

Dottorato di Ricerca in Scienze per la Salute

XXIII ciclo

A.A 2007-2010

Università degli Studi del Molise
Dipartimento di Scienze per la Salute

Tesi di Dottorato

**INTERAZIONE COSTIMOLATORIA TRA UNITÀ CONDROITIN
6-SOLFATO DELLA TIREOGLOBULINA UMANA E CD44 ALLA
SUPERFICIE DELLE CELLULE T CD4⁺ NELLA TIROIDITE
AUTOIMMUNE SPERIMENTALE**

Dott. Giovanni Paolo Cetrangolo

Settore scientifico disciplinare : MED/04

Coordinatore

Ch.mo Prof. Guido Grasso

Relatore

Ch.mo Prof. Fabrizio Gentile

INDICE

Sommario	pag 4
1 INTRODUZIONE	pag 7
La Tireoglobulina	pag 7
1.2 La Tiroidite Autoimmune Sperimentale (EAT)	pag 7
1.3 Struttura e funzione della Tireoglobulina	pag 10
1.3.1. Il gene della Tireoglobulina ed il suo prodotto	pag 10
1.3.2. Modificazioni post-traduzionali della hTg: glicosilazione	pag 11
1.3.3. Modificazioni post-traduzionali della hTg: iodinazione ed ormonogenesi	pag 13
1.3.4. Unità oligosaccaridica condroitin 6-solfato (C6S)	pag 14
1.4 Effetti dei proteoglicani condroitin solfato	pag 16
1.5 Coinvolgimento dell'unità C6S nella Tiroidite Autoimmune sperimentale	pag 20
1.6 CD44: gene, struttura e funzione	pag 24
2 MATERIALI E METODI	pag 31
2.1 Purificazione della hTg	pag 31
2.2 Purificazione della hTgCS dalla hTgCS₀	pag 32
2.3 Purificazione del glicopeptide hTgCSgp	pag 33
2.4 Coniugazione del glicopeptide hTgCSgp con sulfo-NHS -LC-Biotin	pag 34
2.5 Ossidazione del glicopeptide biotinilato e cross linking con <i>p-Azidobenzoyl hydrazide</i>	pag 35
2.6 Induzione della EAT	pag 36
2.7 Valutazione della EAT	pag 36
2.8 Dosaggio di T3 e T4 dai sieri dei topi	pag 37
2.9 Saggio di proliferazione linfocitaria	pag 37
2.10 Saggio del pattern TH1/TH2 della secrezione delle citochine	pag 38
2.11 Dosaggio degli anticorpi del siero	pag 39
2.12 Purificazione delle cellule T CD4⁺	pag 40
2.13 Legame del glicopeptide hTgCSgp modificato alla superficie dei linfociti T CD4⁺ e immunoprecipitazione	pag 41
2.14 SDS PAGE e western blot	pag 43
2.15 Microscopia confocale	pag 45
3 RISULTATI E DISCUSSIONE	pag 47
3.1 Valutazione istologica e biochimica della EAT	pag 47
3.2 Risposte proliferative secondarie degli splenociti murini	pag 50
3.3 Saggio della produzione di citochine nelle risposte	

	proliferative secondarie	pag 51
3.4	Produzione di anticorpi contro gli antigeni hTgCS ed hTgCS₀	pag 59
3.5	Risposte proliferative secondarie dei linfociti T CD4⁺ all'hTgCS, hTgCS₀ ed al glicopeptide hTgCSgp	pag 64
3.6	Identificazione del recettore di membrana delle cellule T CD4⁺ murine interagente con hTgCSgp	pag 68
3.7	Microscopia confocale	pag 70
4	Conclusione	pag 74
5	Bibliografia	pag 81
6	Abbreviazioni	pag 92
7	Ringraziamenti	pag 94

Sommario

Nel nostro laboratorio abbiamo in passato riportato che l'immunizzazione di topi CBA/J(H-2k) con la frazione di hTg contenente condroitin 6-solfato (hTgCS) induceva tiroidite autoimmune sperimentale (EAT) in forma più grave, rispetto alla hTg priva di C6S (hTgCS₀). L'unità C6S stimolava la sensibilizzazione delle cellule T a epitopi comuni di hTgCS e hTgCS₀, poiché splenociti di topi immunizzati con hTgCS proliferavano meglio *in vitro*, in risposta ad entrambe le forme.

Allo scopo, quindi, di svelare i meccanismi molecolari della stimolazione, da parte dell'unità C6S della hTg, della sensibilizzazione delle cellule T CD4⁺ murine agli epitopi peptidici della hTg abbiamo sviluppato la nostra linea di ricerca utilizzando il seguente approccio sperimentale:

Topi CBA/J(H-2k) femmina sono stati immunizzati con hTgCS o hTgCS₀; dopo 30 giorni è stata valutata la proliferazione *in vitro* delle cellule T CD4⁺ in risposta a hTgCS, hTgCS₀ e al glicopeptide condroitinato purificato, hTgCSgp; hTgCSgp biotinilato, aggiunto alle cellule T CD4⁺, è stato legato al suo recettore(i) mediante two-step cross-linking con p-azidobenzoyl hydrazide (ABH); lisati di cellule T CD4⁺ sono stati sottoposti a SDS-PAGE e immunoblotting con anticorpi anti-biotina e cellule T CD4⁺ non lisate sono state analizzate in microscopia confocale con anticorpi anti-biotina e anti-CD44.

L'analisi dei dati ottenuti ha messo in evidenza interessanti risultati. La produzione delle citochine nelle risposte proliferative degli splenociti murini isolati ha evidenziato una polarizzazione in senso Th1 delle cellule T. La restimolazione *in vitro* delle cellule T CD4⁺ isolate con hTgCS e hTgCSgp, ma non hTgCS₀, è stata seguita da proliferazione,

ma solo nei topi immunizzati con hTgCS. Inoltre tali effetti non sembrano coinvolgere i TCR, giacchè la stimolazione con hTgCS o hTgCSgp, uniti ad anticorpi anti-CD3, stimola la proliferazione più di una dose submassimale di anticorpi anti-CD3 o della stimolazione con hTgCS0, unita ad anticorpi anti-CD3. I più alti indici di stimolazione delle cellule T CD4⁺ dei topi immunizzati con hTgCS suggeriscono che l'unità C6S, oltre a stimolare la sensibilizzazione delle cellule T naïve hTg-specifiche, possa aver agito anche esaltando la sensibilità delle cellule effettrici alla successiva riesposizione al C6S. La costimolazione da parte di hTgCS e hTgCSgp è risultata additiva con quella degli anticorpi anti-CD28, nei topi immunizzati con hTgCS. L'SDS-PAGE e l'immunoblotting con anticorpi anti-biotina dei lisati di cellule T CD4⁺ incubate con biotina-hTgCSgp e sottoposte a cross-linking con ABH ha rivelato una banda con massa apparente di 90 kDa, simile al CD44 riconosciuto dall'anticorpo monoclonale DF1485. La microscopia confocale delle cellule T CD4⁺ ha evidenziato 'merging' degli anticorpi anti-biotina e anti-CD44.

Si può concludere che la catena C6S associata con la frazione hTgCS e con il glicopeptide purificato hTgCSgp, aumenti la sensibilizzazione primaria delle cellule CD4⁺ hTg specifiche, promuovendo una co-stimolazione accessoria attraverso un recettore differente rispetto al CD28, la cui espressione e/o sensibilità risultano accresciute come conseguenza dell'esposizione di cellule T CD4⁺ hTg-specifiche all'unità C6S della hTg al momento della loro sensibilizzazione primaria.

Questo recettore è stato identificato nella molecola CD44.

Per il futuro ci proponiamo le seguenti finalità:

- stabilire il ruolo della variabilità nella lunghezza di catena dell'unità oligosaccaridica condroitin 6-solfato nell'efficienza di riconoscimento e legame

del recettore identificato;

-definire l'intervallo di normalità della percentuale di condroitinazione della hTg nella colloide tiroidea e nel siero;

-definire il ruolo del TSH nella condroitinazione della hTg ed il possibile significato patogenetico, nonché il possibile significato diagnostico/prognostico degli eventuali squilibri quali/quantitativi della condroitinazione della hTg.

1.INTRODUZIONE

1.1 La Tireoglobulina

La tireoglobulina umana (hTg) è una grossa glicoproteina omodimerica con una massa molecolare relativa di 660.000 dalton. Dopo essere stata sintetizzata ed assemblata in dimeri nel reticolo endoplasmatico e glicosilata nell'apparato del Golgi, è condensata in granuli secretori nel citoplasma apicale delle cellule follicolari tiroidee e secreta, attraverso un meccanismo regolato, nel lume dei follicoli tiroidei. La tireoglobulina è il sito molecolare della biosintesi degli ormoni tiroidei T3 e T4, sintetizzati attraverso la iodinazione ed il coupling di un piccolo specifico gruppo di residui tirosinici disposti all'interno della catena polipeptidica. L'hTg è considerata anche il più importante autoantigene coinvolto nella patogenesi dell' autoimmunità tiroidea (Gentile et al. 2004).

1.2 La Tiroidite autoimmune sperimentale (EAT)

La tiroidite autoimmune sperimentale (EAT), un modello murino di tiroidite di Hashimoto, può essere indotta in topi con aplotipo H-2^s e H-2^k del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) attraverso l'immunizzazione con Tg murina (mTg) oppure con hTg insieme con l'adiuvante di Freund (CFA) o con lipopolisaccaridi (*Rose et al., 1971*).

L'EAT è caratterizzata da un basso grado di infiltrazione della tiroide da parte

delle cellule mononucleate, dalla produzione di specifici anticorpi anti hTg anti mTg, e, *in vitro*, da una massiva proliferazione di cellule linfocitarie sensibilizzate contro la Tg. I linfociti CD4⁺ giocano un ruolo dominante in questa patologia (*Flynn et al., 1989*), in particolare è cruciale l'attività dei linfociti T helper CD4⁺ di tipo 1 (Th1). Il punto fondamentale rappresenta l'interazione tra il linfocita T helper CD4⁺ e l'autoantigene associato alle molecole del complesso MHC. Normalmente tale interazione non comporta un'attivazione linfocitaria perché i linfociti T helper CD4⁺ potenzialmente autoreattivi sono avulsi allo stimolo a causa della delezione clonale, dell'anergia cellulare o dell'inadeguata presentazione dell'antigene. In alcuni casi questo non accade provocando un livello di responsività anomalo verso l'autoantigene, questo probabilmente è dovuto ad anomalie che colpiscono la soglia di selezione positiva o negativa dei linfociti T helper CD4⁺ nel timo. Anticorpi anti hTg contribuiscono alla patogenesi dell'EAT. Infatti è stata riscontrata una correlazione selettiva tra EAT ed i livelli di un anticorpo monoclonale idiotipico (3B8G), che riconosce specifici frammenti triptici della Tg suina (pTg) (*Tange et al., 1990*). Inoltre alcuni anticorpi monoclonali murini facilitano l'internalizzazione *in vitro* della Tg da parte delle cellule B ibridoma, favorendo o sopprimendo la presentazione di epitopi patogenetici non dominanti 2549-2560 (*Dai et al., 1999*).

Lo sviluppo dell'EAT è influenzato dalle molecole H-2 del MHC (*Vladutiu, 1989; Beisel et al., 1982*). Il dominio H-2A del complesso H-2 è il più importante regolatore della suscettibilità all'EAT (*Beisel et al., 1982*), ma anche le regioni K e D sembrano coinvolte seppur in maniera minore (*Kong et al., 1979*). Evidentemente le molecole H-2 sono estremamente abili a presentare epitopi della tireoglobulina sia murina che umana.

La letteratura scientifica degli ultimi decenni dimostra quindi che gli elementi cellulari e molecolari coinvolti nell'instaurarsi di una condizione patologica quale quella osservata nell'EAT, sono soprattutto linfociti T CD4⁺, gli anticorpi anti-hTg e le molecole del MHC. Diversi lavori scientifici hanno documentato l'influenza delle catene oligosaccaridiche nella presentazione di antigeni glicoproteici da parte delle cellule presentanti l'antigene (APCs) (*Anderton, 2004; Glant et al., 1998*) e il loro coinvolgimento nella modulazione della risposta immune (*Naujokas e al., 1993; Toyama-Sorimachi et al., 1995*). Queste informazioni insieme ai documentati effetti sulla diversa suscettibilità alla proteolisi della regione carbossi-terminale dell'hTg condroitinata (*Gentile et al., 2004*) supportano l'ipotesi che le unità oligosaccaridiche di CS influenzano il processamento dell'hTg da parte delle APCs conferendo ad essa proprietà auto-antigeniche. Ancora, il CS potrebbe influenzare la capacità antigenica dell'hTg mediante un altro meccanismo. Infatti, una piccola percentuale delle catene invarianti (Ii) associate al complesso maggiore di istocompatibilità di tipo II, (MHC II) sono modificate con il CS a livello delle Ser291. Le catene invarianti contenenti CS (Ii-CS oppure CD74) sono trasportate rapidamente sulla superficie delle cellule APCs nonostante abbiano un segnale di localizzazione endosomiale. In questa forma, Ii-CS, rimane associata al MHC II sulla superficie delle cellule APCs (*Sant et al., 1985*) ed agisce come molecola accessoria nella presentazione dell'antigene attraverso l'interazione con la molecola CD44 (*Naujokas et al., 1993*). Infine non è da escludere l'interazione diretta tra le porzioni condroitinate dell'hTg e molecole di superficie coinvolte nell'attivazione delle cellule del sistema immunitario.

1.3 Struttura e funzione della tireoglobulina

1.3.1 Il gene della tireoglobulina ed il suo prodotto

Il gene dell'hTg è localizzato sul cromosoma 8 ed è uno dei più grandi geni conosciuti, essendo composto di 42 esoni ed estendendosi per più di 300 paia di chilobasi (*Bass et al, 1986*). Circa due terzi del gene, alla sua estremità amino-terminale, consistono di motivi ricchi di cisteina ripetuti in tandem di vario tipo. Probabilmente questa porzione del gene della hTg deriva dalla duplicazione di un'unità ancestrale fatta di quattro esoni. Successivamente eventi di crossing-over ineguale, la parziale "esonizzazione" degli stessi introni e la perdita di qualche altro introne, sembrano aver plasmato la presente struttura genica. La porzione carbossi-terminale della Tg è omologa al dominio acetilcolinesterasi e sembra abbia avuto origine dalla duplicazione di un gene ancestrale, in comune con una super-famiglia di esterasi (*Takagi et al. 1991; Krejci et al. 1991*). L'hTg, pertanto, appare composta di due metà, aventi diverse storie evolutive, entrambe le quali posseggono la capacità di sintetizzare ormoni.

La sequenza completa dell'mRNA dell'hTg è stata determinata sovrapponendo cloni di cDNA (*Malthiéry and Lissitzky, 1987*). Essa consiste di 8448 nucleotidi, che includono, rispettivamente, una regione non tradotta all'estremità 5', una cornice di lettura aperta e una regione non tradotta all'estremità 3' e codifica un polipeptide di 2767 amminoacidi. I primi 19 residui rappresentano una sequenza segnale idrofobica assente nella proteina matura, che alla fine risulta costituita di 2748 residui ed ha una Mr attesa di 302,773 dalton. Due terzi della sequenza dell'hTg dal lato amino-terminale consistono di motivi ripetuti in tandem. Il motivo di tipo 1 è lungo da 60 a 70

residui, contiene 6 residui di cisteina ed è ripetuto 10 volte. Il motivo di tipo 2 consiste di 14-17 aminoacidi, due dei quali sono cisteine, ed è ripetuto 3 volte nella parte centrale dell'hTg. Cinque ripetizioni di tipo 3, suddivise in tre ripetizioni sottotipo-3a, con 8 cisteine ciascuna, e 2 ripetizioni sottotipo-3b con 6 residui cisteina ciascuna, seguono in ordine alternato. Il motivo di tipo-1 è omologo ad un motivo ricco in cisteina della catena invariante associata con l'antigene maggiore di istocompatibilità di classe II (*McKnight et al., 1989*). La sequenza di 570 aminoacidi all'estremità carbossi terminale della Tg mostra un alto grado di similarità (fino al 60% in alcune regioni) con quella dei membri di una super-famiglia di lipasi ed esterasi, includenti l'acetilcolinesterasi di *Torpedo californica*, la colinesterasi del siero umano, e altre (*Takagi et al. 1991; Krejci et al. 1991*). Sono note diverse varianti dell'mRNA dell'hTg, generate da eventi di splicing alternativi.

1.3.2 Modificazioni post-traduzionali dell'hTg: glicosilazione

Il 10 % circa in massa dell'hTg è costituito da carboidrati. Due varietà di unità oligosaccaridiche (A e B) sono legate ai residui di asparagina mediante legame glicosilamminico. Le unità A, ricche in mannosio, contengono un numero variabile di residui di mannosio (7-9) e 2 residui di N-acetilglucosammina. L'unità del complesso B contiene 3 residui di mannosio ed un numero variabile di residui di N-acetilglucosammina, galattosio, fucosio, ed acido sialico (*Arima et al. 1972*). La Tg umana contiene anche unità oligosaccaridiche di tipo C e D. Le unità di tipo C sono legate alla serina ed alla treonina da legami di tipo O-glicosidico e contengono galattosammina; le unità di tipo D sono oligosaccaridi condroitin-6-solfato simili legati alla serina e contengono una unità ripetuta di acido glucuronico e galattosammina,

ciascuno dei quali può recare un gruppo sostituito solfato, più xilosio, galattosio e solfato (*Spiro et al. 1977*). Spiro (1977) ne riportò la seguente composizione in moli di carboidrati per mole di serina: xilosio 1.1, galattosio 1.7, galattosamina 11.0, acido glucuronico 10.5, solfato 10.1. Successivamente, la loro esatta natura fu dimostrata mediante confronto dei prodotti della loro digestione con condroitinasi ABC con appropriati standards, in cromatografia su strato sottile (*Schneider et al., 1988*).

Il 90 % del (³⁵S)-solfato incorporato nella Tg umana è equamente distribuito tra:

- a) unità oligosaccaridiche di tipo B bi-antennarie, contenenti galattosio-3-solfato, e tri- e tetra-antennarie, contenenti galattosio-3-solfato e N-acetilgalattosamina-6-solfato;
- b) unità D di tipo condroitin-6-solfato simili (*Spiro and Bhoyroo, 1988; Schneider et al., 1988*).

Nell'hTg sono stati trovati anche gruppi fosfato legati a residui di mannosio presenti su catene oligosaccaridiche di tipo A, nonché a serine e tirosine (*Consiglio et al., 1987*).

L'hTg presenta un'incremento di carica netta negativa dovuto ai residui di acido glucuronico e ai gruppi solfato delle catene di condroitin-6-solfato.

La tireoglobulina modificata con condroitin-6-solfato (hTgCS) mostra un chiaro e lineare incremento di acido uronico, il numero di moli di acido uronico per mole di hTg aumenta linearmente insieme con l'abbondanza in percentuale dell'hTgCS.

La frazione di hTgCS presente nell'hTg è composta da una sottopopolazione eterodimerica, in cui i monomeri condroitinati e non condroitinati sono nel rapporto 1/1, e da una componente omodimerica, che in seguito alla dissociazione produce solo monomeri condroitinati, e rappresenta circa un terzo dell'hTgCS totale. Tenuto conto di ciò il numero massimo di unità disaccaridiche ripetute nella catena condroitin-6-solfato della hTg sembra poter variare da un minimo di 4 ad un massimo di 12.

Quindi, l'hTgCS rappresenta costantemente una frazione rilevante, e a volte predominante dell'hTg, che può essere separata attraverso una cromatografia a scambio ionico su una matrice Q-Sepharose sostituita con gruppi trimetilamminici (Q-IEC), dalle molecole residue di hTg, prive di unità oligosaccaridiche condroitin-6-solfato (hTgCS₀), fatta eccezione per una minoranza di molecole di hTgCS con catene oligosaccaridiche nascenti incomplete, con non più di 2-3 moli di acido uronico per mole di hTg.

1.3.3 Modificazioni post-traduzionali dell'hTg: iodinazione ed ormonogenesi

La iodinazione e l'accoppiamento dei residui di iodotirosina ha luogo sul versante esterno della membrana apicale dei tireociti, lungo la superficie dei microvilli. Gli iodoamminoacidi nell'hTg includono monoiodotirosina (MIT), 3,5-diiodotirosina (DIT), e le iodotironine ormonali 3,3',5-triiodotironina (T3) e 3,3',5,5'-tetraiodotironina (tiroxina, T4). In condizioni normali, il contenuto in iodio dell'hTg varia da 10 a 40 moli di atomi di iodio per mole di Tg. MIT, DIT e T4 appaiono sequenzialmente nel corso della iodinazione e sono in una relazione precursore-prodotto, nello stesso ordine. Per un contenuto di iodio dello 0.5 % in peso (25 moli di atomi di iodio per mole di Tg), vengono formate 2,5-3 moli di T4 e poco meno di 1 mole di T3 per mole di Tg umana. Nel corso della iodinazione, i dimeri non covalenti di hTg vengono convertiti in dimeri covalenti, mediante ossidazione intermolecolare di gruppi sulfidrilici liberi. Non tutti i residui di tirosina dell'hTg sono ugualmente accessibili alla iodinazione. Dei 134 residui di tirosina, solo 25-30 sono normalmente iodinati, e solo 6-8 di essi formano iodotironine. I residui di tirosina che vengono iodinati per primi sono anche i primi ad essere convertiti in iodotironine.

Gli ormoni T3 e T4 sono formati nella Tg attraverso la iodinazione di specifici residui tirosinici ed il susseguente trasferimento di un gruppo iodofenossilico da una iodotirosina “donatrice”, la quale fornisce l'anello esterno, ad una iodotirosina “accettrice”, la quale fornisce l'anello interno.

Il principale sito T4 formatore della hTg è stato localizzato alla tirosina 5 (*Lejeune et al., 1983*) e la formazione della T4 sembra coinvolgere la tirosina suddetta come sito accettore e la tirosina 130 come sito donatore (*Marriq et al. 1991*). La T4 è anche formata alla tirosina 2553 e 2746 (*Lamas et al. 1989*).

Residui di di-idroalanina sono stati identificati in diverse posizioni della Tg da varie specie animali, inclusa la Tyr1375 della Tg bovina (*Gentile et al. 1997*).

Diverse osservazioni portano alla conclusione che le regioni ammino e carbossi terminali della Tg rappresentano domini autonomi per la formazione di ormoni. Una mutazione nell'aminoacido 296 della Tg risulta in una prematura terminazione della catena e gozzo in capre Dutch, determina la produzione di 2 frammenti NH₂-terminali, con masse di 40,000 e 32,000. Comunque, questi sono capaci di efficiente produzione di ormoni tiroidei, in presenza di supplementazione di iodio (*Veenboer and de Vijlder 1993*). Gli ormoni tiroidei sono anche efficientemente formati dalla iodinazione *in vitro* di un frammento carbossi-terminale della Tg di ratto fusa alla proteina A Stafilococcica (*Asunciòn et al.1992*).

1.3.4 Unità oligosaccaridica condroitin 6-solfato

In un precedente studio (Conte et al. 2006), effettuato nel nostro laboratorio è stata caratterizzata in dettaglio l'unità oligosaccaridica condroitin-6-solfato (C6S) tipo D, O-linked, della tireoglobulina umana. E' stato sviluppato un metodo tramite

cromatografia a scambio ionico (Q-IEC), che ha permesso di separare le molecole di hTg contenenti condroitin-6-solfato (hTg-CS) dalle molecole di hTg residue (hTg-CS₀). Esplorando la variazione nella mobilità elettroforetica e le proprietà di colorazione conferite dalle unità condroitin-6-solfato ai prodotti di proteolisi limitata della hTg, la regione contenente l'unità oligosaccaridica in questione è stata associata ad un peptide carbossi terminale della Tg che inizia alla Thr2514. La successiva purificazione di un nonapeptide omogeneo contenente acido D-glucuronico (hTg-CSgp), corrispondente ai residui di hTg 2726-2734, ha permesso di identificare nella Ser2730 il solo sito di addizione del condroitin-6-solfato nella hTg.

In un ampio numero di preparazioni di hTg, la frazione di hTg-CS nel pool totale di hTg costituisce dal 32.0 al 71.6 %. L'unità C6S è risultata composta da un numero largamente variabile di unità disaccaridiche costituite da acido D-glucuronico - N-acetil-D-galattosamina.

In alcuni gozzi, nelle preparazioni di hTg con alti contenuti di hTg-CS, la frazione della hTg-CS eterodimerica, nella quale soltanto una subunità contiene una catena di C6S, è stata vista coesistere con la frazione di hTg-CS omodimerica. Nei monomeri derivanti dalla dissociazione della hTg-CS in urea, il numero netto di unità disaccaridiche per catena di C6S non eccede 14. E' stato anche mostrato che la hTg-CS ha una più alta efficienza di formazione degli ormoni rispetto alla frazione hTg-CS₀, e che l'intera popolazione di hTg non frazionata trova beneficio da questa proprietà.

Così, l'addizione del condroitin 6-solfato rappresenta un meccanismo ergonomico, attraverso il quale la modificazione post-traduzionale di una frazione di molecole influenza la funzione complessiva della hTg. Il maggiore vantaggio nella formazione di T₃, rispetto a T₄, associato con l'unità condroitin 6-solfato, e la vicinanza del sito di

legame di quest'ultimo al carbossi terminale della hTg, suggerisce che può influenzare l'ormonogenesi condizionando la funzione del sito preferenziale di formazione della T₃ alla Tyr2747 (*Van de Graaf et al. 2001; Fassler 1988; Lamas 1989*). Inoltre, sono stati identificati 2 siti, uno tra Lys2714 e Gly2715 e l'altro tra Lys2745 e Thr2746, vicino il sito di addizione del condroitin 6-solfato, suscettibili a proteolisi limitata con tripsina. I dati ottenuti nel nostro laboratorio mostrano che il sito formatore è stato protetto dalla proteolisi nella forma hTg-CS ma non nella forma hTg-CS₀; ciò induce ad ipotizzare che l'addizione della catena C6S può esercitare effetti modificatori nel processing della hTg da parte delle cellule presentanti l'antigene e nell'abilità della hTg a funzionare come autoantigene.

1.4 Effetti dei proteoglicani condroitin solfato

Il proteoglicano condroitin solfato gioca un importante ruolo nell'adesione cellulare, nella migrazione, differenziazione e proliferazione. Differenti articoli scientifici indicano che alcuni proteoglicani di questo tipo influenzano la proliferazione di diversi tipi cellulari. Il versicano 1 e 2 hanno un'opposta azione sulla proliferazione delle cellule NIH-3T3: il versicano 1 induce la proliferazione cellulare ed inibisce l'apoptosi, mentre il versicano 2 inibisce la proliferazione cellulare e non influenza l'apoptosi (*Sheng et al. 2005*).

TENB2, un proteoglicano condroitin solfato identificato nel cancro della prostata, è coinvolto nella progressione della malattia e nel controllo della crescita cellulare (*Glynne-Jones et al. 2001*).

La degradazione dei condroitin solfati A, B e C riduce la proliferazione e la capacità di invasione delle cellule di melanoma, inducendo l'attività della caspasi-3 e così

stimolando l'apoptosi (*Denholm et al. 2001*). Cellule endoteliali, trattate con gli stessi enzimi, si comportano similmente. Alcuni autori (*Yang et al. 2004*), studiando il proteoglicano condroitin solfato di cellule di melanoma (MCSP), hanno dimostrato che esso stimola la proliferazione, la migrazione e l'invasione da parte di cellule tumorali, aumentando l'attivazione di FAK ed ERK. Studiando domini globulari di proteoglicani, sono state identificate specifiche regioni, in grado di modulare risposte cellulari, così come l'apoptosi o la proliferazione cellulare (*Cattaruzza et al. 2004*).

L'azione dei proteoglicani condroitin solfato è spesso mediata da CD44, il più importante proteoglicano con condroitin solfato esposto sulla superficie dei leucociti (*Taylor and Gallo 2006*). CD44 agisce principalmente come un recettore per lo ialuronano, ma può anche legare condroitin solfati, fibronectina ed osteopontina (*Rudzki and Jothy 1997*). CD44 è coinvolto nell'infiammazione, chemiotassi, proliferazione cellulare ed apoptosi (*McVoy and Kew 2005; Castellone et al. 2004; Ayroldi et al. 1995*). Generalmente, CD44 è coinvolto nel signalling proliferativo, mentre fornisce protezione dall'apoptosi indotta dal dexametasone (*Ayroldi et al. 1995*). CD44 è codificato da un singolo gene, contenente 20 esoni; 10 di questi esoni (v1-v10) possono essere differenzialmente inclusi nel trascritto primario, attraverso splicing alternativo. Le varianti di splicing hanno un importante ruolo nella progressione dei tumori, essendo up-regolate in differenti tumori (*Ponta et al. 2003*). Per esempio, CD44v6 è up-regolato in diversi carcinomi papillari della tiroide, dove è abile a modulare l'invasività tumorale (*Guarino et al. 2005*).

Le catene condroitin solfato sono legate al grado di differenziazione di alcuni tumori, così come il carcinoma di Merkel (*Sames et al. 2001*) ed il cancro della prostata (*Ricciardelli et al. 1999*). Generalmente, alti livelli di proteoglicani condroitin solfato

sono predittivi di una cattiva prognosi e di una progressione in senso maligno della malattia. E' concepibile che il glicopeptide hTg-CSgp può essere coinvolto nella progressione dei tumori tiroidei e può indurre proliferazione cellulare e inibizione dell'apoptosi, non solo nelle cellule tiroidee, dove è espresso, ma anche nel tessuto connettivo e nelle cellule endoteliali.

La crescita regolata dei tessuti epiteliali dipende dalla proliferazione controllata delle cellule epiteliali e dell'adiacente tessuto connettivo (*Popp et al. 1996*). Alcuni peptidi con funzioni regolatorie sono prodotti e rilasciati dalle cellule epiteliali stesse ed agiscono come componenti essenziali di meccanismi autocrini o paracrini. La tirotropina (TSH) promuove la crescita e le funzioni di differenziazione dei tiroцити (*Roger and Dumont 1984*), ad esempio, sintesi della tireoglobulina e trasporto dello iodio (*Weiss et al. 1984; Santisteban et al. 1987*).

Alcune delle funzioni esercitate dal TSH sono mediate da molecole sintetizzate da cellule epiteliali tiroidee. Le cellule FRTL-5 stimulate con TSH rilasciano fattori promuoventi la crescita, così come il fattore di crescita II insulina-simile (*Maciel et al. 1988*) e l'ectodominio secretorio del precursore della proteina beta-amiloide (sAPP) (*Graebert et al. 1995*). Per quest'ultimo è stato dimostrato un ruolo regolatorio nella crescita delle cellule FRTL-5 (*Popp et al. 1996*). Inoltre, è stato proposto che sAPP operi come un fattore di crescita autocrino, mediando gli effetti proliferativi del TSH su cellule epiteliali tiroidee vicine (*Pietrzik et al. 1998*). Le funzioni proposte dei componenti della famiglia APP sono in parte dedotte dalla struttura del dominio di differenti forme di APP, il quale include siti di binding per il collagene, la laminina ed i glicosaminoglicani (*Kibbey et al. 1993*). Recentemente è stata anche caratterizzata una forma di APP modificata con condroitin solfato, denominata appicano (*Pangalos et al.*

1996). Nelle cellule tiroidee, l'APP può agire come un link tra segnali intra ed extra cellulari matrice-dipendenti, i quali modulano lo stato differenziativo e proliferativo delle cellule tiroidee. Inoltre, il ruolo della matrice extracellulare nel controllo della differenziazione e della crescita dei tirociti è poco conosciuto. D'altro canto, una serie di articoli hanno dimostrato il ruolo giocato dai componenti della matrice extracellulare nel controllo della differenziazione delle cellule neurali e della crescita dei neuriti. Alcuni autori descrivono sia effetti inibitori che stimolatori, dei proteoglicani portanti condroitin solfato, sull'adesione cellulare e sulla crescita dei neuriti *in vitro* (Anderson et al. 1998).

I glicosaminoglicani, specificamente l'eparan solfato, sono essenziali nell'azione delle cellule gliali fattore neurotrofico-derivate (GDNF) sull'assogenesi nei neuroni (Barnett et al. 2002).

La tireoglobulina secreta dalle cellule follicolari tiroidee viene depositata nel lume delle cellule follicolari come una soluzione colloidale veramente concentrata, la cui concentrazione è aumentata dall'estrusione attiva di acqua (Nitsch and Wollman 1987; Chambard et al. 1987).

In un certo senso, la sostanza colloidale rappresenta una matrice cellulare semi-solido in diretto contatto con gli adattamenti apicali funzionali delle cellule epiteliali tiroidee. La presenza, all'interno della colloide, di una rilevante proporzione (dal 30 al 70 %) di hTg modificata dall'addizione di una catena oligosaccaridica C6S (hTg-CS), può indurre a domandarsi se questa isoforma della hTg può condividere con altri proteoglicani della matrice extracellulare alcune funzioni di segnale verso le cellule epiteliali con le quali è in contatto, inclusi i segnali legati alla polarità cellulare. E' stato mostrato che la Tg è in grado di sopprimere l'espressione di geni tiroide-specifici, così come il simporto

sodio/iodio (NIS), la tireoperossidasi (TPO), la stessa Tg, e il recettore del TSH (TSH-R). tali effetti sono mediati dal binding della Tg al recettore apicale delle asialoglicoproteine (ASGPR), mentre la fosforilazione dei residui di serina/treonina della Tg non solo sopprime tali effetti, ma promuove anche la trascrizione di geni tiroide-specifici (*Ulianich et al. 1999*). Queste osservazioni possono fornire il substrato per uno studio sugli effetti dell'addizione del C6S all'hTg nella modulazione, da parte della stessa, dell'espressione di funzioni tiroide-specifiche. E' possibile che l'addizione e/o l'allungamento delle catene di C6S sulla hTg siano sotto il controllo regolatorio del TSH, così come avviene con le unità oligosaccaridiche N-linked (*Di Jeso and Gentile 1992*). Se fosse così, la hTg contenente condroin 6-solfato (hTg-CS) potrebbe partecipare nella regolazione autocrina del fenotipo differenziato delle cellule tiroidee, sotto il controllo del TSH

1.5 Coinvolgimento dell'unità C6S nella Tiroidite Autoimmune Sperimentale (EAT)

L'unità C6S può influenzare la capacità della hTg a indurre tiroiditi autoimmuni sperimentali (EAT) in topi geneticamente suscettibili in diversi modi:

1. L'influenza della catena oligosaccaridica C6S sulla suscettibilità proteolitica della regione all'estremo carbossi-terminale della hTg potrebbe modificare il processing e la presentazione della proteina da parte delle cellule presentanti l'antigene (APCs), particolarmente a causa del fatto che il sito di addizione del C6S all'hTg è localizzato all'interno di una regione ricca di epitopi, portante diversi epitopi legati a cellule T e B (*Gentile et al. 2004*). I mono- e di-saccaridi O-linked nella glicoproteina associata ai tumori MUC1 restringono il repertorio degli epitopi prodotti e/o presentati in una

maniera sito-specifica, sia limitando l'accessibilità di specifici siti di taglio alla catepsina L (*Hanisch et al. 2003*), sia prevenendo il riconoscimento di epitopi attraverso un ibridoma a cellule T peptide-specifico. Le catene oligosaccaridiche N-linked inibiscono anche la generazione di un epitopo self dalla subunità 3 del recettore del glutammato (*Gahring et al. 2001*), e di linfociti T citotossici (CTL)-epitopi specifici dalla nucleoproteina dell'influenza A (*Wood 1998*). Una catena di cheratan solfato maschera un epitopo T cellulare artritogenico nel dominio G1 dell'aggrecano, mentre la deplezione enzimatica di multiple catene laterali di condroitin solfato genera clusters di pezzi di condroitin solfato, che attivano specifiche cellule B a funzionare come APCs (*Glant et al. 1998*). Plausibilmente, l'unità oligosaccaridica C6S nell' hTgCS potrebbe impedire il processamento da parte delle APCs della regione circostante, all'interno di un range che include il legame Lys2714-Gly2715, all'estremità amminica, ed il legame Lys2745-Thr2746, al lato carbossi terminale.

2. Gli effetti diretti dell'unità oligosaccaridica condroitin solfato sulla risposta cellulare immune sono stati documentati:

- La molecola Ii (catena invariante, CD74) è una glicoproteina non-polimorfica che partecipa in una serie di funzioni immunologiche. Le maggiori funzioni della Ii sono mediate attraverso la sua associazione con gli eterodimeri MHC-II (*Hiltbolt 2002*). Nel reticolo endoplasmatico, le molecole Ii neo sintetizzate si auto assemblano in trimeri. Tre eterodimeri di classe II vengono aggiunti sequenzialmente ad un trimero di Ii per formare un complesso a nove catene. Sempre nel reticolo, la Ii facilita l'assemblamento ed il folding degli eterodimeri MHC-II e occupa il solco di binding, prevenendo prematuri legami di altri peptidi o

polipeptidi non ripiegati. Il complesso nonamerico transita attraverso il Golgi ed è trasportato in ultimo negli endosomi/lisosomi, dove Ii è degradato, permettendo all'MHC-II di essere caricato con il peptide. Comunque è stato mostrato che una piccola percentuale (2-5%) di molecole Ii associate con le molecole MHC di classe II sono modificate mediante l'aggiunta di una singola catena di condroitin solfato alla Ser291. I complessi di catena invariante contenenti condroitin solfato (Ii-Cs) sono trasportati rapidamente dal *trans*-Golgi alla superficie cellulare, a dispetto della presenza di un corretto segnale di localizzazione endosomale. In questa forma, rimangono associati con le molecole di classe II alla superficie delle APCs (*Sant et al. 1985; Miller et al. 1988*), dove agiscono come molecole accessorie nella presentazione dell'antigene, attraverso l'interazione con CD44 (*Naujokas 2003*). Recentemente, è stato dimostrato che la presenza di almeno una subunità contenente condroitin solfato all'interno del contesto dei nonameri Ii/MHC-II è capace a orientare Ii alla superficie cellulare (*Arneson et al. 2007*). Gli effetti di enhancing della molecola Ii (CD74) sulle risposte cellulari T allogene e mitogene avvengono attraverso l'interazione della Ii-CS (CD74) con il CD44 sulle cellule T responsive, come dimostrato dal fatto che possono essere inibite sia da anticorpi anti-CD44, e da forme solubili di CD44 (CD44Rg) (*Naujokas et al. 1993*). Anticorpi monoclonali contro CD44 sono efficaci nell'innescare l'attività citotossica delle CTL in un modo TCR-indipendente (*Seth et al. 1991*). Serin-glicine, piccoli proteoglicani in granuli secretori di cellule ematopoietiche, attivano il rilascio CD3-dipendente di citochine e proteasi da cloni CTL CD44 positivi (*Toyama-Sorimachi et al. 1995*), interagendo con il CD44 attraverso le loro catene laterali di condroitin 4-solfato e 6-solfato (*Toyama-Sorimachi et al. 1997*). Inoltre, il binding

dell'aggregano al CD44, attraverso le sue catene laterali di condroitin 4-solfato e 6-solfato, è stato efficace nell'innescare l'oligomerizzazione delle molecole di CD44 e il signaling intracellulare (*Fujimoto et al. 2001*). Sia l'isoforma CD44v6 e CD44v7 sono state transitoriamente up-regolate durante l'attivazione linfocitaria. Gli anticorpi per CD44s e CD44v7 inibiscono le risposte antigeniche e mitogeniche delle cellule T e B, mentre gli anticorpi per CD44v6 inibiscono selettivamente le risposte mediate dalle cellule T (*Seiter et al. 2000*). Infine, il cross-linking dell'isoforma CD44v6, ma non CD44s, promuove proliferazioni TCR/CD3-indipendenti di cellule T di linfoma, accompagnate da produzione di IL-2 e attivazione di MAP e SAP chinasi (*Marhaba et al. 2005*).

- Più recentemente, Ii-CS (chiamata CD74) è stata identificata come recettore della superficie cellulare per il fattore inibitorio della migrazione dei Macrofagi (MIF) (*Leng, 2003*). MIF promuove la produzione di citochine infiammatorie da parte dei macrofagi, innesca la proliferazione delle cellule T, e induce il rilascio di ossido nitrico, metalloproteasi della matrice, COX-2, e prostaglandine E2. MIF si lega alla Ii attraverso una interazione ad alta affinità e induce la fosforilazione della serina del dominio intracitoplasmatico del CD74 in un meccanismo CD44-dipendente. CD44 può essere necessario per alcune, se non tutte, le proprietà di trasduzione del segnale da parte di MIF. Utilizzando linee cellulari COS-7/M6 (deficienti sia in CD74 che in CD44) ingegnerizzate per esprimere stabilmente combinazioni di CD74, CD44 e CD44D67, alcuni studiosi hanno stabilito che CD74 solo impartisce il legame di MIF alle cellule e che la presenza di CD44 non conferisce una addizionale attività di binding aggiuntiva a quella di CD74 utilizzato da solo. Non ci sono evidenze per una specifica interazione tra MIF e CD44;

comunque, l'attivazione ERK1 e ERK2 MIF-mediata richiede l'espressione di un CD44 completo. La stimolazione di MIF è stata associata con la fosforilazione di una serina PKA-dipendente di CD74 e CD44. Studi con siRNA e l'inibitore delle chinasi PP2 indicano che l'attivazione di ERK indotta da MIF procede mediante Src tirosina chinasi, che si è visto essere associata fisicamente con il dominio intracitoplasmatico del CD44 (*Taher et al. 1996*). Si è stabilito che alcune delle attività biologiche di MIF procedano attraverso l'attivazione via ERK. Queste includono il metabolismo dell'acido arachidonico e la produzione di prostaglandine (via fosfolipasi citoplasmatica A2 e cicloossigenasi-2) (*Mitchell et al. 1999; Sampey et al. 2001*), la regolazione dell'attività di p53 tramite la forma completa di CD44 (*Mitchell et al. 2002*), e l'attivazione di effettori addizionali di ERK, così come la famiglia Ets dei fattori di trascrizione che regolano l'espressione dei Toll-like receptor (*Roger et al. 2001*).

- Infine, è stato dimostrato che il frammento p41 della catena invariante (contenente una sequenza di 64 aminoacidi addizionale nel dominio luminale) è un potente inibitore della catepsina L. Il segmento addizionale (AS) è ricco in cisteina, e condivide significativa omologia con la sequenza ripetitiva di tipo-1 della tioglobulina (*Bevec 1996*). Questi dati suggeriscono che p41 può aumentare la presentazione dell'antigene, riducendo l'attività proteolitica del compartimento Ag-processing, così proteggendo un subset di epitopi antigenici dall'eccessiva degradazione (*Fineschi 1996*).

1.6 CD44: gene struttura e funzione

La proteina CD44 è una proteina trans-membrana di tipo 1, monomerica ed

ubiquitaria la cui funzione principale è quella di legare l'acido ialuronico (HA) ed altre glicoproteine della matrice extracellulare.

Il gene codificante CD44 è composto di 20 esoni. Gli esoni 1÷16 codificano per il dominio extracellulare di CD44, i primi 5, insieme con gli esoni 15 e 16, sono presenti in tutte le isoforme di questa glicoproteina, mentre gli esoni 5a÷14 (v1÷v10) sono sottoposti a fenomeni di splicing alternativo. L'esone 17 codifica per il dominio trans-membrana, gli esoni 18 e 19 codificano per la porzione intracellulare. Gli esoni da v1 a v10 codificano per la regione extracellulare prossimale alla membrana citoplasmatica e rendono conto di un ampio spettro di isoforme del CD44.

Le varie isoforme della molecola possiedono specifiche proprietà differenti tra loro (*Jurgen et al., 2000*). Per esempio, l'isoforma CD44 v6 è iper-espressa in molti carcinomi papilliferi della tiroide, ciò modula in maniera rilevante le proprietà invasive di questo tumore (*Guarino et al., 2005*).

A livello strutturale CD44 è composto da:

Una regione ammino-terminale a livello extracellulare, che include il dominio di legame all'acido ialuronico (HBD), che ha un grado di omologia alle proteine leganti la cartilagine.

Una regione trans-membrana composta da 21 residui amminoacidici.

Un dominio citoplasmatico composto da 72 residui amminoacidici. Il dominio citoplasmatico può essere fosforilato sulle serine. I residui di serina in seguito alla fosforilazione possono influenzare le interazioni proteina-proteina all'interno della cellula.

Le proteine coinvolte nella trasduzione del segnale intracellulare mediato da CD44 sono molte, le principali sembrano essere: Src, Lck, Fyn, PKC e Rho GTPasi (*Kalomiris et*

al., 1988; Bourguignon et al., 2000; Oliferenko et al., 2000; Bourguignon et al., 2001; Hirao et al., 1996)

La variabilità strutturale di questa proteina è enormemente accentuata, oltre che da eventi di splicing alternativo, anche dal suo elevato grado di modificazione post-traduzionale che includono la glicosilazione sia O- che N-linked, ed il legame ai glicosamminoglicani. Il dominio extracellulare risulta essere pesantemente glicosilato nei residui di serina, treonina e prolina. In questa regione si ritrovano 5 residui conservati per la glicosilazione N-linked e 4 dipeptidi serina-glicina legati ai glicosamminoglicani. In alcuni casi come nell'isoforma CD44H tali modifiche post-traduzionali sono così abbondanti da modificare le caratteristiche di legame e le proprietà funzionali della molecola (*Lesly et al., 1995*). Le isoforme di CD44 contenenti l'esone v3 sembrano quelle modificate con i residui di eparan-solfato e condroitin-6-solfato (*Bennet et al., 1995*).

Le isoforme più importanti di questa molecola sono CD44s (H), che si trova sulle cellule mature del sangue e sulle CD34⁺ HPC, CD44 v8-v10 (E) che si trova nelle cellule epiteliali, CD44 v6 e CD44 v9 che sono localizzate sui monociti, macrofagi e cellule dendritiche. Tra i principali ligandi di questa molecola vanno di sicuro menzionati l'acido ialuronico (HA), il collagene, la fibronectina, la laminina, l'osteopontina, MHC II, E-selectina e L-selectina (*Jurgen et al., 2000*).

CD44 è coinvolto in condizioni fisiologiche nei meccanismi di adesione e migrazione cellulare, nell'ematopoiesi, nell'attivazione dei linfociti, nell'assemblaggio della matrice extracellulare (*Toshiyuki et al., 2004*). In seguito al legame con HA CD44 incentiva la produzione di importanti citochine pro infiammatorie da parte dei macrofagi come IL-12, IL-1, TNF, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β . Inoltre promuove la proliferazione e

differenziazione delle cellule T attraverso l'induzione dell'IL-12 e dell'INF γ , la fagocitosi da parte delle cellule polimorfonucleate e la tossicità cellulo-mediata da parte dei linfociti NK. Il ruolo di CD44 nei processi di adesione e migrazione cellulare è stato individuato in molti tipi di cellule CD44⁺. Infatti, la migrazione dei linfociti T CD4⁺ attraverso il recettore CD44, è attiva nelle fasi iniziali di molte patologie a carattere autoimmune (*Seingelman et al., 1999*). CD44 è implicato anche nella migrazione ed invasione degli alveoli polmonari da parte delle cellule fibroblastiche promuovendo la formazione di tessuto fibrotico e l'insorgenza della fibrosi acuta alveolare (*Svee et al., 1996*). Questa molecola è coinvolta, inoltre, anche nei processi che regolano l'apoptosi e la proliferazione cellulare suggerendone un ruolo importante nei meccanismi patogenetici di alcuni tumori. Infatti, CD44 provvede alla protezione dell'apoptosi indotta dal dexametasone (*Ayrolodi et al., 1995*). Nei carcinomi papilliferi della tiroide il tipico riarrangiamento RET/PTC fa scattare un segnale autocrino che coinvolge l'osteopontina e CD44 che sostiene l'invasione e la proliferazione dei tirociti trasformati (*Castellone et al. 2004*).

HA, la più abbondante componente della matrice extracellulare, si può trovare in una forma ad alto peso molecolare (HMW-HA) ed in una forma a basso peso molecolare (LMW-HA). Queste due differenti forme legano entrambe CD44 ma promuovono effetti completamente diversi sulla proliferazione delle cellule della muscolatura liscia vascolare.

HMW-HA inibisce la progressione del ciclo cellulare attraverso l'inibizione del legame del GTP alla molecola Rac che così non può più catalizzare l'attivazione della ciclina D1. LMW-HA stimola la progressione del ciclo cellulare in quanto attiva la via ERK promuovendo l'attivazione della ciclina D1 (*Kothapalli et al., 2008*).

Cellule pancreatiche provenienti da un tumore non metastatico sono indotte a metastatizzare in seguito alla trasfezione con un cDNA codificante per l'isoforma CD44H (*Gunthert et al., 1995*).

Inoltre, è stata caratterizzata una forma solubile del CD44 nella circolazione murina, i livelli di questa proteina sono influenzati dalla immunoreattività e dalla grandezza del tumore indicando che tale molecola potrebbe avere un ruolo di marker diagnostico e prognostico nell'ambito delle malattie tumorali (*Katoh et al., 1994*).

Nell'ambito delle neoplasie ematologiche gli esoni v3, v4, v5, v6, e v7 sono espressi nella leucemia mieloide acuta (AML), mentre i progenitori CD34⁺ del midollo osseo e le cellule del sangue periferico sono negative per queste varianti (*Bendall et al., 2000*). L'isoforma CD44 v6 è stata ritrovata in 6 casi su 16 di leucemia linfatica acuta (LLA) (*Magyarosy et al., 2001*). Il condroitin-6-solfato gioca un ruolo molto importante nell'adesione, migrazione differenziazione e proliferazione in seguito all'interazione con CD44 esposto sulla superficie delle cellule T. L'aumento della risposta mitogenetica ed allogenetica delle cellule T è dovuta all'interazione tra la Ii-CS (CD74) ed il CD44 posto sulla superficie di tali cellule. Infatti utilizzando anticorpi anti-CD44 o forme solubili del recettore la capacità allogenetica e proliferativa delle cellule T si riduce notevolmente (*Naujokas et al., 1993*). Anticorpi monoclonali diretti contro CD44 sono capaci di innescare l'attività citotossica dei CTL in maniera CD3-indipendente (*Seth et al., 1991*). Il legame dell'Aggregano al CD44 attraverso i suoi domini condroitinati può innescare l'oligomerizzazione della molecola ed il signaling intracellulare (*Fujimoto et al., 2001*). Alcuni piccoli proteoglicani contenuti nei granuli secretori delle cellule ematopoietiche attivano il rilascio in maniera CD3-dipendente di citochine e proteasi da parte dei CTL CD44⁺. Proprio l'interazione di questi piccoli proteoglicani con i residui

condroitinati del CD44 è la responsabile di questo fenomeno (*Toyama-Sorimachi et al., 1997*). Come già accennato sopra, recentemente Ii-CS (CD74) è stato riconosciuto essere il recettore per il fattore inibitorio della migrazione macrofagica (MIF) (*Leng et al., 2003*). MIF promuove la produzione di citochine pro-infiammatorie da parte dei macrofagi, innesca la proliferazione delle cellule T ed induce il rilascio di ossido nitrico, metalloproteasi, COX-2 e prostaglandina-E2. MIF lega CD74 attraverso interazioni ad alta affinità e ne induce la fosforilazione del dominio intracitoplasmatico in maniera CD44 dipendente. Quindi anche in questo caso CD44 sembra essere importante per promuovere la trasduzione del segnale mediata da MIF.

Tutte le evidenze fin qui riportate fanno ritenere un ruolo diretto dell'interazione tra la molecola CD44 ed il condroitin-6-solfato, sia nei processi fisiologici che in quelli patologici. Lo scopo del nostro studio è stato quello di approfondire il ruolo di tali fenomeni utilizzando come modello di studio proprio quello delle tiroiditi autoimmuni sperimentali.

MATERIALI E METODI

2 MATERIALI E METODI

2.1 Purificazione dell'hTg

Le preparazioni di tireoglobulina umana (hTg) usate per gli esperimenti di denaturazione, le immunizzazioni e i saggi di restimolazione linfocitaria sono state ricavate da campioni di tessuto tiroideo umano, ottenuti dietro consenso informato da pazienti sottoposti ad interventi di tiroidectomia per gozzo semplice o multinodulare. I frammenti di tessuto sono stati congelati a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ subito dopo l'escissione chirurgica. Successivamente, il tessuto è stato immerso in tampone fosfato 0.05 M , pH 7.2 (1 mL per g di tessuto), sminuzzato fino ad ottenere piccoli frammenti di tessuto e sottoposto a precipitazione frazionata con ammonio solfato $1.4\text{-}1.8\text{ M}$. Il precipitato finale è stato sottoposto a cromatografia per esclusione molecolare in gel di Sephacryl S-300, in 0.1 M NaCl , 0.05 M Tris/HCl , pH 7.4 (tampone A). La hTg così ottenuta è stata analizzata per il contenuto in iodio, mediante un metodo colorimetrico che sfrutta le proprietà catalitiche dello iodio nella reazione di ossidazione del NaAsO_2 da parte del $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 2 (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$. Poiché, data la sua origine da gozzo, la hTg è risultata normalmente dotata di scarso contenuto di iodio, allo scopo di aumentare la sua immunogenicità, essa è stata sottoposta a iodinazione enzimatica in vitro, in presenza di

KI 4×10^{-5} M, D-glucosio 100 mM, Glucosio Ossidasi di *Aspergillus niger* alla concentrazione di 0.23 $\mu\text{g/mL}$, e lattoperossidasi da latte bovino alla concentrazione di 2 $\mu\text{g/mL}$. In tali condizioni, si è regolarmente ottenuta l'incorporazione di una quantità di iodio pari allo 0.5% in rapporto di massa nella hTg (corrispondente a circa 25 moli di atomi di iodio per mole di hTg). La hTg iodinata è stata filtrata su una colonnina PD-10 impaccata con matrice Sephadex G-25 ed equilibrata con tampone 0.12 M Tris/HCl, pH 9.0, e quindi concentrata in Centricon 30 a 4 °C.

2.2 Purificazione dell'hTgCS dall'hTgCS₀

Le molecole di hTg contenenti unità oligosaccaridiche di tipo D (hTgCS) sono state separate dalle residue molecole di hTg, prive di unità di tipo D (hTgCS₀), attraverso cromatografia a scambio ionico su matrice Q-Sepharose sostituita con gruppi trimetilamminici (Q-IEC), usando colonne HiTrap Q-Sepharose HP da 5 ml, equilibrate in 0.025 M Tris/HCl, pH 7.4 (buffer A). Sulla colonna sono state applicate aliquote di hTg di 20 mg in buffer A e 0.05 M NaCl. Dopo lavaggio con il buffer A, è stato applicato un gradiente lineare da 0 a 100 % di buffer B (1.2 M NaCl in buffer A) in 24 min, ad una velocità di flusso di 2.5 ml/min. Al termine della cromatografia sono state analizzate frazioni da 1 ml. La concentrazione delle endotossine batteriche nelle

preparazioni di hTg, hTgCS e hTgCS₀, usate per le immunizzazioni dei topi e per i saggi di proliferazione secondaria degli splenociti, è stata misurata mediante test del lisato di amebociti di Limulo. La soglia di purezza del campione per l'uso con culture cellulari è stata settata a < 0.01 Endotoxin Units (EU)/ml.

2.3 Purificazione del glicopeptide hTgCSgp

Il glicopeptide dell'hTg contenente condroitin-6-solfato (hTgCSgp) è stato purificato come descritto precedentemente (*Conte et al., 2006*). Un'aliquota di 40 mg di hTgCS è stata denaturata e ridotta, in 15 ml di 0.3 M Tris/HCl pH 8.0, 6.0 M guanidina/HCl, 1×10^{-3} M EDTA, 0.01 M ditiotreitolo, a 37 °C per 2 h. Le proteine ridotte sono state carbossimetilate con un eccesso molare 5 volte superiore di iodoacetammide, rispetto al totale dei gruppi SH presenti, a temperatura ambiente per 30 min al buio. L'alchilazione è stata bloccata con un eccesso di ditiotreitolo. Il campione è stato allora dializzato contro tampone 0.05 M sodio fosfato, pH 7.8, e digerito con endoproteinase Glu-C (protease V8) da *Staphylococcus aureus*, nel rapporto di massa enzima:substrato di 1:100, a 37 °C per 18 h. Al termine dell'incubazione il campione è stato diluito con una soluzione di tampone per una concentrazione finale di 0.025 M Tris/HCl, 0.1 M NaCl, 2.0 M Urea, pH 7.4 (buffer C)

e caricato su una colonna HiTrap Q-Sepharose HP da 5 ml, equilibrata nello stesso buffer. Dopo lavaggio con il buffer C, è stato fatto partire un gradiente, da 0 a 100 % di buffer D (1.2 M NaCl in buffer C) in 55 min, seguito da 100 % buffer D per 10 min, alla velocità di flusso di 1 ml/min. Sono state monitorate frazioni da 1 ml attraverso l'assorbanza ottica a 280 nm e la misura del contenuto in acido D-glucuronico, e il singolo picco contenente peptide e acido D-glucuronico è stato soggetto a cromatografia a esclusione molecolare su una colonna 1.5 x 100 cm di Bio-Gel P-2, in 0.01 M NH_4HCO_3 . Il picco contenente acido D-glucuronico, eluito nel volume escluso, è stato liofilizzato e ulteriormente purificato tramite cromatografia su una colonna 0.5 x 40 cm di Sephadex G-50 fine, in 0.01 M NH_4HCO_3 . Frazioni da 1 ml sono state monitorate per il contenuto in peptide, misurando la densità ottica a 220 nm, e il contenuto in acido D-glucuronico, e il picco peptidico contenente acido D-glucuronico è stato liofilizzato.

2.4 Coniugazione del glicopeptide hTgCSgp con sulfo-NHS-LC-Biotin

Un'aliquota di 150 nmoli di hTgCSgp dopo liofilizzazione è stata dissolta in 0.1 ml di PBS pH 7.2. Quindi 45 μl di una soluzione 20 mM sulfosuccinimidyl-6-biotin-amido) hexanoate (EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin, Pierce) sono stati aggiunti al campione (rapporto molare biotina:peptide = 6:1), e la miscela è lasciata su ghiaccio per

2 h. Il prodotto della reazione è stato filtrato su una colonna 1.5 x 100 cm di Bio-Gel P-2, in 0.01 M NH_4HCO_3 per rimuovere la biotina che non ha reagito. Frazioni da 1 ml sono state monitorate a 220 nm e il picco è stato liofilizzato.

2.5 Ossidazione del glicopeptide hTgCSgp biotinilato e cross linking con *p*-Azidobenzoyl hydrazide

Il glicopeptide biotinilato e liofilizzato è stato ridisciolti in 0.5 ml di tampone 0.1 M sodio acetato pH 5.5, a questo sono stati aggiunti 0.5 ml di una soluzione 20 mM sodio-meta-periodato freddo e la miscela è lasciata al buio per 30 min in ghiaccio. Il prodotto della reazione è stato filtrato su una colonna 1.5 x 100 cm di Bio-Gel P-2, in tampone 0.033 M sodio fosfato, 0.05 M NaCl pH 7.2, per rimuovere l'eccesso di sodio-meta-periodato. Frazioni da 1 ml sono state monitorate a 220 nm ed il picco è stato liofilizzato ad un volume finale di 3 ml. Al campione così ottenuto sono stati aggiunti 150 μl di una soluzione 50 mM *p*-Azidobenzoyl hydrazide (ABH) (Pierce) in DMSO e la miscela è incubata per 2 h a temperatura ambiente e al buio. Allo scopo di eliminare l'eccesso di cross linker che non ha reagito con l'hTgCSgp, il prodotto di reazione è stato filtrato su una colonna 1.5 x 100 cm di Bio-Gel P-2, in tampone 0.033 M sodio fosfato, 0.05 M NaCl, pH 7.2.

Frazioni da 1 ml sono state monitorate a 220 nm e il picco è stato liofilizzato ad

un volume finale di 4 ml.

2.6 Induzione della EAT

Un gruppo di sei topi femmine, CBA/J (H-2^k) sono stati immunizzati al giorno 0 iniettando, 100 µg di hTgCS₀ o hTgCS complementati con adiuvante di Freund (CFA) contenente 3.5 µg/ml di *Mycobacterium tuberculosis* in 50 µl di PBS, nella regione toracico dorsale. I topi di controllo sono stati trattati con PBA e CFA. Al giorno 7, tutti gli animali sono stati trattati con il rispettivo immunogeno sciolto in 25 µl di PBS, emulsionato con lo stesso volume di adiuvante di Freund incompleto (IFA). Dopo 30 giorni i topi sono stati sacrificati ed il sangue, le milze e le tiroidi sono state immediatamente prelevate.

2.7 Valutazione della EAT

Le tiroidi sono state fissate, tagliate e colorate con la colorazione May-Grünwald-Giemsa per l'esame istologico ed incluse in paraffina per la caratterizzazione immunoistochimica.

L'infiltrazione della tiroide da parte delle cellule mononucleate è stata valutata istologicamente in accordo con Verginis et al. (2002) in almeno 30 sezioni tiroidee per

animale ed è stato dato uno score istologico come segue: **0** = assenza di infiltrazione; **1** = piccolo accumulo interstiziale tra due o più follicoli; **2** = uno o due foci di cellule infiammatorie più grandi delle dimensioni dei follicoli; **3** = 10-40 % dell'area occupata da cellule infiammatorie; **4** = 40-80 % dell'area infiltrata da cellule infiammatorie.

2.8 Dosaggio di T3 e T4 dal siero dei topi

La concentrazione di ormoni tiroidei liberi fT3 e fT4 nei sieri murini è stata determinata su aliquote di 10-100 µl di siero usando un saggio radio-immunometrico in fase solida (Medical system), allestendo una curva standard da 0.3-7.7 pmoli per T4 e da 30-920 fmoli per T3.

2.9 Saggio di proliferazione linfocitaria

Le milze dei topi sono state collocate in 5 ml di mezzo di coltura RPMI 1640, supplementato con Na-piruvato, L-glutammato, penicillina e streptomicina. Gli splenociti sono stati isolati attraverso una distruzione meccanica delle milze con l'estremità superiore dello stantuffo di una siringa sterile monouso e posti in tubi falcon da 50 ml. Per rimuovere i globuli rossi e le cellule morte presenti, gli splenociti sono stati stratificati in un mezzo che permette la separazione delle cellule in base alla loro

densità (Lympholyte-M, Cedarlane). Dopo la centrifugazione a 1000 rcf per 20 minuti le cellule viventi sono state delicatamente raccolte dalla superficie del mezzo, trasferite in nuovi tubi e risospese in 5 ml di mezzo diluito 1:1000 con PBS ed in seguito sono state contaminate con la cameretta di Burker. Dopo un'ulteriore centrifugazione il mezzo è stato allontanato e le cellule sono state risospese in RPMI 1640 supplementato con 2 % di siero fetale bovino (FBS) così da ottenere una densità cellulare di 2.5×10^6 cellule/ml. Aliquote di questa sospensione cellulare sono state messe in cultura per effettuare saggi di proliferazione cellulare *in vitro* su piastre da 96 pozzetti a fondo piatto ed incubate a 37 °C in assenza o presenza di dosi graduali di hTgCS₀, di hTgCS, di hTgCSgp. Dopo 48 ore aliquote di 50 µl del sopranatante sono state prelevate da ogni pozzetto per effettuare il saggio delle citochine. 1 µCi di timidina triziata è stato aggiunto in ogni pozzetto ed incubato per 16 ore dopo le quali le cellule sono state trasferite su di un filtro di fibre di vetro e la radioattività, indicatore della proliferazione cellulare, è stata misurata con il β counter. Tutti i saggi sono stati effettuati in triplicato ed i risultati espressi come indice di stimolazione (S.I.) definito come segue: S.I.= cpm in presenza di antigene/cpm in assenza di antigene.

2.10 Saggio del pattern TH1/TH2 della secrezione delle citochine

La concentrazione delle citochine GMC-SF, INF γ , IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6,

IL-10, IL-17 e TNF- α nei sopranatanti delle reazioni di proliferazione degli splenociti, è stata misurata usando la tecnica cito-fluorimetrica multi parametrica basata su beads magnetiche (FlowCytomix Mouse Th1/Th2 10 plex, Bender MedSystems®). Le misurazioni sono state effettuate utilizzando il citofluorimetro Dako.

2.11 Dosaggio degli anticorpi del siero

La concentrazione di IgG totali, IgG1, IgG2a e IgG3, nei sieri di topo è stata effettuata attraverso il saggio ELISA in piastre da 96 pozzetti nei quali sono stati fatti adsorbire rispettivamente 1 μ g di hTgCS₀, 1 μ g di hTgCS, oppure 1 μ g di hTgCSgp. Le IgG sono state saggiate su una diluizione di siero 1:6000 usando un anticorpo secondario biotinilato diretto contro la catena Ig γ F(AB)₂.

IgG1, IgG2a e IgG3, sono stati saggiati su diluizioni di siero rispettivamente di 1:20000, 1:500 ed 1:500 usando un anticorpo monoclonale biotinilato prodotto in ratto diretto contro gli anticorpi di topo IgG1, IgG2a e IgG3 (LO-MG₁, LO-MG_{2a} and LO-MG₃ clones, Sigma). Il rilevamento è stato effettuato con coniugati streptavidina-perossidasi, e l'*o*-fenilendiammina come substrato. Per il saggio degli anticorpi contro il glicopeptide purificato hTgCSgp, aliquote di 0.5 μ g per pozzetto di hTgCSgp biotinilato contenuto in 100 μ l di PBS, sono state incubate O.N. a 15 °C in Reacti-Bind

Neutravidin Coated Plates, High-Binding Capacity, 8-well strips (Pierce). Dopo il lavaggio con PBS-Tween le piastre sono state incubate per un'ora a temperatura ambiente con 100 μ l di siero di topo diluito in blocking buffer 1:1000 per la rilevazione delle IgG ed 1:500 per la rilevazione delle IgM. Gli anticorpi secondari utilizzati sono IgG anti-mouse o IgM anti-mouse prodotti in capra e coniugati con perossidasi (Sigma). Il saggio è stato sviluppato utilizzando *o*-fenilendiammina come substrato.

2.12 Purificazione delle cellule T CD4⁺

La purificazione dei linfociti T CD4⁺ è stata eseguita con il MACS CD4 isolation kit (Miltenyi Biotec). La miscela cellulare derivata da tessuto splenico, in RPMI supplementato con 2 % FBS ad una densità cellulare di (2.5×10^6 cells/ml), è stata centrifugata per 10 minuti ad una velocità di 300 rcf, il soprannatante è stato allontanato ed il pellet risospeso in falcon da 15 ml con PBS pH 7.2, 0.5 % BSA, 2 mM EDTA (buffer A), a 4 °C, ad una diluizione cellulare di 10^7 cells/40 μ l. A questo punto sono stati aggiunti per ogni 10^7 cellule totali, 10 μ l di una miscela di anticorpi monoclonali biotinilati diretti contro CD8a (Ly-2) (rat IgG2a), CD11b (Mac-1) (rat IgG2b), CD45R (B220) (rat IgG2a), DX5 (rat IgM) and Ter-119 (rat IgG2b) (Biotin-Antibody Cocktail, No. 130-090-860, Miltenyi Biotec). La miscela di reazione è stata incubata per 10

minuti a 4-8 °C. In seguito sono stati aggiunti 30 µl di buffer A e 20 µl di anticorpo monoclonale anti-biotina legato a sfere magnetiche per ogni 10⁷ cellule totali (Anti-Biotin MicroBeads, No. 130-090-860, Miltenyi Biotec), incubando per 15 minuti a 4-8 °C. Dopo due lavaggi con buffer A, intervallati con passaggi di centrifugazione di 10 minuti ad una velocità di 300 rcf, il pellet è stato risospeso in 500 µl di buffer A per una diluizione di 2x10⁸ cells/ml. La separazione dei linfociti CD4⁺ è stata completata utilizzando una colonna MACS-LS (Miltenyi Biotec, No. 130-042-201) equilibrata con buffer A. La colonna è stata posta in un campo magnetico in modo tale da trattenere tutte le cellule non CD4⁺ per effetto del campo magnetico, mentre i linfociti CD4⁺ sono stati eluiti e raccolti nei tubi raccoglitori (MS columns plus tubes, No. 130-041-301 Miltenyi Biotec).

2.13 Legame del glicopeptide hTgCSgp alla superficie dei linfociti T CD4⁺ ed immunoprecipitazione

24 µg di hTgCSgp biotinilato e coniugato con ABH, già dissolto in 1.5 ml di PBS 2X, è stato diluito ad un volume finale di 3.0 ml con acqua apirogena, 365 µl di questa soluzione (~3 µg) sono stati aggiunti ai pozzetti di una piastra a 6 pozzetti contenente le cellule T CD4⁺ isolate (10⁷ cells/pozzetto). Dopo un'incubazione di 30 minuti a 37 °C ogni mezzo di coltura, dopo una delicata risospensione con pasteur

sterili, è stato trasferito in tubi falcon per eseguire la procedura di lavaggio. Tale procedura è necessaria per l'eliminazione dell'eccesso di hTgCSgp-ABH non legato, in modo da prevenire legami aspecifici dell'ABH alla superficie cellulare dei linfociti CD4⁺. Il lavaggio è stato eseguito centrifugando ad una velocità di 1600 rpm per 5 min, al termine della centrifugazione il sopranatante è stato allontanato ed il pellet risospeso in mezzo senza siero. A questo punto le cellule sono state trasferite nuovamente in una piastra da coltura da 6 pozzetti ed irradiate con una lampada UV, posta a 10 cm di distanza dalla parte superiore della piastra tenuta senza coperchio, ad una lunghezza d'onda di 365 nm, al buio, per 15 minuti, in modo da rendere attivo il gruppo fotosensibile del cross-linker ABH. Dopo l'irradiazione le cellule sono state trasferite in tubi falcon da 15 ml e centrifugate a 1600 rpm per 5 minuti, il sopranatante è stato allontanato ed il pellet risospeso in 5 ml di D-PBS sterile. Da questa soluzione sono stati raccolti:

- a)** 10 µl per il trattamento con 4 % paraformaldeide (PFA) e per eseguire la microscopia confocale.
- b)** 10 µl per il trattamento con metanolo e per eseguire la microscopia confocale.
- c)** 4.98 ml sono stati utilizzati per preparare il lisato cellulare.

Il campione di cui al punto c) è stato centrifugato alla velocità di 1600 rpm per 5

minuti, ed il pellet risospeso in 0.5 ml di buffer di lisi (50 mM Tris/HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 % NONIDET P-40, 1 mM Sodio Ortovanadato e 1 X Mix Antiprotease).

Dopo lo step di lisi, i campioni sono stati centrifugati ad una velocità di 10.000 rcf per 10 minuti, il pellet è stato allontanato ed il sopranatante è stato trasferito in tubi conici da centrifuga in ghiaccio. A questo punto 100-200 µg di lisato cellulare sono stati trasferiti in eppendorf da 1.5 ml per eseguire lo step di immunoprecipitazione.

L'immunoprecipitazione è stata eseguita aggiungendo al lisato cellulare 2 µl (~0.4 µg) di anticorpo primario anti-biotina (Biotin 39-15D9: sc-57636). Dopo 60 min di incubazione a 4 °C sono stati aggiunti 20 µl di Proteina A/G PLUS-Agarose (Santa Cruz Biotechnology, INC. SC-2003). L'eppendorf è stata incubata O.N. a 4 °C in agitazione su un agitatore a piatto rotante verticale. L'immunoprecipitato è stato raccolto mediante centrifugazione a 1000 rcf per 5 minuti a 4 °C, e lavato 3 volte con 1.0 ml di PBS alternando cicli di centrifugazione a 1000 rcf per 5 minuti a 4 °C. Al termine dei lavaggi, il precipitato è stato risospeso in 40 µl di sample buffer riducente 1 X per SDS-PAGE. Quindi il campione è stato utilizzato per l'analisi in SDS-PAGE e western blot.

2.14 SDS-PAGE e western blot

L'SDS-PAGE è stata eseguita come descritto da Leammeli (*Leammeli, 1970*),

allestendo un gradiente di acrilamide 8-18 % in tampone 0.375 M Tris/HCl pH 8.8, 0.1 % SDS, ed utilizzando un sistema elettroforetico Amersham. La corsa elettroforetica è stata condotta a 10 mA per 16 ore.

Il western blot è stato eseguito con un sistema semi-dry blotting dell'American Bionetics (modello SDB-1000), utilizzando come tampone di trasferimento 25 mM Tris base e 10 mM glicina, ad una corrente costante di 0.8 mA/cm² per 90 minuti. La membrana utilizzata per il western blot è stata l'Immobilon-P membrane (Millipore). Al termine del western blot la membrana Immobilon-P è stata bloccata incubando per 60 minuti a temperatura ambiente con PBS-Tween-Latte (PBS pH 7.5, 0.2 % Tween-20, 5 % latte in polvere Bio-Rad). La membrana è stata lavata 3 volte con PBS-Tween ed incubata O.N. a 4 °C in agitazione in presenza dell'anticorpo primario monoclonale anti-biotina (Biotin 39-15D9: sc-57636) in rapporto 1/100 (v/v) di PBS-Tween, 3 % BSA. La membrana è stata lavata nuovamente in PBS-Tween, per eliminare l'eccesso di anticorpo primario non legato, ed incubata con di anticorpo secondario IgG anti-mouse HRP (horseradish-perossidasi) coniugato, in rapporto 1/20.000 (v/v) con PBS-Tween, 3 % BSA, per 1 h a temperatura ambiente. Gli spot immunoreattivi sono stati rilevati attraverso chemiluminescenza (ECL Plus, GE Healthcare).

2.15 Microscopia confocale

Le cellule (2×10^4) sono state strisciate su un vetrino non carico elettrostaticamente, fissate per 15 minuti in formaldeide 4 %, lavate due volte con PBS, permeabilizzate con 1 % Triton X-100 per 30 minuti a temperatura ambiente e lavate di nuovo con PBS. Successivamente i vetrini sono stati incubati con 1 % BSA in PBS per 30 minuti a temperatura ambiente, passati i quali, sono stati incubati O.N. con gli anticorpi primari anti-biotina ed anti-CD44 (1/100 in 1 % BSA dissolto in PBS) a 4 °C. I vetrini sono stati lavati, ed incubati per 60 minuti a temperatura ambiente con gli anticorpi secondari coniugati con i fluorocromi, ficoeritrina (PE) per anti-biotina ed isotiocianato di fluoresceina (FITC) per anti-CD44 (1/100 in 0.1 % BSA dissolto in PBS), lavati di nuovo e montati con un vetrino coprioggetti. I vetrini sono stati esaminati al microscopio confocale Leica TCS SP2 dotato di un obiettivo ad immersione in acqua HCX Apo 0.8.

RISULTATI E DISCUSSIONE

3 RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 Valutazione istologica e biochimica della EAT

L'immunizzazione dei topi CBA/J (H-2^k) rispettivamente con una frazione di hTg condroitinata (hTgCS) e non condroitinata (hTgCS₀) ha evidenziato profonde differenze sulla severità della EAT indotta. Per esempio sono state riscontrate differenze per quanto riguarda la concentrazione di ormoni T3 e T4 nel siero murino e per quanto concerne l'aspetto istologico della malattia.

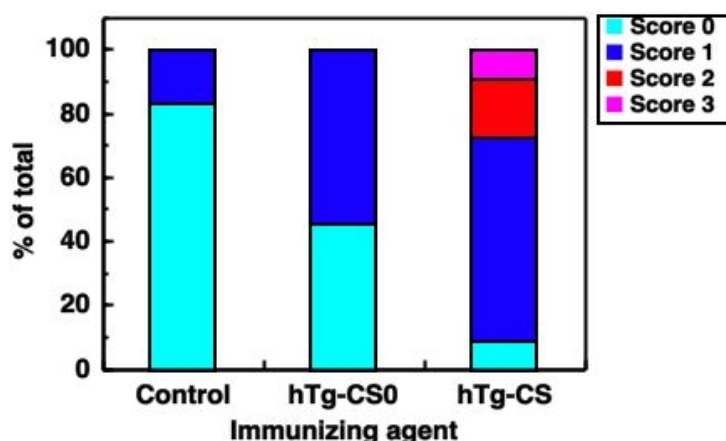


Tabella 1. Valori percentuali dello score istologico dell'EAT

	Numero di topi	Score 0	Score 1	Score 2	Score 3
Controlli	10	90.0 %	10.0 %	0 %	0 %
TgCS ₀	19	42.1 %	57.9 %	0 %	0 %
TgCS	19	15.8 %	68.4 %	10.5 %	5.3 %

Figura 6. Score istologico dell'EAT, che indica la severità dell'infiltrazione, da parte delle cellule mononucleate, delle tiroidi di topi CBA/J (H-2^k) immunizzati con differenti forme dell'hTg. Lo score istologico dell'EAT è stato calcolato usando modificazioni dei criteri adottati da Virginis et al. (2002) nel seguente modo: 0 = assenza di infiltrazione; 1 = piccolo accumulo interstiziale tra due o più follicoli; 2 = uno o due foci di cellule infiammatorie più grandi delle

dimensioni dei follicoli; 3 = 10-40 % dell'area occupata da cellule infiammatorie; 4 = 40-80 % dell'area infiltrata da cellule infiammatorie.

La figura 6 e la tabella 1 mostrano gli score assegnati agli animali, alla fine del terzo esperimento di immunizzazione, ricavati dall'esame istologico di 30 sezioni di tiroide per lobo basandosi sull'estensione dell'infiltrazione del tessuto da parte delle cellule mononucleate. Gli score 2 e 3 corrispondono rispettivamente ad uno o più foci di infiltrazione, e ad una percentuale di infiltrazione da parte delle cellule mononucleate che occupa il 10-40 % del campo d'area della sezione. Gli score 2 e 3 sono stati ritrovati solo nei topi immunizzati con hTgCS ma non in quelli con hTgCS₀ che hanno mostrato score che vanno da 0 a 1 quindi con assente o limitata infiltrazione tiroidea.

Un tipico aspetto di infiltrazione tiroidea con cellule mononucleate, con uno score 2, assegnato secondo la nostra valutazione, è mostrato in figura 7, confrontata con una sezione normale proveniente da un topo di controllo

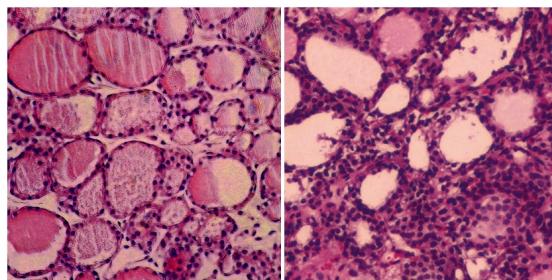


Figura. 7. Aspetti rappresentativi di infiltrazione della tiroide nell'EAT, in confronto ad una tipica sezione normale proveniente da un topo del gruppo di controllo. La sezione di tiroide a destra è stata ottenuta da un topo del gruppo immunizzato con hTgCS, la sezione a sinistra, normale, proviene da un topo del gruppo di controllo.

Il differente grado di severità nel coinvolgimento della tiroide, documentato

dagli esami istologici, è stato confermato dall'incremento differenziale, nel siero dei topi, dalle concentrazioni degli ormoni T3 e T4 (Fig. 8). Queste risultavano molto basse e statisticamente irrilevanti nei topi immunizzati con hTgCS₀ mentre enormemente e significativamente aumentati in quelli immunizzati con hTgCS.

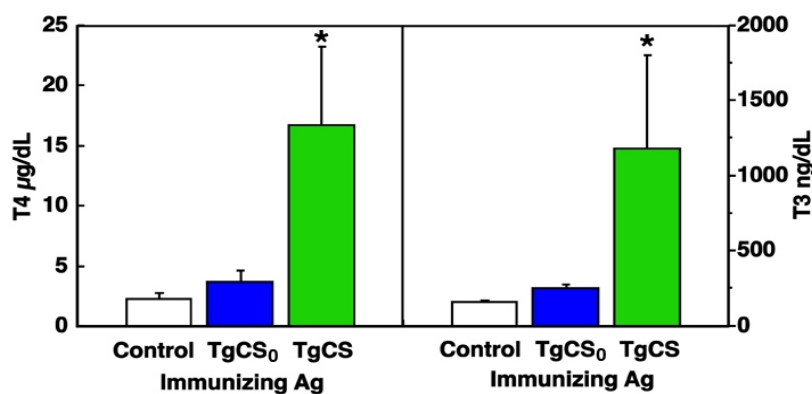


Figura 8. Concentrazione sierica degli ormoni T3 (3,5,5'-triiodothyronine) e T4 (thyroxine) in topi immunizzati con differenti forme dell' hTg. I risultati sono espressi come media ± S.D.

E' risaputo che l'EAT è caratterizzata da un basso grado di infiltrazione della ghiandola tiroidea da parte delle cellule mononucleate, anche in ceppi murini geneticamente suscettibili. L'infiltrazione tiroidea risulta essere più bassa anche quando viene usata come agente immunizzante la Tg umana rispetto a quella murina, nonostante sia generalmente appurato che i linfociti T autoreattivi murini riconoscano epitopi conservati tra le due specie. Nei nostri studi abbiamo visto che l'hTg è regolarmente composta da una miscela di hTgCS₀ ed hTgCS in proporzioni variabili tra

i diversi individui. Alla luce di questi dati sembra che l'induzione dell'EAT nei topi CBA/J (H-2^k) dipenda principalmente, se non esclusivamente, dalla frazione di hTgCS (Fig. 6). Poiché gli studiosi di EAT hanno sempre usato pool non frazionati di hTg come agente immunizzante per i loro esperimenti, sembra che la severità della malattia sia stata profondamente influenzata dalla composizione delle preparazioni di hTg usate, non solo in relazione alla abbondanza percentuale della hTgCS usata per l'immunizzazione, ma anche alla proporzione relativa della hTgCS eterodimerica ed omodimerica, nonché alla lunghezza media delle catene di condroitin-6-solfato legate a ciascuna subunità della hTg.

3.2 Risposte proliferative secondarie degli splenociti murini

Le risposte proliferative degli splenociti murini sia all'hTgCS che alla hTgCS₀ risultano marcatamente più alte nei topi immunizzati con hTgCS, paragonate ai topi immunizzati con l'hTgCS₀ (Fig. 9).

In entrambi i gruppi, la risposta all'hTgCS₀ ha mostrato una tendenza all'inibizione alle più alte dosi, in contrasto alla risposta all'hTgCS.

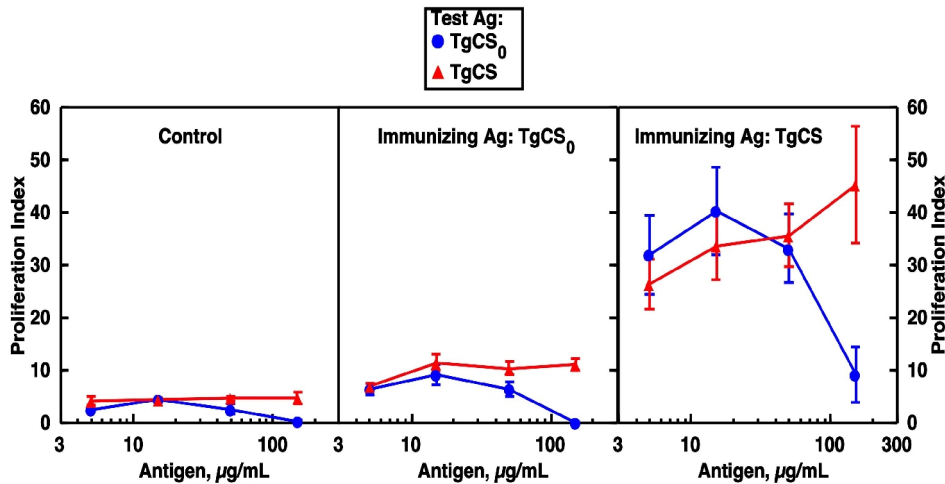


Figura. 9. Risposte proliferative secondarie dei linfociti splenici isolati dai topi CBA/J(H-2^k) immunizzati e re-stimolati in vitro con hTgCS₀, hTgCS, hTgCSgp, o con hTgCS₀ più hTgCSgp, anche in presenza dell'anticorpo monoclonale anti-CD44 KM114 I risultati sono medie ± S.E.M. di 5 o 6 animali per gruppo sperimentale. Tutte e dieci le citochine sono state saggiate usando una tecnica multiparametrica di citometria a flusso basata su beads magnetiche.

3.3 Saggio della produzione di citochine nelle risposte proliferative secondarie

Le concentrazioni delle citochine multiple sono state misurate nei sopranatanti dei saggi di proliferazione eseguiti con gli splenociti provenienti dai topi CBA/J(H-2^K) immunizzati con hTgCS₀ e hTgCS, mediante l'uso di una tecnica cito-fluorimetrica multi parametrica basata su beads magnetiche. Le citochine saggiate sono finalizzate a spiegare la polarizzazione delle cellule CD4⁺ Th nelle risposte cellulo-dipendente, queste includono IFN- γ , GM-CSF, TFN- α , IL-2, IL-1b,IL-6, IL-4, IL-5, IL-17 e IL-10; i risultati ottenuti sono mostrati nella figura 10.

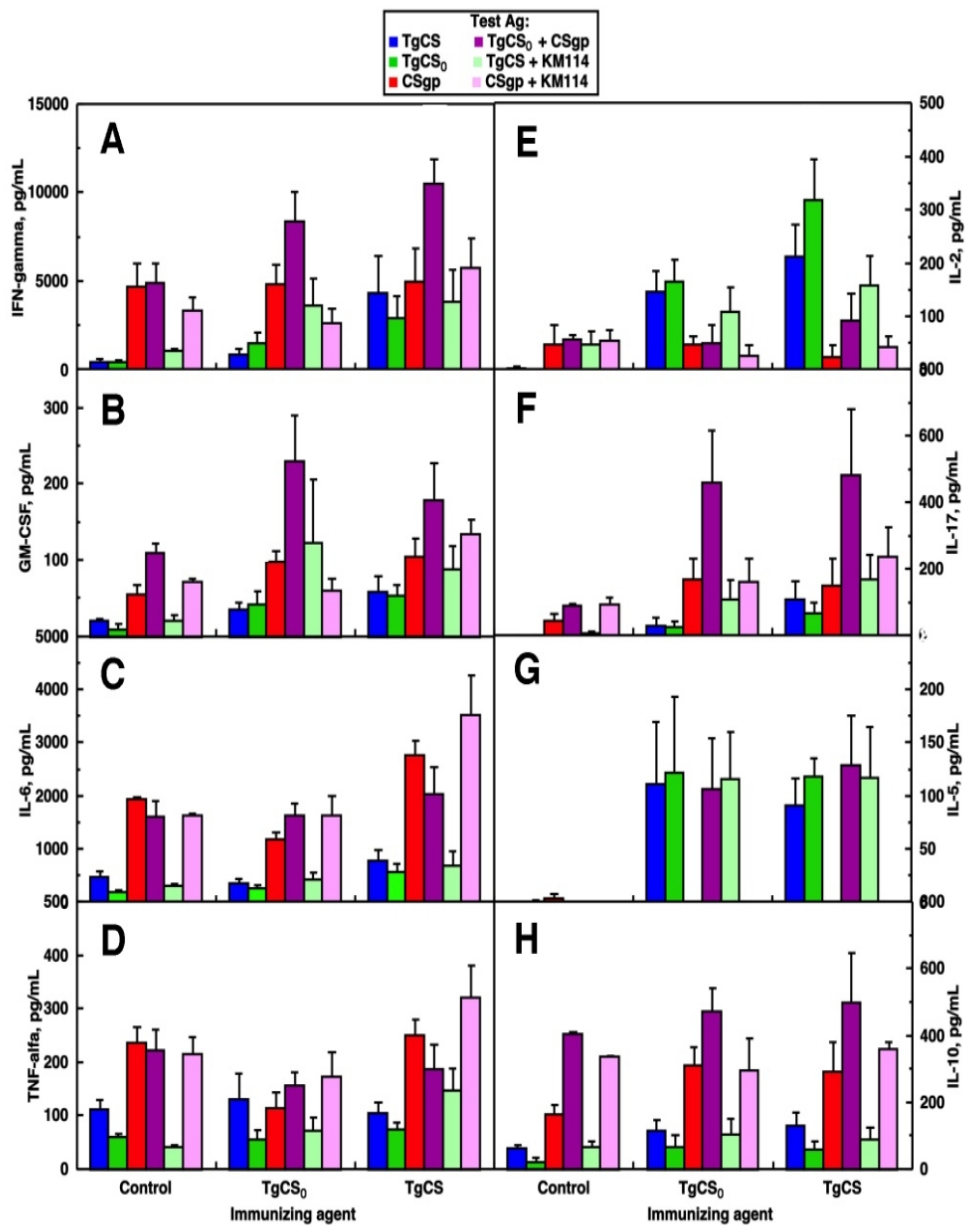


Figura. 10. Risposte proliferative secondarie dei linfociti splenici isolati dai topi CBA/J(H-2^k) immunizzati e re-stimolati in vitro con hTgCS₀, hTgCS, hTgCSgp, o con hTgCS₀ più hTgCSgp, anche in presenza dell'anticorpo monoclonale anti-CD44 KM114. I risultati sono medie ± S.E.M. di 5 o 6 animali per gruppo sperimentale. Tutte e dieci le citochine sono state saggiate usando una tecnica multiparametrica di citometria a flusso basata su beads magnetiche.

L' **IFN- γ** è un tipico indicatore della polarizzazione in senso Th1 della differenziazione delle cellule CD4⁺ TH, analizzando il pannello A della figura 10 si possono fare le seguenti osservazioni: a) la risposta secretoria sia all'hTgCS che all'hTgCS₀, raggiunge i maggiori livelli nei topi hTgCS-immuni, rispetto ai topi hTgCS₀-immuni risultando completamente assente o veramente bassa nei controlli; b) l'aggiunta del glicopeptide purificato hTgCSgp evoca un'intensa risposta secretoria di grandezza definita in tutti i gruppi, includendo gli animali di controllo; c) il peptide sintetico LTAGSGLRE non glicosilato omologo del glicopeptide hTgCSgp, non ha effetti, facendo osservare, in tutti i casi e per tutte le citochine saggiate, risposte prossime alla linea di base (dati omessi nella figura per ragioni di chiarezza); d) gli effetti combinati dell'hTgCS₀ con hTgCSgp sono additivi nei topi immunizzati con hTgCS e ancora di più nei topi hTgCS₀-immuni, nei quali il contributo da parte del solo hTgCS₀ è stato più basso rispetto ai topi hTgCS-immuni. Risultati simili sono stati ottenuti anche con il GM-CSF (Fig. 10, pannello B), un'altra tipica citochina Th1-like, anche se le risposte all' hTg tra i due gruppi sperimentali non ha fatto osservare differenze statisticamente significative; e) l'anticorpo monoclonale KM114, che dovrebbe inibire il legame dell'acido ialuronico alla molecola CD44 (*Katoh et al., 1995*), non ha mostrato un significativo effetto sull'azione dell'hTgCS e dell'hTg CSgp (Fig. 10).

Gli effetti osservati con l'hTgCSgp, visti anche alla luce dei dati riportati sopra, concernenti le risposte proliferative degli splenociti, possono rappresentare la composizione di due distinte azioni: 1) una sollecitazione da parte dell'unità oligosaccaridica condroitin 6-solfato dell'hTgCSgp alla proliferazione delle cellule T, indipendente dal loro stato di attivazione, come è stato evidente anche negli splenociti di controllo; 2) un aiuto alle cellule APC nella sensibilizzazione delle cellule T alla hTg, vale a dire ai determinanti antigenici all'interno della sua struttura peptidica, come suggerito dal fatto che topi immunizzati con hTgCS hanno mostrato risposte proliferative secondarie aumentate ad entrambe le forme di hTg.

La secrezione di **IL-2** in risposta all'hTgCS₀ e all'hTgCS è stata più abbondante nei topi immunizzati con hTgCS in accordo con il supposto ruolo di enhancing della catena oligosaccaridica condroitin-6-solfato dell'hTg nella differenziazione Th1 delle cellule T hTg reattive (Fig. 10, pannello E). Comunque, in alcuni gruppi sperimentali, la stimolazione con hTgCSgp non fa osservare un significativo aumento dei livelli di IL-2. Questo dato contrasta con l'effetto comune attribuito a IFN- γ , GM-CSF e IL-2 nella polarizzazione Th1 della differenziazione delle cellule TH. A tal proposito è stato riportato che i rapporti quantitativi dell'espressione delle citochine possono fluttuare in risposta a variazioni nelle condizioni di attivazione, così come la quantità e la qualità di

specifici o non specifici ligandi del TCR. In particolare , la forma tronca del peptide della proteina basica della mielina (MBP) che induce la secrezione di una considerevole quantità di IFN- γ dalle cellule T MBP-reattive, senza indurre produzione o proliferazione di IL-2. Al contrario, il superantigene dell'enterotossina stafilococcica elicitava sia una risposta proliferativa sia la produzione di IL-2, senza elicitarne la secrezione di IFN- γ o TFN- α (Sun et al., 1995). Queste referenze, insieme alle nostre osservazioni, illustrano la complessità dell'attivazione e della differenziazione delle cellule T, particolarmente in relazione con il ruolo giocato dalle modificazioni degli autoantigeni e dei differenti modi di interazione.

L'analisi delle citochine **IL-6 e TFN- α** (Fig. 10, pannelli C e D), propongono commenti comuni: a) non sono osservate significative differenze nella risposta all'hTg tra i differenti gruppi; b) hTgCSgp elicitava una forte risposta come osservato con IFN- γ e GM-CSF in tutte le condizioni dove è stato presente; c) non sono stati osservati effetti sinergici dopo l'uso della formula combinata di hTgCS₀ con hTgCSgp nei topi immunizzati con hTgCS₀, né tanto meno effetti additivi nei topi immunizzati con hTgCS; d) inoltre l'uso dell'anticorpo monoclonale KM114 anti-CD44 in combinazione con hTgCSgp è stato associato con un aumento della secrezione di IL-6 e TFN- α nei topi hTgCS-immuni in contrasto a quanto osservato per IFN- γ e GM-CSF.

Data la predominante origine dell'IL-6 dalle cellule presentanti l'antigene stimolate, le osservazioni riportate sembrano indicare che, a differenza delle cellule T, la catena oligosaccaridica condroitin 6-solfato dell'hTg, è stata anche abile a esercitare i suoi effetti su alcune sottopopolazioni di APCs. Questo in accordo con un numero di osservazioni già pubblicate (Rachmilewitz et al. 1998; Termeer et al.2001). La dimostrazione di questo può risiedere nella mancanza di variazioni osservate , tra i differenti gruppi sperimentali, nella sensibilizzazione e risposta degli splenociti all'hTg, necessariamente implicando il contributo delle cellule T, e così, meglio riflesso dalle variazioni nella produzione di IFN- γ , GM-CSF e IL-2. Anche la secrezione del TNF- α è considerato normalmente un marcatore della differenziazione Th1. E' possibile, comunque, che nelle nostre condizioni sperimentali, molto di questa citochina derivi da macrofagi attivati, DC o cellule NK. Questo può riflettere una dissociazione nel pattern di produzione delle citochine dalle cellule Th1 differenziate tra la secrezione di IFN- γ , GM-CSF da un lato e IL-2 dall'altro.

La produzione di **IL-17** è una caratteristica della differenziazione delle cellule Th17, una specifica sottopopolazione di cellule Th, coinvolte nel controllo della risposta infiammatoria come anche nello sviluppo dell'autoimmunità.

Un basso livello di produzione della IL-17 in risposta all'hTg è stato osservato

solo nei topi hTgCS-immuni e bassi livelli sono anche prodotti in risposta all'hTgCSgp negli animali immunizzati ma non nei controlli (Fig. 10, pannello F). Comunque, un effetto sinergico tra hTgCS₀ e hTgCSgp è stato osservato nei topi immunizzati.

Anche se fattori promuoventi lo sviluppo del fenotipo Th1 sono efficaci ad inibire la differenziazione in senso Th17, ci sono molte osservazioni che supportano l'idea che entrambe le sotto popolazioni di cellule possono cooperare nell'induzione dell'encefalite autoimmune sperimentale (EAE) nel topo (Bettelli et al.2007). I nostri dati sostengono un coinvolgimento delle cellule produttrici IL-17 anche nello sviluppo dell'EAT.

Un'abbondante produzione di **IL-5** è stata misurata in entrambi i gruppi di topi, immuni-hTgCS₀ ed hTgCS, ma non nei controlli, stimolati con tutte e due le forme di hTg, mentre lo stimolo con hTgCSgp non ha avuto effetti in nessuno di essi (Fig. 10 pannello G). E' abbastanza ben documentato che la Tg è capace ad elicitare, insieme alla risposta delle cellule T, anche una ben definita risposta anticorpale. Dai nostri dati risulta abbastanza chiaro che le unità oligosaccaridiche di condroitin-6-solfato della tireoglobulina umana non sono capaci di indurre in ogni caso la differenziazione in senso Th2 dei linfociti CD4⁺.

La citochina **IL-10** è stata prodotta in tutti i gruppi sperimentali in risposta

all'hTgCSgp e, in misura minore ad entrambe le forme di hTg (Fig. 10, pannello H).

La simultanea produzione di citochine caratteristiche della polarizzazione Th1 (IFN- γ e IL-2) e Th2 (IL-5 e IL-10) è stata precedentemente osservata con le cellule T MBP-reattive di ratto (Sun et al. 1995). Come per le cellule T produttrici IL-10 in risposta all'MBP, rimane da stabilire se la capacità delle cellule T murine a produrre IL-10 in risposta all'hTgCSgp o all'hTgCS₀ in presenza di hTgCSgp sia direttamente coinvolta nella loro attività tiroiditogenica.

Infine, meritano un commento i risultati ottenuti con l'anticorpo monoclonale anti-CD44, KM114. L'uso di questo anticorpo monoclonale come presunto competitore dell'hTgCSgp è stato suggerito da lavori in merito, speculanti da un lato il coinvolgimento del CD44 sugli effetti della forma contenente condroitin solfato della catena invariante (CD74) sulle risposte mitogeniche ed allogeniche delle cellule T (Naujokas et al.1993) e, dall'altro lato gli effetti inibitori dell'anticorpo KM114 nel binding dell'acido ialuronico al CD44 (*Zheng et al., 1995*)

L'apparente mancanza di effetti di KM114 mAb sulla produzione di citochine, eccetto che per IL-2, nelle risposte proliferative secondarie all'hTgCS e hTgCSgp non esclude, a nostro parere, il possibile coinvolgimento di CD44 come recettore della catena oligosaccaridica condroitin-6-solfato dell'hTg. Infatti, le interazioni dei mAb diretti

contro CD44 hanno un elevato grado di selettività in merito alla loro specificità epitopica e funzionale. Per questo l'anticorpo monoclonale KM114 potrebbe inibire il legame di HA al CD44 ma non necessariamente quello dell'hTgCSgp (Zheng *et al.*, 1995). Solo ulteriori sperimentazioni nei topi knockout CD44 possono essere in grado di dimostrare o escludere il coinvolgimento di CD44 negli effetti provocati dal condroitin-6-solfato dell'hTg.

3.4 Produzione di anticorpi contro gli antigeni hTgCS₀ ed hTgCS

L'immunizzazione con entrambe le forme di hTg è stata accompagnata dalla produzione di significative quantità di IgG dirette contro hTgCS₀ ed hTgCS. Le concentrazioni di IgG totali, IgG1 e IgG2a non variano tra i gruppi sperimentali e nei controlli non sono osservati anticorpi anti-hTg (Fig 11).

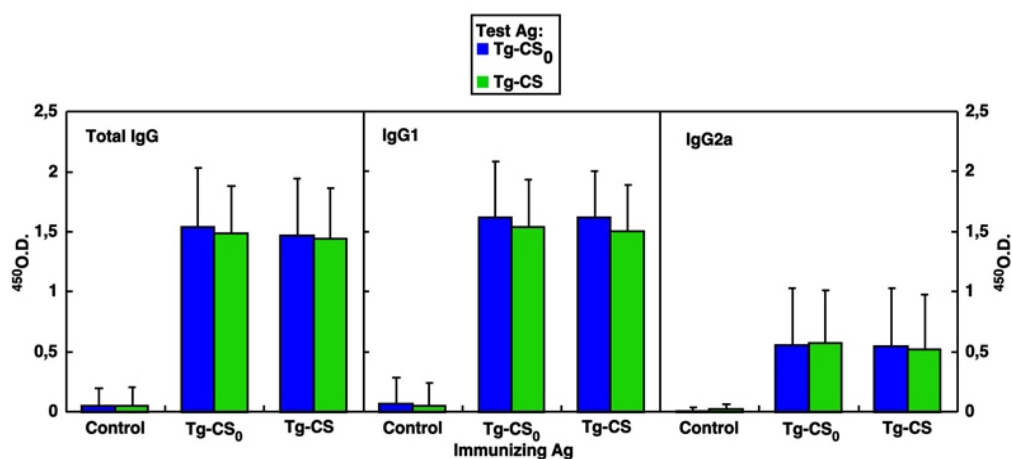


Figura 11. Concentrazione degli anticorpi IgG delle sottoclassi IgG1 e IgG2a diretti contro hTgCS₀ ed hTgCS nei sieri di topi CBA/J (H-2^k) immunizzati con entrambi gli antigeni. Gli antigeni sono stati utilizzati ad una concentrazione di 1 µg per piastra. I risultati sono espressi come media ± S.D. di risultati ottenuti da 3 (IgG) e 6 esperimenti (IgG1 and IgG2a).

Questi risultati mostrano la scarsa capacità del CS della Tg di indurre la produzione di anticorpi che è già stata suggerita dalla mancanza di effetti dell'hTgCS e del glicopeptide hTgCSgp nel produrre citochine tipiche del pattern Th2 nelle risposte proliferative secondarie dei linfociti splenici dai topi immunizzati con le diverse forme di hTg. E' stata investigata anche la presenza di anticorpi riconoscenti il glicopeptide nei sieri dei topi immunizzati con hTGCS₀ o hTgCS (Fig 12).

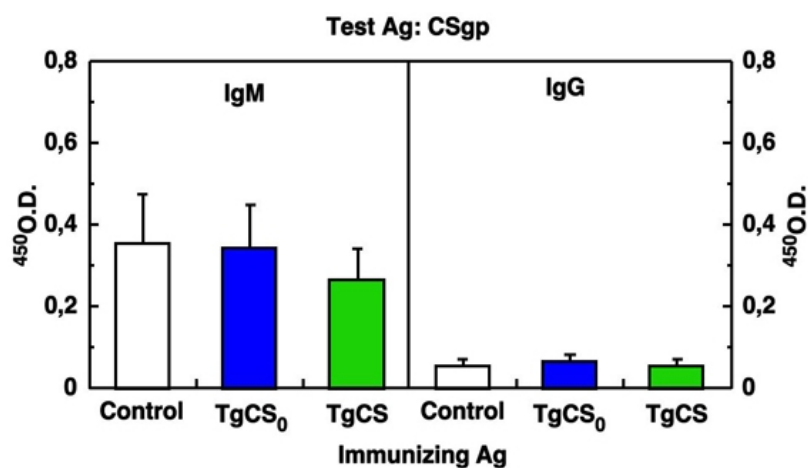


Figura 12. Concentrazione degli anticorpi IgG ed IgM diretti contro l'antigene hTgCSgp coniugato con la biotina in sieri di topi CBA/J (H-2^k) immunizzati con hTg e controlli. I risultati combinati di due esperimenti di immunizzazioni sono espressi come media ± S.E.M.

Le differenze tra i due gruppi non sono state statisticamente significative. La presenza di anticorpi diretti contro hTgCSgp non sembra riflettere una risposta immunitaria adattativa specifica al peptide glicosilato in quanto non sono stati trovati livelli comparabili di IgG ed IgM nei controlli e negli animali immunizzati. Questo però

non ci sorprende alla luce della diffusione ed abbondanza dei glicosamminoglicani e dei proteoglicani contenenti CS nella matrice extracellulare e nel tessuto connettivo dei tessuti costituenti il corpo dei topi.

Risultati interessanti sono stati ottenuti invece dallo studio del possibile ruolo del CS di influenzare il processing e/o la presentazione di epitopi immunogenici vicino alla regione carbossi-terminale dell'hTg nelle vicinanze del sito di addizione del condroitin 6-solfato alla Ser2730. A tal fine sono stati disegnati e quindi sintetizzati chimicamente sei peptidi di 12 amminoacidi che si sovrappongono di quattro residui a ciascuna estremità e che coprono l'intera regione carbossi-terminale che va dal residuo 2702 a quello 2749. Il peptide all'estremo carbossi-terminale, contenente il sito preferenziale di formazione dell'ormone T3 nella Tg, è stato sintetizzato con il T3 alla posizione 2747, in vista del fatto che una significativa produzione di T3 è normalmente trovata in questo sito ormogenico in vivo, anche a bassi livelli di disponibilità di iodio. I peptidi, coniugati con la biotina, sono stati utilizzati per effettuare saggi ELISA per individuare la concentrazione di IgG nei sieri dei topi sperimentali (Fig. 13). Bassi livelli di IgG sono stati rilevati nei topi di controllo mentre significativi livelli di IgG sono stati rilevati nei sieri dei topi immunizzati con hTgCS₀ e hTgCS e trattati con il peptide carbossi-terminale 2738-2749 (T3) della hTg e a più bassa concentrazione con il peptide

della hTg 2731-2742 immediatamente precedente.

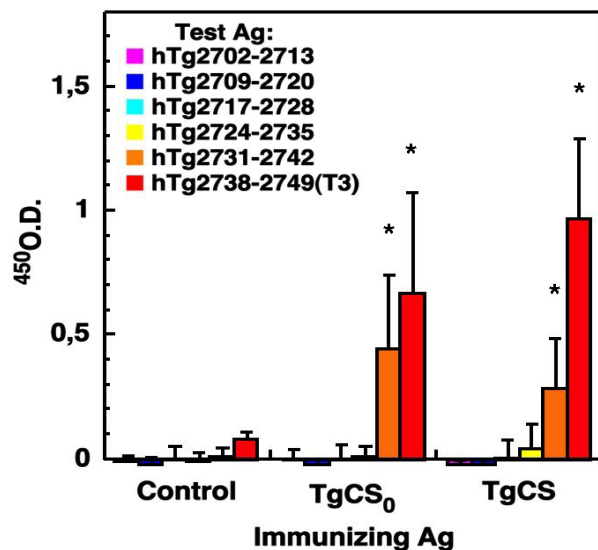


Figura 13. Concentrazione di anticorpi IgG diretti contro un set di sei peptidi sintetizzati chimicamente che coprono l'intera sequenza amminoacidica dell'hTg che va dal residuo 2702 al residuo 2749 nei sieri di topi CBA/J (H-2^k) immunizzati con hTg e controlli. I risultati combinati di due esperimenti di immunizzazione, sono espressi come media \pm S.D. *indicano la rilevanza statistica tra topi immunizzati con le due forme di hTg e controlli ($p < 0.05$).

Questi dati non escludono che gli effetti dell'aggiunta del condroitin 6-solfato sulla suscettibilità della hTg al processing e alla presentazione degli epitopi cellule B-dipendenti possano essere riflessi su altri siti della struttura della hTg, corrispondenti a regioni più distanti nella sequenza della proteina, che potrebbero entrare in contatto o in vicinanza della catena condroitin 6-solfato, come conseguenza del folding e della dimerizzazione delle catene polipeptidiche costituenti la struttura quaternaria della hTg.

In riguardo alla immunogenicità del dominio carbossiterminale della hTg

contenente il sito di formazione del T3, i nostri dati rappresentano la prima documentazione del fatto che l'immunizzazione di topi suscettibili all'EAT, con hTg, possa elicitarne la produzione di anticorpi diretti contro questa regione della proteina contenente il sito preferenziale di formazione del T3 alla Tyr 2747. Altri autori precedentemente riportano la presenza di anticorpi in topi immunizzati con peptidi sintetizzati chimicamente centrati sui due maggiori siti ormogenici della Tg, corrispondenti ai residui 1-12 e 2549-2560 della hTg (Kong *et al.* 1995; Wan *et al.* 1997). Una serie di evidenze suggeriscono che l'antigenicità della Tg è influenzata dal suo contenuto in iodio ed ormoni. Cellule linfonodali CBA (LNC) stimulate in vivo con tireoglobulina di topo o con il peptide 2549-2560 della hTg contenente T4 sono capaci di trasferire EAT a ospiti singenici mediante transfer adottivo, in seguito ad attivazione in vitro con il peptide (Hutchings *et al.*, 1992). Quindi, l'antigenicità della Tg sembra essere correlata tanto alla formazione di iodotironine (un evento che avviene naturalmente durante la iodinazione), quanto alla iodinazione stessa : infatti, il peptide 2549-2560 della hTg contenente una tironina (T0)n nella posizione 2553, è stata capace, in topi CBA, a indurre risposte proliferative e attivare il trasferimento adottivo dell'EAT a partire dalle cellule LNC (stimolate con tireoglobulina murina o con lo stesso peptide), in seguito ad espansione *in vitro*, sebbene con più bassa efficienza rispetto al

corrispondente peptide contenente T4. Anche i peptidi T4(1-12) e T0(1-12), contenenti rispettivamente T4 o T0 nella posizione 5, stimolano debolmente, in ordine di potenza decrescente, cellule T di topo *in vitro* innescate con Tg (Kong *et al.*, 1995). Plausibilmente, la Tg normalmente presente a basse concentrazioni nel siero, la quale è almeno interamente priva di iodio ed appare essere secreta dal polo basolaterale delle cellule follicolari, senza raggiungere il sito apicale di iodinazione (Ikekubo *et al.*, 1981, Schneider *et al.*, 1983), potrebbe avere scarso potere immunogeno, essendo un antigene self partecipante nei processi di delezione clonale durante lo sviluppo embrionale (Savin *et al.* 1990), mentre la Tg più iodinata e ormonogenica, normalmente segregata all'interno dei follicoli tiroidei e rilasciata nel sangue solo sotto condizioni anormali, così come il cancro della tiroide o tiroiditi acute o sub-acute, potrebbe attivare specifiche cellule T riconoscenti determinanti antigenici iodinazione-dipendenti.

3.5 Risposte proliferative secondarie dei linfociti T CD4⁺ all'hTgCS₀, hTgCS ed al glicopeptide hTgCSgp

Oltre alle risposte proliferative degli splenociti murini isolati da ciascun gruppo di topi immunizzati con le varie forme dell'hTg, sono state studiate anche le risposte proliferative secondarie dei linfociti T CD4⁺ murini isolati mediante metodo immunomagnetico e stimolati *in vitro* con hTgCS₀, hTgCS e hTgCSgp, come tali o

anche in presenza di anticorpi anti-CD3 ed anti-CD28.

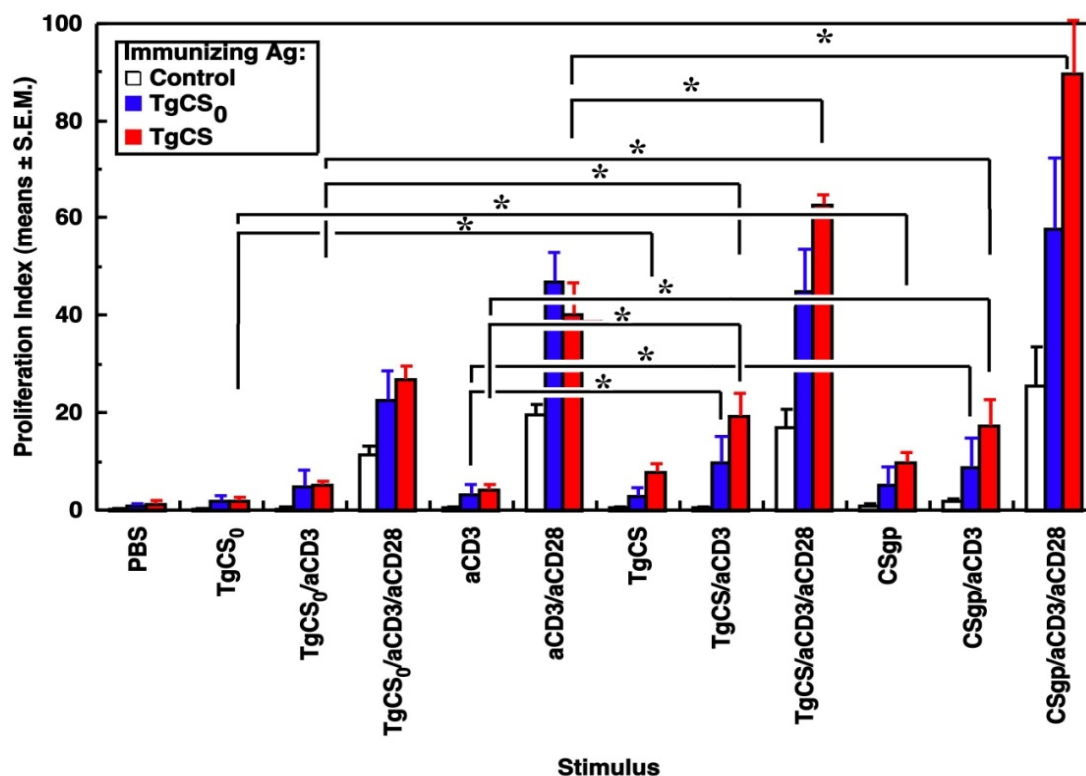


Figura 14. Risposte proliferative secondarie dei linfociti T CD4⁺ splenici dei topi CBA/J(H-2^k) all'hTgCS₀, hTgCS ed al glicopeptide hTg-CSgp. I linfociti T CD4⁺ isolati con metodo immunomagnetico dalle milze dei topi CBA immunizzati, come descritto nella sezione Metodi, sono stati stimolati *in vitro* con hTg-CS₀, hTgCS o con il glicopeptide purificato contenente l'unità oligosaccaridica condroitin 6-solfato (hTgCSgp), come tali o anche in presenza di anticorpi anti-CD3 ed anti-CD28. I risultati sono espressi come medie ± S.E.M. * indicano la rilevanza statistica tra topi immunizzati con le forme di hTg e controlli ($p < 0.05$).

L'analisi dei dati consente le seguenti osservazioni:

- a. La stimolazione con hTgCS₀ non ha evocato risposte proliferative significativamente differenti rispetto ai controlli negativi con PBS in alcuno dei gruppi sperimentali, mentre vivaci risposte proliferative sono state ottenute nei controlli positivi, rappresentati dalle cellule T CD4⁺ degli animali dei diversi

gruppi sperimentali re-stimolate con anticorpi anti-CD3 uniti agli anticorpi anti-CD28 (Figura 14);

- b. Le stimolazioni con hTgCS e con hTgCSgp, d'altra parte, sono risultate associate con indici di proliferazione significativamente maggiori, in paragone con la stimolazione con hTgCS₀, limitatamente al gruppo degli animali immunizzati con hTgCS (Figura 14);
- c. Questi ultimi effetti non sembrano ascrivibili alla stimolazione del TCR da parte dell'unità condroitin-6-solfato associata alla hTgCS ed al glicopeptide hTgCSgp, in quanto anche la stimolazione con hTgCS unita agli anticorpi anti-CD3, oppure con hTgCSgp unito agli anticorpi anti-CD3, ha stimolato la proliferazione delle cellule T CD4⁺ purificate, in assenza di APC, in misura significativamente maggiore rispetto alla stimolazione con i soli anticorpi anti-CD3, tanto nel gruppo degli animali immunizzati con hTgCS₀ quanto nel gruppo degli animali immunizzati con hTgCS. Sembra, perciò, che lo stimolo proliferativo apportato dall'unità oligosaccaridica condroitin-6-solfato si configuri piuttosto come co-stimolo; è da notare che il contributo dell'unità CS alla stimolazione proliferativa delle cellule T CD4⁺ è risultato maggiore negli animali immunizzati con hTgCS piuttosto che con hTgCS₀ (Figura 14), il che

suggerisce che tra gli effetti della co-stimolazione apportata dall'unità CS in fase di sensibilizzazione primaria delle cellule T hTg-specifiche vi sia pure un incremento di sensibilità delle cellule T effettrici antigene-specifiche (ad esempio, per abbassamento della soglia di co-stimolazione o per aumento dell'espressione dei recettori di co-stimolazione) alla successiva esposizione all'unità CS;

d. considerazioni analoghe a quelle fatte al punto c) possono essere fatte in relazione alle differenze riscontrate tra le risposte alle stimolazioni con hTgCS unita agli anticorpi anti-CD3, oppure con hTgCSgp unito agli anticorpi anti-CD3, e la stimolazione con hTgCS₀ unita agli anticorpi anti-CD3; in questi casi, però, le differenze sono risultate ancora una volta significative all'interno del gruppo di animali immunizzati con hTgCS, mentre non hanno raggiunto significatività statistica nel gruppo degli animali immunizzati con hTgCS₀ (Figura 14);

e. La co-stimolazione fornita dall'unità condroitin-6-solfato associata all'hTgCS ed al glicopeptide hTgCSgp è risultata additiva a quella fornita dagli anticorpi anti-CD28, limitatamente al gruppo degli animali immunizzati con hTgCS (Figura 14). Pertanto, come suggerito più sopra, sembra che essa possa ritenersi mediata

da recettore/i diversi dal CD28 stesso, la cui sensibilità e/o espressione potrebbero risultare aumentati per effetto dell'esposizione all'unità CS all'atto della sensibilizzazione primaria delle cellule T hTg-specifiche.

3.6 Identificazione del recettore di membrana delle cellule T CD4⁺ murine interagente con hTgCSgp

Nella figura 15 è riportata l'analisi, tramite SDS-PAGE e western blot, degli estratti proteici provenienti dalle colture cellulari dei linfociti T CD4⁺ purificati con metodo immunomagnetico dalle milze di topi di controllo (lane A e B), di topi immunizzati con hTgCS₀ (lane C e D) e di topi immunizzati con hTgCS (lane E ed F).

Dapprima le cellule di ciascun gruppo sono state incubate con aliquote di glicopeptide purificato, biotinilato e modificato con un cross-linker bi funzionale (ABH), quindi sono state irradiate con luce UV per permettere il cross linking del gruppo fotoattivabile dell'ABH al recettore riconosciuto dal glicopeptide. Tale approccio ha permesso di legare covalentemente il glicopeptide hTgCSgp alla biotina ed al recettore riconosciuto sulla superficie cellulare dei linfociti T CD4⁺ e di immunorilevare in questo modo la proteina di membrana che ipoteticamente potrebbe essere la candidata nell'interazione con il glicopeptide e di conseguenza l'effettore del suo ruolo co-stimolatorio nella progressione del fenomeno patogenetico della tiroidite autoimmune

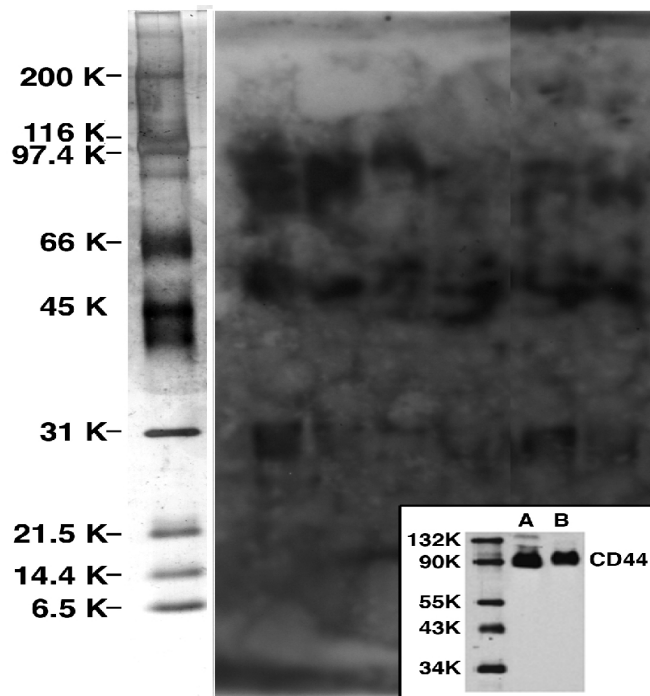


Figura 15. Immunoblot degli immunoprecipitati di lisati delle cellule T CD4⁺ incubate con hTgCSgp. I linfociti T CD4⁺ isolati con metodo immunomagnetico dalle milze dei topi CBA di controllo (corsie A, B) o immunizzati con hTgCS₀ (corsie C, D) o hTgCS (corsie E,F) sono stati incubati con il glicopeptide purificato hTgCSgp coniugato con biotina e modificato con un cross-linker bifunzionale (ABH). Corsie A, C, E: cellule T CD4⁺ in condizioni basali; corsie B, D, F: cellule T CD4⁺ stimulate con anticorpi anti-CD3.

L'inserto mostra una immagine della immunorilevazione dell'antigene CD44 (HCAM) nei lisati di cellule HeLa (corsia A) e HUV-EC-C (corsia B), per mezzo di anticorpi anti-CD44 (sc-7297 Santa Cruz Biotechnology, Inc.). L'immagine è tratta dal Technical Data Sheet del prodotto.

L'analisi mediante immunoblot con anti-biotina, usata sia per immunoprecipitare gli estratti cellulari sia come anticorpo primario nella rilevazione, mette in luce una proteina di massa molecolare di circa 90 KDa come possibile candidata dell'interazione con il glicopeptide hTgCSgp. La notevole somiglianza con il pattern di immunorilevazione dell'antigene CD44 (HCAM) nei lisati di cellule HeLa (inserto Fig. 14), rilevato con un anticorpo commerciale anti-CD44 Santa Cruz, suggerisce, anche se non in maniera diretta, un termine di paragone con le immunorilevazioni da noi

ottenute. Un dato del genere, supportato da ulteriori esperimenti (rilevazione direttamente con anti-CD44 e microscopia confocale), potrebbe essere perfettamente in accordo con l'identificazione di un recettore di membrana quale CD44 come specifico ligando della frazione glicopeptidica della tireoglobulina umana. Dall'analisi mediante immunoblot, non risulta chiaro il pattern di espressione del recettore reattivo all'anti-biotina nelle condizioni di stimolazione con antiCD3/antiCD28 (lanes B, D, F). Sembra comunque che nelle condizioni di attivazione ci sia uno shift della banda verso il basso, reso osservabile dalla diminuzione di intensità della banda superiore e dall'aumento di intensità di una banda inferiore. Tuttavia, saranno gli esperimenti futuri a spiegare i meccanismi alla base di tali variazioni.

3.7 Microscopia confocale

Le ipotesi sperimentali documentate a proposito degli esperimenti di immunoprecipitazione degli estratti cellulari dei linfociti T CD4⁺ e di immunorilevazione con anti-biotina, sono state confermate attraverso esperimenti di microscopia confocale. Le immagini riportate in figura 16 mostrano le acquisizioni ottenute in microscopia confocale effettuate sulle stesse aliquote di linfociti T CD4⁺, incubate con il glicopeptide biotinilato e modificato con ABH, per le quali è stato effettuato l'esperimento di immunoblot. Risulta ben evidente, dall'osservazione delle

microfotografie ai vari ingrandimenti delle sezioni cellulari, che i segnali di emissione della fluorescenza degli anticorpi coniugati con ficoeritrina (PE) per la biotina, cellule in rosso (A, D, G), e isotiocianato di fluoresceina (FITC) per il CD44, cellule in verde (B, E, H), vadano a coincidere nelle immagini corrispondenti alla sovrapposizione (C, F, I). Tale risultato dimostra la colocalizzazione del glicopeptide biotinilato e modificato con ABH con l'integrina di membrana CD44.

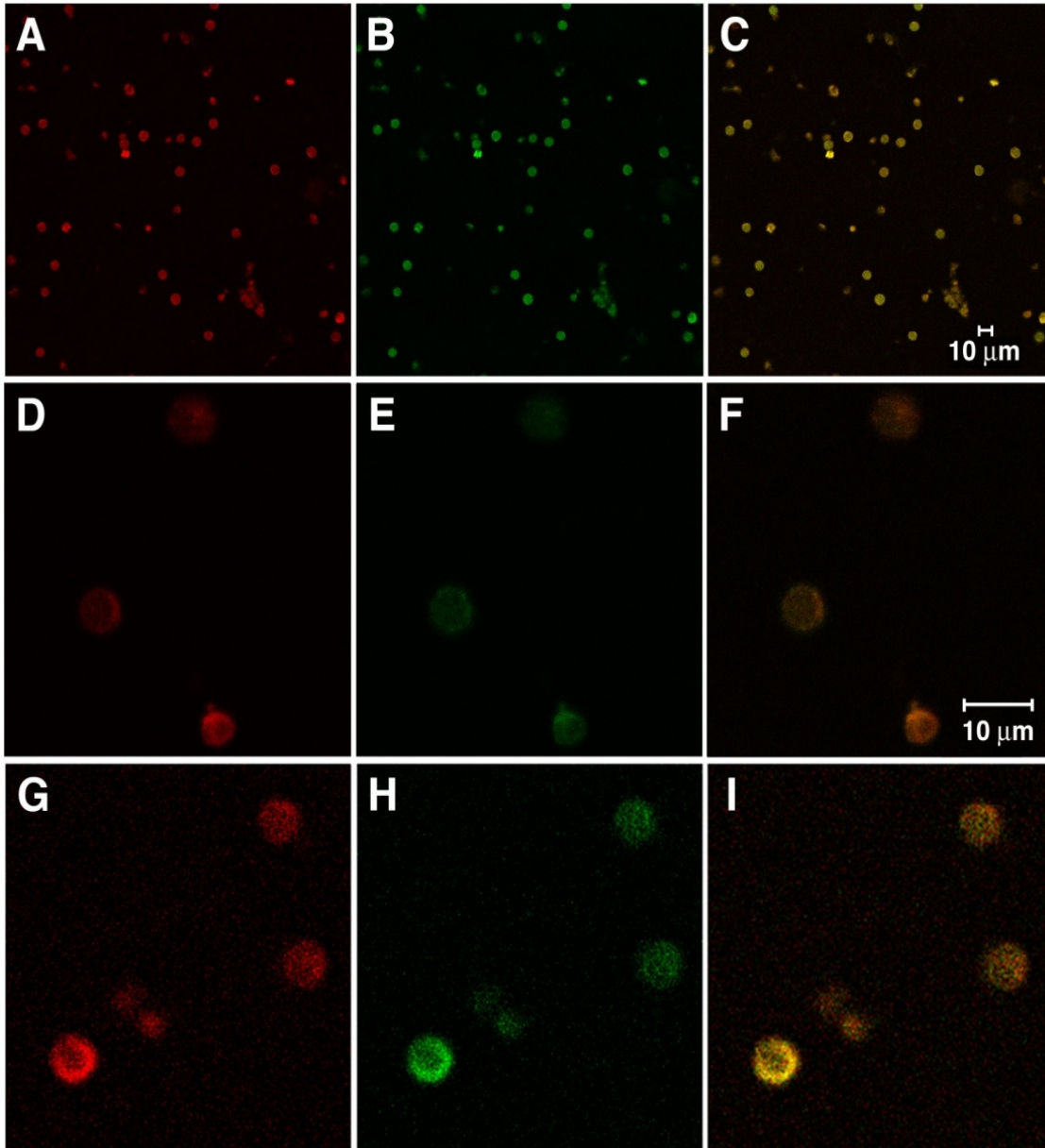


Figura 16. Microscopia confocale delle cellule T $CD4^+$ isolate dalle milze dei topi CBA/J(H-2^k) incubate con il glicopeptide hTgCSgp biotinilato e modificato con *p*-Azidobenzoyl hydrazide (ABH). Riquadri A, D, G, cellule esposte ad anti-biotina-PE. Riquadri B, E, H, cellule esposte ad anti-CD44-FITC. Riquadri C, F, I, sovrapposizione delle immagini.

Conclusione

4. CONCLUSIONE

I dati presentati in questo lavoro dimostrano che la modifica post-traduzionale riguardante l'addizione della catena oligosaccaridica del condroitin-6-solfato alla Ser2730 dell'hTg ha un profondo impatto sulla capacità dell'hTg di indurre tiroiditi autoimmuni sperimentali in topi suscettibili CBA/J(H-2^K). Sembra che le molecole di hTg contenenti il condroitin-6-solfato, che precedenti studi hanno dimostrato rappresentare regolarmente una percentuale largamente variabile dell'intero contenuto di hTg (*Conte et al., 2006*), può essere attualmente la sola frazione di proteina capace di indurre EAT nei topi.

La variabilità nell'abbondanza percentuale della frazione hTgCS presente nelle miscele di hTg totali usate per indurre le tiroiditi sperimentali può ben spiegare il basso tasso di severità dell'EAT, come quello osservato nei topi suscettibili CBA/J (H-2^K) immunizzati con la frazione non condroitinata dell'hTg. Il meccanismo attraverso il quale le unità di condroitin-6-solfato (CS) dell'hTg esercitano il loro effetto sull'immunopatogenicità dell'hTg sembrano essere complessi. I risultati ottenuti con cellule dendritiche isolate indicano che le unità di condroitin-6-solfato possono in parte influenzare il profilo di secrezione delle citochine nel quale le cellule dendritiche

maturano e portano a termine la loro funzione che è quella di presentare l'antigene (Fig 10). Indubbiamente gli effetti principali dell'unità oligosaccaridica del condroitin-6-solfato sono nei confronti delle cellule T. Tuttavia alla luce degli effetti riportati per il condroitin-6-solfato su una varietà di cellule tra cui macrofagi, cellule dendritiche, linfociti B, questo punto merita ulteriori indagini che comprendono anche la funzione delle cellule NK.

Il condroitin-6-solfato dell'hTg ha importanti effetti sull'attivazione delle cellule T murine con conseguenze sia sull'infiltrazione della tiroide e sul danno *in vivo*, che sulle risposte proliferative secondarie dei linfociti T *in vitro*. Questo avviene sia quando è un componente intrinseco dell'hTgCS, sia in aggiunta ad hTgCS₀ indipendente, all'interno del setting sperimentale delle risposte proliferative (Fig. 6 e 9). Inoltre una parte rilevante del suo effetto è stata realizzata anche con hTgCSgp un glicopeptide con una componente peptidica nonamerica veramente limitata la quale da sola non ha nessun effetto.

I risultati ottenuti, oltre a quanto detto prima mettono in luce ulteriori evidenze.

La presenza dell'unità CS, parte integrante della tireoglobulina, conferisce all'hTg la capacità di sensibilizzare efficacemente le cellule T murine, dotate di TCR specifici per gli epitopi condivisi della mTg e hTg. Viceversa l'immunizzazione con

hTgCS₀ non è in grado di produrre il superamento della tolleranza immunologica da parte di queste cellule T autoreattive. Esperimenti in corso ci dicono che questa azione del CS, in sede di sensibilizzazione primaria, è meglio esercitata quando il CS è parte dell'hTg piuttosto che quando essa viene somministrata come unità oligosaccaridica indipendente hTgCSgp.

Inoltre, come dimostrato dalle proliferazioni *in vitro* degli splenociti di topi immunizzati con le varie forme dell'hTg, il superamento della tolleranza agli epitopi condivisi tra mTg e hTg mediante immunizzazione con hTgCS può essere evidenziata come sensibilizzazione efficace alla parte peptidica dell'hTg nei topi immunizzati con hTgCS come attestano gli indici di stimolazione consimili ottenibili nei topi immunizzati mediante hTgCS₀ re-stimolati *in vitro* tanto con hTgCS₀ quanto con hTgCS.

La modalità con cui l'unità oligosaccaridica CS esercita il suo effetto promuovente la sensibilizzazione primaria agli epitopi autoreattivi dell'hTg nei topi CBA/J sembra avere relazioni non tanto con la stimolazione di specifiche cellule T reattive per il CS, quanto con l'apparato di una co-stimolazione indipendente ed additiva rispetto alla co-stimolazione dei recettori CD28 delle cellule T autoreattive. A tale riguardo gli esperimenti compiuti con le cellule T CD4⁺ purificate ed immunizzate,

dimostrano che tale co-stimolazione aggiuntiva apportata dal CS, può avere luogo all'atto della co-stimolazione secondaria dei linfociti T splenici degli animali sperimentali, tanto quando l'unità CS è parte integrante dell'hTg, tanto quando è parte del glicopeptide hTgCSgp. La co-stimolazione, fornita dall'unità CS, è apparsa più rilevante nelle cellule T isolate dagli animali immunizzati con hTgCS. Ciò suggerisce che tra gli effetti della co-stimolazione, da parte dell'unità CS all'atto della sensibilizzazione primaria delle cellule T reattive Tg specifiche, vi sia anche un incremento del livello di espressione e/o sensibilità della co-stimolazione legata al CS da parte delle cellule T CD4⁺ effettrici, che può essere appunto rilevato successivamente all'atto della stimolazione secondaria con il CS. Inoltre, vi è da rilevare, che sebbene la co-stimolazione fornita dall'unità CS, almeno alle dosi di hTgCS e di hTgCSgp da noi impiegate, sia quantitativamente meno rilevante di quella ottenibile con dosi sub-ottimali di anticorpi anti-CD28 essa risulta essere: mediata da recettori e/o vie di trasduzione differenti da quelle correlate a CD28 stesso, come si evince chiaramente dagli effetti additivi del CS con gli anticorpi anti-CD28 negli animali immunizzati con hTgCS e particolarmente rilevante, anzi essenziale, ai fini del superamento della tolleranza immunologica da parte delle cellule T autoreattive specifiche per gli epitopi condivisi della Tg umana e murina.

Infine, gli esperimenti di immunoblot e di microscopia confocale hanno consentito di identificare i recettori delle cellule T, implicati nella co-stimolazione ad opera del CS dell'hTg nei riguardi delle cellule T CD4⁺ nei topi CBA/J, nella molecola CD44. Tale risultato è prettamente in linea con l'osservazione che tra le conseguenze funzionali di tale co-stimolazione aggiuntiva all'atto della sensibilizzazione primaria delle cellule T autoreattive Tg-specifiche murine vi è un incremento dei livelli di espressione e/o sensibilità dei recettori di tale co-stimolazione nelle cellule T effettrici e di memoria. È noto infatti, che sebbene CD44 sia espresso ubiquitariamente alla superficie dei linfociti T e B come nei macrofagi, i suoi livelli di espressione sono sensibilmente aumentati nelle cellule B e T effettrici di memoria. I nostri dati inoltre, rappresentano un'originale e ben documentata conferma, in un modello animale ben caratterizzato (EAT) di una specifica malattia autoimmune umana (AIDT), dell'ipotesi già in passato avanzata in precedenza nella letteratura sulla base di osservazioni in qualche modo frammentarie e/o isolate da specifici contesti di malattia, che tra le funzioni dell'antigene CD44 vi sia anche un importante contributo alla sensibilizzazione primaria agli antigeni ed in generale alle risposte allogenetiche e mitogenetiche delle cellule T.

Inoltre come descritto precedentemente, il CD44 è implicato nei processi di

adesione, migrazione ed attivazione linfocitaria quando interagisce con il condroitin-6-solfato (*Toshiyuki et al., 2004*), per cui la sua interazione con le varie forme di tireoglobulina condroitinata umana potrebbe rappresentare il passaggio chiave attraverso il quale progredisce e si sviluppa la tiroidite autoimmune sperimentale dei topi CBA/J(H-2^K). Infatti, è stato dimostrato che la migrazione dei linfociti T CD4⁺ attraverso il recettore CD44, è attiva nelle fasi iniziali di molte patologie a carattere autoimmune e potrebbe avere importanti implicazioni nel monitoraggio e nella terapia di questi tipi di malattie (*Seingelman et al., 1999*).

Come prospettiva di lavoro futura, sarebbe inoltre interessante poter stabilire che ruolo abbia la variabilità nella lunghezza di catena dell'unità oligosaccaridica di condroitin-6-solfato, delle varie popolazioni di hTg testate, nell'efficienza di riconoscimento e legame del recettore identificato.

Inoltre la conferma di questo modello sperimentale, tramite l'analisi più approfondita dei probabili e differenti recettori che potrebbero interagire con la tireoglobulina condroitinata, potrebbe essere molto utile nel confermare un eventuale ruolo come marker di rischio neoplastico della molecola CD44 o di altri recettori identificati. Infatti è noto che un processo infiammatorio cronico, quale potrebbe essere una tiroidite autoimmune, può rappresentare un evento nella promozione della

trasformazione neoplastica di una cellula potenzialmente candidata. Alla luce di ciò sarebbe utile approfondire tutti i fenomeni che sono a monte ed a valle dell'interazione tra CD44 e le catene condroitin-6-solfato e come variazioni della regolazione di questa modifica post-traduzionale possano condizionare l'efficacia e la qualità di questa interazione. A tal proposito un modello di studio, come quello della tiroidite autoimmune sperimentale, si rivela un modello ottimale.

5. BIBLIOGRAFIA

- Anderson RB, [Walz A](#), [Holt CE](#), [Key B](#). (1998) **Chondroitin sulfates modulate axon guidance in embryonic *Xenopus* brain.** *Dev Biol* 1998;202:235-243.
- Arima T and Spiro RG.(1972) **Studies on the carbohydrate units of thyroglobulin. Structure of the mannose-N-acetylglucosamine unit (unit A) of the human and calf proteins.** *J. Biol. Chem.*; 247:1836-1848
- Arima T, Spiro MJ and Spiro RG. (1972) Studies on the carbohydrate units of thyroglobulin. Evaluation of their microheterogeneity in the human and calf proteins. *J. Biol. Chem.*; 247:1825-1835
- Arneson L. et Miller J.(2007) **The chondroitin sulfate form of invariant chain trimerizes with conventional invariant chain and these complexes are rapidly transported from the trans-Golgi network to the cell surface.** *Biochem. J.* 406:97-103
- Asuncion M, Ingrassia R, Escribano J, Martin U, Mendez F, Di Lauro R, Lamas L. **Efficient thyroid hormon formation by in vitro iodination of a segment of rat thyroglobulin fused to Staphylococcal protein A.** *Febs Lett* 1992; 297:266-270
- Ayroldi E., Cannarile L., Migliorati G., Bartoli A., Nicoletti I., Riccardi C. (1995). **CD44 (Pgp-1) inhibits CD3 and dexamethasone-induced apoptosis.** *Blood* 86: 2672-2678.
- Baas F., Van Ommen G.J.B., Bikker H., Arnberg A.C., de Vijlder J.J.M. (1986). **The human thyroglobulin gene is over 300 kb long and contains introns of up to 64 kb.** *Nucl. Acids. Res.* 14: 5171-5186.

- Beisel K.W., David C.S., Giraldo A.A., Kong Y.M., Rose N.R. (1982). **Regulation of experimental autoimmune thyroiditis: mapping of susceptibility to the I-A subregion of the mouse H-2.** *Immunogenetics* 15: 427-430
- Bendall L.J., Bradstock K.F., Gottlieb D.J. (2000). **Expression of CD44 variant exons in acute myeloid leukemia is more common and more complex than that observed in normal blood, bone marrow or CD34⁺ cells.** *Leukemia*. 14: 1239-46.
- Bennett K.L., Jackson D.G., Simon J.C., Tanczos E., Peach R., Modrell B., Stamenkovic I., Plowman G., Aruffo A. (1995). **CD44 isoforms containing exon V3 are responsible for the presentation of heparin-binding growth factor.** *J. Cell. Biol.* 128: 687-98.
- Bourguignon L.Y., Zhu H., Shao L., Chen Y.W. (2000) **CD44 interaction with tiam1 promotes Rac1 signaling and hyaluronic acid-mediated breast tumor cell migration.** *J. Biol. Chem.* 275: 1829-38.
- Bourguignon L.Y., Zhu H., Shao L., Chen Y.W. (2001) **CD44 interaction with c-Src kinase promotes cortactin-mediated cytoskeleton function and hyaluronic acid-dependent ovarian tumor cell migration.** *J. Biol. Chem.* 276: 7327-36.
- Braley-Mullen H, Sharp GC, Medling B, Tang H. **Spontaneous thyroiditis in NOD.H-2h4 mice.** *J. Autoimmun.* 1999;12:157-65
- Braley-Mullen H and Yu S. **Early requirement for B cells for development of spontaneous autoimmune thyroiditis in NOD.H-2h4 mice.** *J. Immunol.* 2000;165:7262-9
- Carayanniotis G, Chronopoulou E and Rao V.P. **Distinct genetic pattern of mouse susceptibility to thyroiditis induced by a novel thyroglobulin peptide.** *Immunogenetics* 1994;39:21-28

- Castellone M.D., Celetti A., Guarino V., Cirafici A.M., Basolo F., Giannini R., Medico E., Kruhoffer M., Orntoft TF., Curcio F., Fusco A., Melillo R.M., Santoro M. (2004). **Autocrine stimulation by osteopontin plays a pivotal role in the expression of the mitogenic and invasive phenotype of RET/PTC-transformed thyroid cells.** *Oncogene* 23: 2188-2196.
- Chambard M, Mauchamp J, Chabaud O. **Synthesis and apical and basolateral secretion of thyroglobulin by thyroid cell monolayers on permeable substrate: modulation by thyrotropin.** *J Cell Physiol* 1987;133:37-45
- Chronopoulou E and Carayanniotis G. **H-2Ek expression influences thyroiditis induction by the thyroglobulin peptide (2495-2511).** *Immunogenetics* 1993;38:150-153
- Consiglio E., Acquaviva A.M., Formisano S., Liguoro D., Gallo A., Tassi V., Santisteban P., De Luca M., Shifrin S., Yeh H.J.C., Kohn L. (1987). **Characterization of phosphate residues on thyroglobulin.** *J. Biol. Chem.* 262: 10304-10314
- Conte M., Arcaro A., D'Angelo D., Gnata A., Mamone G., Ferranti P., Formisano S., Gentile F. (2006). **A Single Chondroitin 6-Sulfate Oligosaccharide Unit at Ser-2730 of Human Thyroglobulin Enhances Hormone Formation and Limits Proteolytic Accessibility at the Carboxyl Terminus.** *J. Biol. Chem.* 281: 22200-22211.
- Dai Y., Carayanniotis K.A., Eliades P., Lymberi P., Shepherd P., Kong Y.M., Carayanniotis G. (1999). **Enhancing or suppressive effects of antibodies on processing of a pathogenic T cell epitope in thyroglobulin.** *J. Immunol.* 162: 6987-92.

- Damotte D, Colomb E, Cailleau C, Brousse N, Charreire J, Carnaud C. **Analysis of susceptibility of NOD mice to spontaneous and experimentally induced thyroiditis.** *Eur. J. Immunol.* 1997;27:2854-62
- Di Jeso B, Gentile F: **TSH-Induced galactose incorporation at the NH₂-terminus of thyroglobulin secreted by FRTL-5 cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 1992;189:1624-1630
- Fassler, C A, Dunn, J T, Anderson P C, Fox J W, Dunn A D, Hite L A, Moore R C, and Kim P S. **Thyrotropin alters the utilization of thyroglobulin's hormonogenic sites.** *J. Biol. Chem.* 1988;263,17366-17371
- Flynn J.C., Conaway D.H., Cobbold S., Waldmann H., Kong Y.M. (1989). **Depletion of L3T⁴ and Lyt-2⁺ cells by rat monoclonal antibodies alters the development of adoptively transferred experimental autoimmune thyroiditis.** *Cell. Immunol.* 122: 377-90.
- Franc J.L., Venot N., Marriq C. (1990). **Characterization of the two oligosaccharides present in the preferential hormonogenic domain of human thyroglobulin.** *Biochem. Biophys.* 166: 937-944.
- Fujimoto T., Kawashima H., Tanaka T., Hirose M., Toyama-Sorimachi N., Matsuzawa Y., Miyasaka M. (2001). **CD44 binds a chondroitin sulfate proteoglycan, aggrecan.** *Int. Immunol.* 13: 359-366.
- Gentile F., Salvatore G. (1993). **Preferential sites of proteolytic cleavage of bovine, human and rat thyroglobulin. The use of limited proteolysis to detect solvent-exposed regions of the primary structure.** *J. Biochem.* 218: 603-612.
- Gentile F., Conte M., Formisano S. (2004). **Thyroglobulin as an autoantigen: what can we learn about immunopathogenicity from the correlation of antigenic**

properties with protein structure? *Immunology* 112: 13-25.

Glant T.T., Buzás E.I., Finnegan A., Negroiu G., Cs-Szabó G., Mikecz K. (1998). **Critical roles of glycosaminoglycan side chains of cartilage proteoglycan (aggrecan) in antigen recognition and presentation.** *J. Immunol.* 160: 3812-9.

Guarino V., Faviana P., Salvatore G., Castellone M.D., Cirafici A.M., De Falco V., Celetti A., Giannini R., Basolo F., Melillo R.M., Santoro M. (2005). **Osteopontin is overexpressed in human papillary thyroid carcinomas and enhances thyroid carcinoma cell invasiveness.** *J. Clin. Endocrinol.* 90: 5270-5278.

Günthert U., Stauder R., Mayer B., Terpe H.J., Finke L., Friedrichs K. (1995). **Are CD44 variant isoforms involved in human tumour progression?** *Cancer Surv.* 24: 19-42.

Hanisch F-G, Schwientek T, Von Bergwelt-Baildon MS, Schultze J, and Finn O. **O-linked glycans control glycoprotein processing by antigen-presenting cells: a biochemical approach to the molecular aspects of MUC1 processing by dendritic cells.** *Eur. J. Immunol.* 2003;33:32-42-54

Hirao M., Sato N., Kondo T., Yonemura S., Monden M., Sasaki T., Takai Y., Tsukita S., Tsukita S. (1996). **Regulation mechanism of ERM (ezrin/radixin/moesin) protein/plasma membrane association: possible involvement of phosphatidylinositol turnover and Rho-dependent signaling pathway.** *J. Cell. Biol.* 135: 37-51.

Hutchings P.R., Cooke A., Dawe K., Champion B.R., Geysen M., Valerio R., Roitt I.M. (1992). **A thyroxine-containing peptide can induce murine experimental autoimmune thyroiditis.** *J. Exp. Med.* 175: 869-872.

- Ikekubo K., Kishihara M., Sanders J., Jutton J., A.B Schneider. (1981). **Differences between circulating and tissue thyroglobulin in rats.** *Endocrinology* 109: 427-432.
- Lesley J., English N., Perschl A., Gregoroff J., Hyman R. (1995). **Variant cell lines selected for alterations in the function of the hyaluronan receptor CD44 show differences in glycosylation.** *J. Exp. Med.* 182: 431-437.
- Jürgen B. (2000). **Molecular organization, structural features, and ligand binding characteristics of CD44, a highly variable cell surface glycoprotein with multiple functions.** *Proteins* 39: 103–111.
- Kalomiris E.L., Bourguignon L.Y. (1988). **Mouse T lymphoma cells contain a transmembrane glycoprotein (GP85) that binds ankyrin.** *J. Cell. Biol.* 106: 319-27.
- Katoh S. Zheng Z., Oritani K., Shimosato T., Kincade P.W. (1995). **Glycosylation of CD44 negatively regulates its recognition of hyaluronan.** *J. Exp. Med.* 182: 419-429.
- Kothapalli D. Flowers J., Xu T., Pure E., Assoian R.K. (2008). **Differential activation of ERK and Rac mediates the proliferative and Anti-proliferative effects of hyaluronan and CD44.** *J. Biol. Chem.* 10: 1074.
- Kong Y.M., David C.S., Giraldo A.A., ElRehewy M., Rose N.R., (1979). **Regulation of autoimmune response to mouse thyroglobulin: influence of H-2D-end genes.** *J. Immunol.* 123: 15-18
- Kong Y.M., McCormick D.J., Wan Q Motte R.W., Fuller B., Giraldo A.A., David C.S. (1995). **Primary hormonogenic sites as conserved autoepitopes on thyroglobulin in murine autoimmune thyroiditis.** *J. Immunol.* 155: 5847-

- Krejci E., Duval N., Chatonnet A., Vincens P., Massoulié P. (1991). **Cholinesterase-like domains in enzymes and structural proteins: functional and evolutionary relationships and identification of a catalytically essential aspartic acid.** *Proc. Natl. Acad.* 88: 6647-6651.
- Lamas L., Anderson P.C., Fox J.W., Dunn, J.T., (1989) **Consensus sequences for early iodination and hormonogenesis in human thyroglobulin.** *J. Biol. Chem.* 264: 13541-13545.
- Lejeune P.J., Marriq C., Rolland M., Lissitzky S. (1983) **Amino acid sequence around a hormonogenic tyrosine residue in the N-terminal region of human thyroglobulin after in vivo and in vitro iodination.** *Biochem. Biophys.* 114: 73-80.
- Leng L., Christine N., Metz Y., Fang J., Xu S., Donnelly J., Baugh T., Delohery Y., Chen R., Mitchell A., Richard Bucala. (2003). **MIF signal transduction initiated by binding to CD74.** *J. exp. Med.* 11: 1467–1476.
- Magyarosy E., Sebestyén A., Timár J. (2001). **Expression of metastasis associated proteins, CD44v6 and NM23-H1, in pediatric acute lymphoblastic leukemia.** *Anticancer. Res.* 21: 819-23.
- Malthiéry Y., Lissitzky S. (1987). **Primary structure of human thyroglobulin deduced from the sequence of its 8448-base complementary DNA.** *Eur. J. Biochem.* 165: 491-498.
- Marhaba R, Bourouba M, and Zoller M. **CD44v6 promotes proliferation by persisting activation of MAP kinases.** *Cell. Signal.* 2005;17:961-973
- Marriq C, Lejeune PJ, Venot N and Vinet L. **Hormone formation in the isolated**

fragment 1-171 of human thyroglobulin involves the couple tyrosine 5 and tyrosine 130. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1991;81:155-164

Matsuoka N, Unger P, Ben-Nun A, Graves P and Davies TF. **Thyroglobulin-induced murine thyroiditis assessed by intrathyroidal T cell receptor sequencing.** *J. Immunol.* 1994;152:2562-68

McVoy LA, and Kew RR. **CD44 and annexin A2 mediate the C5a chemotactic cofactor function of the vitamin D binding protein.** *J Immunol* 2005;175:4754-4760

Miller J, Hatch JA, Simonis S, Cullen SE. **Identification of the glycosaminoglycan attachment site of mouse invariant chain proteoglycan core protein by site-direct mutagenesis.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:1359-1363

Naujokas M.F., Morin M., Abderson M.S., Peterson M., Miller J. (1993). **The chondroitin sulfate form of invariant chain can enhance stimulation of T cell responses through interaction with CD44.** *Cell.* 74: 257-68.

Oliferenko S., Kaverina I., Small J.V., Huber L.A. (2000). **Hyaluronic acid (HA) binding to CD44 activates Rac1 and induces lamellipodia outgrowth.** *J. Cell. Biol.* 148: 1159-64.

Palumbo G., Tecce M.F., Ambrosio G. (1982). **A non-incinerative rate-sensing methods for the determination of iodine in iodoproteins.** *Anal. Biochem.* 123: 183-189.

Rawitch A.B., Liao T.H., Pierce J.G. (1968). **The amino acid sequence of a tryptic glycopeptide from human thyroglobulin.** *Biochim. Biophys.* 160: 360-367.

Rose N.R., Twarog F.J., Crowle A.J. (1971). **Murine thyroiditis: importance of**

- adjuvant and mouse strain for induction of thyroid lesions.** *J. Immunol.* 106: 698-704.
- Sant A.J., Schwartz B.D., Cullen S.E. (1985) **Cellular distribution of the Ia-associated chondroitin sulfate proteoglycan.** *J. Immunol.* 135:408-15.
- Schneider A.B., Ikekubo K., Kuma K. (1983). **Iodine content of serum thyroglobulin in normal individuals and patients with thyroid tumors.** *J. Clin. Endocrinol.* 57: 1251-1256.
- Schneider A.B., McCurdy A., Chang T., Dudlak D., Magner J. (1988). **Metabolic labeling of human thyroglobulin with (³⁵S)-sulfate: incorporation into chondroitin 6-sulfate and endoglycosidase-F-susceptible carbohydrate units.** *Endocrinology* 122: 2428-2435.
- Seth A., Gote L., Nagarkatti M., Nagarkatti P.M. (1991). **T-cel-receptor-independent activation of cytolytic activity T cytotoxic lymphocytes through mediated CD44 and gp90^{MEL14}** *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 7877-7881.
- Siengelmann M.H., Heather C., Pila E. (1999). **Activation and interaction of CD44 on hyaluronan in immunological system.** *Journal of leukocytes biology* 66: 315-321.
- Spiro R.G., Bhoyroo V.D. (1988). **Occurrence of sulfate in the asparagine-linked complex carbohydrate units of thyroglobulin. Identification and localization of galactose 3-sulfate and N-acetylglucosamine 6-sulfate residues in the human and calf proteins.** *J. Biol. Chem.* 263: 14351-14358.
- Spiro M.J. (1977). **Presence of a glucuronic acid-containing carbohydrate unit in human thyroglobulin.** *J. Biol. Chem.* 252: 5424-5430.
- Sun D., Hu X.Z., Shah R., Coleclough C. (1995). **The pattern of cytokine gene**

expression induced in rat T cells specific for myelin basic protein depends on the type and quality of antigenic stimulus. *Cell Immunol* 166: 1-8

Svee K., White P.J., Vaillant J.J., Urvashi R., Krumwiede M., Johnson D., Henke C. (1996). **Acute lung Injury fibroblast migration and invasion of a fibrin matrix is mediated by CD44.** *Exp. Med.:* 1713–1727.

Takagi Y., Omura T., Go M. (1991). **Evolutionary origin of thyroglobulin by duplication of esterase gene.** *FEBS Lett.*282: 17-22.

Tange H., Bedin C., Texier B., Charreire J. (1990). **Autoantibody specific for a thyroglobulin epitope inducing experimental autoimmune thyroiditis or its anti-idiotype correlates with the disease.** *Eur. J. Immunol.* 20: 1535-9.

Toshiyuki M., Nagako S., Hiroto K., Kazuhito Y., Masayuki M. (2004). **CD44–chondroitin sulfate interactions mediate leukocyte rolling under physiological flow conditions.** *Immunology Letters* 93: 163–170.

Toyama-Sorimachi N., Sorimachi H., Tobita Y., Kitamura F., Yagita H., Suzuki K., Miyasaka M. (1995). **A novel ligand for CD44 is serglycin, a hematopoietic cell lineage-specific proteoglycan. Possible involvement in lymphoid cell adherence and activation.** *J Biol Chem.* 270: 7437-44.

Toyama-Sorimachi N., Kitamura F., Habuchi H., Tobita Y., Kimata K., Miyasaka M. (1997). **Widespread expression of chondroitin sulfate-type serglycins with CD44 binding ability in hematopoietic cells.** *J. Biol. Chem.* 272: 26714-26719.

Vladutiu A.O. (1989). **Experimental autoimmune thyroiditis in mice chronically treated from birth with anti-IgM antibodies.** *Cell. Immunol.* 121: 49-59.

Verginis P., Stanford M.M., Carayanniotis G. (2002). **Delineation of five thyroglobulin T cell epitopes with pathogenic potential in experimental autoimmune thyroiditis.** *J. Immunol.* 169: 5332-7.

Zheng Z., Katoh S., He Q., Oritani K., Miyake K., Lesley J., Hyman R., Hamik A., Parkhouse RM., Farr AG. (1995). **Monoclonal antibodies to CD44 and their influence on hyaluronan recognition.** *J Cell Biol.* 130: 485-95.

6. ABBREVIAZIONI

hTg	Tireoglobulina umana
mTg	Tireoglobulina murina
CS	Condroitin-6-solfato
hTgCS ₀	Tireoglobulina umana priva di condroitin-6-solfato
hTgCS	Tireoglobulina umana contenente condroitin-6-solfato
hTgCSgp	Glicopeptide condroitinato della tireoglobulina umana
T3	3,3',5-triodotironina
T4	3,5,3',5'-tetraiodotironina
Q-IEC	Cromatografia a scambio ionico su matrice Q-sefariosio
EAT	Tiroidite autoimmune sperimentale
AITD	Malattia autoimmune tiroidea
MHC	Complesso maggiore di istocompatibilità
Ii	Catena invariante
APCs	Cellule presentanti l'antigene
HA	Acido ialuronico
MIF	Fattore inibitorio della migrazione dei macrofagi

PBS Fosfato buffer salino

BCA Acidobicinconinico

SDS-PAGE Sodio dodecil solfato poliacrilammide gel elettroforesi

FBS Siero fetale bovino

BSA Albumina di siero bovino

ABH Para-azidobenzoil-idrazide

CPM Conte per minuto

CFA adiuvante di Freund completo

IFA adiuvante di Freund incompleto

PFA Paraformaldeide

PE Ficoeritrina

FITC Isotiocianato di fluoresceina

ELISA Dosaggio immuno-assorbente legato ad un enzima

TCR Recettore delle cellule T

7. RINGRAZIAMENTI

Approfitto della stesura della tesi per ringraziare:

il Prof. Fabrizio Gentile, docente guida, maestro esemplare nell'ambito lavorativo scientifico ed extra-scientifico, stimolo giornaliero per la mia crescita intellettuale e sorgente inesauribile di fondamentali insegnamenti di vita

i miei colleghi di laboratorio la dott.ssa Alessia Arcaro e il dott. Alessio Lepore per il sostegno sperimentale importante per la realizzazione del lavoro

il dott. Mario Galgani per il suo prezioso supporto tecnico nell'analisi citofluorimetrica e nell'impostazione di esperimenti chiave del lavoro

il dott. Ferdinando Febbraio per i suoi preziosi consigli, per la sua disponibilità e per l'eccellente supporto tecnologico

il Prof. Guido Maria Grasso, coordinatore del corso di dottorato di ricerca in "Scienze per la Salute" e direttore del Dipartimento di Scienze per la Salute dell'Università degli Studi del Molise, per aver favorito l'arricchimento culturale di noi dottorandi, organizzando seminari e lezioni e sostenendo la partecipazione a corsi di formazione e congressi nazionali ed internazionali.