



1993

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

İç Hastalıkları Anabilim Dalı
(Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Bilim Dalı)

HASHİMOTO TİROİDİTİNDE
ANTI-BİP DÜZEYLERİ

YAN DAL UZMANLIK TEZİ
Uzm. Dr. Mehmet Aşık

Ankara, 2007



1993

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

İç Hastalıkları Anabilim Dalı
(Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Bilim Dalı)

HASHİMOTO TİROİDİTİNDE
ANTİ-BİP DÜZEYLERİ

YAN DAL UZMANLIK TEZİ

Uzm. Dr. Mehmet Aşık

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Neslihan Başçıl Tütüncü

Ankara, 2007

Proje Numarası: KA06/261

TEŞEKKÜR

Tıpta Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları yan dal uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, yetişmemde emeği geçen başta Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Bilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Nilgün Güvener olmak üzere tüm Başkent Üniversitesi Tıp Fakóltesi Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Bilim Dalı öğretim üyelerine teşekkür ederim. Tez çalışmam sırasında yardımlarını esirgemeyen tez sorumlum Doç. Dr. Neslihan Başcıl Tütüncü ve hasta toplamamda yardımları olan asistan arkadaşlarıma, hasta serumlarını çalışan Serap Arıkan'a, istatistik konusunda Halk Sağlığı Ana Bilim Dalı'na, tez için mali destek sağlayan Başkent Üniversitesi Araştırma fonuna ve bana en çok destek olan eşim Zuhâl ve kızım Meriç Aşık'a katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Uzm. Dr. Mehmet Aşık

ÖZET:

Hashimoto tiroiditli hastalarda immün modölatör ve antiapoptotik etkileri olan endoplazmik retikulum şaperonu BIP'e karşı oluşan antikor varlığını araştırmak.

Çalışmaya 20 ötiroid otoimmün tiroidit, 27 subklinik hipotiroidi, 15 hipotiroid hashimoto tiroiditi olmak üzere 62 otoimmün tiroiditli hasta ve 37 hastadan oluşan sağlıklı kontrol grubu alındı.

Hashimoto tiroiditli hastaların alt gruplarıyla kontrol grubu arasında ve hashimoto tiroiditi alt gruplarının kendi aralarında Anti-BIP düzeyleri açısından kıyaslandığında herhangi bir istatistiksel fark saptanmadı ($p=0,889$).

Tiroid hücrelerinde BIP aktivasyonu gösterilmesine rağmen bizim çalışmamızda hashimoto tiroiditli hasta alt gruplarında Anti-BIP düzeyi kontrol grubundan farklı bulunmamıştır. Bu durum hashimoto tiroiditinde apoptozis ve/veya T hücre cevabıyla BIP'e karşı oluşan antikorların ilişkisiz olduğu veya serumda tespit edilemeyecek düzeylerde olduğunu düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: Hashimoto tiroiditi, Anti-BIP, apoptozis

ABSTRACT:

Anti-BIP Levels on Hashimoto's Thyroiditis

To assess the presence of antibodies to BIP/GRP78, which is a chaperon of endoplasmic reticulum and has immune modulating and antiapoptotic effects in hashimoto's thyroiditis.

The study included 62 patients with autoimmune thyroiditis. Of these, 20 had euthyroid, 27 had subclinical hypothyroid, and 15 had hypothyroid hashimoto's thyroiditis. A control group including 37 healthy patients also participated in the study.

There was no statistically significant difference between subgroups of hashimoto's thyroiditis patients and control group, and between subgroups of hashimoto's thyroiditis patients, individually; when comparison was made in respect of Anti-BIP levels ($p=0,889$).

Although BIP activation has previously been shown, the Anti-BIP level was not different from the control group in subgroups of hashimoto's thyroiditis patients in our study. This condition suggests that antibodies formed against BIP by apoptosis and/or T cell response are not associated with hashimoto's thyroiditis or that it is at a level in serum that can not be measured.

Key words: Hashimoto's thyroiditis, Anti-BIP, apoptosis

İÇİNDEKİLER DİZİNİ:

TEŞEKKÜR.....	ii
ÖZET:.....	iii
İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT):.....	iv
İÇİNDEKİLER DİZİNİ:	v
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ:	vi
ŞEKİLLER ve TABLOLAR DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ:	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Hashimoto Tiroiditinde Patogenez:	3
2.2. Endoplazmik Retikulum Stresi ve Apoptozis:	8
2.2.1. Endoplazmik Retikulum Şaperonlarının ve Proteinlerin Katlanmalarını Sağlayan Enzimlerin Rollerini:	8
2.2.2. Katlanmayan Proteinlerin Tanınması ve Yıkımı:	11
2.2.3. Katlanmamış Protein Cevabı ve Endoplazmik Retikulum Şaperon Düzeylerinin Kontrolü:	11
2.2.4. Endoplazmik Retikulum İlişkili Protein Yıkımı ve Apoptozis:	15
2.2.5. Endoplazmik Retikulumda Proteinlerin Birikimini İçeren Hastalıklarda Katlanmamış Protein Cevabı Hastalık Durumunu Göstermede Tanısal Bir Belirteç Olabilir:	17
2.2.6. Otoimmün Hastalıklarda BIP Şaperonu:	17
3. HASTALAR ve YÖNTEM	20
3.1. Hastalar:	20
3.2. Tiroid Hormonlarının ve Anti-Tiroglobulin Çalışılması:	20
3.3. Anti- tiroid peroksidaz Çalışılması:	21
3.4. Anti-BIP ELISA Çalışması:	21
3.5. İstatistik Değerlendirme:	22
4. SONUÇLAR:	23
5. TARTIŞMA:	26
6. KAYNAKLAR:.....	29

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ:

ATF-6: Activating transcription factor-6

BIP/GRP78: İmmünglobulin ağır zincir bağlayıcı protein/glukozla regüle edilen protein78

CTLA: Sitotoksik T lenfosit ilişkili serin esteraz

ER: Endoplazmik retikulum

ERİPY: Endoplazmik retikulum ilişkili protein yıkımı

FADD: Fas'la ilişkili ölüm alanı içeren protein

Fas-L: Fas ligandı

FLICE: FADD benzeri IL-1 β konverting enzim

HLA: Human lökosit antijen

HSP: Heat shock protein

HT: Hashimoto tiroiditi

IFN- γ : İnterferon- γ

IL: İnterlökin

IRE-1: Inositol requiring enzyme-1

JNK: c-Jun N terminal kinaz

MHC: Majör histokompalite kompleksi

NIS: Na/I transporter

PDI: Protein disülfid izomeraz

PERK: PKR benzeri ER kinaz

RA: Romatoid artrit

S1P-S2P: site 1 ve 2 proteaz

Tg: Tiroglobulin

TNF- α : Tümör nekrozis faktör- α

TRAF-2: TNF reseptörüyle ilişkili faktör-2

TRAIL: TNF'yle ilişkili apoptozis idükleyici ligand

UGGT: UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase

UPR: Katlanmamış protein cevabı

ŞEKİLLER ve TABLOLAR DİZİNİ

Şekil 1: Hashimoto tiroiditi ve normal tiroositte Fas/FasL'nın rolü.....	6
Şekil 2: BIP/GRP78 normal koşullarda PERK, ATF-6, IRE-1'i inaktive durumda tutarken ER stresiyle bu şaperonlardan ayrılarak onların aktivasyonuna neden olur.....	13
Şekil 3: PERK, ATF-6 ve IRE-1'in BIP'ten ayrılıp, aktive olduktan sonra izledikleri yollar.....	14
Şekil 4: UPR ile kontrol edilen apoptotik yollar.....	17
Şekil 5: Gruplar arası Anti-BIP düzeylerinin karşılaştırması	25
Tablo-1: Kronik tiroiditlerin sınıflandırılması.....	3
Tablo-2: Hastaların genel özellikleri.....	24

1. GİRİŞ:

Hashimoto tiroiditi (HT) en sık endokrin hastalıklardan biridir. Tiroid bezinin diffüz lenfositik infiltrasyonu, folliküler hücrelerin yıkımı ve sonuçta hipotiroidinin gelişmesiyle karakterizedir (1). Tiroid follikül yıkımında tiroid peroksidaz ve tiroglobulin gibi tiroidin kendi antijenlerine karşı antikorlar gelişir (2).

Ökaryotik sekretuar proteinler doğru katlanamadıklarında endoplazmik retikulumda (ER) birikirler ve moleküler şaperonlarla stabil kompleksler yaparlar. Glukoz eksikliği, patojenik enfeksiyon, kimyasal yaralanma, genetik mutasyon, glikoproteinlerin glikolize olamaması, artan protein sentez ve sekresyonu, ER'a kalsiyum akımı gibi birçok fizyolojik ve patolojik durum ER stresini uyarır (3). Stres uzaması durumunda hasar çok şiddetli olur ve homeostaz düzeltilemezse ER'da mutant proteinler birikir ve ER'da bulunan kaspaz zinciri uyarılarak apoptotik yol aktive edilir (4). Bir "Heat shock protein"i (HSP) olan BIP/GRP78 (İmmünglobulin ağır zincir bağlayıcı protein/glukozla regüle edilen protein 78) ER'daki moleküler şaperonlardan birisidir. Bu molekül, bu tip ER stresini artıran durumlarda, katlanmamış proteinlerin üç boyutlu yapısına ulaşmasını artıracak, yeni katlanmamış protein girişini azaltacak, katlanmamış proteinlerin çökmelerini engelleyecek işlemlere direk ve indirek yollarla katılarak hücreyi bu toksik olaylardan korur (5, 6). Ayrıca BIP, ER stresinin uzamasıyla devreye giren apoptotik yol üzerinde düzenleyici etki gösterir. Kaspaz zinciri yolağındaki kaspaz-7 ve 12'ye bağlanıp, kaspaz zincirini inaktivasyona uğratarak anti-apoptotik etki gösterir (7).

Bir diğer HSP'i olan 72 kDa HSP'lerinin (HSP-72) ekspresyonu Graves ve HT'li hastaların tiroid dokusunda gösterilmiştir (8, 9). Ötiroid HT, hipertiroid graves hastalığında HSP-72 reaktivitesi varken toksik yada ötiroid multinodüler guvatr ve kontrol grubunda bu gözlenmemiştir. Organ spesifik otoimmün süreçle etkilenen tiroid dokusunda HSP-72'nin varlığının olası bir açıklaması olarak kronik hücrel stres gösterilmektedir (10). Tiroglobulin üç boyutlu yapısına ER'daki işlemler sonucu ulaşır. Tiroglobulinin ER'daki protein katlanması işlemlerine BIP'te katılır ve katlanmamış tiroglobulinin golgiye geçişini engeller. Tiroitte ER stresini artıran durumlarda BIP düzeyleri artarak tiroiti korur (11).

BIP şaperon fonksiyonlarının yanı sıra immünolojik olarak sitotoksik Th cevabı ve klasik olmayan antijen sunumu gibi görevleri vardır (12, 13). BIP'in aşırı ekspresyonuyla bir kısım BIP hücre yüzeyinde ekspresse edilir. Spesifik regülatör T hücrelerin hedefi olur ve supressör T hücrelerin uyarılmasını sağlar. Bu immün cevap immün hiperreaktivitenin

ve cevabın baskılanmasını sağlar (14). Aynı yollarla BIP, T supressör etkiyle T hücre cevabını önleyerek tümörlerin büyümesine neden olabilir (12).

Hashimoto tiroiditinde folliküler yıkımın patogeneğinde apoptozisin rol oynayabileceği düşünülmektedir (15). HT'nde apoptozisle ilgili yapılan çalışmalarda Fas/FasL (Fas Ligandı) (16) ve TRAIL (TNF'yle ilişkili apoptozis idükleyici ligand) yolaklarının santral rol oynadıkları düşünülmektedir (15). Bu yolaklar kaspaz zincirini aktive ederek apoptozise yol açarlar (15, 17). Apoptotik mekanizmaların hala bilinmeyen yönleri mevcuttur. Apoptozise eğilimi artıran mekanizmaların ön planda olduğu HT'nde antiapoptotik tedaviler faydalı olabilir.

Bodman-Smith ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, romatoid artritli (RA) hastaların serumlarında ve sinovyal sıvılarında otoimmün olmayan artritli ve kontrol hastalarına göre serumda BIP'e karşı oluşturulan antikor düzeyleri anlamlı olarak yüksek saptanmış (18). Bu çalışmada, Anti-BIP antikorlarının BIP düzeylerini azaltarak BIP'in inflamatuvar olaylardan ve apoptozisten koruyucu etkisinin bloke edildiği düşünülmektedir. Zaten aynı grubun deneysel bir çalışmasında BIP'le tedavi edilen ratlarda kollajenin indüklediği artrit oluşumuna direnç gözlenmiştir (19).

İmmün modülatör ve antiapoptotik özelliklere sahip olan BIP'e karşı oluşturulan antikorlar HT'ndeki apoptotik mekanizmaların ilerlemesine katkıda bulunuyor olabilir. Bizim çalışmamızın amacı HT'li hastaların serumlarında Anti-BIP antikorlarının varlığını araştırmaktır. Bu antikorların varlığı HT'nin apoptozisindeki mekanizmalara ışık tutabilir ve HT'nde apoptozis yoluyla ilişkili yeni tedaviler geliştirilmesinde yardımcı olabilir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hashimoto Tiroiditinde Patogenez:

Kronik tiroidit hipotiroidinin en sık nedenidir (20). Kronik tiroidit, aynı zamanda otoimmün tiroidit veya HT olarak da isimlendirilir. HT, tiroidin immün hücre infiltrasyonu, tiroide özgü Anti-tiroid peroksidaz ve Anti-tiroglobulin antikorlarının varlığı, tiroid otoantijen spesifik T lenfositlerin varlığı ve folliküler yapının yıkımıyla karakterizedir (21). Kronik tiroidit dört alt grup olarak sınıflandırılır. Erken dönemde hastalar ötiroidtir ve yalnız otoantikoları mevcuttur. İkinci dönemde hastalık subklinik ve otoantikolar mevcuttur. Hastalık ilerledikçe tiroid sertleşir, diffüz guvatr görülür, bu dönemde tirotoksikoz, ötiroidi veya hipotiroidi gözlenebilir. Dördüncü evrede hipotiroidi ile birlikte atrofik tiroidit ortaya çıkar. Kronik tiroiditlerin sınıflaması tablo-1'de verilmiştir.

Tablo-1: Kronik tiroiditlerin sınıflandırılması

Tip-1 otoimmün tiroidit (hashimoto hastalığı tip-1)

1A guvatr var

1B guvatr yok

Klinik durum

Hastalar ötiroid. Genellikle Tg ve TPO antikorları mevcut.

Tip-2 otoimmün tiroidit (hashimoto hastalığı tip-2)

2A guvatr var (klasik hashimoto hastalığı)

2B guvatr yok (primer miksödem, atrofik tiroidit)

Klinik durum

Hipotiroidi (TSH düzeyleri yüksek). Genellikle otoantikolar mevcut. Bazı tip-2B grubu hastaları bloke edici TSH reseptör antkorlarıyla ilişkili.

Kısaltmalar: Tg: tiroglobulin, TPO: tiroid peroksidaz, RAIU: radyoaktif iyot uptake

Otoimmün yıkımı başlatan nedenler bilinmemektedir, çünkü hastalık tanıdan yıllarca önce başlamıştır. Tiroid hücrelerinin yıkımı yavaş olmakta ve hücrelerin ölümü yıllar almaktadır. Otoimmün tiroiditte, diğer otoimmün hastalıklara benzer şekilde tiroid antijenlerine self-toleransın bozulmasıyla başladığı düşünülmektedir. İmmünolojik self-toleransın perinatal dönemde olgunlaşmamış lenfositlerin self-antijenlere maruz kalmasıyla oluştuğu düşünülmektedir. Bu kritik noktada timustaki otoreaktif T hücrelerinin klonal

delesyonu veya anerjilerinin indüklenmesiyle otoantijenlere self-tolerans gelişir. Bu dönemde oluşan bir anormallik self-toleransın oluşumunu engelleyerek otoimmün tiroidit oluşturabilir (22). Olası bir anormallik organa özgü baskılayıcı T lenfositlerindeki bir defekt sonucu Th lenfositlerin kontrolden çıkmasıdır (23). Çevresel faktörlerinde katkıda bulunabileceği düşünülmektedir. Otoantijenlerle benzerlik gösteren enfeksiyonlar, ilaçlar gibi çevresel antijenlerin çapraz reaksiyonla self-toleransı bozabileceği düşünülmektedir (24).

Hashimoto tiroiditinde tiroglobulin, tiroid peroksidaz, TSH reseptörü, “Na⁺/I⁻ symporter” (NIS) temel antijenik hedeflerdir. HT’nde Anti-tiroid peroksidaz antikorları %99, anti-tiroglobulin antikorları %65 oranlarında gözlenir. Anti-tiroid peroksidaz ve anti-tiroglobulin antikorlarının artmasına rağmen bu antikorların otoimmün tiroiditte patojenik rolü gösterilememiştir (25). İngiltere’deki çok merkezli bir çalışmada, hastalarda Anti-tiroglobulin pozitifliği sağlıklı kadınlarda 18-24 yaş arasında %10’ken, 55-64 yaş arasında bu oran %30’a kadar yükselmektedir. Anti-tiroid peroksidaz pozitifliği ise %15’ten %24’e yükselmektedir (26). ABD’de yapılan çok merkezli bir çalışmada ise tüm toplumda Anti-tiroglobulin pozitifliği %11,5 ve Anti-tiroid peroksidaz pozitifliği %13 bulunmuştur. Antikor pozitifliği kadınlarda erkeklerden daha sık ve yaşla birlikte arttığı gözlenmiştir (27). Ötiroid antikor pozitif hastalarda aşikar hipotiroidi gelişimi yıllık %2-4 civarında saptanmıştır (28). Çeşitli çalışmalarda subklinik hipotiroidinin prevalansı %4-10 arasında saptanmıştır (27, 29, 30). Çalışmalarda subklinik hipotiroidinin aşikar hipotiroidiye ilerlemesi ise yılda %3-18 oranında saptanmıştır (28, 29, 31, 32).

TSH reseptör antikorları Graves hastalarının tümüne yakınında gözlenirken, HT’nde daha az rastlanır. Bununla birlikte HT’nde TSH reseptörünü bloke edici antikorlar gözlenebilir. NIS proteinlerinin miktarı HT’nde azalmıştır. NIS antikorları deneysel çalışmalarda HT’inde %15 oranında saptanmış, fakat herhangi bir klinik önemi bulunamamıştır (33, 34).

Otoimmün tiroiditte genetik yatkınlık bilinmektedir. Otoimmün hipotiroidili hastaların akrabalarının yaklaşık %50’sinde tiroid antikorları saptanmıştır (35). Hastalığın genetiği ile ilgili MHC, HLA, CTLA-4 genlerini içeren spesifik genler araştırılmıştır. MHC-HLA kompleksiyle ilgili genlerle gerek Graves hastalığı, gerekse HT ile ilişkileri gösterilmiş, ancak bu gen poliformizmlerinin spesifik rolleri tam olarak anlaşılamamıştır (36). CTLA-4 poliformizmi HT’nde gösterilmiştir (37). CTLA-4 geni T hücre toleransını kontrol eden T hücre yüzeyindeki molekülü kodlayan immün modülatör bir gendir. Anerjinin oluşmasını sağlar ve T hücre cevabı üzerinde negatif etkisi vardır. HT’nde bu

gen polimorfizmiyle negatif etki ortadan kalkmakta ve sitotoksik hücre yıkımı oluşmaktadır.

Hastalık ilk defa 1912 yılında Hashimoto tarafından tiroid yıkımı olarak gözlemlenirken, bu yıkımdaki apoptotik süreç 1995 yıllarında farkedilmeye başlanmıştır (38, 39). Apoptozis (programlı hücre ölümü) hücrelerin normal gelişimi ve immün fonksiyon için önemli bir yeri olan hücre ölümünün düzenli bir şekilde gerçekleştirilmesidir. Apoptozisin temel hedefi hücre popülasyonundaki dengeyi korumaktır. Ana hedefi ömrü dolan veya zarar görmüş hücreleri yıkıma uğratarak, yeni hücrelere yer açıp hücre popülasyonunu sabit düzeyde tutmaktır. Normal tiroitte apoptozis temel düzeyde hücre döngüsünün kontrolüne ve hücrelerin yıkımına yardımcı olacak biçimde düşük düzeydedir.

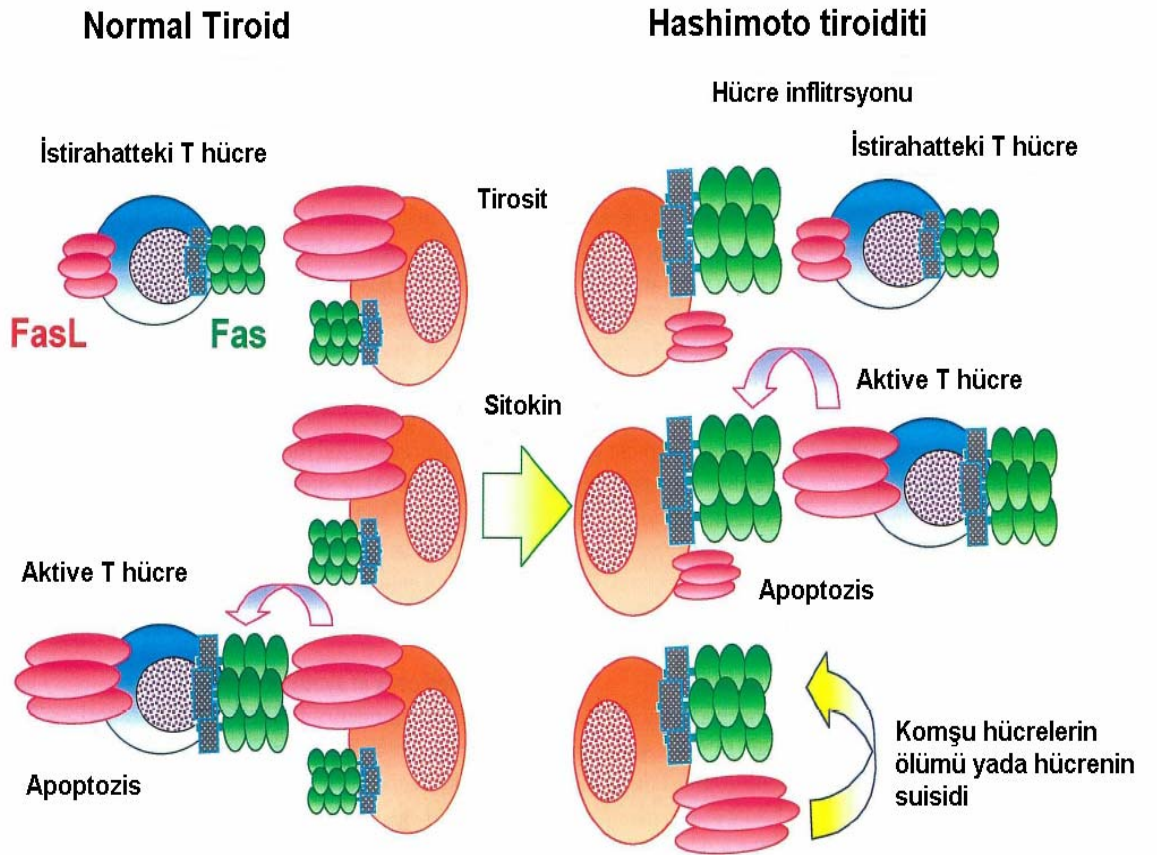
İnflamatuvar sitokinlerin immün sistemde apoptozisin kontrolünde birçok etkiye sahiptir. IFN- γ , IL-1, TNF- α gibi sitokinler immün aracılı apoptozisi direk veya indirek olarak etkilerler. Sitokinler, apoptozis yollarının komponentlerinin ekspresyonlarını ve apoptozis başlatıcılarının hücrel ekspresyonlarını kontrol edebilirler. Aynı zamanda apoptotik aktivite sürecinin ilerlemesine de katkıda bulunabilirler (40). İnflamasyonlu tiroitte birçok sitokin mevcuttur. Destruktif tiroiditte inflamatuvar sitokinler immün hücrelerin hedefi olan folliküller hücrelerde reseptör aracılı apoptozisin regülasyonunda rol alabilirler.

Tiroid hücrelerinin immün hücrelerce yıkımına neden olan birkaç farklı model tanımlanmıştır. Her bir model tiroid otoantijenlerine immün cevap, tiroid bezi hücrelerine immün hücre infiltrasyonunun uyarılması (başlangıç fazı) ve tiroid hücrelerinin ölümü (etkin faz) olmak üzere iki faza ayrılır. Yıkım olmayan başlangıç fazından yıkım olan etkin faza geçişin mekanizması tam olarak bilinmemektedir.

Giardino ve arkadaşları, 1997'de tiroidin inflamatuvar hücrelerce infiltrasyonu durumlarında Fas ve Fas ligandının ekspresyonunun tiroid hücrelerini apoptozise götürdüklerini göstermiştir (16). Fas ve FasL sitotoksik T lenfosit aracılı hücre ölümünde, inflamatuvar hücrelerin yıkımında ve sitotoksik T lenfositlerin tümör hücrelerini yıkımında en çok üstünde inceleme yapılan apoptotik yoldur. Fas aynı zamanda Apo-1 yada CD95 olarak isimlendirilen TNF reseptör ailesinin bir üyesidir. FasL, aktif T hücreler ve NK hücreler tarafından ekspresse edilen bir transmembran proteinidir. Fas, FasL'na bağlandığında sitotoksik sinyal dizisi başlar ve oluşan Fas-FADD-FLICE/kaspaz-8 kompleksi hücre ölümünü uyarıcı sinyal kompleksini tamamlar ve kaspaz-8'i aktive eder.

Aktifleşen kaspaz-8 bu kompleksten ayrılarak kaspaz-3'ü aktifleştirir ve apoptozise yol açan kaspaz zincirini başlatır (17).

Eguchi, normal tiroositlerde FasL'nın küçük miktarlarda ekspresse edildiğini göstermiştir. Tiroositlerde FasL'nın üretiminin T hücrelerinin uyarısıyla önemli derecede artarak apoptozise yol açtığı da bu çalışmada gösterilmiştir (15). Giardino ve arkadaşları ise HT'nde tiroositlerde FasL'nın ekspresyonunu, yine tiroositlerde IL-1 β 'nin uyardığı Fas ekspresyonu artışını, Fas ve FasL'nın HT'nde tiroositlerde eş zamanlı ekspresyonunu göstermişlerdir (16). FasL'ına bağlanan Fas'ın nasıl kontrol edildiği bilinmemektedir. Fas'ın kendiliğinden mi yoksa IL-1 β , IFN- γ , TNF- α tarafından uyarılarak mı ekspresse edildiği tartışmalıdır (15,41). Hücrel ve humoral otreaktiviteyle tiroid inflamasyonundan sonra aktifleşen makrofaj ve T lenfositler inflamatuvar sitokinleri üretirler ve bu durum Fas ekspresyonunu tiroitte artırır. Bu bilgiler HT'nde Fas aracılı apoptozisin iki farklı mekanizmayla olabileceğini akla getirmektedir: ilki aktive T hücreler aracılığıyla bu Fas-FasL etkileşiminin sağlanarak tiroitin apoptozisinin gerçekleşmesi, ikincisi aynı anda tirositte aktifleşen Fas-FasL'nın tiroitin suisidine yada komşu hücrelerin ölümüne yol açmasıdır (15,42) (şekil 1).



Şekil 1: Hashimoto tiroiditi ve normal tirositte Fas/FasL'nın rolü

Fas'ın uyardığı apoptozisin HT'nin patogenezinde santral rol oynadığı düşünülmektedir. İmmünohistokimyasal çalışmalar HT'nde apoptotik folliküler hücrelerin sayısında artış gösterilmiştir (43). HT'ndeki aktif T hücrelerinin çoğunluğunu Th1 lenfositler oluşturur (42). Th1 lenfositler nispeten IL-4 ve 10'un yokluğunda IL-2, IFN- γ ve TNF- α sitokinlerini üretir ve bu hücreler T hücre aracılı apoptozisi uyarırlar (44). Farklı olarak Graves hastalığında Th2 lenfositler baskın durumdadır ve daha az IL-2, IFN- γ ve TNF- α sitokinlerini üretirken daha çok IL-4-5 ve 10'u üretirler (44). Böylece otoimmün tiroiditte tiroid hastalığının sonucu lenfositik infiltrasyonda hakim olan T hücre tipine ve uyarılan apoptotik yada antiapoptotik yolların seçimine göre belirlenir (42). Antiapoptotik mekanizmalar Graves hastalığında tirostitin yaşamını uzatırken, HT'nde proapoptotik mekanizmalar tirostitlerin ölümüne neden olur (15). HT'nde apoptozise uğramış hücrelerin çoğu lenfoid hücrelerin infiltrate ettiği alanlarla yakın komşuluktaki folliküler alanlarda görülür (38).

Tiroid hücrelerinin reseptör aracılı apoptotik yıkımına yol açan diğer bir yolak da TRAIL'dir. TRAIL, FasL'ı ile önemli derecede homoloji gösteren bir ölüm ligandıdır. Tiroid folliküler hücrelerinde bu ölüm ligandının reseptörleri gösterilmiştir (45). Bu reseptörler inflamatuvar sitokinlerle kontrol edilir ve destrüktif tiroiditte ekspresyonları artar. FasL yolağında olduğu gibi IL-1 β , IFN- γ ve TNF- α eklenen hücre kültürlerinde TRAIL ekspresyonu artmıştır (46). Tiroidi infiltrate eden lenfositlerde de TRAIL mRNA ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (45). TRAIL yolağı Fas yoluna benzer şekilde kaspaz zincirini aktifleyerek apoptozise neden olur (15).

Apoptotik zincirin aktivasyonu aynı zamanda antiapoptotik Bcl-2 ailesi tarafından kontrol edilir. Graves hastalığında Bcl-2 ekspresyonu gösterilmiştir. HT'nde ise tirostitlerde Bcl-2 ekspresyonu azalmıştır (47). Bcl-2 ekspresyonunun HT'nde azalması hala incelenmektedir. Bcl-X bir diğer Bcl-2 ailesi üyesidir. İn vitro çalışmalarda proinflamatuvar sitokinlerle oluşturulan tirostit hücre kültürlerinde ekspresyonu azalmaktadır. Bu bilgilerin ışığında Palazzo ve arkadaşları HT'nde proinflamatuvar sitokinlerin aktifleştirdiği T hücrelerin Bcl-X ekspresyonunu azaltarak apoptozise eğilimi artırdığını ileri sürmüşlerdir (41). Apoptotik mekanizmaların hala bilinmeyen yönleri mevcuttur. Proapoptotik mekanizmaların ön planda olduğu HT'nde antiapoptotik tedaviler faydalı olabilir.

2.2. Endoplazmik Retikulum Stresi ve Apoptozis:

2.2.1. Endoplazmik Retikulum Şaperonlarının ve Proteinlerin Katlanmalarını Sağlayan Enzimlerin Rollerini:

Yeni sentezlenen proteinlerin gidecekleri hücrel bölgeye taşınabilmeleri için doğru şekilde katlanmaları ve üç boyutlu yapılarına ulaşmaları gereklidir. Bu işlemdeki başarısızlık bu taşınmaya hazır olmayan proteinlerin ER’da birikimleri ve yıkılmalarıyla sonuçlanır. Çok sayıdaki ER şaperonları ve protein katlantı enzimleri, proteinlerin sekresyona ve taşınmaya hazır hale gelmesi için olgunlaşmasına yardımcı olurlar ve bu işlemin monitorizasyonunu sağlarlar. Bu yapılar ER kalite kontrol kompleksi olarak isimlendirilirler (48). Yeni sentezlenen polipeptidler henüz katlanmamış olarak şaperonlarla etkileşim halinde ER içersinde tutulurlar (49). İki ana şaperon sisteminin etki mekanizması ve komponentleri iyi çalışılmıştır. Bunlardan ilki “lectin” benzeri “calnexin” ve “calreticulin” şaperonlarıdır. Bunlar olgunlaşmamış glikoprotein üzerindeki monoglikolize N-linked glikanlar ve katlanmamış bölgelerin varlığına bağlıdır. Olgunlaşmamış proteinler ER’un lümenine girdikten sonra sıklıkla 2 N-asetilglukozamin, 9 mannoz ve 3 glukoz molekülünün birleşiminden oluşan N-linked glikanlarla modifiye edilirler. Glukozlar hemen glukozidaz I ve II enzimleri tarafından çıkartılırlar (50). Glikan tek bir glukozla bırakıldığında artık “calnexin” ve “calreticulin” şaperonları için bir substrat olur (51). Protein katlanması tamamlandığında son glukozun çıkarılması bu şaperonların bağlanma yerini bozar ve olgunlaşmamış proteinin golgi cisimciğine transportuna izin verir (51,52). ERp57’nin (protein disülfid izomeraz ailesinin bir üyesi olup 2 thioredoxin motifi içerir ve ER’da bulunur) komplekse dahil edilmesiyle disülfid bağlarının oluşumu katalize edilerek protein katlanması stabilize edilir (53). Fakat, olgunlaşmamış proteini tam olarak katlanmayı bitiremezse glikoprotein glikoziltransferaz katlanmamış bölgeye bağlanır ve deglikolize glikana bir glukoz ekler ve UDP-glukozu (glucose-1-phosphate uridylyltransferase) oluşturur (51, 54). Böylece “calnexin” ve “calreticulin” şaperonları için tekrar bir bağlanma bölgesi oluşturur (55). Eğer olgunlaşmamış zincir katlanması olağan düzeninde olursa, UDP-glikoziltransferaz yeniden reaksiyona girmeyecek ve katlanmış protein ER’u terk ederek sekretuar yolağa devam edip nihai hedefine ulaşacaktır. Fakat katlanma tamamlanamaz veya yanlış olursa siklus protein yıkılana kadar sürekli tekrarlanacaktır (51, 55).

İkinci önemli ER şaperon sistemi hidrofobik rezidüleri içeren proteinlerdeki katlanmamış bölgelerin varlığına bağlı olan ER şaperonu HSP70 ailesinin bir üyesi olan

BIP'tir (56). BIP, HSP70 ailesiyle %60 homoloji gösterir. Fakat HSP70'den başlıca iki önemli fark gösterir. İlki BIP sinyal peptid dizilerine sahiptir ve ER'da işlev yapar. Oysaki HSP70 sitozoliktir ve sinyal peptid zinciri içermez. İkinci olarak BIP sentezi "heat shock" durumlarından etkilenmez (57). BIP, ER'da geçici olarak yeni sentezlenen proteinlere ve daha uzun süreli olarak yanlış katlanmış, glikolize ve birleştirilmesi tamamlanmamış proteinlere bağlanarak onların ER'dan transportunu engeller. Diğer Hsp 70 üyeleri gibi yeni sentezlenen proteinlerin katlanmasına, birleştirilmelerinin tamamlanmasına, katlanmamış proteinlerin tanınmasına yardımcı olur, protein polipeptidlerinin agregasyonunu önler. BIP N-ucu ATPase katalitik kısmı ve C-ucu substrat bağlayıcı kısmı olarak iki ana kısımdan oluşur. Bu kısımlar polipeptid bağlanmasının affinitesini ve süresini belirler. Böylece polipeptidler için C-ucuna afinite N-ucunun ATP yada ADP'yle dolu olup olmamasına bağlıdır. C-ucuna polipeptid bağlanması N-ucundaki ATP hidrolizinin oranıyla artar. BIP katlanmamış proteinlerle ATP bağımlı bir durum ortaya çıktığında bağlantıya geçer ve hızla ATP ADP'ye katalize olur. Böylece BIP katlanmamış protein üzerine kilitlenir. Sonraki basamakta BIP ATPase'la ATP'yi tekrar nükleotid içine alarak BIP'i tekrar ATP bağımlı duruma geçirir ve katlanmamış proteini serbest bırakır. Tabii ki katlanmamış proteinin serbest kalması proteinin üç boyutlu yapısını tamamlamasına kadar sürer. Bakteriler ve ökaryotik hücrelerin mitokondrilerinde GrpE proteinleri bu nükleotid değişim basamağını kontrol eder (58). Memelilerde GrpE benzeri moleküller diğer organellerde tespit edilmemekle beraber sitozolik Hsp70 için nükleotid değişimini kontrol eden başka sitozolik organellerde buna benzer moleküller tespit edilmiştir (59). Son zamanlarda bir memeli ER nükleotid değişim faktörü BAP klonlanmıştır (60). BAP, BIP'ten ADP'nin ayrılmasını uyarır. Bu nükleotid değişim proteinlerinin şaperonların Hsp70 ATPase döngüsünde sürekli olarak bağlanmalarını ve ayrılmalarını sağlayarak, proteinlerin katlanmasının ilerlemesini sağladıkları düşünülmektedir. ER stresine cevap olarak BIP'in aşırı ekspresyonu hücreleri apoptozisten korur (61). BIP kaspaz inaktivasyonu ve şu an bilinmeyen diğer mekanizmalarla apoptozisi engelleyici etki gösterir (62). Böylece patolojik durumlarda hücreyi ER stresinden koruyan temel koruyucu mekanizmayı oluşturarak organları korur ve aynı zamanda antiapoptotik etkisi nedeniyle kanser progresyonuna neden olabilir (63, 64).

ER'da bulunan diğer şaperon ve katlanma enzimleri GRP94, GRP170, ERp72, protein disüfid izomeraz (PDI) ve peptidil-prolyl izomerazdır. Fakat bu proteinlerinin çoğunun ER kalite kontrol ve iki ana şaperon sistemiyle bağlantıları tam olarak açıklanamamıştır. Son zamanlardaki bir çalışmada şaperon etkileşimlerinin stabilizasyonu

için bir kimyasal bağlantı kullanılmaktaydı. Bunu sağlayan ER’da bulunan multi-protein kompleksli ER şaperonlarının bir alt grubu idi. Bu şaperonlar BIP, GRP94, calcium binding isomerase protein-1, PDI, cyclophilin B, ERp72, GRP170, UGGT ve SDF2-L1’den oluşmaktadır (65). Bu şaperonlarla diğerleri bir ER ağı oluşturmaktadır. ER ağındaki ER şaperonlarının bir kısmı mevcut havuzdaki proteinlerin yerine katlanmamış proteinlere bağlanabilir. GRP94 bu kompleksin ana komponentidir. Sitozolik şaperon komplekslerinde HSP90’ın oynadığı primer role benzer şekilde komplekslerin toplanmasını ve görevlerini yapmasında ana rol oynar. Olasılıkla bu kompleks sekretuvar yol boyunca proteinlerin eksik katlanmalarını önleyerek yada toplanmasını sağlayarak işlev görür. ER lümeninde olgunlaşmamış sekretuvar yol proteinleri; yapısal elementler, moleküler şaperonlar, katlantı enzimleri ve diğer katlanmamış proteinlerin konsantre karışımı içine ve karmaşık birtakım reaksiyonlara girmelerine rağmen, çok hızlı bir şekilde katlanmaları tamamlanır. İlginç olarak, ER içinde en çok bulunan şaperonların önemli bir kısmını içeren “Calnexin/calreticulin/ERp57” sisteminin komponentlerinin çoğu bu kompleks içinde yer almaz.

BIP ve “calnexin” protein katlanmasındaki rollerine ek olarak, ER içersine olgunlaşmamış proteinlerin girişini arttırlar. BIP, ER ve sitozol arasında geçirgenlik bariyerini korumak için protein yer değiştirmesinin erken dönemi boyunca bir tıpa görevi görür. Bu BIP’i ER’a giren olgunlaşmamış zincirlere bağlanabilmesi için ideal bir noktada durmasını sağlar. Fakat hayvan deneylerindeki gözlemler henüz memeli hücrelerinde doğrulanmamıştır. Eğer BIP’in memeli hücrelerindeki translokasyonda bir görevi varsa, bu olasılıkla glikolize olmayan proteinlerin elde edilmesi için olacaktır. ER içersine glikoprotein translokasyonu sırasında N-linked glikanına bağlı olarak iki şaperon sisteminden birinin seçildiği düşünülmektedir. Fakat katlanma olayı başladığında bir sistemden diğerine geçiş olabilir.

2.2.2. Katlanmayan Proteinlerin Tanınması ve Yıkımı:

ER kalite kontrolünden geçemeyen olgunlaşmamış proteinler ER’da birikmezler ve yıkılırlar. Bu proteinler şaperon sistemi dışında biriktirilirler veya hücreye toksik olabilen büyük çözünemeyen birikintiler oluştururlar. Bu sirkülasyon mekanizması ER ilişkili protein yıkımı (ERİPY) olarak isimlendirilir. Maya gibi en basit ökaryotik sistemlerden memeli gibi gelişmiş canlılara kadar bu sistem korunmuştur. ERİPY’in son basamağı en iyi maya hücrelerinde tanımlanmıştır. Hem olgunlaşmamış proteinler hem aşırı kümelenmiş proteinlerin alt birimleri Sec-61 içeren protein aracılığıyla tekrar sitozole dönerler. Bu ER lümenine ilk girişlerindeki yolağa benzer bir yolla olur. Bu olay ER membranının sitozolik yüzeyinde bulunan “ubiquitin” (Ub) proteinini içeren kompleksle birlikte hareket eder. Ub genellikle ökaryot hücrelerde üretilen küçük bir proteindir. Substratların ubiquitinasyonu Ub aktive eden enzim (E1), Ub birleştirici enzim (E2), Ub ligaz enzimlerine (E3) bağımlı birçok basamaktan oluşur. ER membranındaki bu kompleks ERİPY olayını kolaylaştırır. Ubiquitinasyona uğramış ERİPY substratları sitozolik 26S protezomu tarafından yıkılır. Bu olaylar zinciri normal fizyolojik koşullarda ER homeostazını korumak için önemli görünmektedir.

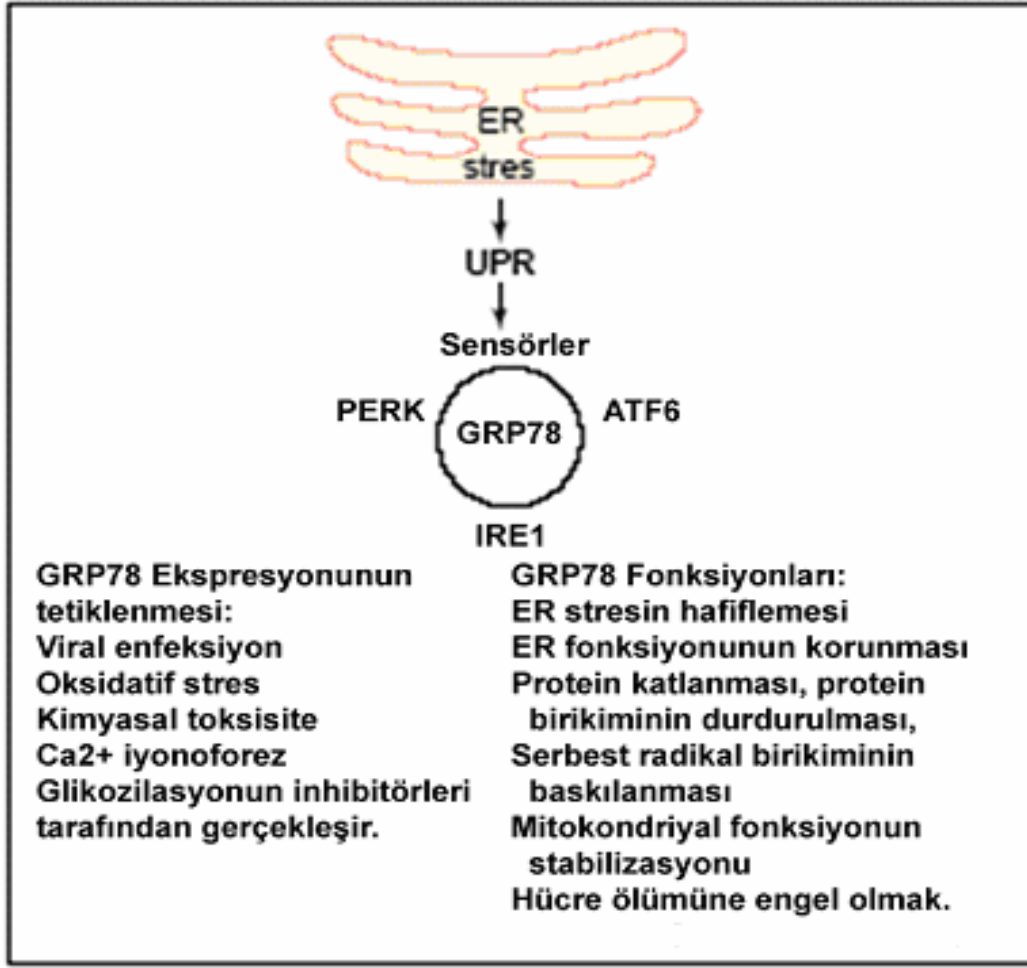
Olgunlaşmamış proteinlerin hücreler tarafından nasıl tanındığının mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Olası bir mekanizma BIP, “calnexin”, “calreticulin” gibi ER şaperonlarının bu olaya dahil olduğudur. BIP’in bu aşamadaki rolü uygun katlanmış ve katlanamamış çok çeşitlilikteki proteinleri birbirinden ayırmaktır. Bu şaperonlarla oluşan glikoprotein değişiklikleri bu moleküllerin tanınmasını sağlıyor olabilir. Son zamanlardaki bir bilgi calnexin ve BIP’in bu moleküllerin tanınmasında ardışık sırayla rol aldıklarını düşündürmektedir (66).

2.2.3. Katlanmamış Protein Cevabı ve Endoplazmik Retikulum Şaperon Düzeylerinin Kontrolü:

Ökaryotik sekretuar proteinler doğru katlanamadıklarında ER’da birikirler ve BIP ve diğer moleküler şaperonlarla stabil kompleksler yaparlar. Glukoz eksikliği, patojenik enfeksiyon, kimyasal yaralanma, genetik mutasyon, glikoproteinlerin glikolize olamaması, artan protein sentez ve sekresyonu, ER’a kalsiyum akımı gibi birçok fizyolojik ve patolojik durum ER stresini uyarır (3). Katlanmamış proteinlerin ER’da birikimi ER’da bulunan bir dizi şaperon ve enzimlerin genlerinin transkripsiyonunun artmasına yol açar (67). Bu

hücrel cevap katlanmamış protein cevabı (UPR) olarak isimlendirilir. Katlanmamış protein cevabının temel amacı mutant veya katlanmamış proteinlerin birikmesiyle oluşan toksik yükten hücreyi korumaktır. Katlanmamış protein cevabı ER'daki katlanmamış protein yükünü azaltmak için protein translasyonunu azaltır, proteinlerin katlanma, sekresyon ve yıkım kapasitelerini şaperonların yardımıyla artırarak ER stresini ortadan kaldırmaya çalışır. Katlanmamış protein cevabı uyarıldığında ilk önce protein sentezinin hızı azalır, ikinci aşamada şaperonları kodlayan genlerin transkripsiyonu artırılarak polipeptid agregasyonu önlenir ve polipeptidlerin katlanması hızlandırılır, üçüncü aşamada ER'daki mutant proteinlerin retrotranslokasyonu ve yıkımı (ERİPY) sağlanır. Şaperon proteinler katlanma işleminin kolaylaştırır ve proteinlerin agregasyonunu önler.

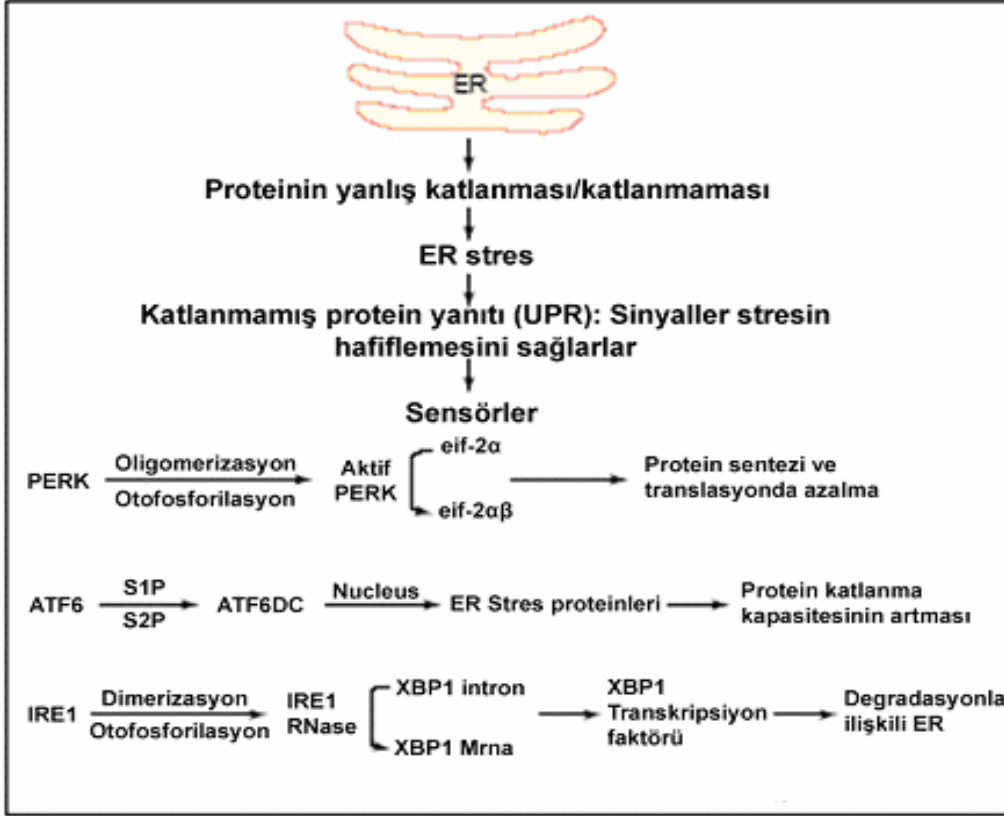
Katlanmamış protein cevabının başlangıç sinyali direk katlanmamış proteinlerle değil, bunlara bağlanan lümendeki serbest BIP düzeyinin azalmasıyla başlar (8). ER'daki serbest BIP düzeyinin azalması algılanarak nükleusla bağlantıya geçilmesi sonucu gen transkripsiyonu başlar. Serbest BIP düzeyleriyle ER'daki protein olgunlaşmasındaki değişiklikler monitorize edilebilir (68). UPR yolağı proksimal algılayıcı işlevi yapan ATF-6, IRE-1 ve PERK isimli üç ana transmembran ögesine sahiptir. Stres olmayan koşullarda bu sensörlerin lümendeki kısmı BIP tarafından tutularak bu sinyal yolları kontrol altında tutulur. Stres durumlarında BIP katlanmamış proteinlerle bağlanarak, onların agregasyonunu önler ve katlanmalarına yardımcı olur. Bu arada katlanmamış proteinler tarafından tutulan BIP'in ATF-6, IRE-1 ve PERK'in lümendeki kısımlarından ayrılması gerçekleşir. Katlanmamış proteinlerle, bu şaperonların BIP için birbirleriyle yarışmaları için bu ayrılmanın olduğu düşünülmektedir. Sonuçta PERK ve IRE-1 fosforilasyonla, ATF-6 ise önce golgiye taşınıp orada S1P ve S2P proteazlarıyla bölünerek aktif duruma geçer (3)(Şekil-2).



Şekil 2: BIP/GRP78 normal koşullarda PERK, ATF-6, IRE-1'i inaktive durumda tutarken ER stresıyla bu şaperonlardan ayrılarak onların aktivasyonuna neden olur.

PERK bir eIF2- α kinazdır ve olgunlaşmamış proteinlerin aşırı birikmelerini engellemek için ER stres cevabının erken fazı sırasında genel protein translasyonunun inhibisyonundan sorumludur. Aynı zamanda ATF4/CREB kompleksini de indükleyerek apoptozisten sorumlu CHOP gen bölgesinin ekspresyonunu artırır. ATF-6 aktivasyonu diğer transkripsiyon faktörleri ve moleküler şaperonların (CHOP, BIP, PDI, GRP94) uyarılmasında görevlidir. Bu işlem ER'un protein katlama kapasitesini artırarak stresi hafifletmesine yardımcı olur ve CHOP gen bölgesinin aktivasyonu ile apoptozisi indükler. Yine IRE-1'le birlikte XBP-1'in transkripsiyonuna katılır. IRE-1'in aktivasyonu XBP-1'i aktive eder. XBP-1 ERİPY ile ilişkili protein ve moleküler şaperonların transkripsiyonunu başlatarak katlanmamış proteinlerin tekrar sitozole geçip peroksizomda yıkılma işlemini artırır. Ayrıca CHOP geninin transkripsiyonunu artırarak apoptozise katılır. Yine IRE-1 TNF reseptörüyle ilişkili faktör-2 (TRAF-2)'nin ekspresyonunu artırır. TRAF-2

apoptozisle ilişkili JNK ve antiapoptotik NF- κ B'nin ekspresyonlarını artırır (3). Aynı şaperonun hem proapoptotik, hem anti-apoptotik yollara sahip olup bunları ne zaman ve hangisini devreye sokacağı konusundaki bilgiler yetersizdir. Ana ER şaperonu BIP bu üç iletici molekülü kullanarak UPR aktivasyonunu direk kontrol eder (9)(Şekil-3).



Şekil 3: PERK, ATF-6 ve IRE-1'in BIP'ten ayrılıp, aktive olduktan sonra izledikleri yollar.

ER stresi aynı zamanda immün cevabı da başlatır. CREB/ATF ailesine ait karaciğere özgü transkripsiyon faktörü olan, yapısal olarak ATF-6'ya benzeyen CREB-H proinflamatuvar sitokin veya lipopolisakkaridlerin varlığında katlanmamış protein cevabı aracılığıyla immün cevabı başlatır. CREB-H da aynen ATF-6 gibi ER stresinin uyarılmasıyla golgiye taşınarak S1P ve S2P proteazlarıyla bölünerek aktive olur. Aktive olan CREB-H akut faz cevabının inflamatuvar komponentlerinin genlerinin transkripsiyonunu sağlar. Hepatositlerde CREB-H ve ATF-6'nın her biri diğerinin ER stresine ilgili hedef genlerinin ekspresyonunu sinerjistik olarak aktive ettiği gösterilmiştir. ATF-6'da akut faz reaksiyonuyla ilgili genlerin transkripsiyonunu artırır. Ayrıca

hepatositlerde CREB-H aracılı akut inflamatuvar cevabı artırıcı etki gösterir. Olasılıkla CREB-H/ATF-6 ER stresi ile akut inflamatuvar cevap arasındaki ilişkinin patogenezi açıklamaktadır (69).

Endoplazmik retikulum şaperonlarının ERİPY sırasında yükselmesi mutasyondan mutasyona, dokudan dokuya, fizyolojik veya patolojik durumlara göre farklılık gösterir. Bu yüzden ER şaperonlarının düzeylerinin tanısal önemi olabilir (70).

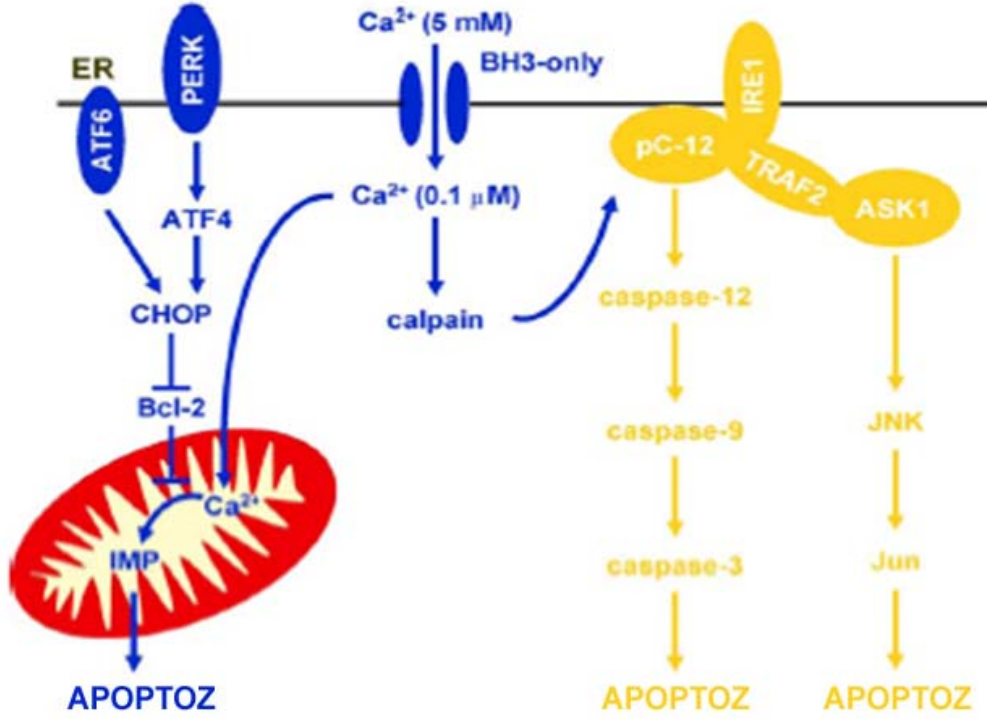
2.2.4. Endoplazmik Retikulum İlişkili Protein Yıkımı ve Apoptozis:

Endoplazmik retikulum şaperonlarının strese cevabı fizyolojik durumlarda olana benzer şekildedir. ER şaperonlarının temel fonksiyonu yanlış katlanma ve agregasyonu önleyerek protein katlanmasını ilerletmektir. ER stres durumları sırasında ER ortamındaki değişiklikler birçok proteinin katlanmasını ciddi şekilde etkiler. Bu olay proteinlerin BIP şaperon sisteminin yanı sıra “calnexin/calreticulin” şaperon sistemlerine bağlanmasını da içerir. Her ne kadar BIP ER stresinin monitorizasyonunda tek şaperon olsada, ER stresinde birçok şaperon koordineli olarak çalışır. Böylece ER şaperonlarının temel işlevi olgunlaşmamış proteinlere bağlanmak ve agregasyonlarını engellemek, eğer ER için normal fizyolojik durumları sağlayabilirlerse bu proteinlerin tekrar katlanmalarını sağlamaktır. Geçici stres durumlarında şaperonlar proteinleri tutar ve stres geçtikten sonra proteinlere tekrar katlanma şansı verir. Memeliler normal fizyolojilerinin bir parçası olarak kan şekeri değişiklikleri ve toksinlere maruziyet gibi geçici streslerle sürekli karşılaşır. Bu geçici stresler farmakolojik olarak indüklenen durumdan daha fizyolojiktir. Bu işlemlere rağmen hala hatalı olan proteinler ERİPY yolağı aracılığıyla peroksizomlarda yıkılır.

Stres sırasında ER ilişkili yıkım sırasında ER şaperonlarının oynadığı roller, olasılıkla normal fizyolojik durumlarda olan olayların aynısı, fakat normal fizyolojik durumlarındakine göre daha abartılıdır. BIP memeli hücrelerinde ER ilişkili substratlara bağlanır ve yıkımın oranlarını kontrol eder ve sonuçta “calnexinle” BIP sırasıyla hedef proteinleri tanıyarak işaretler.

Stres uzaması durumunda hasar çok şiddetli olur ve homeostaz düzeltilemezse ER’da mutant proteinler birikir ve ER’da bulunan kaspaz-12 proteinini içeren apoptotik yol aktive edilir. Kaspaz-12’nin aktivasyonunun mekanizması hakkında çok az bilgi mevcuttur. Apoptotik hücre ölümünde kaspaz yolunun aktivasyonu santral rol oynar (71). ER stresi sırasında katlanmamış protein cevabında proksimal etkileyici olan Ire-1α’nın aktivasyonu apoptozisde santral rol oynayan TRAF-2 adaptör proteininde toplanır ve

apoptotik ölüme yol açan JNK yolunu veya anti-apoptotik NF- κ B yolunu aktive eder. Ayrıca IRE-1 direk olarak da kaspaz-12'nin aktivasyonunu artırarak apoptozise neden olur. Hücrenin apoptozise gidip gitmeyeceği bu iki yolak arasındaki etkileşime bağlıdır. NF- κ B kaspaz yolağını baskılar ve JNK aktivitesini azaltır (72). TRAF-2, JNK yolunu uyararak prokaspaz-12'yi aktive eder (73). Sonuç olarak ER stresi sırasında kaspaz-7 ER membranına doğru yer değiştirir ve daha ileri aşamada ayrılma ve aktivasyonu kaspaz-12 ile ilişki kurmasını sağlar. Tüm bunlar apoptotik kaspaz zincirini harekete geçirir. Ancak JNK ve NF- κ B arasında TRAF-2 reseptörü tarafından seçimin nasıl ve ne zaman yapıldığı belirsizdir. BIP kaspaz-7 ve 12'nin serbestleşmesini ve aktivasyonunu baskılayarak anti-apoptotik özellik gösterir (62). Hücre kültürü çalışmalarında bu anti-apoptotik etki ilk 24 saatte hücreyi korurken, 24. saatten sonra stres uzuyorsa kaspaz aktivitesi baskın gelmeye başlamaktadır. Uzamış streste BIP-kaspaz-7/kaspaz-12 kompleksinin proteolitik parçalanması aktif kaspaz-12'nin salınmasına neden olur. Kaspaz zincirinin aktivasyonunu kaspaz-9, Apaf-1, sitokrom-c ve (d)ATP gibi apoptozomlar kolaylaştırır. BIP-kaspaz-12 kompleksinde bulunan (d)ATP bu inhibitör kompleksin parçalanmasına neden olur (7). PERK/ATF-4-CREB, IRE-1/XBP-1 ve ATF-6 direk ve XBP-1 aracılığıyla CHOP gen aktivasyonunu artırarak başka bir yoldan apoptozise neden olur. CHOP, ER'da lokalize antiapoptotik özellikteki Bcl-2'nin transkripsiyonunu baskılar ve bu yolla yine kaspaz zincirini aktive ederek apoptozise neden olur (74). BIP, IRE-1/TRAF-2, PERK/CHOP kompleksleri ve kaspaz zinciri arasındaki etkileşimler hücrenin ölümü yada yaşamasını kontrol ediyor görünmektedir. Birkaç apoptozisi indükleyen yol tanımlanmasına rağmen ER stresinin uyardığı apoptozisin mekanizması tam olarak açıklanamamıştır. Mesela apoptozisin indüklendiği gerekli eşik değeri, proapoptotik yolların ilerlemesi hangi noktada geri dönüşümsüz olduğu bilinmemektedir (Şekil-4).



Şekil 4: UPR ile kontrol edilen apoptotik yollar

2.2.5. Endoplazmik Retikulumda Proteinlerin Birikimini İçeren Hastalıklarda Katlanmamış Protein Cevabı Hastalık Durumunu Göstermede Tanısal Bir Belirteç Olabilir:

Düşük düzeyli ökaryotlarda yapılan çalışmalarda UPR'nin artması hücrenin varlığını sürdürmesinin gerekliliğinden dolayı BIP hücre yaşamı için esastır (75, 76). Hüresel düzeyde BIP ve diğer şaperonlar protein sekresyonunun negatif sonuçlarını düzeltirler ve BIP düzeylerinin artması veya azalması stres koşullarında hücre büyümesi veya yaşamı için zararlı durumların bir göstergesi olmaktadır (77, 78).

2.2.6. Otoimmün Hastalıklarda BIP Şaperonu:

HSP-72 ekspresyonu Graves, HT hastalarının tiroid dokusunda gösterilmiştir (8, 9). Ötiroid HT, hipertiroid Graves hastalığında HSP72 reaktivitesi varken toksik veya ötiroid multinodüler guvatr ve kontrol grubunda bu gözlenmemiştir. Organ spesifik otoimmün süreçle etkilenen tiroid dokusunda HSP72'nin varlığının olası bir açıklaması olarak kronik hüresel stres gösterilmektedir (10). Tirositten HSP72 ekspresyonun otoimmün tiroid hastalığındaki kronik stres ortamından kaynaklanıp kaynaklanmadığı veya gelişen

otoimmün sürecin erken bir bulgusu olup olmadığı veya hastalığı tetikleyip tetiklemediği ayırt edilememiş (79). BIP'le otoimmünite ilişkisinin ayrıntıları açık değildir. HSP ekspresyonunun otoimmün tiroid hastalıklarının etyolojisindeki rolü veya HSP ekspresyonunun hastalığın bir sonucu olup olmadığı şu an bilinmemektedir.

BIP, ER'da oldukça fazla miktarda bulunan bir proteindir. Son zamanlardaki çalışmalar RA'in patogenezinde BIP'e spesifik otoimmünitenin rolü olduğunu düşündürmektedir. RA'li hastaların %30-60'ında Anti-BIP otoantikoları T hücre otoreaktivitesiyle aynı düzeyde saptanmıştır (19, 80). Bodman-Smith ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, RA'li hastaların serumlarında ve sinovyal sıvılarında otoimmün olmayan artritli ve kontrol hastalarına göre serumda BIP'e karşı oluşturulan antikor düzeyleri anlamlı olarak yüksek saptanmış. Ancak RA'le ilişkili antikorlarla Anti-BIP düzeyleri arasında herhangi bir bağlantı kurulamamıştır. Ayrıca RA başlangıcındaki hastalarda antikor düzeyleri daha ileri dönemdeki RA'li hastalara göre daha yüksek saptanmıştır (18). Bu çalışmada, Anti-BIP antikorlarının BIP düzeylerini azaltarak BIP'in inflamatuvar olaylardan ve apoptozisten koruyucu etkisinin bloke edildiği düşünülmektedir. Zaten aynı grubun deneysel bir çalışmasında BIP'le tedavi edilen ratlarda kollajenin indüklediği artrit oluşumuna direnç gözlenmiştir (19).

Birkaç çalışmada RA'de otoimmün tiroid hastalığı riski artmıştır (81, 82). Bu bilgiler RA'le otoimmün tiroid hastalıkları arasındaki ilişkiyi desteklemektedir. CTLA-4 poliformizmiyle RA arasında olan ilişkinin benzer şekilde otoimmün tiroditle olması nedeniyle bu ilişkiye şaşırılmamak gerekiyor (37).

Son zamanlarda yapılan çalışmalardan birinde hücre kültürüne katılan BIP IL-10 yapımını uyarmıştır (83). Klonlanan CD8+ BIP spesifik T hücrelerin IL-4 ve IL-5 ürettiği de gözlenmiştir (84). Bu gözlemler BIP'in immün modülatör özelliklerini ortaya koymuştur. BIP'in RA'deki koruyucu etkisi Th-2 sitokin üretimini uyarmasıyla ilişkilidir. CTLA-4 ekspresse eden T-lenfositler, diğer T-lenfositleri baskırlar. CTLA-4'ün ekspresyonu için iki tane CD-8+ BIP'e yanıt veren klon incelenmiştir. Bunlardan biri sitoplazmik olarak ekspresse edilir. Sonuç olarak BIP'e cevap veren Th lenfositler immün sistem üzerinde düzenleyici etkiye sahip görünmektedir (84). Farelerde verilen BIP tedavisi kollajenin indüklediği RA'in oluşumunu engellemiştir (19). RA'de gözlenen Anti-BIP antikorları bu immün modülasyonu bozuyor olabilir.

BIP tedavisi RA indüklenen deneysel çalışmalarda RA aktivasyonunu baskılamıştır (19). Bir eIF2 α inhibitörü olan (PERK benzeri) Salubrinal ise ER üzerindeki yükü, protein sentezini azaltarak hafifletmektedir. Bu küçük molekül hala deneysel aşamada olup

diyabet, HIV, nörodejenerasyon, iskemi gibi durumlarda faydalı olabileceği düşünölmektedir (85).

Özet olarak ER şaperonlarının ER fonksiyonlarını kontrol ettiğine dair çok sayıda çalışma vardır. BIP protein katlanmasını etkileyen ER ortamındaki hücrenel mekanizmalarda santral rol oynamaktadır. Protein katlanmasındaki basamakların proksimal olaylarında görev almaktadır. Bunun yanında olasılıkla stresin ortadan kalkmasından sorumludur. Stresin uzaması ve katlanmamış veya mutant protein agregasyonları artık katlanmamış protein cevabı kapasitesini aştığında apoptotik yollar devreye girmektedir. Antiapoptotik etkisi olan BIP şaperonuna karşı oluşan antikorlar HT'nde oluşan apoptozisin mekanizmasında rol oynayabilir.

3. HASTALAR ve YÖNTEM

3.1. Hastalar:

Çalışmaya 2006 ile 2007 yılları arasında Başkent Üniversitesi Hastanesi Endokrinoloji polikliniğine başvuran 99 hasta çalışmaya dahil edildi. Kontrol grubu (grup 1) 37 sağlıklı gönüllünün verdiği serumlardan oluşturuldu. Otoimmün tiroiditli hastaların 20 ötiroid otoimmün tiroidit (grup 2), 27 subklinik hipotiroidi (grup 3), 15 hipotiroid HT (grup 4) olmak üzere 62 hastadan oluşmaktaydı.

Hashimoto tiroiditli hastalarda tanı, Anti-tiroid peroksidaz, Anti-tiroglobulin, TSH, sT4, tiroid ultrasonografi ve klinik bulgularıyla konuldu. Hiçbir hastada enfeksiyöz veya otoimmün bir hastalık yok idi. Gene çalışmaya dahil ettiğimiz hastalarda herhangi bir ilaç kullanma öyküsü yok idi. Hipotiroidili hastalarda TSH yüksek, sT4 düşüktü, sT3 düşük veya normal sınırlar içinde idi. Subklinik hipotiroidili hastalarda TSH yüksek, sT4-sT3 düzeyleri normal seviyelerde idi. Ötiroid hastalarda TSH, sT4, sT3 düzeyleri normal seviyelerde idi. Her 3 grupta Anti-tiroid peroksidaz ve Anti-tiroglobulin antikorlarından birisi veya herikisi birden yüksek idi. Otoimmün tiroiditli hastaların % 75'inde tiroid ultrasonografisi hipoekoik patern göstermekteydi.

Kontrol grubundaki hastalarda da herhangi bir enfeksiyöz, otoimmün hastalık, ilaç kullanımı öyküsü yoktu. Hastaların TSH, sT3, sT4, Anti-tiroid peroksidaz, Anti-tiroglobulin düzeyleri ve tiroid ultrason görüntüleri normaldi.

Kan örnekleri pıhtılaşma süresi ardından 3000 rpm de 15 dk santrifüj edildikten sonra serumlar ayrılarak hormon düzeyleri ve Anti-tiroglobulin hemen çalışılırken Anti-tiroid peroksidaz ve Anti-BIP toplu olarak çalışılmak üzere -70°C 'de saklandı.

3.2. Tiroid Hormonlarının ve Anti-tiroglobulin Çalışılması:

Tiroid fonksiyonlarını değerlendirmek için, sT3, sT4, TSH seviyeleri ve Anti-tiroglobulin kemilüminisan enzim immunoassay yöntemiyle BioDPC, USA kitleri kullanılarak hormon analizörü (Immulate One) aracılığıyla ölçüldü.

Serum sT4, sT3, TSH, anti-tiroglobulin, düzeyleri kemilüminesans yöntemiyle Immulate ONE analizöründe (DPC, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, USA) ölçüldü. TSH çalışmasında üçüncü jenerasyon kiti kullanılmış olup, analitik duyarlılığı 0,004 $\mu\text{IU/ml}$, referans aralığı 0.4-4 $\mu\text{IU/ml}$ olarak kabul edildi. (Döngü içi CV: %3,8,

döngüler arası CV: %4,6) sT3 ve sT4 için referans aralığı sırasıyla 1.8-4.2 pg/ml, 0.8-1.9 ng/dl'dir. Anti-Tg için referans aralığı 0-40 IU/ml'dir.

3.3. Anti- tiroid peroksidaz Çalışması:

İndirect immunofluorescence (İFA) metodu yöntemiyle çalışıldı (Euroimmun, Germany). 1/100 titrasyondan itibaren 1/320 ve 1/1000 titrasyon ile değerlendirme yapılmıştır. 1/100 değerinin altındaki titrasyonlar negatif olarak değerlendirilmiştir.

3.4. Anti-BIP ELISA Çalışması:

ELISA plağında her bir kuyucuk pH 8,2 10 ug/ ml BIP içerecek şekilde hazırlanan tampon ile kaplandı. Spesifik olmayan bağlanmaları önlemek amacıyla %10 goat serum eklendi. Plak üstü kapalı şekilde 24 saat oda ısısında bekletildikten sonra 1/100 dilüe edilmiş hasta serumları eklenerek bir gece +4°C'de bekletildi. Her bir kuyucuğa %1 bovine serum ve %0,05 Tween 20 eklenmiş 1/20000 PBS tampon içinde konjugat eklendi. Son aşamada 3,3',5,5' tetrametil benzidin (TMB) eklenmesi ile renk oluşumu gözlemlendi. Plak 450 nm de okutularak hasta ve kontrol örnek absorbanları kaydedildi.

3.5. İstatistik Değerlendirme:

İstatistik analiz için Windows tabanlı SPSS programı (11.0 versiyon, Chigago, IL) kullanıldı. Normal dağılan veriler için gruplararası farkları test etmede varyans analizi yöntemi kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılığın hangi iki grup arasında olduğunu test etmede post-hoc test olarak Tukey testi kullanılmıştır. Normal dıőı dağılan veriler için gruplararası farkları test etmede Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. İkili grup karşılaőtırmaları Mann-Whitney U testi ile analiz edilmiştir.

4. BULGULAR:

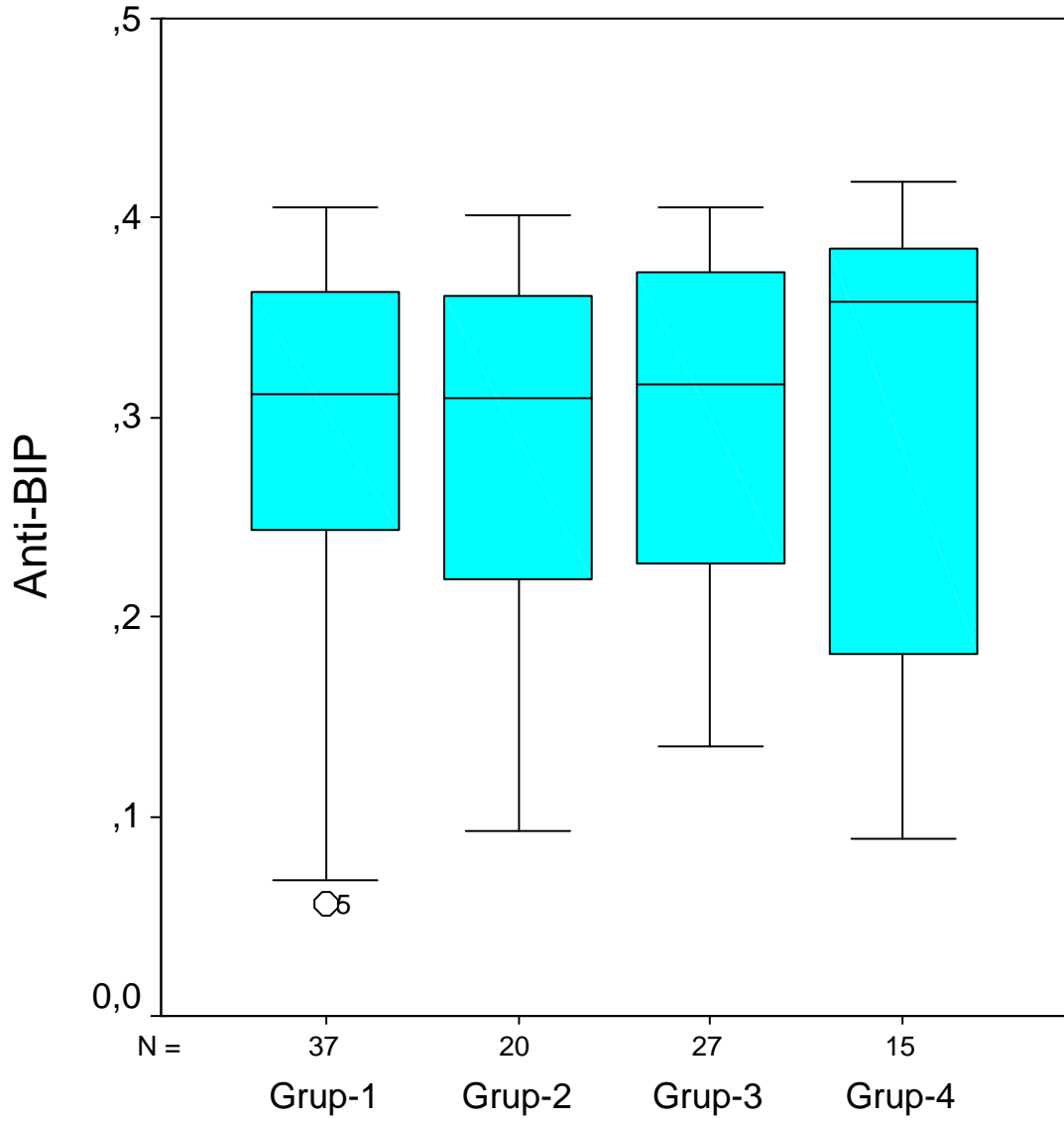
Sağlıklı gönüllülerin oluşturduğu kontrol grubu 37 hastadan oluşturuldu. HT'li hastaların 20'sini ötiroid otoimmün tiroiditli, 27'sini subklinik hipotiroidili, 15'ini hipotiroid HT'li hasta gruplarından olmak üzere 62 hastadan oluşturuldu. Bazal değerlendirmede dört grup arasında yaş, cinsiyet, değerleri arasında farklılık yoktu. Hastaların özellikleri Tablo 2'de verilmiştir.

Grup 2,3,4'ün grup-1 ve kendi aralarında Anti-BIP düzeyleri açısından kıyaslandığında herhangi bir fark saptanmadı ($p=0,889$). Grupların Anti-BIP düzeyleri açısından karşılaştırılması şekil-5'de verilmiştir.

Tablo 2: Hastaların genel özellikleri

Hasta Özellikleri	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	P
Cinsiyet					
K/E	31/6	19/1	23/4	14/1	AD
Yaş (yıl)	32,27±8,47	34,90±11,86	38,56±11,18	38,93±10,46	AD
TSH (0.4-4 µIU/ml)	1,43±0,89	11,96±0,90	13,12±13,95	47,19±33,92	<0,001
sT4 (0.8-1.9 ng/dl)	1,325±0,22	1,20±0,16	1,04±0,21	0,51±0,09	<0,001
sT3 (1.8-4.2 pg/ml)	2,78±0,54	2,96±0,68	2,87±0,62	2,39±0,71	AD
Anti-TPO	0	770,53±403,1	842,86±311,5	740,0±436,9	<0,001
AntiTg (0-40 IU/ml)	27,59±12,57	288,71±350,2	345,8±364,41	549,3±427,5	<0,001
Anti-BIP	0,28±0,09	0,28±0,09	0,30±0,84	0,29±0,12	AD

Kısaltmalar: grup 1: kontrol grubu, grup 2: ötiroid otoimmün tiroidit, grup 3: subklinik hipotiroidi, grup 4: hipotiroid HT, K: kadın, E: erkek, AD: anlamlı değil.



Şekil 5:Gruplar arası Anti-BIP düzeylerinin karşılaştırması

5. TARTIŞMA:

Hashimoto tiroiditi ilk defa 1912 yılında Hashimoto tarafından tiroid yıkımı olarak gözlemlenirken, bu yıkımdaki apoptotik süreç 1995 yıllarında farkedilmeye başlanmıştır (38, 39). Giardino ve arkadaşları, 1997’de tiroidin inflamatuvar hücrelerce infiltrasyonu durumlarında Fas ve FasL’nin ekspresyonunun tiroid hücrelerini apoptozise götürdüklerini göstermiştir (16). Fas, FasL’na bağlandığında sitotoksik sinyal dizisi başlar ve oluşan Fas-FADD-FLICE/kaspaz-8 kompleksi hücre ölümünü uyaran sinyal kompleksini tamamlar ve kaspaz zincirini aktive ederek tirositlerin apoptozisine yol açar. (17). Tiroid hücrelerinin reseptör aracılı apoptotik yıkımına yol açan diğer bir yolak da TRAIL’dir. TRAIL, tiroid folliküler hücrelerinde reseptörleri bulunan ve FasL’ı ile önemli derecede homoloji gösteren bir ölüm ligandır. TRAIL yolağı da Fas yolağına benzer şekilde kaspaz zincirini aktifleyerek apoptozise neden olur (15).

Stres durumlarında BIP katlanmamış proteinlerle bağlanarak, onların agregasyonunu önler ve katlanmalarına yardımcı olur. Bu arada katlanmamış proteinler tarafından tutulan BIP’in ATF-6, IRE-1 ve PERK’in lümenindeki kısımlarından ayrılması gerçekleşir (3). Tiroid hücrelerinde TSH uyarısıyla UPR yollarından PERK ve ATF-6’nın aktivasyonu gösterilmiştir. Fakat aynı çalışmada IRE1 aktivitesi gösterilememiştir. Yine bu çalışmada PERK/ATF-4/CHOP yolağının aktifleştiği gösterilmiştir (86). Stres uzaması durumunda hasar çok şiddetli ve homeostaz düzeltilemezse ER’da mutant proteinler birikir ve ER’da bulunan kaspaz-12 proteinini içeren apoptotik yol aktive edilir (4). PERK/ATF4-CREB, IRE-1/XBP-1 ve ATF-6 direk ve XBP-1 aracılığıyla CHOP gen aktivasyonunu artırarak kaspaz zincirini aktive ederek apoptozise neden olur (74).

ER stresine cevap olarak BIP’in aşırı ekspresyonu hücreleri apoptozisten korur (61). BIP kaspaz inaktivasyonu ve şu an bilinmeyen diğer mekanizmalarla apoptozisi engelleyici etki gösterir (62). Böylece patolojik durumlarda hücreyi ER stresinden koruyan temel koruyucu mekanizmayı oluşturarak organları korur (63).

Tüm bu bilgilerden yola çıktığımızda HT’nin apoptozisle ilişkili patogenezinde yer alan FasL, TRAIL, ve ER’da BIP’in kontrol altında tuttuğu şaperonlar (ATF-6, IRE-1, PERK) ve BIP’in bu yollardan farklı olarak direk etkisi sonucunda apoptozis sürecindeki yollar kaspaz zincirinin aktivasyonu yada inaktivasyonunda birleşmektedir.

Birkaç çalışmada RA’de otoimmün tiroid hastalığı riski artmıştır (81, 82). Bu bilgiler RA’le otoimmün tiroid hastalıkları arasındaki ilişkiyi desteklemektedir. CTLA-4 poliformizmiyle RA arasında olan ilişkinin benzer şekilde otoimmün tiroidite olması

nedeniyle bu ilişkiye şaşırılmamak gerekiyor (37). Bodman ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada RA'de başlangıç evresinde daha belirgin olmak üzere BIP'e karşı oluşan antikor düzeyleri kontrol grubuna göre daha belirgin olarak yüksek çıkmıştır (18).

Bizim teorimiz HT'ndeki otoimmün süreçte apoptotik olaylarda Anti-BIP antikorlarının katkıda bulunabileceği yönündeydi. Ancak, bizim çalışmamızda kontrol grubuyla HT'nin ötiroid, subklinik ve aşikar hipotiroid evrelerini içeren gruplar arasında Anti-BIP düzeyleri açısından fark saptanmamıştır. Bu durum Anti-BIP antikorlarının en azından serum düzeyinde HT'ndeki apoptozisle ilgili olaylarla ilişkisiz olduğunu göstermektedir.

Gruplar arasında tiroid antikor düzeylerine göre değerlendirdiğimizde de Anti-BIP düzeyleri açısından kontrol grubuyla fark saptamadık. Bodman ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da RA antikorlarıyla Anti-BIP düzeyi arasında ilişki saptanmamıştır (18).

Tiroid dokusu düzeyinde yapılan çalışmalar ER stresinin otoimmün süreçte arttığını düşündürmektedir (10). Serumda bu antikorların varlığını gösterememizin bir sebebi doku düzeyindeki anti-BIP antikorlarının artışının seruma yansıtılmadığı düzeyde olmayıp daha lokal bir aktivasyon olmasına bağlı olabilir.

Hashimoto tiroiditi ötiroid, subklinik ve aşikar hipotiroid alt gruplarına bölmemizin sebebi, hastalık aktivitesi açısından farklı dönemleri değerlendirmek istememizdir. Fakat gruplarla kontrol veya grupların kendi aralarında Anti-BIP düzeyi açısından herhangi bir farklılık saptamadık. Bodman ve arkadaşları RA'in başlangıç evresinde Anti-BIP antikorlarını daha yüksek bulmuşlardır (18).

Tiroid hücrelerinde TSH'nın uyarısıyla tiroglobulin sentezinin artışı ve bununla birlikte ER şaperonlarından BIP'in arttığı bilinmektedir. Fizyolojik koşullarda BIP tiroglobulinin erken polipeptid katlanma döneminde önemli rol oynar. Özellikle tiroglobulin agregatları ve katlanmamış tiroglobulin monomerlerine bağlanarak tiroglobulinin ER'dan transportu için gerekli üç boyutlu protein haline gelmesini sağlar (87). Bizim çalışmamızda hipotiroid ve subklinik hipotiroidili hastalarda TSH'nın yüksek olmasına rağmen BIP'e karşı antikor düzeyini kontrol grubundan farklı bulmadık.

BIP supressör T hücrelerin uyarılmasını sağlar. Bu immün cevap immün hiperreaktivitenin ve cevabın baskılanmasını sağlar (14). HT'ndeki CTLA-4'le ilgili mutasyonlarda da supressör T hücre cevabı bozulmuştur. Bizim çalışmamızda Anti-BIP antikorlarını gösteremeyişimiz HT'ndeki supressör T hücre disfonksiyonuyla Anti-BIP antikorlarının ilişkisiz olduğunu düşündürmektedir.

Hashimoto tiroiditinde tiroglobulin, tiroid peroksidaz, NIS, TSH resptörüne antikor geliştiği gibi tiroid dokusunda ekspresse edildiği gösterilen BIP'e karşıda benzer şekilde antikor gelişebileceği düşünölmüştü. Ancak HT'li hastaların serumlarında kontrol grubuna göre Anti-BIP farklılığını gösteremedik.

BIP/GRP78, ER stresiyle ilişkili apoptotik yollarda ve supressör T hücre vasıtasıyla sitotoksik T hücre aracılı hücre yıkımında baskılayıcı özellikleriyle hücreyi koruyucu özellikler taşımaktadır. Bizim hipotezimiz HT'nde BIP'e karşı oluşacak antikorların bu koruyucu etkiyi ortadan kaldırabileceği yönündeydi. Tiroid hücrelerinde BIP aktivasyonu gösterilmesine rağmen bizim çalışmamızda HT'li hasta alt gruplarında Anti-BIP düzeyi kontrol grubundan farklı bulunmamıştır. Bu durum HT'nde apoptozis ve/veya T hücre cevabıyla BIP'e karşı oluşan antikorların ilişkisiz olduğu veya serumda tespit edilemeyecek düzeylerde olduğunu düşündürtmektedir.

6. KAYNAKLAR:

1. Dayan CM, Daniels GH. Chronic autoimmune thyroiditis. *N Engl J Med* 335: 99–107, 1997.
2. Rapoport B. Pathophysiology of Hashimoto's thyroiditis and hypothyroidism. *Annu Rev Med* 42: 91–96, 1991.
3. Schroder M, Kaufman RJ. ER stress and the unfolded protein response. *Mutat Res* 569: 29-63, 2005.
4. Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403: 98–103, 2000.
5. Kaufman RJ. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev* 13: 1211-1233, 1999.
6. Sherman MY, Goldberg AL. Cellular defenses against unfolded proteins: a cell biologist thinks about neurodegenerative diseases. *Neuron* 29: 15-32, 2001.
7. Rao RV, Peel A, Logvinova A, Del Rio G, Hermel E, Yokota T, et al. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: role of the ER chaperone GRP78. *Febs Lett* 514: 122-128, 2002.
8. Kohno K, Normington K, Sambrook J, Gething M-J, Mori K. The promoter region of the yeast *KAR2_BiP* gene contains a regulatory domain that responds to the presence of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol* 13: 877-890, 1993.
9. Zhao L, Ackerman SL. Endoplasmic reticulum stress in health and disease. *Current opinion in cell Biol* 18: 444-452, 2006.
10. Young RA. Stress proteins and immunology. *Annu Rev Immunol* 8: 401-420, 1990.
11. Kim PS, Bole D, Arvan P. Transient aggregation of nascent thyroglobulin in the endoplasmic reticulum: relationship to the molecular chaperone, BiP. *J Cell Biol* 118: 541-549, 1992.
12. Jamora C, Dennert G, Lee AS. Inhibition of tumor progression by suppression of stress protein GRP78/BiP induction in fibrosarcoma B/C10ME. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 7690-7694, 1996.
13. Melnick J, Argon Y. Molecular chaperones and the biosynthesis of antigen receptors. *Immunol Today* 16: 243-250, 1995.
14. Blass S, Union A, Raymackers J, Schumann F, Ungethüm U, Müller-Steinbach S, De Keyser F, Engel JM, Burmester GR. The Stress Protein BiP Is Overexpressed and Is a Major B and T Cell Target in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 44: 761–771, 2001.
15. Eguchi K. Apoptosis in autoimmune diseases. *InternMed* 40: 275-284, 2001.
16. Giordano C, Stassi G, De Maria R, Todaro M, Richiusa P, Papoff G, Ruberti G, Bagnasco M, Testi R, Galluzzo A. Potential involvement of Fas and its ligand in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis. *Science* 275: 960-963, 1997.
17. Phelps E, Wu P, Bretz J, Baker JR. Autoimmune thyroid disease. *Endocrinol Metab Clin North Am* 29: 375-388, 2000.

18. Bodman-Smith MD, Corrigan VM, Berglin E, Cornell HR, Tzioufas AG, Mavragani CP, Chan C, Rantapaa-Dahlqvist S, Panayi GS. Antibody response to the human stress protein BIP in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 43: 1283-1287, 2004.
19. Corrigan VM, Bodman-Smith MD, Fife MS, Canas B, Myers LK, Wooley P, Soh C, Staines NA, Pappin DJ, Berlo SE, van Eden W, van Der Zee R, Lanchbury JS, Panayi GS. The human endoplasmic reticulum molecular chaperone BiP is an autoantigen for rheumatoid arthritis and prevents the induction of experimental arthritis. *J Immunol* 166: 1492-1498, 2001.
20. Hamburger JI. The various presentations of thyroiditis. Diagnostic considerations. *Ann Intern Med* 104: 19-224, 1986.
21. Farwell AP, Braverman LE. Inflammatory thyroid disorders. *Otolaryngol Clin North Am* 29: 541-556, 1996.
22. Nossal GJ, Pike BL. Evidence for the clonal abortion theory of B-lymphocyte tolerance. *J Exp Med* 141: 904-917, 1975.
23. Volpe R, Iitaka M. Evidence for an antigen-specific defect in suppressor T-lymphocytes in autoimmune thyroid disease. *Exp Clin Endocrinol* 97: 133-138, 1991.
24. Pearce EN, Farwell AP, Braverman LE. Thyroiditis. *N Engl J Med* 348: 2646-2655, 2003.
25. Weetman AP. Autoimmunity and endocrinology. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 107: 63-66, 1999.
26. Prentice LM, Phillips DI, Sarsero D, Beever K, McLachlan SM, Smith BR. Geographical distribution of subclinical autoimmune thyroid disease in Britain: a study using highly sensitive direct assays for autoantibodies to thyroglobulin and thyroid peroxidase. *Acta Endocrinol* 123: 493-498, 1990.
27. Hollowell JG, Staehling NW, Flanders WD, Hannon WH, Gunter EW, Spencer CA, Braverman LE. Serum TSH, T4 and thyroid antibodies in the United States population (1988 to 1994): National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *J Clin Endocrinol Metab* 87: 489-499, 2002.
28. Vanderpump MP, Tunbridge WM, French JM, Appleton D, Bates D, Clark F, Grimley Evans J, Hasan DM, Rodgers H, Tunbridge F, Young ET. The incidence of thyroid disorders in the community: a twenty-year follow-up of the Wickham Survey. *Clin Endocrinol* 43: 55-68, 1995.
29. Tunbridge WMG, Evered DC, Hall R, et al. The spectrum of thyroid disease in a community: The Wickham survey. *Clin Endocrinol* 7: 481-493, 1977.
30. Canaris GJ, Manowitz NR, Mayor G, Ridgway EC. The Colorado thyroid disease prevalence study. *Arch Intern Med* 160: 526-534, 2000.
31. Parle JV, Franklyn JA, Cross KW, Jones SC, Sheppard MC. Prevalence and follow-up of abnormal thyrotrophin (TSH) concentrations in the elderly in the United Kingdom. *Clin Endocrinol* 34: 77-83, 1991.
32. Kabadi UM. Subclinical hypothyroidism. Natural course of the syndrome during a prolonged follow-up study. *Arch Intern Med*. 153: 957-961, 1993.
33. Endo T, Kaneshige M, Nakazato M, Kogai T, Saito T, Onaya T. Autoantibody against thyroid iodide transporter in the sera from patients with Hashimoto's thyroiditis

- possesses iodide transport inhibitory activity. *Biochem Biophys Res Commun* 228: 199-202, 1996.
34. Endo T, Kogai T, Nakazato M, Saito T, Kaneshige M, Onaya T. Autoantibody against Na⁺/I⁻ symporter in the sera of patients with autoimmune thyroid disease. *Biochem Biophys Res Commun* 224: 92-95, 1996.
 35. Hall R, Owen SG, Smart GS. Evidence for genetic predisposition to formation of thyroid autoantibodies. *Lancet* 2: 187-188, 1964.
 36. Allahabadia A, Gough SCL. The different approaches to the genetic analysis of autoimmune thyroid disease. *J Endocrinol* 163: 7-13, 1999.
 37. Kotsa K, Watson PF, Weetman AP. A CTLA-4 gene polymorphism is associated with both Graves disease and autoimmune hypothyroidism. *Clin Endocrinol* 46: 551-554, 1997.
 38. Kotani T, Aratake Y, Hirai K, Fukazawa Y, Sato H, Ohtaki S. Apoptosis in thyroid tissue from patients with Hashimoto's thyroiditis. *Autoimmunity* 20: 231-236, 1995.
 39. Okayasu I, Saegusa M, Fujiwara M, Hara Y, Rose NR. Enhanced cellular proliferative activity and cell death in chronic thyroiditis and thyroid papillary carcinoma. *J Canc Res and Clin Oncol* 121: 746-752, 1995.
 40. Bretz JD, Baker JR. Apoptosis and autoimmune thyroid disease: following a TRAIL to thyroid destruction? *Clin Endocrinol* 55: 1-11, 2001.
 41. Palazzo FF, Hammond LJ, Goode AW, Mirakian R. Death of the autoimmune thyrocyte: is it pushed or does it jump? *Thyroid* 10: 561-572, 2000.
 42. Stassi G, Zeuner A, Di Liberto D, Todaro M, Ricci-Vitiani L, De Maria R. Fas-FasL in Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Immunol* 21: 19-23, 2001.
 43. Andrikoula M, Tsatsoulis A. The role of Fas-mediated apoptosis in thyroid disease. *Eur J Endocrinol* 144: 561-568, 2001.
 44. McIver B, Morris JC. The pathogenesis of Graves' disease. *Endocrinol Metab Clin North Am* 27: 73-89, 1998.
 45. Bretz JD, Rymaszewski M, Arscott PL, Myc A, Ain KB, Thompson NW, Baker JR. TRAIL death pathway expression and induction in thyroid follicular cells. *J Biol Chem*. 274: 23627-23632, 1999.
 46. Bretz JD, Arscott PL, Myc A, Baker JR. Inflammatory cytokine regulation of Fas-mediated apoptosis in thyroid follicular cells. *J Biol Chem* 274: 25433-25438, 1999.
 47. Borgerson K, Bretz J, Baker J. The role of Fas-mediated apoptosis in thyroid autoimmune disease. *Autoimmunity* 30: 251-264, 1999.
 48. Hammond C, Helenius A. Quality control in the secretory pathway: retention of a misfolded viral membrane glycoprotein involves cycling between the ER, intermediate compartment, and Golgi apparatus. *J. Cell. Biol* 126: 41-52, 1994.
 49. Ellgaard L, Helenius A. ER quality control: towards an understanding at the molecular level. *Curr. Opin. Cell Biol* 13: 431-437, 2001.
 50. Kornfeld R, Kornfeld S. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem* 54: 631-664, 1985.

51. Hebert DN, Foellmer B, Helenius A. Glucose trimming and reglucosylation determine glycoprotein association with calnexin in the endoplasmic reticulum. *Cell* 81: 425–433, 1995.
52. Trombetta SE, Parodi AJ. Purification to apparent homogeneity and partial characterization of rat liver UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase. *J. Biol. Chem* 267: 9236–9240, 1992.
53. High S, Lecomte FJ, Russell SJ, Abell BM, Oliver JD. Glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum: a tale of three chaperones? *Febs Lett* 476: 38–41, 2000.
54. Parodi AJ. Role of N-oligosaccharide endoplasmic reticulum processing reactions in glycoprotein folding and degradation. *Biochem. J* 348: 1–13, 2000.
55. Sousa MC., Ferrero Garcia MA, Parodi AJ. Recognition of the oligosaccharide and protein moieties of glycoproteins by the UDPGlc: glycoprotein glucosyltransferase. *Biochem J* 31: 97–105, 1992.
56. Flynn GC, Pohl J, Flocco MT, Rothman JE. Peptide-binding specificity of the molecular chaperone BiP. *Nature* 353: 726–730, 1991.
57. Lee AS. The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress, *Methods* 35: 373-381, 2005.
58. Liberek K, Marszalek J, Ang D, Georgopoulos C, Zylicz M. Escherichia coli DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 874–2878, 1991.
59. Hohfeld J, Minami Y, Hartl FU. Hip, a novel cochaperone involved in the eukaryotic Hsc70/Hsp40 reaction cycle. *Cell* 83: 589–598, 1995.
60. Chung KT, Shen Y, Hendershot LM. BAP, a mammalian BiP-associated protein, is a nucleotide exchange factor that regulates the ATPase activity of BiP. *J Biol Chem* 277: 47557-47563, 2002.
61. Kaufman RJ. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev* 13: 1211-1233, 1999.
62. Reddy RK, Mao C, Baumeister P, Austin RC, Kaufman RJ, Lee AS. Endoplasmic reticulum chaperone protein GRP78 protects cells from apoptosis induced by topoisomerase inhibitors: role of ATP binding site in suppression of caspase-7 activation. *J Biol Chem* 278: 20915-20924, 2003.
63. Lee AS. The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications. *Trends Biochem Sci* 26: 504-510, 2001.
64. Uramoto H, Sugio K, Oyama T, Nakata S, Ono K, Yoshimastu T, Morita M, Yasumoto K. Expression of endoplasmic reticulum molecular chaperone Grp78 in human lung cancer and its clinical significance. *Lung Cancer* 49: 55-62, 2005.
65. Meunier L, Usherwood YK, Chung KT, Hendershot LM. A subset of chaperones and folding enzymes form multiprotein complexes in endoplasmic reticulum to bind nascent proteins. *Mol. Biol. Cell* 13: 4456–4469, 2002.
66. Molinari M, Galli C, Piccaluga V, Pieren M, Paganetti P. Sequential assistance of molecular chaperones and transient formation of covalent complexes during protein degradation from the ER. *J. Cell. Biol* 158: 247–257, 2002.

67. McMillan DR, Gething MJ, Sambrook J. The cellular response to unfolded proteins: intercompartmental signaling. *Curr Biol* 5: 540-545, 1994.
68. Ma Y, Hendersot LM. ER chaperone functions during normal and stress conditions. *J Chem Neuroanat* 28: 51-65, 2004.
69. Zhang K, Shen X, Wu J, Sakaki K, Saunders T, Rutkowski DT, Back SH, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress activates cleavage of CREBH to induce a systemic inflammatory response. *Cell* 124: 587-599, 2006.
70. Kim PS, Arvan P. Endocrinopathies in the family of endoplasmic reticulum (ER) storage diseases: disorders of protein trafficking and the role of ER molecular chaperones. *Endocr Rev* 19: 173-202, 1998.
71. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87: 171, 1996.
72. Mauro C, Crescenzi E, De Mattia R, Pacifico F, Mellone S, Salzano S, de Luca C, D'Adamio L, Palumbo G, Formisano S, Vito P, Leonardi A. Central role of the scaffold protein tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 in regulating endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J Biol Chem* 281: 2631-2638, 2006.
73. Yoneda T, Imaizumi K, Oono K, Yui D, Gomi F, Katayama T, Tohyama M. Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. *J Biol Chem* 276: 13935-13940, 2001.
74. Rutkowski DT, Kaufman RJ. A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biol* 14: 20-28, 2004.
75. Mori K, Ma W, Gething M-J, Sambrook J. A transmembrane protein with a cdc2/cdc28-related kinase activity is required for signaling from the ER to the nucleus. *Cell* 74: 743-756, 1993.
76. Mori K, Kawahara T, Yoshida H, Yanagi H, Yura T. Signaling from the ER to the nucleus: transcription factor with a basic-leucine zipper motif is required for the unfolded protein-response pathway. *Genes Cells* 1: 803-817, 1996.
77. Li L-J, Li V, Ferrario A, Rucker N, Liu ES, Wong S, Gomer CJ, Lee AS. Establishment of a chinese hamster ovary cell line that expresses grp78 antisense transcripts and suppresses A23187 induction of both GRP78 and GRP94. *J Cell Physiol* 153: 575-582, 1992.
78. Little E, Lee AS. Generation of a mammalian cell line deficient in glucose-regulated protein stress induction through targeted ribozyme driven by a stress-inducible promoter. *J Biol Chem* 270: 9526-9534, 1995.
79. Heufelder AE, Goellner JR, Wenzel BE, Bahn RS. Immunohistochemical detection and localization of a 72-kilodalton heat shock protein in autoimmune thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab* 74: 724-731, 1992.
80. Purcell AW, Todd A, Kinoshita G, Lynch TA, Keech CL, Gething MJ, Gordon TP. Association of stress proteins with autoantigens: a possible mechanism for triggering autoimmunity? *Clin Exp Immunol* 132: 193-200, 2003.
81. Silman AJ, Ollier WE, Bubel MA. Autoimmune thyroid disease and thyroid autoantibodies in rheumatoid arthritis patients and their families. *Br J Rheumatol* 28: 18-21, 1989.

82. Shiroky JB, Cohen M, Ballachey ML, Neville C. Thyroid dysfunction in rheumatoid arthritis: a controlled prospective survey. *Ann Rheum Dis* 52: 454-456, 1993.
83. Corrigall VM, Bodman-Smith MD, Brunst M, Cornell H, Panayi GS. Inhibition of antigen-presenting cell function and stimulation of human peripheral blood mononuclear cells to express an antiinflammatory cytokine profile by the stress protein BiP. *Arthritis Rheum* 50: 1164–1171, 2004.
84. Bodman-Smith MD, Corrigall VM, Kemeny DM, Panayi GS. BiP, a putative autoantigen in rheumatoid arthritis, stimulates IL-10 producing CD8-positive T cells from normal individuals. *Rheumatology* 42: 637–644, 2003.
85. Wiseman RL, Balch WE. A new pharmacology--drugging stressed folding pathways. *Trends Mol Med* 11: 347-350, 2005.
86. Sargsyan E, Baryshev M, Mkrтчian S. The physiological unfolded protein response in the thyroid epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 322: 570-576, 2004.
87. Kim PS, Arvan P. Hormonal regulation of thyroglobulin export from the endoplasmic reticulum of cultured thyrocytes. *J Biol Chem* 268: 4873-9, 1993.