναγνωριζόταν από μονοκλωνικά αντισώματα έναντι της ανθρώπινης Tg. Μετά από υποκλωνοποίηση, αυτός ο αντιγονικός καθοριστής μειώθηκε σε ένα πεπτίδιο 102 αμινοξέων (1149-1250). Αυτοαντισώματα έναντι Tg, τα οποία παρουσίαζαν διασταυρούμενη αντίδραση με τα παραπάνω μονοκλωνικά αντισώματα, αναγνώριζαν το πεπτίδιο αυτό. Οι ερευνητές καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για ανοσοκυρίαρχη (immunodominant) περιοχή της Tg, αφού το πεπτίδιο αυτό αναγνώρισαν 13 από 16 ορούς ασθενών με αυτοάνοσες ασθένειες του θυρεοειδούς οι οποίοι ελέγχθηκαν (216).

Επίτοποι αντισωμάτων έναντι της Tg



Σχήμα 10. Σχηματική αναπαράσταση των πεπτιδίων που έχει βρεθεί μέχρι σήμερα ότι περιέχουν ορολογικούς επιτόπους της Tg: Dong και συν. 1989 (213), Ludgate και συν. 1989 (178), Henry και συν. 1990 (215), Henry και συν. 1992 (216), Saboori και συν. 1999 (217).

Σε μια προσπάθεια εντοπισμού διαμορφωτικών επιτόπων, οι Saboori και συν. (218), χρησιμοποίησαν πεπτίδια που προέκυψαν μετά από πέψη τεσσάρων ωρών της Tg με θρυψίνη. Αναγνωρίστηκαν κυρίως τρία πεπτίδια από ορούς ασθενών με αυτοάνοσες ασθένειες του θυρεοειδούς, αλλά το πρότυπο αναγνώρισης διέφερε μεταξύ των δύο ομάδων ασθενών: 60% των ασθενών με νόσο Graves αναγνώριζαν ένα πεπτίδιο 25 kDa και 63% των ασθενών με θυρεοειδίτιδα Hashimoto ήταν δραστικοί έναντι ενός πεπτιδίου 20 kDa. Οροί και από τις δύο ομάδες ασθενών αναγνώριζαν, σε υψηλή συχνότητα, ένα πεπτίδιο 15 kDa. Σε επόμενες εργασίες τους (219,217) οι ίδιοι ερευνητές κατάφεραν να απομονώσουν με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) τα πεπτίδια 15 kDa και 20 kDa και να προσδιορίσουν μέρος της αμινο-τελικής αλληλουχίας τους. Έτσι, διαπιστώθηκε ότι το πεπτίδιο 15 kDa περιλαμβάνει 92 αμινοξέα από το καρβοξυ-τελικό άκρο της ανθρώπινης Tg (αλληλουχία 2657-2748), ενώ το πεπτίδιο 20 kDa προέρχεται από την περιοχή 2089-2316 της ανθρώπινης Tg. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι οι περιοχές 2657-2748 και 2089-2316 της ανθρώπινης Tg (πεπτίδια 15 kDa και 20 kDa), αναγνωρίζονται, με ELISA, από το ίδιο μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι της Tg και η πρόσδεση σε καθένα από τα πεπτίδια αυτά αναστέλλεται, με ανταγωνιστική ELISA, από το άλλο πεπτίδιο (217). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι ο ίδιος επίτοπος αναγνωρίζεται και στα δύο πεπτίδια, παρόλο που δεν υπάρχουν μεταξύ τους ομόλογες αλληλουχίες τριών ή περισσότερων αμινοξέων. Είναι πιθανό, ο επίτοπος αυτός να σχηματίζεται από ασυνεχή τμήματα της πρωτεΐνης – ένα από κάθε πεπτίδιο. Εναλλακτικά, τα δύο πεπτίδια μπορεί να μοιράζονται κάποια παρόμοια δευτεροταγή δομή (διαμορφωτικός επίτοπος) (217). Ο επίτοπος που περιλαμβάνεται στα πεπτίδια αυτά αναγνωρίζεται από ασθενείς με θυρεοειδίτιδα Hashimoto. Η ίδια ερευνητική ομάδα (210), μελέτησε την αναστολή της πρόσδεσης σειράς μονοκλωνικών αντι-Tg αντισωμάτων στην Tg, από ορούς ασθενών με αυτοάνοσες ασθένειες του θυρεοειδούς. Οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι οι ασθενείς με θυρεοειδίτιδα Hashimoto αναγνωρίζουν τρεις κυρίως αντιγονικές περιοχές (II, III και VI), ενώ οι ασθενείς με νόσο Graves αναγνωρίζουν κυρίως την περιοχή II. Η αντιγονική περιοχή VI, είναι αυτή που κατά κύριο λόγο διαφοροποιεί τις δύο ομάδες

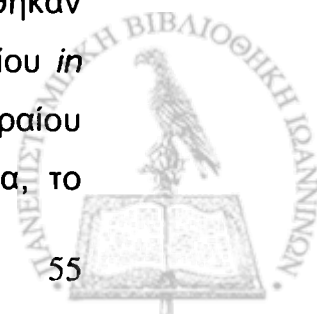


ασθενών. Μια παρόμοια μελέτη (220) με ανθρώπινα μονοκλωνικά αυτοαντισώματα έναντι Tg, έδειξε ότι τα αυτοαντισώματα κατευθύνονται έναντι δύο κύριων διαμορφωτικών επιτόπων. Αντισώματα έναντι του ενός από αυτούς κυριαρχούν σε ορούς υγιών ατόμων, ενώ αντισώματα έναντι του δεύτερου επιτόπου κυριαρχούν σε ορούς ατόμων με αυτοάνοσες ασθένειες του θυρεοειδούς.

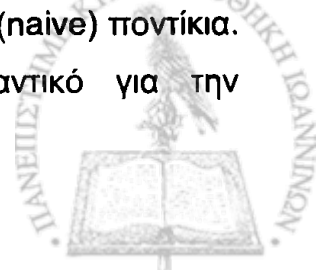
Οι Duthoit και συν. (221) διαπίστωσαν με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση τύπου Western, ότι κατά το σχηματισμό των ορμονών του θυρεοειδούς *in vitro*, παράγονται θραύσματα της Tg που αποτελούν στόχους αυτοαντισωμάτων ασθενών με αυτοάνοσες ασθένειες του θυρεοειδούς. Όπως αναφέρθηκε στην §2.1.5, ο σχηματισμός των ορμονών του θυρεοειδούς πάνω στο μόριο της Tg γίνεται μέσω ενός μηχανισμού, στον οποίο συμμετέχουν ελεύθερες ρίζες. Είναι λοιπόν πιθανό η παρουσία των ελευθέρων ριζών να προκαλεί τη διάσπαση της Tg κατά τη διαδικασία σύνθεσης των ορμονών. Το μικρότερο θραύσμα της Tg που παράγεται κατά το σχηματισμό των ορμονών έχει μέγεθος 40kD και περιλαμβάνει τα αμινοξέα 2384-2748 της ανθρώπινης Tg (221). Οι επίτοποι που περιλαμβάνονται σε αυτό το θραύσμα φαίνεται ότι είναι διαμορφωτικοί, αφού καταστρέφονται κάτω από αναγωγικές συνθήκες.

2.4.4 T-επίτοποι της θυρεοσφαιρίνης

Η πειραματική αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα (EAT) προκαλείται με τη μεσολάβηση T-κυττάρων (222). Κατά συνέπεια, μπορεί να προκληθεί από τη χορήγηση πεπτιδίων της Tg που περιέχουν T-επιτόπους. Διάφορα πεπτίδια της Tg έχουν ελεγχθεί ως προς τη ικανότητά τους να προκαλέσουν EAT σε πειραματόζωα. Ένα 17μερές πεπτίδιο (TgP1), το οποίο αποτελεί τμήμα της Tg του αρουραίου, βρέθηκε ότι προκαλεί πειραματική αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα σε στελέχη ποντικού (223) και αρουραίου (224), ευαίσθητα σε EAT. Το πεπτίδιο TgP1 αντιστοιχεί στα αμινοξικά κατάλοιπα 2495-2511 της ανθρώπινης Tg και είναι φυλογενετικά σταθερό. T-κύτταρα που διεγέρθηκαν με το πεπτίδιο TgP1 δεν αντέδρασαν με άθικτη Tg ποντικού ή αρουραίου *in vitro* και αντίστροφα, T-κύτταρα που διεγέρθηκαν με Tg ποντικού ή αρουραίου δεν αντέδρασαν με το πεπτίδιο TgP1 σε καλλιέργεια. Κατά συνέπεια, το



πεπτίδιο αυτό περιλαμβάνει μη ανοσοκυρίαρχους (non-immunodominant) T-επίτοπους. Το πεπτίδιο χαρακτηρίστηκε επίσης ως μη κυρίαρχος B-επίτοπος, αφού η *in vivo* ευαισθητοποίηση όλων των στελεχών ποντικού (ευαίσθητων και μη ευαίσθητων σε EAT) με Tg ποντικού οδήγησε στην παραγωγή αντισωμάτων ειδικών για την Tg τάξης IgG, όχι όμως και για το TgP1. Το γεγονός αυτό δεν οφειλόταν στην απουσία B-επιτόπων, αφού η χορήγηση του πεπτιδίου σε EAT-ευαίσθητα στελέχη οδήγησε στην παραγωγή αντισωμάτων τάξης IgG που αντιδρούσαν τόσο με το TgP1 όσο και με την Tg (223). Δείχθηκε επίσης ότι τα αντισώματα έναντι του TgP1 αντιδρούν πολύ περισσότερο με την αποδιαταγμένη Tg παρά με τη φυσική πρωτεΐνη και επομένως ο B-επίτοπος στο πεπτίδιο TgP1 είναι γραμμικός (225). Αργότερα, βρέθηκε ότι ο T-επίτοπος πάνω στο πεπτίδιο αυτό αποτελείται από εννέα αμινοξικά κατάλοιπα (2496-2504) (226). Σε άλλη μελέτη, βρέθηκε ένα ακόμη πεπτίδιο της αλληλουχίας του αρουραίου (αμινοξέα 2695-2713) με παρόμοιες ιδιότητες (132). Ένα 9μερές πεπτίδιο του αρουραίου (2499-2507) οδήγησε σε ανάπτυξη EAT ήπιας μορφής και δεν προκάλεσε διέγερση T-κυττάρων σε καλλιέργεια (226). Το 18μερές πεπτίδιο 2695-2713 της Tg του αρουραίου προκάλεσε EAT και διέγερση T-κυττάρων *in vitro* (132). Ακόμα, βρέθηκε ότι ένα πεπτίδιο 40 αμινοξικών καταλοίπων, τμήμα της ανθρώπινης Tg (αμινοξέα 1672-1711), προκαλεί EAT σε ποντίκια του στελέχους CBA (227). Τα πεπτίδια που αναφέρθηκαν μέχρι τώρα για την πρόκληση EAT, δεν περιλαμβάνουν θυρεοειδικές ορμόνες. Οι Kong και συν. (121) εξέτασαν την ανοσοπαθογονικότητα τριών 12-μερών πεπτιδίων της ανθρώπινης Tg (1-12, 2549-2560 και 2559-2570), τα οποία έφεραν T₄ στις κύριες ορμονογόνες θέσεις 5, 2553 και 2567, αντίστοιχα. Για σύγκριση, ελέγχθηκαν επίσης πεπτίδια, τα οποία έφεραν θυρονίνη (T₀) στις θέσεις αυτές. Η T₀ έχει την ίδια δομή με την T₄, αλλά στερείται των τεσσάρων ατόμων ιωδίου. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα πεπτίδια που έφεραν T₄ ή T₀ στη θέση 2553 ήταν ανοσογόνα σε ποντίκια CBA και ενεργοποιούσαν T-κύτταρα, τα οποία είχαν υποστεί αρχική διέγερση, είτε με Tg ποντικού είτε με το αντίστοιχο πεπτίδιο. Τα κύτταρα αυτά μπορούσαν να προκαλέσουν στη συνέχεια EAT με επίκτητη μεταφορά (adoptive transfer) σε μη ανοσοποιημένα (naive) ποντίκια. Αυτό σημαίνει ότι το ιώδιο στην T₄ δεν είναι σημαντικό για την



παθογονικότητα. Ωστόσο, τα άτομα ιωδίου τροποποιούν αρκετά το σύμπλεγμα πεπτιδίου-MHC ώστε ο ιωδιωμένος και ο μη ιωδιωμένος T-επίτοπος να αναγνωρίζεται από διαφορετικές υποομάδες T-κυττάρων. Επιπλέον, τα πεπτίδια που έφεραν T₄ στις θέσεις 5 και 2567 εμφάνισαν χαμηλή αντιγονικότητα και ανοσογονικότητα, γεγονός που σημαίνει ότι η παρουσία T₄ δεν είναι αρκετή για να προσδώσει ανοσοδιεγερτικές ιδιότητες σε ένα πεπτίδιο της Tg. Οι Hoshioka και συν. (228) ακολούθησαν μια διαφōρετική προσέγγιση, βασισμένοι στην παρακάτω υπόθεση. Αφού υπάρχουν κοινοί B-επίτοποι μεταξύ της Tg και της TPO (§2.4.2.2.1.2), θα μπορούσαν εξίσου να υπάρχουν και κοινοί T-επίτοποι. Το 14μερές πεπτίδιο 2730-2743 της ανθρώπινης Tg φέρει πέντε διαδοχικά αμινοξέα πανομοιότυπα με την αλληλουχία της ανθρώπινης TPO. Το πεπτίδιο αυτό δεν προκάλεσε EAT με απευθείας χορήγηση σε ποντίκια. Παρατηρήθηκε όμως σημαντικής έκτασης EAT σε ποντίκια στα οποία μεταφέρθηκαν T-λεμφοκύτταρα προ-διεγερμένα (αρχική χορήγηση) με Tg ποντικού *in vivo* και στη συνέχεια, τους έγινε αναμνηστική χορήγηση του πεπτιδίου *in vitro*.

Στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας I), συνοψίζονται όλα τα παραπάνω αποτελέσματα. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 11, οι τέσσερις από τις πέντε παθογονικές θέσεις της Tg βρίσκονται στην καρβοξυ-τελική περιοχή του μορίου. Το μικρότερο πεπτίδιο που προκαλεί EAT, είναι το 9μερές 2496-2504 του αρουραίου, ενώ το μόνο πεπτίδιο που βρέθηκε ότι είναι παθογονικό σε ζωικό είδος εκτός του ποντικού, είναι το 17πεπτίδιο 2495-2511 του αρουραίου, το οποίο προκαλεί EAT σε διάφορα στελέχη αρουραίου (224). Κάποια από τα πεπτίδια προκαλούν παραγωγή αντισωμάτων στα ποντίκια, όμως τα μόνα πεπτίδια που οδήγησαν στην παραγωγή αντισωμάτων που αναγνωρίζουν και την ακέραια Tg είναι το 2549-2560 της ανθρώπινης Tg και το 2495-2511 της Tg του αρουραίου. Η διήθηση λεμφοκυττάρων που προκαλείται στο θυρεοειδή αδένα ενός ποντικού από τη χορήγηση ενός παθογονικού πεπτιδίου, είναι πολύ μικρότερη από τη διήθηση που προκαλεί η χορήγηση ολόκληρου του μορίου της Tg (Εικόνα 2, σελ. 34). Αυτό οφείλεται στην ύπαρξη πολλών καθοριστών (T-επιτόπων) στην Tg, οι οποίοι δρουν αθρόοιστικά ή συνεργιστικά ώστε να διεγείρουν ένα πολύ μεγαλύτερο αριθμό T-κυτταρικών κλώνων (122). Όλα τα γνωστά παθογονικά πεπτίδια της Tg



ταξινομούνται ως μη κυρίαρχα (nondominant) και προκαλούν ήπιας μορφής EAT (155). Μερικά από αυτά, όπως το 2495-2511, είναι κρυπτικά (cryptic) αφού τα πεπτίδια αυτά δεν σχηματίζονται κατά την επεξεργασία (processing) της Tg *in vivo* ή *in vitro* (122). Άλλα, όπως τα 2549-2560 και 2695-2713, ίσως να είναι υποκυρίαρχα (subdominant), αφού φαίνεται να σχηματίζονται κατά την επεξεργασία της Tg *in vivo* αλλά όχι *in vitro* (155).

Πίνακας Ι. Ανοσοπαθογονικές ιδιότητες γνωστών T-επιτόπων της Tg (122)

Στέλεχος ποντικού	Αλληλουχία ¹	Επαγωγή EAT:		Διέγερση T-κυττάρων ³	Παραγωγή αντισωμάτων	Αναφορά
		Απευθείας	Επικτήτη μεταφορά ²			
CBA	hTg (1-12)	-	ΔΕ ⁴	+	+	(121)
CBA	hTg (1672-1711)	+	ΔΕ	ΔΕ	+	(227)
B10.BR, C3H, SJL	rTg (2495-2511)	+	ΔΕ	+	+	(223)
C3H, SJL	rTg (2496-2504)	+	ΔΕ	+	+	(226)
C3H, SJL	rTg (2499-2507)	Ασθενής	ΔΕ	-	-	(226)
CBA	hTg (2549-2560)	-	+ ^{α,β}	+	+	(121)
SJL	rTg (2695-2713)	+	+	+	+	(132)
CBA	hTg (2730-2743)	-	+ ^β	+	+	(228)

¹ Αρίθμηση σύμφωνα με την ανθρώπινη Tg. hTg ή rTg: το πεπτίδιο ανήκει στην Tg ανθρώπου ή αρουραίου, αντίστοιχα.

² Ανάπτυξη EAT με επίκτητη μεταφορά (adoptive transfer) λεμφοκυττάρων από ζώο στο οποίο έχει χορηγηθεί το αντιγόνο σε άλλο μη ανοσοποιημένο (naive) ζώο.

³ Επαγωγή *in vitro* πολλαπλασιασμού T-κυττάρων από λεμφαδένες ζώου που έχει ανοσοποιηθεί με κάποιο αντιγόνο, με χορήγηση του αντιγόνου στην καλλιέργεια.

⁴ ΔΕ: Δεν έγινε

^α Με επίκτητη μεταφορά κυττάρων από λεμφαδένες τα οποία είχαν διεγερθεί (αρχική χορήγηση) *in vivo* και τους έγινε αναμνηστική χορήγηση *in vitro* με πεπτίδιο.

^β Με επίκτητη μεταφορά κυττάρων από λεμφαδένες τα οποία είχαν διεγερθεί (αρχική χορήγηση) με Tg ποντικού *in vivo* και τους έγινε αναμνηστική χορήγηση *in vitro* με πεπτίδιο.

Ανοσοπαθογονικά πεπτίδια της Tg

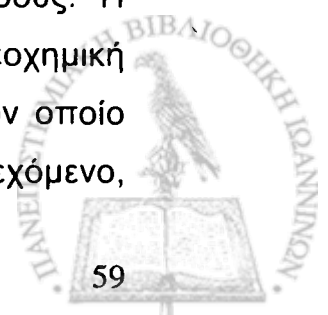


Σχήμα 11. Θέσεις των πεπτιδίων της Tg που προκαλούν πειραματική αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα. Οι ενδείξεις (h) και (r) δηλώνουν ότι το πεπτίδιο προέρχεται από την αλληλουχία της Tg του ανθρώπου ή του αρουραίου, αντίστοιχα. Σε όλες τις περιπτώσεις όμως, η αρίθμηση έγινε σύμφωνα με την αλληλουχία της ανθρώπινης Tg. Έχουν εντοπιστεί πέντε διαφορετικά ανοσοπαθογονικά πεπτίδια της Tg, δηλ. πεπτίδια που προκαλούν πειραματική αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα κατά τη χορήγησή τους σε πειραματόζωα. Τέσσερα από τα πέντε αυτά πεπτίδια βρίσκονται στην καρβοξυ-τελική περιοχή της Tg.

2.4.5 "Ιωδίωση της θυρεοσφαιρίνης και οι ανοσολογικές της ιδιότητες

- Επιδημιολογικές και κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι αυξημένη κατανάλωση ιωδίου ενδέχεται να συνδέεται με την εμφάνιση αυτοάνοσων ασθενειών του θυρεοειδούς (229,230). Η σχέση ανάμεσα στο ιώδιο που προσλαμβάνεται από τον οργανισμό και τις αυτοάνοσες ασθένειες του θυρεοειδούς υποστηρίχθηκε και από την ακόλουθη μελέτη. Σε παιδιά στα οποία δόθηκε, για προφύλαξη, ιώδιο μετά το πυρηνικό ατύχημα στο Chernobyl, εμφανίστηκαν αυτοαντισώματα έναντι της Tg και της μεμβράνης του θυρεοειδούς (231). Προς την ίδια κατεύθυνση συνηγορούν και πειραματικά αποτελέσματα με ζωικά μοντέλα. Στα πειράματα αυτά φάνηκε ότι δίαιτα με αυξημένη ποσότητα ιωδίου ενισχύει την ανάπτυξη αυτοάνοσης πειραματικής θυρεοειδίτιδας σε στελέχη ζώων που είναι ευαίσθητα στην ανάπτυξη της νόσου (§2.4.4), όπως σε στελέχη κοτόπουλου (232,233), σε στελέχη αρουραίου (234,235) και σε στέλεχος ποντικού (236). Σε *in vitro* μελέτεςδείχθηκε ότι κάποια υβριδώματα T-κυττάρων αντιδρούσαν με την Tg σε άμεση αναλογία με τη σύσταση της πρωτεΐνης σε ιώδιο (237). Τα πεπτίδια που περιείχαν T₄ και αναγνωρίζονταν από αυτά τα υβριδώματα ήταν ικανά να επάγουν πειραματική θυρεοειδίτιδα (238). Σε άλλη μελέτη όμως, έγινε εμφανές ότι δεν εξαρτώνται όλα τα πεπτίδια από τη σύστασή τους σε ιώδιο για να επάγουν πολλαπλασιασμό T-κυττάρων (121). Φαίνεται λοιπόν ότι για κάποια πεπτίδια, η αναγνώριση από T-κύτταρα εξαρτάται από την παρουσία ιωδίου, ενώ για άλλα όχι.

Έχει βρεθεί ότι η ιωδίωση της Tg οδηγεί σε στερεοχημική διαμόρφωση του μορίου (239). Οι Saboori και συν. (240) διαπίστωσαν ότι η ιωδίωση της Tg *in vivo* ή *in vitro* αλλάζει τη διαμόρφωση του μορίου με τέτοιο τρόπο, ώστε να χάνονται κάποιοι φυσικοί επίτοποι ενώ συγχρόνως να εμφανίζονται κάποιοι νέοι επίτοποι. Το αποτέλεσμα αυτό προέκυψε από μελέτη της δραστηριότητας μονοκλωνικών αντισωμάτων ποντικού έναντι Tg. Οι ερευνητές εικάζουν ότι η δημιουργία νέων επιτόπων ίσως είναι σημαντική για τη γένεση αυτοάνοσης αντίδρασης που οδηγεί σε αυτοανοσία του θυρεοειδούς. Η εγσωμάτωση ιωδίου στην Tg πιθανόν να αλλάζει τη στερεοχημική διαμόρφωση της πρωτεΐνης και έτσι να επηρεάζει τον τρόπο με τον οποίο αναγνωρίζεται από το ανοσοποιητικό σύστημα. Ένα δεύτερο ενδεχόμενο,



είναι το ιώδιο με την παρουσία του σε κάποιο αντιγονικό καθοριστή να δημιουργεί νέες θέσεις δέσμευσης αντισωμάτων (241). Στο συμπέρασμα αυτό κατέληξαν οι ερευνητές όταν διαπίστωσαν ότι η πρόσδεση ενός μονοκλωνικού αντισώματος που αναγνώριζε ιωδιωμένη Tg αναστέλλεται από T₄, T₃, αντίστροφη T₃ (rT₃), τριιωδοθυροοξικό οξύ (triac), διιωδοθυρονίνη (T₂) και διιωδοτυροσίνη (DIT), αλλά όχι από θυρονίνη (T₀). Η σειρά αναστολής από τις παραπάνω χημικές ενώσεις είναι T₄ > T₃ > rT₃ > triac > T₂ > DIT, δηλαδή εξαρτάται από το περιεχόμενό τους σε ιώδιο και σε μικρότερο βαθμό από τη θέση ιωδίωσης στον αρωματικό δακτύλιο. Οι πιο ιωδιωμένες χημικές ενώσεις αναστέλλουν ισχυρότερα. Οι Saboori και συν. (241) υποστηρίζουν ότι οι ιωδιωμένες θέσεις της Tg φαίνονται να είναι πρώιμοι στόχοι της ανοσοαπόκρισης στην αυτοανοσία του θυρεοειδούς. Στη συνέχεια, υπάρχει επέκταση προς άλλους επιτόπους, καθώς η αυτοάνοση απόκριση οδεύει προς τη νόσο. Οι επίτοποι που περιέχουν ιώδιο δεν είναι οι μόνοι που αναγνωρίζονται από αντισώματα ασθενών με αυτοάνοσες ασθένειες του θυρεοειδούς ή από αντισώματα που επάγονται σε πειραματικά πρότυπα (121). Ωστόσο, οι ιωδιωμένες θέσεις μπορεί να είναι σημαντικές για την έναρξη ή την ενίσχυση της αυτοάνοσης απόκρισης.



3. Υλικά και Μέθοδοι

3.1 Διαλύματα

Τα ακόλουθα διαλύματα χρησιμοποιούνται στην παρούσα μελέτη (στο κείμενο με πλάγια γράμματα).

Διάλυμα 1. Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 1 M, pH 7.4

Σε διάλυμα K_2HPO_4 1 M προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα διαλύματος KH_2PO_4 1M, έτσι ώστε το pH του τελικού διαλύματος να γίνει 7.4.

Διάλυμα 2. PBS (phosphate-buffered saline)

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Διάλυμα 1) 0.01 M pH 7.4 που περιέχει 0.15 M NaCl.

Διάλυμα 3. Cbc (διάλυμα ανθρακικού - διττανθρακικού νατρίου) 0.5 M, pH 9.5

17.5 g ανθρακικού νατρίου και 28g διττανθρακικού νατρίου διαλύονται σε 1 lt H_2O .

Διάλυμα 4. Ρυθμιστικό διάλυμα αποκόλλησης αντισωμάτων από τα

ομοιοπολικά προσδεδεμένα πεπτίδια (disruption buffer)

15.6 g NaH_2PO_4 και 10 g SDS σε 1 lt H_2O . Ρύθμιση του pH στο 7.2 με 50% NaOH.

Διάλυμα 5. Supercocktail

1% (w/v) αλβουμίνη αυγού, 1% (w/v) BSA και 0.1% Tween-20 (v/v) σε PBS.

Διάλυμα 6. Ρυθμιστικό διάλυμα ABTS

50ml διαλύματος Na_2HPO_4 1 M και 40 ml διαλύματος κιτρικού οξέος 1 M αναμιγνύονται με 410 ml H_2O και το pH ρυθμίζεται στο 4.0.

Διάλυμα 7. TBS (Tris buffered saline)

Αναμιγνύονται 100 ml 0.1 M Tris-HCl, pH 7.4 και 100 ml 1.5 M NaCl και συμπληρώνονται με H_2O μέχρι το 1 lt.

Διάλυμα 8. Lower Tris

1.5 M Tris-HCl, pH 8.8

4% (v/v) διαλύματος SDS 10%

Διάλυμα 9. Upper Tris

0.5 M Tris-HCl, pH 6.8

4% (v/v) διαλύματος SDS 10%

Διάλυμα 10. Ακρυλαμίδιο/δισ-ακρυλαμίδιο

30% (w/v) ακρυλαμίδιο, 0.8% (w/v) δισ-ακρυλαμίδιο

Διάλυμα 11. Ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος (sample buffer) 5x

Αναγωγικές συνθήκες: 50 mM Tris, 10% (w/v) SDS, 25% (v/v) β-μερκαπτοαιθανόλη, 50% (v/v) γλυκερόλη, 0.01% (w/v) μπλε της

βρωμοφαινόλης.

Μη αναγωγικές συνθήκες: όπως στις αναγωγικές συνθήκες, αλλά χωρίς β-μερκαπτοαιθανόλη

Διάλυμα 12. Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης
24 g Tris, 115.2 g γλυκίνης, 1 lt H₂O, pH 8.3

Διάλυμα 13. Διάλυμα χρώσης
45% (v/v) μεθανόλη, 0.25%(w/v) χρωστική μπλε του Coomassie BBR-250 και 9% (v/v) οξικό οξύ σε νερό

Διάλυμα 14. Διάλυμα αποχρωματισμού
20% (v/v) μεθανόλη και 10% (v/v) οξικό οξύ σε νερό

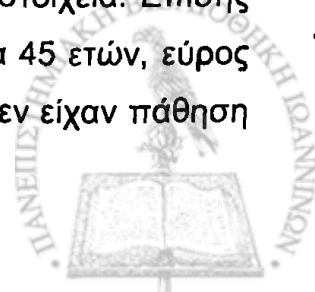
Διάλυμα 15. Ρυθμιστικό διάλυμα βορικού 0.05 M/KH₂PO₄, pH 8.4
δι-Na-τετραβορικό 0.05 M ρυθμίζεται με διάλυμα 0.1 M KH₂PO₄, στο pH 8.4

Διάλυμα 16. Ρυθμιστικό διάλυμα σύζευξης
0.1 M NaHCO₃, 0.5 M NaCl pH 8.3

Διάλυμα 17. 0.1 M ρυθμιστικό διάλυμα οξικού pH 4.0, 0.5 M NaCl
Παρασκευάζονται διαλύματα 0.1 M οξικού οξέος και 0.1 M οξικού Na.
Αναμιγνύονται σε τέτοια αναλογία ώστε το τελικό pH να γίνει 4.0. Προστίθεται NaCl σε τελική συγκέντρωση 0.5 M.

3.2 Οροί

Χρησιμοποιήθηκαν οροί από 99 ασθενείς με GD (μέση ηλικία 48 ετών, εύρος 17-84 ετών, αναλογία γυναικών / ανδρών 74/25) και από 32 ασθενείς με HT (μέση ηλικία 43 ετών, εύρος 15-78 ετών, αναλογία γυναικών / ανδρών 28/4). Η διάγνωση των ασθενών στηρίχθηκε στην κλινική εικόνα και σε εργαστηριακά ευρήματα. Οι ασθενείς υποβλήθηκαν σε λεπτομερή κλινική εξέταση όσον αφορά την οφθαλμοπάθεια, περιλαμβανομένης της μέτρησης του εξόφθαλμου. Στους ασθενείς στους οποίους η οφθαλμοπάθεια δεν ήταν κλινικά εμφανής, πραγματοποιήθηκε υπερηχογράφημα κόγχων για να εξακριβωθεί αν υπάρχει πάθηση του οφθαλμικού μυός. Από τους ασθενείς με GD, οι 37 παρουσίαζαν οφθαλμοπάθεια σταδίου II-IV κατά Werner (242,243), οι 55 δεν είχαν οφθαλμοπάθεια, ενώ για επτά δεν υπήρχαν στοιχεία. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν οροί από 45 υγιείς μάρτυρες (μέση ηλικία 45 ετών, εύρος 20-75 ετών, αναλογία γυναικών / ανδρών 35/10), οι οποίοι δεν είχαν πάθηση

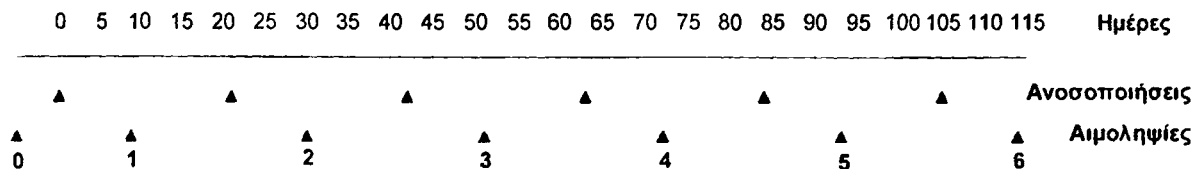


του θυρεοειδούς. Όλοι οι οροί φυλάχθηκαν στους -70°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

3.3 Ανοσοποιήσεις - Αντιοροί

3.3.1 Ανοσοποίηση με ανθρώπινη Tg

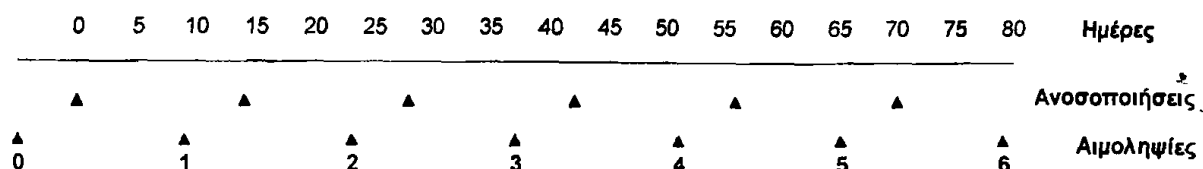
Σε δύο ενήλικα λευκά κουνέλια Νέας Ζηλανδίας ενέθηκαν υποδορίως 2.5 mg ανθρώπινης Tg, σε αιώρημα πλήρους ανοσοενισχυτικού εκδόχου του Freund (CFA) (Sigma, St. Louis, Missouri, ΗΠΑ), ανά τρεις εβδομάδες, συνολικά έξι φορές. Αιμοληψία έγινε πριν την ανοσοποίηση και 8-10 ημέρες μετά από κάθε ανοσοποίηση (Σχήμα 12). Δύο ζώα ενέθηκαν μόνο με CFA ακολουθώντας το ίδιο χρονοδιάγραμμα, ως αρνητικοί μάρτυρες. Οι αντιοροί φυλάχθηκαν στους -70°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.



Σχήμα 12. Χρονοδιάγραμμα ανοσοποίησης και αιμοληψιών των κουνελιών που ανοσοποιήθηκαν με ανθρώπινη Tg. Οι ανοσοποιήσεις πραγματοποιήθηκαν ανά τρεις εβδομάδες, συνολικά έξι φορές. Αιμοληψία έγινε πριν την έναρξη των ανοσοποιήσεων και 8-10 ημέρες μετά από κάθε ανοσοποίηση.

3.3.2 Ανοσοποίηση με το πεπτιδίο TgP41

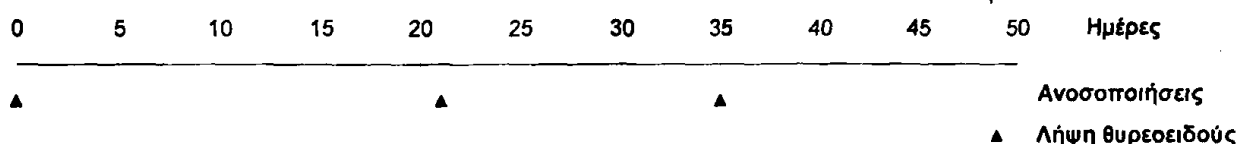
Δύο ενήλικα λευκά κουνέλια Νέας Ζηλανδίας (L48 και L49) ενέθηκαν υποδορίως με 100 μg πεπτιδίου TgP41, σε αιώρημα CFA ανά δύο εβδομάδες, συνολικά έξι φορές. Αιμοληψία έγινε πριν την ανοσοποίηση και 8-10 ημέρες μετά από κάθε ανοσοποίηση (Σχήμα 13). Οι αντιοροί φυλάχθηκαν στους -70°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.



Σχήμα 13. Χρονοδιάγραμμα ανοσοποίησης και αιμοληψιών των κουνελιών που ανοσοποιήθηκαν με το πεπτιδίο TgP41. Οι ανοσοποιήσεις έγιναν ανά δύο εβδομάδες, συνολικά έξι φορές. Αιμοληψίες έγιναν πριν την έναρξη των ανοσοποιήσεων και 8-10 ημέρες μετά από κάθε ανοσοποίηση.

3.3.3 Ανοσοποίηση με το πεπτιδίο TgP41 για ιστολογική εξέταση του θυρεοειδούς αδένος

Τρία ενήλικα λευκά κουνέλια Νέας Ζηλανδίας (L63, L64 και L65) ενέθηκαν υποδορίως με 100 μg πεπτιδίου TgP41, σε αιώρημα πλήρους ανοσοενισχυτικού εκδόχου του Freund (CFA). Μετά από τρεις εβδομάδες ενέθηκαν με τον ίδιο τρόπο χορήγησης και την ίδια ποσότητα πεπτιδίου σε ατελές ανοσοενισχυτικό του Freund (IFA). Μετά από δύο εβδομάδες επαναλήφθηκε η χορήγηση της ίδιας ποσότητας πεπτιδίου σε IFA με τον ίδιο τρόπο χορήγησης (Σχήμα 14). Δύο εβδομάδες μετά την τελευταία χορήγηση τα ζώα θυσιάστηκαν και αφαιρέθηκαν οι θυρεοειδείς αδένες (Σχήμα 14). Οι αδένες φυλάχτηκαν σε διάλυμα 10% φορμαλδεΰδης μέχρι να γίνει ιστολογική εξέταση.



Σχήμα 14. Χρονοδιάγραμμα χορήγησης του πεπτιδίου TgP41 σε τρία κουνέλια και λήψης των θυρεοειδών αδένων για ιστολογική εξέταση. Έγιναν συνολικά τρεις ανοσοποιήσεις. Η δεύτερη ανοσοποίηση έγινε τρεις εβδομάδες μετά την πρώτη ενώ η τρίτη απείχε δύο εβδομάδες από τη δεύτερη. Δύο εβδομάδες μετά την τελευταία ανοσοποίηση, τα ζώα θανατώθηκαν και έγινε λήψη των θυρεοειδών αδένων για ιστολογική εξέταση.

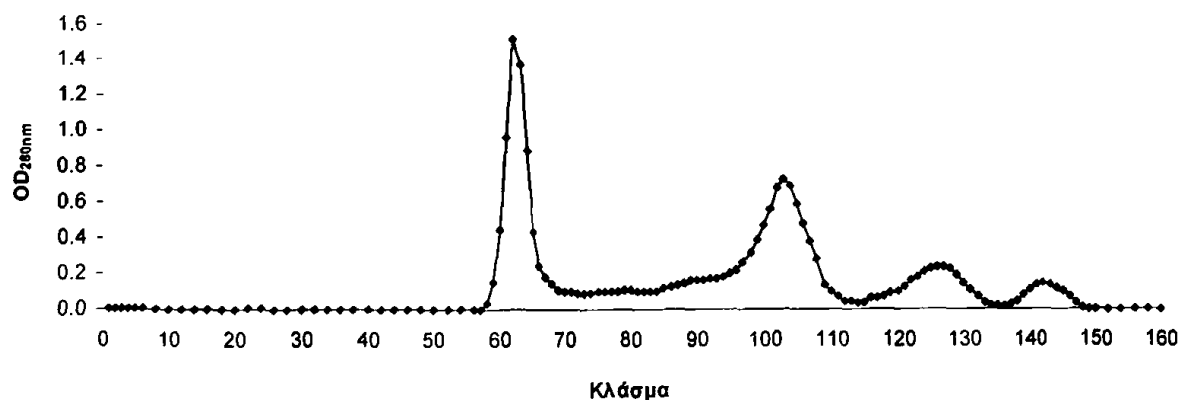
3.4 Αντιδραστήρια

- Ο έλεγχος καθαρότητας όλων των αντιγονικών παρασκευασμάτων πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου παρουσία SDS (SDS-PAGE), κάτω από αναγωγικές και μη αναγωγικές συνθήκες (244) (§3.8).

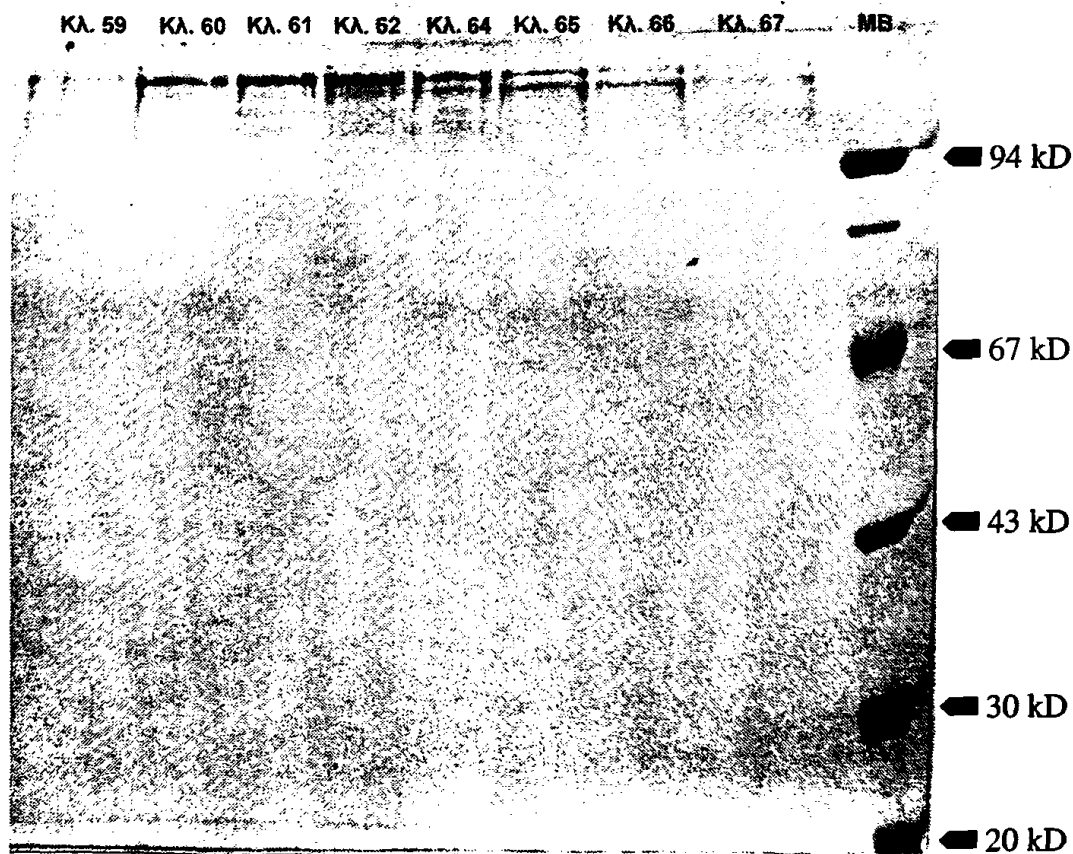
3.4.1 Θυρεοσφαιρίνη

Η ανθρώπινη θυρεοσφαιρίνη απομονώθηκε από θυρεοειδείς αδένες που αφαιρέθηκαν με χειρουργική επέμβαση από ασθενείς με υπερπλασία του θυρεοειδούς. Η Tg απομονώθηκε επίσης από θυρεοειδείς αδένες ποντικού, αρουραίου και κουνελιού. Η Tg του βοδιού και του χοίρου που χρησιμοποιήθηκαν, ήταν εμπορικά παρασκευάσματα από τη Sigma (St. Louis, Missouri, ΗΠΑ). Η μέθοδος απομόνωσης της Tg (245) έχει ως εξής: Οι θυρεοειδείς αδένες τεμαχίστηκαν και φυλάχτηκαν στους -80°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν. Ο θυρεοειδικός ιστός ομογενοποιήθηκε σε περίπου πέντε όγκους ψυχρού διαλύματος KCl 0.15 M σε ομογενοποιητή Polytron και φυγοκεντρήθηκε (10,000 g, 30 min) στους 4°C . Το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης αυτής, φυγοκεντρήθηκε ξανά στα 78,000 g επί 30 min στους 4°C . Το υπερκείμενο της δεύτερης φυγοκέντρωσης ρυθμίστηκε σε τελική συγκέντρωση θειικού αμμωνίου 1.52 M (με προσθήκη διαλύματος $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.75 M). Το διάλυμα παρέμεινε για 1 h στους 0°C και φυγοκεντρήθηκε στα 1,000 g επί 20 min, σε θερμοκρασία 4°C . Το υπερκείμενο ρυθμίστηκε σε συγκέντρωση θειικού αμμωνίου 1.76 M. Μετά από παραμονή 1 h στους 0°C και φυγοκέντρωση (1,000 g, 30 min), το ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε σε απιονισμένο H_2O και διήλθε από στήλη μοριακής διήθησης Sepharose 6B (Pharmacia, Uppsala, Σουηδία) σε θερμοκρασία 4°C . Τα κλάσματα που προέκυψαν από έκλυση με διάλυμα 0.15 M NaCl ελέγχθηκαν ως προς την περιεκτικότητά τους σε πρωτεΐνη με φωτομέτρηση στα 280 nm (Σχήμα 15). Η παρουσία Tg στα κλάσματα έκλυσης ελέγχθηκε με SDS-PAGE (Σχήμα 16). Τα κλάσματα που διαπιστώθηκε ότι περιείχαν Tg ενώθηκαν, συμπυκνώθηκαν και αποθηκεύτηκαν στους -20°C σε 50% γλυκερόλη. Η ανθρώπινη Tg που απομονώθηκε, είχε 20 άτομα ιωδίου ανά μονομερές, όπως προσδιορίστηκε

με τη μέθοδο των Palumbo και συν. (246,247). Η τιμή αυτή βρίσκεται μέσα στα φυσιολογικά όρια περιεχομένου της Tg σε ιώδιο (6).



Σχήμα 15. Φωτομέτρηση στα 280nm των κλασμάτων έκλουσης από τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης κατά τη διαδικασία απομόνωσης ανθρώπινης Tg. Η πρώτη κορυφή, που αντιστοιχεί στα κλάσματα 59-67, περιέχει την Tg, όπως διαπιστώθηκε με SDS-PAGE (Σχήμα 16). Αναμίχθηκαν και συμπυκνώθηκαν τα κλάσματα 60-66.



Σχήμα 16. Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE, υπό αναγωγικές συνθήκες, των κλασμάτων έκλουσης 59-67 (Σχήμα 15) από τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης κατά τη διαδικασία απομόνωσης ανθρώπινης Tg. Διακρίνονται οι ζώνες από τις μονομερείς υπομονάδες της Tg. Μια δεύτερη ζώνη σε ελαφρώς μικρότερο μοριακό βάρος που εμφανίζεται κατά την ηλεκτροφόρηση των κλασμάτων 64-67 πιθανόν να οφείλεται σε κάποια υπομονάδα Tg με μικρή διαφορά στο μοριακό βάρος, π.χ. λόγω διαφορετικής γλυκοζυλίωσης. Αναμίχθηκαν και συμπυκνώθηκαν τα κλάσματα 60-66. MB: πρότυποι δείκτες μοριακών βαρών.

3.4.2 Άλλα αντιγόνα και αντιδραστήρια

- Η AChE από το ηλεκτροφόρο χέλι *Electrophorus electricus* (περίπου 1,000 U/mg) ήταν εμπορικό παρασκεύασμα (Boehringer Mannheim, Γερμανία). Η αλβουμίνη βοείου ορού (BSA, Fraction V) καθώς και το φυσικό DNA (nDNA) από θύμο αδένα μοσχαριού ήταν εμπορικά παρασκευάσματα από τη Sigma (St. Louis, Missouri, ΗΠΑ). Η θυρεοειδική υπεροξειδάση (TPO) ήταν εμπορικό παρασκεύασμα από την HyTest (Turku, Φινλανδία). Η ανθρώπινη μυοσίνη, η ανθρώπινη ακτίνη και η τουμπουλίνη χοίρου παρασκευάστηκαν στο Εργαστήριο Ανοσολογίας του Ελλ. Ινστ. Pasteur, σύμφωνα με γνωστά πρωτόκολλα παρασκευής: μυοσίνη (248), ακτίνη (249), τουμπουλίνη (250). Τα συζεύγματα αντισωμάτων έναντι ανθρώπινης IgG με υπεροξειδάση ή αλκαλική φωσφατάση καθώς και το σύζευγμα αντισώματος έναντι ολικών ανοσοσφαιρινών κουνελιού με αλκαλική φωσφατάση, προέρχονταν από τη Sigma.

3.4.3 Συζεύγματα ορμονών του θυρεοειδούς (T_3 και T_4) με RSA

Οι ορμόνες T_3 και T_4 (Sigma), συζεύχθηκαν με αλβουμίνη ορού κουνελιού (RSA, Sigma) μέσω π-βενζοκινόνης (PBQ), με μια διαδικασία που εκτελέστηκε σε δύο στάδια. Αρχικά, 50 μ l διαλύματος PBQ (30 mg/ml σε αιθανόλη) αναμίχθηκε με την RSA (2 mg σε 0.2 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών 0.1 M, pH 6.0) και επωάστηκαν για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου (Θ.Δ.). Η ενεργοποιημένη - με PBQ - RSA διαχωρίστηκε από την ελεύθερη PBQ με χρωματογραφία μοριακής διήθησης σε Sephadex G-25 fine (Pharmacia, Uppsala, Σουηδία) διαποτισμένη με 0.15 M NaCl. Από την έκλουση συλλέχθηκε το πρώτο έγχρωμο κλάσμα (1 ml). Στο κλάσμα αυτό προστέθηκαν 5 μ mol T_3 ή T_4 . Προστέθηκε διάλυμα ανθρακικού-διττανθρακικού 1 M, pH 9.5, ώστε η τελική του συγκέντρωση να είναι 0.1 M. Η ενεργοποιημένη RSA αντέδρασε με T_3 ή T_4 για 48 h της 4°C. Οι χημικές ομάδες στην RSA που δεν αντέδρασαν με T_3 ή T_4 αδρανοποιήθηκαν με L-λυσίνη (τελική συγκέντρωση 0.1 M, επώαση 2 h) και τα σύζευγματα, μετά από διαπίδυση έναντι PBS, αποθηκεύτηκαν της - 20°C σε 50% γλυκερόλη.

3.5 Σύνθετικά πεπτίδια

Τα πεπτίδια TgP15, TgP26 και TgP41 (2339-2358, 2471-2490 και 2651-2670 της ανθρώπινης Tg, αλληλουχίες: QVAALTWVQTHIRGFGGDPR, PPARALKRSLWVEVDLLIGS και PYEFSRKVPTFATPWPDPFVP, αντίστοιχα) συντέθηκαν με τη μέθοδο της στερεάς φάσης κατά Merrifield (251) και απομονώθηκαν με HPLC από τη Genosys Biotechnologies (Cambridge, Αγγλία). Τα αμινο- και καρβοξυ-τελικά άκρα των πεπτιδίων ήταν ελεύθερα. Το ποσοστό καθαρότητάς της ήταν > 70%. Η ταυτοποίησή της έγινε με φασματοσκοπία μάζας.

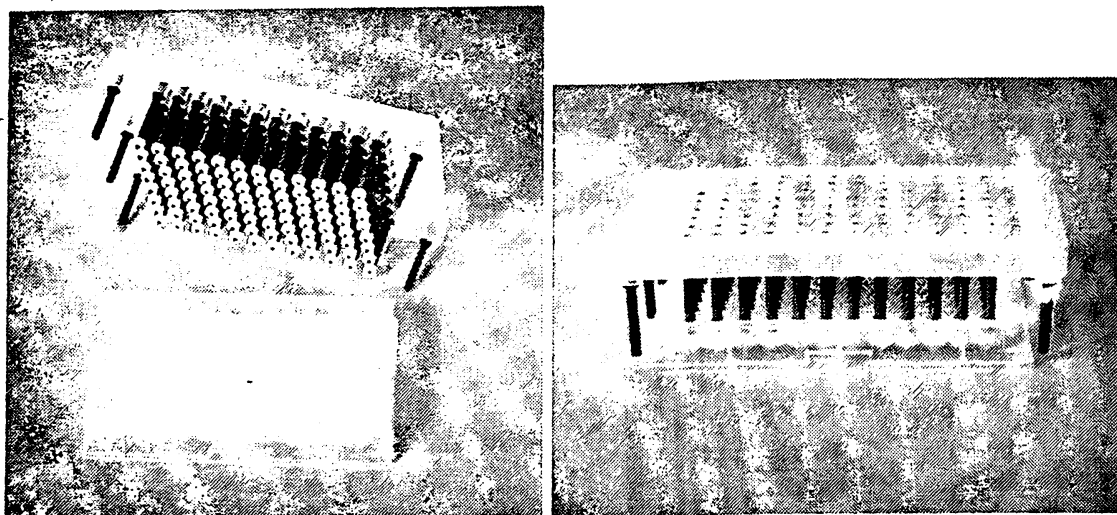
3.6 Σύνθεση πεπτιδίων σε ραβδία

Σαράντα οκτώ 20-μερή πεπτίδια, επικαλυπτόμενα μεταξύ τους κατά οκτώ αμινοξέα, τα οποία κάλυπταν την περιοχή 2171-2748 της ανθρώπινης Tg (23), παρασκευάστηκαν πάνω σε ραβδία σε δύο αντίγραφα το καθένα.

Για τη σύνθεση των πεπτιδίων χρησιμοποιήθηκε το "non-cleavable peptides kit" της εταιρίας Chiron (Clayton, Αυστραλία). Κάθε block φέρει 96 ραβδία σε διάταξη 8x12. Κάθε ραβδίο έχει μια πολυαιθυλενική κεφαλή σχήματος γκρανζιού (Εικόνα 3). Το πολυαιθυλένιο είναι εμβολιασμένο με πολυακρυλικό οξύ και πάνω στις καρβοξυλομάδες του ακρυλικού βρίσκεται προσδεδεμένο 1,6-διαμινοεξανίο με αμιδικό δεσμό. Η άλλη αμινομάδα του διαμινοεξανίου σχηματίζει αμίδιο με την καρβοξυλομάδα μιας β-αλανίνης, η οποία έχει προστατευμένη με Fmoc την αμινομάδα της. Πάνω στην αμινομάδα της β-αλανίνης γίνεται η σύνθεση του πεπτιδίου με τη μέθοδο που προτάθηκε από τους Geysen και συν. (252) και περιγράφεται στη συνέχεια (Σχήμα 17).

Χρησιμοποιήθηκαν L-αμινοξέα με Fmoc-προστατευμένη την αμινομάδα και κατάλληλα προστατευμένη, όπου χρειαζόταν, την πλευρική ομάδα: Fmoc-Ala, Fmoc-Cys(Trt), Fmoc-Asp(OtBu), Fmoc-Glu(OtBu), Fmoc-Phe, Fmoc-Gly, Fmoc-His(Boc), Fmoc-Lys(Boc), Fmoc-Leu, Fmoc-Met, Fmoc-Asn, Fmoc-Pro, Fmoc-Gln, Fmoc-Arg(Mtr), Fmoc-Ser(tBu), Fmoc-Thr(tBu), Fmoc-Val, Fmoc-Trp και Fmoc-Tyr(tBu).





Εικόνα 3. Παράλληλη σύνθεση μεγάλου αριθμού πεπτιδίων σε πολυαιθυλενικά στηρίγματα. "Non-cleavable peptides kit" της εταιρίας Chiron.

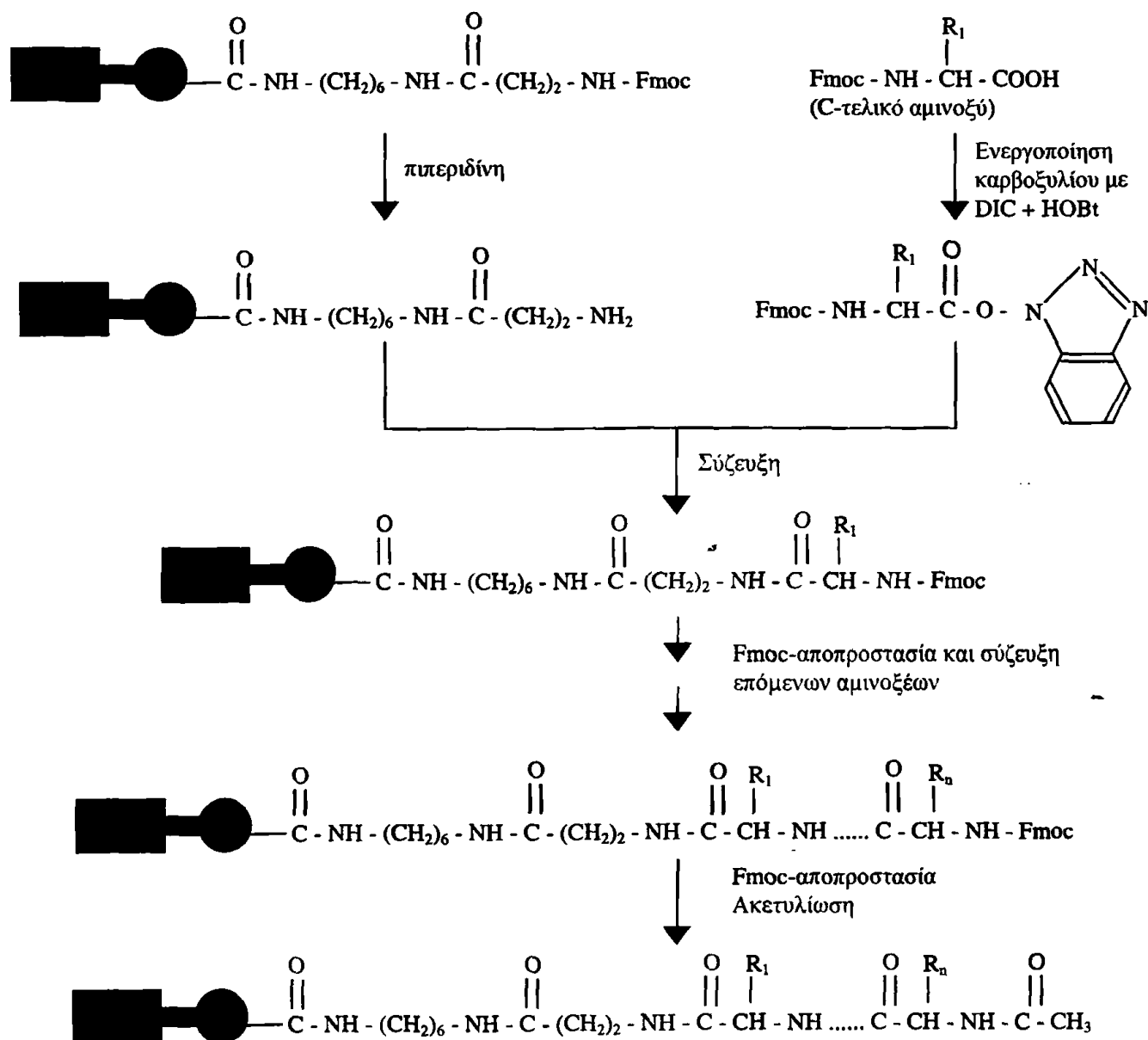
Οι ακόλουθες διαδικασίες πραγματοποιούνται σε πολυαιθυλενικές πλάκες μικροτιπλοδότησης 96 φρεατίων (σε διάταξη 8x12). Όλες οι αντιδράσεις εκτελούνται σε Θ.Δ. Αποκόπτεται η Fmoc-προστασία από την αμινομάδα της β-αλανίνης με 20% πιπεριδίνη/DMF, 175 μ l/φρεατίδιο, για 30 min. Ακολουθεί πλύσιμο με DMF και μεθανόλη και στέγνωμα για 30 min. Παραμονή για 2 min σε DMF. Η σύζευξη του αμινοξέος πραγματοποιείται για τουλάχιστον 4 ώρες σε διάλυμα που περιέχει 60 mM του αμινοξικού παραγώγου, 60 mM DIC και 72 mM HOBt σε DMF, 150 μ l/φρεάτιο. Με προσθήκη 0.05 mM μπλε της βρωμοφαινόλης ελέγχεται η πορεία της αντίδρασης. Ακολουθεί πλύσιμο με DMF και μεθανόλη και συνεχίζεται η ίδια διαδικασία για τη σύζευξη των επόμενων αμινοξέων.

Όταν ολοκληρωθεί το πεπτίδιο, απομακρύνεται η Fmoc-προστασία της τελικής αμινομάδας με 20% πιπεριδίνη/DMF και ακολουθεί πλύσιμο με DMF και μεθανόλη. Η τελική αμινομάδα ακετυλιώνεται με 150 μ l/φρεάτιο μίγματος ακετυλίωσης, το οποίο αποτελείται από DMF : οξικό ανυδρίτη : N-αιθυλοδιισοπροπυλαμίνη σε αναλογία 50 : 2 : 1 (v/v/v). Η αντίδραση διαρκεί 90 min. Ακολουθεί πλύσιμο με DMF και μεθανόλη και στέγνωμα.

Η αποπροστασία των πλευρικών ομάδων των αμινοξέων γίνεται με παραμονή για 4 ώρες σε λουτρό με μίγμα TFA : ανισόλη : αιθανοδιθειόλη σε αναλογία 95 : 2.5 : 2.5 (v/v/v). Ακολουθεί στέγνωμα για 10 min και παραμονή σε λουτρό υπερήχων (sonicator) για 15min σε διάλυμα 0.1% HCl σε

μεθανόλη/H₂O 1 : 1. Τα ραβδία στεγνώνονται και αποθηκεύονται χωρίς υγρασία στους 4°C.

Για τον καθορισμό των διαδοχικών κύκλων σύνθεσης των πεπτιδίων καθώς και για τις απαιτούμενες ποσότητες αντιδραστηρίων, κατασκευάσαμε πρόγραμμα H/Y σε γλώσσα προγραμματισμού Visual Basic 3.0, το οποίο παρουσιάζεται στο Παράρτημα (σελ. 188).

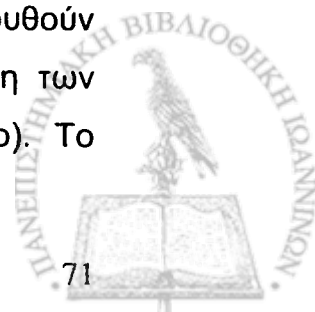


Σχήμα 17. Σχηματική απεικόνιση των σταδίων σύνθεσης πεπτιδίων σε πολυαιθυλενικά στηρίγματα.

3.7 Ενζυμική ανοσοπροσροφητική δοκιμασία (ELISA)

3.7.1 Μη ανταγωνιστική ELISA με ομοιοπολικά συνδεδεμένα πεπτιδία

Τα ραβδία με τα συνθετικά πεπτιδία (§3.6) υφίστανται κατεργασία με υπέρηχους σε ρυθμιστικό διάλυμα αποκόλλησης αντισωμάτων (*disruption buffer*, Διάλυμα 4), που περιέχει 1 ml 2-μερκαπτοαιθανόλης ανά λίτρο διαλύματος, για 30 min στους 60°C. Ακολουθεί πλύση με απιονισμένο H₂O στους 60°C και με ελαφρώς ζέουσα μεθανόλη. Η παραπάνω διαδικασία γίνεται πριν από την πρώτη δοκιμασία ELISA καθώς και μετά από κάθε τέτοια δοκιμασία, έτσι ώστε να απομακρυνθούν τα προσκολλημένα αντισώματα και να αναχθούν οι δισουλφιδικοί δεσμοί που ίσως έχουν σχηματιστεί. Οι ακόλουθες διαδικασίες εκτελούνται σε πολυστυρενικές πλάκες μικροτιτλοδότησης 96 φρεατίων. Για τον έλεγχο της δραστηριότητας των πεπτιδίων που είναι προσδεδεμένα σε ραβδία, χρησιμοποιούνται απομονωμένες ανοσοσφαιρίνες τάξης IgG αντί για ολικό ορό (α) για να μειωθεί η μη ειδική πρόσδεση που παρατηρείται με τη χρήση ολικού ορού και (β) για να αποφευχθεί πιθανή καταστροφή των πεπτιδίων από πρωτεάσες του ορού. Γίνεται κορεσμός των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης με διάλυμα κορεσμού (*supercocktail*, Διάλυμα 5), 200 μl/φρεάτιο, για 1h σε Θ.Δ. Αποχύνεται το διάλυμα κορεσμού και προστίθεται η κατάλληλη αραίωση του διαλύματος των ολικών IgG του ορού ή των ειδικών αντι-Tg αντισωμάτων (150 μl/φρεάτιο), το οποίο επωάζεται όλη τη νύκτα στους 4°C. Η αραίωση των IgG ή αντι-Tg γίνεται σε *supercocktail*. Σε προκαταρκτικά πειράματα βελτιστοποίησης, επιλέχθηκε η συγκέντρωση των 50 μg/ml IgG, επειδή στη συγκέντρωση αυτή μεγιστοποιούνται οι διαφορές ανάμεσα σε θετικά και αρνητικά φρεάτια. Τα απομονωμένα ειδικά αντι-Tg αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν σε συγκέντρωση 5 μg/ml. Ακολουθεί απόχυση και πλύσεις με 0.5% Tween-20 σε PBS (Διάλυμα 2). Στη συνέχεια, γίνεται επώαση για 1 h σε Θ.Δ. με αντισώματα έναντι ανθρώπινης IgG, συζευγμένα με υπεροξειδάση και αραιωμένα σε διάλυμα κορεσμού (175 μl/φρεάτιο). Ακολουθούν σχολαστικές πλύσεις με 0.5% Tween-20/PBS και PBS. Η πρόσδεση των αντισωμάτων ανιχνεύεται με κατάλληλο υπόστρωμα (150 μl/φρεάτιο). Το



υπόστρωμα που χρησιμοποιείται είναι H_2O_2 μαζί με θειική αζινο-δι-3-αιθυλοβενζοθειαζολίνη (ABTS): 50 mg ABTS διαλύονται σε 100 ml ρυθμιστικού διαλύματος ABTS (Διάλυμα 6) και προστίθεται διάλυμα 30% H_2O_2 σε αναλογία 0.3 μl/ml. Η φωτομέτρηση γίνεται στα 405 nm. Μετά το πέρας του πειράματος, τα ραβδία πλένονται με 0.5% Tween-20/PBS και H_2O , ενώ ακολουθεί αποκόλληση των αντισωμάτων, όπως περιγράφεται στην αρχή της παραγράφου. Για να εξακριβωθεί η πλήρης απομάκρυνση των αντισωμάτων, τα ραβδία επωάστηκαν με σύζευγμα αντισωμάτων έναντι ανθρώπινης IgG με υπεροξειδάση και ακολούθησε προσθήκη υποστρώματος και μέτρηση της απορρόφησης. Το διαχωριστικό όριο (cut-off) των θετικών προσδιορίστηκε για κάθε πεπτιδίο σαν η μέση τιμή των απορροφήσεων + 3 s.d. των υγιών μαρτύρων. Χρησιμοποιήθηκε ένα υψηλό διαχωριστικό όριο λόγω του σχετικά μικρού αριθμού των IgG που ελέγχθηκαν. Ο έλεγχος μεγαλύτερου αριθμού IgG δεν ήταν εφικτός εξαιτίας των περιορισμών της μεθόδου (φθορά των πεπτιδίων).

3.7.2 Μη ανταγωνιστική ELISA με προσροφημένο αντιγόνο

Η δοκιμασία ELISA πραγματοποιείται σε πλάκες μικροτιτλοδότησης Maxisorb (Nunc, Roskilde, Δανία) που φέρουν 96 φρεάτια σε διάταξη 8x12. Αρχικά οι πλάκες επιστρώνονται με το αντιγόνο. Για το σκοπό αυτό, η πρωτεΐνη ή το πεπτιδίο διαλύεται στην βέλτιστη συγκέντρωση, η οποία προκαθορίζεται με ειδική δοκιμασία βελτιστοποίησης (optimization). Στην περίπτωση των πρωτεϊνών Tg, AChE, G-ακτίνη, τουμπουλίνη, των συζευγμάτων T_3 - ή T_4 -RSA, καθώς και των πεπτιδίων TgP15, TgP26 και TgP41, η συγκέντρωση επίστρωσης ήταν 10 μg/ml σε 0.1 M *cbs* (Διάλυμα 3). Η TPO επιστρώθηκε σε συγκέντρωση 1 μg/ml σε 0.1 M *cbs*. Τα αντιγόνα BSA και μυοσίνη επιστρώνονται σε συγκέντρωση 4 μg/ml σε 0.1 M *cbs*. Η συγκέντρωση επίστρωσης του nDNA είναι 10 μg/ml σε TBS (Διάλυμα 7). Η F-ακτίνη επιστρώνεται σε συγκέντρωση 5 μg/ml, σε PBS που περιέχει 2 mM $MgCl_2$ και 120 μg/ml ATP. Τοποθετούνται 100 μl από το διάλυμα του αντιγόνου σε κάθε φρεάτιο. Ακολουθεί επώαση για 1 h στους 37°C και για μια νύκτα στους 4°C. Γίνεται απόχυση του διαλύματος επίστρωσης και πλύση με PBS. Ο κορεσμός των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης πραγματοποιείται με

προσθήκη κατάλληλου διαλύματος κορεσμού (150 μ l/φρεάτιο). Στην περίπτωση ορών από ασθενείς με αυτοάνοσες ασθένειες του θυρεοειδούς καθώς και ολικών IgG ή απομονωμένων ειδικών αντι-Tg αντισωμάτων από τους αυτοάνοσους ορούς, το διάλυμα κορεσμού είναι *PBS* που περιέχει 5% ορό βοδιού (BS). Στην περίπτωση αντιορών από ανοσοποιημένα κουνέλια ή απομονωμένων ειδικών αντισωμάτων από τους αντιορούς, το διάλυμα κορεσμού είναι 0.5% ζελατίνη σε *PBS*. Ο κορεσμός διαρκεί 45 min στους 37°C. Ακολουθεί πλύση με 0.1% Tween-20/*PBS* και προσθήκη 100 μ l/φρεάτιο της κατάλληλης αραιώσης του ορού ή του διαλύματος των ολικών IgG ή των απομονωμένων αντι-Tg αντισωμάτων. Στην περίπτωση αυτοάνοσων ορών καθώς και ολικών IgG ή απομονωμένων ειδικών αντι-Tg αντισωμάτων, η αραιώση γίνεται σε *PBS* που περιέχει 5%BS και 0.1% Tween-20 (*PBS*-BS-T). Στην περίπτωση αντιορών κουνελιού ή απομονωμένων ειδικών αντισωμάτων από τους αντιορούς, η αραιώση γίνεται σε *PBS* που περιέχει 0.5% ζελατίνη και 0.1% Tween-20 (*PBS*-G-T). Η επώαση των αυτοάνοσων ορών με τα πεπτίδια διαρκεί όλη τη νύχτα στους 4°C, ενώ σε όλες τις άλλες περιπτώσεις η επώαση στη φάση αυτή διαρκεί 90min στους 37°C. Μετά γίνονται πλύσεις με 0.1% Tween-20/*PBS*. Στη συνέχεια, 100 μ l/φρεάτιο του συζευγμένου με ένζυμο αντισώματος έναντι ανοσοσφαιρίνης επωάζονται για 1 h στους 37°C. Για την ανίχνευση των ανθρώπινων αντισωμάτων χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι ανθρώπινης IgG (γ -αλυσίδας) αραιωμένο σε *PBS*-BS-T, ενώ η ανίχνευση των αντισωμάτων κουνελιού πραγματοποιήθηκε με αντίσωμα έναντι ολικών ανοσοσφαιρινών κουνελιού αραιωμένο σε *PBS*-G-T. Και τα δύο αυτά αντισώματα ήταν συζευγμένα με αλκαλική φωσφατάση. Η αραιώση του συζεύγματος προκαθορίζεται με μια δοκιμασία βελτιστοποίησης (optimization assay). Ακολουθούν σχολαστικές πλύσεις με 0.1% Tween-20/*PBS* και *PBS*, προσθήκη του κατάλληλου υποστρώματος, που στην περίπτωση αυτή ήταν η φωσφορική π-νιτροφαινόλη (pNPP). Η pNPP διαλύεται σε υδατικό διάλυμα που περιέχει 0.1 M γλυκίνη, 1 mM MgCl₂, 1 mM ZnCl₂, pH 10.4, σε συγκέντρωση 1 mg/ml. Τοποθετείται ποσότητα 100 μ l/φρεάτιο. Η φωτομέτρηση γίνεται στα 405 nm σε φωτόμετρο ειδικό για μικροπλάκες ELISA, Dynatech MR5000.

Στην ELISA με τα προσροφημένα πεπτίδια για τον έλεγχο δραστηριότητας των αυτοάνοσων ορών, από τη μετρούμενη απορρόφηση αφαιρείται η απορρόφηση που προκύπτει από μη επιστρωμένα (κατεργασμένα μόνο με *cbs*) φρεάτια. Θετικοί θεωρούνται οι οροί με απορρόφηση πάνω από το διαχωριστικό όριο ($\text{cut-off} = \text{μέση τιμή των απορροφήσεων των υγιών μαρτύρων} + 2.5 \text{ s.d.}$). Το διαχωριστικό όριο στην περίπτωση αυτή, είναι χαμηλότερο από την περίπτωση του ελέγχου δραστηριότητας IgG έναντι πεπτιδίων συνδεδεμένων σε ραβδία (§3.7.1), λόγω του πολύ μεγαλύτερου αριθμού ορών που ελέγχθηκαν στα προσροφημένα πεπτίδια. Η δραστηριότητα των ορών εκφράστηκε σε μονάδες ELISA (διαχωριστικό όριο = 100 μονάδες).

3.7.3 Ανταγωνιστική ELISA

Ακολουθείται η ίδια διαδικασία με τη μη ανταγωνιστική ELISA, με τη διαφορά ότι ο ορός (στην αραίωση του 50% της μέγιστης πρόσδεσης) πριν επωαστεί με το επιστρωμένο αντιγόνο, επωάζεται με διαφορετικές συγκεντρώσεις του αναστολέα (8-50,000 pmol/ml για τα πεπτίδια και 0.32-1,000 pmol/ml για τις πρωτεΐνες), για 90 min στους 37°C. Το ποσοστό αναστολής υπολογίζεται από το λόγο της δραστηριότητας (οπτική απορρόφηση) παρουσία αναστολέα προς τη δραστηριότητα απουσία αναστολέα (100% της πρόσδεσης).

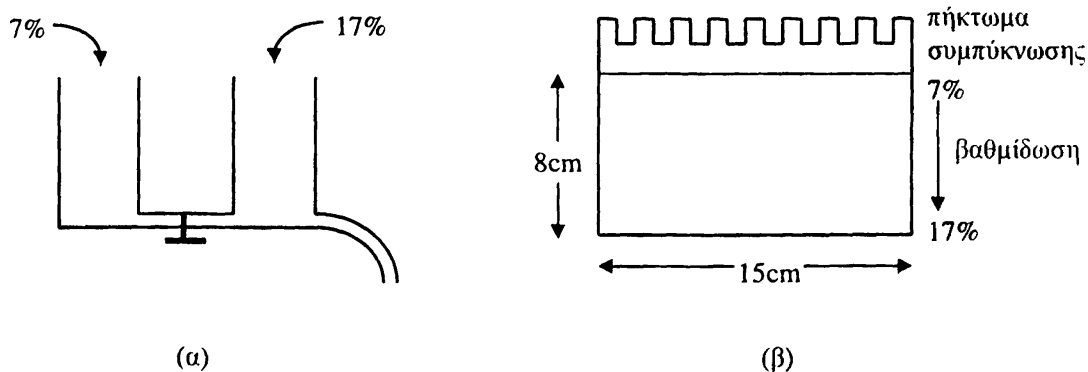
3.8 SDS-ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου

Το πήκτωμα

Στην παρούσα εργασία, για τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό πρωτεϊνών, χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου με διαβάθμιση συγκέντρωσης 7-17%.

Κατασκευάζονται ξεχωριστά τα διαλύματα 7% και 17%. Το διάλυμα 7% περιέχει 4.5 ml *Lower Tris* (Διάλυμα 8), 2.8 ml ακρυλαμιδίου/δισ-ακρυλαμιδίου (Διάλυμα 10), 4.4 ml απιονισμένο H₂O και 10 μl TEMED. Το διάλυμα 17% περιλαμβάνει 4.5 ml *Lower Tris*, 6.8 ml ακρυλαμιδίου/δισ-ακρυλαμιδίου, 1.2 g σακχαρόζης και 10 μl TEMED. Τα δύο διαλύματα τοποθετούνται στις δύο στήλες του βαθμιδοποιητή (Σχήμα 18α), έτσι ώστε, το διάλυμα 17% να

βρίσκεται προς την πλευρά της εξόδου. Πριν την έναρξη της ανάμιξης των διαλυμάτων προστίθενται στο καθένα 25 μl διαλύματος υπερθειικού αμμωνίου 10% (w/v) για να αρχίσει η αντίδραση πολυμερισμού. Το διάλυμα, από την έξοδο της συσκευής ρέει σε καλούπι, ώστε να σχηματιστεί πήκτωμα μήκους 15 cm, ύψους 8 cm και πάχους 2 mm. Πάνω από το πήκτωμα αυτό, που ονομάζεται πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel), προστίθεται το πήκτωμα συμπύκνωσης των πρωτεϊνών (stacking gel), το οποίο συμβάλλει στην ελάττωση της έκτασης του δείγματος των πρωτεϊνών που θα υποστούν ηλεκτροφόρηση. Αυτό περιέχει 2.5 ml *Upper Tris* (Διάλυμα 9), 1.5 ml ακρυλαμιδίου/δισ-ακρυλαμιδίου (Διάλυμα 10), 6.4 ml H₂O, 20μl TEMED και 120 μl διαλύματος υπερθειικού αμμωνίου 10% (w/v). Το πήκτωμα συμπύκνωσης φέρει εσοχές, που δημιουργούνται με τη χρήση ειδικού χάρακα με προεξοχές ίδιου πάχους με το πήκτωμα, στις οποίες τοποθετούνται τα δείγματα (Σχήμα 18β).



Σχήμα 18. (α) Ο βαθμιδοποιητής και (β) το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου για την ηλεκτροφόρηση.

Επεξεργασία των δειγμάτων - ηλεκτροφόρηση - χρώση

Τέσσερις όγκοι δείγματος πρωτεΐνης και ένας όγκος ρυθμιστικού διαλύματος δείγματος (*sample buffer*, Διάλυμα 11) 5x, αναμιγνύονται (τελικός όγκος μέχρι 80 μl) και θερμαίνονται στους 100°C για 5 min. Πριν από την ηλεκτροφόρηση το πήκτωμα τοποθετείται κατακόρυφο σε συσκευή ηλεκτροφόρησης, έτσι ώστε η πάνω και η κάτω πλευρά του να βρίσκονται σε επαφή με διάλυμα που αποτελείται από 100 ml ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης (Διάλυμα 12), 8ml διαλύματος SDS 10% (w/v) και

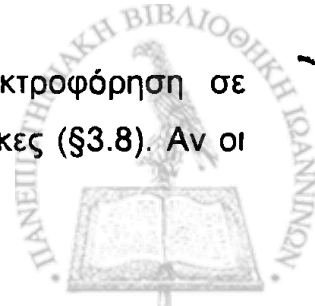
απιονισμένο H₂O μέχρι τα 800 ml. Στη συνέχεια, τα δείγματα τοποθετούνται στο πήκτωμα και εκτελείται ηλεκτροφόρηση με διέλευση ρεύματος εντάσεως 20 mA, κατά τη διαδρομή στο πήκτωμα συμπύκνωσης και 40 mA, για το πήκτωμα διαχωρισμού των πρωτεϊνών. Η χρώση του πηκτώματος πραγματοποιείται σε διάλυμα χρώσης (Διάλυμα 13) για 1-2 h σε Θ.Δ. και μετά από διαδοχικές πλύσεις με το διάλυμα αποχρωματισμού (Διάλυμα 14) παραμένουν χρωματισμένες μόνο οι πρωτεϊνικές ζώνες.

3.9 Απομόνωση ολικών ανοσοσφαιρινών τάξης IgG από ορό

Η απομόνωση των ολικών ανοσοσφαιρινών τάξης IgG από ανθρώπινο ορό γίνεται με χρωματογραφία συγγένειας σε στήλη Sepharose - πρωτεΐνης G (spG) (Pharmacia, Uppsala, Σουηδία). Η πρωτεΐνη G παρουσιάζει υψηλή συγγένεια για όλες τις υποτάξεις των ανθρώπινων ανοσοσφαιρινών τάξης IgG.

Ο ορός διηθείται με φίλτρο Millipore 0.45 μm και αραιώνεται στο διπλάσιο όγκο με PBS. Η στήλη spG, με όγκο πηκτώματος 5 ml, πλένεται διαδοχικά με 0.1 N HCl-γλυκίνη, pH 2.2 και PBS. Ο ορός διέρχεται από τη στήλη με ρυθμό περίπου 1 ml/3 min σε Θ.Δ. Ακολουθεί διέλευση PBS από τη στήλη, μέχρι να μηδενιστεί η οπτική πυκνότητα (απορρόφηση, OD) στα 280 nm του υγρού που εξέρχεται από τη στήλη (έκπλυση), γεγονός το οποίο υποδηλώνει απουσία πρωτεϊνών. Η "αποκόλληση" των δεσμευμένων IgG-πραγματοποιείται με διέλευση διαλύματος 0.1 N HCl-γλυκίνης, pH 2.2 στους 4°C. Συλλέγονται κλάσματα των 2 ml τα οποία εξουδετερώνονται άμεσα με την προσθήκη μικρής ποσότητας διαλύματος 2 M Tris. Τα κλάσματα που περιέχουν ανοσοσφαιρίνες εντοπίζονται με φωτομέτρηση στα 280 nm, συμπυκνώνονται και υφίστανται διαπίδυση (dialysis) έναντι PBS όλη τη νύκτα στους 4°C. Φυλάγονται στους -20°C, αφού προστεθεί ίσος όγκος γλυκερόλης. Η γλυκερόλη χρησιμοποιείται επειδή δεν παγώνει στη θερμοκρασία αυτή, έτσι ώστε να αποφεύγεται η ψύξη-απόψυξη, ενώ ταυτόχρονα το υψηλό ιξώδες της ευνοεί τη σταθερότητα των πρωτεϊνών.

Η καθαρότητα των IgG διαπιστώνεται με SDS-ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 7-17%, υπό αναγωγικές συνθήκες (§3.8). Αν οι



IgG είναι καθαρές, τότε η εικόνα της ηλεκτροφόρησης παρουσιάζει δύο ζώνες, μία που αντιστοιχεί στις βαριές αλυσίδες των ανοσοσφαιρινών (50 kDa) και μία που αντιστοιχεί στις ελαφριές αλυσίδες (25 kDa).

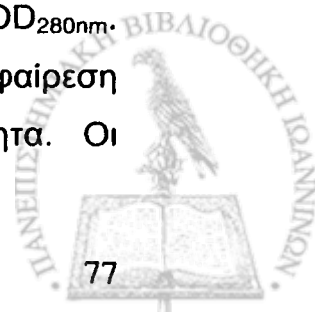
Η συγκέντρωση των IgG υπολογίζεται με φωτομέτρηση στα 280 nm: Ένα μικρό δείγμα αραιώνεται σε PBS (π.χ. 1:50) και η OD στα 280 nm διαιρείται με το συντελεστή απόσβεσης (extinction coefficient), που για τις IgG είναι 1.36. Πολλαπλασιάζοντας, στη συνέχεια, με το συντελεστή αραιώσης ($\times 50$) ανευρίσκεται η συγκέντρωση IgG στο εξεταζόμενο δείγμα σε mg/ml.

3.10 Παρασκευή ανοσοπροσροφητών

3.10.1 Παρασκευή ανοσοπροσροφητή με θυρεοσφαιρίνη

Για την παρασκευή του ανοσοπροσροφητή, απομονωμένη ανθρώπινη Tg (υψηλού βαθμού καθαρότητας) προσδένεται ομοιοπολικά, μέσω γλουταραλδεϋδης, σε σφαιρίδια πολυακρυλαμιδίου-αγαρόζης. Η διαδικασία πρόσδεσης περιγράφεται παρακάτω.

Σφαιρίδια πολυακρυλαμιδίου-αγαρόζης Ultrogel AcA-22 (IBF biotechnics, Villeneuve-la-Garenne, Γαλλία) πλένονται διαδοχικά με απιονισμένο H_2O , 1M NaCl και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0.1 M, pH 7.4. Προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος γλουταραλδεϋδης 25% και το pH ρυθμίζεται στο 7.6 με 10 N KOH. Το μίγμα επωάζεται για 20 h στους $37^\circ C$ υπό ανάδευση. Ακολουθούν σχολαστικές πλύσεις με H_2O και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0.1 M, pH 7.6. Στα ενεργοποιημένα με γλουταραλδεϋδη σφαιρίδια προστίθεται ίσος όγκος ρυθμιστικού διαλύματος βορικού $0.05 M/KH_2PO_4$, pH 8.4 (Διάλυμα 15), που περιέχει την Tg σε συγκέντρωση 5mg/ml και επωάζεται όλη τη νύκτα σε Θ.Δ. υπό ανάδευση. Στη συνέχεια, τα σφαιρίδια πλένονται με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0.1 M, pH 7.6 και προσδιορίζεται η ποσότητα της Tg που δεν προσδέθηκε, με φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 280 nm. Ο συντελεστής απόσβεσης για την Tg είναι 1, οπότε η συγκέντρωση της Tg σε mg/ml ισούται αριθμητικά με την τιμή της OD_{280nm} . Η ποσότητα της Tg που προσδέθηκε στα σφαιρίδια υπολογίζεται με αφαίρεση της ποσότητας που δεν προσδέθηκε από την αρχική ποσότητα. Οι



αλδεϋδομάδες της γλουταραλδεϋδης που παρέμειναν ελεύθερες αδρανοποιούνται με 0.1 M λυσίνη σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0.1 M, pH 7.6, για 2 h σε Θ.Δ. υπό ανάδευση. Ακολουθεί πλύση του ανοσοπροσροφητή με *PBS* και αποθήκευση στους 4°C σε *PBS* που περιέχει 0.02% NaN₃ ως βακτηριοστατικό.

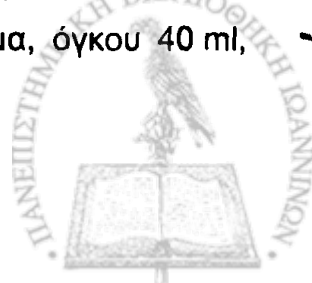
3.10.2 Παρασκευή ανοσοπροσροφητή με το πεπτίδιο TgP41

Για την παρασκευή ανοσοπροσροφητή TgP41, το πεπτίδιο (§3.5) συνδέεται ομοιοπολικά σε ενεργοποιημένα με CNBr σφαιρίδια Sepharose 4B (Pharmacia, Uppsala, Σουηδία). Περίπου 1g ξηρού πηκτώματος ενυδατώνεται επί 15 min σε 1 mM HCl. Ακολουθεί έκπλυση με 200 ml 1 mM HCl και 5 ml ρυθμιστικού διαλύματος σύζευξης (Διάλυμα 16), μέσα σε πορώδη ηθμό. Αμέσως το πήκτωμα μεταφέρεται σε 5ml ρυθμιστικού διαλύματος σύζευξης που περιέχει 10 mg πεπτιδίου. Επωάζεται 2 h σε Θ.Δ. και όλο το βράδυ στους 4°C υπό ανάδευση. Ακολουθούν εκπλύσεις με ρυθμιστικό διάλυμα σύζευξης. Οι ενεργές ομάδες των σφαιριδίων που ενδεχομένως δεν αντέδρασαν δεσμεύονται με 0.1 M Tris-HCl, pH 8 (2 h, Θ.Δ. υπό ανάδευση). Στη συνέχεια τα σφαιρίδια πλένονται με 0.1 M ρυθμιστικό διάλυμα οξικού, 0.5 M NaCl (Διάλυμα 17) και ρυθμιστικό διάλυμα σύζευξης, εναλλάξ τέσσερις φορές. Ο ανοσοπροσροφητής φυλάγεται στους 4°C σε *PBS* που περιέχει 0.02% NaN₃ ως βακτηριοστατικό, μέχρι να χρησιμοποιηθεί.~

3.11 Απομόνωση ειδικών αντισωμάτων

3.11.1 Απομόνωση ανθρώπινων αντισωμάτων τάξης IgG έναντι θυρεοσφαιρίνης

Η απομόνωση αντισωμάτων έναντι Tg εκτελείται σε στήλη ανοσοπροσροφητή που αποτελείται από σφαιρίδια πολυακρυλαμιδίου-αγαρόζης Ultrogel AcA-22 τα οποία φέρουν ανθρώπινη Tg προσδεσμένη ομοιοπολικά μέσω γλουταραλδεϋδης (§3.10.1). Το πήκτωμα, όγκου 40 ml, φέρει συνολικά 180 mg Tg.



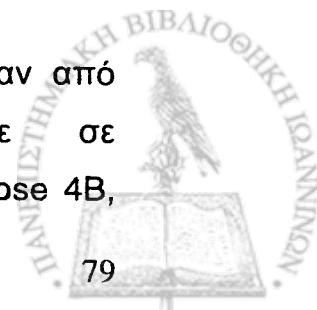
Τα σφαιρίδια πλένονται διαδοχικά με 0.2 N HCl-γλυκίνη, pH 2.2 (στους 4°C), 1 M K₂HPO₄ (4°C) και PBS (Θ.Δ.), ώστε να αναγεννηθούν. Το διάλυμα των ανοσοσφαιρινών τάξης IgG σε PBS (§3.9) εισέρχεται στη στήλη και παραμένει σε Θ.Δ., υπό περιοδική ανάδευση, για 90 min. Ακολουθεί πλύση της στήλης με PBS μέχρι να μηδενιστεί η OD_{280nm} στην έξοδο της στήλης. Τα δεσμευμένα στην Tg αντισώματα εκλούονται με διέλευση 0.2 N HCl-γλυκίνη, pH 2.2, στους 4°C. Συλλέγονται κλάσματα των 2 ml, τα οποία εξουδετερώνονται με κατάλληλη ποσότητα διαλύματος 2 M Tris. Η παρουσία αντισωμάτων στα κλάσματα ελέγχεται με φωτομέτρηση στα 280 nm. Τα κλάσματα που περιέχουν ανοσοσφαιρίνες συμπυκνώνονται και υφίστανται διαπίδυση έναντι PBS στους 4°C. Η συγκέντρωση υπολογίζεται με τη μέθοδο Bradford (Protein Assay, Bio-Rad Laboratories GmbH, Munchen, Germany). Η τεχνική στηρίζεται στην παρατήρηση ότι το μέγιστο απορρόφησης ενός όξινου διαλύματος της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 μετατοπίζεται από τα 465 nm στα 595 nm, όταν αυτή δεσμεύεται σε πρωτεΐνες (253). Τα αντι-Tg αντισώματα φυλάγονται στους -20°C, αφού προστεθεί ίσος όγκος γλυκερόλης, ώστε να αποφεύγεται η ψύξη-απόψυξη του δείγματος και να σταθεροποιούνται τα αντισώματα.

3.11.2 Απομόνωση αντισωμάτων κουνελιού έναντι της θυρεοσφαιρίνης

Η διαδικασία απομόνωσης είναι όμοια με αυτήν που περιγράφεται στην §3.11.1, με τη διαφορά ότι χρησιμοποιείται ορός αντί για διάλυμα IgG, ο οποίος διαπερνά τη στήλη με ροή 1 ml/3 min. Στον αντιορό προστίθεται 1 μl διαλύματος PMSF 100 mM ανά ml ορού. Το PMSF είναι αναστολέας πρωτεασών και χρησιμοποιείται για να μην καταστραφεί το αντιγόνο του ανοσοπρόσροφητή από πρωτεάσες του ορού.

3.11.3 Απομόνωση αντισωμάτων κουνελιού έναντι του πεπτιδίου TgP41

Ειδικά αντισώματα έναντι του πεπτιδίου TgP41 απομονώθηκαν από αντιορούς κουνελιών. Η απομόνωση πραγματοποιήθηκε σε ανοσοπρόσροφητή από ενεργοποιημένα με CNBr σφαιρίδια Sepharose 4B,



τα οποία φέρουν ομοιοπολικά προσδεδεμένο το TgP41 (§3.10.2). Το πήκτωμα έχει όγκο 2 ml και φέρει συνολικά 10 mg TgP41.

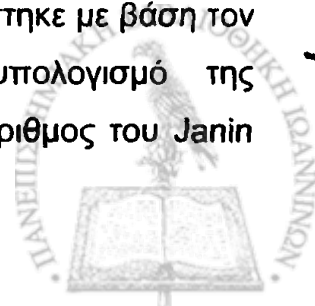
Η διαδικασία απομόνωσης έχει ως εξής: Τα σφαιρίδια πλένονται διαδοχικά με 0.2 N HCl-γλυκίνη, pH 2.2 (στους 4°C), 1 M K₂HPO₄ (4°C) και PBS (Θ.Δ.), ώστε να αναγεννηθούν. Ο διαχωρισμός του πηκτώματος από το διάλυμα γίνεται με φυγοκέντρηση. Δύο ml ορού, στον οποίο προστίθεται 1 μl/ml PMSF 100 mM, αναδεύεται σε σωληνάριο που περιέχει τον ανοσοπροσροφητή επί 2 h σε Θ.Δ. Ακολουθούν διαδοχικές εκπλύσεις με PBS μέχρι να μηδενιστεί η OD_{280nm}. Τα προσδεδεμένα αντισώματα εκλούονται με 0.2 N HCl-γλυκίνη, pH 2.2, υπό ανάδευση επί 10 min, στους 4°C. Το διάλυμα των αντισωμάτων εξουδετερώνεται με 1 M K₂HPO₄, ενώ ακολουθεί συμπύκνωση και διαπίδυση έναντι PBS στους 4°C. Τα αντι-TgP41 αντισώματα φυλάγονται στους -20°C, αφού προστεθεί ίσος όγκος γλυκερόλης.

3.12 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Τα ποσοστά των ορών από τις δύο ομάδες ασθενών (GD και HT) που ήταν θετικοί έναντι των τριών πεπτιδίων της Tg (TgP15, TgP26 και TgP41), συγκρίθηκαν μεταξύ τους, καθώς και με το αντίστοιχο ποσοστό των ορών υγιών μαρτύρων με δοκιμασία ομοιογένειας χ^2 . Η ίδια δοκιμασία χρησιμοποιήθηκε για να συγκριθούν οι δύο υποομάδες ασθενών με GD (με οφθαλμοπάθεια και χωρίς οφθαλμοπάθεια). Τα αποτελέσματα θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικά για $p < 0.05$.

3.13 Μελέτη δομικών παραμέτρων των πεπτιδίων

Για τη μελέτη δομικών παραμέτρων των πρωτεϊνών Tg και AChE, χρησιμοποιήθηκαν οι αλγόριθμοι που διατίθενται στην ιστοσελίδα ExPaSy (Expert Protein Analysis System: www.expasy.ch) του Swiss Institute of Bioinformatics. Η υδροφοβικότητα (hydrophobicity) υπολογίστηκε με βάση τον αλγόριθμο των Kyte & Doolittle (54). Για τον υπολογισμό της προσβασιμότητας (% accessible) χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος του Janin



(254), ενώ για τη μέση ευκαμψία (average flexibility) χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος των Bhaskaran & Ponpuswamy (255). Η πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής (α-έλικα, β-στροφή και β-πτυχωτή επιφάνεια) έγινε με βάση τον αλγόριθμο των Deleage & Roux (256). Σε όλους τους υπολογισμούς χρησιμοποιήθηκε παράθυρο εννέα αμινοξέων, ενώ η σχετική βαρύτητα των άκρων του παραθύρου σε σχέση με το μέσον ήταν 100%. Η βαθμολόγηση του κάθε αμινοξέος για τον υπολογισμό των παραπάνω δομικών παραμέτρων παρουσιάζεται στον επόμενο πίνακα (Πίνακας II).

Πίνακας II. Βαθμολόγηση του κάθε αμινοξέος για τον υπολογισμό των διαφόρων δομικών παραμέτρων σύμφωνα με τους αλγόριθμους που χρησιμοποιήθηκαν.

Αμινοξύ	Υδροφοβικότητα	% προσβασιμότητα	Μέση ευκαμψία	α-έλικα	β-στροφή	β-πτυχωμένη επιφάνεια
Ala	1.800	6.6	0.36	1.489	0.788	0.709
Arg	-4.500	4.5	0.53	1.224	0.912	0.920
Asn	-3.500	6.7	0.46	0.772	1.572	0.604
Asp	-3.500	7.7	0.51	0.924	1.197	0.541
Cys	2.500	0.9	0.35	0.966	0.965	1.191
Gln	-3.500	5.2	0.49	1.164	0.997	0.840
Glu	-3.500	5.7	0.50	1.504	1.149	0.567
Gly	-0.400	6.7	0.54	0.510	1.860	0.657
His	-3.200	2.5	0.32	1.003	0.970	0.863
Ile	4.500	2.8	0.46	1.003	0.240	1.799
Leu	3.800	4.8	0.37	1.236	0.670	1.261
Lys	-3.900	10.3	0.47	1.172	1.302	0.721
Met	1.900	1.0	0.30	1.363	0.436	1.210
Phe	2.800	2.4	0.31	1.195	0.624	1.393
Pro	-1.600	4.8	0.51	0.492	1.415	0.354
Ser	-0.800	9.4	0.51	0.739	1.316	0.928
Thr	-0.700	7.0	0.44	0.785	0.739	1.221
Trp	-0.900	1.4	0.31	1.090	0.546	1.306
Tyr	-1.300	5.1	0.42	0.787	0.795	1.266
Val	4.200	4.5	0.39	0.990	0.387	1.965

Η απεικόνιση της τρισδιάστατης δομής της AChE έγινε με το πρόγραμμα RasWin v 2.6, από τις συντεταγμένες των ατόμων που έδωσαν οι Raves και συν. (257).

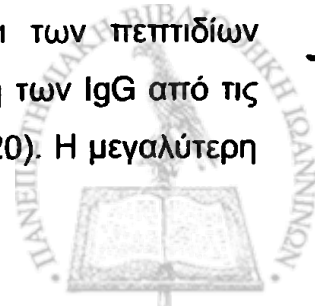
4. Αποτελέσματα

4.1 Μελέτη επιτόπων της θυρεοσφαιρίνης που αναγνωρίζονται από αυτοαντισώματα στις αυτοάνοσες ασθένειες του θυρεοειδούς

4.1.1 Χαρτογράφηση αυτοεπιτόπων στην ομόλογη με την AChE περιοχή της Tg

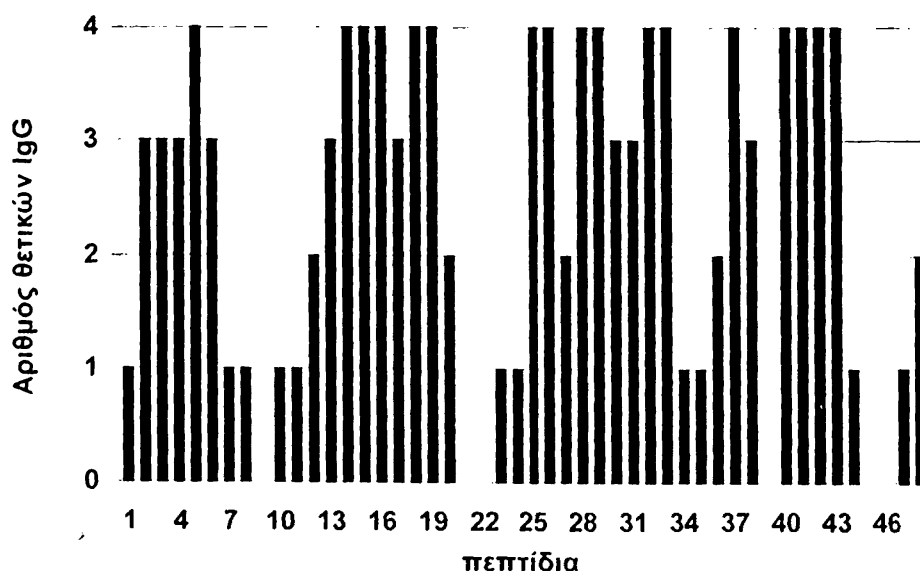
Με βάση την αμινοξική αλληλουχία της ανθρώπινης Tg (23), παρασκευάστηκαν πάνω σε ραβδία, σαράντα οκτώ 20-μερή πεπτίδια επικαλυπτόμενα μεταξύ τους κατά οκτώ αμινοξέα. Τα πεπτίδια συντέθηκαν σε δύο αντίγραφα το καθένα και κάλυπταν την περιοχή 2171-2748 της ανθρώπινης Tg, η οποία εμφανίζει 28% ομολογία με την AChE. Ολικές ανοσοσφαιρίνες τάξης IgG απομονώθηκαν από τέσσερις ορούς ασθενών με GD, οι οποίοι ήταν δι-δραστικοί έναντι ανθρώπινης Tg και AChE από *Electrophorus electricus*, όπως διαπιστώθηκε με ELISA. Απομονώθηκαν επίσης οι ολικές IgG από τρεις ορούς υγιών ατόμων για να χρησιμοποιηθούν ως μάρτυρες. Η δραστικότητα των επτά δειγμάτων ανοσοσφαιρινών ελέγχθηκε έναντι των πεπτιδίων με ELISA, σε συγκέντρωση 50 µg/ml. Δεκαεπτά από τα 48 πεπτίδια αναγνωρίστηκαν και από τα τέσσερα παρασκευάσματα IgG των ασθενών με GD, εννέα πεπτίδια αναγνωρίστηκαν από τρία παρασκευάσματα IgG, άλλα εννέα αναγνωρίστηκαν από δύο και 11 από τα πεπτίδια αναγνωρίστηκαν μόνο από μία IgG (Σχήμα 19). Τέλος, έξι από τα πεπτίδια που ελέγχθηκαν δεν αναγνωρίστηκαν από καμία IgG. Από τη μελέτη αυτή δεν έγινε εμφανής η παρουσία κάποιας ανοσοκυρίαρχης περιοχής, αφού τα πεπτίδια που αναγνωρίστηκαν από υψηλό ποσοστό των IgG εντοπίστηκαν διασκορπισμένα σε όλη την έκταση του υπό εξέταση τμήματος της Tg.

Για να διαπιστωθεί ποιά από τα πεπτίδια περιλαμβάνουν επίτοπους που αναγνωρίζονται και πάνω στη φυσική Tg, τα ειδικά αντι-Tg αντισώματα απομακρύνθηκαν από το ολικό IgG κλάσμα δύο ασθενών με GD, με ανοσοπροσρόφηση σε στήλη ανθρώπινης Tg. Η έναντι των πεπτιδίων δραστικότητα των ολικών IgG συγκρίθηκε με την αντίστοιχη των IgG από τις οποίες είχαν απομακρυνθεί τα αντι-Tg αντισώματα (Σχήμα 20). Η μεγαλύτερη



μείωση της δραστικότητας μετά την αφαίρεση των αντι-Tg αντισωμάτων, που παρατηρήθηκε και στους δύο ασθενείς, αντιστοιχούσε στα πεπτίδια TgP15, TgP26 και TgP41 (Πίνακας III, Σχήμα 22). Τα πεπτίδια αυτά αποτελούν τους πιθανότερους γραμμικούς στόχους αυτοαντισωμάτων στην υπό εξέταση περιοχή της Tg.

Το εύρημα αυτό με τις ολικές IgG του ορού επιβεβαιώθηκε και με τη μελέτη των ειδικών αντι-Tg αντισωμάτων. Η ποσότητα των ειδικών αντισωμάτων του ορού, που απομονώνονται μετά από ανοσοπροσρόφηση, είναι περιορισμένη και δεν επιτρέπει τον έλεγχο της δραστικότητάς τους έναντι όλων των συνθετικών πεπτιδίων. Για το λόγο αυτό ελέγχθηκε η δραστικότητά τους (σε συγκέντρωση 5 $\mu\text{g/ml}$) έναντι πέντε επιλεγμένων πεπτιδίων: των TgP15, TgP26 και TgP41, για τα οποία αναμενόταν υψηλή δραστικότητα και των TgP21 και TgP44, για τα οποία αναμενόταν χαμηλή δραστικότητα, με βάση το προηγούμενο πείραμα (Σχήμα 20). Όπως φαίνεται στο Σχήμα 21, επιβεβαιώνεται η έναντι των πεπτιδίων δραστικότητα.

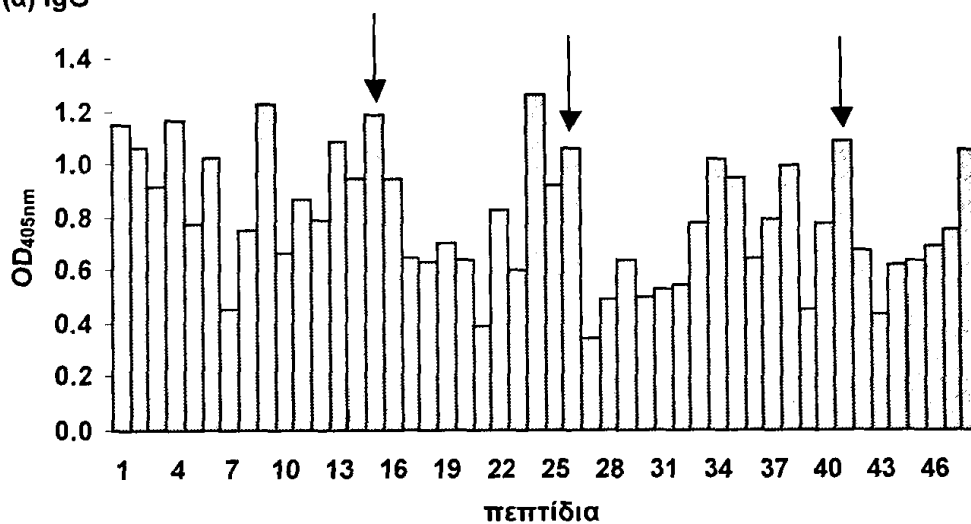


Σχήμα 19. Αριθμός θετικών δειγμάτων IgG από ασθενείς με GD, για καθένα από τα 48 ομοιοπολικά προσδεδεμένα σε ραβδία πεπτίδια. Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε σε συγκέντρωση IgG 50 $\mu\text{g/ml}$. Το διαχωριστικό όριο (cut-off) των θετικών προσδιορίστηκε για κάθε πεπτίδιο σαν η μέση τιμή της OD + 3 s.d. των IgG από τους τρεις υγιείς μάρτυρες.

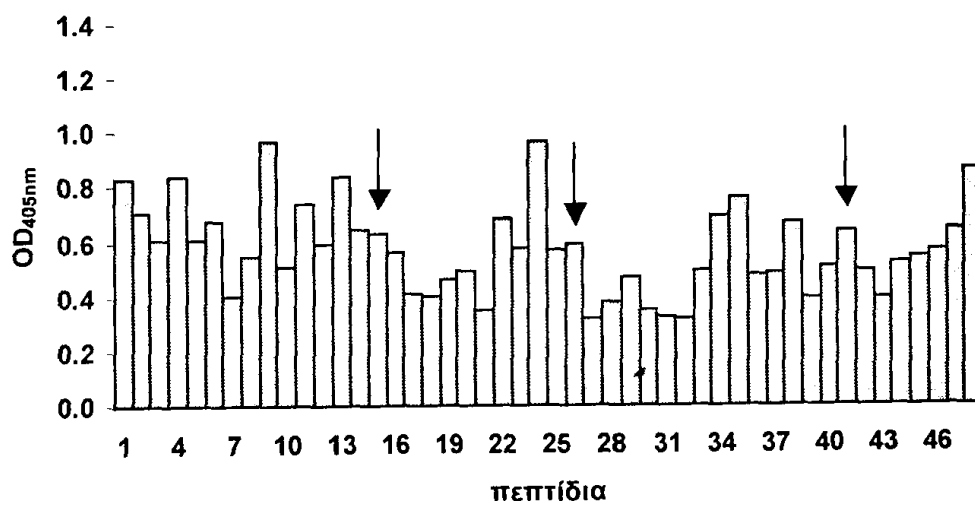
➤ Δεκαεπτά από τα 48 πεπτίδια αναγνωρίστηκαν και από τις τέσσερις IgG των ασθενών με GD. Τα πεπτίδια αυτά είναι διασκορπισμένα σε όλο το μήκος του υπό εξέταση τμήματος της Tg.

Ασθενής 1

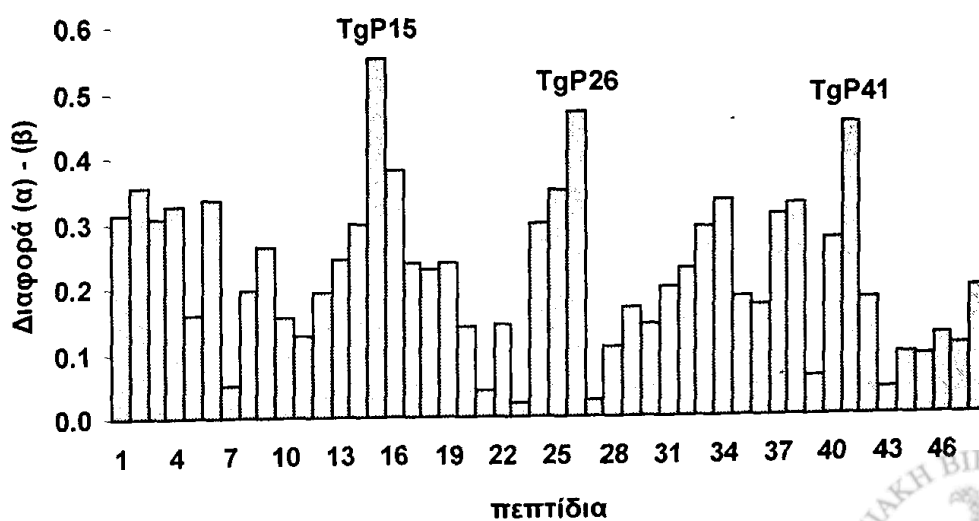
(α) IgG



(β) IgG χωρίς αντι-Tg



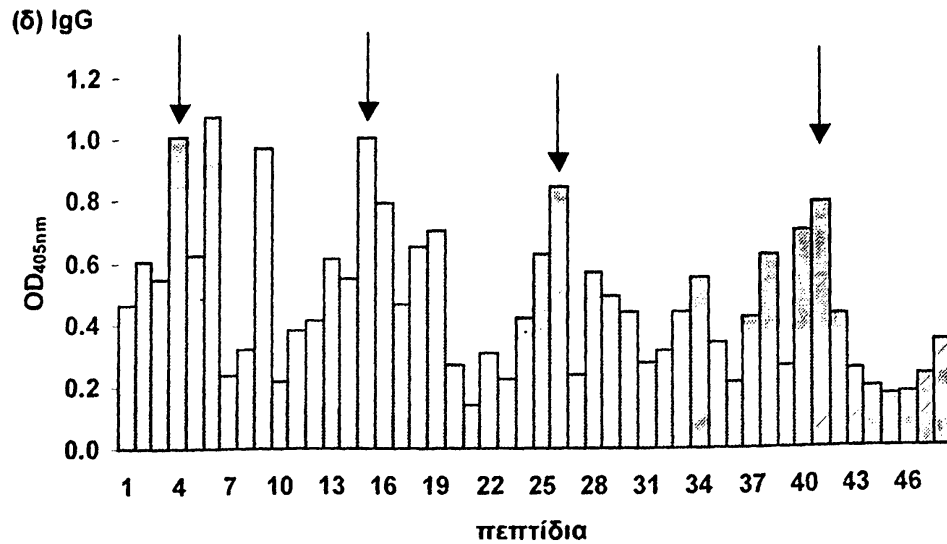
(γ) Διαφορά (α) - (β)



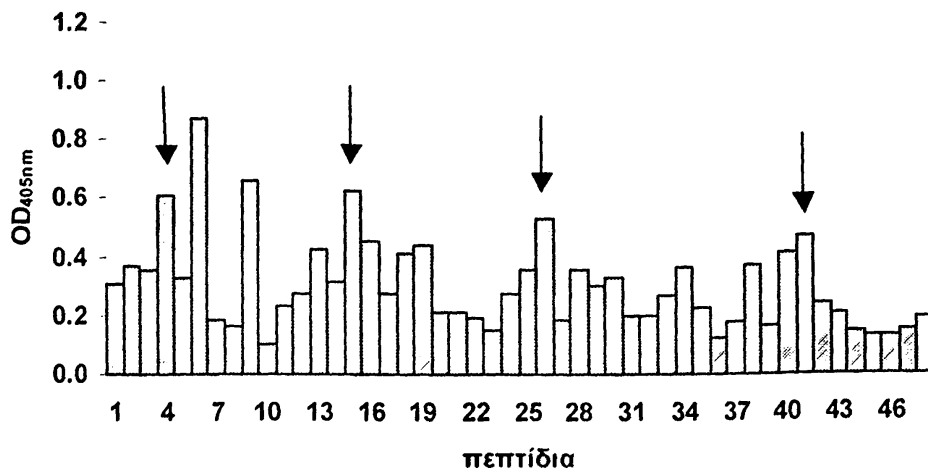
Σχήμα 20. Συνεχίζεται.



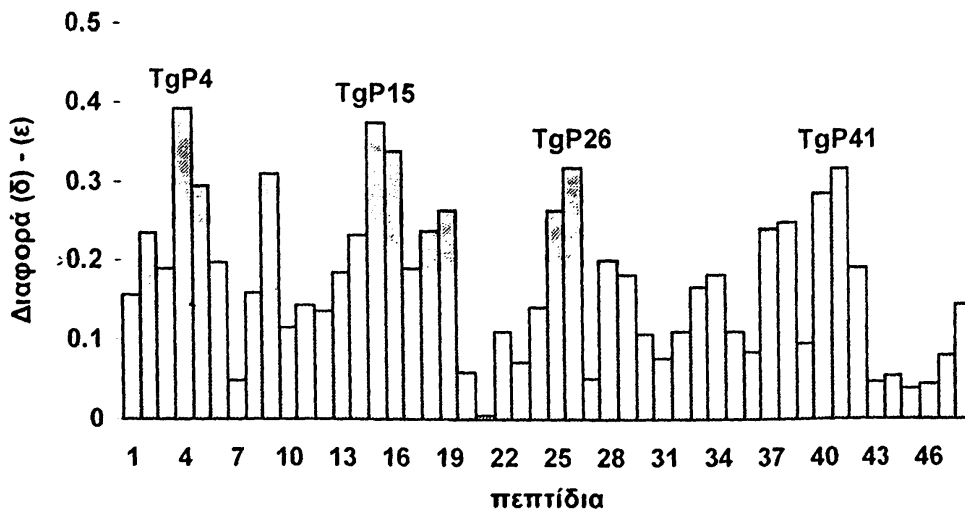
Ασθενής 2



(ε) IgG χωρίς αντι-Tg



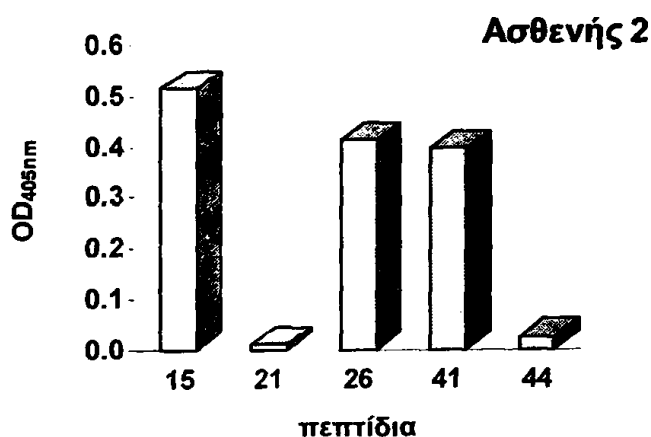
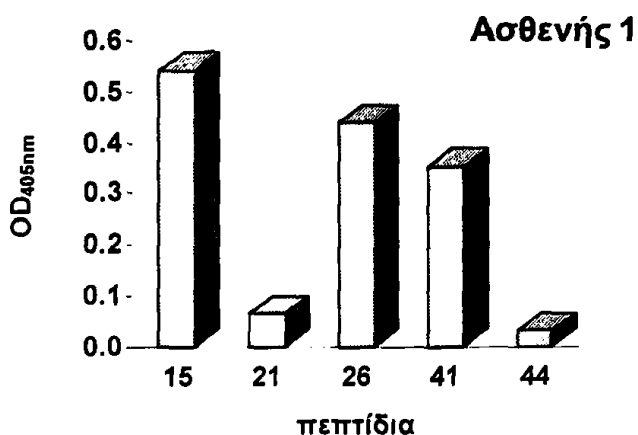
(στ) Διαφορά (γ) - (δ)



Σχήμα 20. (α), (δ) Δραστικότητα των IgG από δύο ασθενείς με GD (1 και 2) έναντι των πεπτιδίων της Tg. Απεικονίζεται η μετρούμενη οπτική απορρόφηση (OD) για τα διάφορα πεπτιδίδια. (β), (ε) Δραστικότητα των IgG μετά την αφαίρεση των αντι-Tg αντισωμάτων από το παρασκεύασμα. γ, στ) Διαφορές στην OD πριν και μετά την αφαίρεση των αντι-Tg

αντισωμάτων από τις ολικές IgG για τους δύο ασθενείς. Η έναντι των πεπτιδίων δραστηριότητα των IgG, πριν και μετά την αφαίρεση των ειδικών αντισωμάτων, ελέγχθηκε με ELISA σε συγκέντρωση 50 µg/ml.

➤ Η μεγαλύτερη μείωση της δραστηριότητας μετά την αφαίρεση των αντι-Tg αντισωμάτων, που παρατηρήθηκε και στους δύο ασθενείς, αντιστοιχούσε στα πεπτίδια TgP15, TgP26 και TgP41.



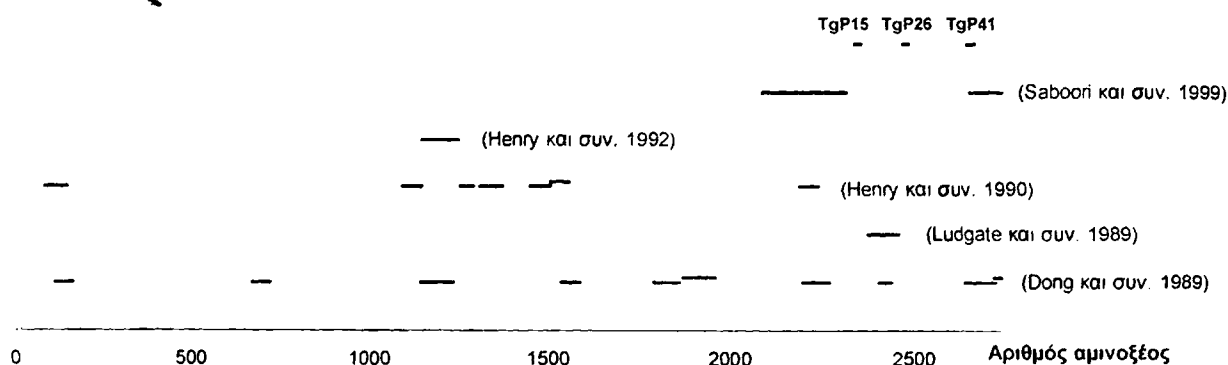
Σχήμα 21. Επιβεβαίωση δραστηριότητας των απομονωμένων αντι-Tg αντισωμάτων από δύο ασθενείς με GD (σε συγκέντρωση 5 µg/ml) έναντι πέντε συνθετικών πεπτιδίων της ανθρώπινης Tg: των TgP15, TgP26 και TgP41, για τα οποία αναμένεται υψηλή δραστηριότητα και των TgP21 και TgP44, για τα οποία αναμένεται χαμηλή δραστηριότητα, με βάση το (Σχήμα 20). Απεικονίζεται η μετρούμενη οπτική απορρόφηση (OD) για τα επιλεγμένα πεπτίδια.

➤ Για τα πεπτίδια TgP15, TgP26 και TgP41 η δραστηριότητα, είναι υψηλή ενώ για τα TgP21 και TgP44 η δραστηριότητα είναι χαμηλή.

Πίνακας III. Περιοχές της ανθρώπινης Tg και αλληλουχίες αμινοξέων που αντιστοιχούν στα πεπτίδια TgP15, TgP26 και TgP41

Πεπτίδιο	Περιοχή της ανθρώπινης Tg	Αλληλουχία αμινοξέων
TgP15	2339-2358	QVAALTWVQTHIRGFGGDPR
TgP26	2471-2490	PPARALKRSLWVEVDLLIGS
TgP41	2651-2670	PYEFSRKVPTFATPWPDFVP

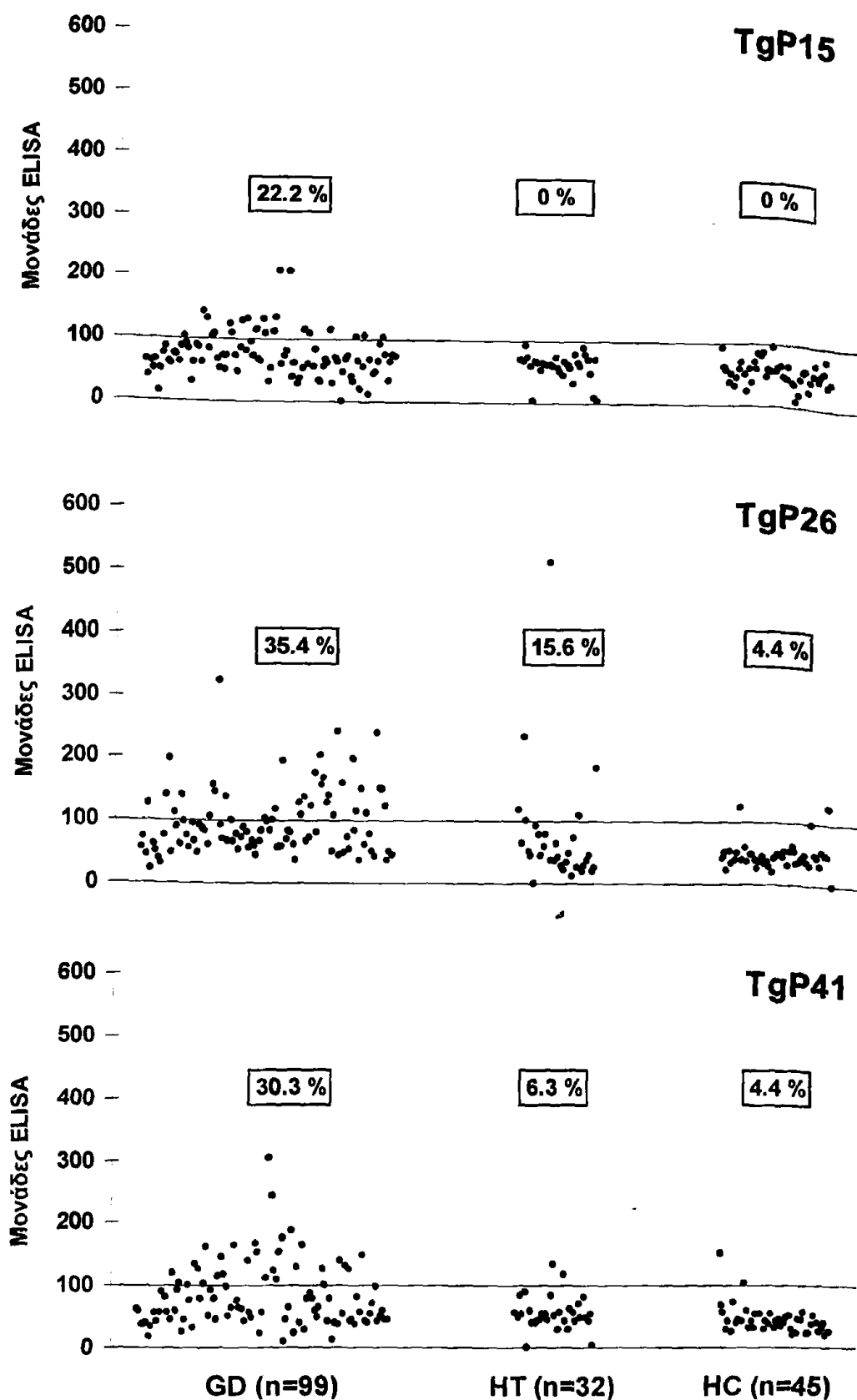
Επίτοποι ανψωμάτων έναντι της Tg



Σχήμα 22. Σχηματική αναπαράσταση των πεπτιδίων TgP15, TgP26 και TgP41 σε σύγκριση με άλλα πεπτίδια της Tg που έχει βρεθεί μέχρι σήμερα ότι περιέχουν ορολογικούς επιτόπους: Dong και συν. 1989 (213), Ludgate και συν. 1989 (178), Henry και συν. 1990 (215), Henry και συν. 1992 (216), Saboori και συν. 1999 (217). Βλ. και Σχήμα 10, §2.4.3.

4.1.2 Σύνθεση των πεπτιδίων TgP15, TgP26 και TgP41 και έλεγχος της δραστηριότητας των ορών από ασθενείς με αυτοάνοσες ασθένειες του θυρεοειδούς έναντι των αυτών

Τα πεπτίδια TgP15, TgP26 και TgP41 συντέθηκαν με τη μέθοδο της στερεάς φάσης και απομονώθηκαν στην ελεύθερη μορφή τους ώστε να χρησιμοποιηθούν σε ELISA για τον έλεγχο της δραστηριότητας μεγάλου αριθμού ορών (99 GD, 32 HT και 45 υγιείς μάρτυρες) (Σχήμα 23).



Σχήμα 23. Κατανομή της δραστηριότητας έναντι των TgP15, TgP26 και TgP41, των ορών από τις τρεις ομάδες που ελέγχθηκαν: νόσος Graves (GD), θυρεοειδίτιδα Hashimoto (HT) και υγιείς μάρτυρες (HC). Το διαχωριστικό όριο (cut-off) υπολογίστηκε ως μέσος όρος των τιμών OD + 2.5 s.d., για τους ορούς των υγιών μαρτύρων και δηλώνεται με την οριζόντια γραμμή. Η δραστηριότητα των ορών εκφράζεται σε μονάδες ELISA (διαχωριστικό όριο = 100 μονάδες).

➤ Συγκρίνοντας τα ποσοστά θετικών ορών για τα τρία πεπτιδία στις τρεις ομάδες, βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην GD.

Από τους 99 ορούς ασθενών με GD που ελέγχθηκαν, οι 22 ήταν θετικοί με το πεπτίδιο TgP15 (22.2%), 35 με το TgP26 (35.4%) και 30 με το TgP41 (30.3%). Από τους 32 ορούς ασθενών με HT κανένας δεν ήταν θετικός με το πεπτίδιο TgP15 (0%), πέντε οροί ήταν θετικοί με το TgP26 (15.6%) και μόνο δύο με το TgP41 (6.3%). Κανένας από τους 45 ορούς αναφοράς δεν ήταν θετικός με το πεπτίδιο TgP15 (0%), ενώ θετικοί ήταν δύο οροί υγιών μαρτύρων για το πεπτίδιο TgP26 και δύο για το TgP41 (4.4%) (Πίνακας IV). Τα ποσοστά θετικών ορών για τη GD είναι στατιστικά σημαντικά σε σχέση με τη HT και με τους υγιείς μάρτυρες. Αντίθετα, η σύγκριση των ασθενών με HT με τους υγιείς δεν δείχνει στατιστικά σημαντική διαφορά. Συνολικά, 56.6% των ορών από ασθενείς με GD ήταν θετικοί για ένα τουλάχιστον από τα τρία πεπτίδια, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό για τους ασθενείς με HT είναι 21.9% και για τους υγιείς μάρτυρες 8.9%. Αυτό το ποσοστό για την ομάδα των ασθενών με GD είναι στατιστικά σημαντικό, τόσο σε σχέση με την ομάδα των ασθενών με HT ($p<0.001$), όσο και σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες ($p<0.001$). Αντίθετα, το ποσοστό που αντιστοιχεί στους ασθενείς με HT δεν είναι στατιστικά σημαντικό σε σύγκριση με το ποσοστό των υγιών μαρτύρων.

Πίνακας IV. Ποσοστό θετικών ορών για τα πεπτίδια, από τις ομάδες GD, HT και υγιών μαρτύρων (HC)

Πεπτίδιο	Αμινοξική αλληλουχία	GD (n=99) %	HT (n=32) %	HC (n=45) %	p^* GD-HT	p GD-YM	p HT-YM
TgP15	2339-2358	22.2	0	0	<0.005	<0.001	ΜΣ
TgP26	2471-2490	35.4	15.6	4.4	<0.05	<0.001	ΜΣ
TgP41	2651-2670	30.3	6.3	4.4	<0.01	<0.001	ΜΣ
Ένα τουλάχιστον από τα τρία		56.6	21.9	8.9	<0.001	<0.001	ΜΣ

*Στατιστική σύγκριση ανάμεσα στις ομάδες GD, HT και YM. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με τη δοκιμασία χ^2 .

ΜΣ: Στατιστικά μη σημαντικές διαφορές.

4.1.3 Συσχέτιση της δραστικότητας έναντι των πεπτιδίων με τη θυρεοειδική οφθαλμοπάθεια

Από τους ασθενείς με GD, οι 37 παρουσίαζαν θυρεοειδική οφθαλμοπάθεια (TED) ενώ οι 55 δεν είχαν σημεία εμφανούς οφθαλμοπάθειας. Όταν τα στοιχεία για τη δραστικότητα των ορών έναντι των πεπτιδίων εξετάστηκαν σε σχέση με την παρουσία TED, βρέθηκε ότι 17 από τους 37 ορούς ασθενών GD που παρουσίαζαν και TED (48.6%) αντιδρούσαν με το TgP26, ενώ μόνο 14 από τους 55 ορούς ασθενών GD χωρίς TED (25.5%) αντιδρούσαν με το πεπτίδιο αυτό (Πίνακας V). Η διαφορά αυτή είναι στατιστικά σημαντική ($p < 0.05$) και φανερώνει συσχέτιση ανάμεσα στη δραστικότητα έναντι του TgP26 και στην παρουσία TED. Η δραστικότητα έναντι των TgP15 και TgP41 δεν συνδέεται με την TED (Πίνακας V).

Πίνακας V. Ποσοστό θετικών ορών για τα πεπτίδια, από τους ασθενείς GD, με ή χωρίς θυρεοειδική οφθαλμοπάθεια (TED).

Πεπτίδιο	Αμινοξική αλληλουχία	GD με TED (n=37)	GD χωρίς TED (n=55)	p^*
TgP15	2339-2358	16.2	23.6	MΣ
TgP26	2471-2490	48.6	25.5	<0.05
TgP41	2651-2670	21.6	36.4	MΣ

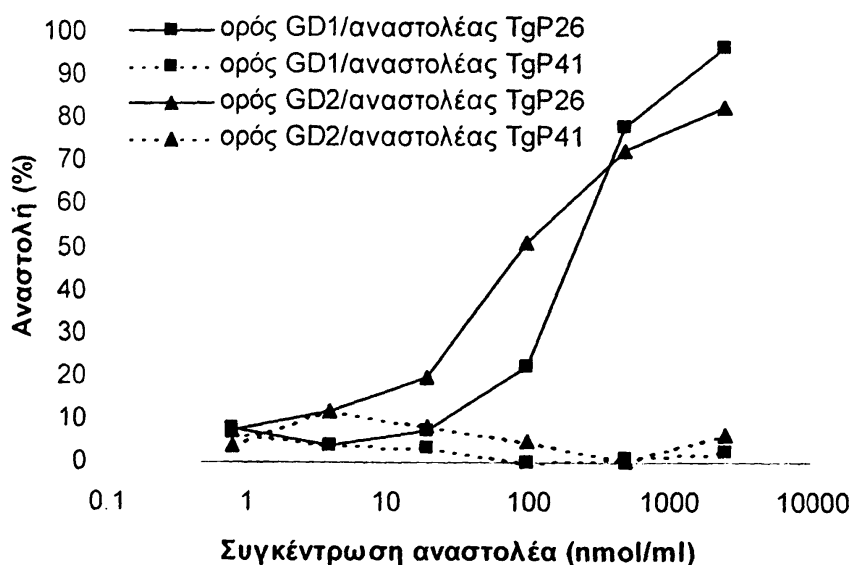
* Υπολογίστηκαν με τη δοκιμασία χ^2 . MΣ: Στατιστικά μη σημαντικές διαφορές.

4.1.4 Αναστολή της αντι-TgP26 δραστικότητας από διαλυτό TgP26

Για να επιβεβαιωθεί ότι η παρατηρούμενη δραστικότητα των ορών έναντι του πεπτιδίου TgP26 οφείλεται σε αναγνώριση του πεπτιδίου από ειδικά αντισώματα και όχι σε μη ειδική πρόσδεση, πραγματοποιήθηκε ανταγωνιστική ELISA. Η δραστικότητα των ορών δύο ασθενών με GD έναντι ακινητοποιημένου πεπτιδίου TgP26, παρεμποδίστηκε από το αυτόλογο διαλυτό πεπτίδιο (50% αναστολή προκαλούν περίπου 100 nmol πεπτιδίου/ml), όχι όμως και από ετερόλογο πεπτίδιο (TgP41) (Σχήμα 24).

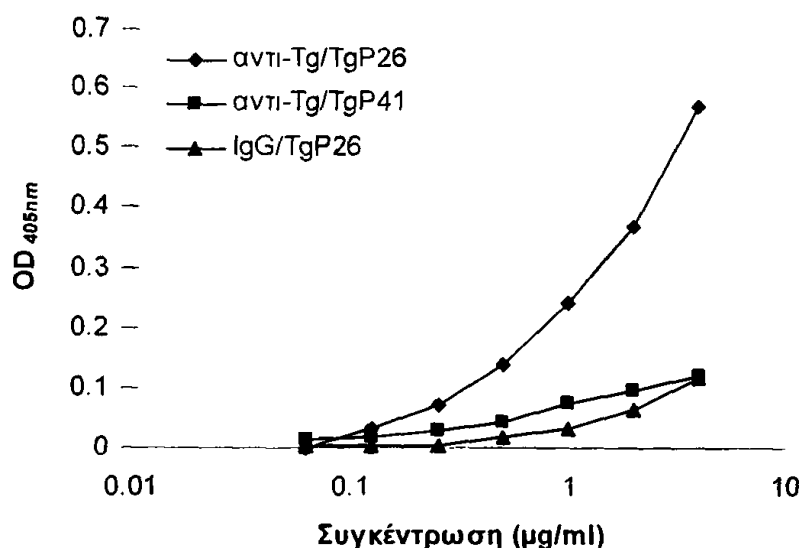
4.1.5 Αύξηση της δραστηριότητας έναντι TgP26 μετά την απομόνωση των ειδικών αντι-Tg αντισωμάτων

Τα ειδικά αντι-Tg αντισώματα απομονώθηκαν με ανοσοπροσρόφηση (σε στήλη Tg) από το ολικό IgG κλάσμα του ορού ασθενούς με GD, ο οποίος εμφάνιζε δραστηριότητα έναντι του TgP26, όχι όμως έναντι του TgP41. Η δραστηριότητα των απομονωμένων αντισωμάτων ελέγχθηκε με ELISA έναντι του ακινητοποιημένου πεπτιδίου TgP26 και συγκρίθηκε με την αντίστοιχη δραστηριότητα του ολικού IgG κλάσματος, στις ίδιες συγκεντρώσεις. Τα απομονωμένα αντι-Tg αντισώματα παρουσίασαν αυξημένη δραστηριότητα έναντι του πεπτιδίου TgP26, σε σύγκριση με το ολικό IgG κλάσμα, ενώ δεν αντέδρασαν με το πεπτίδιο TgP41 (Σχήμα 25). Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνει ότι το πεπτίδιο TgP26 περιέχει επίτοπο των αντι-Tg αντισωμάτων.



Σχήμα 24. Δοκιμασία αναστολής της πρόσδεσης δύο GD ορών (GD1 και GD2) σε ακινητοποιημένο TgP26, από το αυτόλογο και από ένα ετερόλογο (TgP41) διαλυτό πεπτίδιο. Στο σχήμα απεικονίζεται το ποσοστό αναστολής συναρτήσει της συγκέντρωσης του αναστολέα.

➤ Η δραστηριότητα των ορών παρεμποδίστηκε από το αυτόλογο πεπτίδιο. Το πεπτιδιο-μάρτυρας (TgP41) δεν προκαλεί αναστολή.

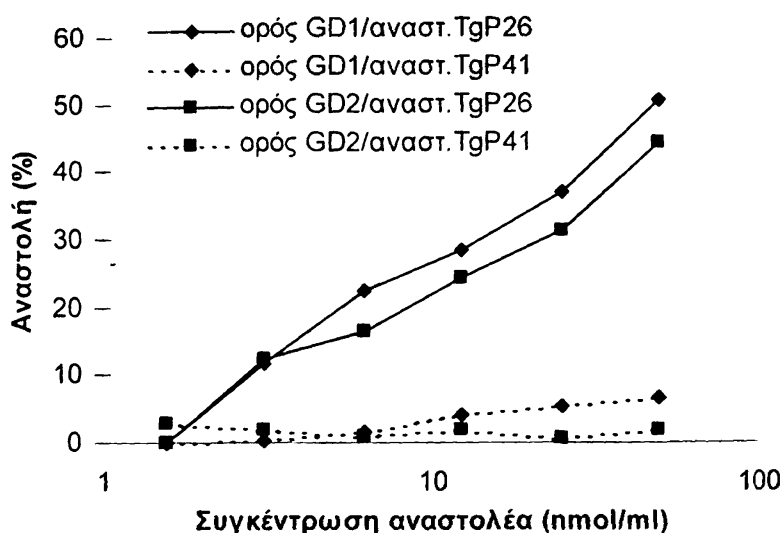


Σχήμα 25. Σύγκριση της δραστικότητας των απομονωμένων αντι-Tg αντισωμάτων και των ολικών IgG, από τον ορό ενός ασθενούς με GD, έναντι του πεπτιδίου TgP26 (αντι-Tg/TgP26 και IgG/TgP26, αντίστοιχα). Απεικονίζεται επίσης η δραστικότητα των αντι-Tg αντισωμάτων έναντι του πεπτιδίου TgP41 (αντι-Tg/TgP41). Ο συγκεκριμένος ορός αντιδρούσε με το TgP26 αλλά όχι με το TgP41. Στο σχήμα παρουσιάζεται η OD συναρτήσει της συγκέντρωσης αντισωμάτων ή IgG.

➤ Η απομόνωση των αντι-Tg αντισωμάτων ενισχύει τη δραστικότητα έναντι του πεπτιδίου TgP26, σε σύγκριση με το ολικό IgG κλάσμα.

4.1.6 Αναστολή της δραστικότητας ορών έναντι ακινητοποιημένης AChE από διαλυτό πεπτίδιο TgP26

Στη συνέχεια ελέγχθηκε κατά πόσον το πεπτίδιο TgP26 περιλαμβάνει επίτοπο της Tg που είναι κοινός με την AChE. Αν συμβαίνει αυτό, τότε η δραστικότητα των ορών έναντι AChE θα μπορεί, υπό ορισμένες προϋποθέσεις, να ανασταλεί από διαλυτό πεπτίδιο TgP26. Επιλέχθηκαν δέκα οροί ασθενών με GD, οι οποίοι ήταν δραστικοί έναντι του πεπτιδίου TgP26, και ελέγχθηκε η αναστολή της πρόσδεσής τους σε ακινητοποιημένη AChE (από *Electrophorus electricus*) από διαλυτό πεπτίδιο TgP26. Δύο από τους ορούς αυτούς έδειξαν αναστολή μέχρι και 45-50% (Σχήμα 26), ενώ οι άλλοι οκτώ δεν παρουσίασαν αναστολή μέχρι τη συγκέντρωση πεπτιδίου 50nmol/ml. Σαν μάρτυρας, ελέγχθηκε η αναστολή πρόσδεσης από διαλυτό πεπτίδιο TgP41. Η δραστικότητα έναντι της AChE δεν αναστάλη από το TgP41 για κανέναν από τους ορούς.



Σχήμα 26. Αναστολή πρόσδεσης σε ακινητοποιημένη AChE από διαλυτό πεπτιδίιο TgP26, για δύο ορούς ασθενών με GD που ήταν δραστικοί για το πεπτιδίιο TgP26. Στο σχήμα απεικονίζεται το ποσοστό αναστολής συναρτήσει της συγκέντρωσης του αναστολέα.

➤ Το ποσοστό αναστολής από το TgP26 φτάνει το 45-50%. Το πεπτιδίιο-μάρτυρας TgP41 δεν προκαλεί αναστολή.

4.1.7 Δομική μελέτη των πεπτιδίων TgP15, TgP26 και TgP41

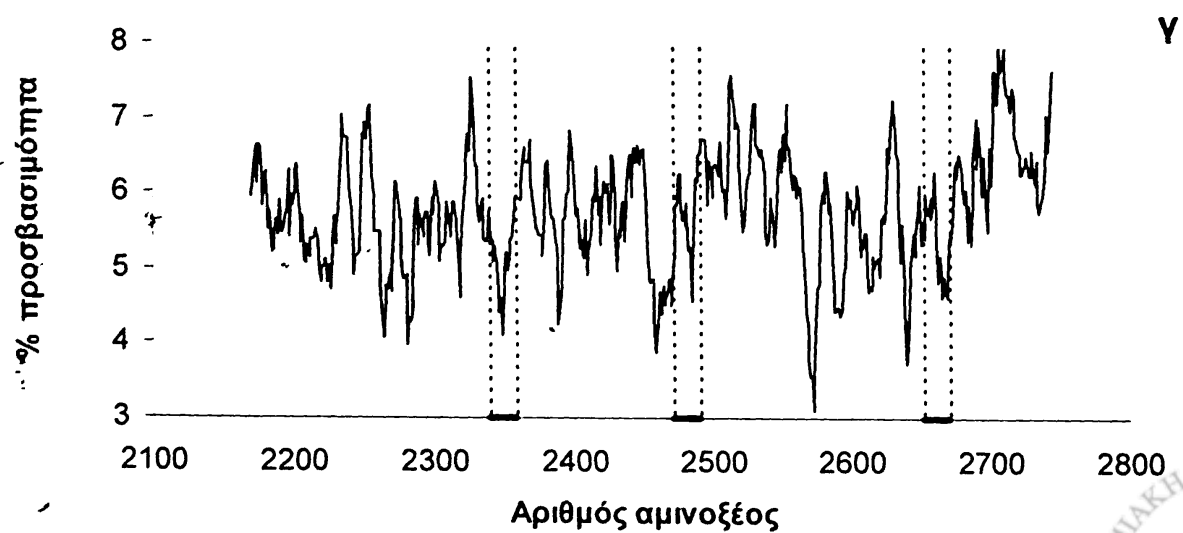
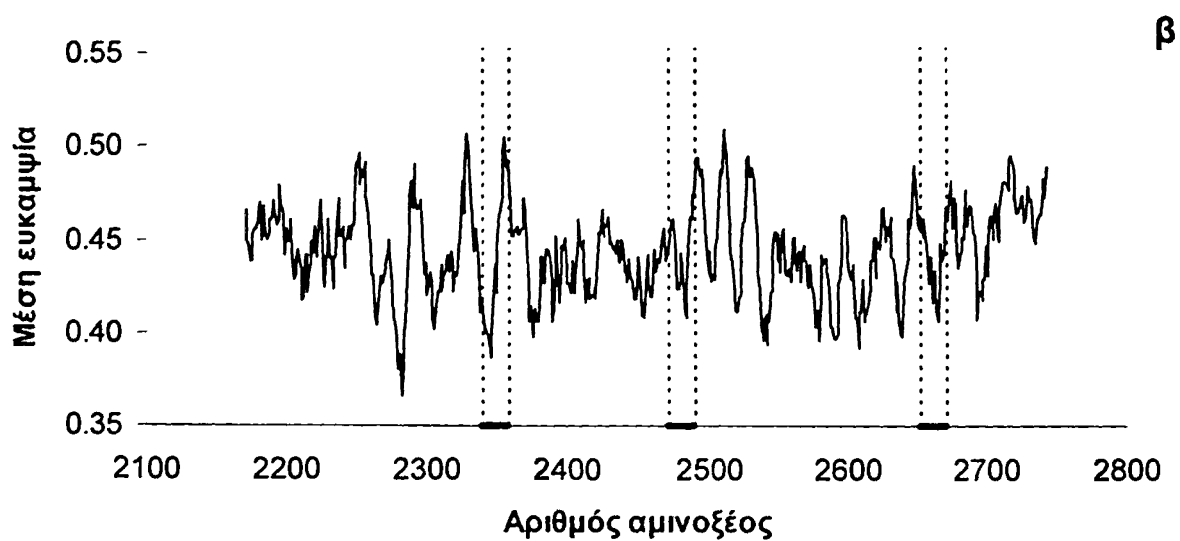
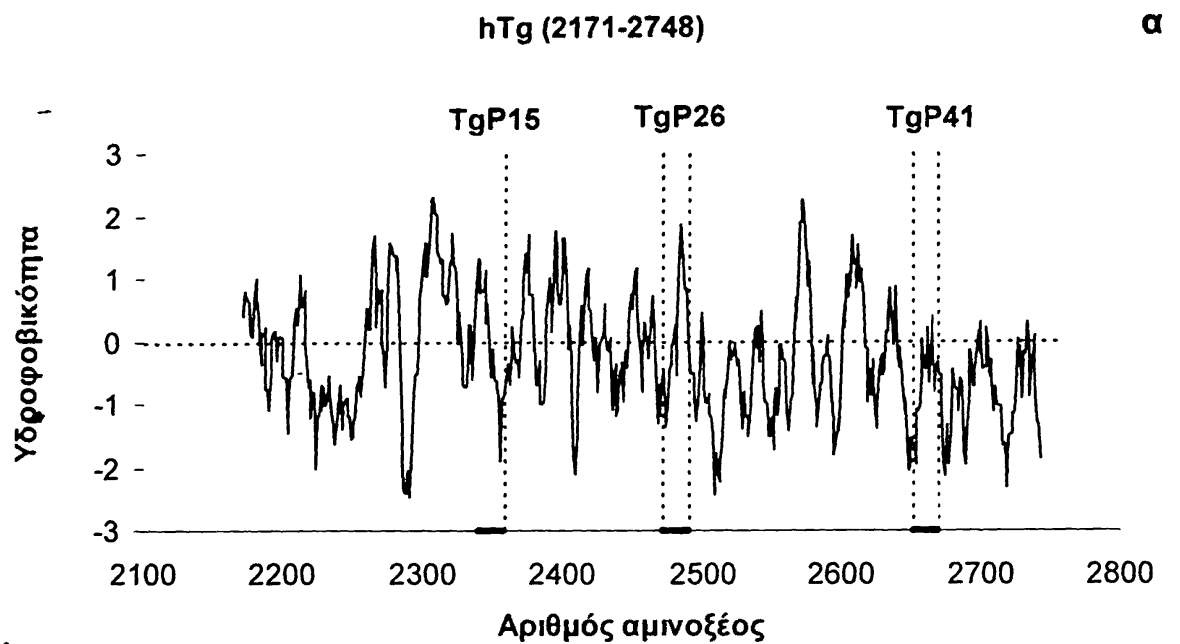
Για την κατανόηση της δομής των πεπτιδίων, τα οποία διαπιστώθηκε ότι περιλαμβάνουν επίτοπους χαρακτηριστικούς για την GD, πραγματοποιήθηκε υπολογισμός του προφίλ της υδροφοβικότητας, της μέσης ευκαμψίας και της προσβασιμότητας των αμινοξέων της καρβοξυ-τελικής περιοχής της Tg. Επίσης έγινε πρόβλεψη χαρακτηριστικών της δευτεροταγούς δομής (α-έλικα, β-στροφή και β-πτυχωτή επιφάνεια) της περιοχής αυτής της Tg (Σχήμα 27).

Για το πεπτιδίιο TgP15, παρατηρούμε ότι η αμινο-τελική περιοχή του περιλαμβάνει ένα υδρόφοβο τμήμα, μικρής ευκαμψίας. Αντίθετα, στο καρβοξυ-τελικό τμήμα του, γίνεται υδρόφιλο και εύκαμπτο. Η προσβασιμότητα του πεπτιδίου αυτού είναι χαμηλή στη μέση και μέτρια στα άκρα του. Όσον αφορά την πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής, το αμινο-τελικό τμήμα του πεπτιδίου πιθανόν να αποτελείται από α-έλικα, χωρίς να αποκλείεται και η δομή β-πτυχωτής επιφάνειας. Το καρβοξυ-τελικό τμήμα του πεπτιδίου είναι πολύ πιθανό να σχηματίζει β-στροφή. Με βάση τα παραπάνω, ο επίτοπος που περιλαμβάνεται στο TgP15 είναι αρκετά πιθανό να βρίσκεται

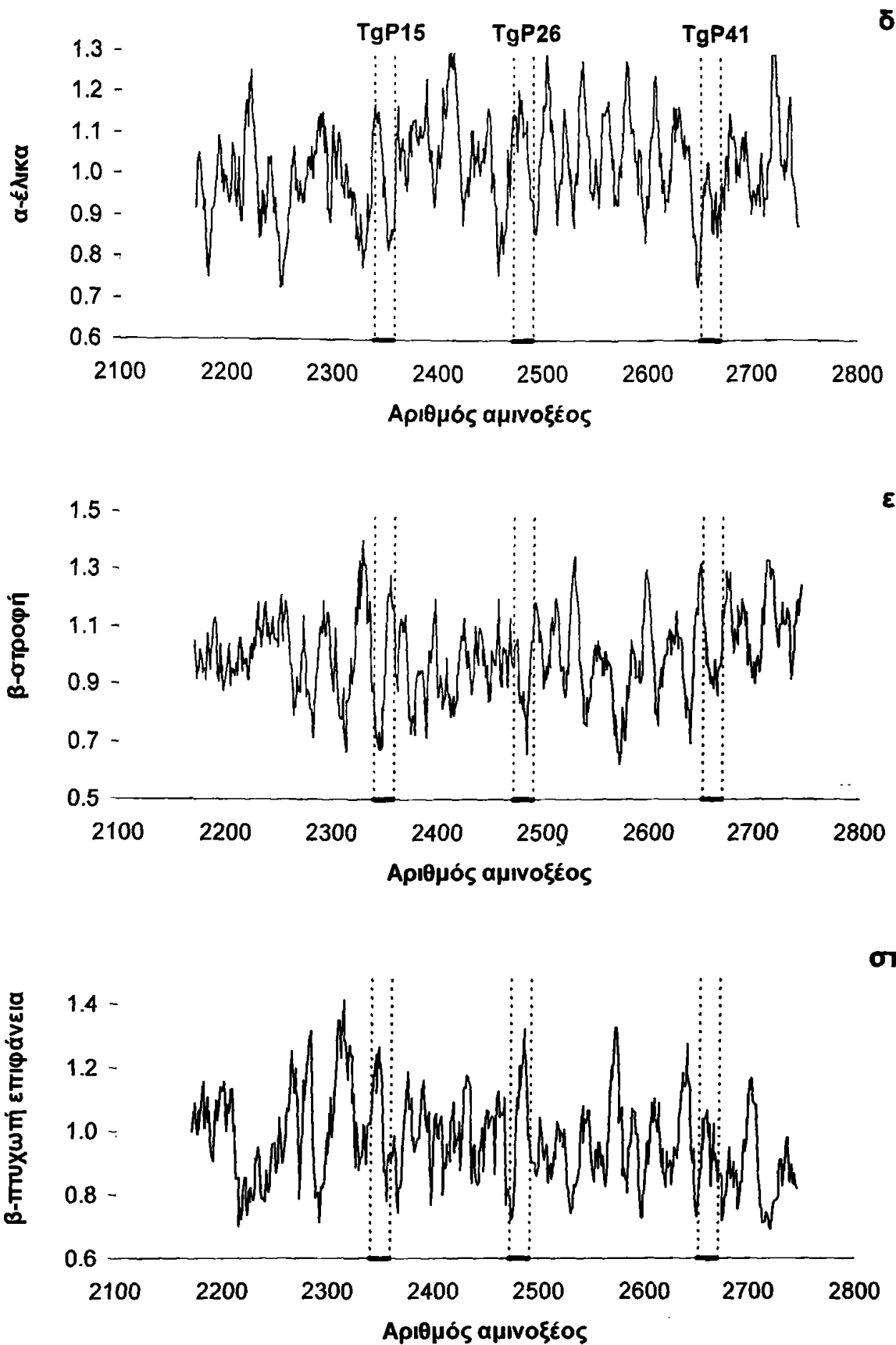
στο καρβοξυ-τελικό τμήμα του (β-στροφή, υψηλή υδροφιλικότητα και ευκαμψία).

Το πεπτίδιο TgP26 περιέχει ένα υδρόφιλο αμινο-τελικό τμήμα, με μέτρια ευκαμψία και προσβασιμότητα και μια υδρόφοβη καρβοξυ-τελική περιοχή, με σχετικά μειωμένη ευκαμψία και μικρή προσβασιμότητα (Σχήμα 27). Το αμινο-τελικό τμήμα του έχει σημαντική πιθανότητα να αποτελείται από α-έλικα, ενώ η καρβοξυ-τελική περιοχή φαίνεται πιθανότερο να σχηματίζει β-πτυχωτή επιφάνεια. Το πεπτίδιο αυτό, όπως διαπιστώθηκε (§4.1.6), περιλαμβάνει κοινό επίτοπο μεταξύ της Tg και της AChE. Όταν ολόκληρη η αλληλουχία της AChE, στοιχιστεί με την καρβοξυ-τελική περιοχή της Tg, τότε το πεπτίδιο TgP26 αντιστοιχεί στην περιοχή 313-332 της ανθρώπινης AChE. Από τα 20 αμινοξέα της αλληλουχίας του TgP26, τα τρία είναι κοινά και άλλα τέσσερα αποτελούν συντηρητικές υποκαταστάσεις στην ομόλογη αλληλουχία της ανθρώπινης AChE (53) (Πίνακας VI). Στο καρβοξυ-τελικό άκρο του πεπτιδίου TgP26, υπάρχει μια περιοχή που έχει αρκετή ομολογία με την αντίστοιχη περιοχή της AChE (Πίνακας VI). Η περιοχή αυτή θα μπορούσε να αποτελεί κοινό γραμμικό επίτοπο μεταξύ Tg και AChE. Αν εξετάσουμε την περιοχή της ανθρώπινης AChE που είναι ομόλογη με το πεπτίδιο TgP26 ως προς τα δομικά της χαρακτηριστικά (Σχήμα 28), διαπιστώνουμε τα ακόλουθα: το αμινο-τελικό τμήμα της περιοχής έχει μέτρια υδροφιλικότητα, ενώ το υπόλοιπο τμήμα περιλαμβάνει μια κορυφή στην υδροφοβικότητα, που όμως μειώνεται προς το καρβοξυ-τελικό άκρο. Η περιοχή αυτή παρουσιάζει μέτρια αύξηση της ευκαμψίας προς τα άκρα, ενώ προς τα άκρα είναι αυξημένη και η προσβασιμότητα. Η ομόλογη με το TgP26 περιοχή της ανθρώπινης AChE, στο αμινο-τελικό άκρο έχει πιθανότητα να είναι α-έλικα (Σχήμα 28δ). Στο μέσο της περιοχής, η πρόβλεψη υποδεικνύει δομή β-στροφής, ενώ το καρβοξυ-τελικό τμήμα έχει σημαντική πιθανότητα να σχηματίζει β-πτυχωτή επιφάνεια (Σχήμα 28ε,στ).





Σχήμα 27. Συνεχίζεται.



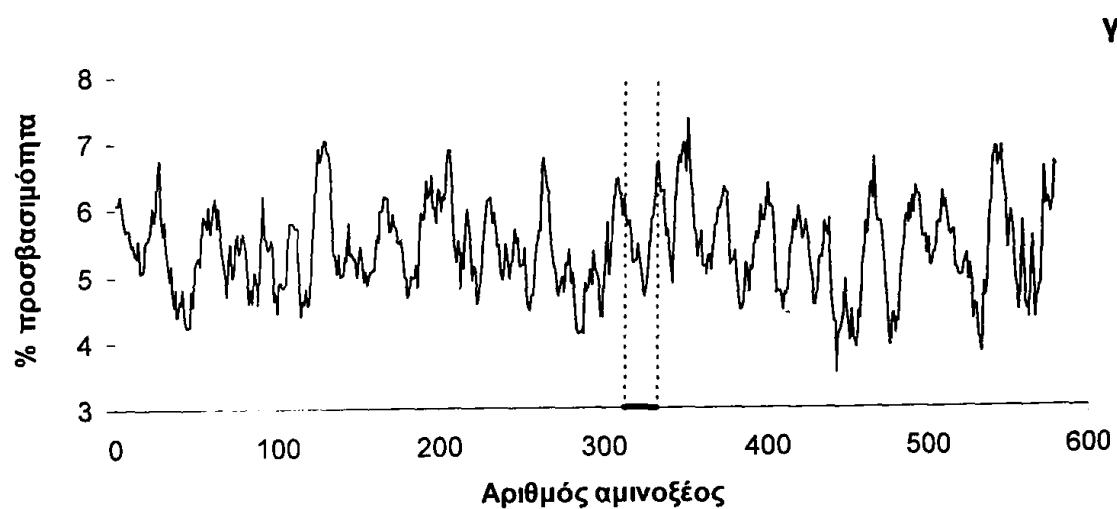
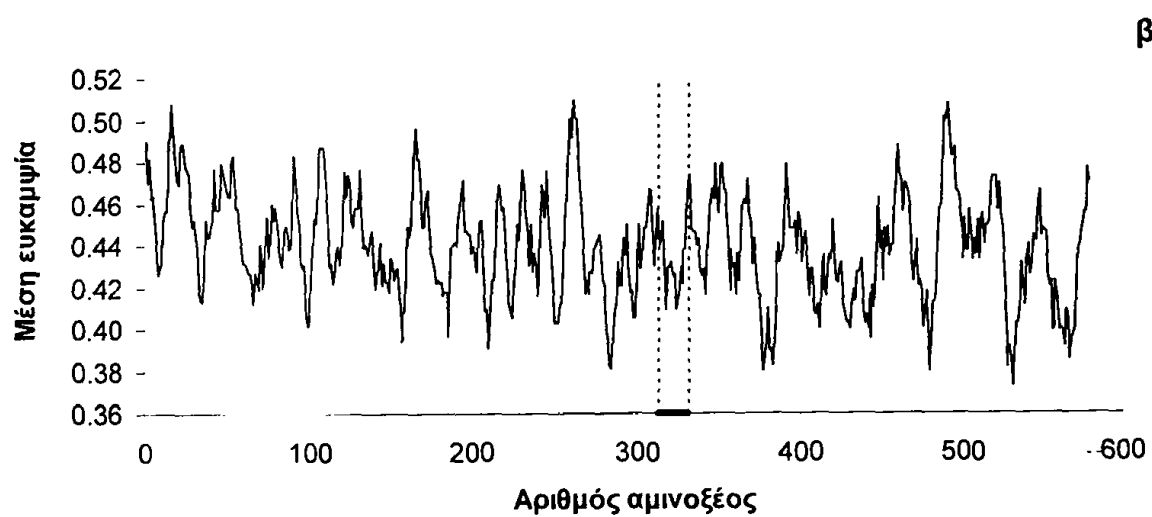
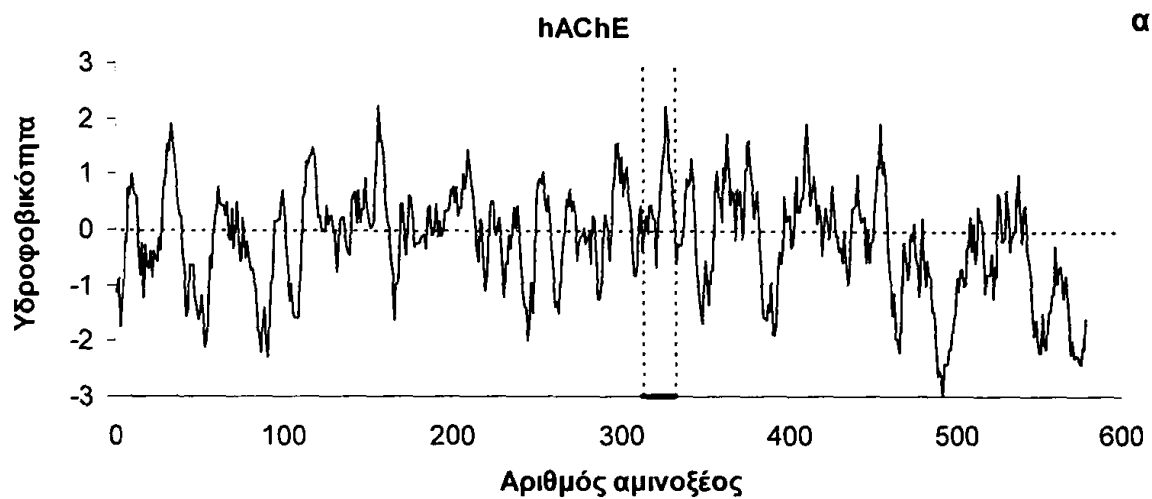
Σχήμα 27. Υπολογισμός δομικών παραμέτρων: υδροφοβικότητα (α), μέση ευκαμψία (β), προσβασιμότητα (γ), καθώς και πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής: α-έλικα (δ), β-στροφή (ε), β-πτυχωτή επιφάνεια (στ), για την καρβοξυ-τελική περιοχή της ανθρώπινης Tg. Η πρόβλεψη έγινε με βάση την πρωτοταγή δομή της πρωτεΐνης. Στα σχήματα απεικονίζεται η βαθμολόγηση για την κάθε δομική παράμετρο, συναρτήσει της αρίθμησης των αμινοξέων στην

ώριμη πρωτεΐνη. Με κάθετες διακεκομμένες γραμμές οριοθετούνται οι αλληλουχίες των πεπτιδίων TgP15, TgP26 και TgP41.

Πίνακας VI. Στοιχίση του πεπτιδίου TgP26 με την ομόλογη περιοχή της ανθρώπινης AChE. Στην αλληλουχία της AChE, με διαγώνια διαγράμμιση σημειώνονται τα ταυτόσημα αμινοξέα και με οριζόντια διαγράμμιση οι συντηρητικές υποκαταστάσεις.

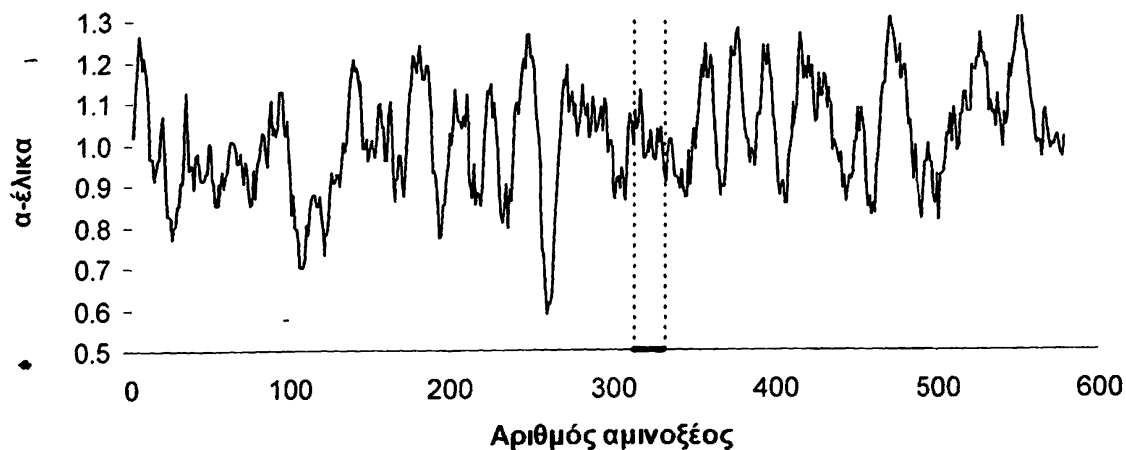
TgP26 (hTg: 2471-2490)	P	P	A	R	A	L	K	R	S	L	W	V	E	V	D	L	L	I	G	S
hAChE: 313-332	T	P	E	A	L	I	N	A	G	D	F	H	G	L	Q	V	L	V	Q	V

Όπως φαίνεται από τη γνωστή τρισδιάστατη δομή της AChE από *Torpedo californica* (257), η περιοχή που είναι ομόλογη με το πεπτίδιο TgP26 της Tg (αλληλουχία 304-323 στην AChE του *T. californica*, (29)) είναι κατά ένα τμήμα της εκτεθειμένη στην επιφάνεια της πρωτεΐνης (Σχήμα 29α). Το τμήμα αυτό βρίσκεται προς το αμινο-τελικό άκρο της περιοχής και έχει διαμόρφωση α-έλικας που συνοδεύεται από β-στροφή (Σχήμα 29β). Το τμήμα που δεν είναι εκτεθειμένο έχει διαμόρφωση β-πτυχωτής επιφάνειας και βρίσκεται προς το καρβοξυ-τελικό άκρο. Τα δεδομένα από τη γνωστή τρισδιάστατη δομή της AChE του *T. Californica*, όσον αφορά την περιοχή που είναι ομόλογη με το TgP26 (Σχήμα 30), συμφωνούν με την πρόβλεψη για την ανθρώπινη AChE (Σχήμα 28). Επίσης υπάρχει αρκετή συμφωνία με την προβλεπόμενη δομή του TgP26 (Σχήμα 27). Το μόνο που δεν προβλέπεται στην τελευταία περίπτωση, είναι η β-στροφή στο μέσον της περιοχής. Συνεπώς, οι πρωτεΐνες Tg και AChE φαίνεται πως εμφανίζουν ομοιότητα στην τρισδιάστατη δομή τους στο αμινο-τελικό τμήμα του TgP26.

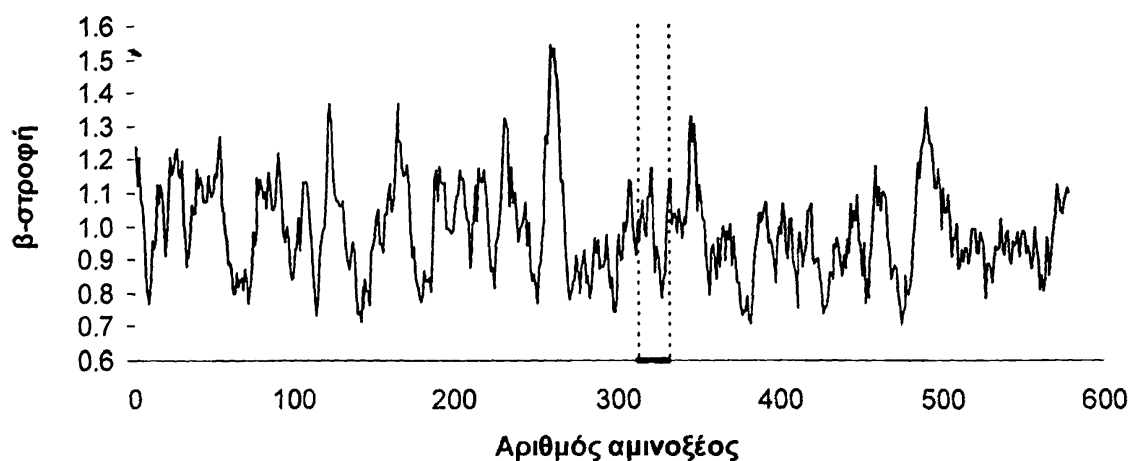


Σχήμα 28. Συνεχίζεται.

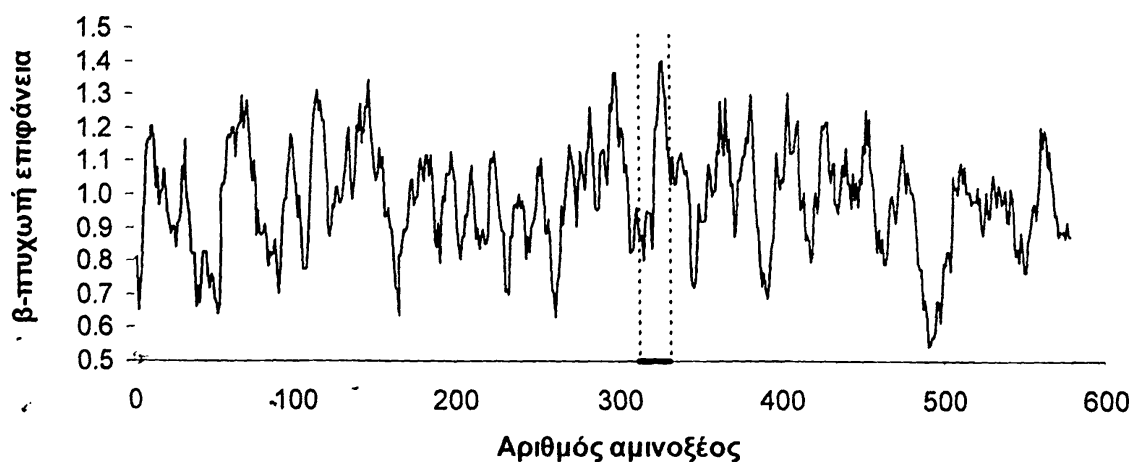
δ



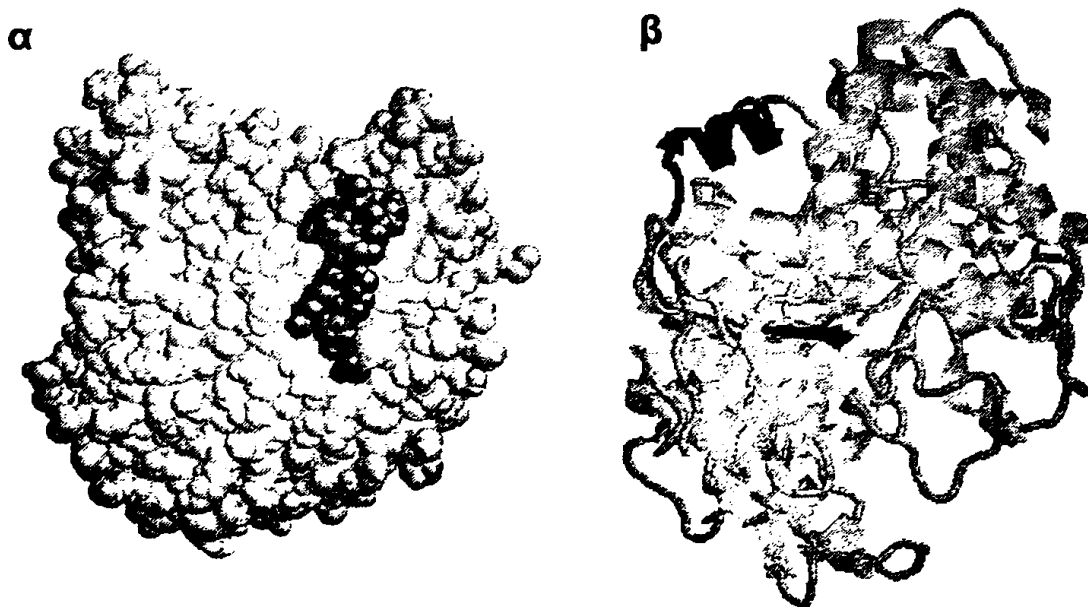
ε



στ



Σχήμα 28. Υπολογισμός δομικών παραμέτρων: υδροφοβικότητα (α), μέση ευκαμψία (β), προσβασιμότητα (γ), καθώς και πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής: α-έλικα (δ), β-στροφή (ε), β-πτυχωτή επιφάνεια (στ), για την ώριμη ανθρώπινη AChE. Η πρόβλεψη έγινε με βάση την πρωτοταγή δομή της πρωτεΐνης. Στα σχήματα απεικονίζεται η βαθμολόγηση για την κάθε δομική παράμετρο συναρτήσει της αρίθμησης των αμινοξέων στην ώριμη πρωτεΐνη. Με κάθετες διακεκομμένες γραμμές, οριοθετείται η αλληλουχία που είναι ομόλογη με το πεπτιδίιο TgP26 της ανθρώπινης Tg.



Σχήμα 29. Τρισδιάσταση δομή του μορίου της AChE από *Torpedo californica* (257). Η θέση πάνω στην πρωτεΐνη που είναι ομόλογη με το πεπτίδιο TgP26 (αλληλουχία 304-323) σημειώνεται με σκούρο. (α) Χωροπληρωτικός τύπος απεικόνισης, όπου φαίνεται το εκτεθειμένο τμήμα της περιοχής αυτής. (β) Απεικόνιση τύπου ταινίας, όπου παρουσιάζεται η δευτεροταγής δομή της πρωτεΐνης.

Σύμφωνα με τα προηγούμενα δεδομένα, η καρβοξυ-τελική περιοχή του πεπτιδίου TgP26, η οποία παρουσιάζει ομολογία με αλληλουχία αμινοξέων και στις δύο πρωτεΐνες (Πίνακας VI), εμφανίζει υδρόφοβο χαρακτήρα και όπως φαίνεται, δεν είναι εκτεθειμένη στην επιφάνεια των δύο πρωτεϊνών. Ωστόσο, ακόμα και αν η καρβοξυ-τελική περιοχή του πεπτιδίου TgP26 δεν αποτελεί κοινό γραμμικό επίτοπο μεταξύ Tg και AChE, δεν αποκλείεται ο κοινός επίτοπος να περιέχεται σε κάποια διαμορφωτική δομή του πεπτιδίου, που είναι κοινή και στις δύο πρωτεΐνες. Όπως είδαμε νωρίτερα σε αυτή την παράγραφο, η αμινο-τελική περιοχή του πεπτιδίου είναι εκτεθειμένη στις δύο πρωτεΐνες και πιθανόν να έχει όμοια δευτεροταγή δομή.

Το αμινο-τελικό τμήμα του πεπτιδίου TgP41 είναι υδρόφιλο και έχει υψηλή ευκαμψία και μέτρια προσβασιμότητα. Το υπόλοιπο τμήμα του πεπτιδίου έχει μικρή υδροφιλικότητα (χωρίς να είναι ιδιαίτερα υδρόφοβη), μικρή ευκαμψία και μικρή προσβασιμότητα. Όσον αφορά τη δευτεροταγή δομή, το αμινο-τελικό άκρο του πεπτιδίου έχει μεγάλη πιθανότητα να είναι β-στροφή, ενώ για το υπόλοιπο πεπτίδιο η πρόβλεψη δε φανερώνει επικράτηση

κάποιες από τις τρεις δομές (α-έλικα, β-στροφή, β-πτυχωτή επιφάνεια). Συνεπώς, το αμινο-τελικό άκρο του πεπτιδίου TgP41 είναι πιθανό να περιλαμβάνει επίτοπο, ο οποίος να αναγνωρίζεται πάνω στη φυσική Tg.

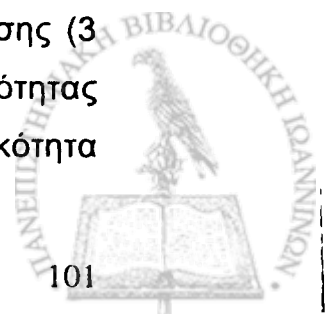
4.2 Μελέτη της ειδικότητας αντισωμάτων που επάγονται κατά την πειραματική ανοσοποίηση με Tg ή με το πεπτίδιο TgP41

4.2.1 Πειραματική ανοσοποίηση με Tg

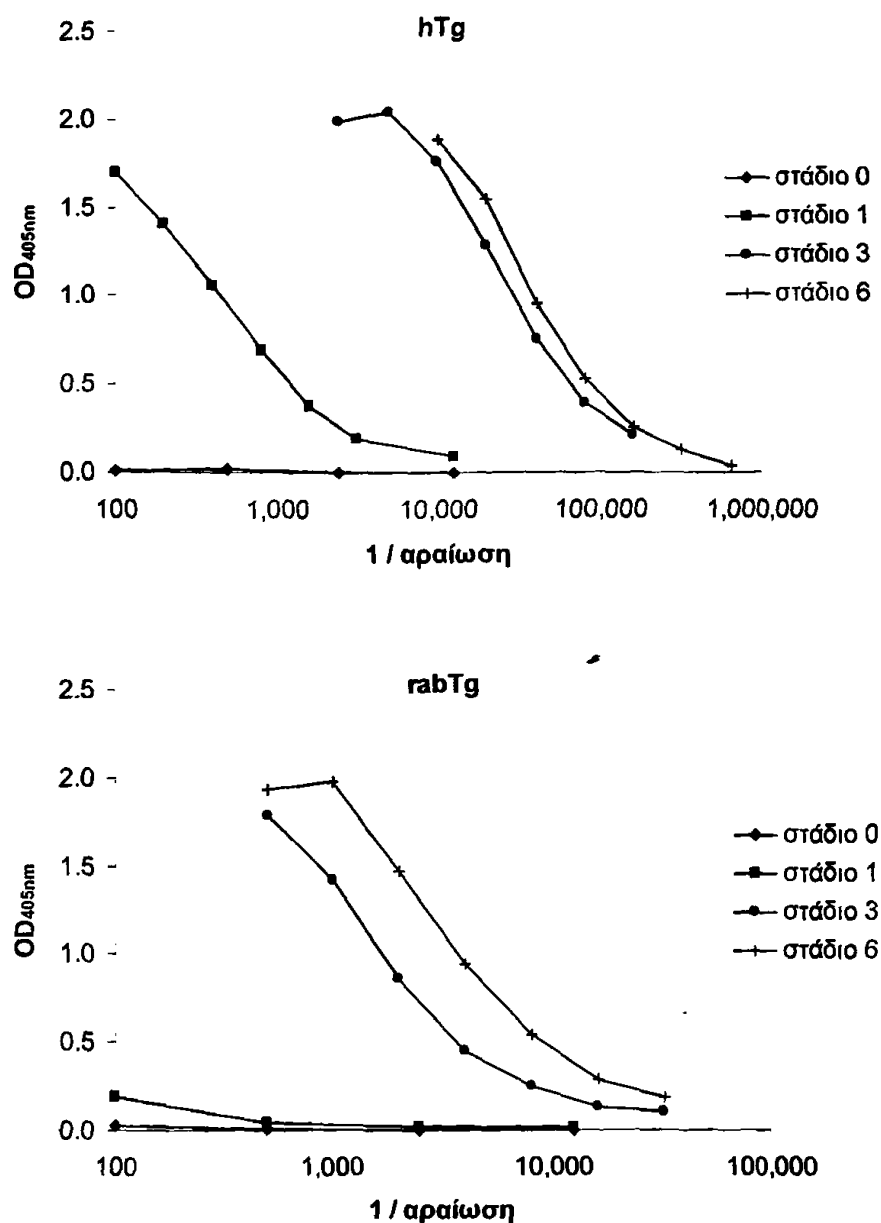
Κατά την υπερανοσοποίηση κουνελιών με ανθρώπινη Tg, μελετήθηκε η ορολογική απόκριση έναντι Tg από διάφορα ζωικά είδη, έναντι ορμονών του θυρεοειδούς και έναντι πεπτιδίων της Tg. Σε δύο κουνέλια (L46 και L47) χορηγήθηκαν υποδορίως 2.5 mg αντιγόνου σε αιώρημα πλήρους ανοσοενισχυτικού εκδόχου του Freund (CFA) ανά τρεις εβδομάδες, συνολικά έξι φορές (στάδια 1-6). Αιμοληψία έγινε πριν την έναρξη των ανοσοποιήσεων (στάδιο 0) και 8-10 ημέρες μετά από κάθε ανοσοποίηση (στάδια 1-6). Δύο ζώα – μάρτυρες ενέθηκαν μόνο με CFA. Οι οροί καθώς και απομονωμένα αντι-Tg αντισώματα από τα στάδια 0-6, ελέγχθηκαν με μη ανταγωνιστική και ανταγωνιστική ELISA, για δραστικότητα έναντι ανθρώπινης και ετερόλογων Tg, ορμονών T₃ και T₄ και πεπτιδίων της ανθρώπινης Tg (TgP15, TgP26 και TgP41).

4.2.1.1 Ορολογική απόκριση έναντι Tg από διάφορα ζωικά είδη

Ελέγχθηκε με ELISA η δραστικότητα των αντιορών, από τα κουνέλια που ανοσοποιήθηκαν με ανθρώπινη Tg (L46 και L47), έναντι Tg από διάφορα ζωικά είδη: άνθρωπο (hTg), βόδι (bTg), χοίρο (pTg), ποντικό (mTg), αρουραίο (ratTg) και κουνέλι (rabTg). Το Σχήμα 30 παρουσιάζει ενδεικτικά τις καμπύλες τιτλοδότησης για τις hTg και rabTg, των ορών από τα στάδια 0, 1, 3, και 6 του κουνελιού L46. Όπως παρατηρούμε, στην αραιώση 1:100, η δραστικότητα δεν διαφέρει μεταξύ των ειδών στα προχωρημένα στάδια ανοσοποίησης (3 και 6). Αντίθετα σε μεγαλύτερη αραιώση (1:12,500) η διαφορά δραστικότητας μεταξύ των ειδών είναι εμφανής. Στο Σχήμα 31 παρουσιάζεται η δραστικότητα



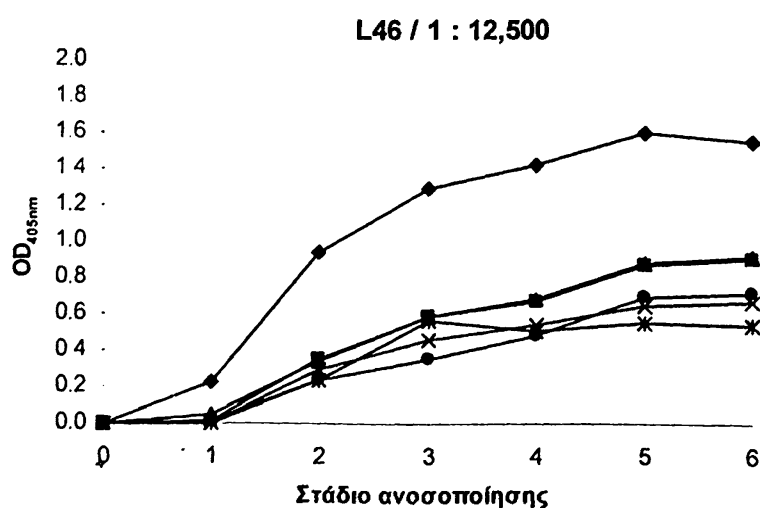
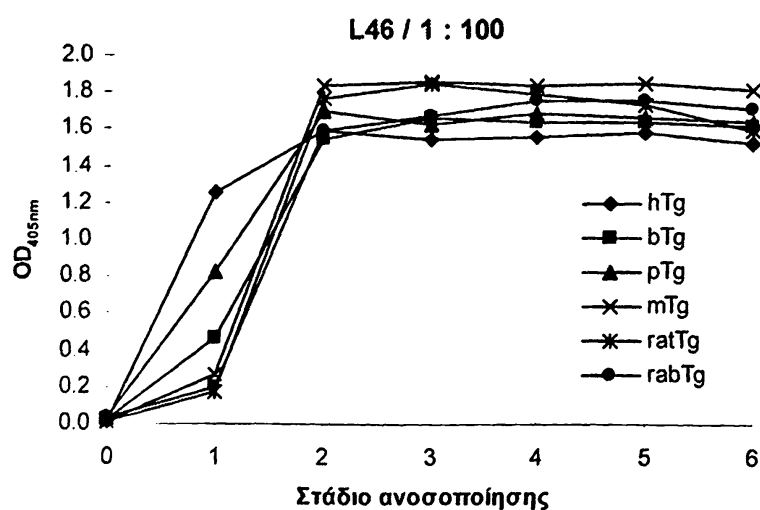
των αντιορών που ελήφθησαν στα διαδοχικά στάδια ανοσοποίησης, σε αραιώσεις 1:100 και 1:12,500, για όλα τα ζωικά είδη που ελέγχθηκαν. Παρατηρείται υψηλή δραστικότητα των αντιορών έναντι της ανθρώπινης Tg^s και χαμηλότερη έναντι ετερόλογων Tg, όπως φαίνεται σε μεγάλη αραιώση των αντιορών.



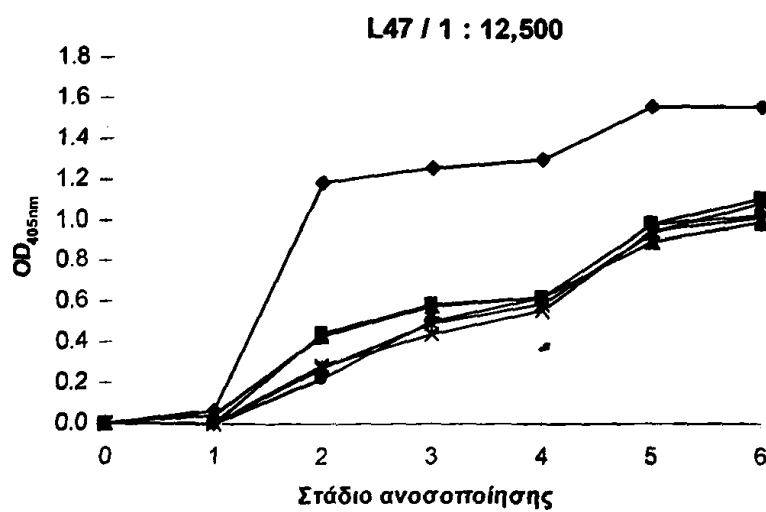
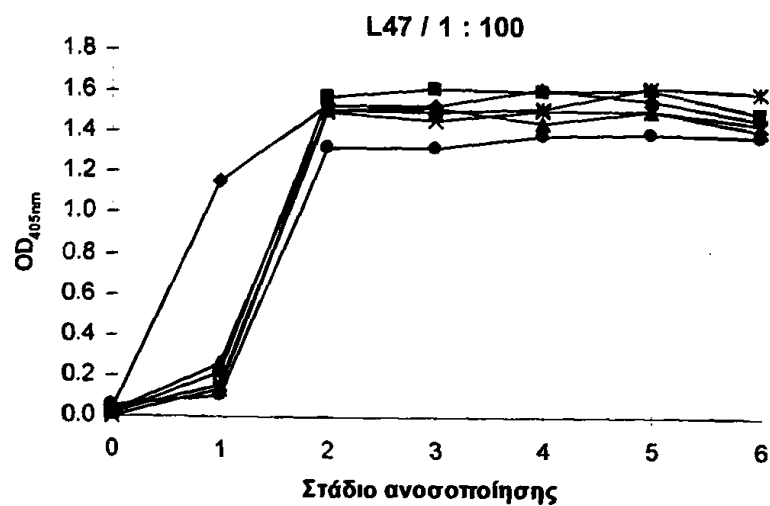
Σχήμα 30. Καμπύλες τιτλοδότησης των ορών από τα στάδια 0, 1, 3, και 6 του κουνελιού L46, για τις hTg και rabTg (απορρόφηση συναρτήσεως της αραιώσεως των ορών).

➤ Η μετατόπιση των καμπύλων προς τα δεξιά (μεγαλύτερη αραιώση) κατά την πάροδο των σταδίων ανοσοποίησης υποδηλώνει αύξηση της δραστικότητας. Επίσης διαπιστώνεται αυξημένη δραστικότητα για την hTg σε σχέση με την rabTg: 50% πρόσδεση για την hTg σε αραιώση 1:40,000 και για την rabTg σε αραιώση 1:4,000.

Η δραστικότητα έναντι των ετερόλογων Tg γίνεται σημαντική κυρίως από το στάδιο 2 (1^η αναμνηστική δόση) και μετά, ενώ η αύξηση της δραστικότητας έναντι hTg είναι σημαντική ήδη από το στάδιο 1 (1^η ανοσοποίηση). Τα ζώα - μάρτυρες, τα οποία ενέθηκαν μόνο με CFA, δεν παρουσίασαν δραστικότητα έναντι των παραπάνω αντιγόνων.



Σχήμα 31. Συνεχίζεται.



Σχήμα 31. Δραστικότητα (OD) των αντιορών από τα κουνέλια L46 και L47, που ανοσοποιήθηκαν με ανθρώπινη Tg, στα διαδοχικά στάδια ανοσοποίησης και σε αραιώσεις 1:100 και 1:12,500, έναντι Tg από διάφορα ζωικά είδη: άνθρωπο (hTg), βόδι (bTg), χοίρο (pTg), ποντικό (mTg), αρουραίο (ratTg) και κουνέλι (rabTg).

➤ Όλες οι Tg αναγνωρίζονται από τους αντιορούς, όμως σε μεγάλη αραιώση των αντιορών (1:12,500) η δραστικότητα έναντι της ανθρώπινης Tg είναι υψηλότερη από τη δραστικότητα έναντι των ετερόλογων Tg.

Από τους ορούς των σταδίων 0, 1, 2, 3 και 6 του κουνελιού L46, απομονώθηκαν τα ειδικά αντι-Tg αντισώματα, με χρωματογραφία συγγένειας σε ανοσοπροσροφητή hTg. Η έκλυση των αντισωμάτων που προσδέθηκαν στη στήλη πραγματοποιήθηκε σε όξινο pH, pH 2.8 και ακολούθως σε pH 2.2. Τα αντισώματα που εκλύονται σε χαμηλότερο pH είναι αυτά με τη μεγαλύτερη συγγένεια, έχουν δηλαδή την ιδιότητα να προσδέονται ισχυρότερα με το αντιγόνο. Οι ποσότητες των αντισωμάτων που απομονώθηκαν φαίνονται στον Πίνακα VII. Παρατηρούμε ότι η ποσότητα των ειδικών αντι-Tg αντισωμάτων στον ορό αυξάνεται σταδιακά. Συγκρίνοντας τη συγκέντρωση των αντι-Tg αντισωμάτων στο τελικό στάδιο ανοσοποίησης (στάδιο 6) με την αντίστοιχη συγκέντρωση πριν την ανοσοποίηση (στάδιο 0) διαπιστώνουμε αύξηση περίπου κατά 18 φορές. Επίσης, παρατηρούμε ότι γενικά, η ποσότητα των χαμηλής συγγένειας αντισωμάτων (έκλυση σε pH 2.8) είναι μεγαλύτερη από την ποσότητα των αντισωμάτων υψηλής συγγένειας (έκλυση σε pH 2.2) κατά 1.4 έως 4 φορές ανάλογα με το στάδιο ανοσοποίησης.

Πίνακας VII. Συγκέντρωση στον ορό των αντι-Tg αντισωμάτων που απομονώθηκαν από τους ορούς των σταδίων 0, 1, 2, 3 και 6 του κουνελιού L46.

Στάδιο	pH έκλυσης	Συγκέντρωση των αντι-Tg στον ορό (μg/ml)	Σύνολο (μg/ml)
0	2.8	20	25.3
	2.2	5.3	
1	2.8	30.6	44.9
	2.2	14.3	
2	2.8	66.4	83.5
	2.2	17.1	
3	2.8	240.5	335.7
	2.2	95.2	
6	2.8	264.7	448.2
	2.2	183.5	

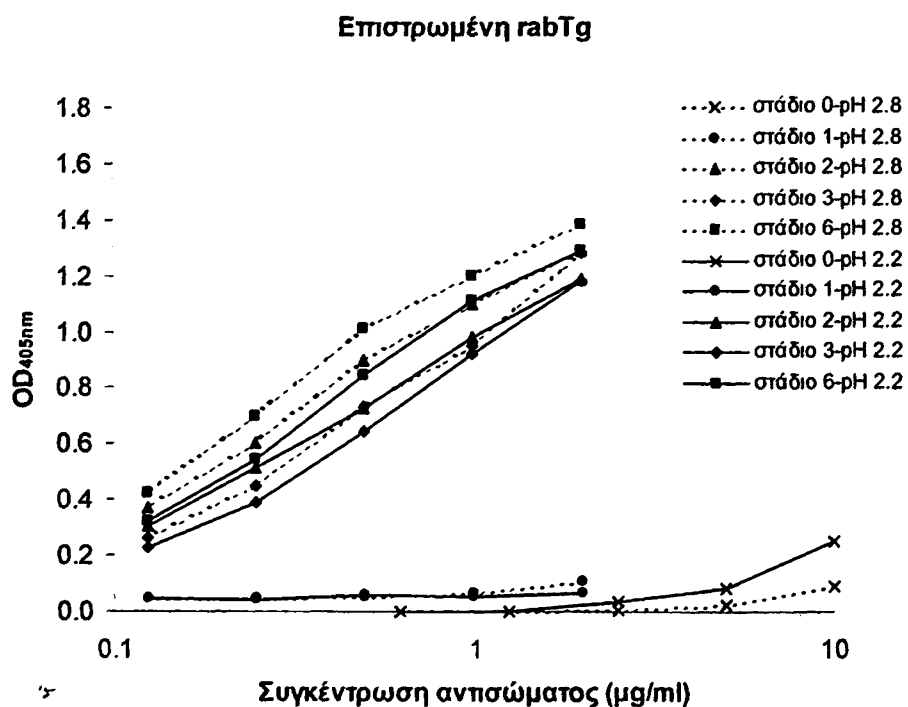
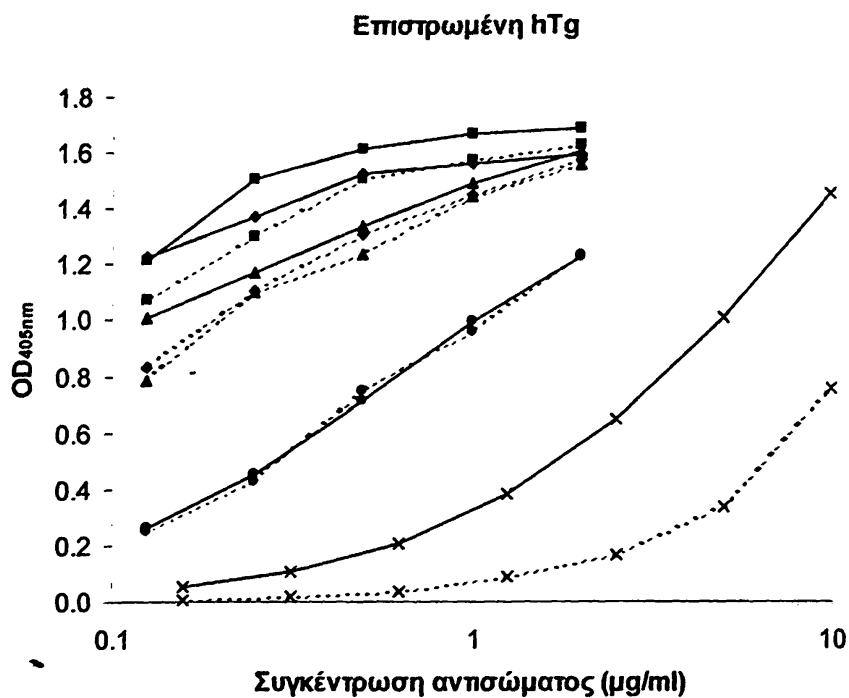
Η δραστικότητα των απομονωμένων ειδικών αντι-Tg αντισωμάτων, ελέγχθηκε έναντι των Tg από διάφορα ζωικά είδη (Σχήμα 32, Σχήμα 33). Διαπιστώνονται τα ακόλουθα: α) Κατά την ανοσοποίηση αναπτύσσονται

αντισώματα έναντι της Tg από όλα τα εξεταζόμενα είδη, όμως, η συγγένεια των αντισωμάτων για την hTg είναι ισχυρότερη αφού πρόκειται για το αντιγόνο ανοσοποίησης. Αυτό γίνεται φανερό κυρίως όταν ελέγχεται η δραστικότητα των αντισωμάτων σε χαμηλή συγκέντρωση (0.1 $\mu\text{g/ml}$). β) Η δραστικότητα έναντι της rabTg αρχίζει να αυξάνεται από το στάδιο 2 και μετά, ενώ για την hTg η αύξηση είναι αισθητή από την πρώτη κιάλας ανοσοποίηση. γ) Η δραστικότητα των αντισωμάτων από το στάδιο 0 έναντι της hTg είναι αυξημένη. Αυτό οφείλεται, αφενός στο γεγονός ότι η απομόνωση των αντι-Tg έγινε σε ανοσοπροσροφητή ανθρώπινης Tg και αφετέρου στην ανοχή που υπάρχει στο κουνέλι για την πρωτεΐνη του ίδιου είδους (δηλ. στο κουνέλι υπάρχει πολύ μικρή ποσότητα αντισωμάτων για rabTg). δ) Όπως είναι αναμενόμενο, η δραστικότητα των αντισωμάτων υψηλής συγγένειας (έκλυση σε pH 2.2) είναι γενικά αυξημένη σε σχέση με αυτή των αντισωμάτων χαμηλής συγγένειας (έκλυση σε pH 2.8). Αφού η συγκέντρωση των αντισωμάτων στα πειράματα αυτά είναι σταθερή, οι διαφορές στη δραστικότητα οφείλονται σε διαφορές στη συγγένεια των αντισωμάτων, ανεξάρτητα από τη συγκέντρωσή τους στον ορό.

Για να διαπιστωθεί η διαφορά στη συγγένεια των αντισωμάτων για τις Tg από διαφορετικά είδη στα διαδοχικά στάδια ανοσοποίησης, ελέγχθηκε με ανταγωνιστική ELISA η αναστολή της δραστικότητας έναντι ακινητοποιημένης hTg και rabTg από διαλυτή hTg, bTg και ratTg για τους αντιορούς των σταδίων 1, 3 και 6 του ζώου L46. Από το Σχήμα 34 φαίνεται ότι η πρόσδεση σε ακινητοποιημένη hTg αναστέλλεται ισχυρά από το αυτόλογο αντιγόνο και ελάχιστα από τις ετερόλογες Tg. Αντίθετα, η πρόσδεση σε ακινητοποιημένη rabTg παρεμποδίζεται από τις Tg όλων των εξεταζόμενων ειδών. Η παρεμπόδιση αυτή είναι ασθενέστερη από την παρεμπόδιση πρόσδεσης σε hTg από το αυτόλογο αντιγόνο. Το στάδιο 1 διαφοροποιείται από τα στάδια 3 και 6 στα ακόλουθα σημεία:

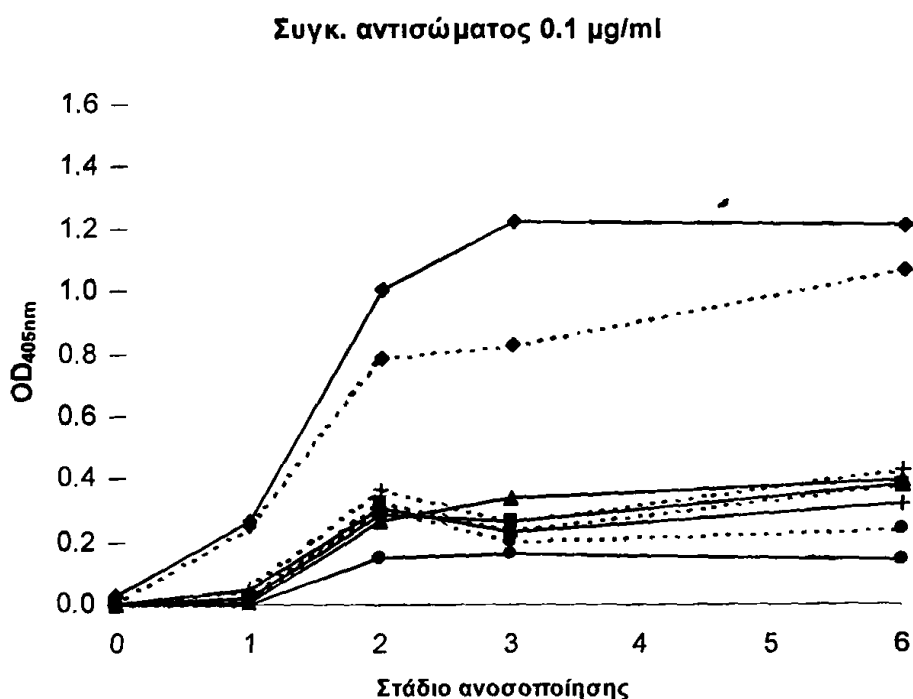
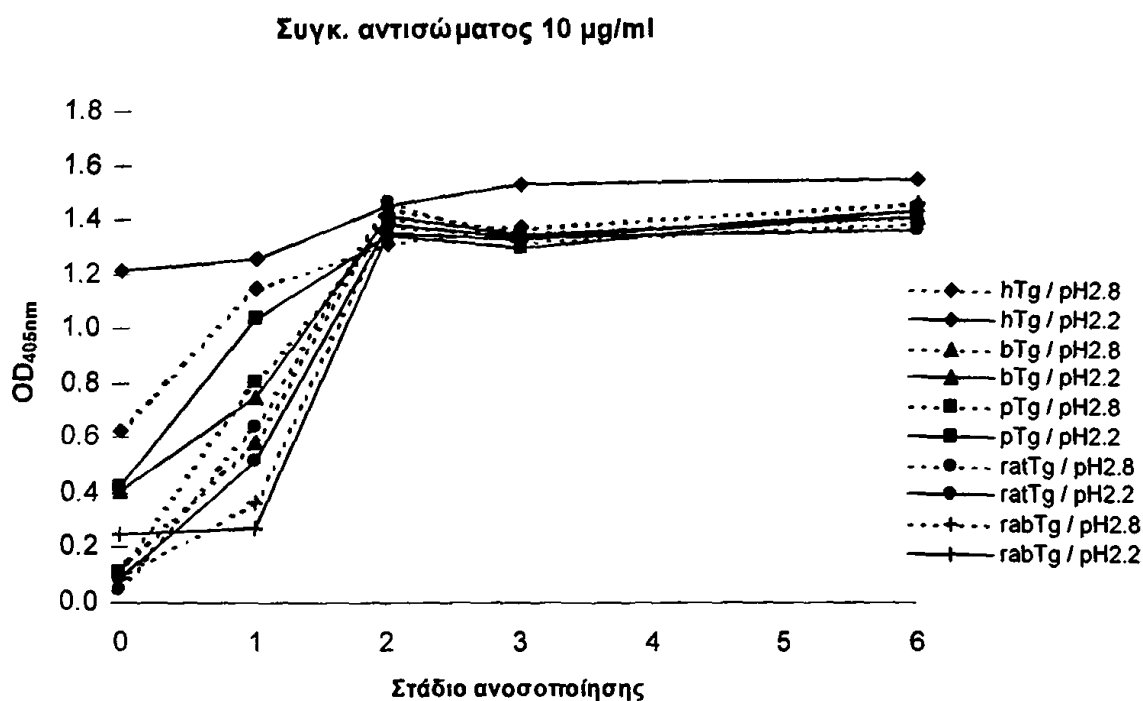
α) Η παρεμπόδιση πρόσδεσης σε hTg από το αυτόλογο αντιγόνο είναι ισχυρότερη στα στάδια 3 και 6 (50% αναστολή επιτυγχάνεται σε συγκέντρωση αναστολέα $<0.3 \text{ pmol/ml}$, Πίνακας VIII) από ό,τι στο στάδιο 1 (50% αναστολή, στα 6 pmol/ml).





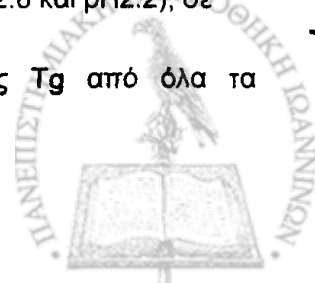
Σχήμα 32. Καμπύλες τιτλοδότησης (OD συναρτήσει της συγκέντρωσης αντισώματος) των απομονωμένων αντι-Tg αντισωμάτων από τους ορούς των σταδίων 0, 1, 2, 3 και 6 του κουνελιού L46, έναντι hTg και rabTg. Παρουσιάζονται χωριστά οι καμπύλες για τα αντισώματα που εκκλύονται στις δύο διαφορετικές τιμές του pH.

➤ Η συγγένεια των αντισωμάτων αυξάνεται από το στάδιο 1 για την hTg και από το στάδιο 2 για την rabTg. Η συγγένεια για την hTg είναι ισχυρότερη από ό,τι για την rabTg.



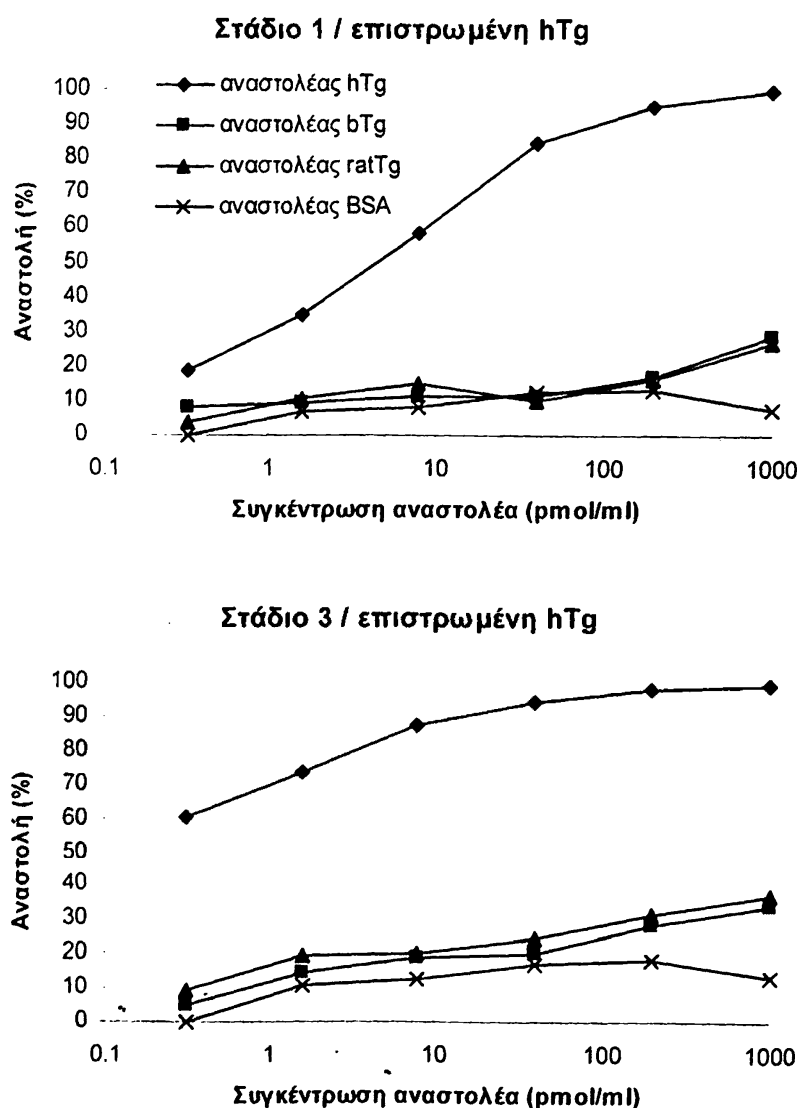
Σχήμα 33. Δραστηκότητα των απομονωμένων ειδικών αντι-Tg αντισωμάτων, έναντι Tg από διάφορα ζωικά είδη: άνθρωπο (hTg), βόδι (bTg), χοίρο (pTg), αρουραίο (ratTg) και κουνέλι (rabTg). Απεικονίζεται η μετρούμενη απορρόφηση για τα διαδοχικά στάδια ανοσοποίησης. Παρουσιάζεται ξεχωριστά η δραστηκότητα για κάθε κλάσμα έκλουσης (pH2.8 και pH2.2), σε συγκεντρώσεις 10 $\mu\text{g/ml}$ και 0.1 $\mu\text{g/ml}$.

➤ Κατά την ανοσοποίηση, αναπτύσσονται αντισώματα έναντι της Tg από όλα τα εξεταζόμενα είδη, όμως η συγγένεια για την hTg είναι υψηλότερη.



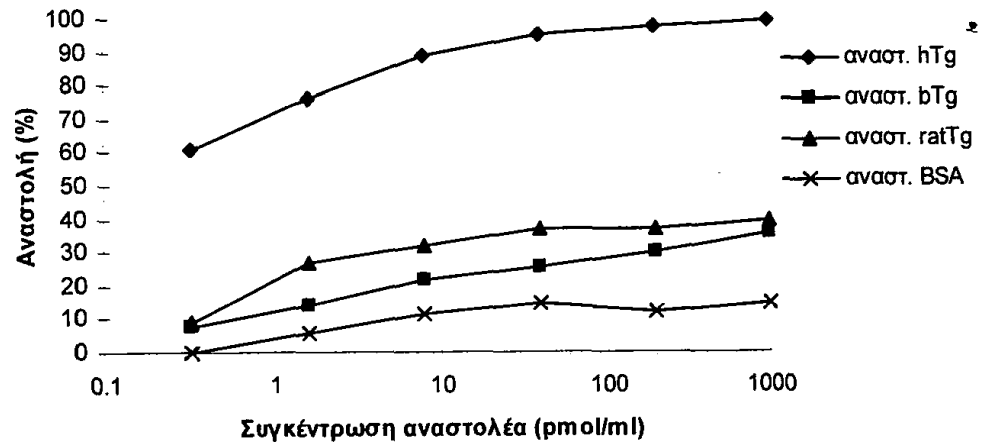
β) Στα στάδια 3 και 6 η παρεμπόδιση πρόσδεσης σε rabTg από όλες τις εξεταζόμενες Tg είναι ισχυρότερη από ό,τι στο στάδιο 1 (Πίνακας VIII).

γ) Στο στάδιο 1, η αναστολή πρόσδεσης σε rabTg από διαλυτή hTg είναι ισχυρότερη (50% αναστολή στα 22 pmol/ml, Πίνακας VIII) από την αντίστοιχη αναστολή που προκαλούν οι bTg και ratTg (50% αναστολή στα 350 και 300 pmol/ml, αντίστοιχα). Αντίθετα, στα στάδια 3 και 6 η αναστολή πρόσδεσης σε rabTg από τις Tg όλων των εξεταζόμενων ειδών είναι παρόμοια.

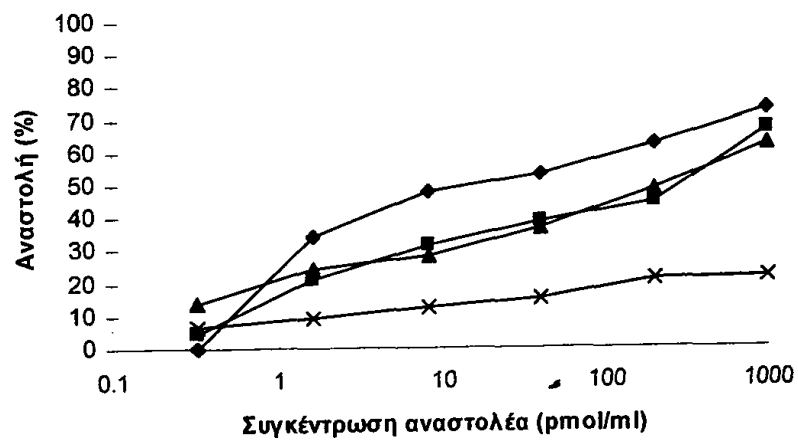


Σχήμα 34. Συνεχίζεται.

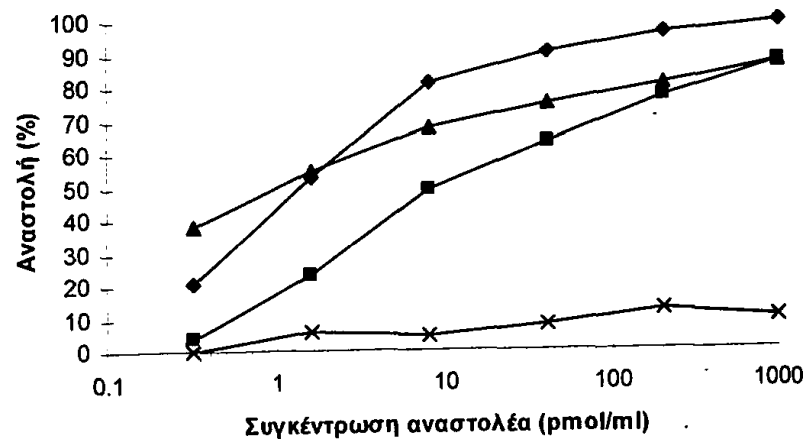
Στάδιο 6 / επιστρωμένη hTg



Στάδιο 1 / επιστρωμένη rabTg



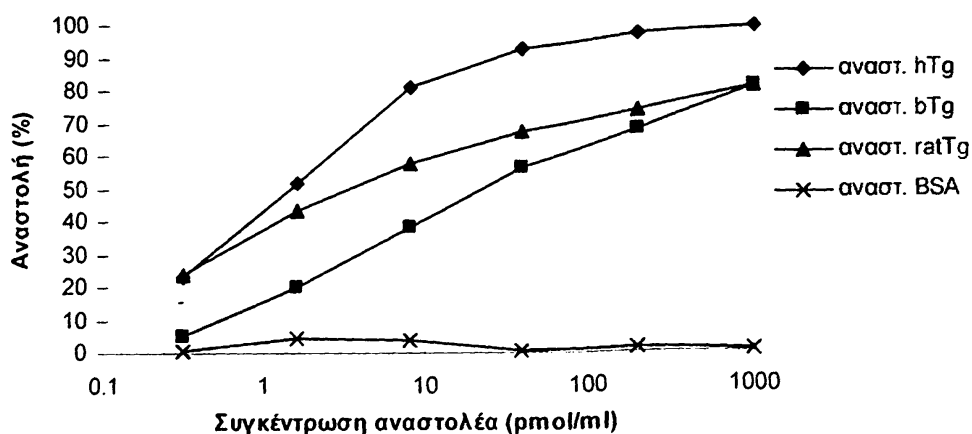
Στάδιο 3 / επιστρωμένη rabTg



Σχήμα 34. Συνεχίζεται.



Στάδιο 6 / επιστρωμένη rabTg



Σχήμα 34. Αναστολή της δραστηριότητας έναντι ακινητοποιημένης hTg και rabTg από διαλυτή hTg, bTg και ratTg για τους αντιορούς των σταδίων 1, 3 και 6 του κουνελιού L46. Ως μάρτυρας, ελέγχθηκε η αναστολή από BSA. Στα σχήματα απεικονίζεται το ποσοστό αναστολής συναρτήσει της συγκέντρωσης του αναστολέα.

Πίνακας VIII. Συγκέντρωση αναστολέα (pmol/ml) για 50% αναστολή της δραστηριότητας έναντι ακινητοποιημένης hTg και rabTg από διαλυτή hTg, bTg και ratTg για τους αντιορούς των σταδίων 1, 3 και 6 του κουνελιού L46.

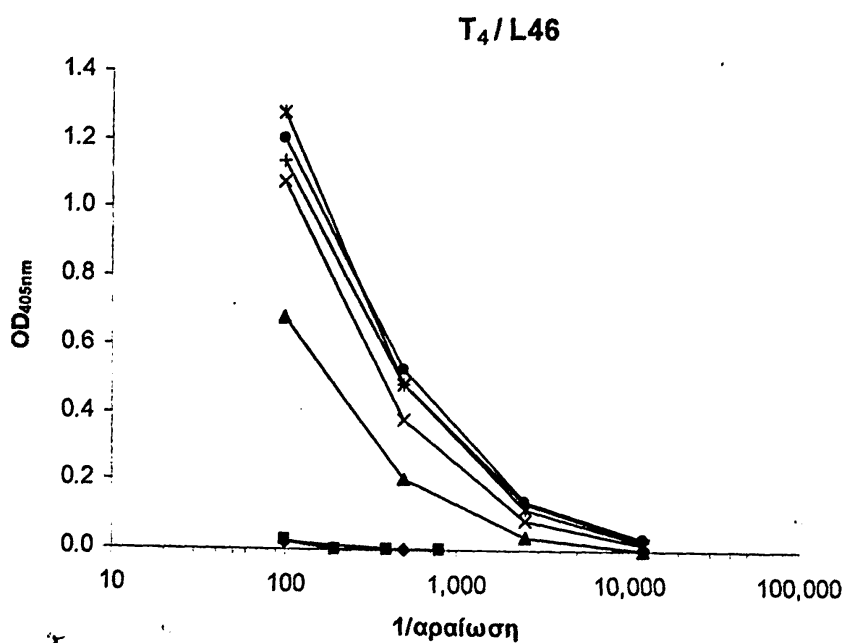
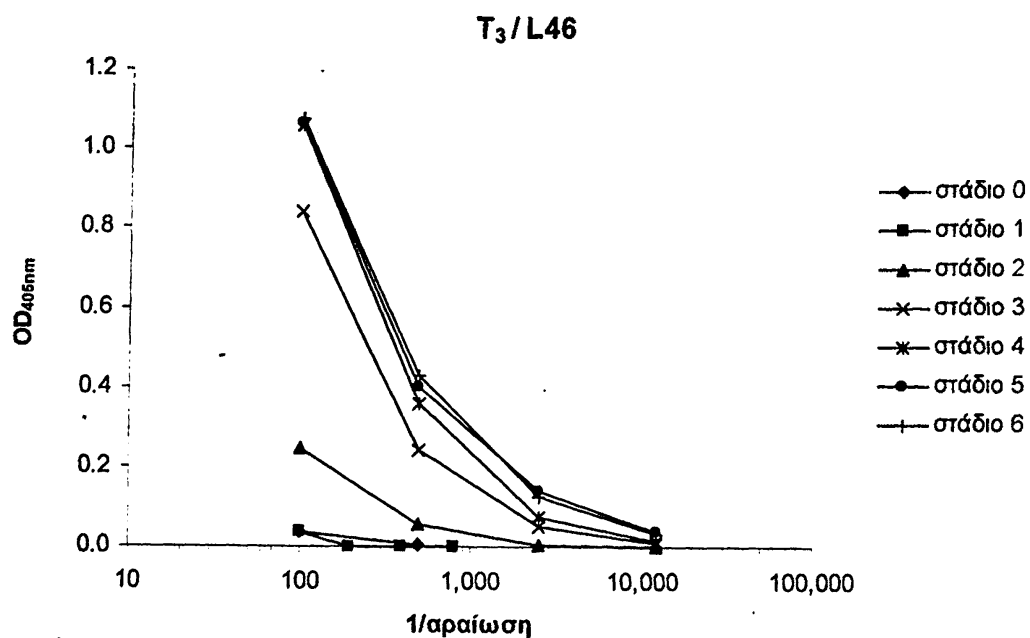
Επιστρωμένο αντιγόνο	Στάδιο ανοσοποίησης	Αναστολέας		
		hTg	bTh	ratTg
hTg	1	6	-	-
	3	< 0.3	-	-
	6	< 0.3	-	-
rabTg	1	22	350	300
	3	1.5	10	1.2
	6	1.5	30	5

4.2.1.2 Ορολογική απόκριση έναντι ορμονών του θυρεοειδούς

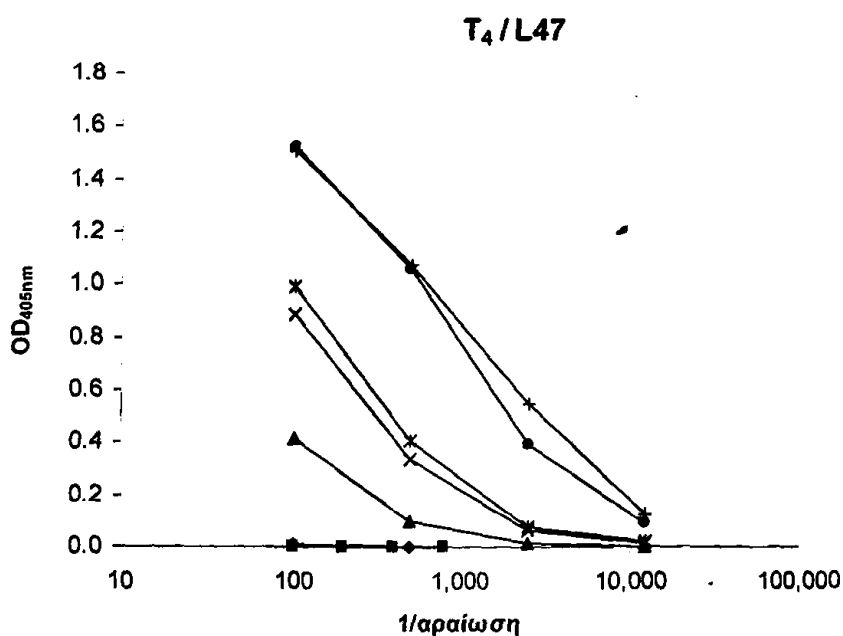
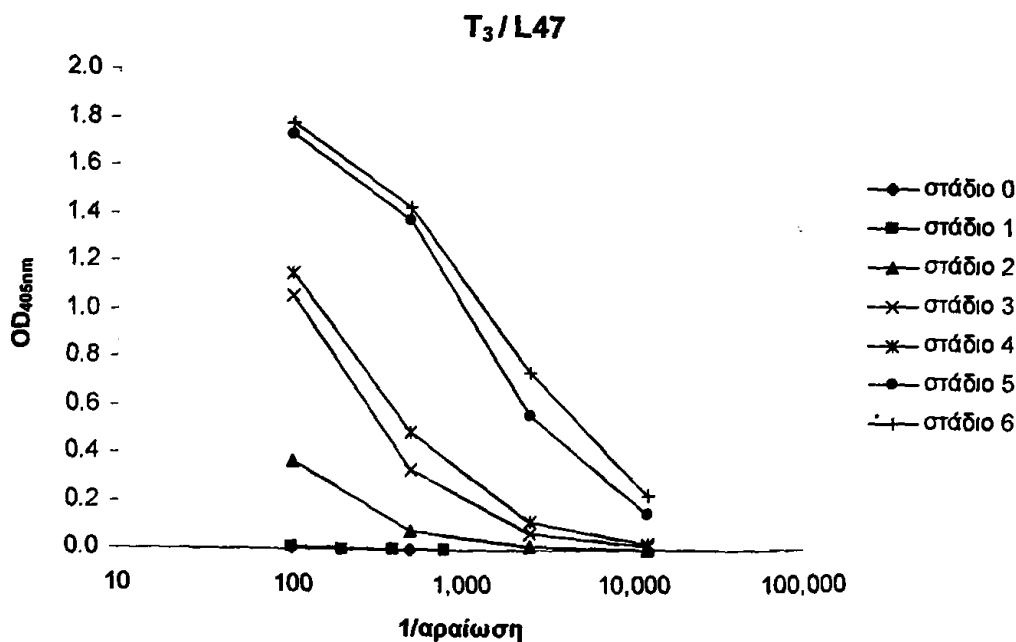
Η δραστηριότητα των αντιορών έναντι των ορμονών του θυρεοειδούς (T_3 και T_4), ελέγχθηκε με ELISA, όπου χρησιμοποιήθηκαν σαν ακινητοποιημένα αντιγόνα συζεύγματα των ορμονών με αλβουμίνη ορού κουνελιού (RSA). Ως μάρτυρας, ελέγχθηκε και η δραστηριότητα έναντι μη συζευγμένης RSA. Στο Σχήμα 35 παρουσιάζονται οι καμπύλες τιτλοδότησης των αντιορών που ελήφθησαν από τα κουνέλια L46 και L47, ενώ στο Σχήμα 36 παρουσιάζεται η δραστηριότητα στα διαδοχικά στάδια ανοσοποίησης. Συνάγεται ότι, κατά την ανοσοποίηση με ανθρώπινη Tg, από το στάδιο 2 αναπτύσσονται αντισώματα

έναντι των ορμονών του θυρεοειδούς, η δραστικότητα των οποίων μεγιστοποιείται στο στάδιο 4 για το κουνέλι L46 και στο στάδιο 5 για το κουνέλι L47. Η δραστικότητα έναντι T_3 και η δραστικότητα έναντι T_4 είναι συγκρίσιμες μεταξύ τους (Σχήμα 35). Τα ζώα-μάρτυρες, τα οποία ενέθηκαν μόνο με CFA, δεν παρουσίασαν δραστικότητα έναντι των δύο ορμονών. Τα απομονωμένα αντι-Tg αντισώματα από το στάδιο 2 και μετά, παρουσιάζουν υψηλή δραστικότητα έναντι των συζευγμάτων των T_3 και T_4 με RSA (Σχήμα 37, Σχήμα 38), ενώ οι οροί μετά την αφαίρεση των αντι-Tg αντισωμάτων δεν αντιδρούν με τα παραπάνω συζεύγματα (Σχήμα 39). Κατά συνέπεια, η δραστικότητα των αντιορών έναντι των ορμονών του θυρεοειδούς οφείλεται σε κάποια μερίδα των αντι-Tg αντισωμάτων. Η δραστικότητα έναντι T_3 και T_4 των αντι-Tg αντισωμάτων που εκλούνται σε pH 2.8 (χαμηλής συγγένειας για την Tg) είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη δραστικότητα των αντισωμάτων που εκλούνται σε pH 2.2 (υψηλής συγγένειας για την Tg) (Σχήμα 37, Σχήμα 38). Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι τα αντισώματα που αναγνωρίζουν τις θυρεοειδικές ορμόνες ανήκουν κυρίως στα χαμηλής συγγένειας αντι-Tg αντισώματα. Παρόλο που στο στάδιο 1 η δραστικότητα έναντι της ανθρώπινης Tg ήταν ήδη αυξημένη (Σχήμα 31, σελ. 104), η δραστικότητα έναντι των ορμονών του θυρεοειδούς γίνεται σημαντική από το στάδιο 2 και μετά. Αυτό είναι το στάδιο, στο οποίο γίνεται σημαντικότερη και η δραστικότητα έναντι των ετερόλογων Tg. Θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι σημαντικό μέρος της διασταυρούμενης αντίδρασης ανάμεσα σε Tg από διαφορετικά ζωικά είδη οφείλεται σε αντισώματα που αναγνωρίζουν τις ορμόνες του θυρεοειδούς που βρίσκονται πάνω στο μόριο της Tg.





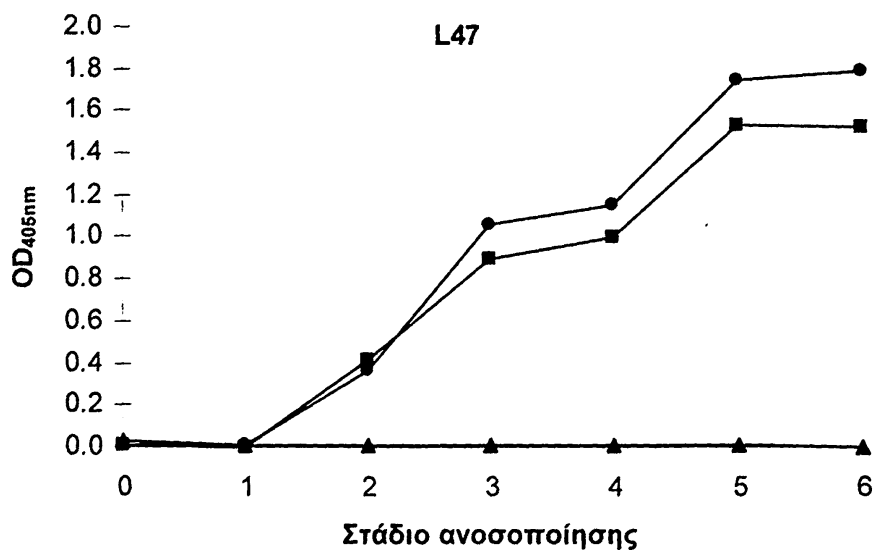
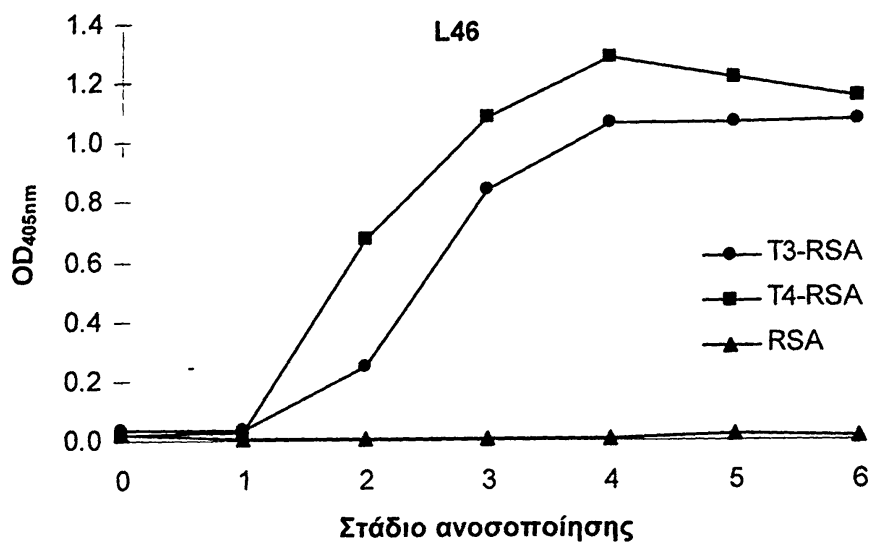
Σχήμα 35. Συνεχίζεται.



Σχήμα 35. Καμπύλες τιτλοδότησης για τη δραστικότητα των ορών έναντι ορμονών του θυρεοειδούς T₃ και T₄, συζευγμένων με αλβουμίνη ορού κουνελιού (RSA), από τα διαδοχικά στάδια ανοσοποίησης των κουνελιών L46 και L47. Παριστάνεται η δραστικότητα (οπτική απορρόφηση) συναρτήσει της αραίωσης των ορών.

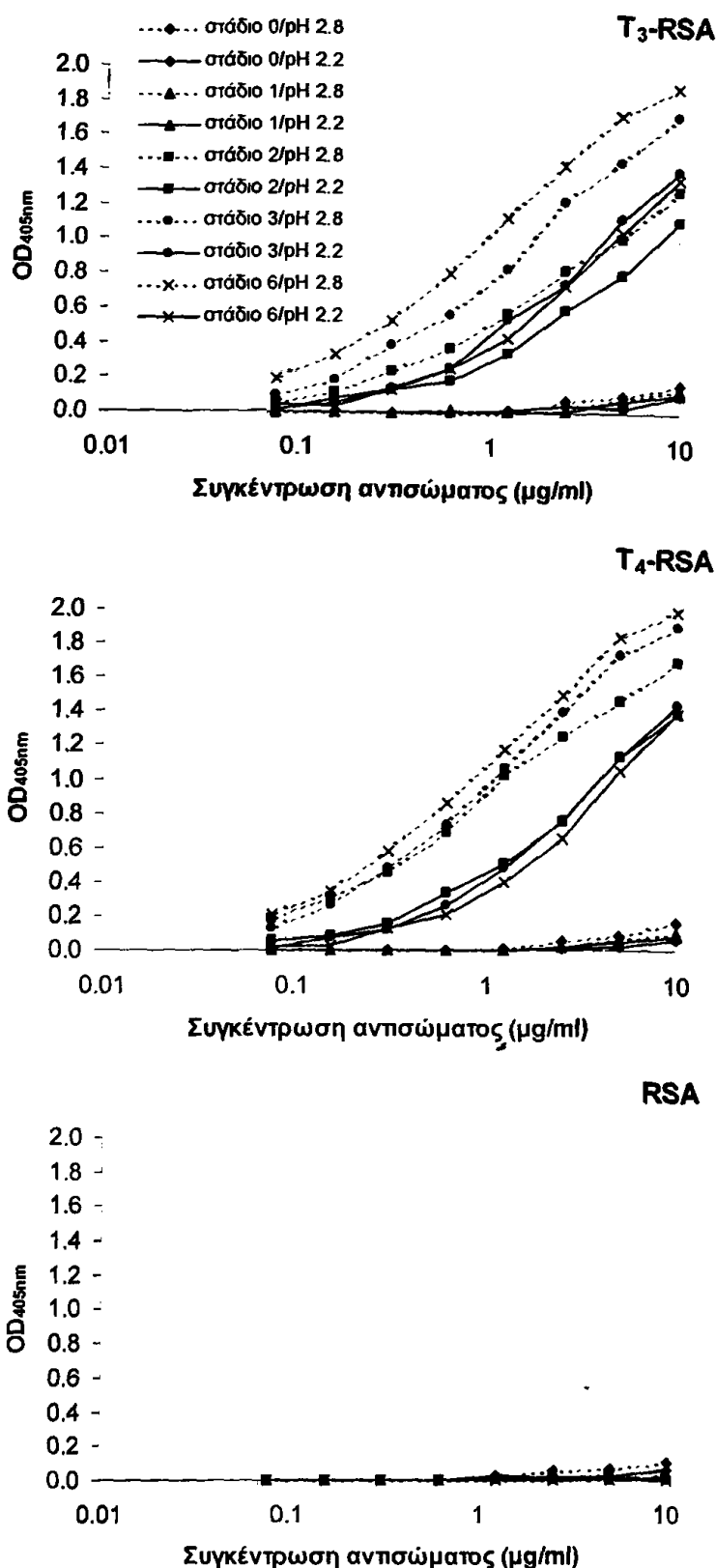
➤ Κατά τα διαδοχικά στάδια ανοσοποίησης, αναπτύσσεται διαδοχικά αυξανόμενη δραστικότητα έναντι των ορμονών του θυρεοειδούς. Η δραστικότητα έναντι T₃ και αυτή έναντι T₄ είναι μεταξύ τους παρόμοιες.





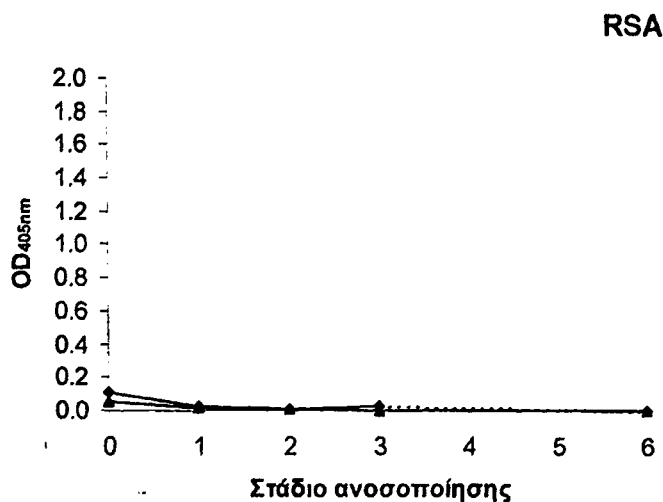
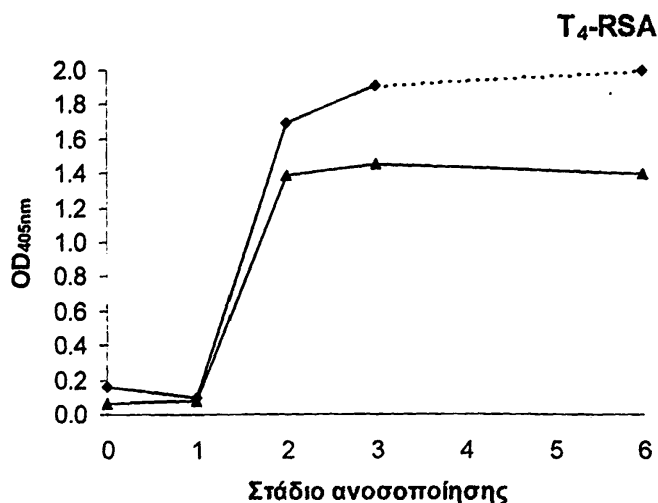
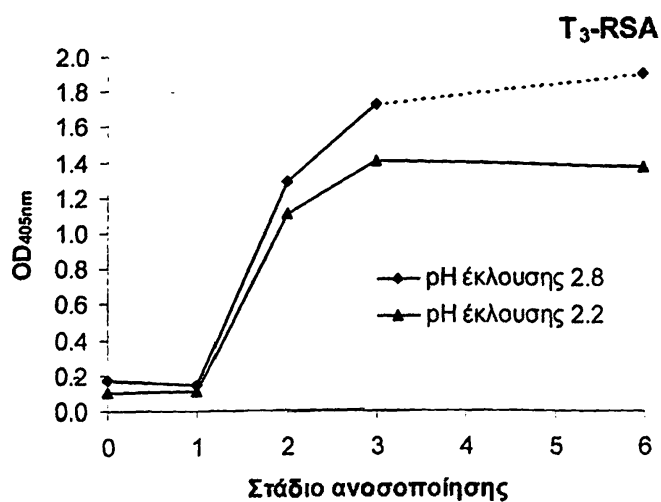
Σχήμα 36. Δραστικότητα των ορών έναντι των ορμονών του θυρεοειδούς T_3 και T_4 , συζευγμένων με RSA, από τα διαδοχικά στάδια ανοσοποίησης των κουνελιών L46 και L47, σε αραιώση 1:100. Ως μάρτυρας, ελέγχθηκε και η δραστικότητα έναντι μη συζευγμένης RSA.

➤ Συνάγεται ότι κατά την ανοσοποίηση με Tg, από το στάδιο 2 και μετά, αναπτύσσεται δραστικότητα έναντι των ορμονών του θυρεοειδούς T_3 και T_4 .



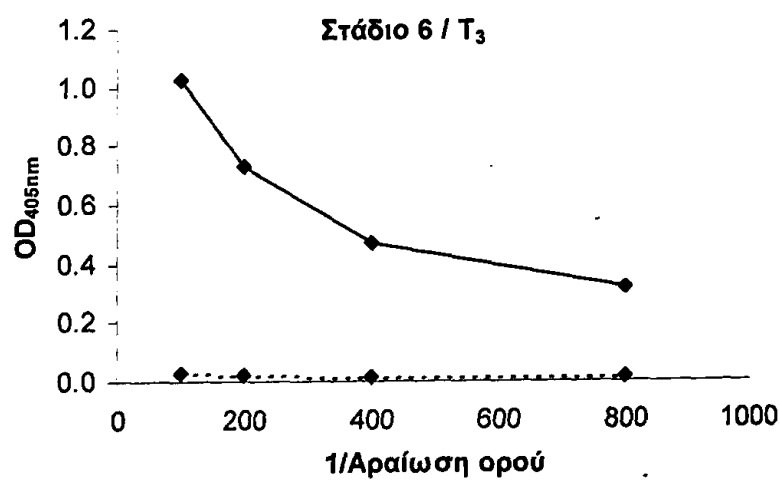
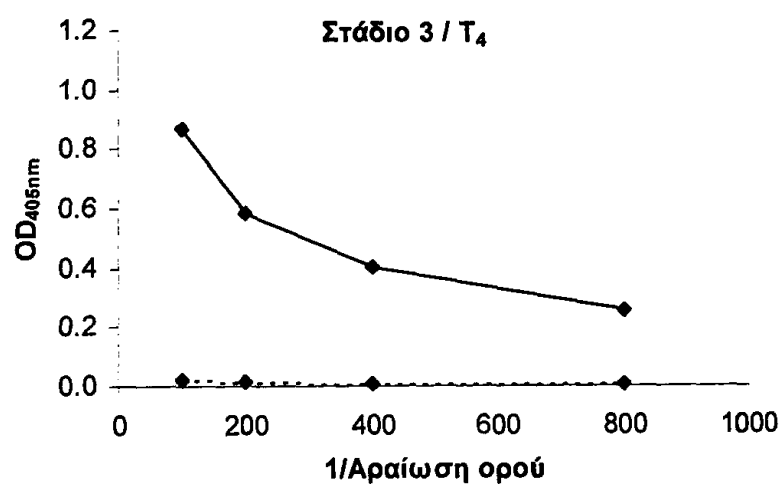
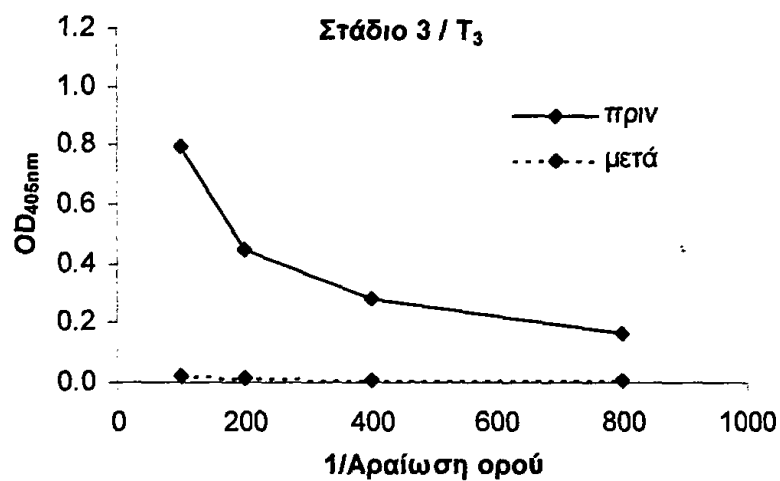
Σχήμα 37. Δραστικότητα απομονωμένων αντι-Tg αντισωμάτων από τα στάδια 0, 1, 2, 3 και 6 του ζώου L46 έναντι συζευγμάτων των ορμονών T₃-RSA και T₄-RSA και RSA. Παρουσιάζεται χωριστά η δραστικότητα των κλασμάτων έκλουσης σε pH 2.8 και pH 2.2. Το σχήμα απεικονίζει την OD συναρτήσει της συγκέντρωσης αντισώματος.

➤ Τα αντι-Tg αντισώματα αντιδρούν με τις ορμόνες από το στάδιο 2 και μετά. Τα χαμηλής συγγένειας αντι-Tg αντισώματα (έκλουση σε pH 2.8) αντιδρούν πιο ισχυρά με τις T₃ και T₄ (οι καμπύλες τιτλοδότησης για τα χαμηλής συγγένειας αντι-Tg αντισώματα είναι μετατοπισμένες προς μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αντισώματος).

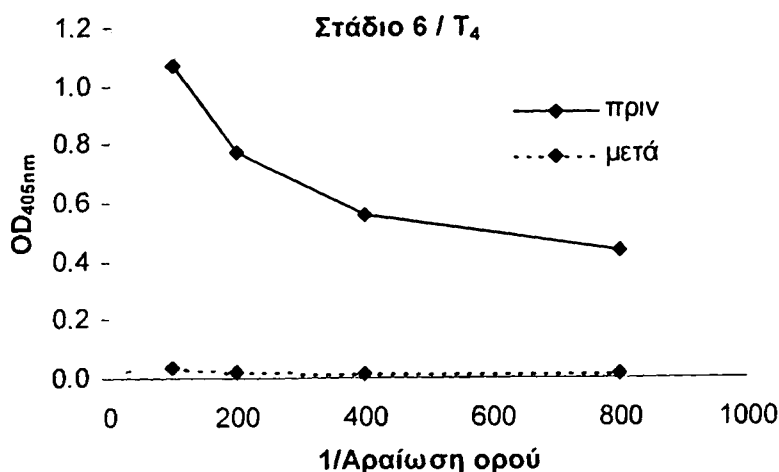


Σχήμα 38. Δραστικότητα απομονωμένων αντι-Tg αντισωμάτων από τα στάδια 0, 1, 2, 3 και 6 του ζώου L46 έναντι T₃-RSA και T₄-RSA και RSA. Παρουσιάζεται χωριστά η δραστικότητα των κλάσμάτων έκλουσης σε pH 2.8 και pH 2.2. Το σχήμα απεικονίζει την OD συναρτήσει του σταδίου ανοσοποίησης σε συγκέντρωση αντισωμάτων 10μg/ml.

➤ Τα αντι-Tg αντισώματα αντιδρούν με τα συμπλέγματα T₃-RSA και T₄-RSA από το στάδιο 2 και μετά, αλλά όχι με την RSA, άρα η δραστικότητα είναι ειδική μόνο για τις ορμόνες. Τα χαμηλής συγγένειας αντι-Tg αντισώματα αντιδρούν πιο ισχυρά με τις T₃ και T₄.



Σχήμα 39. Συνεχίζεται.

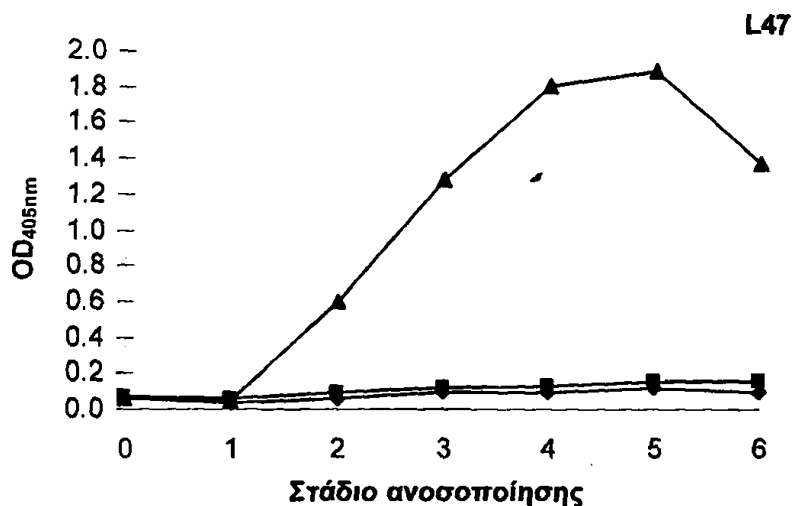
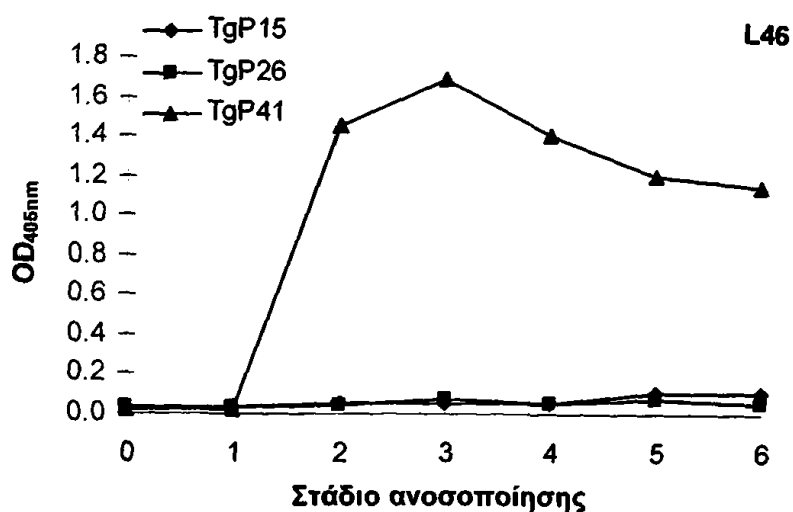


Σχήμα 39. Δραστικότητα των αντιορών από τα στάδια 3 και 6 του ζώου L46 έναντι των συζευγμάτων T_3 -RSA και T_4 -RSA, πριν και μετά την απομάκρυνση των αντι-Tg αντισωμάτων. Το σχήμα απεικονίζει την OD συναρτήσει της αραίωσης των ορών.

➤ Η δραστικότητα έναντι T_3 και T_4 χάνεται μετά την απομάκρυνση των αντι-Tg αντισωμάτων.

4.2.1.3 Δραστικότητα έναντι πεπτιδίων της Tg

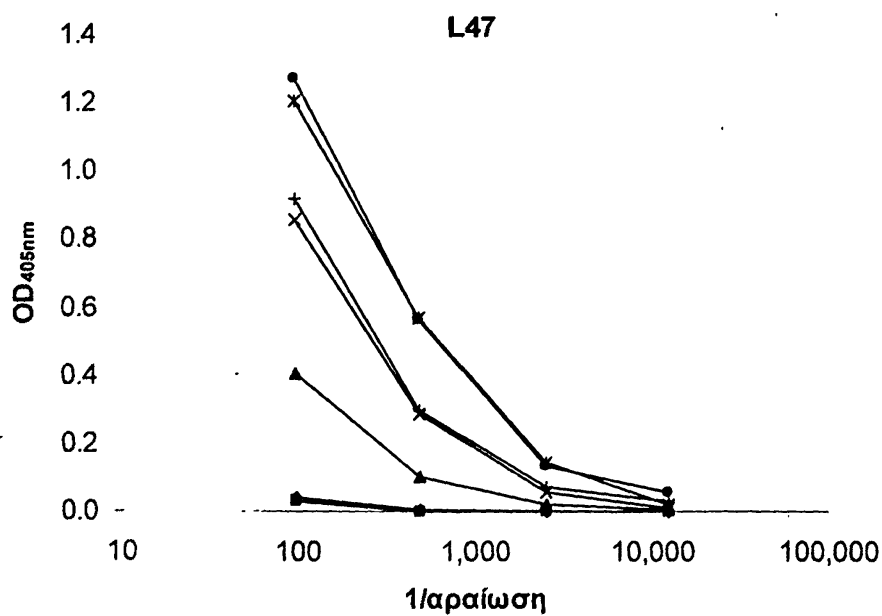
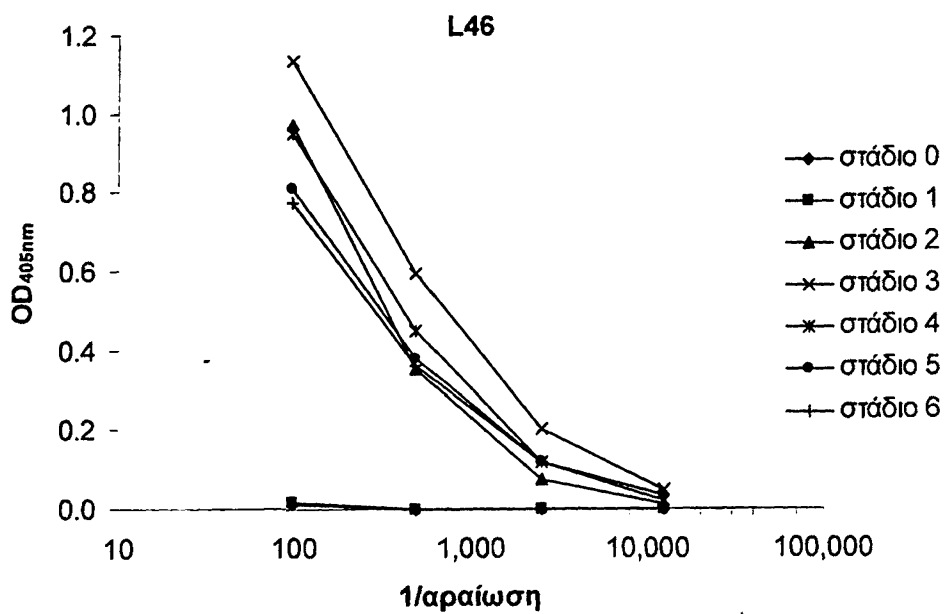
Διερευνήθηκε κατά πόσον οι αντιοροί από κουνέλια ανοσοποιημένα με hTg, αναγνωρίζουν τα τρία πεπτίδια της hTg (TgP15, TgP26 και TgP41, Πίνακας III, σελ. 87) τα οποία, όπως διαπιστώθηκε στην παρούσα μελέτη, περιλαμβάνουν αυτοεπιτόπους της Tg που αναγνωρίζονται από αντισώματα ασθενών με νόσο Graves (§ 4.1.2). Στο Σχήμα 40 παρουσιάζεται η δραστικότητα των αντιορών που ελήφθησαν στα διαδοχικά στάδια ανοσοποίησης από τα κουνέλια L46 και L47, έναντι των πεπτιδίων. Αναπτύσσεται υψηλή δραστικότητα έναντι του πεπτιδίου TgP41 μετά τη δεύτερη ανοσοποίηση (στάδιο 2), ενώ οι αντιοροί δεν αντιδρούν με τα άλλα δύο πεπτίδια. Τα ζώα-μάρτυρες, τα οποία ενέθηκαν μόνο με CFA, δεν παρουσίασαν δραστικότητα έναντι των παραπάνω πεπτιδίων. Συμπεραίνεται ότι το πεπτίδιο TgP41 πιθανότατα περιλαμβάνει επίτοπο των αντι-Tg αντισωμάτων που επάγονται κατά την πειραματική ανοσοποίηση με hTg. Στο Σχήμα 41, παρουσιάζονται οι καμπύλες τιτλοδότησης των ορών για το πεπτίδιο TgP41. Στο ζώο L46, η δραστικότητα έναντι του πεπτιδίου TgP41 μεγιστοποιείται στο στάδιο 3 και στη συνέχεια μειώνεται σταδιακά, ενώ το μέγιστο της δραστικότητας έναντι αυτού του πεπτιδίου στο ζώο L47 εμφανίζεται κατά το στάδιο 5 και στη συνέχεια μειώνεται.



Σχήμα 40. Δραστικότητα των αντιορών, από κουνέλια ανοσοποιημένα με ανθρώπινη Tg, έναντι τριών πεπτιδίων της ανθρώπινης Tg: TgP15, TgP26 και TgP41 (2339-2358, 2471-2490 και 2651-2670 της ανθρώπινης Tg, αλληλουχίες: QVAALTWNQTHIRGFGGDPR, PPARALKRSLWNEVDLLIGS και PYEFSRKVNPTFATPWPDFVP, αντίστοιχα). Στο σχήμα, παρουσιάζεται η δραστικότητα των αντιορών που ελήφθησαν στα διαδοχικά στάδια ανοσοποίησης από τα κουνέλια L46 και L47, σε αραιώσεις 1:100.

➤ Δραστικότητα έναντι του πεπτιδίου TgP41 αναπτύσσεται και στα δύο κουνέλια, από το στάδιο 2 και μετά. Οι αντιοροί δεν αντιδρούν με τα άλλα δύο πεπτίδια.





Σχήμα 41. Καμπύλες τιτλοδότησης των ορών από τα στάδια 0 - 6 των κουνελιών L46 και L47, για το πεπτιδίο TgP41. Απεικονίζεται η OD συναρτήσει της αραίωσης των ορών.

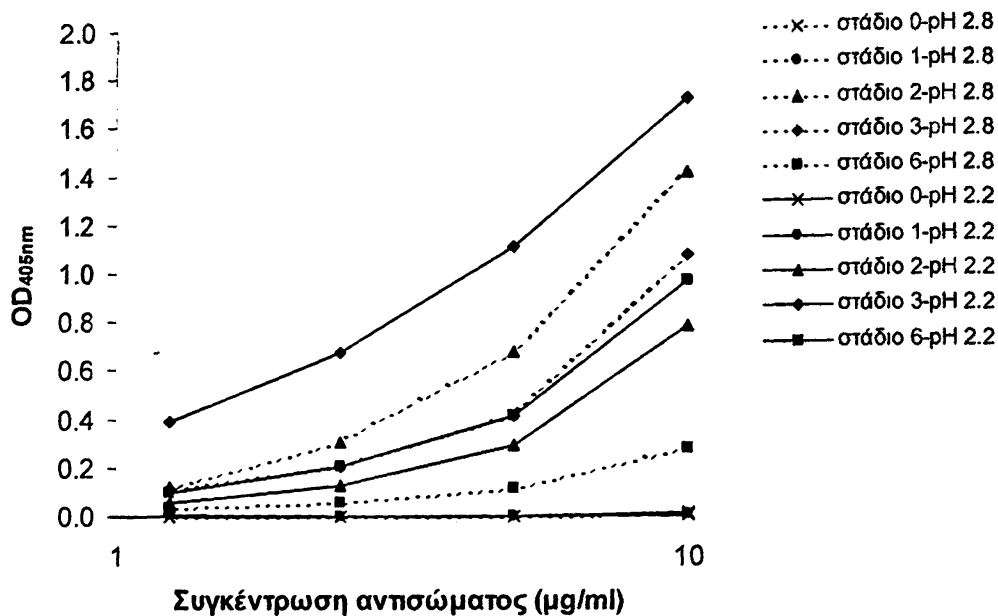
➤ : Ισχυρή δραστικότητα για το πεπτιδίο παρατηρείται και στα δύο ζώα από το στάδιο 2 και μετά.

Για να επιβεβαιωθεί ότι το πεπτίδιο περιλαμβάνει πράγματι επίτοπο της Tg, ελέγχθηκε η δραστικότητα των απομονωμένων ειδικών αντι-Tg αντισωμάτων του κουνελιού L46 έναντι του πεπτιδίου TgP41. Στο Σχήμα 42, παρουσιάζεται ξεχωριστά η δραστικότητα για κάθε κλάσμα έκλουσης (pH 2.8 και pH 2.2). Τα αντι-Tg/pH 2.8 παρουσιάζουν μέγιστη δραστικότητα στο στάδιο 2, όπου υπερτερούν έναντι των αντι-Tg/pH 2.2, ενώ η δραστικότητα των αντι-Tg/pH 2.2 γίνεται μέγιστη στο στάδιο 3 και υπερτερεί έναντι της αντίστοιχης των αντι-Tg/pH 2.8. Κατά συνέπεια, η δραστικότητα έναντι του TgP41 κατά το στάδιο 2 οφείλεται κυρίως στα χαμηλής συγγένειας αντι-Tg αντισώματα. Αντίθετα, στα επόμενα στάδια, η δραστικότητα έναντι του TgP41 οφείλεται κυρίως στα υψηλής συγγένειας αντι-Tg αντισώματα. Δηλαδή, αρχικά τα αντισώματα έναντι του πεπτιδίου ανήκουν στα χαμηλής συγγένειας αντι-Tg αντισώματα, ενώ στη συνέχεια η συγγενειά τους αυξάνει.

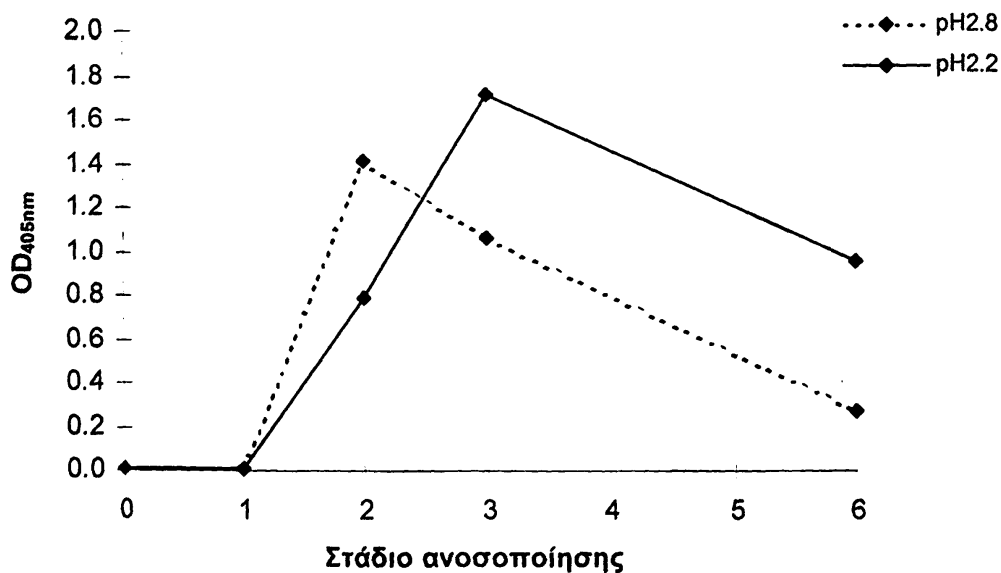
Για να επιβεβαιωθεί περαιτέρω ότι το πεπτίδιο TgP41 περιλαμβάνει επίτοπο της Tg που αναγνωρίζεται από επαγόμενα αντισώματα, ελέγξαμε αν τα αντισώματα που αναγνωρίζουν το πεπτίδιο TgP41 μπορούν να προσδεθούν και στην Tg. Από τον αντιορό του σταδίου 6 του κουνελιού L46, πραγματοποιήθηκε απομόνωση αντισωμάτων έναντι του πεπτιδίου TgP41 με χρωματογραφία συγγένειας σε σφαιρίδια Sepharose 4B ενεργοποιημένα με CNBr στα οποία είχε προσδεθεί το πεπτίδιο TgP41. Η συγκέντρωση των αντισωμάτων που απομονώθηκαν ήταν 2.4 $\mu\text{g/ml}$ ορού. Η ποσότητα των αντισωμάτων έναντι του πεπτιδίου TgP41 είναι περίπου το 0.5% των αντισωμάτων έναντι Tg. Στη συνέχεια, ελέγχθηκε η δραστικότητα των αντι-TgP41 αντισωμάτων έναντι του TgP41 (Σχήμα 43α), καθώς και η δραστικότητα του ορού, πριν και μετά την αφαίρεση των αντι-TgP41 (Σχήμα 43β). Με τον τρόπο αυτό, επιβεβαιώνεται η αποτελεσματική απομόνωση των αντισωμάτων.



(α)



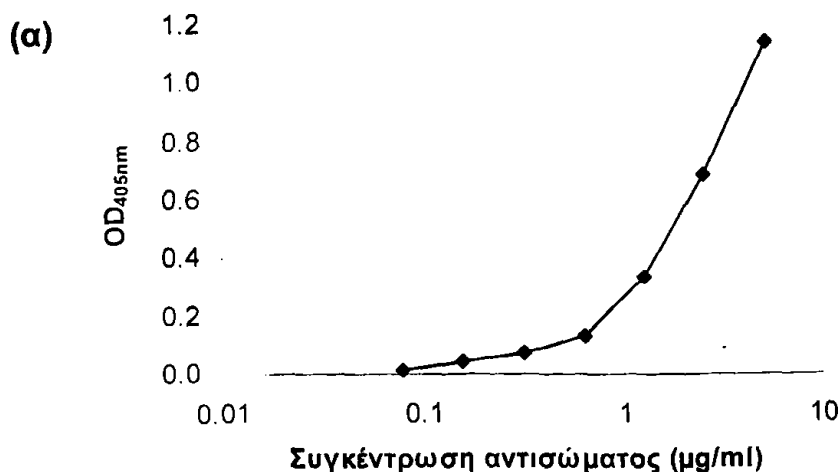
(β)



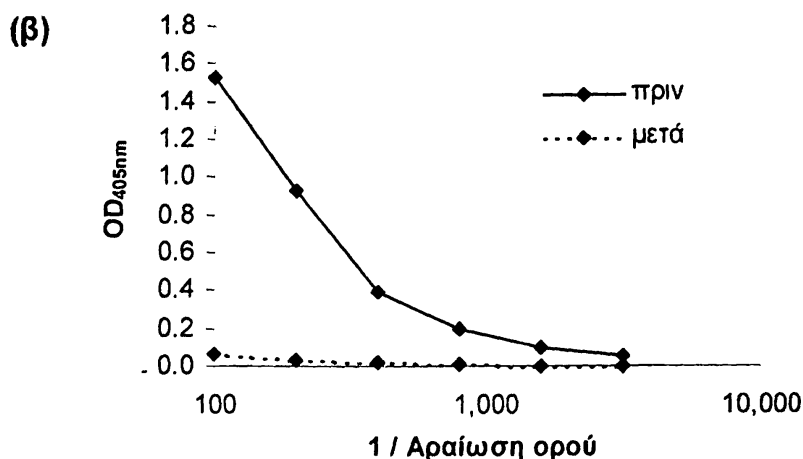
Σχήμα 42. Δραστικότητα των απομονωμένων ειδικών αντι-Tg αντισωμάτων έναντι του πεπτιδίου TgP41 της hTg. Παρουσιάζεται ξεχωριστά η δραστικότητα για κάθε κλάσμα έκλουσης (pH 2.8 και pH 2.2), (α) συναρτήσει της συγκέντρωσης αντισώματος (καμπύλες τιτλοδότησης) και (β) σε συγκέντρωση 10μg/ml, για τα διαδοχικά στάδια ανοσοποίησης.

➤ Στο στάδιο 2, υπερτερεί η δραστικότητα των αντι-Tg που εκκλούνται σε pH 2.8, ενώ στα επόμενα στάδια η δραστικότητα έναντι του πεπτιδίου οφείλεται κυρίως στα αντι-Tg που εκκλούνται σε pH 2.2.

Επίσης, εξετάστηκε η αναστολή πρόσδεσης των αντι-TgP41 στο ακινητοποιημένο TgP41 από το αυτόλογο πεπτίδιο και από ένα άλλο πεπτίδιο της Tg (TgP15) (Σχήμα 44), ώστε να επιβεβαιωθεί ότι η δραστηριότητα των αντισωμάτων είναι ειδική για το πεπτίδιο και δεν οφείλεται σε μη ειδική αντίδραση. Πράγματι, τα ειδικά για το TgP41 αντισώματα αναγνωρίζουν το πεπτίδιο αυτό (Σχήμα 43α), ενώ η έναντι TgP41 δραστηριότητα του ορού μηδενίζεται μετά την αφαίρεση των ειδικών αντισωμάτων (Σχήμα 43β). Το αυτόλογο πεπτίδιο αναστέλλει την πρόσδεση των απομονωμένων αντι-TgP41 στο ακινητοποιημένο πεπτίδιο TgP41, ενώ το πεπτίδιο TgP15 δεν προκαλεί αναστολή (Σχήμα 44). Επίσης, ελέγχθηκε η αναστολή πρόσδεσης των αντι-TgP41 σε ακινητοποιημένη hTg και rabTg από διαλυτό TgP41. Το διαλυτό πεπτίδιο TgP41 (μέχρι τη συγκέντρωση 25 ηmol/ml) δεν αναστέλλει την πρόσδεση των αντι-TgP41 σε ακινητοποιημένη hTg ή rabTg. Πιθανόν η συγγένεια των αντι-TgP41 να είναι πολύ μεγαλύτερη για τη φυσική Tg από ότι για το πεπτίδιο TgP41.

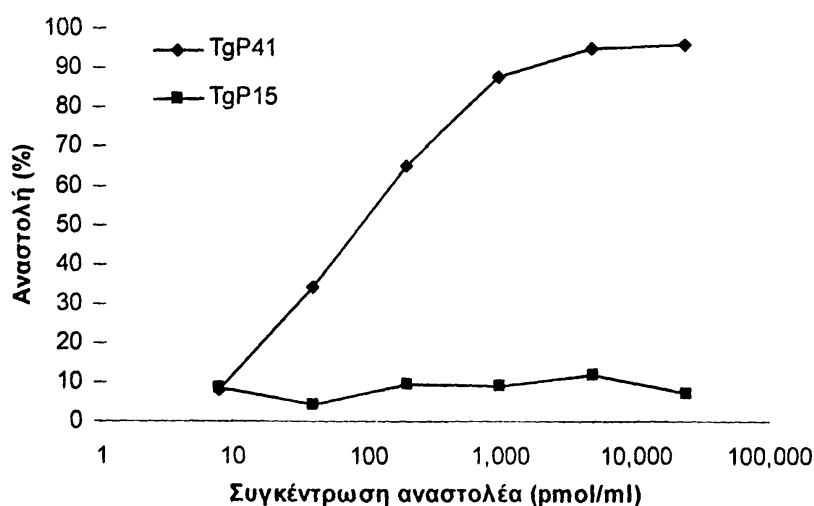


Σχήμα 43. Συνεχίζεται.



Σχήμα 43. (α) Δραστικότητα των ειδικών αντι-TgP41 αντισωμάτων από το στάδιο 6 του κουνελιού L46 έναντι του TgP41. Παρουσιάζεται η OD συναρτήσει της συγκέντρωσης αντισώματος. (β) Δραστικότητα του αντιορού του σταδίου 6 έναντι του TgP41, πριν και μετά την αφαίρεση των αντι-TgP41. Παρουσιάζεται η OD συναρτήσει της αραίωσης του αντιορού.

➤ Τα πειράματα αυτά επιβεβαιώνουν την αποτελεσματική απομόνωση των ειδικών για το πεπτιδίο αντισωμάτων.

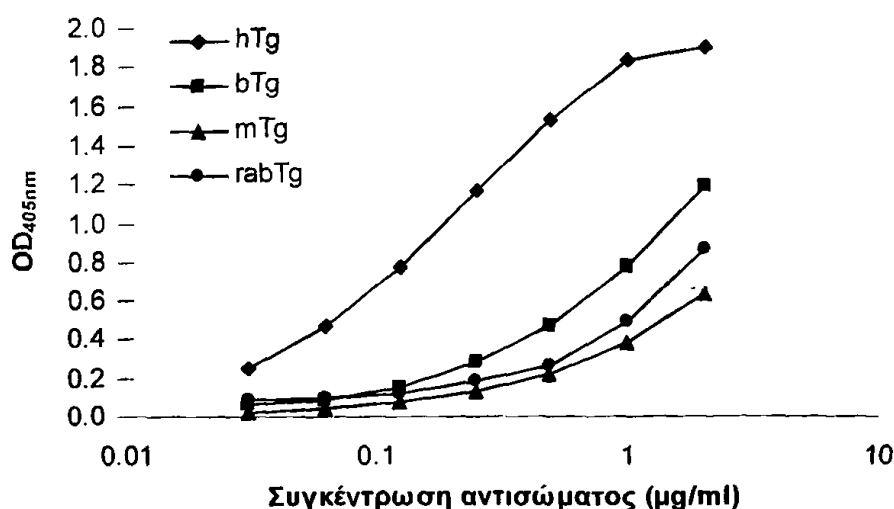


Σχήμα 44. Δοκιμασία αναστολής πρόσδεσης των ειδικών αντι-TgP41 στο ακινητοποιημένο TgP41 από το αυτόλογο πεπτιδίο και από ένα άλλο πεπτιδίο της Tg (TgP15). Παρουσιάζεται το ποσοστό αναστολής σαν συνάρτηση της συγκέντρωσης του αναστολέα. Το αυτόλογο πεπτιδίο παρεμποδίζει σε ποσοστό περίπου 100%, ενώ το πεπτιδίο-μάρτυρας δεν παρεμποδίζει.

➤ Αποδεικνύεται ότι η δραστικότητα έναντι του πεπτιδίου οφείλεται σε ειδική αναγνώριση και όχι σε μη ειδική πρόσδεση.

Ο έλεγχος της δραστικότητας των απομονωμένων αντι-TgP41 έναντι Tg από άνθρωπο, βόδι, ποντικό και κουνέλι έδειξε ότι τα αντι-TgP41 αντιδρούν κυρίως με την ανθρώπινη Tg και λιγότερο με τις Tg των άλλων ειδών (Σχήμα 45). Συμπεραίνεται ότι τα αντισώματα έναντι του επιτόπου που

περιλαμβάνεται στο συγκεκριμένο πεπτιδίο, αναγνωρίζουν ισχυρά την αλληλουχία που αντιστοιχεί στην ανθρώπινη Tg, όμως αναγνωρίζουν ασθενέστερα και τις ομόλογες αλληλουχίες από τα άλλα είδη. Θα μπορούσαμε κατά συνέπεια να υποθέσουμε ότι η διασταυρούμενη αντίδραση των αντιορών έναντι Tg διαφορετικών ειδών οφείλεται εν μέρει στην αναγνώριση ομόλογων αλληλουχιών. Η διασταυρούμενη αντίδραση οφείλεται επίσης στην αναγνώριση των ορμονών του θυρεοειδούς πάνω στο μόριο της Tg. Η ομολογία μεταξύ του πεπτιδίου TgP41 και της αντίστοιχης αλληλουχίας της Tg από άλλα είδη (Πίνακας IX) είναι 75% (χωρίς να ληφθούν υπόψη οι συντηρητικές υποκαταστάσεις). Μετά την απομάκρυνση των αντι-TgP41 από τον αντιορό, η αντι-Tg δραστηριότητα δεν ελαττώθηκε (Σχήμα 46). Αυτό είναι αναμενόμενο αφού κατά την ανοσοποίηση με Tg αναπτύσσονται αντισώματα έναντι πολλών διαφορετικών επιτόπων της Tg (όπως αναφέρθηκε, τα αντισώματα έναντι του συγκεκριμένου πεπτιδίου αποτελούν το 0.5% των συνολικών αντι-Tg αντισωμάτων). Η απομάκρυνση των αντισωμάτων που κατευθύνονται έναντι ενός από τους επιτόπους αυτούς δεν αναμένεται να μειώσει αισθητά τη δραστηριότητα του ορού έναντι ολόκληρου του μορίου της Tg.



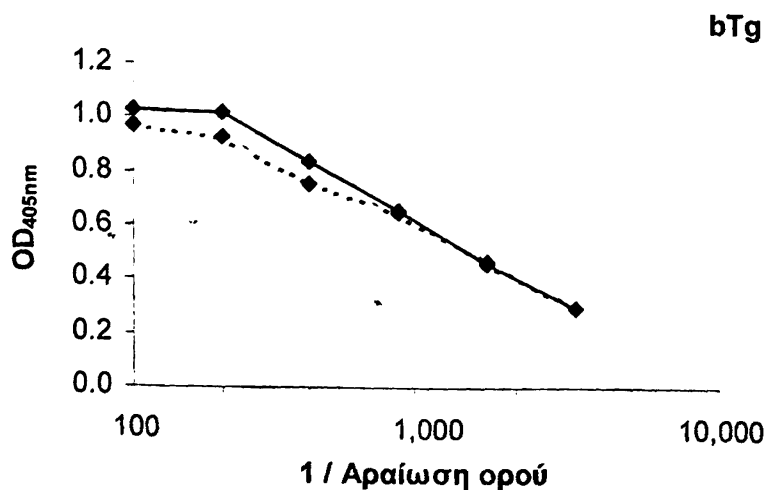
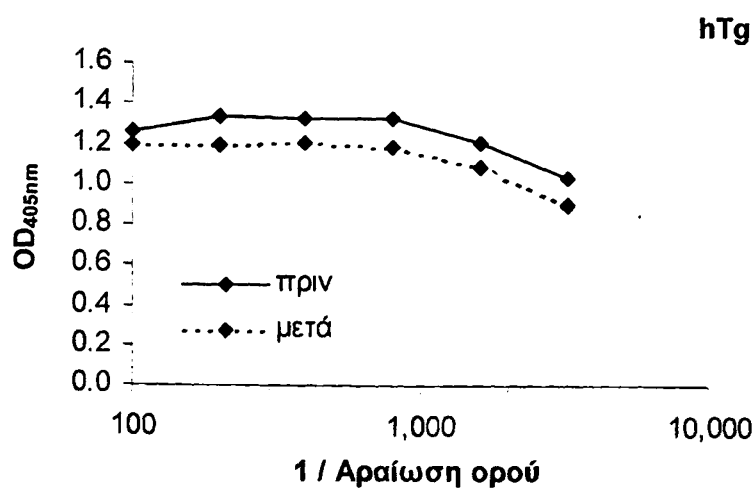
Σχήμα 45. Δραστηριότητα των απομονωμένων αντι-TgP41 αντισωμάτων, έναντι της Tg από άνθρωπο, βόδι, ποντικό και κουνέλι. Στο σχήμα παρουσιάζεται η OD συναρτήσει της συγκέντρωσης του αντισώματος.

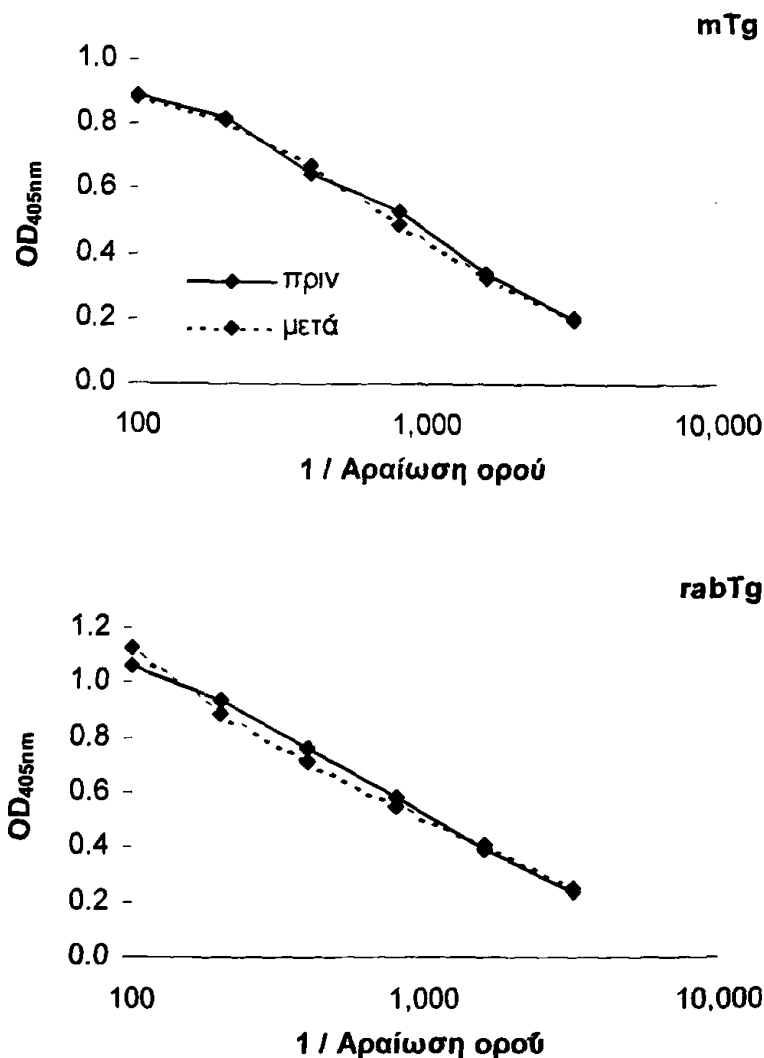
➤ Τα αντι-TgP41 αντισώματα αντιδρούν κυρίως με την ανθρώπινη Tg, όμως αναγνωρίζουν ασθενέστερα και τις Tg από άλλα είδη.



Πίνακας ΙΧ. Σύγκριση των αλληλουχιών που είναι ομόλογες με το πεπτίδιο TgP41 της ανθρώπινης Tg. Με διπλή υπογράμμιση σημειώνονται τα αμινοξέα που είναι ταυτόσημα με την αλληλουχία της hTg, ενώ με απλή υπογράμμιση σημειώνονται οι συντηρητικές υποκαταστάσεις. Το ποσοστό ομολογίας που αναγράφεται αναφέρεται στα ταυτόσημα αμινοξέα.

Είδος	Αλληλουχία	ομολογία
hTg	P Y E F S R K V P T F A T P W P D F V P	
bTg	<u>P</u> <u>H</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>R</u> A <u>P</u> E <u>E</u> <u>A</u> A <u>P</u> <u>W</u> <u>P</u> <u>D</u> <u>E</u> <u>V</u> <u>P</u>	75%
mTg	<u>P</u> <u>H</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>K</u> A A E <u>E</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>P</u> <u>W</u> <u>P</u> <u>D</u> <u>E</u> <u>V</u> <u>P</u>	75%
rTg	<u>P</u> <u>H</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>K</u> A A E <u>E</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>P</u> <u>W</u> <u>P</u> <u>D</u> <u>E</u> <u>V</u> <u>P</u>	75%





Σχήμα 46. Δραστικότητα του αντιορού 6 του ζώου L46 πριν και μετά την απομάκρυνση των αντι-TgP41 αντισωμάτων, έναντι Tg διαφόρων ζωικών ειδών (hTg, bTg, mTg και rabTg). Στο σχήμα παριστάνεται η OD συναρτήσει της αραίωσης του αντιορού.

➤ Δεν υπάρχει ιδιαίτερη μείωση στην αντι-Tg δραστικότητα του ορού μετά την απομάκρυνση των αντι-TgP41 αντισωμάτων.

4.2.2 Πειραματική ανοσοποίηση με το πεπτιδίο TgP41

Όπως διαπιστώθηκε, το πεπτιδίο TgP41 (2651-2670 της ανθρώπινης Tg, αλληλουχία: PYEFSRKVPTFATPWPDFVP) αποτελεί επίτοπο των αντι-Tg αντισωμάτων, που παράγονται κατά την ανοσοποίηση κουνελιών με hTg. Για το λόγο αυτό θελήσαμε να διαπιστώσουμε αν η περιοχή αυτή της hTg είναι και ανοσογονική, δηλαδή αν η χορήγηση του πεπτιδίου TgP41 σε πειραματόζωα προκαλεί την παραγωγή αντισωμάτων, τα οποία θα

αναγνωρίζουν το πεπτιδίο καθώς και την αλληλουχία του πεπτιδίου πάνω στη φυσική πρωτεΐνη.

Για το σκοπό αυτό, δύο ενήλικα λευκά κουνέλια Νέας Ζηλανδίας (L48 και L49) ενέθηκαν υποδορίως με 100μg πεπτιδίου TgP41, σε αιώρημα πλήρους ανοσοενισχυτικού εκδόχου του Freund (CFA) ανά δύο εβδομάδες, συνολικά έξι φορές (στάδια 1-6). Αιμοληψία έγινε πριν την ανοσοποίηση (στάδιο 0) και 8-10 ημέρες μετά από κάθε ανοσοποίηση (στάδια 1-6). Οι οροί από τα στάδια 0-6 και απομονωμένα, με χρωματογραφία συγγένειας, αντι-TgP41 και αντι-Tg αντισώματα από τα στάδια 3 και 6, ελέγχθηκαν με ELISA, για δραστικότητα έναντι του πεπτιδίου TgP41, της ανθρώπινης και ετερόλογων Tg καθώς και των ορμονών T_3 και T_4 .

4.2.2.1 Ορολογική απόκριση έναντι του πεπτιδίου TgP41

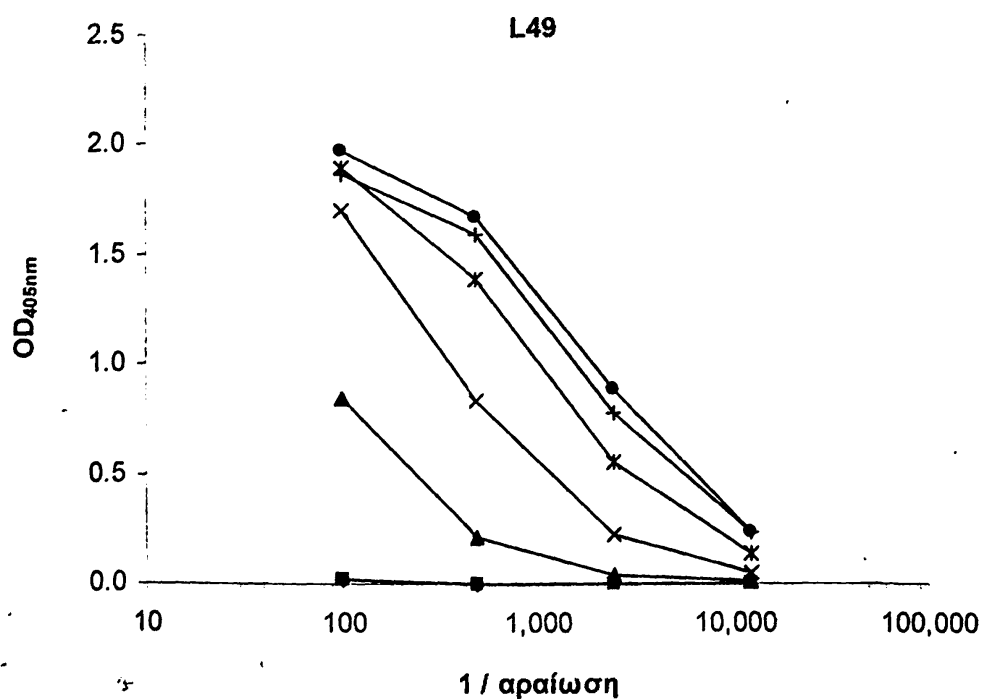
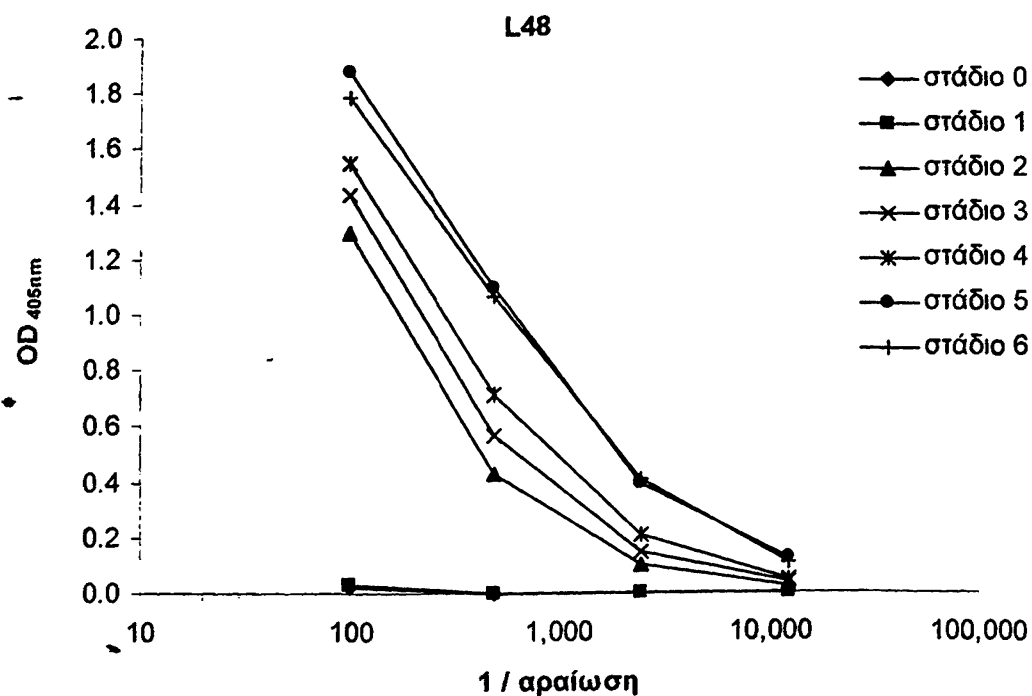
Η ορολογική απόκριση έναντι του πεπτιδίου TgP41, των κουνελιών που ανοσοποιήθηκαν με το TgP41 ελέγχθηκε με ELISA. Στο Σχήμα 47 παρουσιάζονται οι καμπύλες τιτλοδότησης των αντιορών που συλλέχθηκαν στα διαδοχικά στάδια ανοσοποίησης από τα δύο ζώα, ενώ στο Σχήμα 48 παριστάνεται η δραστικότητα των αντιορών από τα διαδοχικά στάδια ανοσοποίησης σε αραιώσεις 1:100 και 1:2,500. Στην αραιώση 1:100, μεγιστοποιείται η δραστικότητα, ενώ σε αραιώση 1:2,500 διακρίνονται καλύτερα οι διαφορές ανάμεσα στα διαδοχικά στάδια και μεταξύ των δύο ζώων. Παρατηρούμε ότι και στα δύο ζώα, μετά τη δεύτερη ανοσοποίηση, αναπτύσσεται ισχυρή απόκριση έναντι του πεπτιδίου. Μικρά μόρια, όπως τα πεπτιδία, για να προκαλέσουν παραγωγή αντισωμάτων, συνήθως πρέπει να συζευχθούν με φορείς, όπως πρωτεΐνες (BSA ή KLH) ή άλλα μόρια. Το TgP41 είναι ισχυρά ανοσογονικό, αφού η απόκριση ήταν ισχυρή, παρόλο που το πεπτιδίο χορηγήθηκε ελεύθερο, χωρίς να έχει συνδεθεί σε κάποιο φορέα. Όπως φαίνεται, σε μεγάλη αραιώση των αντιορών, αλλά και από τις καμπύλες τιτλοδότησης (Σχήμα 47, Σχήμα 48) το ζώο L49 έχει πιο ισχυρό τίτλο αντισωμάτων από το L48.

4.2.2.2 Ορολογική απόκριση έναντι Tg διαφόρων ζωικών ειδών και ορμονών του θυρεοειδούς

Η δραστικότητα των αντιορών από κουνέλια ανοσοποιημένα με το TgP41, έναντι Tg από διάφορα ζωικά είδη (hTg, bTg, pTg, mTg, ratTg και rabTg), ελέγχθηκε με ELISA. Στο Σχήμα 49, παρουσιάζονται οι καμπύλες τιτλοδότησης των αντιορών που συλλέχθηκαν από διαδοχικά στάδια ανοσοποίησης από τα δύο ζώα, ενώ το Σχήμα 50 παρουσιάζει τη δραστικότητα των ορών στα διαδοχικά στάδια ανοσοποίησης σε αραιώση 1:100, στην οποία μεγιστοποιείται η δραστικότητα και σε αραιώση 1:500, όπου διακρίνονται καλύτερα οι διαφορές ανάμεσα στα διαδοχικά στάδια ανοσοποίησης και μεταξύ των δύο ζώων. Παρατηρούμε ότι οι αντιοροί αντιδρούν κυρίως με την ανθρώπινη Tg με μέγιστη δραστικότητα μετά την 5^η ανοσοποίηση (Σχήμα 49, Σχήμα 50). Η αύξηση της δραστικότητας για τις Tg από τα άλλα είδη είναι πολύ μικρότερη. Αυτό σημαίνει ότι τα αντισώματα που παράγονται έναντι του πεπτιδίου TgP41 αναγνωρίζουν κυρίως την ανθρώπινη αλληλουχία.

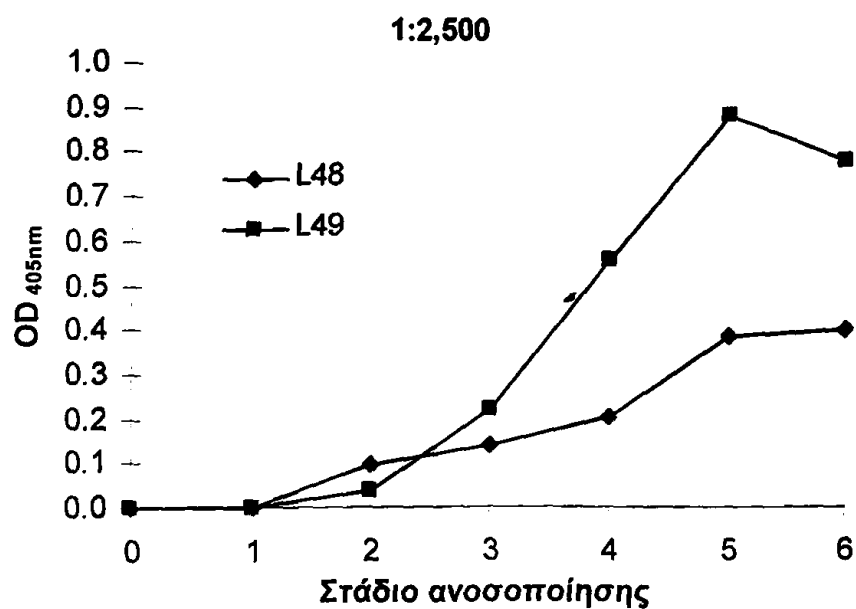
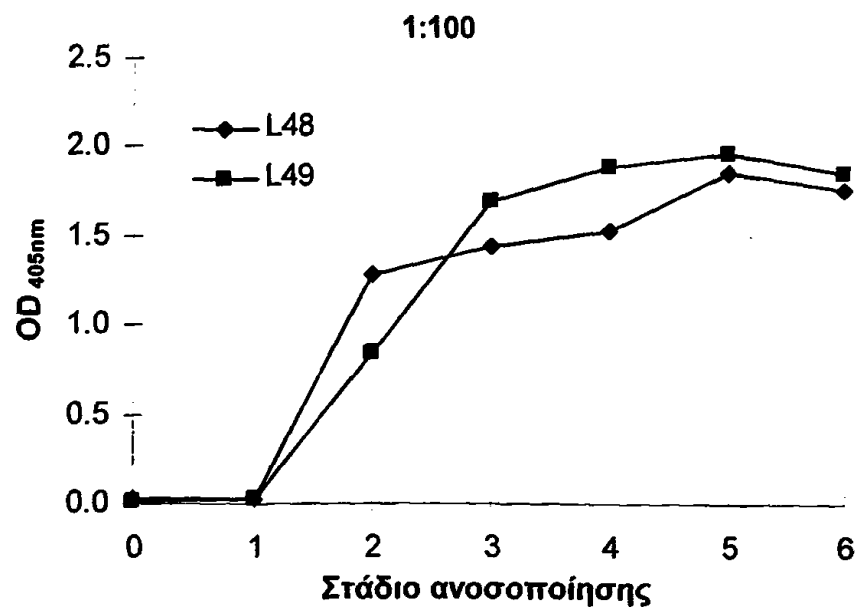
Επίσης μελετήθηκε η δραστικότητα των αντιορών έναντι των ορμονών του θυρεοειδούς (T_3 και T_4), με ELISA, όπου χρησιμοποιήθηκαν ακινητοποιημένα συζεύγματα T_3 -RSA και T_4 -RSA. Η δραστικότητα έναντι μη συζευγμένης RSA χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας. Διαπιστώθηκε ότι οι αντιοροί δεν αντιδρούν με τις ορμόνες T_3 και T_4 .





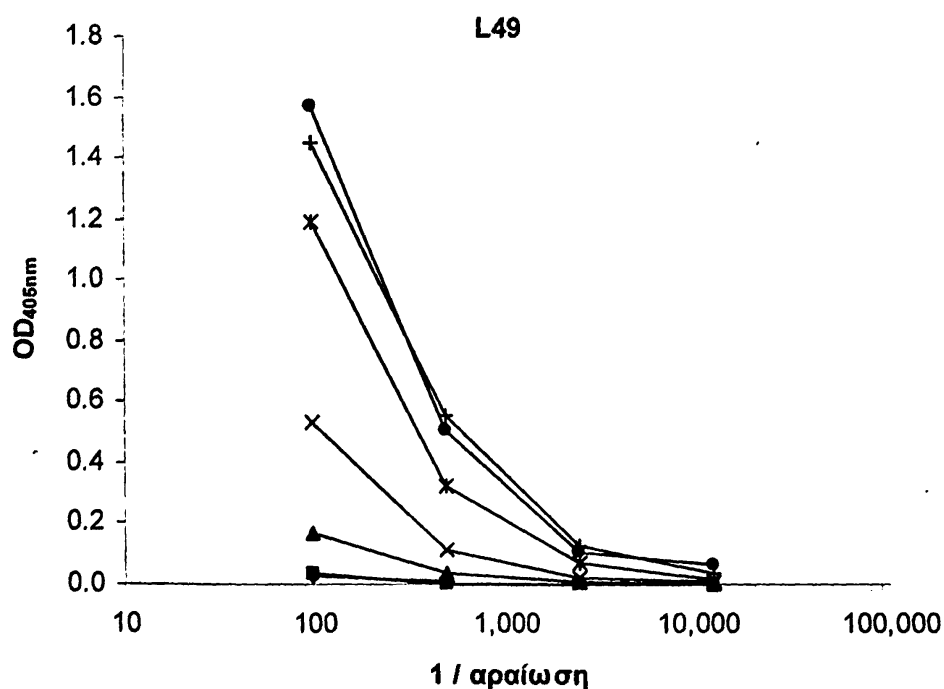
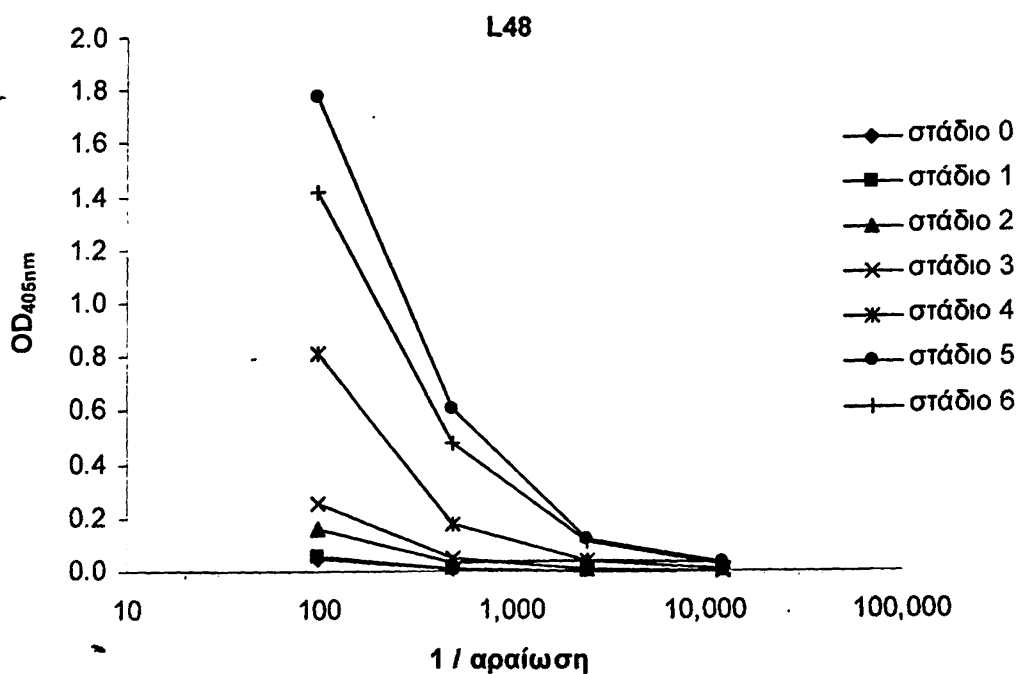
Σχήμα 47. Δραστικότητα έναντι TgP41 των αντισωρών από τα διαδοχικά στάδια ανοσοποίησης με το TgP41, από τα ζώα L48 και L49. Στο σχήμα, παρουσιάζονται οι καμπύλες τιτλοδότησης (OD συναρτήσει της αραιώσης των αντισωρών).

➤ Υψηλός τίτλος αντισώματος αναπτύσσεται και στα δύο ζώα, από το στάδιο 2 και μετά.



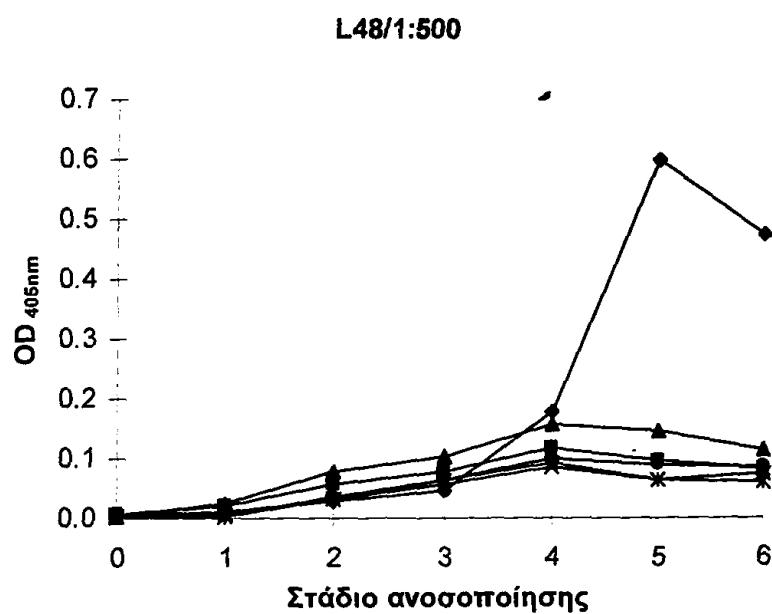
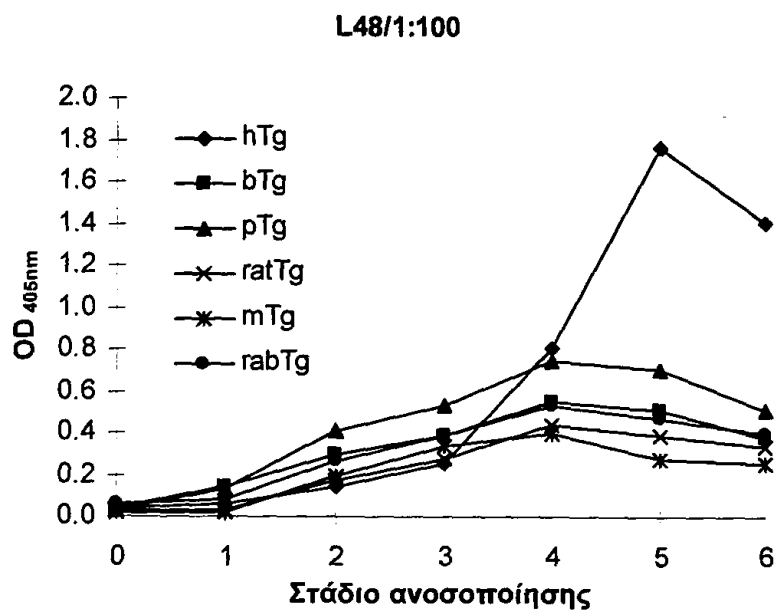
Σχήμα 48. Δραστηκότητα έναντι TgP41 των αντιορών από τα διαδοχικά στάδια ανοσοποίησης από τα δύο ζώα (L48 και L49) που ανοσοποιήθηκαν με το πεπτίδιο TgP41, σε αραιώσεις 1:100 και 1:2,500.

➤ Κατά την ανοσοποίηση με TgP41, μη συζευγμένου σε φορέα, αναπτύσσονται αντισώματα έναντι του πεπτιδίου.



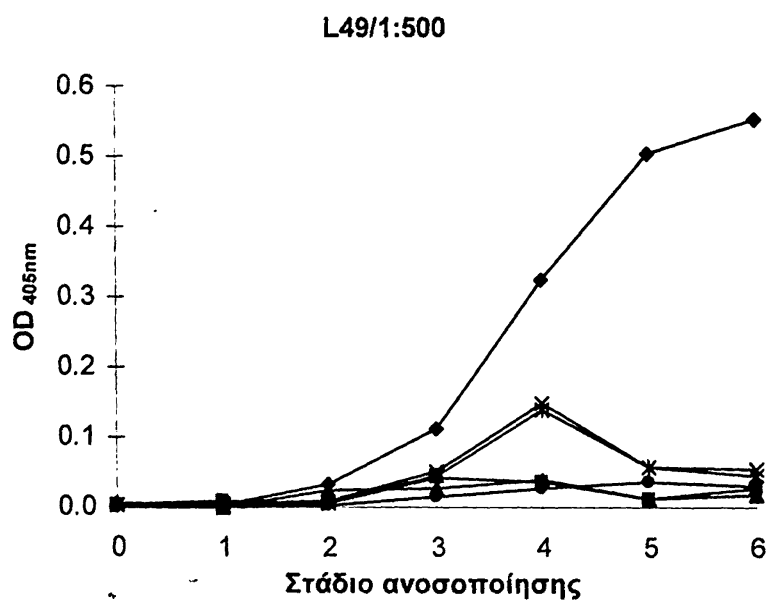
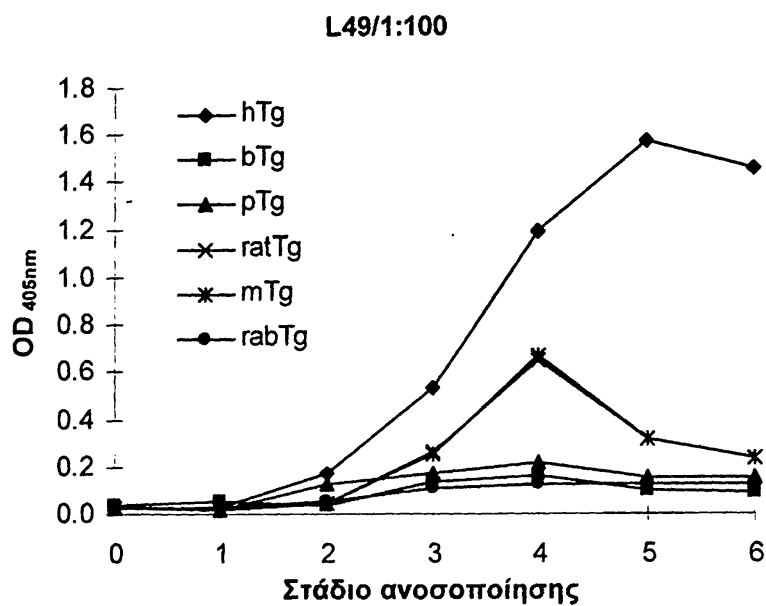
Σχήμα 49. Δραστικότητα έναντι hTg, των αντιορών από τα διαδοχικά στάδια ανοσοποίησης με το TgP41, από τα ζώα L48 και L49. Στο σχήμα παρουσιάζονται οι καμπύλες τιτλοδότησης (OD συζατησει της αραιώσης των αντιορών).

➤ Παρατηρείται βαθμιαία αύξηση της δραστικότητας έναντι hTg κατά την πορεία ανοσοποίησης με το πεπτίδιο TgP41.



Σχήμα 50. ΣΥΝΕΧΙΖΕΤΑΙ.



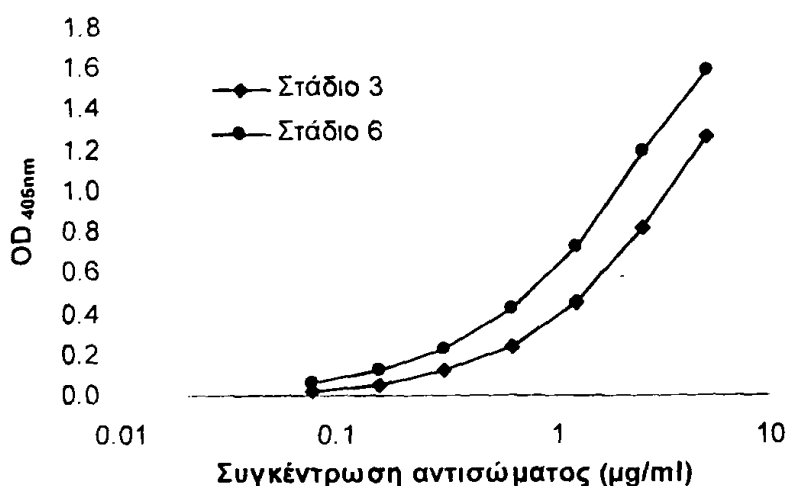


Σχήμα 50. Δραστηκότητα έναντι της Tg από διάφορα ζωικά είδη των αντιορών από τα διαδοχικά στάδια ανοσοποίησης με το TgP41, από τα ζώα L48 και L49, σε αραιώσεις ορών 1:100 και 1:500.

➤ Οι αντιοροί από τα ανοσοποιημένα με το πεπτιδίο TgP41 ζώα αναγνωρίζουν την hTg.

4.2.2.3 Απομόνωση και έλεγχος δραστικότητας έναντι Tg των ειδικών αντι-TgP41 αντισωμάτων

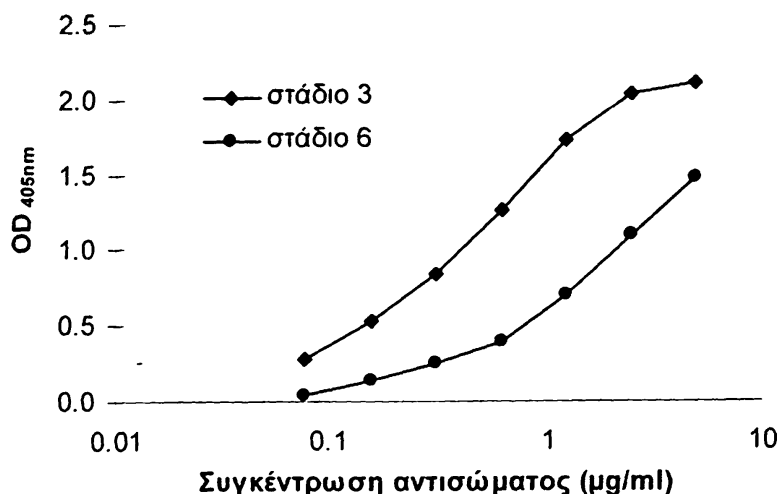
Από τους αντιορούς των σταδίων 3 και 6 του ζώου L49, πραγματοποιήθηκε απομόνωση των αντισωμάτων έναντι του πεπτιδίου TgP41 με χρωματογραφία συγγένειας σε σφαιρίδια Sepharose 4B ενεργοποιημένα με CNBr στα οποία ήταν συζευγμένο το πεπτίδιο TgP41. Η συγκέντρωση των αντισωμάτων που απομονώθηκαν ήταν 24.5 μg ανά ml ορού για το στάδιο 3 και 29.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ για το στάδιο 6. Στη συνέχεια, ελέγχθηκε με ELISA η δραστικότητα των απομονωμένων αντι-TgP41 έναντι α) του πεπτιδίου TgP41 (Σχήμα 51) και β) της hTg (Σχήμα 52). Παρατηρούμε ότι η δραστικότητα έναντι TgP41 των ειδικών αντι-TgP41 του αντιορού 6 είναι σχεδόν ίδια με αυτή των αντισωμάτων του αντιορού 3. Αντίθετα, η δραστικότητα έναντι Tg των ειδικών αντι-TgP41 αντισωμάτων που απομονώθηκαν από τον αντιορό 3 είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη δραστικότητα των αντισωμάτων του αντιορού 6. Κατά συνέπεια, θα μπορούσαμε να συμπεράνουμε ότι καθώς συνεχίζεται η διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος με το πεπτίδιο TgP41, αυξάνεται η παραγωγή αντισωμάτων έναντι του πεπτιδίου, τα οποία δεν αναγνωρίζουν την αντίστοιχη αλληλουχία πάνω στη φυσική Tg (ή έχουν μικρή συγγένεια γι' αυτήν).



Σχήμα 51. Δραστικότητα των απομονωμένων αντι-TgP41 από τους αντιορούς των σταδίων 3 και 6 του κουνελιού L49, έναντι του πεπτιδίου TgP41. Παρουσιάζεται η OD συναρτήσεως της συγκέντρωσης αντισωμάτων.

➤ Η δραστικότητα των αντισωμάτων του αντιορού 6 είναι ελάχιστα μεγαλύτερη από τη δραστικότητα των αντισωμάτων του αντιορού 3.





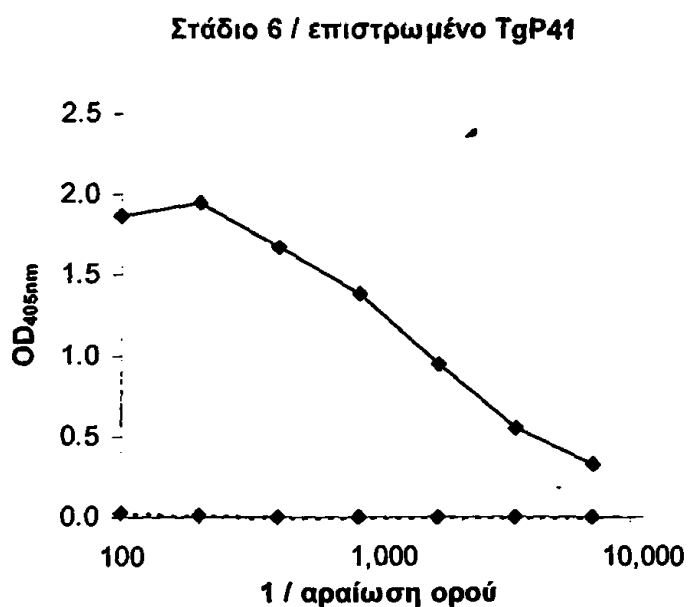
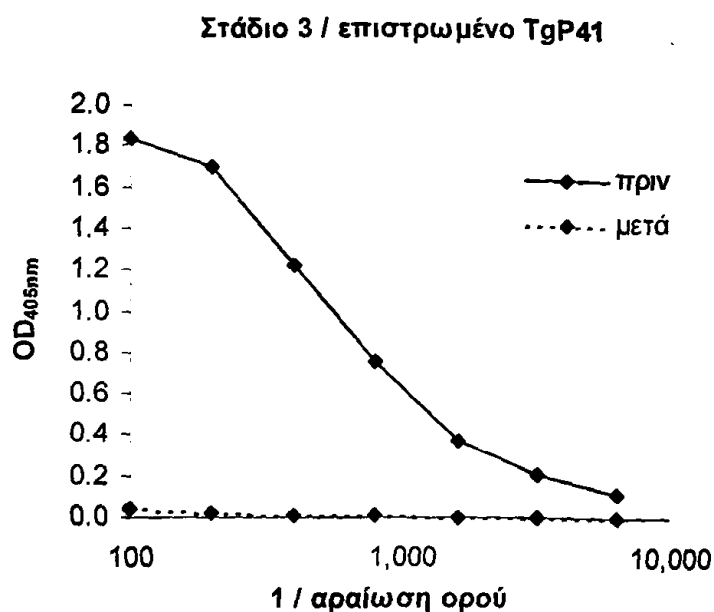
Σχήμα 52. Δραστικότητα των απομονωμένων αντι-TgP41 από τους αντιορούς των σταδίων 3 και 6 του κουνελιού L49, έναντι hTg. Παρουσιάζεται η OD συναρτήσει της συγκέντρωσης αντισωμάτων.

➤ Η δραστικότητα έναντι hTg των ειδικών αντι-TgP41 αντισωμάτων που απομονώθηκαν από τον αντιορό 3 είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη δραστικότητα των αντισωμάτων του αντιορού 6.

4.2.2.4 Έλεγχος για ενδομοριακή επέκταση επιτόπων κατά την ανοσοποίηση με το πεπτιδίο TgP41

Η ανάπτυξη αντισωμάτων που προσδένονται σε μια επιφανειακή θέση της Tg, θα μπορούσε να επάγει την επεξεργασία (processing) της Tg από τα Τ-λεμφοκύτταρα και την παρουσίαση νέων επιτόπων στα Β-λεμφοκύτταρα. Συνεπώς, γεννάται το ερώτημα αν κατά την χορήγηση του πεπτιδίου TgP41, εκτός από τα αντισώματα έναντι του πεπτιδίου αυτού αναπτύσσονται και αντισώματα έναντι άλλων περιοχών της Tg εκτός από αυτήν που ορίζεται από το πεπτιδίο αυτό. Για να δοθεί απάντηση στο ερώτημα για την ενδομοριακή επέκταση επιτόπων, συγκρίθηκαν οι αντιοροί από τα στάδια 3 και 6 του ζώου L49 πριν και μετά την απομάκρυνση των αντι-TgP41 αντισωμάτων με ανοσοπροσρόφηση, ως προς τη δραστικότητά τους έναντι α) του TgP41 (Σχήμα 53) και β) της ανθρώπινης Tg (Σχήμα 54). Παρατηρούμε ότι μετά την απομάκρυνση των αντι-TgP41 αντισωμάτων, η δραστικότητα έναντι του εν λόγω πεπτιδίου μηδενίζεται, γεγονός που επιβεβαιώνει την πλήρη απομάκρυνση των αντι-TgP41 αντισωμάτων από τον ορό. Αντίθετα, παραμένει δραστικότητα έναντι της Tg. Δηλαδή, μετά την απομάκρυνση των

αντι-TgP41 παραμένουν στον ορό αντισώματα που αναγνωρίζουν την ακέραια Tg.

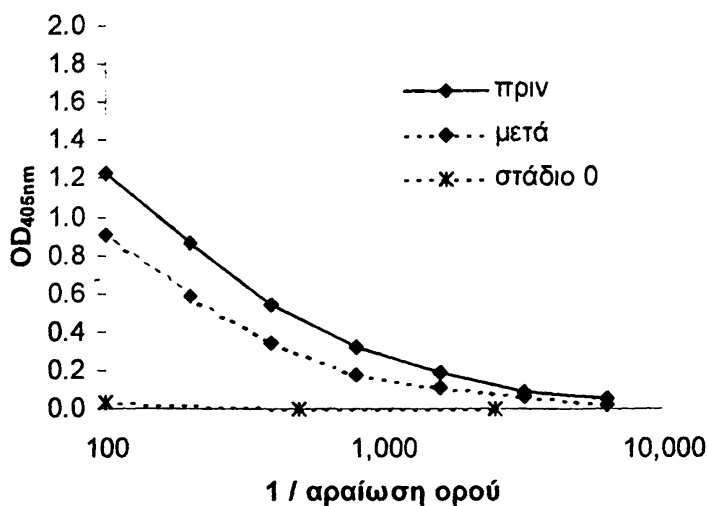


Σχήμα 53. Σύγκριση των αντιορών από τα στάδια 3 και 6 του ζώου L49 πριν και μετά την απομάκρυνση των αντι-TgP41 αντισωμάτων με ανοσοπροσρόφηση, ως προς τη δραστηρότητά τους έναντι του TgP41. Παρουσιάζεται η OD συναρτήσεως της αραιώσεως των ορών.

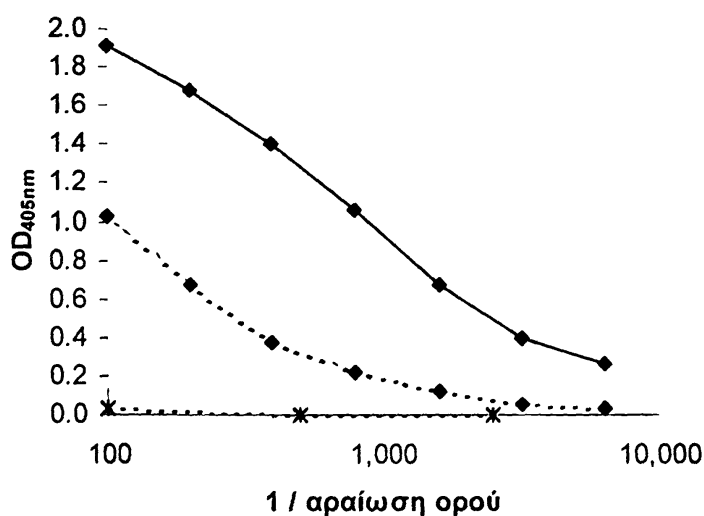
➤ Η δραστηρότητα έναντι του πεπτιδίου απαλείφεται μετά την απομάκρυνση των ειδικών αντισωμάτων. Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει την πλήρη απομάκρυνση των αντι-TgP41 αντισωμάτων από τον ορό.



Στάδιο 3 / επιστρωμένη hTg



Στάδιο 6 / επιστρωμένη hTg



Σχήμα 54. Σύγκριση των αντιορών από τα στάδια 3 και 6 του ζώου L49 πριν και μετά την απομάκρυνση των αντι-TgP41 αντισωμάτων με ανοσοπροσρόφηση, ως προς τη δραστικότητά τους έναντι της hTg. Παρουσιάζεται η OD συναρτήσει της αραιώσης των ορών. Για να εκτιμηθεί η διαφορά, παρατίθεται και η δραστικότητα του ορού από το στάδιο 0, δηλ. πριν την έναρξη της ανοσοποίησης.

➤ Μετά την απομάκρυνση των αντι-TgP41 αντισωμάτων, παραμένει στον ορό δραστικότητα έναντι της hTg.

Αυτό σημαίνει ότι, μετά την αρχική διέγερση παραγωγής αντισωμάτων έναντι συγκεκριμένου επιτόπου της Tg, προκαλείται παραγωγή αντισωμάτων και έναντι άλλων επιτόπων της Tg (ενδομοριακή επέκταση επιτόπων, intramolecular epitope spreading). Η δραστικότητα έναντι Tg, που παραμένει

στον ορό μετά την απομάκρυνση των αντι-TgP41 αντισωμάτων, αναστέλλεται από διαλυτή Tg (περίπου 90% αναστολή σε συγκέντρωση διαλυτής Tg 1,000 nmol/ml), ενώ δεν αναστέλλεται από διαλυτό πεπτιδίο TgP41 μέχρι και 25 nmol/ml (Σχήμα 55). Το αποτέλεσμα αυτό σημαίνει, αφενός ότι η υπολειπόμενη δραστηριότητα έναντι Tg μετά την απομάκρυνση των αντι-TgP41 είναι ειδική για την Tg και δεν οφείλεται σε μη ειδική αντίδραση και αφετέρου ότι η δραστηριότητα αυτή οφείλεται σε επίτοπους που δεν περιλαμβάνονται στο TgP41, ούτε παρουσιάζουν διασταυρούμενη αντίδραση με αυτό.

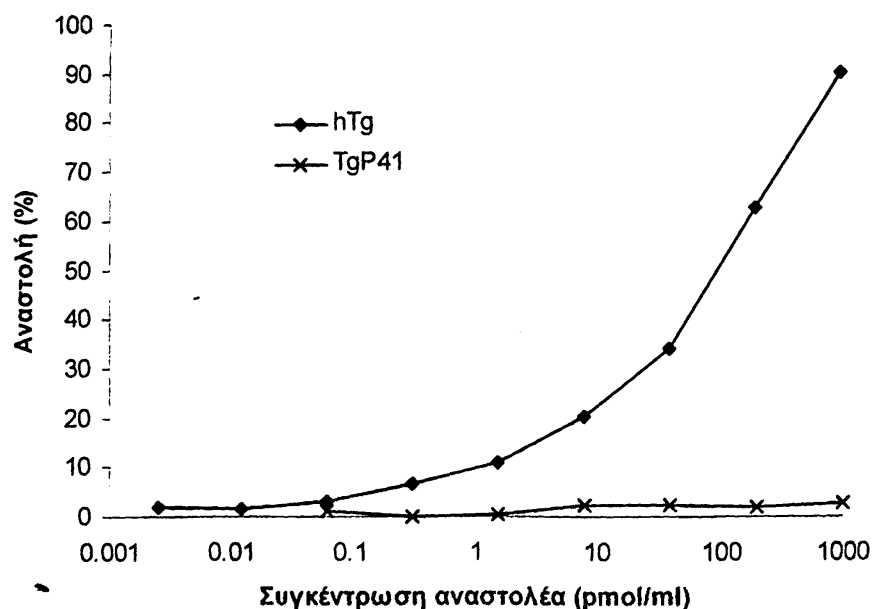
Για επιπλέον επιβεβαίωση της ενδομοριακής επέκτασης επιτόπων, πραγματοποιήθηκε και το ακόλουθο πείραμα. Απομονώθηκαν τα αντι-Tg αντισώματα από τα στάδια 3 και 6 του κουνελιού L49, το οποίο είχε ανοσοποιηθεί με το πεπτιδίο TgP41. Για να διαπιστωθεί αν μεταξύ των αντι-Tg αντισωμάτων υπάρχουν και αντισώματα που προσδένονται σε περιοχές της Tg εκτός του πεπτιδίου TgP41, εξετάστηκε η παρεμπόδιση της δραστηριότητας των αντι-Tg αντισωμάτων έναντι επιστρωμένης Tg, από διαλυτό TgP41 (Σχήμα 56). Η παρεμπόδιση αυτή για το στάδιο 3 δεν ξεπερνά το 30% σε συγκέντρωση αναστολέα 25 nmol/ml (Πίνακας X). Η αντίστοιχη αναστολή από διαλυτή Tg φτάνει το 100% σε συγκέντρωση 1 nmol/ml. Στο στάδιο 6, η αναστολή από το πεπτιδίο TgP41 είναι μεγαλύτερη από ό,τι στο στάδιο 3, ωστόσο δεν ξεπερνά το 62% σε συγκέντρωση αναστολέα 25 nmol/ml. Η αντίστοιχη αναστολή από διαλυτή Tg στο στάδιο 6 πλησιάζει το 100% σε συγκέντρωση 1 nmol/ml. Το γεγονός ότι το πεπτιδίο TgP41 δεν έχει τη δυνατότητα να αναστείλει εντελώς τη δραστηριότητα των αντισωμάτων έναντι Tg, επιβεβαιώνει ότι υπάρχουν αντισώματα που κατευθύνονται έναντι περιοχών της Tg, εκτός του πεπτιδίου TgP41.

Πίνακας X. Μέγιστα ποσοστά αναστολής της δραστηριότητας των αντι-Tg έναντι επιστρωμένης Tg, από διαλυτά TgP41 και Tg. Αναγράφονται οι μέγιστες συγκεντρώσεις των αναστολέων.

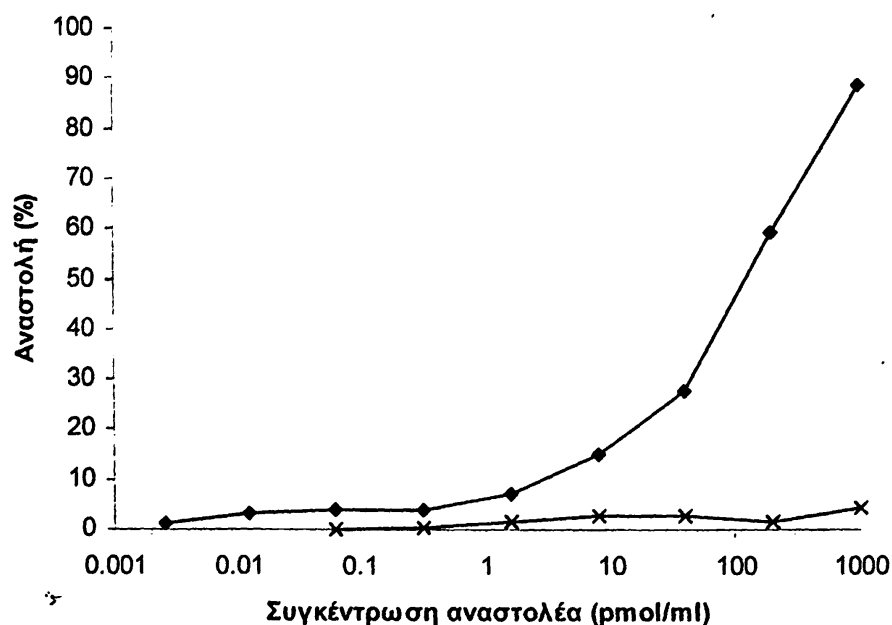
Στάδιο ανοσοποίησης	Αναστολέας	
	TgP41 (25 nmol/ml)	hTg (1 nmol/ml)
3	30%	100%
6	62%	100%



Στάδιο 3

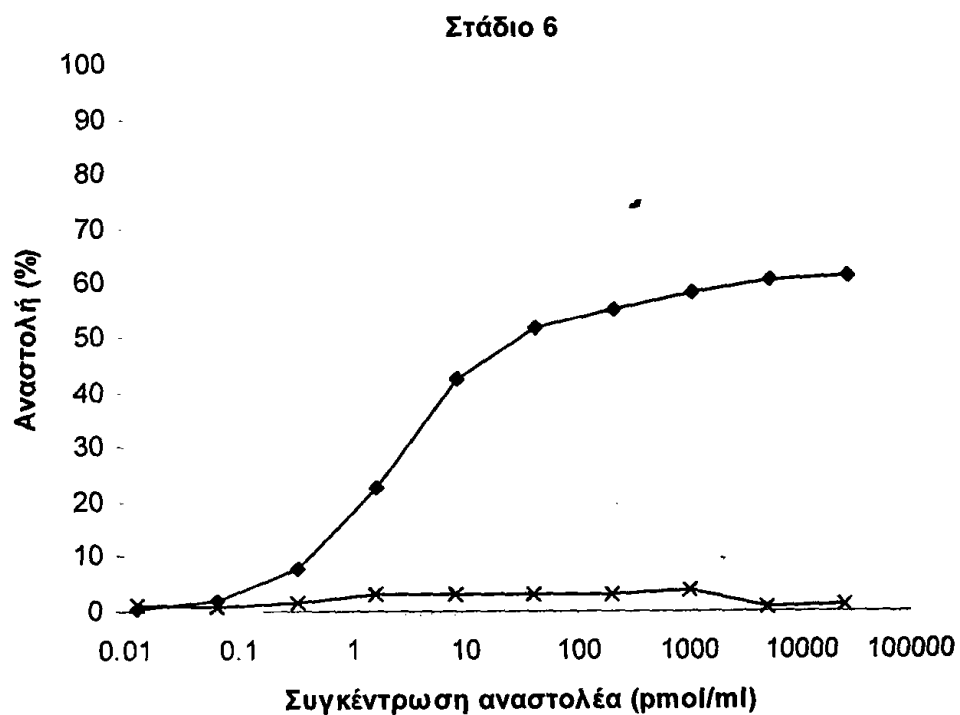
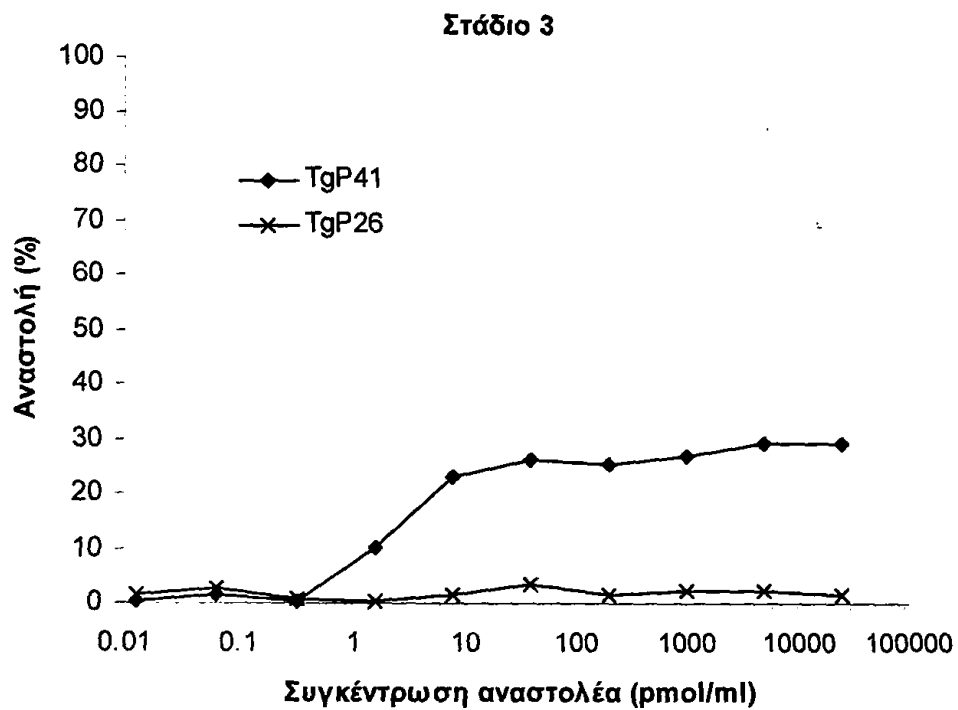


Στάδιο 6



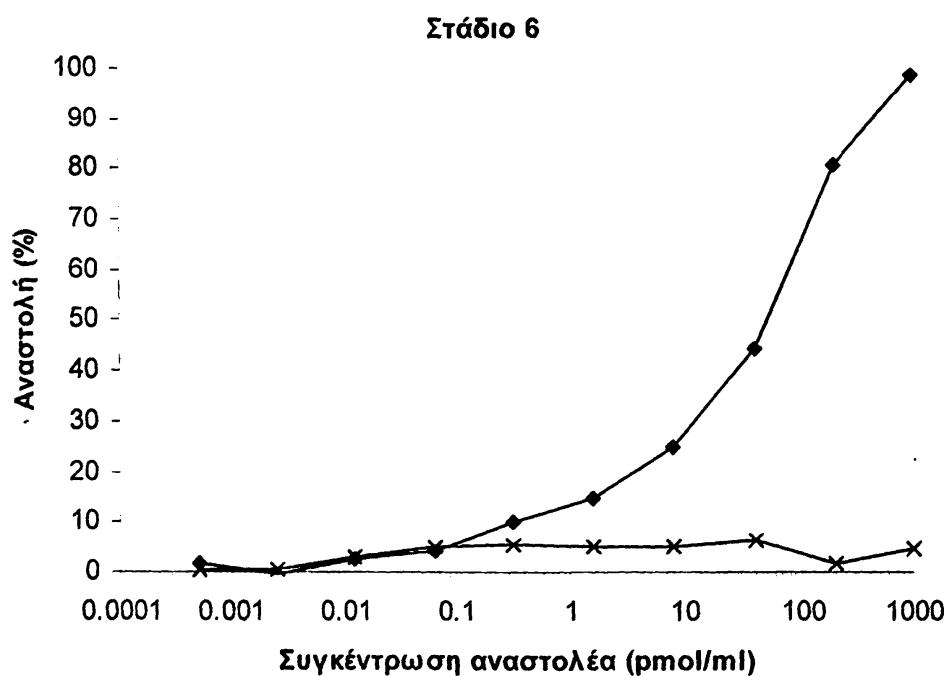
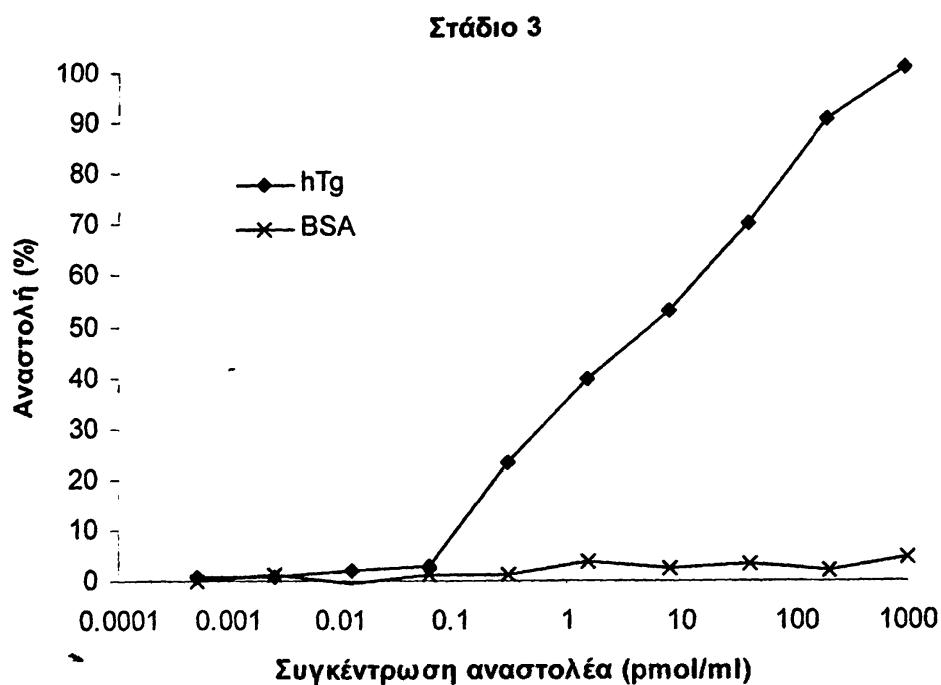
Σχήμα 55. Έλεγχος αναστολής πρόσδεσης σε επιστρωμένη hTg, των ορών από τα στάδια 3 και 6 του κουνελιού L49 μετά την απομάκρυνση των αντι-TgP41, από αναστολείς hTg και TgP41. Στο σχήμα, παρουσιάζεται το ποσοστό αναστολής συναρτήσει της συγκέντρωσης του αναστολέα.

➤ Η αναστολή από διαλυτή Tg φτάνει περίπου το 90% και στα δύο στάδια, ενώ το πεπτίδιο TgP41 δεν προκαλεί αναστολή της δραστηριότητας μέχρι και συγκέντρωση 25 nmol/ml (στο σχήμα δε φαίνεται ολόκληρη η καμπύλη αναστολής δραστηριότητα σε hTg από το TgP41).



Σχήμα 56. Συνεχίζεται.





Σχήμα 56. Έλεγχος αναστολής της πρόσδεσης σε επιστρωμένη Tg, των αντι-Tg αντισωμάτων από τα στάδια 3 και 6 του κουνελιού L49 (ανοσοποιημένο με TgP41), από διαλυτό πεπτίδιο TgP41 και διαλυτή Tg. Ως μάρτυρες, χρησιμοποιήθηκαν οι αναστολείς TgP26 και BSA.

➤ Το πεπτίδιο TgP41 δεν έχει τη δυνατότητα να αναστείλει πλήρως τη δραστικότητα των αντι-Tg έναντι επιστρωμένης Tg. Αντίθετα, η αναστολή από Tg είναι πλήρης. Οι αναστολείς-μάρτυρες (TgP26 και BSA) δεν έδειξαν καμιά παρεμπόδιση.

4.2.2.5 Ιστολογική εξέταση των θυρεοειδών αδένων μετά από χορήγηση του TgP41

Στη συνέχεια, θελήσαμε να διαπιστώσουμε αν η χορήγηση του πεπτιδίου TgP41 προκαλεί ανάπτυξη πειραματικής αυτοάνοσης θυρεοειδίτιδας στα κουνέλια. Για το λόγο αυτό, το πεπτίδιο χορηγήθηκε σε τρία ενήλικα λευκά κουνέλια Νέας Ζηλανδίας (L63, L64 και L65) ακολουθώντας το πρωτόκολλο που παρουσιάζεται στο Σχήμα 14. Τελικά, τα ζώα θυσιάστηκαν και αφαιρέθηκαν οι θυρεοειδείς αδένες, στους οποίους πραγματοποιήθηκε ιστολογική εξέταση. Δεν διαπιστώθηκε διήθηση λεμφοκυττάρων στους θυρεοειδείς αδένες των ζώων, γεγονός που σημαίνει ότι δεν αναπτύχθηκε θυρεοειδίτιδα.

4.3 Διαμοριακή επέκταση δραστικότητας κατά την πειραματική ανοσοποίηση με Tg ή με πεπτίδιο TgP41

Μετά τη διαπίστωση ενδομοριακής επέκτασης επιτόπων κατά την ανοσοποίηση με το πεπτίδιο TgP41 της Tg, διερευνήθηκε η διαμοριακή επέκταση της δραστικότητας των ορών, δηλαδή επέκταση της δραστικότητας σε άλλα μόρια εκτός της Tg, τόσο κατά την ανοσοποίηση με Tg όσο και κατά την ανοσοποίηση με το πεπτίδιο TgP41.

4.3.1 Διαμοριακή επέκταση δραστικότητας κατά την πειραματική ανοσοποίηση με Tg

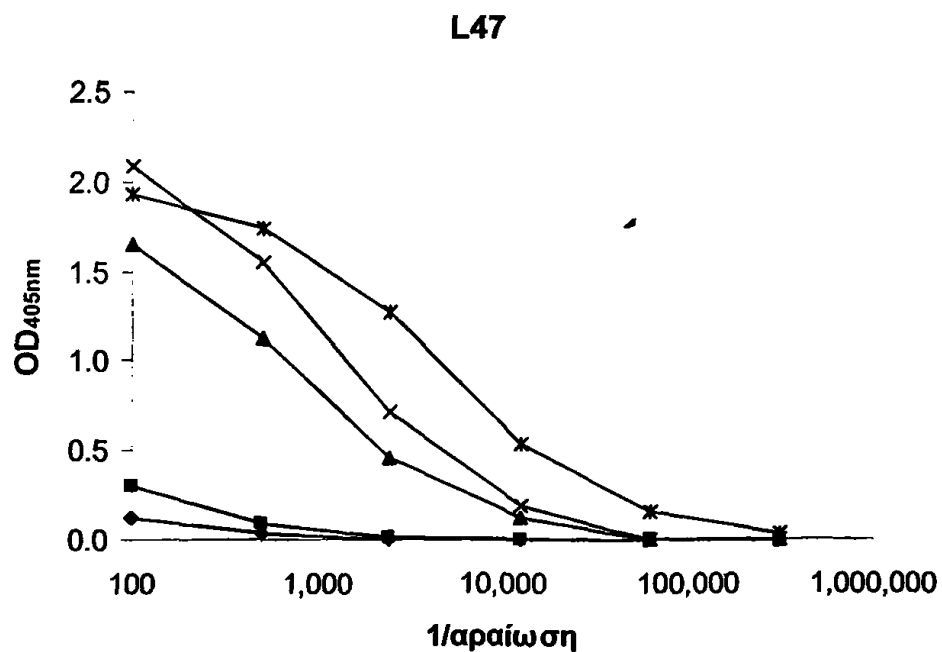
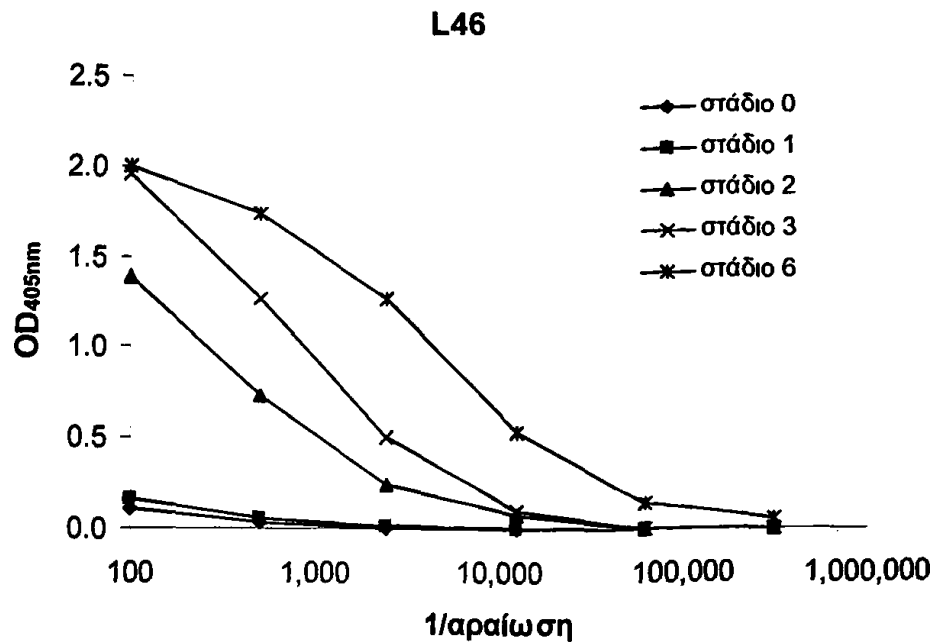
Κατά την ανοσοποίηση με ανθρώπινη Tg, μελετήθηκε η ανάπτυξη δραστικότητας έναντι άλλων αντιγόνων εκτός της Tg. Ελέγχθηκε η δραστικότητα ορών καθώς και απομονωμένων αντι-Tg αντισωμάτων από τα διαδοχικά στάδια ανοσοποίησης, με μη ανταγωνιστική και ανταγωνιστική ELISA, έναντι ανθρώπινης θυρεοειδικής υπεροξειδάσης (TPO) και άλλων μη θυρεοειδικών αντιγόνων: ανθρώπινης μυοσίνης, ανθρώπινης ακτίνης, σφαιρικής (G) και ινώδους (F), τουμπουλίνης χοίρου, φυσικού DNA (nDNA), καθώς και αλβουμίνης βοείου ορού (BSA).



4.3.1.1 Ορολογική απόκριση έναντι θυρεοειδικής υπεροξειδάσης

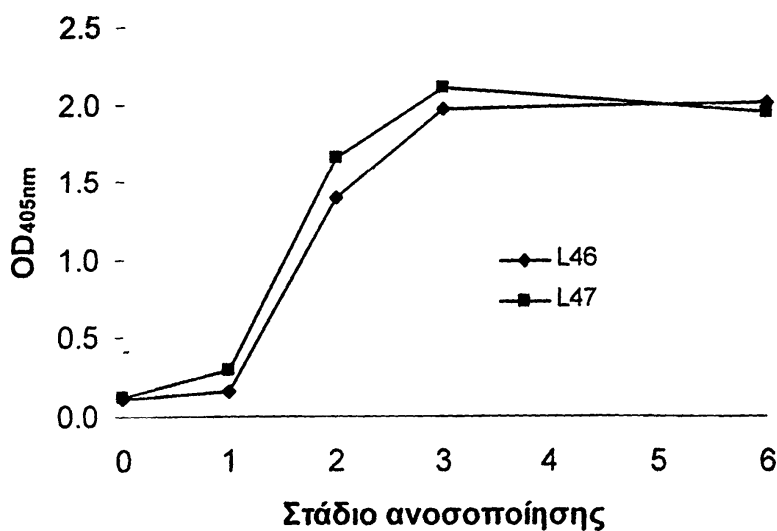
– Η ορολογική απόκριση των ανοσοποιημένων με hTg κουνελιών, ελέγχθηκε με ELISA έναντι ανθρώπινης θυρεοειδικής υπεροξειδάσης (TPO) (Σχήμα 57, Σχήμα 58). Το Σχήμα 57 παρουσιάζει τις καμπύλες τιτλοδότησης για την TPO, των ορών από τα στάδια 0, 1, 2, 3, και 6 των κουνελιών L46 και L47. Από την 1^η αναμνηστική ένεση (στάδιο 2) και μετά, παρατηρείται υψηλή δραστικότητα των αντιορών έναντι ανθρώπινης TPO. Τα ζώα-μάρτυρες, τα οποία ενέθηκαν μόνο με CFA, δεν παρουσίασαν δραστικότητα έναντι της TPO.

Στη συνέχεια, εξετάσαμε αν η δραστικότητα έναντι TPO οφείλεται σε διασταυρούμενη αντίδραση με την Tg. Με ανταγωνιστική ELISA εξετάστηκε η αναστολή της αντι-TPO δραστικότητας των αντιορών των σταδίων 2 και 6 του ζώου L46 από διαλυτή hTg (Σχήμα 59). Διαπιστώθηκε ότι η δραστικότητα έναντι TPO οφείλεται στην ύπαρξη αντι-Tg αντισωμάτων με διασταυρούμενη αντίδραση για την TPO, αφού η δραστικότητα αυτή αναστέλλεται από διαλυτή ανθρώπινη Tg. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι τα απομονωμένα αντι-Tg αντισώματα αντιδρούν με την TPO (Σχήμα 60), ενώ η δραστικότητα των ορών μετά την αφαίρεση των αντι-Tg αντισωμάτων μειώνεται σημαντικά (Σχήμα 61).



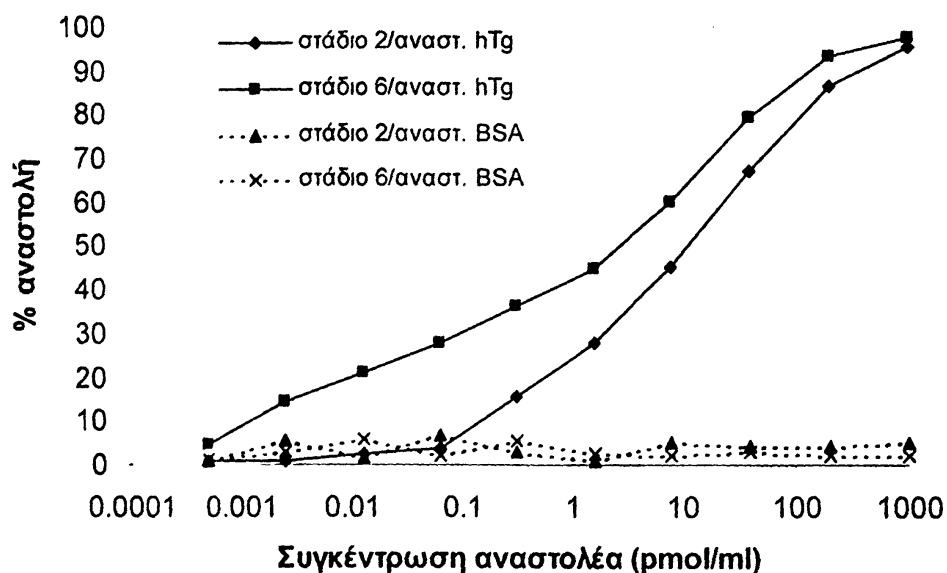
Σχήμα 57. Καμπύλες τιτλοδότησης των ορών από τα στάδια 0, 1, 2, 3, και 6 των κουνελιών L46 και L47 έναντι TPO. Απεικονίζεται η οπτική απορρόφηση συναρτήσει της αραίωσης των ορών.

➤ Σημαντική δραστικότητα έναντι TPO αναπτύσσεται από το στάδιο 2 και μετά.



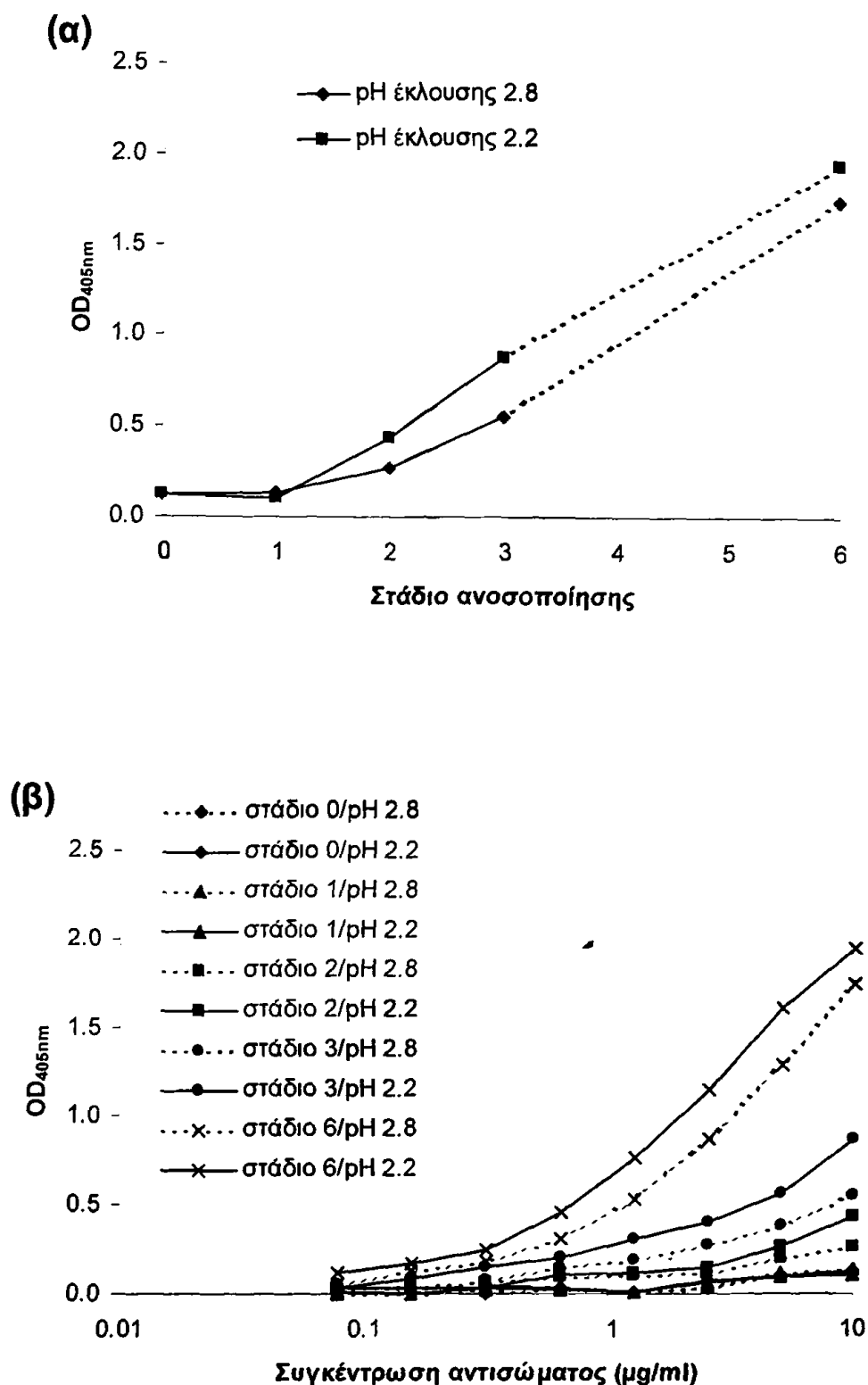
Σχήμα 58. Δραστικότητα των αντιορών των κουνελιών L46 και L47, από τα διαδοχικά στάδια ανοσοποίησης με hTg, σε αραιώση 1:100, έναντι ανθρώπινης TPO.

➤ Υψηλή δραστικότητα των αντιορών έναντι TPO παρατηρείται από το στάδιο 2 και μετά.



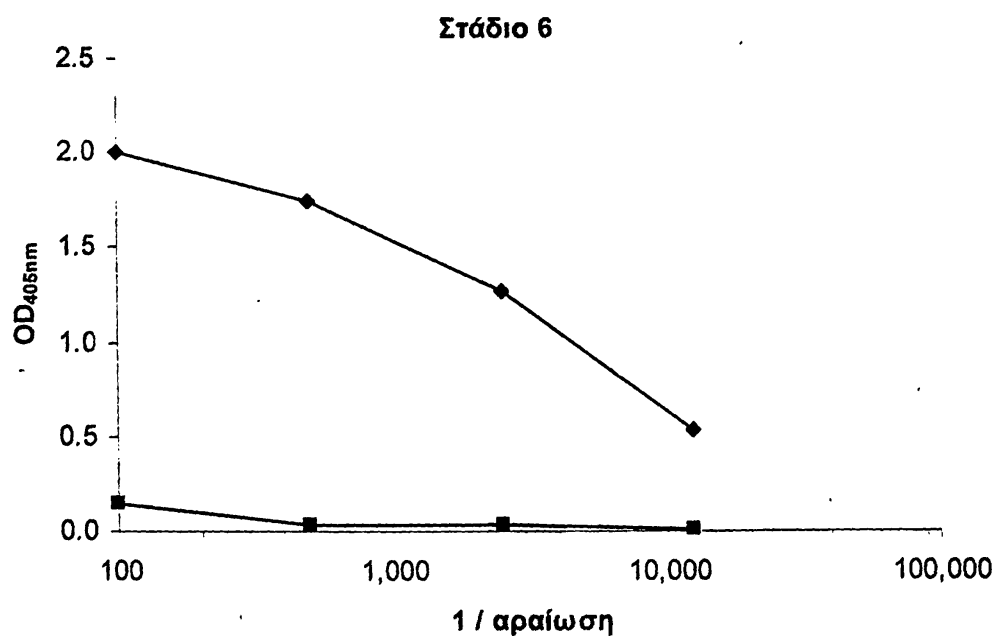
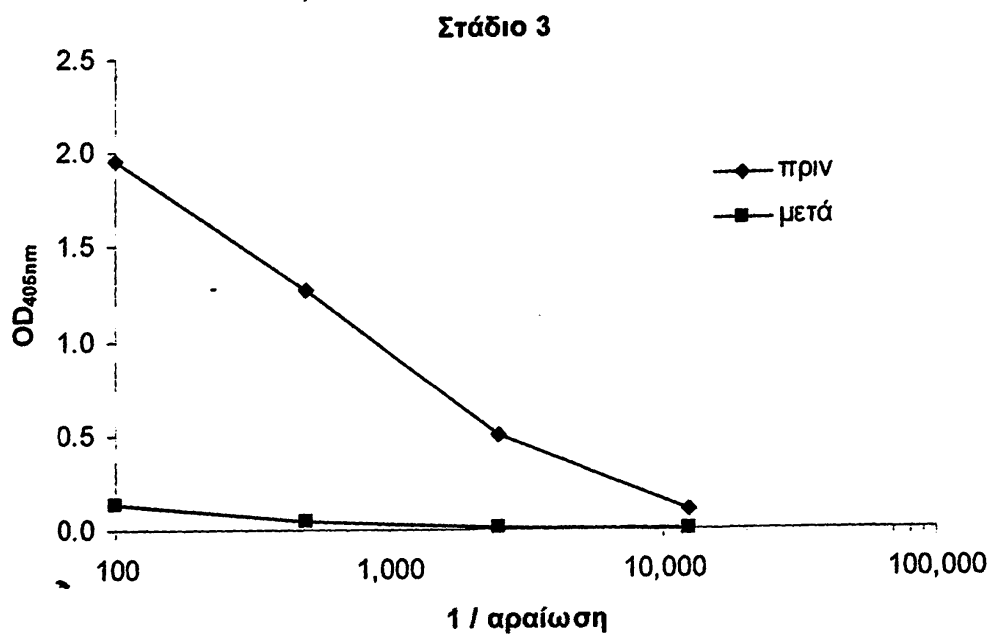
Σχήμα 59. Δοκιμασία αναστολής της αντι-TPO δραστικότητας των αντιορών των σταδίων 2 και 6 του κουνελιού L46 από διαλυτή ανθρώπινη Tg. Στο σχήμα, φαίνεται το ποσοστό αναστολής συναρτήσει της συγκέντρωσης αναστολέα. Ως μάρτυρας, χρησιμοποιήθηκε σαν αναστολέας BSA.

➤ Η Tg αναστέλλει τη δραστικότητα των ορών έναντι TPO σε ποσοστό που πλησιάζει το 100%. Ο αναστολέας-μάρτυρας (BSA) δεν προκαλεί αναστολή.



Σχήμα 60. Δραστικότητα έναντι TPO, των απομονωμένων αντι-Tg αντισωμάτων από τα στάδια 0, 1, 2, 3 και 6 του ζώου L46. (α) Η OD συναρτήσει του σταδίου ανοσοποίησης για τα δύο κλάσματα έκλουσης (σε pH 2.8 και 2.2), σε συγκέντρωση αντισωμάτων 10 μg/ml και (β) Η OD συναρτήσει της συγκέντρωσης αντισώματος, για τα δύο κλάσματα έκλουσης.

➤ Τα απομονωμένα αντι-Tg αντισώματα παρουσιάζουν δραστικότητα έναντι της TPO. Τα υψηλής συγγένειας αντι-Tg αντισώματα (έκλουση σε pH 2.2) εμφανίζουν ελαφρώς αυξημένη δραστικότητα σε σχέση με τα χαμηλής συγγένειας (έκλουση σε pH 2.8).



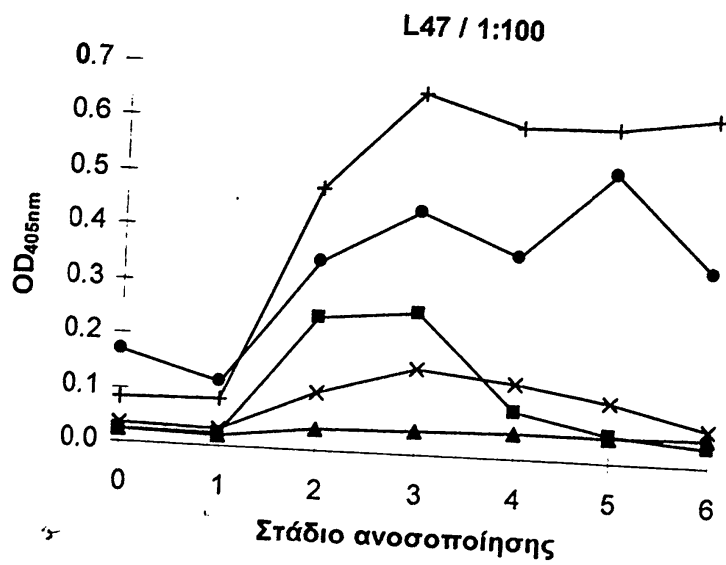
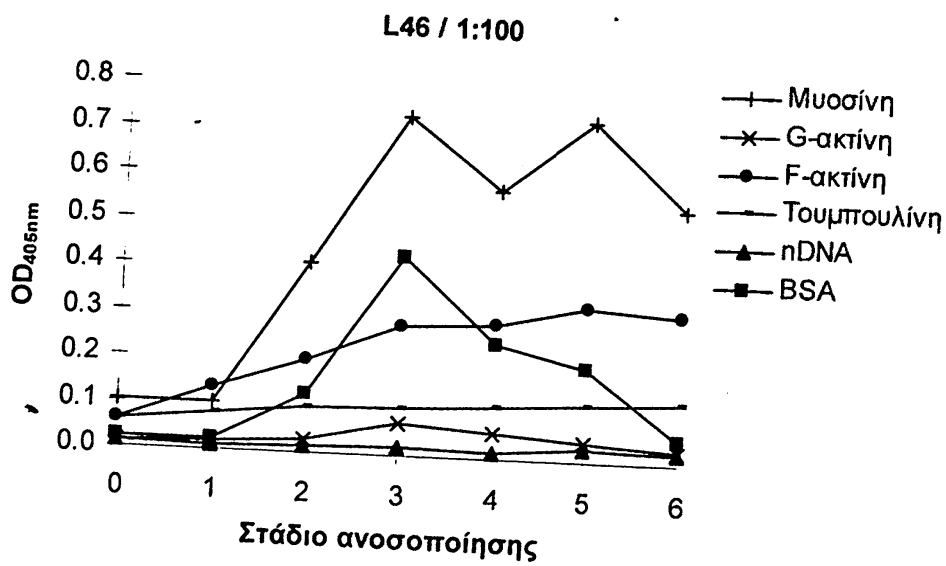
Σχήμα 61. Δραστικότητα έναντι ΤΡΟ, των αντιορών από τα στάδια 3 και 6 του κουνελιού L46 πριν και μετά την αφαίρεση των αντι-Tg αντισωμάτων. Παρουσιάζεται η OD συναρτήσει της αραίωσης των αντιορών.

➤ Η δραστικότητα του ορού έναντι ΤΡΟ χάνεται μετά την απομάκρυνση των αντι-Tg αντισωμάτων.

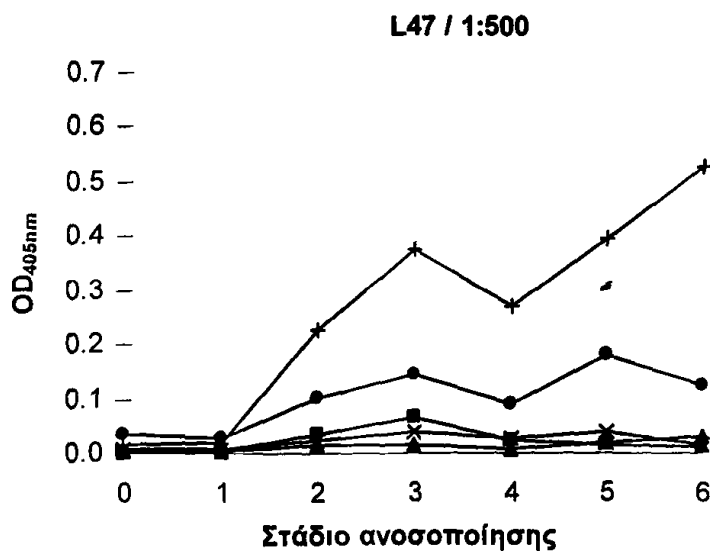
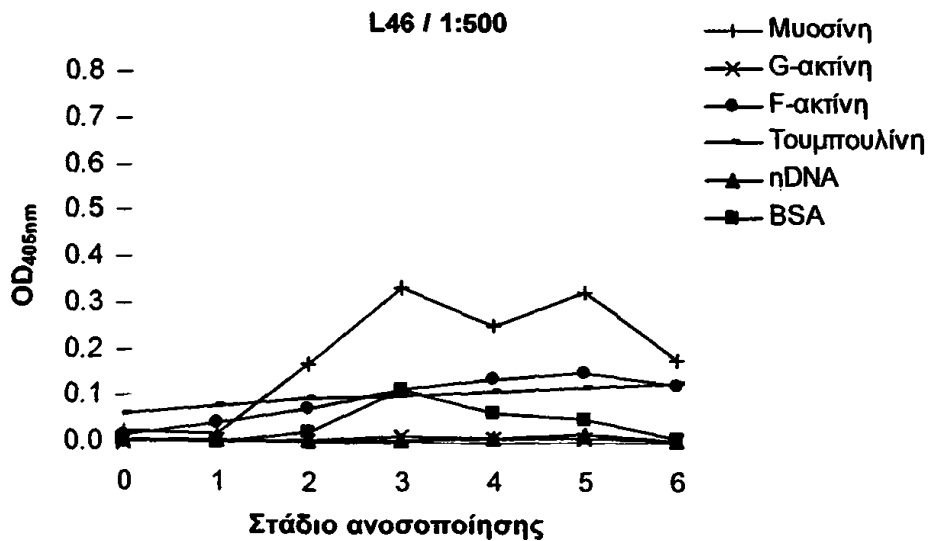
4.3.1.2 Ορολογική απόκριση έναντι μη θυρεοειδικών αντιγόνων

Η πολυειδικότητα, δηλαδή η ικανότητα των αντισωμάτων να αναγνωρίζουν διαφορετικά αντιγόνα, αποτελεί ιδιότητα των φυσικών αυτοαντισωμάτων (258-260). Για να μελετηθεί η μετάβαση από τα φυσικά αυτοαντισώματα στα ειδικά αντισώματα που επάγονται κατά την ανοσοποίηση με Tg, εξετάστηκε η πολυειδικότητα των αντισωμάτων στα διαδοχικά στάδια ανοσοποίησης. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της δραστικότητας των αντιωρών από τα διαδοχικά στάδια ανοσοποίησης με hTg, έναντι των ακόλουθων μη θυρεοειδικών αντιγόνων: ανθρώπινη μυοσίνη, ανθρώπινη G- και F-ακτίνη, τουμπουλίνη χοίρου, φυσικό DNA (nDNA) και αλβουμίνη βοείου ορού (BSA) (Σχήμα 62). Τα συγκεκριμένα αντιγόνα επιλέχθηκαν με κριτήριο το ότι αποτελούν στόχους των φυσικών αυτοαντισωμάτων (261-264). Από τη δεύτερη ανοσοποίηση (στάδιο 2) και μετά, παρατηρήθηκε υψηλή δραστικότητα έναντι της μυοσίνης. Σημαντική είναι και η δραστικότητα έναντι F-ακτίνης, που παραμένει υψηλή μέχρι το στάδιο 6. Η δραστικότητα έναντι BSA αυξήθηκε παροδικά, με μέγιστο στο στάδιο 3 για το ζώο L46 και στα στάδια 2 και 3 για το ζώο L47. Μικρή αύξηση, με μέγιστο στο στάδιο 3, παρουσίασε η δραστικότητα έναντι G-ακτίνης, ενώ δεν αυξήθηκε καθόλου η δραστικότητα έναντι nDNA και τουμπουλίνης κατά τη διάρκεια των ανοσοποιήσεων. Τα ζώα-μάρτυρες, τα οποία ενέθηκαν μόνο με CFA, δεν παρουσίασαν δραστικότητα έναντι των παραπάνω αντιγόνων. Στη συνέχεια εξετάσαμε κατά πόσον η δραστικότητα έναντι των αντιγόνων αυτών οφείλεται σε διασταυρούμενη αντίδραση αντισωμάτων με την Tg.





Σχήμα 62. ΣΥΝΕΧΙΖΕΤΑΙ.



Σχήμα 62. Δραστικότητα των αντιορών, από τα διαδοχικά στάδια ανοσοποίησης με hTg των κουνελιών L46 και L47, έναντι διαφόρων μη θυρεοειδικών αντιγόνων: ανθρώπινη μυοσίνη, ανθρώπινη G- και F-ακτίνη, τουμπουλίνη χοίρου, φυσικό DNA (nDNA) και αλβουμίνη βοείου ορού (BSA). Στο σχήμα παρουσιάζεται η δραστικότητα των αντιορών σε αραιώσεις 1:100 και 1:500.

➤ Παρατηρείται σημαντική δραστικότητα των αντιορών έναντι μυοσίνης, F-ακτίνης, G-ακτίνης και BSA.

4.3.1.2.1 Διερεύνηση της δραστικότητας έναντι μυοσίνης

Η δραστικότητα των απομονωμένων ειδικών αντι-Tg αντισωμάτων από τα στάδια 0, 1, 2, 3 και 6 του ζώου L46 ελέγχθηκε έναντι μυοσίνης (Σχήμα 63α, Σχήμα 64). Ελέγχθηκε ξεχωριστά η δραστικότητα για κάθε κλάσμα έκλουσης των αντι-Tg αντισωμάτων (αντι-Tg/pH 2.8 και αντι-Tg/pH 2.2). Η δραστικότητα των αντι-Tg/pH 2.8 έναντι μυοσίνης γίνεται μέγιστη στο στάδιο 2 και μειώνεται στο στάδιο 3, ενώ η δραστικότητα των αντι-Tg/pH 2.2 έναντι μυοσίνης φτάνει σε υψηλότερο επίπεδο σε σχέση με αυτή των αντι-Tg/pH 2.8, με μέγιστο στο στάδιο 3. Η δραστικότητα έναντι μυοσίνης και των δύο κλασμάτων έκλουσης (αντι-Tg/pH 2.8 και αντι-Tg/pH 2.2) μηδενίζεται στο στάδιο 6, παρόλο που στον ορό αυτού του σταδίου υπήρχε δραστικότητα έναντι μυοσίνης (Σχήμα 62). Το γεγονός αυτό μας οδηγεί στην υπόθεση ότι, ενώ στα πρώτα στάδια ανοσοποίησης η δραστικότητα έναντι μυοσίνης οφείλεται σε αντισώματα με διασταυρούμενη αντίδραση μεταξύ Tg και μυοσίνης, στο στάδιο 6 παράγονται αντισώματα που είναι ειδικά μόνο για μυοσίνη.

Για να πιστοποιηθεί η δραστικότητα των αντι-Tg αντισωμάτων έναντι μυοσίνης, συγκρίθηκαν οι οροί από τα στάδια 0, 1, 2, 3 και 6 του ζώου L46 πριν και μετά την απομάκρυνση, με ανοσοπροσρόφηση, των αντι-Tg αντισωμάτων, ως προς τη δραστικότητά τους έναντι μυοσίνης (Σχήμα 65α). Παρατηρούμε ότι η δραστικότητα του ορού έναντι μυοσίνης εξαλείφεται με την αφαίρεση των αντι-Tg αντισωμάτων, στα στάδια 2 και 3. Αντίθετα, στο στάδιο 6 η αφαίρεση των αντι-Tg αντισωμάτων δε μειώνει τη δραστικότητα έναντι μυοσίνης. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με την απουσία δραστικότητας έναντι μυοσίνης, των αντι-Tg αντισωμάτων που απομονώθηκαν από το στάδιο 6 (Σχήμα 63α, Σχήμα 64).

Σε πειράματα ανταγωνιστικής ELISA, εξετάστηκαν: α) η αναστολή της πρόσδεσης σε ακινητοποιημένη μυοσίνη από το αυτόλογο διαλυτό αντιγόνο για τα στάδια 3 και 6 του κουνελιού L46 (Σχήμα 66α) και β) η αναστολή δραστικότητας έναντι ακινητοποιημένης μυοσίνης από διαλυτή hTg για τους αντιορούς των σταδίων 3, 4, 5 και 6 του κουνελιού L46 (Σχήμα 66β) καθώς και για τους αντιορούς των σταδίων 3 και 6 του ζώου L47 (Σχήμα 67). Διαπιστώθηκε: α) αυτόλογη αναστολή της πρόσδεσης σε μυοσίνη (Σχήμα

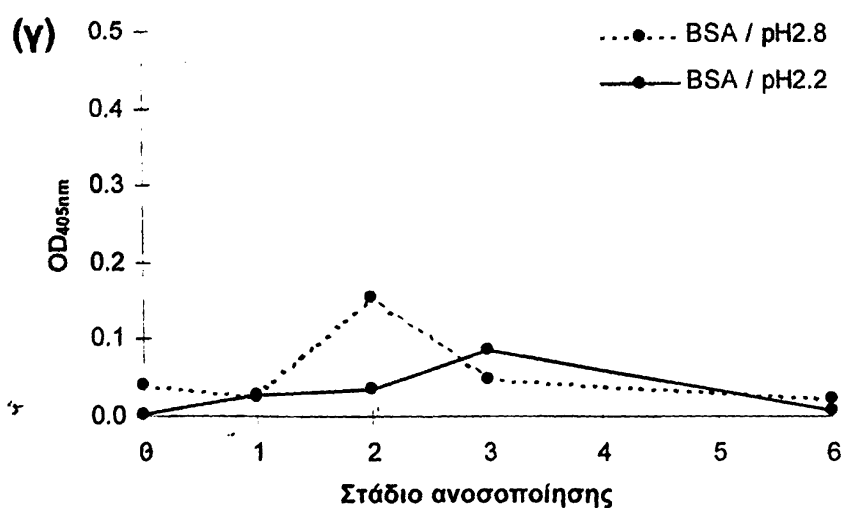
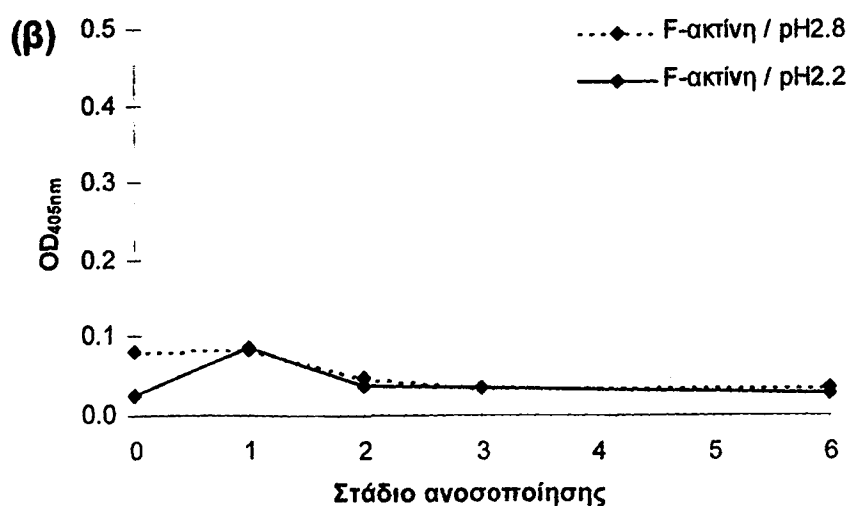
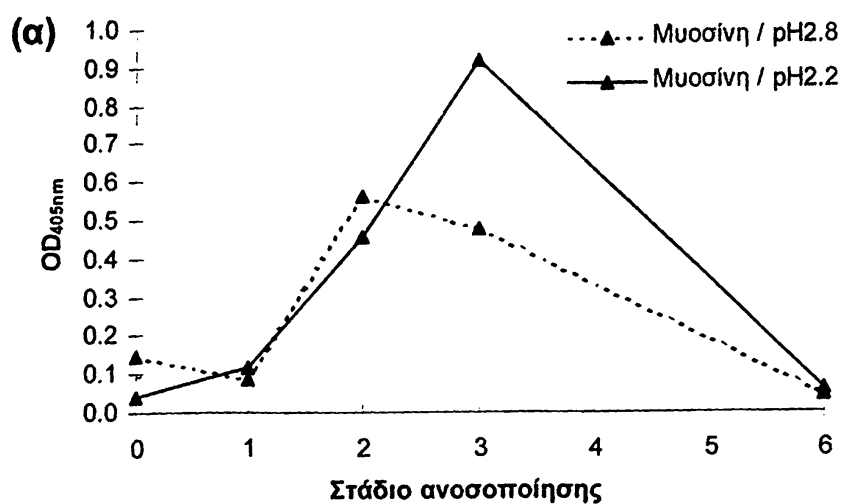
66α), γεγονός που επιβεβαιώνει ότι η δραστικότητα έναντι μυοσίνης είναι ειδική και δεν οφείλεται σε μη ειδική πρόσδεση. β) Στο στάδιο 3, η hTg αναστέλλει σημαντικά τη δραστικότητα έναντι μυοσίνης (50% αναστολή στα 25 pmol/ml), ενώ με την πάροδο των ανοσοποιήσεων η αναστολή αυτή ελαττώνεται (Σχήμα 66β). Το 50% της αναστολής για το στάδιο 4 βρίσκεται στα 100 pmol/ml και για το στάδιο 5 στα 380 pmol/ml. Στο στάδιο 6, η παρεμπόδιση είναι πολύ μικρότερη από τα προηγούμενα στάδια (Πίνακας XI). Παρόμοιο αποτέλεσμα προέκυψε και για το κουνέλι L47 (Σχήμα 67). Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με την παρατηρούμενη δραστικότητα των απομονωμένων αντι-Tg αντισωμάτων (Σχήμα 63α) και με τη δραστικότητα των αντιορών μετά την απομάκρυνση των ειδικών αντισωμάτων (Σχήμα 65α). Επιβεβαιώνεται έτσι ότι, ενώ στα πρώτα στάδια ανοσοποίησης τα αντι-μυοσίνης αντισώματα παρουσιάζουν διασταυρούμενη αντίδραση με την Tg, στο στάδιο 6 γίνονται ειδικά, μόνο για τη μυοσίνη.

Πίνακας XI. Συγκέντρωση διαλυτής hTg που προκαλεί 50% αναστολή δραστικότητας έναντι ακινητοποιημένης μυοσίνης, για τους αντιορούς των σταδίων 3-6 του ζώου L46.

Στάδιο ανοσοποίησης	50% αναστολή
3	25 pmol/ml
4	100 pmol/ml
5	380 pmol/ml
6	>1000 pmol/ml

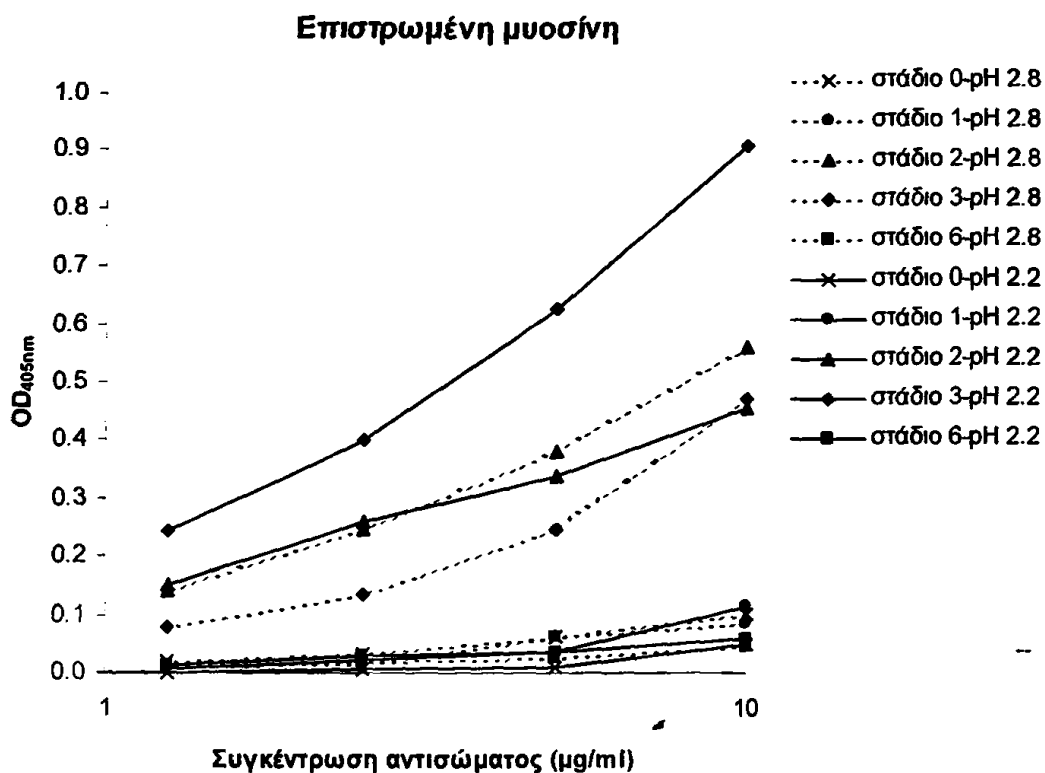
Στον αντιορό του σταδίου 3 του κουνελιού L46, εκτός από την αναστολή της δραστικότητας έναντι μυοσίνης από διαλυτή hTg, ελέγχθηκε και η αναστολή από bTg και ratTg (Σχήμα 68). Η bTg αναστέλλει τη δραστικότητα έναντι μυοσίνης εξίσου με την hTg (50% αναστολή στα 30 pmol/ml), ενώ η αναστολή από την ratTg είναι σημαντικά μικρότερη (50% αναστολή στα 860 pmol/ml). Συμπεραίνεται ότι ο κοινός επίτοπος μεταξύ της μυοσίνης και της Tg (ο οποίος κατά πάσα πιθανότητα είναι διαμορφωτικός) παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα ανάμεσα στην hTg και την bTg, ενώ διαφέρει στην ratTg.





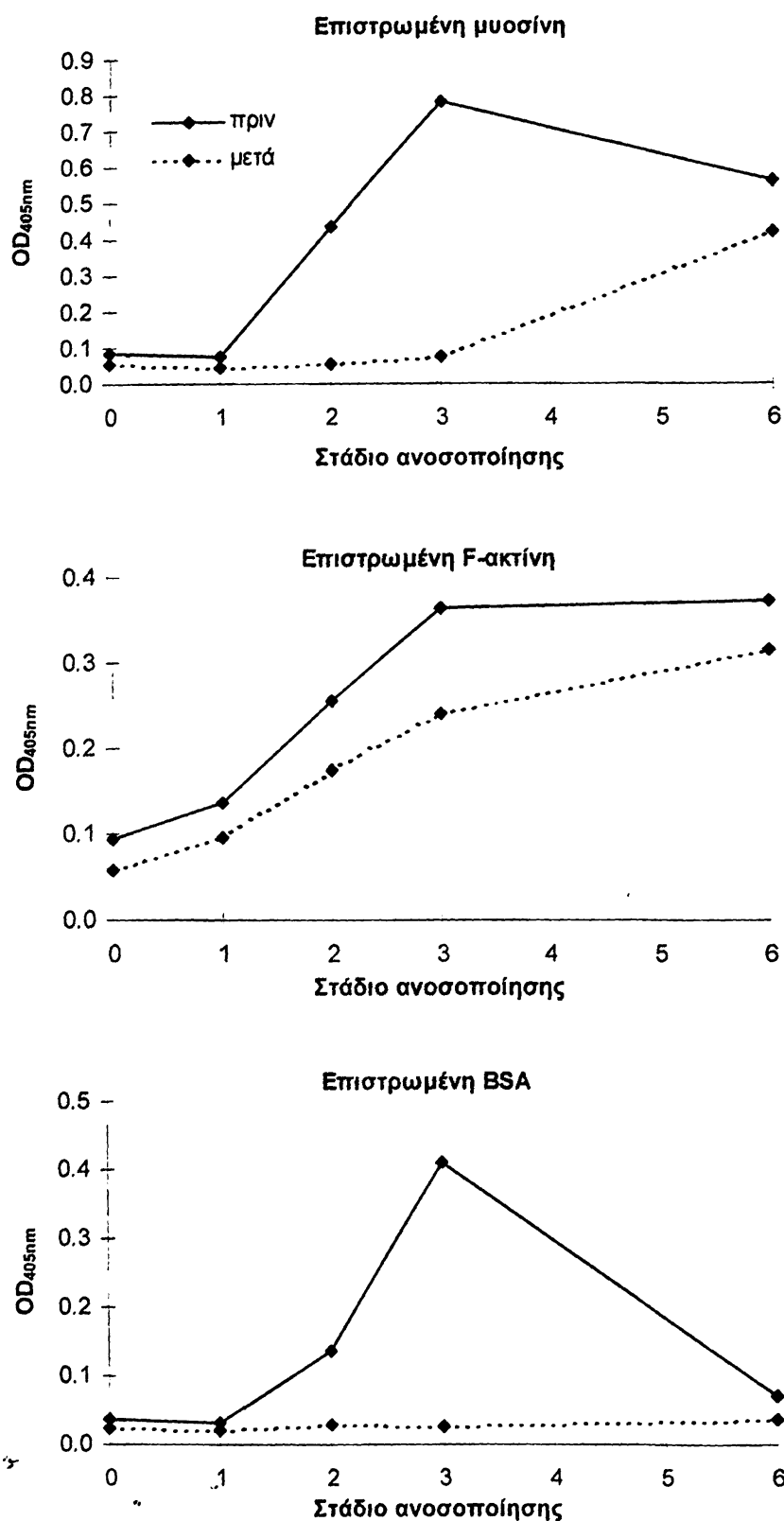
Σχήμα 63. Δραστικότητα των ειδικών αντι-Tg αντισωμάτων που απομονώθηκαν από τα στάδια 0, 1, 2, 3 και 6 του κουνελιού L46, έναντι διαφόρων μη θυρεοειδικών αντιγόνων: (α) μυοσίνη, (β) F-ακτίνη και (γ) BSA. Στο σχήμα παρουσιάζεται ξεχωριστά η δραστικότητα για κάθε κλάσμα έκλουσης (pH 2.8 και pH 2.2) σε συγκέντρωση 10μg/ml.

➤ Τα αντι-Tg αντισώματα: α) αντιδρούν με τη μυοσίνη κατά τα πρώτα στάδια ανοσοποίησης, όχι όμως και κατά το τελικό στάδιο, β) δεν εμφανίζουν αύξηση της δραστικότητάς τους έναντι F-ακτίνης και γ) αντιδρούν με τη BSA στα στάδια 2 και 3.



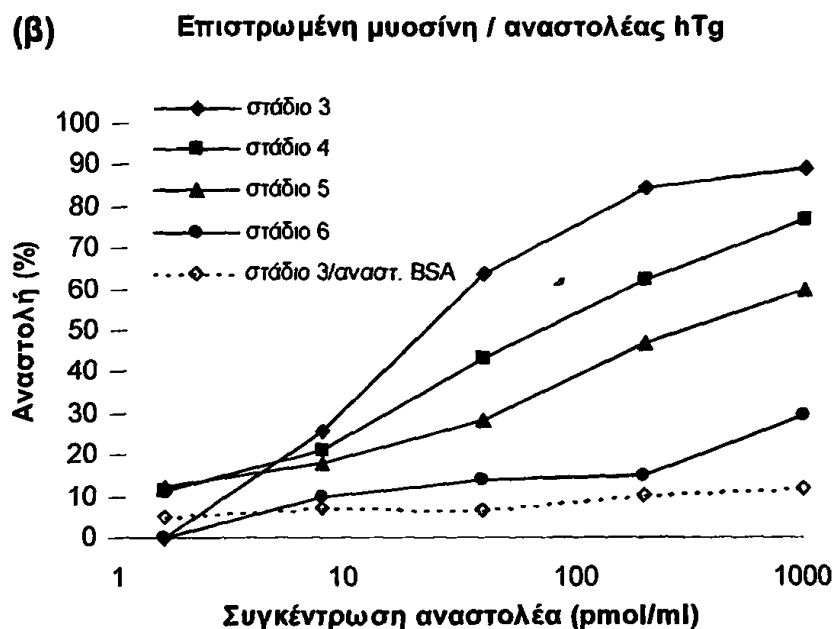
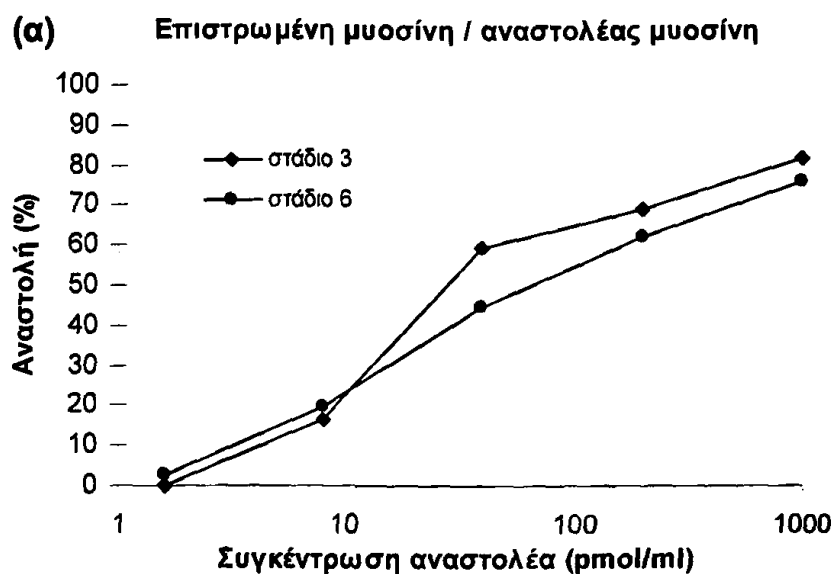
Σχήμα 64. Δραστικότητα των ειδικών αντι-Tg αντισωμάτων που απομονώθηκαν από τα στάδια 0, 1, 2, 3 και 6 του κουνελιού L46, έναντι μυοσίνης. Παρουσιάζεται η OD συναρτήσει της συγκέντρωσης αντισώματος, για τα δύο κλάσματα έκλουσης (pH 2.8 και pH 2.2).

➤ Η δραστικότητα των αντι-Tg έναντι μυοσίνης αυξάνεται σταδιακά στα πρώτα στάδια ανοσοποίησης, ενώ στο τελικό στάδιο δεν διαπιστώνεται δραστικότητα των αντι-Tg έναντι μυοσίνης.



Σχήμα 65. Σύγκριση της δραστικότητας του ορού από τα στάδια 0, 1, 2, 3 και 6 του κουνελιού L48, έναντι των αντιγόνων μυοσίνης, F-ακτίνης και BSA, πριν και μετά την απομάκρυνση των αντι-Tg αντισωμάτων με ανοσοπροσρόφηση.

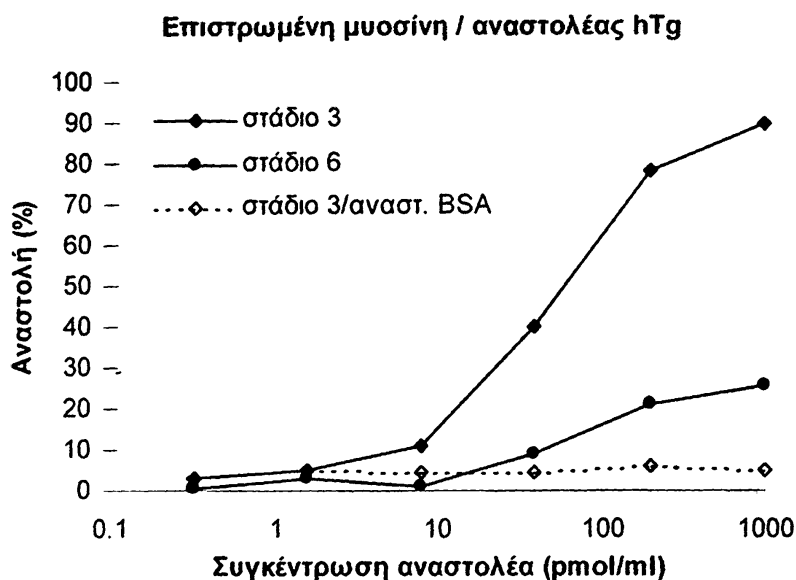
➤ Διαπιστώνεται ότι: α) Κατά τα πρώτα στάδια ανοσοποίησης η δραστικότητα έναντι μυοσίνης εξαλείφεται μετά την απομάκρυνση των αντι-Tg αντισωμάτων. Δεν συμβαίνει το ίδιο για το τελικό στάδιο. β) Η απομάκρυνση των αντι-Tg από τον ορό έχει σαν αποτέλεσμα μικρή μόνο μείωση της δραστικότητας έναντι F-ακτίνης. γ) Η δραστικότητα έναντι BSA εξαλείφεται μετά την απομάκρυνση των αντι-Tg αντισωμάτων.



Σχήμα 66. (α) Αναστολή της πρόσδεσης σε ακινητοποιημένη μυοσίνη από το αυτόλογο διαλυτό αντιγόνο για τα στάδια 3 και 6 του κουνελιού L46. (β) Αναστολή δραστηριότητας έναντι ακινητοποιημένης μυοσίνης από διαλυτή hTg για τους αντιορούς των σταδίων 3, 4, 5 και 6 του κουνελιού L46. Ως μάρτυρας, παρατίθεται η δοκιμασία αναστολής της δραστηριότητας από BSA για τον ορό του σταδίου 3. Στα σχήματα απεικονίζεται το ποσοστό αναστολής συναρτήσει της συγκέντρωσης του αναστολέα.

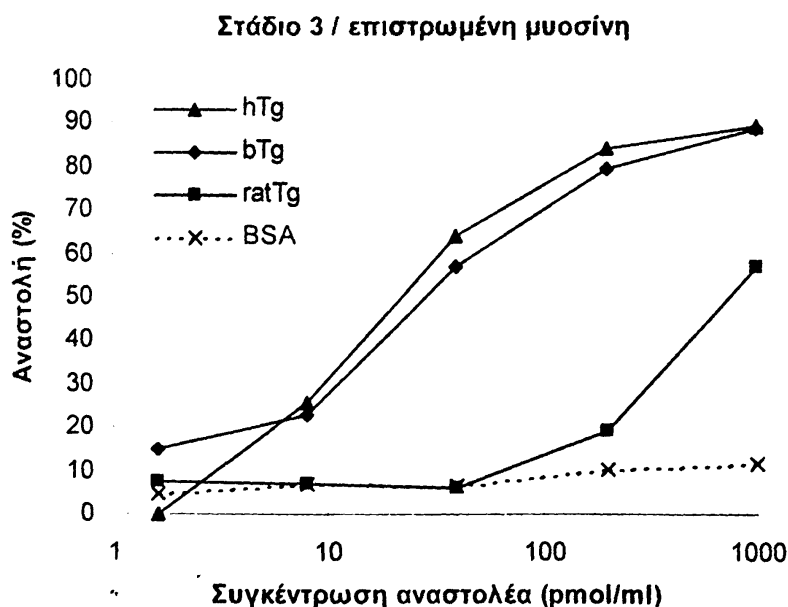
➤ Συμπεραίνονται τα ακόλουθα: α) Παρατηρείται αυτόλογη παρεμπόδιση της πρόσδεσης σε μυοσίνη, γεγονός που επιβεβαιώνει ότι η δραστηριότητα έναντι μυοσίνης είναι ειδική και δεν οφείλεται σε μη ειδική πρόσδεση. β) Η αναστολή δραστηριότητας των ορών έναντι μυοσίνης από διαλυτή Tg ελαττώνεται βαθμιαία από το στάδιο 3 στο στάδιο 6.





Σχήμα 67. Αναστολή δραστηριότητας έναντι ακινητοποιημένης μυοσίνης από διαλυτή hTg για τους αντιορούς των σταδίων 3 και 6 του κουνελιού L47. Απεικονίζεται το ποσοστό αναστολής συναρτήσει της συγκέντρωσης του αναστολέα. Ως μάρτυρας, χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία αναστολής από BSA, της δραστηριότητας του ορού του σταδίου 3.

➤ Η αναστολή δραστηριότητας των ορών έναντι μυοσίνης από διαλυτή Tg, ελαττώνεται σημαντικά από το στάδιο 3 στο στάδιο 6.



Σχήμα 68. Δοκιμασία αναστολής της δραστηριότητας έναντι μυοσίνης από διαλυτές hTg, bTg και ratTg στον αντιορό του σταδίου 3 του κουνελιού L46. Στο σχήμα απεικονίζεται το ποσοστό αναστολής συναρτήσει της συγκέντρωσης του αναστολέα. Η BSA χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας και δεν έδειξε αναστολή.

➤ Η bTg αναστέλλει περίπου εξίσου με την hTg (50% αναστολή σε συγκέντρωση αναστολέα 30 και 25 pmol/ml αντίστοιχα), ενώ η αναστολή από ratTg είναι μικρότερη (50% αναστολή περίπου στα 860 pmol/ml).

4.3.1.2.2 Διερεύνηση της δραστικότητας έναντι F-ακτίνης

Ελέγχθηκε η δραστικότητα των απομονωμένων ειδικών αντι-Tg αντισωμάτων από τα στάδια 0, 1, 2, 3 και 6 του ζώου L46 έναντι F-ακτίνης (Σχήμα 63β). Μελετήθηκε ξεχωριστά η δραστικότητα για κάθε κλάσμα έκλουσης των αντι-Tg αντισωμάτων (αντι-Tg/pH 2.8 και αντι-Tg/pH 2.2). Διαπιστώθηκε ότι τα αντι-Tg αντισώματα δεν δείχνουν αύξηση της δραστικότητας έναντι της F-ακτίνης. Κατά συνέπεια, η δραστικότητα έναντι F-ακτίνης που είχε παρατηρηθεί στον ορό (Σχήμα 62), δεν οφείλεται σε διασταυρούμενη αντίδραση αντισωμάτων μεταξύ Tg και F-ακτίνης.

Μετά την απομάκρυνση των αντι-Tg αντισωμάτων, η δραστικότητα του ορού έναντι F-ακτίνης παρουσιάζει μόνο μικρή μείωση (Σχήμα 65β), γεγονός που συμφωνεί με την έλλειψη δραστικότητας των απομονωμένων αντι-Tg αντισωμάτων έναντι F-ακτίνης (Σχήμα 63β).

Σε πείραμα ανταγωνιστικής ELISA, εξετάστηκε η αναστολή δραστικότητας έναντι ακινητοποιημένης F-ακτίνης από διαλυτή hTg του αντιορού του σταδίου 6 του κουνελιού L46. Όπως ήταν αναμενόμενο, δεν παρατηρήθηκε αναστολή. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με την παρατηρούμενη δραστικότητα των απομονωμένων αντι-Tg αντισωμάτων (Σχήμα 63β) και με τη δραστικότητα των αντιορών μετά την απομάκρυνση των ειδικών αντισωμάτων (Σχήμα 65β). Φαίνεται επομένως ότι η δραστικότητα έναντι F-ακτίνης δεν οφείλεται σε διασταυρούμενη αντίδραση αντισωμάτων μεταξύ Tg και F-ακτίνης.

4.3.1.2.3 Διερεύνηση της δραστικότητας έναντι BSA

Με παρόμοιο τρόπο, η μελέτη της δραστικότητας των αντι-Tg αντισωμάτων έναντι BSA έδειξε ότι τα αντι-Tg/pH 2.8 παρουσιάζουν μέγιστη δραστικότητα έναντι BSA στο στάδιο 2, ενώ η αντίστοιχη των αντι-Tg/pH 2.2 εμφανίζεται στο στάδιο 3 (Σχήμα 63γ). Η δραστικότητα των ορών έναντι BSA εξαλείφεται εντελώς με την αφαίρεση των αντι-Tg αντισωμάτων (Σχήμα 65γ). Συνεπώς, η δραστικότητα έναντι BSA οφείλεται σε διασταυρούμενη αντίδραση αντισωμάτων μεταξύ Tg και BSA.



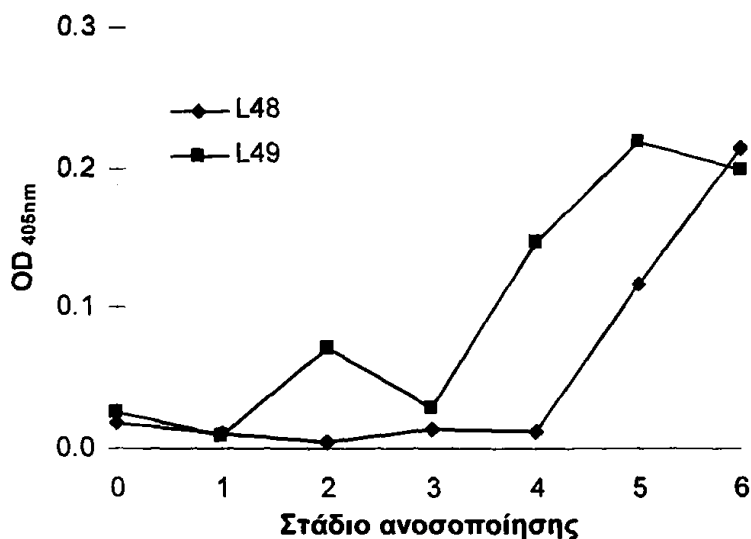
4.3.2 Διαμοριακή επέκταση δραστικότητας κατά την πειραματική ανοσοποίηση με το πεπτίδιο TgP41

Κατά την ανοσοποίηση με το πεπτίδιο TgP41 της ανθρώπινης Tg (βλ. Πίνακας III, σελ. 87) μελετήθηκε η ανάπτυξη δραστικότητας έναντι και άλλων θυρεοειδικών και μη θυρεοειδικών αντιγόνων εκτός της Tg. Ελέγχθηκε η δραστικότητα ορών και απομονωμένων αντισωμάτων από τα διαδοχικά στάδια ανοσοποίησης, με μη ανταγωνιστική και ανταγωνιστική ELISA, έναντι της ανθρώπινης θυρεοειδικής υπεροξειδάσης (TPO) και των μη θυρεοειδικών αντιγόνων: ανθρώπινης μυοσίνης και αλβουμίνης βοείου ορού (BSA).

4.3.2.1 Ορολογική απόκριση έναντι θυρεοειδικής υπεροξειδάσης

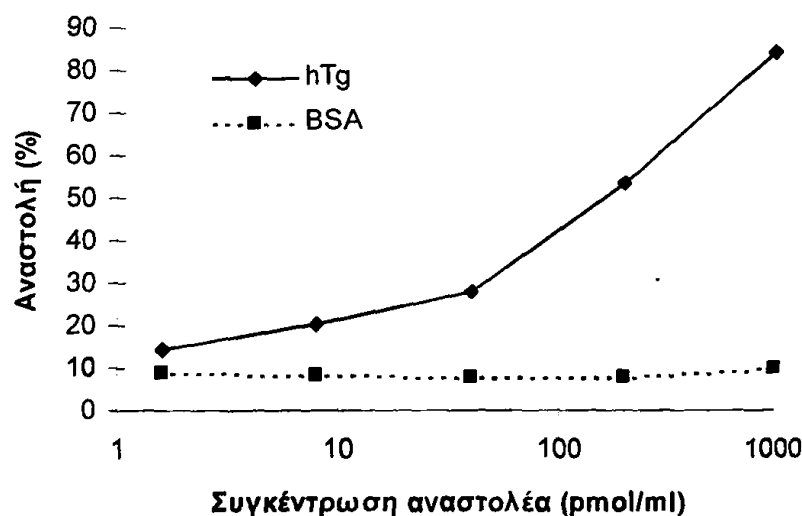
Ελέγχθηκε η ορολογική απόκριση των κουνελιών έναντι ανθρώπινης TPO. Κατά τα τελευταία στάδια της ανοσοποίησης παρατηρείται, και στα δύο ζώα, μικρή αύξηση της δραστικότητας έναντι TPO (Σχήμα 69). Στο κουνέλι L48, η δραστικότητα έναντι TPO εμφανίζεται ουσιαστικά στο στάδιο 5, ενώ στο κουνέλι L49 η αύξηση της δραστικότητας έναντι TPO αρχίζει κυρίως από το στάδιο 4. Με ανταγωνιστική ELISA, μελετήθηκε η αναστολή της πρόσδεσης του αντιορού του σταδίου 6 από το ζώο L48, σε ακινητοποιημένη TPO από διαλυτή hTg. Όπως παρατηρήθηκε, η Tg αναστέλλει τη δραστικότητα του ορού έναντι TPO (Σχήμα 70). Η χαμηλή δραστικότητα έναντι TPO κατά τα τελευταία στάδια της ανοσοποίησης οφείλεται πολύ πιθανά σε διασταυρούμενη αντίδραση μεταξύ Tg και TPO. Ο προηγούμενος ισχυρισμός επιβεβαιώνεται επίσης από το αποτέλεσμα του ελέγχου της δραστικότητας των αντι-Tg αντισωμάτων που απομονώθηκαν με χρωματογραφία συγγένειας από τον αντιορό του σταδίου 6 του κουνελιού L49 έναντι της TPO, σε σύγκριση με την αντίστοιχη δραστικότητα των αντι-TgP41 αντισωμάτων που απομονώθηκαν από τον ίδιο αντιορό (Σχήμα 71). Παρατηρούμε ότι τα αντι-Tg αντισώματα αντιδρούν με την TPO, ενώ τα αντι-TgP41 δεν εμφανίζουν τέτοια δραστικότητα. Από το αποτέλεσμα αυτό, συμπεραίνουμε ακόμα ότι ο κοινός επίτοπος μεταξύ Tg και TPO δεν σχετίζεται με την αλληλουχία του πεπτιδίου TgP41. Το γεγονός αυτό θα πρέπει να συνδυαστεί με την ενδομοριακή επέκταση επιτόπων που

διαπιστώθηκε ότι λαμβάνει χώρα κατά την ανοσοποίηση με το πεπτίδιο TgP41 (§4.2.2.4, σελ. 137). Προφανώς κατά την ενδομοριακή επέκταση επιτόπων παράγονται και αντισώματα έναντι της Tg με διασταυρούμενη αντίδραση για την TPO.



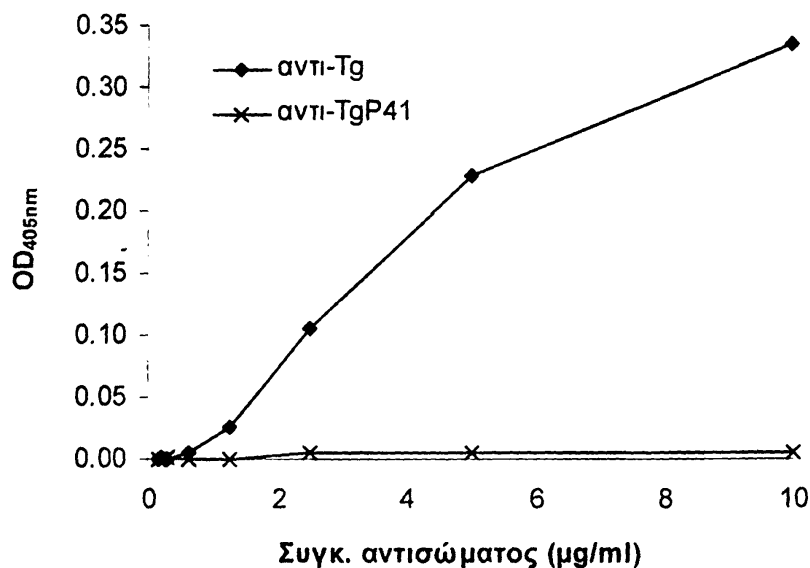
Σχήμα 69. Ορολογική απόκριση των κουνελιών L48 και L49 έναντι ανθρώπινης TPO κατά τα διαδοχικά στάδια ανοσοποίησης με TgP41. Παρουσιάζονται οι τιμές OD στα διαδοχικά στάδια ανοσοποίησης, για αραιώσεις των ορών 1:100.

➤ Παρατηρείται μικρή αύξηση της δραστηριότητας κατά τα τελικά στάδια της ανοσοποίησης και στα δύο ζώα.



Σχήμα 70. Δοκιμασία αναστολής της πρόσδεσης του αντιορού του σταδίου 6 από το ζώο L48, σε ακινητοποιημένη TPO από διαλυτή hTg. Παρουσιάζεται το ποσοστό αναστολής συναρτήσει της συγκέντρωσης του αναστολέα.

➤ Η αναστολή της δραστηριότητας του ορού σε ακινητοποιημένη TPO από διαλυτή hTg φτάνει το 84% σε συγκέντρωση hTg 1,000 pmol/ml (50% αναστολή στα 180 pmol/ml). Η BSA χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας και δεν έδειξε αναστολή.



Σχήμα 71. Έλεγχος δραστηριότητας των απομονωμένων αντι-Tg και αντι-TgP41 αντισωμάτων, από τον αντιορό του σταδίου 6 του κουνελιού L49, έναντι ανθρώπινης ΤΡΟ. Παρουσιάζεται η δραστηριότητα (OD) συναρτήσει της συγκέντρωσης των αντισωμάτων (από 0.15 μέχρι 10 µg/ml).

➤ Παρατηρείται αντι-ΤΡΟ δραστηριότητα από τα αντι-Tg αντισώματα, αλλά όχι από τα αντι-TgP41.

4.3.2.2 Ορολογική απόκριση έναντι μυοσίνης και BSA

Η δραστηριότητα των αντιορών, από κουνέλια ανοσοποιημένα με το TgP41, ελέγχθηκε επίσης έναντι της ανθρώπινης μυοσίνης και της BSA. Υπενθυμίζεται ότι κατά την ανοσοποίηση με hTg αναπτύχθηκαν αντισώματα με διασταυρούμενη αντίδραση έναντι της Tg και των δύο αυτών μη θυρεοειδικών αντιγόνων (§4.3.1.2). Οι αντιοροί από τα δύο ζώα δεν εμφάνισαν καμιά αύξηση δραστηριότητας έναντι της μυοσίνης και της BSA.

5. Συζήτηση - Συμπεράσματα

Ο προσδιορισμός πεπτιδίων τα οποία περιλαμβάνουν επίτοπους αυτοαντισωμάτων, έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα χρήσιμος στην πρόγνωση και διάγνωση αυτοάνοσων ασθενειών (265). Επίσης, είναι δυνατόν η ειδικότητα αυτοαντισωμάτων έναντι διαφορετικών επιτόπων του ίδιου αντιγόνου να διαφοροποιήσει κάποιες νόσους (266).

Εξαιτίας του μεγάλου μεγέθους της Tg, σε όλες τις προηγούμενες προσπάθειες ταυτοποίησης αντιγονικών αλληλουχιών της Tg που αναγνωρίζονται από παθολογικά αυτοαντισώματα ή αντισώματα που επάγονται σε πειραματόζωα κατά την πειραματική ανοσοποίηση, έχουν χρησιμοποιηθεί ανασυνδυασμένα πεπτίδια (178,213,215,216) ή πρωτεολυτικά θραύσματα (219). Έτσι, οι επίτοποι της Tg που έχουν προσδιοριστεί μέχρι σήμερα, περιέχονται σε μεγάλου μεγέθους πεπτίδια (συνήθως αρκετές δεκάδες ή εκατοντάδες αμινοξέων).

Η καρβοξυ-τελική περιοχή της Tg είναι ιδιαίτερα ανοσογονική, αφού περιλαμβάνει τέσσερις από τους πέντε παθογονικούς T-επίτοπους οι οποίοι είναι γνωστοί από ζωικά μοντέλα. Ταυτόχρονα, η περιοχή αυτή της Tg είναι ομόλογη με το ένζυμο AChE, γεγονός που οδήγησε στην υπόθεση ότι η διασταυρούμενη αντίδραση αντισωμάτων μεταξύ της Tg και της AChE των οφθαλμικών μυών εμπλέκεται στην παθογένεια της θυρεοειδικής οφθαλμοπάθειας (TED).

Η παρούσα μελέτη είχε ως στόχους:

1. τη χαρτογράφηση στην καρβοξυ-τελική περιοχή της ανθρώπινης Tg, επιτόπων των αυτοαντισωμάτων (αυτοεπιτόπων) στις αυτοάνοσες ασθένειες του θυρεοειδούς, με τη χρήση μικρών (20-μερών) συνθετικών πεπτιδίων.

2. τη διερεύνηση της παρουσίας επιτόπων επαγόμενων αντισωμάτων (ετεροεπιτόπων) σε πεπτίδια που περιλαμβάνουν επίτοπους αυτοαντισωμάτων (αυτοεπιτόπους), καθώς επίσης της ανοσογονικότητας και της παθογονικότητας των πεπτιδίων που περιλαμβάνουν ετεροεπιτόπους.

3. τη διερεύνηση της επαγωγής ενδομοριακής και διαμοριακής επέκτασης της δραστηριότητας μετά από χορήγηση ανοσογονικού(ών) πεπτιδίου(ων).



5.1 Χαρτογράφηση επιτόπων αυτοαντισωμάτων που ανευρίσκονται σε αυτοάνοσα νοσήματα του θυρεοειδούς

Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήσαμε μικρά (μήκους 20 αμινοξέων) επικαλυπτόμενα συνθετικά πεπτιδία που κάλυπταν την έντονα ανοσογονική (122) και ομόλογη με την AChE καρβοξυ-τελική περιοχή της ανθρώπινης Tg (αλληλουχία 2171-2748), για να εντοπίσουμε ορολογικούς επιτόπους που αναγνωρίζονται από παθολογικά, ειδικά για την Tg αντισώματα τάξης IgG. Αυτή η συστηματική μέθοδος δεν έχει εφαρμοστεί μέχρι τώρα στη χαρτογράφηση επιτόπων στο μόριο της Tg. Οι επίτοποι πάνω σε μια πρωτεΐνη μπορούν να είναι γραμμικοί ή διαμορφωτικοί, ενώ οι τελευταίοι μπορούν να διαχωριστούν επιπλέον σε συνεχείς ή ασυνεχείς. Στην παρούσα μελέτη, οι επίτοποι που προσδιορίστηκαν θεωρούνται γραμμικοί και συνεχείς, λόγω του περιορισμού που επιβάλλει η μέθοδος στο μήκος των συνθετικών πεπτιδίων (μέχρι 20 αμινοξέα). Επίσης, με τη μεθοδολογία αυτή δεν είναι δυνατό να εντοπιστούν αυτοεπίτοποι που εξαρτώνται από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της Tg (213), όπως ιωδίωση και γλυκοζυλίωση, ή περιλαμβάνουν θέσεις σύνθεσης ορμονών (199).

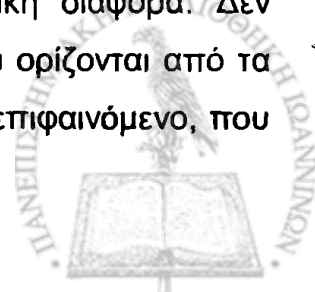
Η χρήση μεγάλων ανασυνδυασμένων ή πρωτεολυτικών τμημάτων για τη χαρτογράφηση επιτόπων έχει ως μειονέκτημα την πιθανή απόκρυψη (masking) των γραμμικών επιτόπων από την τριτοταγή δομή των υπό μελέτη τμημάτων. Από την άλλη, η χρησιμοποίηση συνθετικών πεπτιδίων μικρού μεγέθους, έχει το μειονέκτημα ότι δεν μπορεί να οδηγήσει στον εντοπισμό μη γραμμικών, ιωδιωμένων ή γλυκοζυλιωμένων αντιγονικών καθοριστών. Αυτό όμως αντισταθμίζεται από το γεγονός ότι η προσέγγιση αυτή προσφέρει μια συστηματική μέθοδο διερεύνησης, που έχει εφαρμοστεί με επιτυχία σε άλλα μικρότερα αυτοαντιγόνα (266).

Στη μελέτη μας, ελέγχθηκε η δραστικότητα των ολικών ανοσοσφαιρινών τάξης IgG από Tg/AChE δι-δραστικούς ορούς ασθενών με GD, έναντι των πεπτιδίων του καρβοξυ-τελικού τμήματος της Tg. Δεν διαπιστώθηκε η ύπαρξη ανοσοκυρίαρχης περιοχής μέσα στο υπό εξέταση τμήμα της Tg, αφού τα πεπτιδία που αναγνωρίστηκαν και από τα τέσσερα παρασκευάσματα IgG που ελέγχθηκαν, ήταν κατανεμημένα σε όλο το μήκος της αλληλουχίας. Χρησιμοποιώντας πρωτεολυτικά θραύσματα ή αποδιαταγμένη Tg, μερικοί

ερευνητές συμπέραναν ότι οι κύριοι αυτοεπίτοποι της Tg είναι κυρίως διαμορφωτικοί, αφού βρήκαν ότι μόνο η φυσική Tg ή τα μεγάλα πρωτεολυτικά θραύσματα αναγνωρίζονται από αυτοαντισώματα (212,218,220). Τα δικά μας αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι γραμμικοί αυτοεπίτοποι βρίσκονται διασκορπισμένοι σε όλη την έκταση της υπό εξέταση καρβοξυ-τελικής περιοχής της Tg. Αυτή η ασυμφωνία, μπορεί να εξηγηθεί από τη μη ανοσοκυρίαρχη φύση των γραμμικών επιτόπων καθώς και από την πιθανή απόκρυψη ή καταστροφή αυτών των επιτόπων κατά την αποδιάταξη ή την ενζυμική πέψη της Tg.

Τα πεπτίδια TgP15, TgP26 και TgP41 (αλληλουχίες 2339-2358, 2471-2490 και 2651-2670 της ανθρώπινης Tg, αντίστοιχα, Πίνακας III, σελ. 87) αναγνωρίστηκαν ως οι πιθανότεροι στόχοι των αυτοαντισωμάτων πάνω στη φυσική Tg. Όπως διαπιστώνουμε από τη μελέτη των δομικών παραμέτρων του καρβοξυ-τελικού τμήματος της Tg (Σχήμα 27, σελ. 96) και τα τρία πεπτίδια περιλαμβάνουν εκτεθειμένα και μη εκτεθειμένα τμήματα. Οι περιοχές των πεπτιδίων που βρίσκονται εκτεθειμένες στο μόριο της Tg είναι πιθανό να αναγνωρίζονται από τα αντισώματα πάνω στη φυσική Tg.

Τα πεπτίδια αυτά, παρασκευάστηκαν στη συνέχεια σε μεγάλη ποσότητα, με τη μέθοδο της στερεάς φάσης (251), και ελήφθησαν σε ελεύθερη μορφή, ώστε να μελετηθούν εκτενώς. Η δραστικότητα μεγάλου αριθμού ορών από ασθενείς με αυτοάνοσες ασθένειες του θυρεοειδούς (GD και HT) έναντι των πεπτιδίων αυτών ελέγχθηκε με ELISA. Τα πεπτίδια αναγνωρίστηκαν από σημαντικό ποσοστό ορών ασθενών με GD (22-35%), αλλά όχι από την πλειοψηφία των ασθενών, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι επίτοποι που ορίζονται από τα πεπτίδια δεν είναι κυρίαρχοι μεταξύ των ασθενών με GD. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνει τα ευρήματα άλλων ερευνητών (210), σύμφωνα με τα οποία, οι κυρίαρχοι επίτοποι της Tg δεν είναι γραμμικοί αλλά διαμορφωτικοί. Εντούτοις, οι περισσότεροι οροί ασθενών με GD (56.6%) ήταν θετικοί για ένα τουλάχιστον από τα τρία πεπτίδια. Και τα τρία πεπτίδια αναγνωρίστηκαν από τους ορούς ασθενών με GD σε ποσοστό υψηλότερο από αυτό των ασθενών με HT, με στατιστικά σημαντική διαφορά. Δεν διευκρινίστηκε αν τα αντισώματα έναντι των επιτόπων που ορίζονται από τα τρία αυτά πεπτίδια έχουν κάποιο παθογονικό ρόλο ή είναι επιφαινόμενο, που



προκύπτει από διάσπαση ή αποδιάταξη της Tg. Η διαφοροποίηση των ασθενειών GD και HT με βάση τους επίτοπους που αναγνωρίζουν τα αντι-Tg αυτοαντισώματα έχει αναφερθεί και από άλλους ερευνητές, όπως αναπτύχθηκε στην παράγραφο 2.4.3 (210,218).

Αυξημένη δραστικότητα έναντι του πεπτιδίου TgP26 στον ορό ασθενών με GD συσχετίζεται στατιστικά με την εκδήλωση οφθαλμοπάθειας. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι υπάρχουν κοινοί επίτοποι ανάμεσα στις πρωτεΐνες Tg και AChE (214,177), οι οποίοι είναι δυνατόν να ευθύνονται για την παθογένεια της θυρεοειδικής οφθαλμοπάθειας. Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε αντίθεση με προηγούμενη μελέτη (267), στην οποία ήταν αμφίβολη η ανίχνευση διασταυρούμενης αντίδρασης μεταξύ Tg και AChE. Η ασυμφωνία αυτή ίσως οφείλεται στο είδος του αντιγόνου που χρησιμοποιήθηκε, αφού η αντιγονικότητα μπορεί να διαφέρει ακόμα και ανάμεσα σε διαφορετικούς τύπους ανθρώπινης χολινεστεράσης (268). Οι Ludgate και συν. (178) εντόπισαν ένα ανασυνδυασμένο πεπτίδιο της Tg μήκους 89 αμινοξέων, το οποίο περιείχε έναν (ή περισσότερους) Tg/AChE κοινό επίτοπο, που αναγνωρίστηκε από ασθενείς με αυτοάνοσες ασθένειες του θυρεοειδούς, κυρίως με GD (214). Εντούτοις, η δραστικότητα έναντι του πεπτιδίου αυτού δεν συσχετίστηκε με την εκδήλωση οφθαλμοπάθειας. Η δραστικότητα ορών έναντι της AChE αναστέλλεται από διαλυτό πεπτίδιο TgP26 στην περίπτωση δύο από τους δέκα TgP26-αντιδρώντες ορούς ασθενών με GD που ελέγχθηκαν. Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει ότι το TgP26 περιλαμβάνει ένα Tg/AChE κοινό επίτοπο. Η χαμηλή συχνότητα εμφάνισης αναστολής (2/10) μπορεί να εξηγηθεί ως εξής: (α) Τα AChE-αντιδρώντα αντισώματα κατευθύνονται πιθανότατα έναντι πολλών θέσεων (επιτόπων) της πρωτεΐνης. Κατά συνέπεια, η αναστολή της δέσμευσης, με διαλυτό TgP26, ενός υποπληθυσμού των αντι-AChE αντισωμάτων (δηλαδή αυτών που κατεύθύνονται έναντι της TgP26-ομόλογης περιοχής της AChE), δεν θα επηρέαζε σημαντικά τη δραστικότητα του ορού έναντι της AChE. (β) Η συγγένεια των αυτοαντισωμάτων είναι πιθανόν μεγαλύτερη για την πρωτεΐνη παρά για το 20-μερές πεπτίδιο.

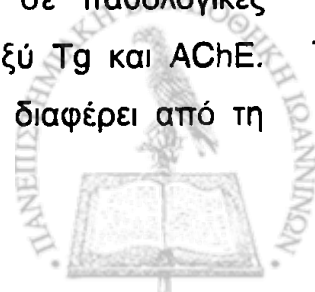
Όταν γίνει στοίχιση ολόκληρης της αλληλουχίας της AChE με την καρβοξυ-τελική περιοχή της Tg, τότε το πεπτίδιο TgP26 αντιστοιχεί στην



περιοχή 313-332 της ανθρώπινης AChE. Από τα 20 αμινοξέα της αλληλουχίας του TgP26, τα τρία είναι κοινά και άλλα τέσσερα αποτελούν συντηρητικές υποκαταστάσεις στην ομόλογη αλληλουχία της ανθρώπινης AChE (53) (Πίνακας VI, σελ. 97). Στο καρβοξυ-τελικό άκρο του πεπτιδίου TgP26 υπάρχει μια περιοχή που έχει αρκετή ομολογία με την αντίστοιχη περιοχή της AChE. Η περιοχή αυτή θα μπορούσε ίσως να αποτελεί κοινό γραμμικό επίτοπο μεταξύ Tg και AChE. Ωστόσο, με βάση τα υπολογιστικά δεδομένα για την υδροφοβικότητα και την τρισδιάστατη δομή (§4.1.7), φαίνεται ότι η περιοχή αυτή του πεπτιδίου, πιθανό να μην είναι εκτεθειμένη στις πρωτεΐνες Tg και AChE. Πάντως, ακόμα και αν η καρβοξυ-τελική περιοχή του πεπτιδίου TgP26 δεν αποτελεί κοινό γραμμικό επίτοπο μεταξύ Tg και AChE, δεν αποκλείεται ο κοινός επίτοπος να περιέχεται σε κάποια διαμορφωτική δομή του πεπτιδίου που είναι όμοια ανάμεσα στις δύο πρωτεΐνες. Όπως διαπιστώθηκε, οι πρωτεΐνες Tg και AChE ενδέχεται να εμφανίζουν ομοιότητα στην τρισδιάστατη δομή τους στο αμινο-τελικό τμήμα του TgP26 (§4.1.7).

Οι επίτοποι του προσδιορίζονται από τα πεπτίδια TgP15 και TgP26 διαφέρουν από τον Tg/AChE κοινό επίτοπο των Ludgate και συν. (37), καθώς και από όλους τους γνωστούς αυτοεπιτόπους της Tg ή επιτόπους που παράγονται κατά την πειραματική ανοσοποίηση με Tg (ετεροεπίτοποι) (213,215,216,219). Το πεπτίδιο TgP41 περιλαμβάνεται στο τμήμα 2644-2730 της ανθρώπινης Tg, το οποίο φέρει ετεροεπίτοπο (213). Πράγματι, όπως φάνηκε στη μελέτη μας, και θα συζητηθεί εκτενέστερα στη συνέχεια, το TgP41 αναγνωρίζεται από αντιορούς κουνελιών που ανοσοποιήθηκαν με ανθρώπινη Tg. Αντίθετα, τα TgP15 και TgP26 δεν αναγνωρίζονται από τους αντιορούς, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα πεπτίδια αυτά περιέχουν μόνο αυτοεπιτόπους. Επιπλέον, το πεπτίδιο TgP41 επικαλύπτεται κατά 14 αμινοξέα με την αλληλουχία 2657-2748 της ανθρώπινης Tg, η οποία βρέθηκε ότι αναγνωρίζεται από μερικούς ορούς ασθενών με HT (219).

Η AChE δεν περιορίζεται μόνο στους οφθαλμικούς μύες. Κατά συνέπεια, θα μπορούσαν και οι σκελετικοί μύες να εμπλέκονται σε παθολογικές καταστάσεις λόγω της διασταυρούμενης αντίδρασης μεταξύ Tg και AChE. Ενδέχεται η μορφή της AChE των οφθαλμικών μυών να διαφέρει από τη

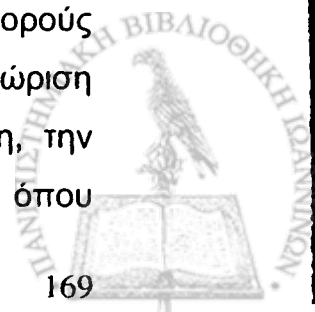


μορφή του ενζύμου που υπάρχει στους σκελετικούς μύες, λόγω της διαφορετικής προέλευσης των δύο ιστών κατά την εμβρυογένεση (269). Στο γεγονός αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί η εμφάνιση βλάβης ειδικά στους οφθαλμικούς μύες στη θυρεοειδική οφθαλμοπάθεια. Υπάρχουν στοιχεία για την εμφάνιση γενικευμένης μυοπάθειας στη θυρεοειδική οφθαλμοπάθεια, αυτή όμως αποδίδεται συνήθως στον υπερθυρεοειδισμό (270). Στη διασταυρούμενη αντίδραση μεταξύ Tg και AChE πιθανόν να οφείλεται και η συνύπαρξη GD και βαριάς μυασθένειας σε κάποιους ασθενείς (271,177).

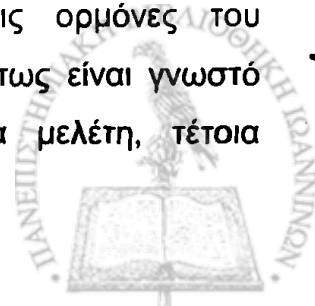
Συμπερασματικά, εντοπίστηκαν τρεις γραμμικοί αυτοεπίτοποι στην καρβοξυ-τελική περιοχή της Tg, οι οποίοι διαφοροποιούν ορολογικά την GD από την HT. Ένας από αυτούς βρέθηκε ότι σχετίζεται με τη θυρεοειδική οφθαλμοπάθεια. Επίτοποι ειδικοί για τη θυρεοειδική οφθαλμοπάθεια θα ήταν ιδιαίτερα χρήσιμοι στην κατανόηση της παθογένειας και εξέλιξης της νόσου, ενώ θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν και ως προγνωστικοί/διαγνωστικοί δείκτες.

5.2 Διερεύνηση ανοσογονικότητας και παθογονικότητας των νέων πεπτιδίων που φέρουν B-επίτοπους

Στη συνέχεια διερευνήθηκε η ανοσογονικότητα και παθογονικότητα των πεπτιδίων που αναγνωρίστηκαν ως επίτοποι των "παθολογικών" αυτοαντισωμάτων. Αρχικά, εξετάσαμε κατά πόσον τα τρία πεπτίδια, εκτός από επιτόπους αυτοαντισωμάτων, περιλαμβάνουν και επιτόπους αντισωμάτων, τα οποία επάγονται σε πειραματόζωα κατά την πειραματική ανοσοποίηση με Tg (επαγόμενα αντισώματα). Βρέθηκε ότι μόνο το ένα από τα τρία πεπτίδια, το TgP41, περιλαμβάνει επίτοπο επαγόμενων αντισωμάτων. Το γεγονός αυτό, πιθανόν να οφείλεται σε διαφορετικούς μηχανισμούς έκθεσης του αντιγόνου στο ανοσοποιητικό σύστημα ανάμεσα στην πειραματική ανοσοποίηση και τις αυτοάνοσες διεργασίες. Το αποτέλεσμα μας συμφωνεί με τα αποτελέσματα άλλων ερευνητών, οι οποίοι διαπίστωσαν ότι κάποιοι ετεροεπίτοποι της Tg δεν αναγνωρίζονται από αυτοάνοσους ορούς (213). Οι ερευνητές αυτοί όμως διατύπωσαν την άποψη ότι η αναγνώριση από τα αυτοαντισώματα πιθανόν να εξαρτάται από τη διαμόρφωση, την ιωδίωση ή την γλυκοζυλίωση της Tg. Ωστόσο, υπάρχουν περιπτώσεις όπου

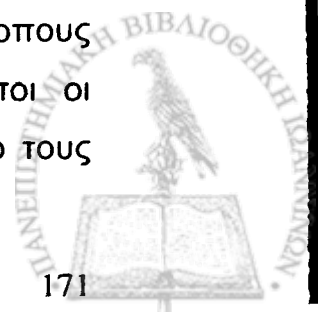


οι αυτοεπίτοποι συμπίπτουν με τους επίτοπους των επαγόμενων αντι-Tg αντισωμάτων (215). Το TgP41 αποτελεί το μικρότερο πεπτίδιο που αναφέρεται στη βιβλιογραφία ότι περιλαμβάνει ετεροεπίτοπο της Tg. Ο αμέσως μεγαλύτερος ετεροεπίτοπος που είναι γνωστός βιβλιογραφικά περιλαμβάνεται σε πεπτίδιο μήκους 22 αμινοξέων στο καρβοξυ-τελικό άκρο του μορίου (αλληλουχία 2727-2748) (213). Στις περισσότερες περιπτώσεις, τα πεπτίδια που ταυτοποιούνται ως στόχοι αντισωμάτων στην Tg έχουν μήκος αρκετές δεκάδες ή και εκατοντάδες αμινοξέων (Σχήμα 22) και αυτό, όπως αναφέρθηκε, οφείλεται στις διαφορετικές μεθοδολογίες που ακολουθούνται. Στο τελικό στάδιο της ανοσοποίησης με Tg, η ποσότητα των αντισωμάτων έναντι του πεπτιδίου TgP41 είναι περίπου το 0.5% των αντισωμάτων έναντι Tg. Είναι γνωστό ότι ο αριθμός των επιτόπων που αναγνωρίζονται κατά την πειραματική ανοσοποίηση με Tg είναι πολύ μεγάλος (205). Κατά συνέπεια, τα αντισώματα που κατευθύνονται έναντι ενός επιτόπου είναι αναμενόμενο να αποτελούν ένα πολύ μικρό ποσοστό των αντισωμάτων έναντι ολόκληρης της πρωτεΐνης. Ο επίτοπος που ορίζεται από το πεπτίδιο TgP41 δεν αναγνωρίζεται μόνο πάνω στην αλληλουχία της ανθρώπινης Tg. Αναγνωρίζεται, ασθενέστερα όμως, στην αλληλουχία της Tg του κουνελιού, καθώς και στις αλληλουχίες της Tg από άλλα είδη θηλαστικών. Η ομολογία της συγκεκριμένης αλληλουχίας ανάμεσα σε διαφορετικά είδη είναι 75%, λαμβάνοντας υπόψη μόνο τα ταυτόσημα αμινοξέα (Πίνακας ΙΧ, σελ. 127). Όπως διαπιστώθηκε στη μελέτη μας, τα αντι-Tg αντισώματα που παράγονται κατά την πειραματική ανοσοποίηση με ανθρώπινη Tg αναγνωρίζουν την ανθρώπινη Tg, αλλά σε μικρότερο βαθμό και την Tg του κουνελιού και άλλων ζωικών ειδών. Μπορούμε λοιπόν να υποθέσουμε ότι η διασταυρούμενη αντίδραση των αντισωμάτων έναντι ανθρώπινης Tg με Tg από άλλα είδη, οφείλεται, εν μέρει τουλάχιστον, σε αναγνώριση ομόλογων αλληλουχιών, όπως αυτή του πεπτιδίου TgP41. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης μας, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι σημαντικό μέρος της διασταυρούμενης αντίδρασης ανάμεσα σε Tg από διαφορετικά ζωικά είδη οφείλεται σε αντισώματα, τα οποία αναγνωρίζουν τις ορμόνες του θυρεοειδούς που βρίσκονται πάνω στο μόριο της Tg. Όπως είναι γνωστό (202,198) και όπως διαπιστώθηκε και στην παρούσα μελέτη, τέτοια



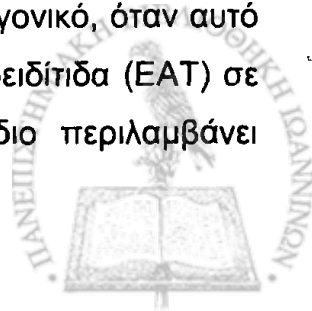
αντισώματα παράγονται κατά την πειραματική ανοσοποίηση με Tg. Τα κυκλοφορούντα αντισώματα έναντι των θυρεοειδικών ορμονών, όπως βρέθηκε στην παρούσα μελέτη, είναι ικανά να αναγνωρίσουν τις ορμόνες T₃ και T₄ πάνω στο μόριο της Tg και ανήκουν στα χαμηλής συγγένειας αντι-Tg αντισώματα.

Το πεπτίδιο TgP41 δεν περιλαμβάνει απλώς έναν από τους επίτοπους των αντι-Tg αντισωμάτων που επάγονται κατά την πειραματική ανοσοποίηση με Tg, αλλά αποτελεί μία ισχυρά ανοσογονική περιοχή της Tg. Με άλλα λόγια, το πεπτίδιο αυτό, όταν χορηγηθεί σε πειραματόζωα (κουνέλια), είναι ικανό να επάγει την παραγωγή αντισωμάτων, που αναγνωρίζουν όχι μόνο το ίδιο το πεπτίδιο αλλά και ολόκληρη την Tg. Για να συμβαίνει αυτό θα πρέπει το συγκεκριμένο πεπτίδιο, ή κάποια περιοχή του πεπτιδίου, να βρίσκεται εκτεθειμένη στη φυσική Tg. Από τη μελέτη πρόβλεψης της δομής της Tg (§4.1.7), διαπιστώθηκε ότι το πεπτίδιο TgP41 είναι γενικά υδρόφιλο, ιδιαίτερα προς το καρβοξυ-τελικό άκρο του, και συνεπώς έχει μεγάλη πιθανότητα να βρίσκεται εκτεθειμένο στην επιφάνεια της Tg. Με τη χορήγηση του TgP41, δεν παράγονται μόνο αντισώματα που αναγνωρίζουν την Tg. Ένα μέρος των αντισωμάτων που αναγνωρίζουν το πεπτίδιο δεν προσδένονται στην Tg. Σύμφωνα με την επικρατέστερη άποψη, ένας γραμμικός επίτοπος αντισωμάτων αποτελείται από 6 αμινοξέα (272). Συνεπώς, είναι πιθανό να παράγονται αντισώματα που κατευθύνονται έναντι διαφορετικών περιοχών πάνω στο 20-μερές πεπτίδιο. Κάποιοι από αυτούς τους επίτοπους είναι πιθανό να μη μπορούν να αναγνωριστούν πάνω στη φυσική Tg, ενδεχομένως λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι ένα μικρό πεπτίδιο, όπως το TgP41, ήταν ικανό να προκαλέσει την παραγωγή αντισωμάτων από μόνο του, χωρίς να χρειαστεί - όπως γίνεται συνήθως - να συζευχθεί σε κάποιο πρωτεϊνικό ή άλλου τύπου φορέα. Για να διεγερθούν τα Β-λέμφοκύτταρα ώστε να παραχθούν αντισώματα έναντι ενός αντιγόνου χρειάζεται η συμβολή των βοηθητικών Τ-λεμφοκυττάρων (273). Όταν προκαλείται ανοσοποίηση από κάποιο μεγάλο αντιγόνο, όπως μια πρωτεΐνη, πάνω στο μόριο του αντιγόνου περιλαμβάνονται εκτός από τους επίτοπους των Β-λεμφοκυττάρων (ορολογικοί επίτοποι) και κυτταρικοί επίτοποι οι οποίοι, συνδεδεμένοι σε μόρια MHC τάξης II, θα αναγνωριστούν από τους



υποδοχείς κάποιων βοηθητικών T-λεμφοκυττάρων ώστε αυτά να ενεργοποιηθούν και να παρέχουν την απαιτούμενη βοήθεια στα B-κύτταρα (273). Αντίθετα, όταν γίνεται ανοσοποίηση με κάποιο μικρό μόριο, όπως ένα μικρό πεπτίδιο, συνήθως αυτό χορηγείται συζευγμένο με κάποιο πρωτεϊνικό ή άλλου τύπου φορέα όπως π.χ. δέντρο λυσίνης (274) ή γραμμικό ολιγοπεπτιδικό φορέα (sequential oligopeptide carrier, SOC) (275). Με τον τρόπο αυτό δημιουργούνται πρόσθετοι επίτοποι που είναι δυνατόν να αναγνωριστούν από βοηθητικά T-λεμφοκύτταρα. Επιπλέον, η σύζευξη ενός πεπτιδίου σε κάποιο φορέα εμποδίζει τη γρήγορη αποικοδόμησή του μέσα στον οργανισμό του δέκτη (272). Στην περίπτωση ανοσοποίησης με το πεπτίδιο TgP41, παράχθηκαν αντισώματα χωρίς σύζευξη του πεπτιδίου σε φορέα. Θα πρέπει συνεπώς να υποθέσουμε είτε α) ότι το πεπτίδιο αυτό, εκτός από επίτοπο αντισωμάτων (B-επίτοπο), περιλαμβάνει και T-επίτοπο, ή β) ότι η χορήγηση ανοσοενισχυτικού CFA μαζί με το πεπτίδιο ήταν επαρκής για την απαιτούμενη ενεργοποίηση των βοηθητικών T-λεμφοκυττάρων (272). Πάντως, σε κάθε περίπτωση, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι το πεπτίδιο TgP41 είναι ισχυρά ανοσογονικό. Μέχρι σήμερα δεν είχαν γίνει μελέτες χορήγησης πεπτιδίων της Tg σε κουνέλια. Τέτοιες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί μόνο σε στελέχη ποντικών ή αρουραίων, κυρίως με σκοπό τον εντοπισμό παθογονικών πεπτιδίων της Tg. Από τις μελέτες αυτές, τα μόνα πεπτίδια της Tg που βρέθηκε να προκαλούν την παραγωγή αντισωμάτων που αναγνωρίζουν και ολόκληρη την πρωτεΐνη, ήταν το πεπτίδιο που αντιστοιχεί στην αλληλουχία 2549-2560 της ανθρώπινης Tg (121) και το πεπτίδιο που αντιστοιχεί στην αλληλουχία 2495-2511 της Tg του αρουραίου (αρίθμηση ως προς ανθρώπινη Tg) (223). Κάποια πεπτίδια μπορεί να είναι ικανά να προκαλέσουν την παραγωγή αντισωμάτων έναντι Tg, χωρίς όμως να περιέχουν επιτόπους αντι-Tg αντισωμάτων που επάγονται κατά την ανοσοποίηση με Tg. Στην περίπτωση αυτή οι B-επίτοποι που περιλαμβάνονται σε αυτά τα πεπτίδια χαρακτηρίζονται ως μη κυρίαρχοι (223).

Ένα πεπτίδιο της Tg μπορεί να χαρακτηριστεί ως παθογονικό, όταν αυτό έχει την ικανότητα να επάγει πειραματική αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα (EAT) σε πειραματόζωα. Το γεγονός αυτό σημαίνει ότι το πεπτίδιο περιλαμβάνει

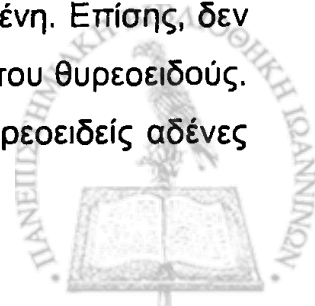


κάποιο (ή κάποιους) T-επίτοπο(ους) ικανό(ους) να διεγείρει(ουν) τις αυτοάνοσες διεργασίες που οδηγούν στη θυρεοειδίτιδα. Στις μέχρι σήμερα μελέτες, η παθογονικότητα ενός πεπτιδίου της Tg ελέγχεται με τη χορήγησή του σε στελέχη ποντικών ή αρουραίων, που είναι ευαίσθητα στην ανάπτυξη EAT (112). Στην παρούσα μελέτη, η χορήγηση του πεπτιδίου TgP41 σε κουνέλια δεν οδήγησε στην ανάπτυξη EAT. Όμως, η EAT δεν αναπτύσσεται πάντα στα κουνέλια· ακόμη και όταν χορηγείται ολόκληρη η Tg (108,118). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι δεν υπάρχουν ειδικά στελέχη κουνελιών, τα οποία να ανταποκρίνονται με σταθερό τρόπο σε συγκεκριμένα ανοσολογικά ερεθίσματα. Σε κάποια μελέτη, ακόμα και η χορήγηση Tg σε ποντίκια στελέχους CBA/J δεν οδήγησε στην εμφάνιση ιστολογικών ενδείξεων θυρεοειδίτιδας, παρόλο που υπήρξε ανοσοαπόκριση έναντι της Tg του είδους (165). Για να αποφανθούμε με βεβαιότητα αν το TgP41 περιλαμβάνει κάποιο παθογονικό επίτοπο θα πρέπει το πεπτίδιο να χορηγηθεί σε ειδικά στελέχη ποντικών. Αυτά τα πειράματα αποτελούν αντικείμενο ξεχωριστής μελέτης. Παρόλο που δεν παρατηρήθηκαν εμφανείς κακώσεις στο θυρεοειδή αδένα των κουνελιών της μελέτης, είναι πιθανόν να προκλήθηκαν παροδικές κακώσεις οι οποίες θα είχαν ως αποτέλεσμα τη μεγαλύτερη έκθεση της θυρεοσφαιρίνης στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Το γεγονός αυτό θα δικαιολογούσε την ενδομοριακή επέκταση επιτόπων που παρατηρήθηκε μετά τη χορήγηση του TgP41, η οποία αναλύεται στη συνέχεια. Η περαιτέρω διερεύνηση της παθολογίας του θυρεοειδούς αδένα στα ανοσοποιημένα ζώα, συνάντησε μεθοδολογικά προβλήματα που ήταν δύσκολο να ξεπεραστούν.

5.3 Ενδομοριακή και διαμοριακή επέκταση δραστηριότητας μετά τη χορήγηση του πεπτιδίου TgP41

Τα τελευταία χρόνια, διάφοροι ερευνητές έχουν αναφερθεί στο φαινόμενο της ενδομοριακής επέκτασης επιτόπων (intramolecular epitope spreading) στην περίπτωση αυτοαντιγόνων που σχετίζονται με συστηματικά αυτοάνοσα νοσήματα, όπως είναι το Ro60 (276), το Sm B/B' (277) και το La (SSB) (278). Κατά την ενδομοριακή επέκταση επιτόπων, η χορήγηση σε πειραματόζωα ενός πεπτιδίου που αποτελεί τμήμα ενός πρωτεϊνικού αυτοαντιγόνου, εκτός

από την παραγωγή αντισωμάτων έναντι του πεπτιδίου, παράγονται αντισώματα και έναντι άλλων περιοχών της πρωτεΐνης. Στην περίπτωση της πειραματικής ανοσοποίησης με το πεπτίδιο TgP41 της Tg, διερευνήσαμε αν συμβαίνει κάτι παρόμοιο. Βρέθηκε πράγματι ότι, κατά τη χορήγηση του πεπτιδίου TgP41 δεν παράγονται μόνο αντισώματα που αναγνωρίζουν την αλληλουχία του πεπτιδίου πάνω στην Tg, αλλά και αντισώματα που αναγνωρίζουν θέσεις πάνω στην Tg εκτός της αλληλουχίας του TgP41. Η αναγνώριση αυτών των περιοχών δεν οφείλεται σε διασταυρούμενη αντίδραση με το πεπτίδιο TgP41. Η ενδομοριακή επέκταση επιτόπων αποτελεί ένα μηχανισμό επέκτασης της αυτοάνοσης απόκρισης έναντι πολλών περιοχών ενός πρωτεϊνικού αυτοαντιγόνου: η αρχική απόκριση έναντι ορισμένων κυρίαρχων (dominant) επιτόπων του αντιγόνου συνοδεύεται από παραγωγή αντισωμάτων έναντι μιας πληθώρας δευτερευόντων ή κρυπτικών (secondary, cryptic) επιτόπων μέσω του μηχανισμού ενδομοριακής επέκτασης (279,280). Η ενδομοριακή επέκταση της δραστηριότητας πιστεύεται ότι προέρχεται από ενεργοποίηση ειδικών για το αντιγόνο κλώνων βοηθητικών T-κυττάρων ικανών να διεγείρουν μια σειρά B-κυττάρων που είναι ειδικά για διαφορετικούς επίτοπους της πρωτεΐνης (281). Η ικανότητα των B-κυττάρων να προσλαμβάνουν ακόμα και ελάχιστες ποσότητες κυκλοφορούντων αντιγόνων και να παρουσιάζουν τους πρωτεϊνικούς καθοριστές στα ειδικά T-κύτταρα είναι σημαντική για την ενεργοποίηση των B-κυττάρων και την παραγωγή αντισωμάτων (281,282). B-κύτταρα ειδικά για το πεπτίδιο ανοσοποίησης, μπορούν να προσλαμβάνουν το αντιγόνο μέσω επιφανειακών ανοσοσφαιρινών και να παρουσιάζουν νέους καθοριστές στα T-κύτταρα. Έτσι, θα μπορούσαν να ενεργοποιηθούν διάφοροι κλώνοι T-κυττάρων, οι οποίοι με τη σειρά τους παρέχουν βοήθεια σε ποικίλους κλώνους B-κυττάρων που είναι ειδικοί για άλλους επίτοπους του αντιγόνου. Πάντως, η ενδομοριακή επέκταση επιτόπων, στην περίπτωση ανοσοποίησης με το πεπτίδιο TgP41, κατευθύνεται κυρίως έναντι μη συντηρητικών περιοχών της Tg, αφού η δραστηριότητα έναντι Tg από άλλα είδη είναι πολύ περιορισμένη. Επίσης, δεν παράχθηκαν αντισώματα που να αναγνωρίζουν τις ορμόνες του θυρεοειδούς. Οι ιστολογικές μελέτες δεν έδειξαν εμφανή βλάβη στους θυρεοειδείς αδένες



των κουνελιών στα οποία χορηγήθηκε το πεπτίδιο TgP41. Είναι πιθανόν τα αντισώματα έναντι Tg, τα οποία παράγονται κατά τη χορήγηση του TgP41, να προκαλούν μικρές βλάβες του αδένα, οι οποίες όμως αποκαθίστανται αμέσως χωρίς να αφήνουν ορατά σημάδια. Η απελευθέρωση κάποιας ποσότητας Tg στην κυκλοφορία από τέτοιες μικρές βλάβες του αδένα ενδέχεται να συνεισφέρει στην έκθεση της Tg στο ανοσοποιητικό σύστημα και κατ' επέκταση στην παραγωγή αντισωμάτων έναντι περιοχών της Tg εκτός της αλληλουχίας του πεπτιδίου ανοσοποίησης, (ενδομοριακή επέκταση επιτόπων).

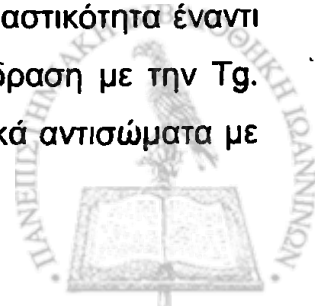
Κατά την ανοσοποίηση με κάποιο αντιγόνο, εκτός από την ενδομοριακή επέκταση της δραστηριότητας των αντισωμάτων είναι δυνατόν να παρατηρηθεί και διαμοριακή επέκταση της δραστηριότητας. Στην περίπτωση αυτή, η δραστηριότητα επεκτείνεται και σε άλλα αντιγόνα, εκτός του αντιγόνου που προκαλεί την ανοσοποίηση (276,277). Για να διαπιστωθεί αν υπάρχει διαμοριακή επέκταση δραστηριότητας κατά την πειραματική ανοσοποίηση κουνελιών με Tg, ελέγχθηκε η δραστηριότητα έναντι του θυρεοειδικού αντιγόνου TPO, καθώς και έναντι άλλων μη θυρεοειδικών αντιγόνων. Τα μη θυρεοειδικά αντιγόνα που χρησιμοποιήθηκαν επιλέχθηκαν επειδή είναι γνωστό ότι αποτελούν στόχους των πολυειδικών φυσικών αυτοαντισωμάτων (264,259,283). Η σημασία της επιλογής αυτής θα γίνει κατανοητή στη συνέχεια. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται η ύπαρξη αντι-Tg αντισωμάτων με διασταυρούμενη αντίδραση για την TPO. Τα αντισώματα αυτά (TGPO αντισώματα) βρέθηκαν τόσο σε ασθενείς με αυτοάνοσες ασθένειες του θυρεοειδούς (164,166) όσο και σε ποντίκια που ανοσοποιήθηκαν με ανθρώπινη Tg (165) ή με TPO (168). Στη μελέτη μας διαπιστώσαμε για πρώτη φορά την ύπαρξη τέτοιων αντισωμάτων σε κουνέλια που ανοσοποιήθηκαν με Tg. Άρα, η δραστηριότητα έναντι TPO ουσιαστικά αποτελεί ένα μέρος της ενδομοριακής επέκτασης επιτόπων, η οποία περιλαμβάνει μια περιοχή της Tg που περιέχει κοινό επίτοπο με την TPO.

Η ανοσοποίηση των κουνελιών με Tg οδήγησε επίσης σε επέκταση της δραστηριότητας έναντι μη θυρεοειδικών αντιγόνων, όπως F-ακτίνη, BSA και μυοσίνη. Τα αντισώματα αυτά μπορεί να εμφανίζουν διασταυρούμενη αντίδραση με την Tg, όπως στην περίπτωση της μυοσίνης και της BSA, ή να



μην εμφανίζουν διασταυρούμενη αντίδραση, όπως στην περίπτωση της F-ακτίνης. Κατά τα πρώτα στάδια της ανοσοποίησης με Tg, τα αντι-Tg αντισώματα εμφανίζουν διασταυρούμενη αντίδραση με άλλα αντιγόνα (πολυειδικά αντισώματα), ενώ κατά τα τελικά στάδια, τα αντισώματα γίνονται μονοειδικά. Η πολυειδικότητα είναι χαρακτηριστικό των φυσικών αυτοαντισωμάτων, τα οποία βρίσκονται σε μικρές ποσότητες στον ορό των υγιών θηλαστικών (258,284). Κατά συνέπεια, η παραγωγή αντισωμάτων έναντι Tg, πιθανόν να οφείλεται σε διέγερση κλώνων B-κυττάρων που παράγουν πολυειδικά φυσικά αυτοαντισώματα. Οι Payelle-Brogard και συν. (285), μελετώντας την ανοσοποίηση κουνελιών με τουμπουλίνη διαπίστωσαν ότι στο αρχικό στάδιο ανοσοποίησης, τα αντισώματα έναντι τουμπουλίνης έχουν διασταυρούμενη αντίδραση με ακτίνη, ενώ καθώς συνεχίζεται η ανοσοποίηση, παράγονται αντισώματα που είναι ειδικά μόνο για το αντιγόνο ανοσοποίησης.

Καταλήξαμε λοιπόν στο συμπέρασμα ότι κατά την πειραματική ανοσοποίηση κουνελιών με Tg, παρατηρείται διαμοριακή επέκταση της δραστηριότητας σε άλλα αντιγόνα του θυρεοειδούς αδένος (TPO) ή σε μη θυρεοειδικά αντιγόνα. Η διαμοριακή επέκταση της δραστηριότητας άλλοτε οφείλεται σε διασταυρούμενη αντίδραση με το αντιγόνο ανοσοποίησης (Tg), όπως στην περίπτωση της TPO, της μυοσίνης και της BSA και άλλοτε δεν οφείλεται σε διασταυρούμενη αντίδραση, όπως στην περίπτωση της F-ακτίνης. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η δραστηριότητα έναντι μυοσίνης. Κατά τα πρώτα στάδια της ανοσοποίησης η δραστηριότητα έναντι μυοσίνης οφείλεται σε διασταυρούμενη αντίδραση των αντι-Tg αντισωμάτων, ενώ κατά τα τελικά στάδια αναπτύσσονται αντισώματα ειδικά μόνο για τη μυοσίνη. Το φαινόμενο αυτό πιθανόν να οφείλεται σε ενδεχόμενη βλάβη που προκαλείται σε κάποιο ιστό από τα αντισώματα με διασταυρούμενη αντίδραση έναντι Tg και μυοσίνης, τα οποία παράγονται στα αρχικά στάδια της ανοσοποίησης. Στη συνέχεια, η απελευθέρωση μυοσίνης στην κυκλοφορία από τον ιστό αυτό ίσως προκαλεί την παραγωγή αντισωμάτων ειδικών για τη μυοσίνη. Μέσω αυτού του μηχανισμού, ενδεχομένως να παράγεται και η δραστηριότητα έναντι F-ακτίνης, η οποία δεν οφείλεται σε διασταυρούμενη αντίδραση με την Tg. Παράλληλα, τα B-κύτταρα που αρχικά παρήγαγαν πολυειδικά αντισώματα με



διασταυρούμενη αντίδραση για την Tg και τη μυοσίνη, μέσω της διαδικασίας ωρίμανσης, παράγουν μονοειδικά αντισώματα που αναγνωρίζουν μόνο την Tg. Η διασταυρούμενη αντίδραση ανάμεσα σε Tg και άλλα αντιγόνα, όπως η BSA και η μυοσίνη, λόγω απουσίας ομολογίας στην αλληλουχία των πρωτεϊνών αυτών, θα πρέπει να αποδοθεί στην αναγνώριση όμοιων διαμορφωτικών δομών ανάμεσα στις διαφορετικές πρωτεΐνες. Η υπόθεση αυτή έχει διατυπωθεί για την ερμηνεία της αναγνώρισης πολλών διαφορετικών αντιγόνων από τα πολυειδικά φυσικά αυτοαντισώματα (259).

Κατά την ανοσοποίηση με το πεπτίδιο TgP41 της Tg παρατηρείται, όπως και στην ανοσοποίηση με Tg, δραστηριότητα έναντι TPO. Η διαμοριακή αυτή επέκταση της δραστηριότητας έχει άμεση σχέση με την ενδομοριακή επέκταση επιτόπων αφού, όπως διαπιστώθηκε, τα αντισώματα που αναγνωρίζουν την TPO εμφανίζουν διασταυρούμενη αντίδραση με την Tg. Δηλαδή η ενδομοριακή επέκταση επιτόπων κατά την ανοσοποίηση με το TgP41 είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή και TGPO αντισωμάτων. Αντίθετα η ενδομοριακή επέκταση επιτόπων δεν οδήγησε στη παραγωγή αντισωμάτων έναντι Tg με διασταυρούμενη αντίδραση για BSA ή μυοσίνη.

Συνοψίζοντας, μπορούμε να πούμε ότι η μελέτη αυτή οδήγησε στον εντοπισμό τριών μικρού μεγέθους πεπτιδίων, τα οποία αποτελούν στόχους αυτοαντισωμάτων στην GD. Ειδικότερα, η αναγνώριση ενός από αυτά συσχετίστηκε με μια υποομάδα των ασθενών με GD οι οποίοι εμφανίζουν οφθαλμοπάθεια. Πεπτίδια τα οποία διαχωρίζουν ομάδες ή υποομάδες ασθενών θα μπορούσαν να αποτελέσουν χρήσιμα διαγνωστικά και/ή προγνωστικά εργαλεία. Επίσης, κάποιο από αυτά τα πεπτίδια βρέθηκε ότι περιλαμβάνει επίτοπο αντισωμάτων που παράγονται κατά την πειραματική ανοσοποίηση με Tg, ενώ το ίδιο είναι ισχυρά ανοσογονικό και ικανό να επάγει ενδομοριακή επέκταση επιτόπων στη θυρεοσφαιρίνη. Κατά την ανοσοποίηση με Tg, η δραστηριότητα επεκτείνεται προς άλλα αντιγόνα (διαμοριακή επέκταση), τόσο εντός του θυρεοειδούς αδένος (TPO), όσο και εκτός του αδένος, παρέχοντας έτσι στοιχεία για την προέλευση των ειδικών επαγόμενων αντισωμάτων από διέγερση Β-κυττάρων που παράγουν πολυειδικά φυσικά αυτοαντισώματα. Περαιτέρω μελέτες σε στελέχη ποντικών που είναι



ευαίσθητα στην ανάπτυξη πειραματικής αυτοάνοσης θυρεοειδίτιδας θα διαλευκάνουν την ενδεχόμενη παθογονική φύση των πεπτιδίων τα οποία αποτελούν στόχους αυτοαντισωμάτων. Με τη χρήση της μεθόδου χαρτογράφησης επιτόπων σε ομοιοπολικά προσδεδεμένα πεπτίδια, επιλέχθηκαν για περαιτέρω μελέτη τα τρία που αποτελούσαν τους πιθανότερους στόχους αυτοαντισωμάτων. Με έλεγχο της δραστικότητας μεγάλου αριθμού ορών, επαληθεύτηκε ότι πράγματι τα πεπτίδια αυτά περιέχουν επίτοπους αυτοαντισωμάτων, ένα δε από αυτά διαπιστώθηκε ότι περιλαμβάνει επίτοπο επαγόμενων αντισωμάτων. Όμως, σημαντική δραστικότητα παρατηρήθηκε και για άλλα πεπτίδια της Tg. Συνεπώς, δεν αποκλείεται, με την ίδια μεθοδολογία, να μπορούν να εντοπιστούν περισσότεροι αυτοεπίτοποι και ετεροεπίτοποι στην καρβοξυ-τελική περιοχή της Tg, η οποία φαίνεται να παρουσιάζει ιδιαίτερο ανοσολογικό ενδιαφέρον.



6. Περίληψη

Η θυρεοσφαιρίνη (Tg) είναι ένα μεγάλο και άφθονο αυτοαντιγόνο του θυρεοειδούς αδένος, το οποίο εμπλέκεται στις αυτοάνοσες ασθένειες του θυρεοειδούς, οι κυριότερες από τις οποίες είναι η νόσος Graves (GD) και η θυρεοειδίτιδα Hashimoto (HT). Η καρβοξυ-τελική περιοχή της Tg παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για δύο λόγους: α) Είναι ιδιαίτερα ανοσογονική, αφού περιλαμβάνει τέσσερις από τους πέντε παθογονικούς T-επίτοπους οι οποίοι είναι γνωστοί από ζωικά μοντέλα. β) Η περιοχή αυτή της Tg (αλληλουχία 2171-2748 της ανθρώπινης Tg) είναι ομόλογη με το ένζυμο ακετυλοχολινεστεράση (AChE), γεγονός που οδήγησε στην υπόθεση ότι αντισώματα με διασταυρούμενη αντίδραση έναντι της Tg και της AChE των οφθαλμικών μυών εμπλέκονται στην παθογένεια της θυρεοειδικής οφθαλμοπάθειας (TED). Οι B-επίτοποι που έχουν προσδιοριστεί μέχρι σήμερα στην Tg, λόγω της μεθοδολογίας που έχει χρησιμοποιηθεί, περιλαμβάνονται σε μεγάλα πεπτίδια.

Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν:

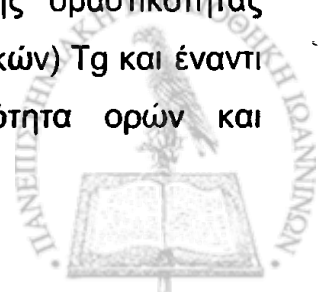
- 1) η χαρτογράφηση γραμμικών ορολογικών αυτοεπιτόπων (B-επιτόπων) στην καρβοξυ-τελική περιοχή της ανθρώπινης Tg, στις αυτοάνοσες ασθένειες του θυρεοειδούς, με τη χρήση μικρών συνθετικών πεπτιδίων,
- 2) να διερευνηθεί κατά πόσον τα πεπτίδια που περιλαμβάνουν αυτοεπίτοπους περιέχουν επίσης επίτοπους (ετεροεπίτοπους) αντισωμάτων που παράγονται πειραματικά με χορήγηση Tg και να μελετηθεί περαιτέρω η ανοσογονικότητα και η παθογονικότητα των πεπτιδίων που φέρουν ετεροεπίτοπους.
- 3) να διερευνηθεί η δυνατότητα επαγωγής ενδομοριακής επέκτασης της δραστηριότητας μετά από χορήγηση ανοσογονικού(ών) πεπτιδίου(ων), αλλά και διαμοριακής επέκτασης της δραστηριότητας μετά από χορήγηση Tg.

Σαράντα οκτώ 20-μερή πεπτίδια, επικαλυπτόμενα κατά οκτώ αμινοξέα, τα οποία κάλυπταν την καρβοξυ-τελική περιοχή της ανθρώπινης Tg, συντέθηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο πολλαπλής σύνθεσης πεπτιδίων σε πολυαιθυλενικά ραβδία. Η δραστηριότητα των ολικών IgG, που απομονώθηκαν από τέσσερις



Tg/ACHΕ δι-δραστικούς ορούς ασθενών με GD και από τρεις υγιείς μάρτυρες, ελέγχθηκε έναντι των συνθετικών πεπτιδίων με ανοσοενζυμική δοκιμασία (ELISA). Βρέθηκε ότι 17 από τα 48 πεπτίδια, κατανεμημένα σε όλη την έκταση της υπό εξέταση περιοχής της Tg, αναγνωρίζονταν από τις IgG όλων των ασθενών GD που εξετάστηκαν, σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες. Η απομάκρυνση των ειδικών αντι-Tg αντισωμάτων από το κλάσμα των ολικών IgG του ορού με ανοσοπροσρόφηση, έδειξε ότι τα πεπτίδια TgP15, TgP26 και TgP41 (2339-2358, 2471-2490 και 2651-2670 της ανθρώπινης Tg, αντίστοιχα) αναγνωρίζονται πάνω στη φυσική Tg. Στη συνέχεια, τα πεπτίδια αυτά συντέθηκαν με τη μέθοδο της στερεάς φάσης και ελέγχθηκε με ELISA η έναντι αυτών δραστηριότητα μεγάλου αριθμού ορών: 99 GD, 32 HT και 45 υγιείς μάρτυρες. Τα τρία πεπτίδια αναγνωρίστηκαν από στατιστικά σημαντικό ποσοστό ορών από ασθενείς με GD (22.2%, 35.4% και 30.3%, αντίστοιχα), συγκριτικά με τους ασθενείς με HT (0%, 15.6% και 6.3%, αντίστοιχα) και τους υγιείς μάρτυρες (0%, 4.4% και 4.4%, αντίστοιχα). Οι οροί από ασθενείς με GD, στην πλειοψηφία τους (56.6%), ήταν θετικοί για τουλάχιστον ένα από τα τρία πεπτίδια. Στη GD, η δραστηριότητα έναντι του TgP26 συσχετίστηκε με την TED (48.6% θετικοί με TED έναντι 25.5% χωρίς TED, $p < 0.05$).

Στη συνέχεια, μελετήθηκε κατά πόσον τα τρία πεπτίδια που αναγνωρίστηκαν ως στόχοι αυτοαντισωμάτων στις αυτοάνοσες ασθένειες του θυρεοειδούς (TgP15, TgP26 και TgP41) περιλαμβάνουν επίσης επίτοπους αντισωμάτων που επάγονται σε πειραματόζωα μετά από πειραματική ανοσοποίηση με Tg και επιπλέον, διερευνήθηκε η ανοσογονικότητα και η παθογονικότητα των πεπτιδίων που αποτελούν στόχους των επαγόμενων αντισωμάτων. Για το σκοπό αυτό, σε δύο ενήλικα λευκά κουνέλια Νέας Ζηλανδίας ενέθηκαν υποδορίως 2.5 mg ανθρώπινης Tg, σε αιώρημα πλήρους ανοσοενισχυτικού εκδόχου του Freund (CFA) ανά τρεις εβδομάδες, συνολικά έξι φορές (στάδια 1-6). Αιμοληψία έγινε πριν την ανοσοποίηση (στάδιο 0) και 8-10 ημέρες μετά από κάθε ανοσοποίηση. Δύο ζώα ενέθηκαν μόνο με CFA, ως αρνητικοί μάρτυρες. Η ανοσοαπόκριση των ανοσοποιημένων κουνελιών αξιολογήθηκε με έλεγχο της δραστηριότητας έναντι ανθρώπινης και ετερόλογων (από άλλα είδη θηλαστικών) Tg και έναντι ορμονών του θυρεοειδούς (T_3 και T_4). Η δραστηριότητα ορών και



απομονωμένων αντι-Tg αντισωμάτων ελέγχθηκε με μη ανταγωνιστική και ανταγωνιστική ELISA. Παρατηρήθηκαν τα ακόλουθα: α) Υψηλή δραστικότητα έναντι της ανθρώπινης Tg και χαμηλότερη έναντι ετερόλογων Tg. β) Παραγωγή αντισωμάτων έναντι των θυρεοειδικών ορμονών. γ) Ισχυρή δραστικότητα των αντιορών έναντι του πεπτιδίου TgP41 της ανθρώπινης Tg. Συνεπώς το πεπτίδιο αυτό περιλαμβάνει επίτοπο των αντισωμάτων που επάγονται πειραματικά από τη χορήγηση Tg.

*Για να διερευνηθεί η ανοσογονικότητα και η παθογονικότητα του TgP41, το πεπτίδιο αυτό χορηγήθηκε σε κουνέλια [σε δύο ενήλικα λευκά κουνέλια Νέας Ζηλανδίας ενέθηκαν υποδορίως 100 μg TgP41, σε CFA ανά δύο εβδομάδες, συνολικά έξι φορές (στάδια 1-6)]. Αιμοληψία έγινε πριν την άνοσοποίηση (στάδιο 0) και 8-10 ημέρες μετά από κάθε άνοσοποίηση. Από το στάδιο 2 και μετά αναπτύχθηκε ισχυρή ορολογική απόκριση έναντι του πεπτιδίου TgP41. Επίσης, παράχθηκαν αντισώματα που αναγνωρίζουν την ανθρώπινη Tg, κυρίως από το στάδιο 4 και μετά. Αναπτύσσεται περιορισμένη δραστικότητα έναντι ετερόλογων Tg και δεν αναπτύσσεται δραστικότητα έναντι των ορμονών του θυρεοειδούς. Με το πρωτόκολλο άνοσοποίησης με TgP41 που εφαρμόστηκε, δεν παρατηρήθηκε βλάβη στον θυρεοειδή αδένα, χωρίς όμως να αποκλείεται η πιθανότητα παροδικής βλάβης του αδένα. Αντίθετα με το TgP41, τα πεπτίδια TgP15 και TgP26 περιλαμβάνουν μόνο επίτοπους αυτοαντισωμάτων.

Στη συνέχεια αναζητήθηκε επαγωγή ενδομοριακής επέκτασης επιτόπων μετά την άνοσοποίηση με TgP41, καθώς επίσης διαμοριακής επέκτασης της δραστικότητα μετά από άνοσοποίηση με Tg και με TgP41. Κατά την άνοσοποίηση με το πεπτίδιο TgP41 διαπιστώθηκε ενδομοριακή επέκταση επιτόπων, δηλ. παραγωγή αντισωμάτων έναντι περιοχών της Tg εκτός του TgP41, όπως φάνηκε σε πειράματα απομάκρυνσης των ειδικών αντισωμάτων με άνοσοπροσρόφηση και πειράματα αναστολής της δραστικότητας. Για να διαπιστωθεί αν συμβαίνει διαμοριακή επέκταση της δραστικότητας κατά την άνοσοποίηση με Tg, μελετήθηκε η δραστικότητα των αντιορών έναντι ανθρώπινης θυρεοειδικής υπεροξειδάσης (TPO) και άλλων μη θυρεοειδικών αντιγόνων: ανθρώπινη μυοσίνη, ανθρώπινη ακτίνη, σφαιρική (G) και ινώδης (F), τουμπουλίνη χοίρου, φυσικό DNA (nDNA), καθώς και αλβουμίνη βοείου



ορού (BSA). Στα ζώα που ενέθηκαν με Tg παρατηρήθηκε σημαντική δραστικότητα έναντι TPO. Ως προς τα μη θυρεοειδικά αντιγόνα, παρατηρήθηκε υψηλή δραστικότητα έναντι μυοσίνης, F-ακτίνης και BSA. Από τη μελέτη των απομονωμένων αντι-Tg αντισωμάτων διαπιστώθηκε ότι η διαμοριακή επέκταση της δραστικότητας άλλοτε οφείλεται σε διασταυρούμενη αντίδραση με το αντιγόνο ανοσοποίησης (Tg), όπως στην περίπτωση της TPO, της μυοσίνης και της BSA και άλλοτε δεν οφείλεται σε διασταυρούμενη αντίδραση, όπως στην περίπτωση της F-ακτίνης. Κατά τα πρώτα στάδια της ανοσοποίησης, η δραστικότητα έναντι μυοσίνης οφείλεται σε διασταυρούμενη αντίδραση των αντι-Tg αντισωμάτων, ενώ κατά τα τελικά στάδια αναπτύσσονται αντισώματα ειδικά μόνο για τη μυοσίνη.

Τα αντι-Tg αντισώματα είναι πολυειδικά κατά τα πρώτα στάδια ανοσοποίησης με Tg, ενώ στο τελικό στάδιο γίνονται ειδικά για την Tg. Η παραγωγή των αντι-Tg αντισωμάτων πιθανό να οφείλεται σε διέγερση κλώνων B-κυττάρων που παράγουν πολυειδικά φυσικά αυτοαντισώματα. Η ανοσοποίηση με το πεπτίδιο TgP41 δεν οδήγησε στην ανάπτυξη δραστικότητας έναντι των μη θυρεοειδικών αντιγόνων. Ωστόσο, η ενδομοριακή επέκταση επιτόπων κατά την ανοσοποίηση με το TgP41 είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή αντισωμάτων με, διασταυρούμενη αντίδραση μεταξύ Tg και TPO.

Συμπεραίνουμε ότι:

- 1) Ορισμένοι επίτοποι στην καρβοξυ-τελική περιοχή της Tg σχετίζονται με την GD (TgP15, TgP26, TgP41).
- 2) Μια υποομάδα των αυτοαντισωμάτων που αντιδρούν με την Tg και κατευθύνονται έναντι αυτής της καρβοξυ-τελικής περιοχής της ανθρώπινης Tg σχετίζονται με την TED και πιθανόν να εμπλέκονται στην παθογένεια της νόσου.
- 3) Ένα από τα πεπτίδια που περιλαμβάνουν αυτοεπίτοπους (συγκεκριμένα το TgP41) περιέχει επίσης επίτοπο αντισωμάτων που επάγονται πειραματικά από τη χορήγηση Tg.
- 4) Το πεπτίδιο TgP41 είναι ισχυρά ανοσογονικό, χωρίς ωστόσο να επάγει νόσο στο κουνέλι, πιθανά λόγω υποχώρησης των βλαβών του θυρεοειδούς αδένος.



5) Η χορήγηση του πεπτιδίου TgP41 σε πειραματόζωα επάγει ενδομοριακή επέκταση επιτόπων. Η ενδομοριακή επέκταση επιτόπων θεωρείται ένας μηχανισμός επέκτασης της ανοσοαπόκρισης μετά από την αρχική διέγερση από λίγους κυρίαρχους επίτοπους.

6) Η χορήγηση Tg σε πειραματόζωα επάγει διαμοριακή επέκταση δραστηριότητας σε θυρεοειδικά και μη θυρεοειδικά αντιγόνα.

Μελλοντικές ιστοπαθολογικές μελέτες σε στελέχη ποντικών που είναι ευαίσθητα σε EAT θα διευκρινίσουν τον παθογονικό ρόλο των πεπτιδίων της Tg που βρέθηκε ότι περιλαμβάνουν αυτοεπίτοπους. Επίσης, είναι δυνατόν να διερευνηθεί η ύπαρξη T-επιτόπων στα πεπτίδια της Tg και να προσδιοριστεί το ελάχιστο μήκος των πεπτιδίων στο οποίο διατηρούνται οι ανοσολογικές τους ιδιότητες (αντιγονικότητα, ανοσογονικότητα, παθογονικότητα). Περαιτέρω μελέτη πεπτιδίων που αναδεικνύονται ως πιθανοί στόχοι αυτοαντισωμάτων με τη μέθοδο χαρτογράφησης επιτόπων, θα μπορούσε να οδηγήσει στον εντοπισμό περισσότερων αυτοεπίτοπων και ετεροεπίτοπων στην καρβοξυ-τελική περιοχή της Tg, η οποία φαίνεται ότι παρουσιάζει ιδιαίτερο ανοσολογικό ενδιαφέρον.

Abstract

Thyroglobulin (Tg) is a large and abundant autoantigen of the thyroid gland, involved in autoimmune thyroid diseases, such as Graves' disease (GD) and Hashimoto's thyroiditis (HT). The C-terminal region of Tg is particularly interesting for two reasons: a) It is highly immunogenic encompassing four of the five pathogenic T-cell epitopes known in animal studies. b) This portion of Tg (sequence 2171-2748 of human Tg) is homologous to the enzyme acetylcholinesterase (AChE), which led to the hypothesis that antibodies cross-reacting with Tg and orbital muscle AChE could be involved in the pathogenesis of thyroid eye disease (TED). B-cell epitopes of Tg have been so far identified within large peptides, due to the methodology applied.

The aim of the present study was:

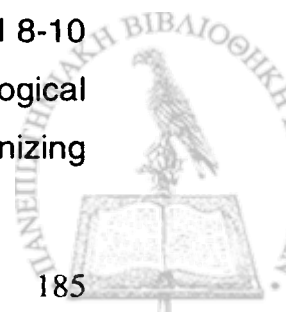
- 1) to finely map linear serological autoepitopes (B-cell epitopes) on the C-terminal region of human Tg, in autoimmune thyroid diseases, using small synthetic peptides,
- 2) to examine whether autoepitope-containing peptides also encompass epitopes (heteroepitopes) of antibodies experimentally induced by Tg and to study the immunogenicity and the pathogenic role of heteroepitope-containing peptides.
- 3) to investigate the possibility of intra- and intermolecular spreading of reactivity after administration of immunogenic peptide(s), and intramolecular spreading after Tg administration.

Forty-eight 20mer peptides, overlapping by eight residues and covering the C-terminal portion of human Tg were synthesised according to the multiple peptide synthesis technique on polyethylene pins. Screening was done by enzyme immunoassay (ELISA) using total IgG purified from four pilot Tg/AChE-reactive sera of GD patients and from three healthy controls. It was found that 17 out of the 48 peptides, spread throughout this Tg region, were preferentially recognized by all GD IgG preparations, as compared to controls. Depletion of Tg-specific antibodies from total IgG by immunoabsorption, revealed that peptides TgP15, TgP26 and TgP41 (2339-2358, 2471-2490 and

2651-2670 of human Tg, respectively) were recognized on intact Tg. Antibody-reactive peptides were subsequently synthesized by solid-phase technique for confirmation with a large number of patient sera: 99 GD, 32 HT and 45 healthy controls. All three peptides were recognized by a statistically significant proportion of GD sera (22.2%, 35.4% and 30.3%, respectively), compared with HT (0%, 15.6% and 6.3%, respectively) and healthy controls (0%, 4.4% and 4.4%, respectively). The majority of GD sera (56.6%) were positive for at least one of the three peptides. In GD, reactivity to TgP26 was associated with TED (48.6% with TED versus 25.5% without TED, $p < 0.05$).

Subsequently, we checked whether the three peptides identified as targets of autoantibodies in human thyroid diseases (TgP15, TgP26 and TgP41), comprise epitopes of antibodies induced in animals experimentally immunized with Tg and furthermore, we investigated the immunogenicity and pathogenicity of the peptides containing targets of induced anti-Tg antibodies. For this purpose, two adult New Zealand white rabbits were injected subcutaneously with 2.5 mg of human Tg in complete Freund's adjuvant (CFA) six times (stages 1-6), every three weeks. Animals were bled before priming (stage 0) and 8-10 days after each immunization. Two control animals were injected only with CFA. The immune response of the immunized rabbits was evaluated by testing reactivity to human and heterologous (from other mammalian species) Tgs, and to thyroid hormones (T_3 and T_4). Sera and affinity-purified anti-Tg antibodies were tested for reactivity by non-competitive and competitive ELISA. The following data were obtained: a) High reactivity to human Tg and lower reactivity to heterologous Tgs. b) Production of antibodies to thyroid hormones. c) Strong response to peptide TgP41 of human Tg. Consequently, this peptide comprises epitope of antibodies experimentally induced by Tg.

To investigate the immunogenicity and pathogenicity of TgP41, this peptide was administered to rabbits [two adult New Zealand white rabbits were injected subcutaneously with 100 μ g of TgP41 in CFA six times (stages 1-6), every two weeks]. Animals were bled before priming (stage 0) and 8-10 days after each immunization. From stage 2 onward, a strong serological response was developed against TgP41. Moreover, antibodies recognizing



human Tg were produced, mainly from stage 4 onward. Limited, if any, reactivity was observed against heterologous Tgs and no reactivity to thyroid hormones was developed. With the applied protocol of TgP41-immunization, we did not detect any signs of gland lesion, although the possibility of transient gland lesion cannot be excluded. Unlike TgP41, peptides TgP15 and TgP26 encompass only targets of autoantibodies.

Subsequently, we investigated the induction of intramolecular epitope spreading after TgP41-immunization, as well as inter molecular spreading of reactivity after Tg- and TgP41-immunization. During immunization with TgP41, intramolecular epitope spreading occurred, i.e. production of antibodies to sites on Tg other than TgP41, as was demonstrated by experiments involving immunoaffinity-depletion of specific antibodies and by inhibition experiments. In order to find out whether intermolecular spreading occurs during immunization with Tg, we tested the reactivity of antisera to human thyroid peroxidase (TPO) and other non-thyroid antigens: human myosin, human globular (G) and filamentous (F) actin, porcine tubulin, native DNA (nDNA) and bovine serum albumin (BSA). In Tg-immunized animals, a significant reactivity to TPO was detected. Concerning non-thyroid antigens, high reactivity to myosin, F-actin and BSA was observed. The study of affinity-purified anti-Tg antibodies revealed that intermolecular spreading of reactivity can sometimes be attributed to cross-reactivity with the immunizing antigen (Tg), as in the case of TPO, myosin and BSA, and sometimes cannot be attributed to cross-reactivity, as in the case of F-actin. During the first stages of immunization, reactivity to myosin is due to cross-reaction of anti-Tg antibodies, while in the final stages, antibodies specific to myosin are produced.

During the first stages of immunization with Tg, anti-Tg antibodies are polyspecific, cross-reacting with other antigens, whereas, at the final stage the response becomes highly specific to Tg. Production of anti-Tg antibodies, may result from the expansion of B-cell clones producing natural polyspecific autoantibodies. Administration of TgP41 did not result in reactivity to the panel of non-thyroid antigens. Nevertheless, intramolecular epitope spreading



obtained during TgP41-immunization resulted in the production of Tg antibodies cross-reacting with TPO.

In conclusion:

- 1) Certain epitopes on the C-terminal region of Tg are associated with GD (TgP15, TgP26, TgP41).
- 2) A subset of Tg-reactive autoantibodies directed to the C-terminal portion of human Tg is associated with TED and may be involved in the pathogenesis of the disease.
- 3) One of the autoepitope-containing peptides (namely TgP41) also encompasses epitope(s) of experimentally induced anti-Tg antibodies.
- 4) Peptide TgP41 is highly immunogenic, however, it does not induce thyroiditis in rabbit, probably due to remission of gland lesions.
- 5) TgP41 induces intramolecular epitope spreading when administered to experimental animals. Intramolecular epitope spreading is considered to be a mechanism of expansion of the immune response after an initial triggering by a few dominant epitopes.
- 6) Intermolecular spreading of reactivity to thyroid and non-thyroid antigens occurs during immunization with Tg.

Future histopathological studies in EAT-susceptible strains of mice will discriminate the pathogenic role of autoepitope-bearing peptides of Tg. Additionally, it is possible to investigate the existence of T-cell epitopes on Tg peptides and determine the minimum length of peptides required for their immunological properties (antigenicity, immunogenicity, pathogenicity). Further studies of peptides likely to be targets of autoepitopes, as revealed by epitope mapping technique, could possibly result in detecting more autoepitopes and heteroepitopes on the C-terminal end of Tg, which attracts special immunological interest.

7. Παράρτημα

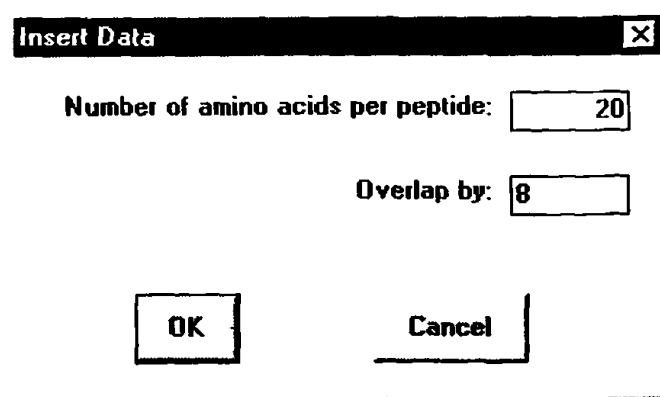
Προγραμματισμός πολλαπλής σύνθεσης πεπτιδίων

Για το σχεδιασμό των διαδοχικών κύκλων σύνθεσης των πεπτιδίων κατασκευάστηκαν δύο προγράμματα Η/Υ σε γλώσσα προγραμματισμού Visual Basic 3.0. Το πρόγραμμα "PEPTIDES" καθορίζει τις αλληλουχίες των πεπτιδίων, ενώ το πρόγραμμα "PCAL20" σχεδιάζει τους διαδοχικούς κύκλους σύνθεσης των πεπτιδίων και προσδιορίζει τις απαιτούμενες ποσότητες αντιδραστηρίων.

7.1 Το πρόγραμμα "PEPTIDES"

Το πρόγραμμα "PEPTIDES" διαβάζει από κάποιο αρχείο την αλληλουχία της πρωτεΐνης και τη χωρίζει σε πεπτίδια με το επιθυμητό μήκος και την επιθυμητή επικάλυψη. Αρχικά το πρόγραμμα ζητά να καθοριστεί το μήκος των πεπτιδίων και η έκταση της επικάλυψης (Εικόνα 4). Στη συνέχεια ζητείται το αρχείο που περιέχει την αλληλουχία της πρωτεΐνης (Εικόνα 5). Το αρχείο αυτό είναι ένα αρχείο κειμένου στο οποίο έχουμε μεταφέρει την αλληλουχία της πρωτεΐνης (Εικόνα 6). Ακολούθως, καθορίζεται το αρχείο όπου θα αποθηκευτούν οι αλληλουχίες των πεπτιδίων (Εικόνα 7). Η μορφή του αρχείου παρουσιάζεται στην Εικόνα 8. Ένα μήνυμα (Εικόνα 9) επιβεβαιώνει το τέλος του προγράμματος.

Εικόνα 4



Insert Data

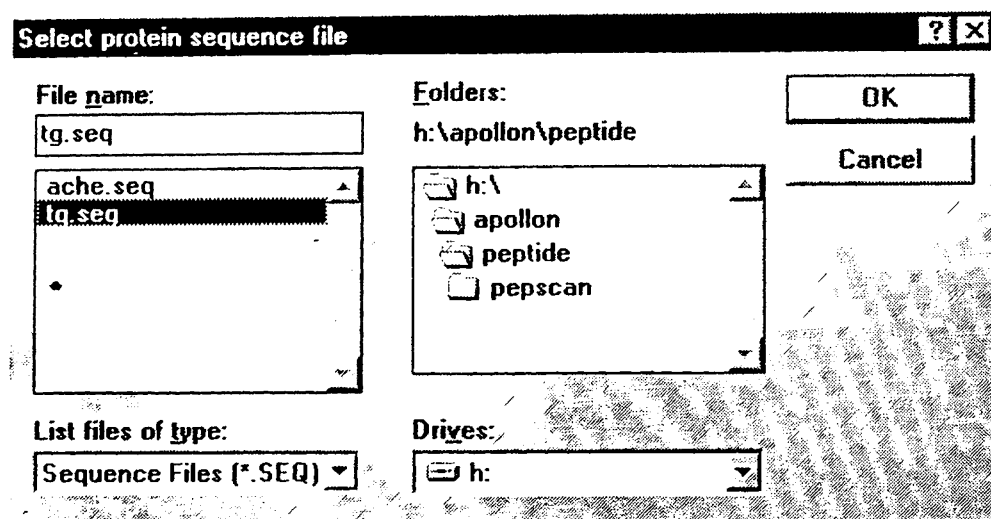
Number of amino acids per peptide: 20

Overlap by: 8

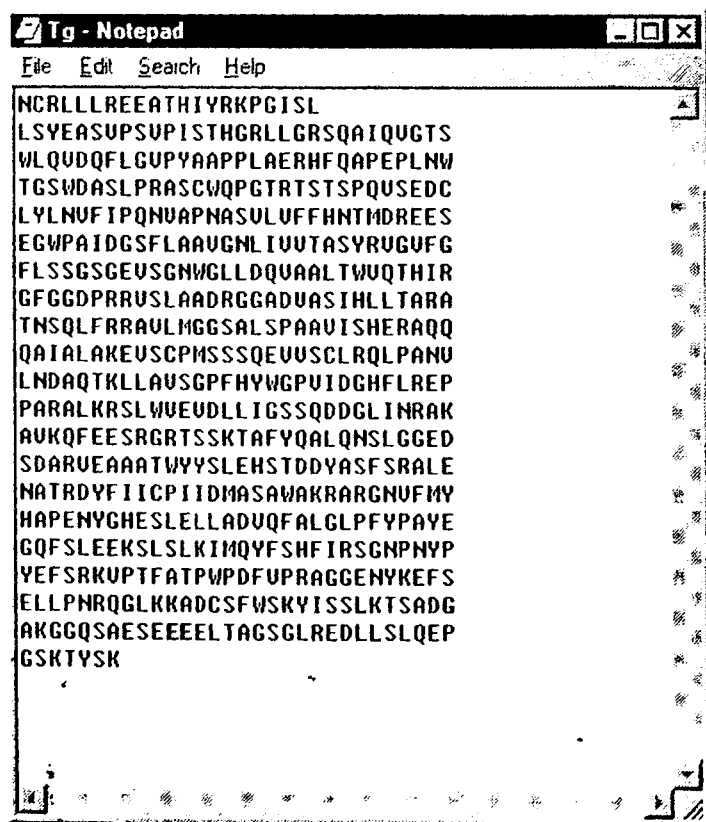
OK Cancel



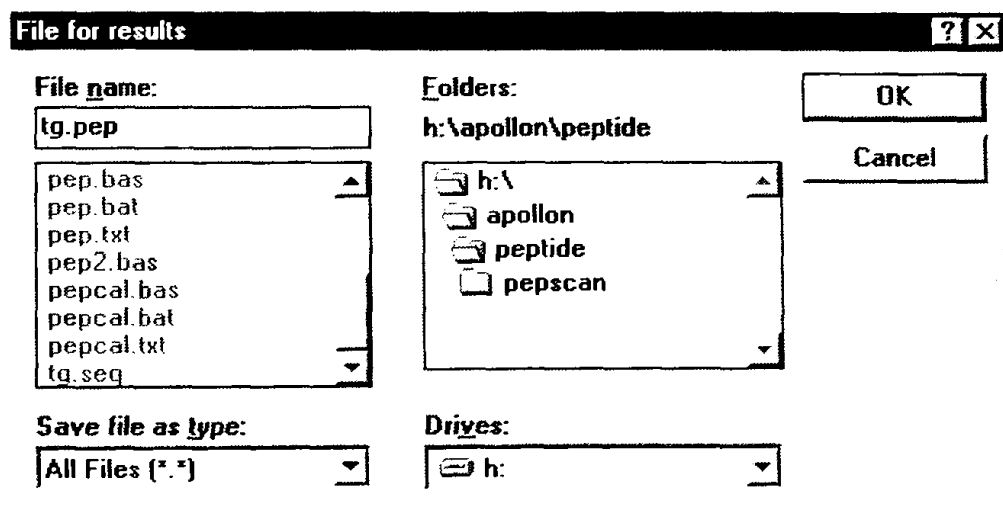
Εικόνα 5



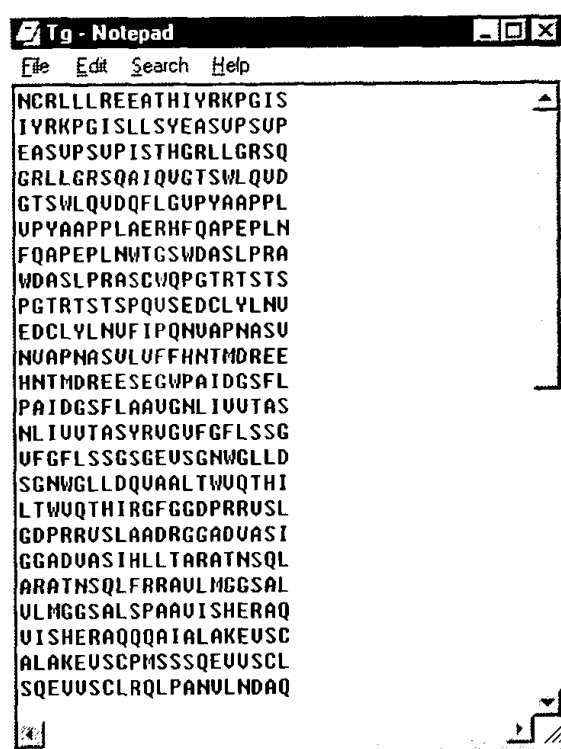
Εικόνα 6



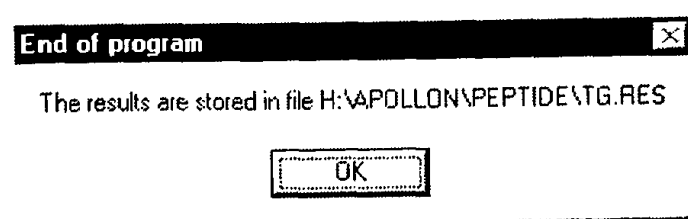
Εικόνα 7



Εικόνα 8



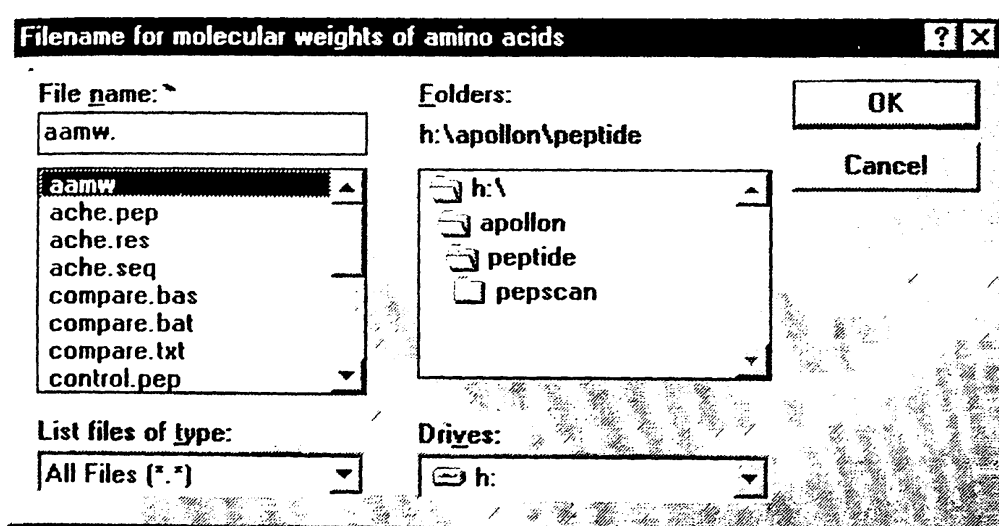
Εικόνα 9



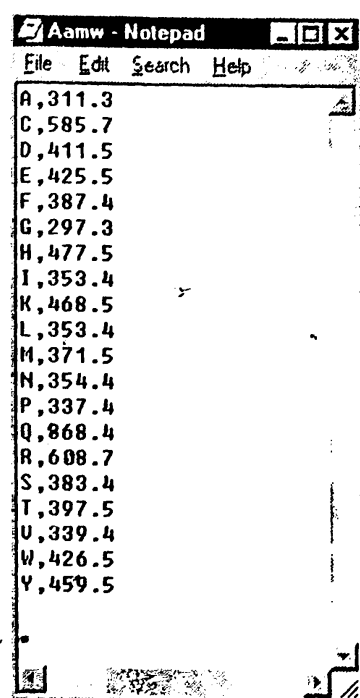
7.2 Το πρόγραμμα "PCAL20"

Το πρόγραμμα "PCAL20" καθορίζει τους διαδοχικούς κύκλους σύνθεσης των πεπτιδίων καθώς και τις απαιτούμενες ποσότητες αντιδραστηρίων. Αρχικά ζητείται να καθοριστεί το αρχείο στο οποίο αναγράφονται τα μοριακά βάρη των παραγώγων αμινοξέων που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν (Εικόνα 10). Το αρχείο αυτό πρέπει να είναι ένα αρχείο κειμένου της μορφής που φαίνεται στην Εικόνα 11.

Εικόνα 10

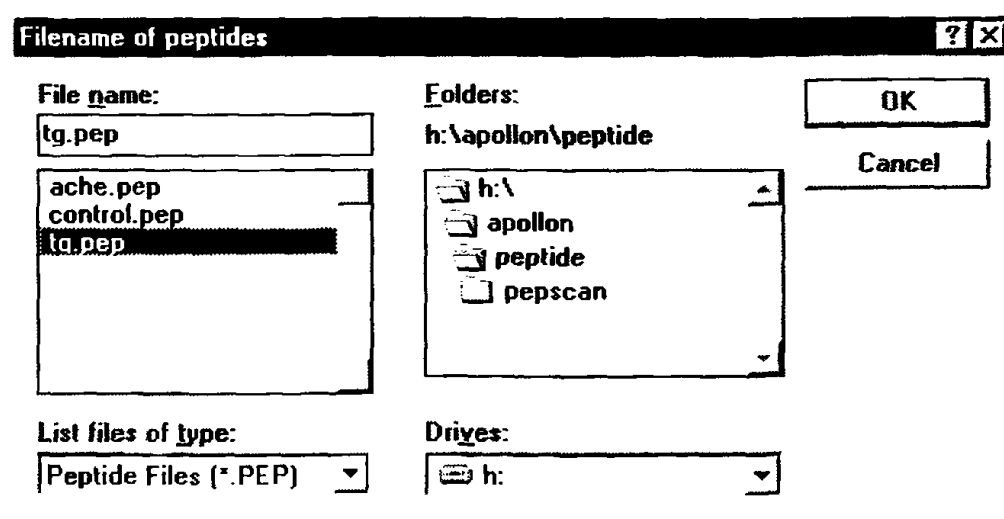


Εικόνα 11

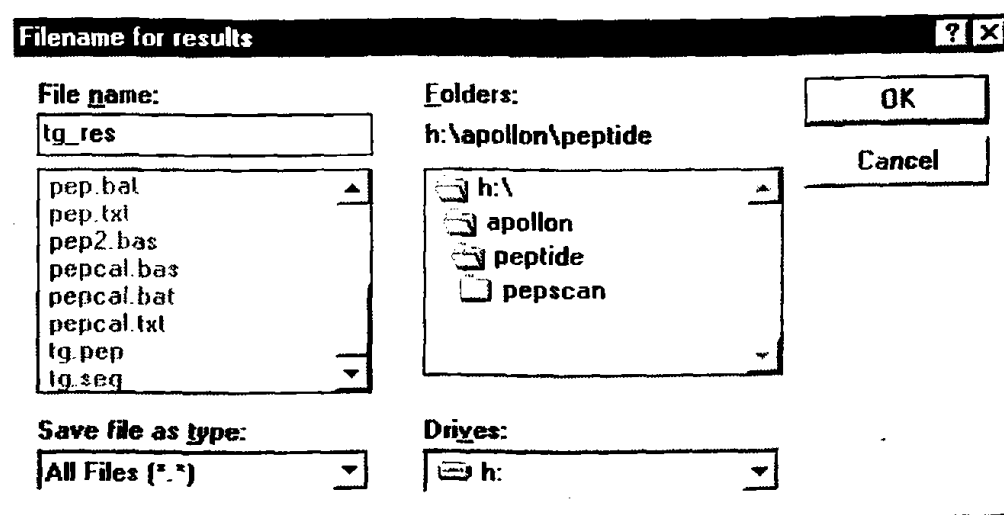


Στη συνέχεια πρέπει να δοθεί το όνομα του αρχείου στο οποίο βρίσκονται οι αλληλουχίες των πεπτιδίων (Εικόνα 12) και το όνομα του αρχείου στο οποίο θα αποθηκευτούν τα αποτελέσματα (Εικόνα 13). Ακολουθεί ένα παράθυρο στο οποίο ζητούνται πληροφορίες σχετικά με τη σύνθεση (Εικόνα 14). Το πρόγραμμα μας ειδοποιεί για το τέλος των υπολογισμών (Εικόνα 15).

Εικόνα 12



Εικόνα 13



Εικόνα 14

Data for synthesis

Concentration of amino acids

☐ 40mM

☒ 60mM

☐ 100mM

Number of copies of each peptide

☐ 1 ☒ 2 ☐ 4 ☐ 8

Concentration of Bromophenol Blue stock solution (mM):

10

Volume per well: 150 µl

OK Cancel

Εικόνα 15

End of program

THE RESULTS ARE STORED IN FILE H:\APOLLON\PEPTIDE\TG_RES

OK

Τα αποτελέσματα αποθηκεύονται σε ένα αρχείο κειμένου στο οποίο παρουσιάζονται τα ακόλουθα:

- i. Η αλληλουχία και η θέση κάθε πεπτιδίου (Εικόνα 16)
- ii. Ο τρόπος παρασκευής των διαλυμάτων για κάθε κύκλο σύνθεσης (Εικόνα 17)
- iii. Κάτοψη της πλάκας (ή των πλακών) όπου φαίνεται η θέση στην οποία πρέπει να τοποθετηθεί το διάλυμα του κάθε αμινοξέος (Εικόνα 18)
- iv. Αναλυτικά κάτοψη με τις θέσεις στις οποίες πρέπει να τοποθετηθεί το διάλυμα του κάθε αμινοξέος (Εικόνα 19).

Εικόνα 16

```

MS-DOS Prompt - EDIT
File Edit Search View Options Help
h:\apollo\peptide\TG_RES
SCHEDULE OF SYNTHESIS

The amino acid concentration in each well is 100 mM.
Volume per well is 150 µl.
2 copies of each peptide.
Concentration of Bromophenol Blue stock solution is 10 mM.

Position of each peptide:

Block 1
A, 1 NCRLLLREEATHIYRKPGIS
A, 2 IYRKPGISLLSYEASVPSVP
A, 3 EASVPSVPISTHGRLGRSQ
A, 4 GRLLGRSQAIQVGTSWLQVD
A, 5 GTSWLQVDQFLGVPYAAPPL
A, 6 VPYAAPPLAERHFQAPEPLN
A, 7 FQAPEPLNWTGSDASLPRA
A, 8 WDASLPRA SCWQPGTRTSTS
A, 9 PGTRTSTSPQVSEDCLYLN
A, 10 EDCLYLN VFIPQNVAPNASV
F1=Help Line:1 Col:1

```

Εικόνα 17

```

MS-DOS Prompt - EDIT
File Edit Search View Options Help
h:\apollo\peptide\TG_RES
Cycle 1

HOBT/DMF solution [Tot. vol.= 10.50 ml]:
Dissolve 391.4 mg of HOBT in 10.395 ml of distilled DMF.

To HOBT/DMF solution add 0.105 ml of Bromophenol Blue stock solution 10 mM.

DIC/DMF solution [Tot. vol.= 10.50 ml]:
Dissolve 0.325 ml of DIC in 10.175 ml of distilled DMF.

Amino Acid solutions:
AA # of wells Weight(mg) HOBT/DMF sol.(ml) DIC/DMF sol.(ml)
A 08 46.7 0.75 0.75 A
C 02 29.3 0.25 0.25 C
D 12 82.3 1.00 1.00 D
E 08 63.8 0.75 0.75 E
F 02 19.4 0.25 0.25 F
G 04 29.7 0.50 0.50 G
I 04 35.3 0.50 0.50 I
L 18 106.0 1.50 1.50 L
M 02 18.6 0.25 0.25 M
N 04 35.4 0.50 0.50 N
F1=Help Line:136 Col:78

```



Εικόνα 18

```

MS-DOS Prompt - EDIT
File Edit Search View Options Help
h:\apollo\peptide\TG_RES
V 06 33.9 0.50 0.50 V
W 04 42.7 0.50 0.50 W
Y 08 68.9 0.75 0.75 Y

DIC/DMF solution is added immediately before dispensing.

TOTAL VIEW OF THE PLATE.
Plate 1
 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
A S P Q D L N A S V V E L
B S P Q D L N A S V V E L
C S G D I L I L L Q C L Q
D S G D I L I L L Q C L Q
E Y E V D F A E W A D S M
F Y E V D F A E W A D S M
G L L L Y Y A G N W D E D
H L L L Y Y A G N W D E D

Plate 2
 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

```

Εικόνα 19. Με '*' παριστάνονται οι θέσεις στις οποίες πρόκειται να τοποθετηθεί το διάλυμα του αμινοξέος, ενώ με 'X' σημειώνονται οι θέσεις στις οποίες έχουν ήδη τοποθετηθεί τα προηγούμενα αμινοξέα. Οι θέσεις που είναι ακόμα κενές συμβολίζονται με 'O'.

```

MS-DOS Prompt - EDIT
File Edit Search View Options Help
h:\apollo\peptide\TG_RES

DISPENSING OF AMINO ACIDS.

For A:

Plate 1
 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
A O O O O O O * O O O O O
B O O O O O O * O O O O O
C O O O O O O O O O O O O
D O O O O O O O O O O O O
E O O O O O * O O * O O O
F O O O O O * O O * O O O
G O O O O O * O O O O O O
H O O O O O * O O O O O O

For A (Cycle 1 )

Plate 2
 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

```

(Συνεχίζεται)

Εικόνα 19. Συνέχεια

```

MS-DOS Prompt - EDIT
File Edit Search View Options Help
h:\apollo\peptide\TG.RES

G
H

For P (Cycle 20 )

For R:

Plate 1
  1  2  3  4  5  6  7  8  9 10 11 12
A X  X  X  X  X  O  X  O  X  X  X  X
B X  X  X  X  X  O  X  O  X  X  X  X
C X  X  O  O  X  X  X  X  O  O  X  O
D X  X  O  O  X  X  X  X  O  O  X  O
E X  X  X  X  X  *  X  X  *  X  X  X
F X  X  X  X  X  *  X  X  *  X  X  X
G *  X  X  X  X  X  O  X  X  X  O  X
H *  X  X  X  X  X  O  X  X  X  O  X

For R (Cycle 20 )

Plate 2
  1  2  3  4  5  6  7  8  9 10 11 12

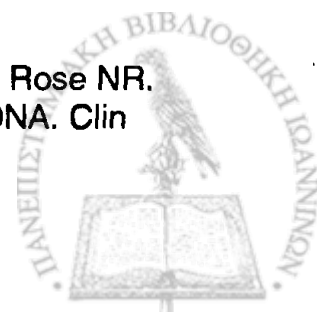
```



8. Βιβλιογραφία

- 1 Berge-LeFranc JL, Cartouzou G, Malthiery Y, Perrin F, Jarry B & Lissitzky S. Cloning of four DNA fragments complementary to human thyroglobulin messenger RNA. *Eur J Biochem* 1981, **120**: 1-7.
- 2 Van Herle AJ, Vassart G & Dumont JE. Control of thyroglobulin synthesis and secretion (second of two parts). *N Engl J Med* 1979, **301**: 307-314.
- 3 Kondo Y & Ui N. Biochemical properties of pig thyroid gland and their variation with the individual. *Seikagaku (Jpn)* 1962, **34**: 159-165.
- 4 Sage M & Robins PC. The quantitative relationship between the concentration of TSH and interferometric measurements on the thyroid colloid. *Gen Comp Endocrinol* 1970, **14**: 601-603.
- 5 Mercken L, Simons MJ, Swillens S, Massaer M & Vassart G. Primary structure of bovine thyroglobulin deduced from the sequence of its 8,431-base complementary DNA. *Nature* 1985, **316**: 647-651.
- 6 Venkatesh SG & Deshpande V. A comparative review of the structure and biosynthesis of thyroglobulin. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 1999, **122**: 13-20.
- 7 Nilsson M. *Trends Endocrinol Metab* 1995, **6**: 175-182.
- 8 Taurog A. Thyroid peroxidase and thyroxine biosynthesis. *Recent Prog Horm Res* 1970, **26:189-247**: 189-247.
- 9 Taurog A. Hormone synthesis: thyroid iodine metabolism. In: Braverman, L. E. and Utiger, R. D., eds. *The Thyroid*. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996:47-81.
- 10 Dunn JT. Thyroglobulin, hormone synthesis and thyroid disease. *Eur J Endocrinol* 1995, **132**: 603-604.
- 11 Nagayama Y & Rapoport B. The thyrotropin receptor 25 years after its discovery: new insight after its molecular cloning. *Mol Endocrinol* 1992, **6**: 145-156.
- 12 Bernier-Valentin F, Kostrouch Z, Rabilloud R, Munari-Silem Y & Rousset B. Coated vesicles from thyroid cells carry iodinated thyroglobulin molecules. *J Biol Chem* 1990, **265**: 17373-17380.

- 13 Marino M & McCluskey RT. Role of thyroglobulin endocytic pathways in the control of thyroid hormone release. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000, **279**: C1295-C1306.
- 14 Ronin C, Fenouillet E, Hovsepian S, Fayet G & Fournet B. Regulation of thyroglobulin glycosylation. A comparative study of the thyroglobulins from porcine thyroid glands and follicles in serum-free culture. *J Biol Chem* 1986, **261**: 7287-7293.
- 15 Bastiani P, Papandreou MJ, Blanck O, Fenouillet E, Thibault V & Miquelis R. On the relationship between completion of N-acetyllactosamine oligosaccharide units and iodine content of thyroglobulin: a reinvestigation. *Endocrinology* 1995, **136**: 4204-4209.
- 16 Van Herle AJ, Uller RP, Matthews NI & Brown J. Radioimmunoassay for measurement of thyroglobulin in human serum. *J Clin Invest* 1973, **52**: 1320-1327.
- 17 Karlson P. Ορμόνες του θυρεοειδούς και των παραθυρεοειδών αδένων. Βιοχημεία. Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας, 1984:375-378.
- 18 Karlson P, Gerok W, and Grob W. Ορμόνες του θυρεοειδούς και των παραθυρεοειδών αδένων. Κλινική Παθολογική Βιοχημεία. Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας, 1989:230-239.
- 19 Stryer L. Hormone action. *Biochemistry*. New York: W.H. Freeman and Co., 1988:975-1003.
- 20 van Ommen GJ, Arnberg AC, Baas F, Brocas H, Sterk A, Tegelaers WH, Vassart G & de Vijlder JJ. The human thyroglobulin gene contains two 15-17 kb introns near its 3'-end. *Nucleic Acids Res* 1983, **11**: 2273-2285.
- 21 Van Ommen GJB, Baas F, Arnberg AC, Pearson PL & Vijlder JJM. *Cytogenet Cell Genet* 1984, **37**: 562.
- 22 Baas F, van Ommen GJ, Bikker H, Arnberg AC & de Vijlder JJ. The human thyroglobulin gene is over 300 kb long and contains introns of up to 64 kb. *Nucleic Acids Res* 1986, **14**: 5171-5186.
- 23 Malthiery Y & Lissitzky S. Primary structure of human thyroglobulin deduced from the sequence of its 8448-base complementary DNA. *Eur J Biochem* 1987, **165**: 491-498.
- 24 Caturegli P, Vidalain PO, Vali M, Aguilera-Galaviz LA & Rose NR. Cloning and characterization of murine thyroglobulin cDNA. *Clin Immunol Immunopathol* 1997, **85**: 221-226.



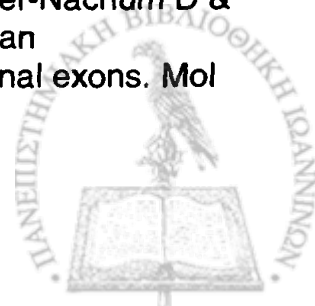
- 25 Durand J, Malthiery Y, Chabaud O & Lissitzky S. C-terminal extremity of ovine thyroglobulin shows strong interspecies homologies. *C R Seances Soc Biol Fil* 1987, **181**: 258-266.
- 26 Di Lauro R, Obici S, Condliffe D, Ursini VM, Musti A, Moscatelli C & Avvedimento VE. The sequence of 967 amino acids at the carboxyl-end of rat thyroglobulin. Location and surroundings of two thyroxine-forming sites. *Eur J Biochem* 1985, **148**: 7-11.
- 27 Marriq C, Lejeune PJ, Malthiery Y, Rolland M & Lissitzky S. Precursor-product relationship between the 26-kDa and 18-kDa fragments formed by iodination of human thyroglobulin. *FEBS Lett* 1984, **175**: 140-146.
- 28 Malthiery Y, Marriq C, Berge-Lefranc JL, Franc JL, Henry M, Lejeune PJ, Ruf J & Lissitzky S. Thyroglobulin structure and function: recent advances. *Biochimie* 1989, **71**: 195-209.
- 29 Schumacher M, Camp S, Maulet Y, Newton M, MacPhee-Quigley K, Taylor SS, Friedmann T & Taylor P. Primary structure of Torpedo californica acetylcholinesterase deduced from its cDNA sequence. *Nature* 1986, **319**: 407-409.
- 30 Koch N, Lauer W, Habicht J & Dobberstein B. Primary structure of the gene for the murine Ia antigen-associated invariant chains (Ii). *EMBO J* 1987, **6**: 1677-1683.
- 31 Sorimachi K & Ui N. Comparison of the iodoamino acid distribution in thyroglobulins obtained from various animal species. *Gen Comp Endocrinol* 1974, **24**: 38-43.
- 32 Dunn JT & Dunn AD. The importance of thyroglobulin structure for thyroid hormone biosynthesis. *Biochimie* 1999, **81**: 505-509.
- 33 Gavaret JM, Nunez J & Cahnmann HJ. Formation of dehydroalanine residues during thyroid hormone synthesis in thyroglobulin. *J Biol Chem* 1980, **255**: 5281-5285.
- 34 Gavaret JM, Cahnmann HJ & Nunez J. The fate of the "lost side chain" during thyroid hormonogenesis. *J Biol Chem* 1979, **254**: 11218-11222.
- 35 Dunn AD, Corsi CM, Myers HE & Dunn JT. Tyrosine 130 is an important outer ring donor for thyroxine formation in thyroglobulin. *J Biol Chem* 1998, **273**: 25223-25229.

- 36 Ohmiya Y, Hayashi H, Kondo T & Kondo Y. Location of dehydroalanine residues in the amino acid sequence of bovine thyroglobulin. *J Biol Chem* 1990, **265**: 9066-9071.
- 37 Tsuji T, Yamamoto K, Irimura T & Osawa T. Structure of carbohydrate unit A of porcine thyroglobulin. *Biochem J* 1981, **195**: 691-699.
- 38 Yamamoto K, Tsuji T, Irimura T & Osawa T. The structure of carbohydrate unit B of porcine thyroglobulin. *Biochem J* 1981, **195**: 701-713.
- 39 Arima T, Spiro MJ & Spiro RG. Studies on the carbohydrate units of thyroglobulin. Evaluation of their microheterogeneity in the human and calf proteins. *J Biol Chem* 1972, **247**: 1825-1835.
- 40 Spiro RG & Bhoyroo VD. Occurrence of sulfate in the asparagine-linked complex carbohydrate units of thyroglobulin. *J Biol Chem* 1988, **263**: 14351-14358.
- 41 Herzog V. Secretion of sulfated thyroglobulin. *Eur J Cell Biol* 1986, **39**: 399-409.
- 42 Consiglio E, Acquaviva AM, Formisano S *et al*. Characterization of phosphate residues on thyroglobulin. *J Biol Chem* 1987, **262**: 10304-10314.
- 43 Gmeiner BM & Seelos CC. Tyrosine phosphorylation blocks tyrosine free radical formation and, hence, the hormonogenic iodination reaction. *Free Radic Biol Med* 1996, **21**: 349-351.
- 44 Taylor P & Radic Z. The cholinesterases: from genes to proteins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1994, **34**:281-320.: 281-320.
- 45 Massoulie J & Bon S. The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates. *Annu Rev Neurosci* 1982, **5**:57-106: 57-106.
- 46 Rosenberry TL. In: Martonosi, A. N., eds. *The Enzymes of Biological Membranes*. New York: Plenum, 1985:403-429.
- 47 Layer PG, Rommel S, Bulthoff H & Hengstenberg R. Independent spatial waves of biochemical differentiation along the surface of chicken brain as revealed by the sequential expression of acetylcholinesterase. *Cell Tissue Res* 1988, **251**: 587-595.



- 48 Zakut H, Ehrlich G, Ayalon A *et al.* Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase genes coamplify in primary ovarian carcinomas. *J Clin Invest* 1990, **86**: 900-908.
- 49 Schumacher M, Camp S, Maulet Y, Newton M, MacPhee-Quigley K, Taylor SS, Friedmann T & Taylor P. Primary structure of acetylcholinesterase: implications for regulation and function. *Fed Proc* 1986, **45**: 2976-2981.
- 50 MacPhee-Quigley K, Vedvick TS, Taylor P & Taylor SS. Profile of the disulfide bonds in acetylcholinesterase. *J Biol Chem* 1986, **261**: 13565-13570.
- 51 Doctor BP, Chapman TC, Christner CE *et al.* Complete amino acid sequence of fetal bovine serum acetylcholinesterase and its comparison in various regions with other cholinesterases. *FEBS Lett* 1990, **266**: 123-127.
- 52 Hall LM & Spierer P. The Ace locus of *Drosophila melanogaster*: structural gene for acetylcholinesterase with an unusual 5' leader. *EMBO J* 1986, **5**: 2949-2954.
- 53 Soreq H, Ben Aziz R, Prody CA *et al.* Molecular cloning and construction of the coding region for human acetylcholinesterase reveals a G + C-rich attenuating structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990, **87**: 9688-9692.
- 54 Kyte J & Doolittle RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 1982, **157**: 105-132.
- 55 Taylor P, Schumacher M, MacPhee-Quigley K, Fiedmann T & Taylor S. *Trends Neurosci* 1987, **10**: 93-95.
- 56 Massoulie J & Rieger F. Acetylcholinesterase of fish electric organs (torpedo and electric eel), membrane complexes. *Eur J Biochem* 1969, **11**: 441-455.
- 57 Futerman AH, Fiorini RM, Roth E, Low MG & Silman I. Physicochemical behaviour and structural characteristics of membrane-bound acetylcholinesterase from Torpedo electric organ. *Biochem J* 1985, **226**: 369-377.
- 58 Rosenberry TL, Roberts WL & Haas R. Glycolipid membrane-binding domain of human erythrocyte acetylcholinesterase. *Fed Proc* 1986, **45**: 2970-2975.

- 59 Lee SL, Camp SJ & Taylor P. Characterization of a hydrophobic, dimeric form of acetylcholinesterase from Torpedo. *J Biol Chem* 1982, **257**: 12302-12309.
- 60 Lee SL, Heinemann S & Taylor P. Structural characterization of the asymmetric (17 + 13) S forms of acetylcholinesterase from Torpedo. *J Biol Chem* 1982, **257**: 12282-12291.
- 61 Rotundo RL. Asymmetric acetylcholinesterase is assembled in the Golgi apparatus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984, **81**: 479-483.
- 62 Younkin SG, Rosenstein C, Collins PL & Rosenberry TL. Cellular localization of the molecular forms of acetylcholinesterase in rat diaphragm. *J Biol Chem* 1982, **257**: 13630-13637.
- 63 Schwarz M, Loewenstein-Lichtenstein Y, Glick D, Liao J, Norgaard-Pedersen B & Soreq H. Successive organophosphate inhibition and oxime reactivation reveals distinct responses of recombinant human cholinesterase variants. *Brain Res Mol Brain Res* 1995, **31**: 101-110.
- 64 Doctor BP, Camp S, Gentry MK, Taylor SS & Taylor P. Antigenic and structural differences in the catalytic subunits of the molecular forms of acetylcholinesterase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983, **80**: 5767-5771.
- 65 Maulet Y, Schumacher M & Taylor P. *Federation Proc* 1986, **44**: 711-
- 66 Sikorav JL, Grassi J & Bon S. Synthesis in vitro of precursors of the catalytic subunits of acetylcholinesterase from *Torpedo marmorata* and *Electrophorus electricus*. *Eur J Biochem* 1984, **145**: 519-524.
- 67 Soreq H, Zevin-Sonkin D & Razon N. Expression of cholinesterase gene(s) in human brain tissues: translational evidence for multiple mRNA species. *EMBO J* 1984, **3**: 1371-1375.
- 68 Legay C. Why so many forms of acetylcholinesterase? *Microsc Res Tech* 2000, **49**: 56-72.
- 69 Grisaru D, Sternfeld M, Eldor A, Glick D & Soreq H. Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. *Eur J Biochem* 1999, **264**: 672-686.
- 70 Seidman S, Sternfeld M, Aziz-Aloya R, Timberg R, Kaufer-Nachum D & Soreq H. Synaptic and epidermal accumulations of human acetylcholinesterase are encoded by alternative 3'-terminal exons. *Mol Cell Biol* 1995, **15**: 2993-3002.



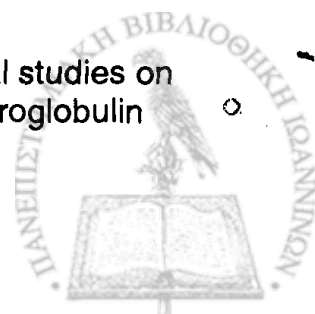
- 71 Massoulie J, Pezzementi L, Bon S, Krejci E & Vallette FM. Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Prog Neurobiol* 1993, **41**: 31-91.
- 72 Karpel R, Aziz-Aloya R, Sternfeld M *et al.* Expression of three alternative acetylcholinesterase messenger RNAs in human tumor cell lines of different tissue origins. *Exp Cell Res* 1994, **210**: 268-277.
- 73 Karpel R, Sternfeld M, Ginzberg D, Guhl E, Graessmann A & Soreq H. Overexpression of alternative human acetylcholinesterase forms modulates process extensions in cultured glioma cells. *J Neurochem* 1996, **66**: 114-123.
- 74 Li Y, Camp S, Rachinsky TL, Getman D & Taylor P. Gene structure of mammalian acetylcholinesterase. Alternative exons dictate tissue-specific expression. *J Biol Chem* 1991, **266**: 23083-23090.
- 75 Kerem A, Kronman C, Bar-Nun S, Shafferman A & Velan B. Interrelations between assembly and secretion of recombinant human acetylcholinesterase. *J Biol Chem* 1993, **268**: 180-184.
- 76 Liao J, Heider H, Sun MC & Brodbeck U. Different glycosylation in acetylcholinesterases from mammalian brain and erythrocytes. *J Neurochem* 1992, **58**: 1230-1238.
- 77 Rubin LL. Increases in muscle Ca^{2+} mediate changes in acetylcholinesterase and acetylcholine receptors caused by muscle contraction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985, **82**: 7121-7125.
- 78 Fallon JR, Nitkin RM, Reist NE, Wallace BG & McMahan UJ. Acetylcholine receptor-aggregating factor is similar to molecules concentrated at neuromuscular junctions. *Nature* 1985, **315**: 571-574.
- 79 Low MG, Ferguson MAJ, Futerman AM & Silman I. *Trends Biochem Sci* 1986, **11**: 212-215.
- 80 Ferguson MA, Duszenko M, Lamont GS, Overath P & Cross GA. Biosynthesis of *Trypanosoma brucei* variant surface glycoproteins. *J Biol Chem* 1986, **261**: 356-362.
- 81 Greenfield S. *Neurochem Int* 1985, **1**: 887-901.
- 82 Blow DM, Birktoft JJ & Hartley BS. Role of a buried acid group in the mechanism of action of chymotrypsin. *Nature* 1969, **221**: 337-340.
- 83 Chambers JL & Stroud RM. *Acta Cryst* 1977, **33**: 1824-1837.

- 84 Froede HC and Wilson IB. Acetylcholinesterase. In: Boyer, P. D., eds. The Enzymes. New York: Academic Press, 1971:87-
- 85 Aldrige WN and Reiner E. Enzyme Inhibitors as Substances. Amsterdam: North-Holland Publishing Co., 1972:37-
- 86 Ogert RA, Gentry MK, Richardson EC, Deal CD, Abramson SN, Alving CR, Taylor P & Doctor BP. Studies on the topography of the catalytic site of acetylcholinesterase using polyclonal and monoclonal antibodies. J Neurochem 1990, **55**: 756-763.
- 87 Sussman JL, Harel M, Frolow F, Oefner C, Goldman A, Toker L & Silman I. Atomic structure of acetylcholinesterase from Torpedo californica: a prototypic acetylcholine-binding protein. Science 1991, **253**: 872-879.
- 88 Swillens S, Ludgate M, Mercken L, Dumont JE & Vassart G. Analysis of sequence and structure homologies between thyroglobulin and acetylcholinesterase: possible functional and clinical significance. Biochem Biophys Res Commun 1986, **137**: 142-148.
- 89 Tunbridge WM, Evered DC, Hall R *et al*. The spectrum of thyroid disease in a community: the Wickham survey. Clin Endocrinol (Oxf) 1977, **7**: 481-493.
- 90 Schwartz RS and Datta SK. In: William E. Paul, eds. Fundamental Immunology. New York: Raven Press Ltd, 1989:851-852.
- 91 Doniach D, Bottazzo GF & Russell RC. Goitrous autoimmune thyroiditis (Hashimoto's disease). Clin Endocrinol Metab 1979, **8**: 63-80.
- 92 Katz SM & Vickery AL, Jr. The fibrous variant of Hashimoto's thyroiditis. Hum Pathol 1974, **5**: 161-170.
- 93 Maagoe H, Reintoft I, Christensen HE, Simonsen J & Mogensen EF. Lymphocytic thyroiditis. Acta Med Scand 1977, **202**: 469-473.
- 94 Hayashi Y, Tamai H, Fukata S, Hirota Y, Katayama S, Kuma K, Kumagai LF & Nagataki S. A long term clinical, immunological, and histological follow-up study of patients with goitrous chronic lymphocytic thyroiditis. J Clin Endocrinol Metab 1985, **61**: 1172-1178.
- 95 Weetman A.P. & McGregor AM. Autoimmune thyroid disease: further developments in our understanding. Endocr Rev 1994, **15**: 788-830.



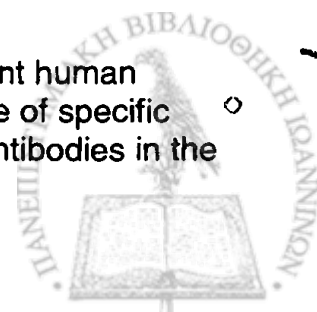
- 96 Bermann M, Magee M, Koenig R.J., Kaplan M.M., Arscott P, Maastricht J, Johnson J & Baker JR, Jr. Differential autoantibody responses to thyroid peroxidase in patients with Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab* 1993, **77**: 1098-1101.
- 97 DeGroot L.J. & Quintans J. The causes of autoimmune thyroid disease. *Endocr Rev* 1989, **10**: 537-562.
- 98 Kendall-Taylor P & Perros P. Clinical presentation of thyroid associated orbitopathy. *Thyroid* 1998, **8**: 427-428.
- 99 Kahali G, Forster G & Hansen C. Glycosaminoglycans in thyroid eye disease. *Thyroid* 2001, **8**: 429-432.
- 100 Bahn RS & Heufelder AE. Pathogenesis of Graves' ophthalmopathy. *N Engl J Med* 1993, **329**: 1468-1475.
- 101 Salvi M, Zhang ZG, Haegert D, Woo M, Liberman A, Cadarso L & Wall JR. Patients with endocrine ophthalmopathy not associated with overt thyroid disease have multiple thyroid immunological abnormalities. *J Clin Endocrinol Metab* 1990, **70**: 89-94.
- 102 Gorman CA. Temporal relationship between onset of Graves' ophthalmopathy and diagnosis of thyrotoxicosis. *Mayo Clin Proc* 1983, **58**: 515-519.
- 103 Wood LC & Ingbar SH. Hypothyroidism as a late sequela in patient with Graves' disease treated with antithyroid agents. *J Clin Invest* 1979, **64**: 1429-1436.
- 104 Gomez J.M., Gomez N, Amat M, Biondo S, Rafecas A, Jaurrieta E & Soler J. Hypothyroidism after iodine-131 or surgical therapy for Graves' disease hyperthyroidism. *Ann Endocrinol (Paris)* 2000, **61**: 184-191.
- 105 Ueta Y, Fukui H, Murakami H *et al.* Development of primary hypothyroidism with the appearance of blocking-type antibody to thyrotropin receptor in Graves' disease in late pregnancy. *Thyroid* 1999, **9**: 179-182.
- 106 Bando Y, Nagai Y, Ushiogi Y, Toya D, Tanaka N & Fujisawa M. Development of Graves' hyperthyroidism from primary hypothyroidism in a case of thyroid hemiagenesis. *Thyroid* 1999, **9**: 183-187.
- 107 Anderson CL & Rose NR. Induction of thyroiditis in the rabbit by intravenous infection of papain-treated rabbit thyroglobulin. *J Immunol* 1971, **107**: 1341-1348.

- 108 Velicky J, Titlbach M, Dvorak R, Lustig R, Raska I, Lhotova H, Mara M & Likovsky Z. Experimental thyroiditis in guinea pigs and rabbits. Immunization with thyroglobulin and bovine thyroid gland suspension. *Funct Dev Morphol* 1993, **3**: 259-267.
- 109 Kotani T, Umeki K, Yagihashi S, Hirai K & Ohtaki S. Identification of thyroiditogenic epitope on porcine thyroid peroxidase for C57BL/6 mice. *J Immunol* 1992, **148**: 2084-2089.
- 110 Costagliola S, Alcalde L, Tonacchera M, Ruf J, Vassart G & Ludgate M. Induction of thyrotropin receptor (TSH-R) autoantibodies and thyroiditis in mice immunised with the recombinant TSH-R. *Biochem Biophys Res Commun* 1994, **199**: 1027-1034.
- 111 Vladutiu AO & Rose NR. Autoimmune murine thyroiditis relation to histocompatibility (H-2) type. *Science* 1971, **174**: 1137-1139.
- 112 Beisel KW, David CS, Giraldo AA, Kong YM & Rose NR. Regulation of experimental autoimmune thyroiditis: mapping of susceptibility to the I-A subregion of the mouse H-2. *Immunogenetics* 1982, **15**: 427-430.
- 113 Beisel KW, Kong YM, Babu KS, David CS & Rose NR. Regulation of experimental autoimmune thyroiditis: influence of non-H-2 genes. *J Immunogenet* 1982, **9**: 257-265.
- 114 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, **160**: 1458-1465.
- 115 Costagliola S, Many MC, Stalmans-Falys M, Vassart G & Ludgate M. Transfer of thyroiditis, with syngeneic spleen cells sensitized with the human thyrotropin receptor, to naive BALB/c and NOD mice. *Endocrinology* 1996, **137**: 4637-4643.
- 116 Many MC, Costagliola S, Detrait M, Denef F, Vassart G & Ludgate MC. Development of an animal model of autoimmune thyroid eye disease. *J Immunol* 1999, **162**: 4966-4974.
- 117 Karesen R. Induction of thyroiditis in guinea-pigs by intravenous injection of rabbit anti-guinea-pig thyroglobulin serum. *Immunology* 1970, **19**: 301-318.
- 118 Blumenthal HT & Premachandra BN. Immunopathological studies on thyroid immunity. IX. Thyroid and renal amyloidosis in thyroglobulin immunized rabbits. *J Pathol* 1987, **151**: 305-314.



- 119 Champion BR, Rayner DC, Byfield PG, Page KR, Chan CT & Roitt IM. Critical role of iodination for T cell recognition of thyroglobulin in experimental murine thyroid autoimmunity. *J Immunol* 1987, **139**: 3665-3670.
- 120 Hoshioka A, Kohno Y, Katsuki T *et al.* Chemical iodination of hormonogenic tyrosine residues of human thyroglobulin is critical for the production of anti-thyroglobulin autoantibody and for the induction of experimental autoimmune thyroiditis in mice. *Arerugi* 1994, **43**: 152-158.
- 121 Kong YC, McCormick DJ, Wan Q, Motte RW, Fuller BE, Giraldo AA & David CS. Primary hormonogenic sites as conserved autoepitopes on thyroglobulin in murine autoimmune thyroiditis. Secondary role of iodination. *J Immunol* 1995, **155**: 5847-5854.
- 122 Carayanniotis G & Rao VP. Searching for pathogenic epitopes in thyroglobulin: parameters and caveats. *Immunol Today* 1997, **18**: 83-88.
- 123 Andrikoula M & Tsatsoulis A. The role of Fas-mediated apoptosis in thyroid disease. *Eur J Endocrinol* 2001, **144**: 561-568.
- 124 Arscott P.L. & Baker JR, Jr. Apoptosis and thyroiditis. *Clin Immunol Immunopathol* 1998, **87**: 207-217.
- 125 Hammond L.J., Lowdell M.W., Cerrano P.G., Goode A.W., Bottazzo G.F. & Mirakian R. Analysis of apoptosis in relation to tissue destruction associated with Hashimoto's autoimmune thyroiditis. *J Pathol* 1997, **182**: 138-144.
- 126 Chiu V.K., Walsh C.M., Liu C.C., Reed J.C & Clark WR. Bcl-2 blocks degranulation but not fas-based cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 1995, **154**: 2023-2032.
- 127 Mitsiades N, Poulaki V, Kotoula V, Mastorakos G, Tseleni-Balafouta S, Koutras DA & Tsokos M. Fas/Fas ligand up-regulation and Bcl-2 down-regulation may be significant in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab* 1998, **83**: 2199-2203.
- 128 Hiromatsu Y, Hoshino T, Yagita H *et al.* Functional Fas ligand expression in thyrocytes from patients with Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1999, **84**: 2896-2902.
- 129 Shimaoka Y, Hidaka Y, Okumura M, Takeoka K, Tada H & Amino N. Serum concentration of soluble Fas in patients with autoimmune thyroid diseases. *Thyroid* 1998, **8**: 43-47.

- 130 Hiromatsu Y, Bednarczuk T, Soyejima E, Miyake I, Yang D, Fukazawa H & Nonaka K. Increased serum soluble Fas in patients with Graves' disease. *Thyroid* 1999, **9**: 341-345.
- 131 Ball AO, Williams ME & Spindler KR. Identification of mouse adenovirus type 1 early region 1: DNA sequence and a conserved transactivating function. *J Virol* 1988, **62**: 3947-3957.
- 132 Carayanniotis G, Chronopoulou E & Rao V. Distinct genetic pattern of mouse susceptibility to thyroiditis induced by a novel thyroglobulin peptide. *Immunogenetics* 1994, **39**: 21-28.
- 133 Rao VP, Kajon AE, Spindler KR & Carayanniotis G. Involvement of epitope mimicry in potentiation but not initiation of autoimmune disease. *J Immunol* 1999, **162**: 5888-5893.
- 134 Burch HB, Nagy EV, Lukes YG, Cai WY, Wartofsky L & Burman KD. Nucleotide and amino acid homology between the human thyrotropin receptor and the HIV-1 Nef protein: identification and functional analysis. *Biochem Biophys Res Commun* 1991, **181**: 498-505.
- 135 Lymberi P & Philippou G. Thyroid autoimmunity. Autoantigens, autoantibodies, autoreactive T-lymphocytes, pathogenesis. *Archives of Hellenic Medicine* 1999, **16**: 337-351.
- 136 Heufelder A.E., Joba W & Morgenthaler NG. Autoimmunity involving the human sodium/iodide symporter: fact or fiction? *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2001, **109**: 35-40.
- 137 Seissler J, Wagner S, Schott M, Lettmann M, Feldkamp J, Scherbaum W.A. & Morgenthaler NG. Low frequency of autoantibodies to the human Na(+)/I(-) symporter in patients with autoimmune thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2000, **85**: 4630-4634.
- 138 Kimura S, Kotani T, McBride O.W., Umeki K, Hirai K, Nakayama T & Ohtaki S. Human thyroid peroxidase: complete cDNA and protein sequence, chromosome mapping, and identification of two alternately spliced mRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987, **84**: 5555-5559.
- 139 Ruf J, Czarnocka B, Ferrand M, Doullais F & Carayon P. Novel routine assay of thyroperoxidase autoantibodies. *Clin Chem* 1988, **34**: 2231-2234.
- 140 Kaufman KD, Filetti S, Seto P & Rapoport B. Recombinant human thyroid peroxidase generated in eukaryotic cells: a source of specific antigen for the immunological assay of antimicrosomal antibodies in the



sera of patients with autoimmune thyroid disease. J Clin Endocrinol Metab 1990, **70**: 724-728.

- 141 Dorrington KJ & Munro DS. The long-acting thyroid stimulator. Clin Pharmacol Ther 1966, **7**: 788-806.
- 142 Vitti P, Valente WA, Ambesi-Impiombato FS, Fenzi GF, Pinchera A & Kohn LD. Graves' IgG stimulation of continuously cultured rat thyroid cells: a sensitive and potentially useful clinical assay. J Endocrinol Invest 1982, **5**: 179-182.
- 143 Southgate K, Creagh F, Teece M, Kingswood C & Rees SB. A receptor assay for the measurement of TSH receptor antibodies in unextracted serum. Clin Endocrinol (Oxf) 1984, **20**: 539-548.
- 144 Crèagh F, Teece M, Williams S, Didcote S, Perkins W, Hashim F & Rees SB. An analysis of thyrotrophin receptor binding and thyroid stimulating activities in a series of Graves' sera. Clin Endocrinol (Oxf) 1985, **23**: 395-404.
- 145 Bigazzi PE and Rose NR. Autoimmune thyroid disease. In: Rose, N. R. and Mackay, I. R., eds. The Autoimmune Diseases. London: Academic Press Inc, 1985:161-199.
- 146 McCoy JP, Michaelson JH & Bigazzi PE. Anti-idiotypic immunity and autoimmunity: III. Investigations in human autoimmune thyroiditis. Life Sci 1983, **32**: 109-118.
- 147 Vanderpump MP, Tunbridge WM, French JM *et al.* The incidence of thyroid disorders in the community: a twenty-year follow-up of the Wickham Survey. Clin Endocrinol (Oxf) 1995, **43**: 55-68.
- 148 Tomer Y. Anti-thyroglobulin autoantibodies in autoimmune thyroid diseases: cross-reactive or pathogenic? Clin Immunol Immunopathol 1997, **82**: 3-11.
- 149 Hayashi Y, Tamai H, Fukata S, Hirota Y, Katayama S, Kuma K, Kumagai LF & Nagataki S. A long term clinical, immunological, and histological follow-up study of patients with goitrous chronic lymphocytic thyroiditis. J Clin Endocrinol Metab 1985, **61**: 1172-1178.
- 150 Weetman AP & Cohen S. The IgG subclass distribution of thyroid autoantibodies. Immunol Lett 1986, **13**: 335-341.
- 151 Weetman AP, Black CM, Cohen SB, Tomlinson R, Banga JP & Reimer CB. Affinity purification of IgG subclasses and the distribution of thyroid

auto-antibody reactivity in Hashimoto's thyroiditis. *Scand J Immunol* 1989, **30**: 73-82.

- 152 Bogner U, Hegedus L, Hansen JM, Finke R & Schleusener H. Thyroid cytotoxic antibodies in atrophic and goitrous autoimmune thyroiditis. *Eur J Endocrinol* 1995, **132**: 69-74.
- 153 Cohn M. In: Kaplan, J. G., Green, D. R., and Bleakley, R. C., eds. *Cellular Basis of Immune Modulation*. New York: Alan Liss, 1989:11-
- 154 Dai Y, Carayanniotis KA, Eliades P, Lymberi P, Shepherd P, Kong Y & Carayanniotis G. Enhancing or suppressive effects of antibodies on processing of a pathogenic T cell epitope in thyroglobulin. *J Immunol* 1999, **162**: 6987-6992.
- 155 Carayanniotis G & Kong YC. Pathogenic thyroglobulin peptides as model antigens: insights on the induction and maintenance of autoimmune thyroiditis. *Int Rev Immunol* 2000, **19**: 557-572.
- 156 Sakata S, Nakamura S, Komaki T & Miura K. Production of anti-human thyroglobulin and anti-thyroid hormone antibodies in rabbits immunized with human thyroglobulin. *Endocrinol Jpn* 1985, **32**: 65-72.
- 157 Aihara Y, Sakata S, Nakamura S, Kamikubo K, Tarutani O, Yamada S, Tadokoro I & Okuda K. Genetic control of mouse antibody production to human thyroglobulin. *J Immunogenet* 1983, **10**: 325-331.
- 158 Torrigiani G, Roitt IM & Doniach D. Quantitative distribution of human thyroglobulin autoantibodies in different immunoglobulin classes. *Clin Exp Immunol* 1968, **3**: 621-630.
- 159 Caturegli P, Kuppers RC, Mariotti S, Burek CL, Pinchera A, Ladenson PW & Rose NR. IgG subclass distribution of thyroglobulin antibodies in patients with thyroid disease. *Clin Exp Immunol* 1994, **98**: 464-469.
- 160 Hay FC & Torrigiani G. The distribution of anti-thyroglobulin antibodies in the immunoglobulin G subclasses. *Clin Exp Immunol* 1973, **15**: 517-521.
- 161 Spiegelberg HL. Biological activities of immunoglobulins of different classes and subclasses. *Adv Immunol* 1974, **19**: 259-294.
- 162 Parkes AB, McLachlan SM, Bird P & Rees SB. The distribution of microsomal and thyroglobulin antibody activity among the IgG subclasses. *Clin Exp Immunol* 1984, **57**: 239-243.



- 163 Davies TF, Weber CM, Wallack P & Platzer M. Restricted heterogeneity and T cell dependence of human thyroid autoantibody immunoglobulin G subclasses. *J Clin Endocrinol Metab* 1986, **62**: 945-949.
- 164 Naito N, Saito K, Hosoya T *et al*. Anti-thyroglobulin autoantibodies in sera from patients with chronic thyroiditis and from healthy subjects: differences in cross-reactivity with thyroid peroxidase. *Clin Exp Immunol* 1990, **80**: 4-10.
- 165 Ruf J, Ferrand M, Durand-Gorde JM, De Micco C & Carayon P. Significance of thyroglobulin antibodies cross-reactive with thyroperoxidase (TGPO antibodies) in individual patients and immunized mice. *Clin Exp Immunol* 1993, **92**: 65-72.
- 166 Estienne V, Duthoit C, Costanzo VD *et al*. Multicenter study on TGPO autoantibody prevalence in various thyroid and non-thyroid diseases, relationships with thyroglobulin and thyroperoxidase autoantibody parameters. *Eur J Endocrinol* 1999, **141**: 563-569.
- 167 Ruf J, Ferrand M, Durand-Gorde JM & Carayon P. Immunopurification and characterization of thyroid autoantibodies with dual specificity for thyroglobulin and thyroperoxidase. *Autoimmunity* 1992, **11**: 179-188.
- 168 Kohno Y, Naito N, Hiyama Y *et al*. Thyroglobulin and thyroid peroxidase share common epitopes recognized by autoantibodies in patients with chronic autoimmune thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab* 1988, **67**: 899-907.
- 169 Henry M, Zanelli E & Malthiery Y. Anti-human thyroid peroxidase and anti-human thyroglobulin antibodies present no cross-reactivity on recombinant peptides. *Clin Exp Immunol* 1991, **86**: 478-482.
- 170 Nishikawa T, Jaume JC, McLachlan SM & Rapoport B. Human monoclonal autoantibodies against the immunodominant region on thyroid peroxidase: lack of cross-reactivity with related peroxidases or thyroglobulin and inability to inhibit thyroid peroxidase enzymatic activity. *J Clin Endocrinol Metab* 1995, **80**: 1461-1466.
- 171 Ruf J, Ferrand M, Durand-Gorde JM & Carayon P. Autoantibodies and monoclonal antibodies directed to an immunodominant antigenic region of thyroglobulin interact with thyroperoxidase through an interspecies idiotypic. *Autoimmunity* 1994, **19**: 55-62.
- 172 Villa M, Durand-Gorde JM, Carayon P & Ruf J. Idiotypic study of a bispecific thyroglobulin and thyroperoxidase monoclonal antibody. *J Autoimmun* 1996, **9**: 653-660.

- 173 Duthoit C, Estienne V, Durand-Gorde JM, Carayon P & Ruf J. Thyroglobulin monoclonal antibody cross-reacting with thyroperoxidase induces in syngeneic mice anti-idiotypic monoclonal antibodies with dual autoantigen binding properties. The intertope hypothesis. *Eur J Immunol* 1999, **29**: 1626-1634.
- 174 McLachlan SM & Rapoport B. Evidence for a potential common T-cell epitope between human thyroid peroxidase and human thyroglobulin with implications for the pathogenesis of autoimmune thyroid disease. *Autoimmunity* 1989, **5**: 101-106.
- 175 Rothbard JB & Taylor WR. A sequence pattern common to T cell epitopes. *EMBO J* 1988, **7**: 93-100.
- 176 Ludgate M, Swillens S, Mercken L & Vassart G. Homology between thyroglobulin and acetylcholinesterase: an explanation for pathogenesis of Graves' ophthalmopathy? *Lancet* 1986, **2**: 219-220.
- 177 Mappouras DG, Philippou G, Haralambous S, Tzartos SJ, Balafas A, Souvatzoglou A & Lymberi P. Antibodies to acetylcholinesterase cross-reacting with thyroglobulin in myasthenia gravis and Graves' disease. *Clin Exp Immunol* 1995, **100**: 336-343.
- 178 Ludgate M, Dong Q, Dreyfus PA, Zakut H, Taylor P, Vassart G & Soreq H. Definition, at the molecular level, of a thyroglobulin-acetylcholinesterase shared epitope: study of its pathophysiological significance in patients with Graves' ophthalmopathy. *Autoimmunity* 1989, **3**: 167-176.
- 179 Salvi M, Miller A & Wall JR. Human orbital tissue and thyroid membranes express a 64 kDa protein which is recognized by autoantibodies in the serum of patients with thyroid-associated ophthalmopathy. *FEBS Lett* 1988, **232**: 135-139.
- 180 Wall JR, Hayes M, Scalise D, Stolarski C, Nebes V, Kiljanski J, Salvi M & Sato M. Native gel electrophoresis and isoelectric focusing of a 64-kilodalton eye muscle protein shows that it is an important target for serum autoantibodies in patients with thyroid-associated ophthalmopathy and not expressed in other skeletal muscle. *J Clin Endocrinol Metab* 1995, **80**: 1226-1232.
- 181 Gunji K, Kubota S, Swanson J, Kiljanski J, Bednarczuk T, Wengrowicz S, Salvi M & Wall JR. Role of the eye muscles in thyroid eye disease: identification of the principal autoantigens. *Thyroid* 1998, **8**: 553-556.



- 182 Ludgate M, Crisp M, Lane C, Costagliola S, Vassart G, Weetman A, Daunerie C & Many MC. The thyrotropin receptor in thyroid eye disease. *Thyroid* 1998, **8**: 411-413.
- 183 Lazarus JH, Hall R, Othman S, Parkes AB, Richards CJ, McCulloch B & Harris B. The clinical spectrum of postpartum thyroid disease. *QJM* 1996, **89**: 429-435.
- 184 Belyavin G & Trotter wr. Investigations of thyroid antigens reacting with Hashimoto sera. *Lancet* 1959, **i**: 648-652.
- 185 Jansson R, Thompson PM, Clark F & McLachlan SM. Association between thyroid microsomal antibodies of subclass IgG-1 and hypothyroidism in autoimmune postpartum thyroiditis. *Clin Exp Immunol* 1986, **63**: 80-86.
- 186 Bogner U, Schleusener H & Wall JR. Antibody-dependent cell mediated cytotoxicity against human thyroid cells in Hashimoto's thyroiditis but not Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1984, **59**: 734-738.
- 187 Kohno Y, Yamaguchi F, Saito K, Niimi H, Nishikawa T & Hosoya T. Anti-thyroid peroxidase antibodies in sera from healthy subjects and from patients with chronic thyroiditis: differences in the ability to inhibit thyroid peroxidase activities. *Clin Exp Immunol* 1991, **85**: 459-463.
- 188 Saller B, Hormann R & Mann K. Heterogeneity of autoantibodies against thyroid peroxidase in autoimmune thyroid disease: evidence against antibodies directly inhibiting peroxidase activity as regulatory factors in thyroid hormone metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 1991, **72**: 188-195.
- 189 Benker G, Kotulla P, Kendall-Taylor P, Emrich D & Reinwein D. TSH binding-inhibiting antibodies in hyperthyroidism: relationship to clinical signs and hormone levels. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1989, **30**: 19-28.
- 190 McKenzie JM & Zakarija M. The clinical use of thyrotropin receptor antibody measurements. *J Clin Endocrinol Metab* 1989, **69**: 1093-1096.
- 191 McGregor AM. Autoantibodies to the TSH receptor in patients with autoimmune thyroid disease. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1990, **33**: 683-685.
- 192 Valente WA, Vitti P, Yavin Z, Yavin E, Rotella CM, Grollman EF, Toccafondi RS & Kohn LD. Monoclonal antibodies to the thyrotropin receptor: stimulating and blocking antibodies derived from the lymphocytes of patients with Graves disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982, **79**: 6680-6684.



- 193 Kraiem Z, Baron E, Kahana L, Sadeh O & Sheinfeld M. Changes in stimulating and blocking TSH receptor antibodies in a patient undergoing three cycles of transition from hypo to hyper-thyroidism and back to hypothyroidism [see comments]. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1992, **36**: 211-214.
- 194 Sakata S. Autoimmunity against thyroid hormones. *Crit Rev Immunol* 1994, **14**: 157-191.
- 195 Sakata S, Matsuda M, Ogawa T, Takuno H, Matsui I, Sarui H & Yasuda K. Prevalence of thyroid hormone autoantibodies in healthy subjects. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1994, **41**: 365-370.
- 196 Benvenga S, Trimarchi F & Robbins J. Circulating thyroid hormone autoantibodies. *J Endocrinol Invest* 1987, **10**: 605-619.
- 197 Ogawa T, Sakata S, Nakamura S, Takuno H, Matsui I, Sarui H & Yasuda K. Thyroid hormone autoantibodies in patients with Graves' disease: effect of anti-thyroid drug treatment. *Clin Chim Acta* 1994, **228**: 113-122.
- 198 Sakata S, Nakamura S, Shima H, Komaki T, Tarutani O & Miura K. Investigations on the mechanism(s) of the production of anti-thyroid hormone antibodies 3. Production of anti-rabbit thyroglobulin and anti-thyroid hormone antibodies in rabbits immunized with rabbit thyroglobulin. *Nippon Naibunpi Gakkai Zasshi* 1984, **60**: 814-821.
- 199 Erregragui K, Cheillan F, Defoort JP, Prato S & Fert V. Autoantibodies to thyroid hormones: the role of thyroglobulin. *Clin Exp Immunol* 1996, **105**: 140-147.
- 200 Sakata S, Nakamura S & Miura K. Autoantibodies against thyroid hormones or iodothyronine. Implications in diagnosis, thyroid function, treatment, and pathogenesis. *Ann Intern Med* 1985, **103**: 579-589.
- 201 Sakata S, Komaki T, Ogawa T *et al.* Evaluation of thyroid function in patients with thyroid hormone autoantibodies. *Clin Chim Acta* 1993, **219**: 23-34.
- 202 Sakata S, Nakamura S, Kojima N, Okuyama M, Miura K, Tarutani O, Aihara Y & Okuda K. Investigations on the mechanism(s) of the production of anti-thyroid hormone antibodies. 1. Anti-thyroid hormone antibodies in rabbits and mice immunized with human thyroglobulin. *Nippon Naibunpi Gakkai Zasshi* 1983, **59**: 64-71.
- 203 Sakata S, Okuda K, Aihara Y, Tanaka Y, Nakamura S, Komaki T, Tarutani O & Miura K. Genetic control of the production of anti-thyroid



hormone antibodies in mice immunized with human thyroglobulin.
Immunol Invest 1986, **15**: 481-492.

- 204 Savin S, Sofronic L & Sinadinovic J. Occurrence of antithyroxine antibodies in rabbits immunized with iodine-poor human thyroglobulin. Exp Clin Endocrinol 1990, **95**: 375-383.
- 205 Heidelberger M. The molecular composition of immune precipitates from rabbit sera. J Am Chem Soc 1938, **60**: 242-
- 206 Nye L, Pontes de Carvalho LC & Roitt IM. Restrictions in the response to autologous thyroglobulin in the human. Clin Exp Immunol 1980, **41**: 252-263.
- 207 Bouanani M, Piechaczyk M, Pau B & Bastide M. Significance of the recognition of certain antigenic regions on the human thyroglobulin molecule by natural autoantibodies from healthy subjects. J Immunol 1989, **143**: 1129-1132.
- 208 Piechaczyk M, Bouanani M, Salhi SL, Baldet L, Bastide M, Pau B & Bastide JM. Antigenic domains on the human thyroglobulin molecule recognized by autoantibodies in patients' sera and by natural autoantibodies isolated from the sera of healthy subjects. Clin Immunol Immunopathol 1987, **45**: 114-121.
- 209 Bresler HS, Burek CL, Hoffman WH & Rose NR. Autoantigenic determinants on human thyroglobulin. Clin Immunol Immunopathol 1990, **54**: 76-86.
- 210 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**: 41-49.
- 211 Gleason SL, Gearhart P, Rose NR & Kuppers RC. Autoantibodies to thyroglobulin are encoded by diverse V-gene segments and recognize restricted epitopes. J Immunol 1990, **145**: 1768-1775.
- 212 Male DK, Champion BR, Pryce G, Matthews H & Shepherd P. Antigenic determinants of human thyroglobulin differentiated using antigen fragments. Immunology 1985, **54**: 419-427.
- 213 Dong Q, Ludgate M & Vassart G. Towards an antigenic map of human thyroglobulin: identification of ten epitope-bearing sequences within the primary structure of thyroglobulin. J Endocrinol 1989, **122**: 169-176.

- 214 Ludgate M, Dong Q, Soreq H, Mariotti S & Vassart G. The pathophysiological significance of a thyroglobulin-acetylcholinesterase shared epitope in patients with Graves' ophthalmopathy. *Acta Endocrinologica* 1989, **121(Suppl.2)**: 38-45.
- 215 Henry M, Malthiery Y, Zanelli E & Charvet B. Epitope mapping of human thyroglobulin. *J Immunol* 1990, **145**: 3692-3698.
- 216 Henry M, Zanelli E, Piechaczyk M, Pau B & Malthiery Y. A major human thyroglobulin epitope defined with monoclonal antibodies is mainly recognized by human autoantibodies. *Eur J Immunol* 1992, **22**: 315-319.
- 217 Saboori AM, Rose NR, Yuhasz SC, Amzel LM & Burek CL. Peptides of human thyroglobulin reactive with sera of patients with autoimmune thyroid disease. *J Immunol* 1999, **163**: 6244-6250.
- 218 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, **98**: 459-463.
- 219 Saboori AM, Rose NR & Burek CL. Amino acid sequence of a tryptic peptide of human thyroglobulin reactive with sera of patients with thyroid diseases. *Autoimmunity* 1995, **22**: 87-94.
- 220 Prentice L, Kiso Y, Fukuma N *et al.* Monoclonal thyroglobulin autoantibodies: variable region analysis and epitope recognition. *J Clin Endocrinol Metab* 1995, **80**: 977-986.
- 221 Duthoit C, Estienne V, Delom F, Durand-Gorde JM, Mallet B, Carayon P & Ruf J. Production of immunoreactive thyroglobulin C-terminal fragments during thyroid hormone synthesis. *Endocrinology* 2000, **141**: 2518-2525.
- 222 Romball CG & Weigle WO. Transfer of experimental autoimmune thyroiditis with T cell clones. *J Immunol* 1987, **138**: 1092-1098.
- 223 Chronopoulou E & Carayanniotis G. Identification of a thyroiditogenic sequence within the thyroglobulin molecule. *J Immunol* 1992, **149**: 1039-1044.
- 224 Balasa B & Carayanniotis G. Induction of experimental autoimmune thyroiditis in rats with the synthetic peptide (2495-2511) of thyroglobulin. *Cell Immunol* 1993, **148**: 259-268.



- 225 Chronopoulou E, Michalak TI & Carayanniotis G. Autoreactive IgG elicited in mice by the non-dominant but pathogenic thyroglobulin peptide (2495-2511): implications for thyroid autoimmunity. Clin Exp Immunol 1994, **98**: 89-94.
- 226 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**: 352-359.
- *227 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**: 3405-3411.
- 228 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**: 235-239.
- 229 Tajiri J, Higashi K, Morita M, Umeda T & Sato T. Studies of hypothyroidism in patients with high iodine intake. J Clin Endocrinol Metab 1986, **63**: 412-417.
- 230 Braverman LE. Effects of iodine on thyroid function in man. Trans Am Clin Climatol Assoc 1990, **102**: 143-151.
- 231 Kinalska I, Zarzycki W, Krawezuk I, Gosiewska A, Gorska M & Zonenberg A. Antithyroid autoantibodies in the examined population with iodine prophylaxis after the Chernobyl catastrophe. Horm Metab Res 1991, **23**: 236-238.
- 232 Bagchi N, Brown TR, Urdanivia E & Sundick RS. Induction of autoimmune thyroiditis in chickens by dietary iodine. Science 1985, **230**: 325-327.
- 233 Sundick RS, Herdegen DM, Brown TR & Bagchi N. The incorporation of dietary iodine into thyroglobulin increases its immunogenicity. Endocrinology 1987, **120**: 2078-2084.
- 234 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, **118**: 1977-1981.
- 235 Allen EM & Braverman LE. The effect of iodine on lymphocytic thyroiditis in the thymectomized buffalo rat. Endocrinology 1990, **127**: 1613-1616.

- 236 Rasooly L, Burek CL & Rose NR. Iodine-induced autoimmune thyroiditis in NOD-H-2h4 mice. *Clin Immunol Immunopathol* 1996, **81**: 287-292.
- 237 Champion BR, Page KR, Parish N *et al.* Identification of a thyroxine-containing self-epitope of thyroglobulin which triggers thyroid autoreactive T cells. *J Exp Med* 1991, **174**: 363-370.
- 238 Hutchings PR, Cooke A, Dawe K, Champion BR, Geysen M, Valerio R & Roitt IM. A thyroxine-containing peptide can induce murine experimental autoimmune thyroiditis. *J Exp Med* 1992, **175**: 869-872.
- 239 Dunn JT, Kim PS, Dunn AD, Heppner DG, Jr. & Moore RC. The role of iodination in the formation of hormone-rich peptides from thyroglobulin. *J Biol Chem* 1983, **258**: 9093-9099.
- 240 Saboori AM, Rose NR, Bresler HS, Vladut-Talor M & Burek CL. Iodination of human thyroglobulin (Tg) alters its immunoreactivity. I. Iodination alters multiple epitopes of human Tg. *Clin Exp Immunol* 1998, **113**: 297-302.
- 241 Saboori AM, Rose NR & Burek CL. Iodination of human thyroglobulin (Tg) alters its immunoreactivity. II. Fine specificity of a monoclonal antibody that recognizes iodinated Tg. *Clin Exp Immunol* 1998, **113**: 303-308.
- 242 Werner SC. Modification of the classification of the eye changes of Graves' disease: recommendations of the Ad Hoc Committee of the American Thyroid Association. *J Clin Endocrinol Metab* 1977, **44**: 203-204.
- 243 Werner S. Modifications of classification of the eye changes of Graves' disease. *American Journal of Ophthalmology* 1977, **83**: 725-727.
- 244 Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970, **227**: 680-685.
- 245 Schardt CW, McLachlan SM, Matheson J & Smith BR. An enzyme-linked immunoassay for thyroid microsomal antibodies. *J Immunol Methods* 1982, **55**: 155-168.
- 246 Palumbo G, Tecce MF & Ambrosio G. A nonincinerative rate-sensing method for the determination of iodine in iodoproteins. *Anal Biochem* 1982, **123**: 183-189.



- 247 Saboori AM, Rose NR, Butscher WG & Burek CL. Modification of a nonincinerative method for determination of iodine in iodoproteins. *Anal Biochem* 1993, **214**: 335-338.
- 248 Taylor RS & Weeds AG. The magnesium-ion-dependent adenosine triphosphatase of bovine cardiac Myosin and its subfragment-1. *Biochem J* 1976, **159**: 301-315.
- 249 Spudis JA & Watt S. The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. *J Biol Chem* 1971, **246**: 4866-4871.
- 250 Weisenberg RC. Microtubule formation in vitro in solutions containing low calcium concentrations. *Science* 1972, **177**: 1104-1105.
- 251 Merrifield RB. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *JACS* 1963, **85**: 2149-2154.
- 252 Geysen HM, Rodda SJ, Mason TJ, Tribbick G & Schoofs PG. Strategies for epitope analysis using peptide synthesis. *J Immunol Methods* 1987, **102**: 259-274.
- 253 Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976, **72**: 248-254.
- 254 Janin J. Surface and inside volumes in globular proteins. *Nature* 1979, **277**: 491-492.
- 255 Bhaskaran R & Ponnuswamy PK. Dynamics of amino acid residues in globular proteins. *Int J Pept Protein Res* 1984, **24**: 180-191.
- 256 Deleage G & Roux B. An algorithm for protein secondary structure prediction based on class prediction. *Protein Eng* 1987, **1**: 289-294.
- 257 Raves ML, Harel M, Pang YP, Silman I, Kozikowski AP & Sussman JL. Structure of acetylcholinesterase complexed with the nootropic alkaloid, (-)-huperzine A. *Nat Struct Biol* 1997, **4**: 57-63.
- 258 Avrameas S. Natural autoantibodies: from 'horror autotoxicus' to 'gnothi seauton'. *Immunol Today* 1991, **12**: 154-159.
- 259 Dighiero G, Lymberi P, Mazie JC, Rouyre S, Butler-Browne GS, Whalen RG & Avrameas S. Murine hybridomas secreting natural monoclonal antibodies reacting with self antigens. *J Immunol* 1983, **131**: 2267-2272.

- 260 Avrameas S, Dighiero G, Lymberi P & Guilbert B. Studies on natural antibodies and autoantibodies. *Ann Immunol (Paris)* 1983, **134D**: 103-113.
- 261 Dighiero G, Lymberi P, Holmberg D, Lundquist I, Coutinho A & Avrameas S. High frequency of natural autoantibodies in normal newborn mice. *J Immunol* 1985, **134**: 765-771.
- 262 Karray S, Lymberi P, Avrameas S & Coutinho A. Quantitative evidence against inactivation of self-reactive B-cell clones. *Scand J Immunol* 1986, **23**: 475-480.
- 263 Lymberi P, Blancher A, Calvas P & Avrameas S. Natural autoantibodies in nude and normal outbred (Swiss) and inbred (BALB/c) mice. *J Autoimmun* 1989, **2**: 283-295.
- 264 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**: 2779-2787.
- 265 Elkon KB. Use of synthetic peptides for the detection and quantification of autoantibodies. *Mol Biol Rep* 1992, **16**: 207-212.
- 266 Tzioufas AG, Yiannaki E, Sakarellos-Daitsiotis M, Routsias JG, Sakarellos C & Moutsopoulos HM. Fine specificity of autoantibodies to La/SSB: epitope mapping, and characterization. *Clin Exp Immunol* 1997, **108**: 191-198.
- 267 Weetman AP, Tse CK, Randall WR, Tsim KW & Barnard EA. Acetylcholinesterase antibodies and thyroid autoimmunity. *Clin Exp Immunol* 1988, **71**: 96-99.
- 268 Dreyfus P, Zevin-Sonkin D, Seidman S, Prody C, Zisling R, Zakut H & Soreq H. Cross-homologies and structural differences between human cholinesterases revealed by antibodies against cDNA-produced human butyrylcholinesterase peptides. *J Neurochem* 1988, **51**: 1858-1867.
- 269 Jacobson DH & Gorman CA. Endocrine ophthalmopathy: current ideas concerning etiology, pathogenesis, and treatment. *Endocr Rev* 1984, **5**: 200-220.
- 270 Schultz RO, Van Allen MW & Blodi FC. Endocrine ophthalmologia: an electromyographic study of parietic extra-ocular muscles. *Arch Ophthalmol* 1960, **63**: 217-227.



- 271 Christensen PB, Jensen TS, Tsiropoulos I, Sorensen T, Kjaer M, Hojer-Pedersen E, Rasmussen MJ & Lehfeldt E. Associated autoimmune diseases in myasthenia gravis. A population-based study. *Acta Neurol Scand* 1995, **91**: 192-195.
- 272 Tam JP. Immunization with peptide-carrier complexes: traditional and multiple-antigen peptide systems. In: Wisdom, G. B., eds. *Peptide antigens. A practical approach*. New York: Oxford University Press, 1994:83-115.
- 273 Austyn JM and Wood KJ. B-cells and antibody responses. *Principles of Cellular and Molecular Immunology*. New York: Oxford University Press, 1993:437-498.
- 274 Tam JP. Synthetic peptide vaccine design: synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988, **85**: 5409-5413.
- 275 Tsikaris V, Sakarellos C, Cung MT, Marraud M & Sakarellos-Daitsiotis M. Concept and design of a new class of sequential oligopeptide carriers (SOC) for covalent attachment of multiple antigenic peptides. *Biopolymers* 1996, **38**: 291-293.
- 276 Deshmukh US, Lewis JE, Gaskin F, Dhakephalkar PK, Kannapell CC, Waters ST & Fu SM. Ro60 peptides induce antibodies to similar epitopes shared among lupus-related autoantigens. *J Immunol* 2000, **164**: 6655-6661.
- 277 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, **181**: 453-461.
- 278 Yiannaki E, Vlachoyiannopoulos PG, Manoussakis MN, Sakarellos C, Sakarellos-Daitsiotis M, Moutsopoulos HM & Tzioufas AG. Study of antibody and T cell responses in rabbits immunized with synthetic human B cell epitope analogues of La (SSB) autoantigen. *Clin Exp Immunol* 2000, **121**: 551-556.
- 279 Vlase H, Nakashima M, Graves PN, Tomer Y, Morris JC & Davies TF. Defining the major antibody epitopes on the human thyrotropin receptor in immunized mice: evidence for intramolecular epitope spreading. *Endocrinology* 1995, **136**: 4415-4423.
- 280 Vanderlugt CJ & Miller SD. Epitope spreading. *Curr Opin Immunol* 1996, **8**: 831-836.

- 281 Mamula MJ & Janeway CA, Jr. Do B cells drive the diversification of immune responses? *Immunol Today* 1993, **14**: 151-152.
- 282 Lanzavecchia A. Receptor-mediated antigen uptake and its effect on antigen presentation to class II-restricted T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 1990, **8**: 773-793.
- 283 Dighiero G, Guilbert B, Ferman J.P., Lymberi P, Danon F & Avrameas S. Thirty-six human monoclonal immunoglobulins with antibody activity against cytoskeleton proteins, thyroglobulin, and native DNA: immunologic studies and clinical correlations. *Blood* 1983, **62**: 264-270.
- 284 Dighiero G, Lymberi P, Guilbert B, Ternynck T & Avrameas S. Natural autoantibodies constitute a substantial part of normal circulating immunoglobulins. *Ann N Y Acad Sci* 1986, **475**:135-45.: 135-145.
- 285 Payelle-Brogard B, Ternynck T, Guilbert B & Avrameas S. Anti-tubulin antibodies in rabbits before and after immunization with pig tubulin. *Mol Immunol* 1989, **26**: 121-128.

