

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ» ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «Βιοχημεία»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Μελέτη του κύριου θύλακα ειδικότητας (S1) των αμινοπεπτιδασών που παράγουν αντιγονικά πεπτίδια

ΖΕΡΒΟΥΔΗ ΕΥΘΑΛΙΑ ΧΗΜΙΚΟΣ

AOHNA

ΙΟΥΛΙΟΣ 2012

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Μελέτη του κύριου θύλακα ειδικότητας (S1) των αμινοπεπτιδασών που παράγουν αντιγονικά πεπτίδια

ΖΕΡΒΟΥΔΗ ΕΥΘΑΛΙΑ

A.M.:61019

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Κ. Γαλανοπούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κ. Γαλανοπούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ε. Στρατίκος, Ερευνητής Β', Ε.ΚΕ.Φ.Ε «Δημόκριτος»

Δ. Γεωργιάδης, Επ. Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 9/07/2012

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι αμινοπεπτιδάσες του ενδοπλασματικού δικτύου ERAP1 και ERAP2 καθώς και η αμινοπεπτιδάση που ρυθμίζεται από την ινσουλίνη (IRAP) είναι τρία ομόλογα ένζυμα που διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην παραγωγή αντιγονικών πεπτιδίων. Οι συγκεκριμένες αμινοπεπτιδάσες υδρολύουν το Ν-τελικό άκρο των εκτεταμένων πρόδρομων επιτόπων με σκοπό τη δημιουργία ώριμων αντιγονικών πεπτιδίων ικανών να προσδεθούν στα μόρια ΜΗC Ι. Η ειδικότητα αυτών των πεπτιδασών μπορεί να επηρεάσει την επιλογή των αντιγονικών πεπτιδίων, αλλά μέχρι στιγμής δεν έχει μελετηθεί λεπτομερώς. Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιώντας μια συλλογή 82 φθοριζόντων υποστρωμάτων, προσδιορίστηκε το προφίλ εκλεκτικότητας για κάθε ένζυμο και διερευνήθηκαν τα δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά του κύριου θύλακα ειδικότητας τους (θύλακας S1). Στη συνέχεια, μέσω μοριακών μοντέλων για τους τρεις S1 θύλακες, προσδιορίστηκαν αλληλεπιδράσεις υποστρώματος-ενζύμου που είναι καθοριστικές για την ειδικότητα των τριών ενζύμων. Τα προφίλ εκλεκτικότητας ως προς τα υποστρώματα που λάβαμε υποδηλώνουν ότι η IRAP συνδυάζει την S1 ειδικότητα των ERAP1 και ERAP2, μια παρατήρηση σύμφωνη με τον προτεινόμενο βιολογικό ρόλο της. Ωστόσο, αυτή η διπλή ειδικότητα της IRAP δεν είναι αποτέλεσμα απλά του συνδυασμού των δομικών χαρακτηριστικών των ERAP1 και ERAP2, αλλά μιας αλλαγής του αμινοξέος στη θέση 541.

Τα αποτελέσματα μας παρέχουν πληροφορίες για την επιλογή των αντιγονικών πεπτιδίων και πιθανόν να αποδειχθούν χρήσιμα στο σχεδιασμό εκλεκτικών αναστολέων ή δραστικών ουσιών για τη συγκεκριμένη κατηγορία ενζύμων. Για να επιβεβαιωθεί η παραπάνω υπόθεση και χρησιμοποιώντας μια εκλογικευμένη με βάση τη δομή προσέγγιση, αναπτύξαμε και δοκιμάσαμε μια σειρά ανιλινικών και πυριδινικών παραγώγων καθώς και μια σειρά φωσφινικών ανάλογων μεταβατικής κατάστασης ως πιθανούς αναστολείς για τα τρία ένζυμα, βασισμένοι στην S1 και S1' ειδικότητα τους. Τα αποτελέσματα μας υποδεικνύουν ότι τα φωσφινικά ανάλογα μεταβατικής κατάστασης είναι δραστικότεροι αναστολείς (με Ki< 1μM) σε σχέση με τα ανιλινικά και πυριδινικά παράγωγα. Τέλος, είναι πιθανόν η συγκεκριμένη σειρά αναστολέων να αποτελέσει μια νέα θεραπευτική προσέγγιση για την αυτοανοσία ή/και τον καρκίνο.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Ενζυμολογία

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: αμινοπεπτιδάσες, αντιγόνα, αναστολείς, πεπτίδια, Μόρια Ιστοσυμβατότητας

Probing the S1 specificity pocket of the aminopeptidases that generate antigenic peptides

ER aminopeptidase 1 (ERAP1), ER aminopeptidase 2 (ERAP2) and Insulin Regulated aminopeptidase (IRAP) are three homologous enzymes that play critical roles in the generation of antigenic peptides. These aminopeptidases excise amino acids from N-terminally extended precursors of antigenic peptides in order to generate the correct length epitopes for binding onto MHC class I molecules. The specificity of these peptidases can affect antigenic peptide selection, but it has not yet been investigated in detail. In the present study we utilized a collection of 82 fluorogenic substrates to define a detailed selectivity profile for each of the three enzymes and to probe structural and functional features of the primary specificity pocket (S1). Molecular modeling of the three S1 pockets reveals substrate-enzyme interactions that are critical determinants for specificity. The substrate selectivity profiles suggest that IRAP largely combines the S1 specificity of ERAP1 and ERAP2, consistent with its proposed biological function. IRAP, however, does not achieve this dual specificity by simply combining structural features of ERAP1 and 2 but rather by a unique amino acid change at position 541.

Our results provide insights on antigenic peptide selection and may prove valuable in designing selective inhibitors or activity markers for this class of enzymes. To test this hypothesis and using a rational, structure-based approach, we have developed and evaluated a series of aniline and pyridine analogs as well as a series of phosphinic transition-state analogs as putative inhibitors of this group of enzymes, focusing on optimizing the specificity of the S1 and S1' subsites. Our results suggest that phosphinic transition-state analogs are more active inhibitors (with inhibition potency down to 1μ M) than aniline and pyridine analogs. Finally, we conclude that this group of inhibitors may constitute a novel avenue for the pharmacological modulation of the immune response with multiple therapeutic applications from the regulation of autoimmunity to cancer immunotherapy.

SUBJECT AREA: Enzymology

KEYWORDS: aminopeptidase, antigen, inhibitors, peptides, Major Histocompatibility Molecules

<u>П</u> Г	ονοίος	15	
1.	. <u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 [ΕΙΣΑΓΩΓΗ]</u> 17		
	1.1	Σύντομη επισκόπηση του Ανοσοποιητικού Συστήματος 17	
	1.2	Επίκτητο ανοσοποιητικό σύστημα 18	
2.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 [Κ	ύτταρα του Επίκτητου Ανοσοποιητικού Συστήματος]19	
	2.1	Λεμφοκύτταρα 19	
	2.1.1	Β λεμφοκύτταρα <u></u> 19	
	2.1.2	Τ λεμφοκύτταρα – Κυτταρική ανοσοαπόκριση 20	
	2.2	Δενδριτικά κύτταρα22	
3.	<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 [Α</u>	ντιγονοπαρουσίαση]25	
	3.1	Αντιγονοπαρουσίαση26	
	3.2	Μονοπάτια αντιγονοπαρουσίασης26	
	3.2.1	Μονοπάτι αντιγονοπαρουσίασης τάξης Ι (ΜΗC Ι) 26	
	3.2.2	Μονοπάτι αντιγονοπαρουσίασης τάξης ΙΙ (ΜΗC ΙΙ)27	
	3.2.3	Μονοπάτι διασταυρούμενης αντιγονοπαρουσίασης	
4.	<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 [Α</u>	μινοπεπτιδάσες]31	
	4.1	Αμινοπεπτιδάσες31	
	4.2	Ο ρόλος των αμινοπεπτιδασών στην αντιγονοπαρουσίαση 31	
	4.3	Ο ρόλος των αμινοπεπτιδασών του ενδοπλασματικού δικτύου στην	
	αντιγονοπαρα	ουσίαση <u></u> 32	
	4.4	Ο ρόλος της IRAP στην αντιγονοπαρουσίαση 36	
	4.5	Οικογένεια αμινοπεπτιδασών Μ1 40	
	4.5.1	Καταλυτικός μηχανισμός43	
	4.5.2	Κρυσταλλική δομή των ERAP1 και ERAP2 <u></u> 43	
	4.6	Συσχέτιση των ERAP1, ERAP2 και IRAP με παθολογικές	
	καταστάσεις <u></u>	48	
5.	ΚΕΓΑΛΑΙΟ 5 ΓΑ	/αστολείς]51	

	5.1	Αναστολείς αμινοπεπτιδασών	<u></u> 51
	5.2	Εκλογικευμένος με βάση τη δομή σχεδιασμός αναστολέων	<u></u> 53
	5.3	Φωσφινικά ανάλογα μεταβατικής κατάστασης ως αναστολείς	
	αμινοπεπτιδασών	/	<u></u> 54
6.	<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 [ΣΙ</u>	κοποΣ]	57
7.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 [Μ	ΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ]	<u></u> 59
	7.1	Κύτταρα Εντόμου – Ηi5 <u></u>	<u></u> 59
	7.1.1	Καλλιέργεια κυττάρων εντόμου –Ηi5 <u></u>	<u></u> 59
	7.1.2	Μακροπρόθεσμη συντήρηση κυττάρων Ηi5 σε υγρό άζωτο	<u></u> 60
	7.1.3	Επιμόλυνση κυττάρων Ηi5 για αναγέννηση ιού <u></u>	<u></u> 60
	7.2	Παραγωγή και καθαρισμός ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών	<u>. </u> 60
	7.2.1	Μέτρηση ενζυμικής δραστικότητας αμινοπεπτιδασών	<u></u> 62
	7.3	Αναπαραγωγή, απομόνωση και καθαρισμός πλασμιδιακού DNA	<u>.</u> 63
	7.3.1	Παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος – Επίστρωση τρυβλίων	<u></u> 64
	7.3.2	Κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση ανθρώπινης IRAP (E541R)	<u></u> 64
	7.3.3	Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων (Transformation)	<u>.</u> 65
	7.3.4	Αναπαραγωγή πλασμιδιακού DNA	<u></u> 66
	7.3.5	Απομόνωση και καθαρισμός πλασμιδιακού DNA	<u></u> 67
	7.3.6	Αλυσιδωτή Αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	<u></u> 68
	7.3.7	Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης	<u></u> 71
	7.4	Έκφραση μεταλλαγμένης IRAP (E541R)	<u>.</u> 72
	7.4.1	Κύτταρα θηλαστικού 293F	<u></u> 72
	7.4.2	Επώαση κυττάρων 293F	<u></u> 72
	7.4.3	Επιμόλυνση κυττάρων 293F (TRANSFECTION)	<u></u> 73
	7.4.4	Καθαρισμός μεταλλαγμένης ΙRAP με στήλη συγγενείας	<u></u> 74
απ	7.5 οδιατακτικές συνθ	Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου κάτω από ήκες (SDS-PAGE)	<u></u> 74
	7.5.1	Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμιδίου	<u></u> 76
	7.5.2	Ηλεκτροφόρηση και προετοιμασία δειγμάτων	76

7.6	Ανίχνευση και εμφάνιση διαχωρισμένων πρωτεϊνών	
7.6.1	Χρώση με Νιτρικό Άργυρο (Silver Stain) 76	5
7.6.2	Χρώση με Coomassie Brilliant Blue	,
7.7	S1 Ειδικότητα αμινοπεπτιδασών,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,	3
7.7.1 καρβαμοϋλο -	Συσχέτιση σήματος φθορισμού με τη συγκέντρωση 7-αμινο-4 μεθυλο κουμαρίνη (ACC) 78	3
7.7.2	Σχεδιασμός βέλτιστων πειραματικών συνθηκών	3
7.7.3	Φθορισμομετρική δοκιμασία79)
7.8	Αναστολείς <u></u> 80)
7.8.1	Δοκιμή πυριδινικών και ανιλινικών αναστολέων80)
7.8.2	Φωσφινικοί αναστολείς81	1
7.8.3	Καθαρισμός φωσφινικών αναστολέων81	I
7.8.4	Λυοφιλίωση <u></u> 81	
7.8.5	Διαλυτοποίηση και ποσοτικοποίηση λιοφιλιωμένου αναστολέα82	2
7.8.6	Προσδιορισμός της σταθεράς Κί των φωσφινικών αναστολέων82	2
7.8.7	Χαρακτηρισμός φωσφινικών αναστολέων83	3
<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8 [ΑΙ</u>	<u>ΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ]</u> 83	}
8.1	Παραγωγή και καθαρισμός ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών83	3
8.1.1	Παραγωγή και καθαρισμός μεταλλαγμένης IRAP(E541R)86	5
8.2	Πρότυπες καμπύλες τιτλοδότησης Michaelis – Menten88	3
8.2.1 ACC από την	Καμπύλη τιτλοδότησης Michaelis – Menten για την υδρόλυση του R- ERAP2 και του L-ACC από τις ERAP1 και IRAP88	
8.3	S1 Ειδικότητα αμινοπεπτιδασών90)
8.3.1 καρβαμοϋλο-ן	Συσχέτιση σήματος φθορισμού με τη συγκέντρωση 7-αμινο-4 μεθυλο-κουμαρίνη (ACC) 90)
8.3.2 και IRAP <u></u>	Υδρόλυση των υποστρωμάτων της συλλογής από τις ERAP1, ERAP2 	
8.3.3 АСС каі D-RA	Καμπύλη τιτλοδότησης Michaelis – Menten για την υδρόλυση του R- ACC από την ERAP2 <u>94</u>	ŀ

8.

9

	IRAP <u></u>	. <u></u> 95
IR	8.4 AP	Προτεινόμενο Μοντέλο για τον S1 θύλακα των ERAP1, ERAP2 και 96
	8.4.1 υποστρώματα	Σύγκριση της δραστικότητας της IRAP και της IRAP Ε541R ως προς τα
	8.4.2 του R-AMC α	Πρότυπη καμπύλη τιτλοδότησης Michaelis – Menten για την υδρόλυση πό την IRAP και την IRAP E541R 101
	8.5	Αναστολείς 102
	8.5.1	Δοκιμή πυριδινικών και ανιλινικών αναστολέων 103
	8.5.2	Φωσφινικοί αναστολείς105
	8.5.3	Καθαρισμός φωσφινικών αναστολέων 106
	8.5.4 αναστολέων <u></u>	Προσδιορισμός της σταθεράς αναστολής Κί των φωσφινικών 108
	8.5.5	Μερική αναστολή112
	8.5.6 αναστολέων <u></u>	Συγκεντρωτικά αποτελέσματα από τη δοκιμή των φωσφινικών 113
	8.5.7	Χαρακτηρισμός Αναστολέων115
	8.5.8 της ERAP2 (3	Επίδραση των φωσφινικών αναστολέων στους δύο πολυμορφισμούς 392Ν και 392Κ)118
9.	<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9</u>	<u>[ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ]</u> 122
10.	<u>ΠΙΝΑΚΑΣ: Ο</u>	ΡΟΛΟΓΙΑ-ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ128
11.	ΠΑΡΑΡΤΗΜ	A130
12.	ΑΝΑΦΟΡΕΣ	

8.3.4 Σύγκριση δραστικότητας του μείγματος ERAP1 και ERAP2 με της

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Τα τρία είδη των λεμφοκυττάρων21
Εικόνα 2: Μοντέλα σύνδεσης πεπτιδίων στις κοιλότητες των μορίων ΜΗC τάξης Ι και ΙΙ22
Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση των χαρακτηριστικών που υφίστανται αλλαγή κατά τη ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων25
Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση των μονοπατιών αντιγονοπαρουσίασης ΜΗC τάξης Ι, ΜΗC τάξης ΙΙ και διασταυρούμενης αντιγονοπαρουσίασης26
Εικόνα 5: Σχετική δραστικότητα εκφρασμένη σε % ποσοστό υδρόλυσης των φθοριζόντων υποστρωμάτων X-AMC (όπου X ένα οποιοδήποτε αμινοξύ) από τις ανθρώπινες ανασυνδιασμένες IRAP, ERAP1 και ERAP239
Εικόνα 6: Φυλογενετική ανάλυση των μελών της οικογένειας αμινοπεπτιδασών Μ141
Εικόνα 7: Σχηματική αναπαράσταση της υποοικογένειας ωκυτοκινασών42
Εικόνα 8: Ευθυγράμμιση των αλληλουχιών αμινοξέων των τριών μελών της υποοικογένειας ωκυτοκινασών43
Εικόνα 9: Προτεινόμενος μηχανισμός υδρόλυσης των φθοριζόντων υποστρωμάτων από τις EARP1, ERAP2 και IRAP44
Εικόνα 10: Αναπαράσταση των δομικών περιοχών των ERAP1 και ERAP246
Εικόνα 11: Αναπαράσταση των τριών κρυσταλλικών δομών της ERAP147
Εικόνα 12: Χωροπληρωτικά μοντέλα του θύλακα ειδικότητας S1 των ERAP2 και ERAP1 όπως προέκυψαν από τις κρυσταλλικές δομές των ενζύμων48
Εικόνα 13: Χωροπληρωτικά μοντέλα της κοιλότητας δέσμευσης πεπτιδίου των ERAP1 και ERAP248
Εικόνα 14: Χαρτογράφηση στην κρυσταλλική δομή της ERAP1 των πολυμορφισμών που συσχετίζονται με την αγκυλωτική σπονδυλίτιδα50
Εικόνα 15: Κρυσταλλική δομή της αμινοπεπτιδάσης Ν με έναν φωσφινικό αναστολέα56
Εικόνα 16: Δέσμευση της ουράς ιστιδίνης των ανασυνδιασμένων πρωτεϊνών στη στήλη NiNTA63
Εικόνα 17: Υδρόλυση υποστρώματος (R-AMC) από την ERAP2 ή την IRAP64
Εικόνα 18: Υδρόλυση υποστρώματος (L-AMC) από την IRAP ή την ERAP164
Εικόνα 19: Πορεία καθαρισμού πλασμιδιακού DNA της Invitrogen69
Εικόνα 20: Αναπαράσταση του θύλακα S1 των ERAP1, ERAP2 και IRAP

Εικόνα 21: Κρίσιμα αμινοξέα που απαρτίζουν τον θύλακα ειδικότητας S1 των τριών	
αμινοπεπτιδασών	.99
Εικόνα 22: Τα έξι μη συντηρημένα αμινοξέα του θύλακα S1 των τριών ενζύμων και οι πιθα	νές
αλληλεπιδράσεις τους με τη hArg1	100

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Πηκτή πολυακρυλαμιδίου 10% βαμμένη με νιτρικό άργυρο για τον καθαρισμό της ανασυνδιασμένης ERAP2 86
Σχήμα 2: Πηκτές πολυακρυλαμιδίου 10% βαμμένες με νιτρικό άργυρο από τον καθαρισμό των ανασυνδιασμένων ERAP1 και IRAP 87
Σχήμα 3: Δραστικότητα της αμινοπεπτιδάσης IRAP (E541R) κατά τον καθαρισμό με στήλη συγγενείας 88
Σχήμα 4: Πηκτή πολυακρυλαμιδίου 10% βαμμένη με coomassie blue από τον καθαρισμό και την έκφραση της μεταλλαγμένης IRAP (E541R) 89
Σχήμα 5: Πρότυπες καμπύλες τιτλοδότησης Michaelis- Menten για την υδρόλυση του L-ACC από τις ERAP1 και IRAP καθώς και για την υδρόλυση του R-ACC από την ERAP2
Σχήμα 6: Γραφική παράσταση του σήματος φθορισμού σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της 7-αμινο-4 καρβαμοϋλο- μεθυλο κουμαρίνη (ACC) 91
Σχήμα 7: Γραφικές παραστάσεις της σχετικής δραστικότητας των ERAP1, ERAP2 και IRAP ως προς τα υποστρώματα της συλλογής 93
Σχήμα 8: (Α) Πρότυπη καμπύλη Michaelis-Menten για την υδρόλυση του L-RACC και του D- RACC από την ERAP2 (Β)Εξειδίκευση της ERAP2 (kcat/KM) ως προς την υδρόλυση της L- και D- αργινίνης95
Σχήμα 9: Σύγκριση της S1 ειδικότητας μεταξύ του μείγματος ERAP1 και ERAP2 και IRAP96
Σχήμα 10: Σύγκριση της S1 ειδικότητας μεταξύ της IRAP E541R και της IRAP WT101
Σχήμα 11: Πρότυπες καμπύλες τιτλοδότησης Michaelis-Menten για την υδρόλυση του R-AMC από τις IRAP WT και την μεταλλαγμένη IRAP E541R 102
Σχήμα 12: Γενική στρατηγική ανάπτυξης πιθανών αναστολέων για τις ERAP1, ERAP2 και IRAP 103
Σχήμα 13: Απεικόνιση της γενικής δομής των ανιλινικών και πυριδινικών παραγώγων που δοκιμάστηκαν ως αναστολείς για τα τρία ένζυμα 104

Σχήμα 14: Παριστάνεται η επίδραση των ανιλινικών και πυριδινικών αναστολέων (εκφρασμένη σε % ποσοστό) στη δραστικότητα των ERAP1, ERAP2 (392N) και IRAP. 105
Σχήμα 15: Απεικόνιση της γενικής δομής των φωσφινικών ενώσεων που δοκιμάστηκαν ως αναστολείς για τα τρία ένζυμα 107
Σχήμα 16: Χαρακτηριστικά χρωματογραφήματα του καθαρισμού του εννιαπεπτιδικού αναστολέα DG001 διπεπτιδικού αναστολέα DG002 108
Σχήμα 17: Πρότυπες καμπύλες τιτλοδότησης μέσω τον οποίων υπολογίστηκε η σταθερά Ki για τους φωσφινικούς αναστολής της ERAP1 110
Σχήμα 18: Πρότυπες καμπύλες τιτλοδότησης μέσω τον οποίων υπολογίστηκε η σταθερά Ki για τους φωσφινικούς αναστολής της ERAP2 111
Σχήμα 19: Πρότυπες καμπύλες τιτλοδότησης μέσω τον οποίων υπολογίστηκε η σταθερά Ki για τους φωσφινικούς αναστολής της IRAP 112
Σχήμα 20: Πρότυπες καμπύλες τιτλοδότησης για τον μερικό αναστολέα DG001 των ERAP1, ERAP2 και IRAP 113
Σχήμα 21: Σύγκριση της δραστικότητας των φωσφινικών αναστολέων που προκάλεσαν πλήρη αναστολή με βάση την σταθερά Κί εκφρασμένη σε nM για τις ERAP1, ERAP2 και IRAP 115
Σχήμα 22: Σύγκριση της δραστικότητας του φωσφινικού αναστολέα που προκάλεσε μερική αναστολή με βάση την σταθερά Κί εκφρασμένη σε nM για τις ERAP1, ERAP2 και IRAP 116
Σχήμα 23: (Α) Πρότυπη καμπύλη τιτλοδότησης Michaelis-Menten για την υδρόλυση του R- AMC από την ERAP2 απουσία και παρουσία αναστολέα DG002(Α) (Β) Μεταβολή της σταθεράς KM (μΜ) σε συνάρτηση με την προστιθέμενη συγκέντρωση αναστολέα (μΜ) (Γ) Μεταβολή της Vmax (μΜ sec-1) σε συνάρτηση με την προστιθέμενη συγκέντρωση αναστολέα (μΜ)
Σχήμα 24: (Α) Πρότυπη καμπύλη τιτλοδότησης Michaelis-Menten για την υδρόλυση του R- AMC από την ERAP2 απουσία και παρουσία αναστολέα DG001 (B) Μεταβολή της σταθεράς KM (μΜ) σε συνάρτηση με την προστιθέμενη συγκέντρωση αναστολέα (μΜ) (Γ) Μεταβολή της Vmax (μMsec-1) σε συνάρτηση με την προστιθέμενη συγκέντρωση αναστολέα (μΜ)
Σχήμα 25: Επίδραση του διπεπτιδικού αναστολέα DG002 στη δραστικότητα των δύο πολυμορφισμών της ERAP2 392N και 392K σε σταθερή συγκέντρωση R-AMC 50μM. 119
Σχήμα 26: (Α) Επίδραση του εννιαπεπτιδικού αναστολέα DG001 στη δραστικότητα των δύο πολυμορφισμών της ERAP2 392N και 392K σε σταθερή συγκέντρωση R-AMC 50μM (B)

Επίδραση της αμαστατίνης στη	δραστικότητα των δύο πολυμορφισμών της ERAP2 392N κα	(1
392Κ σε σταθερή συγκέντρωση	R-AMC 50µM1	20

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Παράμετροι των κύκλων της αντίδρασης σύνθεσης του μεταλλαγμένου κλώνου.66
Πίνακας 2: Παράμετροι αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης
Πίνακας 3: Τα κρίσιμα κατάλοιπα του θύλακα S1 των ERAP1, ERAP2 και IRAP, όπως προέκυψαν από τη μοντελοποίηση98
Πίνακας 4; Παρουσιάζονται συγκεντρωτικά όλοι οι φωσφινικοί αναστολείς που δοκιμάστηκαν με τις αντίστοιχες σταθερές αναστολής σε nM και τα σχετικά σφάλματα για τις ERAP1, ERAP2 και IRAP114
Πίνακας 5: ΟΡΟΛΟΓΙΑ- ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ128

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε κατά την περίοδο 2010-2012 στο Εργαστήριο Χημείας Πρωτεϊνών του Ινστιτούτου Ραδιοϊσοτόπων και Ραδιοδιαγνωστικών Προϊόντων του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στη Βιοχημεία υπό την επίβλεψη του Ερευνητή Β' Ε. Στρατίκου και της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Κ. Γαλανοπούλου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Dr. Marcin Drag (Division of Medicinal Chemistry and Microbiology, Wroclaw University of Technology, Poland) που μας παρείχε τη συλλογή των 82 φθοριζόντων υποστρωμάτων. Ευχαριστώ θερμά τον Δρ. Θάνο Παπακυριακού (Ινστιτούτο Φυσικοχημείας, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος») που συνέβαλλε στην κατασκευή των μοριακών μοντέλων για τον S1 θύλακα των ERAP2 και IRAP καθώς και στη σύνθεση των ανιλινικών και πυριδινικών παραγώγών που δοκιμάστηκαν ως πιθανοί αναστολείς για τις ERAP1, ERAP2 και IRAP. Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Δημήτρη Γεωργιάδη (Τμήμα Χημείας, Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τομέας Οργανικής) που μας παρείχε τις φωσφινικές ενώσεις που δοκιμάστηκαν ως πιθανοί αναστολεί.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τους επιβλέποντές μου Ε. Στρατίκο και Κ. Γαλανοπούλου για την καθοδήγηση, τις πολύτιμες συμβουλές και το αμέριστο ενδιαφέρον τους. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Ε. Ευνουχίδου, την Δ. Γεωργιάδου και τον μεταδιδακτορικό συνεργάτη James Birtley (Ινστιτούτο Φυσικοχημείας, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος») για τη βοήθειά τους κυρίως στα προκαταρκτικά πειράματα της μεταπτυχιακής μου εργασίας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Σύντομη επισκόπηση του Ανοσοποιητικού Συστήματος

Το ανοσοποιητικό σύστημα είναι ένα σύστημα άμυνας του οργανισμού με ιδιαίτερες ικανότητες προσαρμογής, το οποίο εξελίχθηκε ώστε να προστατεύει τα σπονδυλωτά από τους παθογόνους μικροοργανισμούς αλλά και τον καρκίνο. Το ανοσοποιητικό σύστημα αποτελείται από μια τεράστια ποικιλία κυττάρων και μορίων, που έχουν την ικανότητα, με μεγάλη εξειδίκευση, να αναγνωρίζουν και να καταστρέφουν μια τεράστια ποικιλία ξένων παραγόντων. Τα κύτταρα και τα μόρια του ανοσοποιητικού συστήματος δρουν σε ένα λειτουργικά μοναδικό δίκτυο, του οποίου η πολυπλοκότητα μπορεί να συγκριθεί μόνο με εκείνη του νευρικού συστήματος.

Κάθε ξένη ουσία που εισέρχεται στον οργανισμό και επάγει ανοσολογική απόκριση καλείται ανοσογόνο, ενώ κάθε μόριο που αλληλεπιδρά με τα προϊόντα της ανοσολογικής απόκρισης καλείται αντιγόνο. Η ανοσοαπόκριση διακρίνεται σε δύο φάσεις: **α**) την αναγνώριση και **β**) την απόκριση. Η ανοσολογική αναγνώριση είναι απολύτως ειδική (αντιγονική ειδικότητα) επιτρέποντας στο ανοσοποιητικό σύστημα να αναγνωρίζει ακόμα και μικρές διαφορές ανάμεσα στα παθογόνα. Επιπλέον, η αντιγονική ειδικότητα δίνει τη δυνατότητα στο ανοσοποιητικό σύστημα να κάνει τη διάκριση εαυτού/ξένου, μια εξαιρετικά σημαντική ιδιότητα ώστε η άμυνα του οργανισμού να αποκρίνεται μόνο σε ξένα μόρια. Μόλις ένας ξένος μικροοργανισμός αναγνωριστεί, το ανοσοποιητικό σύστημα ενεργοποιεί μια σειρά μηχανισμών προκειμένου να εξουδετερωθεί ο εισβολέας.

Το ανοσοποιητικό σύστημα των θηλαστικών απαρτίζεται από δύο αλληλοσυνδεόμενα συστήματα: **α**) το μη ειδικό έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα (εγγενής ή έμφυτη ανοσία) και **β**) το εξειδικευμένο επίκτητο ανοσοποιητικό σύστημα, τα οποία λειτουργούν συνεργιστικά διασφαλίζοντας την προστασία του οργανισμού. Το έμφυτο και το επίκτητο ανοσοποιητικό σύστημα χρησιμοποιούν δύο θεμελιακά διαφορετικές στρατηγικές για την αναγνώριση των μικροβιακών εισβολέων. Συγκεκριμένα, το έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα αναγνωρίζει παθογόνα με τη βοήθεια πεπερασμένου αριθμού υποδοχέων ικανών να αναγνωρίζουν συντηρημένα μοτίβα από διαφορετικές κατηγορίες παθογόνων, τα PRR (Pattern Recognition Receptors), ενώ το επίκτητο ανοσοποιητικό ανασυνδυασμό των γονιδίων που κωδικοποιούν τους αντιγονικούς υποδοχείς με στόχο την υψηλή ποικιλομορφία των αντιγονικών υποδοχέων [2].

Το έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα αποτελεί τη πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού σε περίπτωση μόλυνσης από κάποιο παθογόνο μικροοργανισμό. Σημαντικό ρόλο στην μη ειδική/ έμφυτη ανοσία παίζουν τα φαγοκύτταρα, όπως μακροφάγα και ουδετερόφιλα, ανατομικοί φραγμοί, όπως το δέρμα, καθώς και μια πληθώρα χημικών μεσολαβητών με αντιμικροβιακές δράσεις που συντίθενται από τον ξενιστή, όπως η λυσοζύμη (διασπά βακτηριακά τοιχώματα), η ιντερφερόνη (αντιϊική δράση) και το συμπλήρωμα. Σε αντίθεση με την έμφυτη ανοσοαπόκριση, η επίκτητη ανοσοαπόκριση είναι η αντίδραση του οργανισμού σε συγκεκριμένες αντιγονικές προκλήσεις [1].

1.2. Επίκτητο ανοσοποιητικό σύστημα

Το επίκτητο ανοσοποιητικό σύστημα χαρακτηρίζεται από υψηλό βαθμό εξειδίκευσης που οφείλεται στη δράση εξειδικευμένων μορίων (αντισώματα, υποδοχείς Τ κυττάρων και τα Μόρια Ιστοσυμβατότητας (ΜΗC)) που αναγνωρίζουν και δεσμεύουν συγκεκριμένα αντιγόνα. Η αποτελεσματικότητα του συγκεκριμένου συστήματος απορρέει από τα τέσσερα βασικά χαρακτηριστικά που εμφανίζει και τα οποία είναι: η αντιγονική ειδικότητα, η ποικιλομορφία, η ανοσολογική μνήμη και η διάκριση εαυτού/ξένου. Η αντιγονική ειδικότητα επιτρέπει στο ανοσοποιητικό σύστημα να διακρίνει ακόμα και μικρές διαφορές ανάμεσα στα αντιγόνα, για παράδειγμα τα αντισώματα μπορεί να διακρίνουν μεταξύ τους δύο μόρια πρωτεϊνών που διαφέρουν μόνο κατά ένα αμινοξύ. Τα εξειδικευμένα μόρια που απαρτίζουν το επίκτητο ανοσοποιητικό σύστημα είναι εξαιρετικά ποικιλόμορφα, δίνοντας τους τη δυνατότητα να αναγνωρίζουν τα δισεκατομμύρια μοναδικών δομών που εμφανίζουν τα ξένα αντιγόνα. Επιπλέον το ανοσοποιητικό σύστημα διαθέτει ανοσολογική μνήμη η οποία του δίνει τη δυνατότητα να αντιδρά πιο αποτελεσματικά σε περίπτωση που συναντήσει για δεύτερη φορά το ίδιο αντιγόνο. Τέλος, σε φυσιολογικές συνθήκες το ανοσοποιητικό σύστημα αποκρίνεται μόνο στα ξένα αντιγόνα, όποτε έχει την ικανότητα της διάκρισης εαυτού/ξένου, μια ιδιότητα εξαιρετικά σημαντική για τον οργαγισμό καθώς η απόκριση του σε αντινόνα του ίδιου του οργανισμού οδηγεί σε αυτοάνοσα νοσήματα και μπορεί να προκαλέσει ακόμα και το θάνατο [1].

Το επίκτητο ανοσοποιητικό σύστημα αποτελείται από δυο παράλληλα και αλληλοσυνδεόμενα συστήματα: **α)** τη κυτταρική ανοσία που μεσολαβείται από τα Τ λεμφοκύτταρα και **β)** την χυμική ανοσία που περιλαμβάνει την έκκριση αντισωμάτων από τα Β λεμφοκύτταρα. Στην επίκτητη ανοσία συμμετέχουν δύο μεγάλες κατηγορίες κυττάρων: τα λεμφοκύτταρα και τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (κυρίως τα δενδριτικά κύτταρα).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Κύτταρα του Επίκτητου Ανοσοποιητικού Συστήματος

2.1. <u>Λεμφοκύτταρα</u>

Τα λεμφοκύτταρα είναι μια κατηγορία λευκών αιμοσφαιρίων τα οποία παράγονται στο μυελό των οστών μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται αιμοποίηση και στη συνέχεια μεταναστεύουν σε όργανα του περιφερικού λεμφικού συστήματος. Λόγω του ότι φέρουν στην επιφάνεια τους ειδικούς υποδοχείς πρόσδεσης μέσω των οποίων αναγνωρίζουν συγκεκριμένα αντιγόνα, τα λεμφοκύτταρα προσδίδουν στο επίκτητο ανοσοποιητικό σύστημα τα χαρακτηριστικά της αντιγονικής ειδικότητας, της ποικιλομορφίας, της ανοσολογικής μνήμης και της διάκρισης εαυτού/ξένου. Διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: **α)** τα Β λεμφοκύτταρα που συμμετέχουν τόσο στην χυμική όσο και στην κυτταρική ανοσοαπόκριση και **β)** τα Τ λεμφοκύτταρα που συμμετέχουν στην επίγερον στην κυτταρική

2.1.1 <u>Β λεμφοκύτταρα</u>

Τα Β λεμφοκύτταρα ωριμάζουν στο μυελό των οστών, φέρουν στη επιφάνεια τους ειδικούς υποδοχείς πρόσδεσης BCR (B-cell receptor) των παθογόνων και περιπολούν τα περιφερικά λεμφικά όργανα (εικόνα 1). Ο υποδοχέας BCR των λεμφοκυττάρων είναι στην ουσία ένα μεμβρανοσύνδετο αντίσωμα. Τα αντισώματα είναι γλυκοπρωτεΐνες και αποτελούνται από δύο ελαφριές και δύο βαριές πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Κατά την πρόσδεση ενός αντιγόνου στα μεμβρανοσύνδετα αντισώματα, το λεμφοκύτταρο ενεργοποιείται και το σήμα της σύλληψης του αντιγονικού μορίου μεταφέρεται στο εσωτερικό του κυττάρου μέσω μιας σειράς φωσφορυλιώσεων που καταλήγουν στην ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων. Οι μεταγραφικοί αυτοί παράγοντες επάγουν με τη σειρά τους κλωνική ενίσχυση, κυτταρική διαφοροποίηση και παραγωγή αντισωμάτων με την ίδια εξειδίκευση πρόσδεσης αντιγόνου. Παράλληλα, η πρόσδεση ενός αντιγόνου στον υποδοχέα ενός ώριμου Β κυττάρου συνεπάγεται την ενδοκύτωση του συμπλόκου BCR-προσδεδεμένου αντιγόνου, την κατάτμηση του αντιγόνου σε πεπτίδια στο ενδόσωμα, την πρόσδεση των πεπτιδίων σε μόρια του Μείζονος Συμπλέγματος Ιστοσυμβατότητας τάξης ΙΙ (MHC ΙΙ) και την παρουσίαση του συμπλόκου MHC ΙΙ-πεπτιδίου στην επιφάνεια του Β κυττάρου προς αναγνώρισή του από τα βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα (Τ_Η). Η αναγνώριση από τα Τ_Η λεμφοκύτταρα έχει σαν αποτέλεσμα την έκκριση Β-διεγερτικών κυτοκινών (ΙL-4, IL-5, II-6). Οι κυτοκίνες οδηγούν σε περαιτέρω ενεργοποίηση των Β λεμφοκυττάρων προς πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση σε Β κύτταρα μνήμης, διαφοροποιημένα Β λεμφοκύτταρα που φέρουν

στην επιφάνειά τους μεμβρανοσύνδετα αντισώματα και σε πλασματοκύτταρα, Β λεμφοκύτταρα που εκκρίνουν διαλυτά αντισώματα [3]. Τα Β κύτταρα μνήμης έχουν μεγαλύτερο χρόνο ζωής από τα μη διαφοροποιημένα Β λεμφοκύτταρα και εκφράζουν τα ίδια μεμβρανοσύνδετα αντισώματα με τα Β λεμφοκύτταρα από τα οποία προήλθαν (πατρικά), ενώ τα πλασματοκύτταρα παρόλο που έχουν χρόνο ημιζωής μόνο λίγες μέρες εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες αντισωμάτων [1].



Εικόνα 1: Τα τρία είδη των λεμφοκυττάρων (a) Αναπαράσταση ενός Β λεμφοκυττάρου με τον υποδοχέα του (BCR) μέσω του οποίου αλληλεπιδρά με τα αντιγόνα (b) Αναπαράσταση ενός βοηθητικού Τ λεμφοκυττάρου με τον υποδοχέα του (TCR) και τον συνυποδοχέα του CD4 μέσω των οποίων αναγνωρίζει το σύμπλοκο αντιγόνου-MHC II (c) Αναπαράσταση ενός κυτταροτοξικού Τ λεμφοκυττάρου με τον υποδοχέα του (TCR) και τον συνυποδοχέα του CD8 μέσω των οποίων αναγνωρίζει το σύμπλοκο αντιγόνου-MHC II [1]

2.1.2 Τ λεμφοκύτταρα – Κυτταρική ανοσοαπόκριση

Όπως τα Β λεμφοκύτταρα, έτσι και τα Τ προέρχονται από το μυελό των οστών αλλά ωριμάζουν στο θύμο αδένα. Τα ώριμα Τ λεμφοκύτταρα μεταναστεύουν σε όργανα του περιφερικού λεμφικού συστήματος προκειμένου να συναντήσουν και να αναγνωρίσουν κάποιο μολυσμένο ή αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο μέσω ειδικών υποδοχέων που διαθέτουν στην επιφάνεια τους γνωστών ως υποδοχείς Τ λεμφοκυττάρων (TCR) (εικόνα 1). Σε αντίθεση με τα μεμβρανοσύνδετα αντισώματα στη επιφάνεια των Β λεμφοκυττάρων, τα οποία αναγνωρίζουν μόνα τους τα αντιγόνα, οι υποδοχείς TCR έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν αντιγόνα που παρουσιάζονται από μόρια του Μείζονος Συμπλέγματος Ιστοσυμβατότητας (MHC). Τα μόρια MHC είναι πολυμορφικές γλυκοπρωτεΐνες που συγκροτούνται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: τα μόρια MHC τάξης Ι, τα οποία εκφράζονται μόνο από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APC) [4]. Τα μόρια MHC τάξης Ι είναι ετεροδιμερή και αποτελούνται από μια μεγάλη α-αλυσίδα (45kDa) και μια μικρότερη (12kDa) β-

αλυσίδα (β₂-μικρογλοβουλίνη). Η α-αλυσίδα διαθέτει 3 δομικές περιοχές (α1, α2 και α3) εντός του ενδοπλασματικού δικτύου, μια διαμεμβρανική δομική περιοχή και μια κυτοπλασματική ουρά. Η β₂-μικρογλοβουλίνη είναι της ίδιας τάξης μεγέθους με την α3 δομική περιοχή, δεν διαθέτει διαμεμβρανικό τμήμα και είναι μη ομοιοπολικά δεσμευμένη στο υπόλοιπο μόριο. Οι δομικές περιοχές α1 και α2 σχηματίζουν μια κοιλότητα στην οποία μπορούν να προσδεθούν πεπτίδια μήκους 8-11 αμινοξέων (εικόνα 2). Όπως τα μόρια MHC I έτσι και τα MHC II αποτελούνται από δύο διαφορετικές πολυπεπτιδικές αλυσίδες, μια α-αλυσίδα (33kDa) και μια β-αλυσίδα (28kDa) οι οποίες συγκρατούνται μεταξύ τους μέσω μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων. Τόσο η α όσο και η β-αλυσίδα διαθέτουν δύο δομικές περιοχές α1 και β1 σχηματίζουν μια κοιλότητα πρόσδεσης πεπτιδίων μήκους μεγαλύτερου από 9 αμινοξέα (εικόνα 2).



Εικόνα 2: Μοντέλα σύνδεσης πεπτιδίων στις κοιλότητες των μορίων MHC τάξης I και II (a) Χωροπληρωτικό μοντέλο του ανθρώπινου μορίου ιστοσυμβατότητας τάξης I (HLA-A2), όπου με άσπρο αναπαριστάται η α αλυσίδα, με μπλε η β2-μικρογλοβουλίνη και κόκκινο το αντιγονικό πεπτίδιο. Τα αμινοξέα που έρχονται σε επαφή με το πεπτίδιο από την πάνω και κάτω πλευρά προέρχονται από τις δομικές περιοχές α1 και α2 του MHC I αντίστοιχα (b) Χωροπληρωτικό μοντέλο του ανθρώπινου μορίου ιστοσυμβατότητας τάξης II (HLA-DR1) όπου με άσπρο αναπαριστάται η ααλυσίδα, με μπλε η β-αλυσίδα και κόκκινο το αντιγονικό πεπτίδιο [1]

Τα Τ λεμφοκύτταρα χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: τα βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα (T_H), που εκφράζουν στην μεμβράνη τους τον συνυποδοχέα CD4 και τα κυτταροτοξικά (T_C) που εκφράζουν τον συνυποδοχέα CD8. Οι γλυκοπρωτεΐνες CD4 και CD8 είναι κρίσιμες για την αναγνώριση του συμπλόκου MHC-πεπτιδίου και συμβάλλουν στην διαφοροποίηση των T_H από τα T_{C.} Συγκεκριμένα, τα T λεμφοκύτταρα που εκφράζουν στην επιφάνεια τους τον συνυποδοχέα CD4 λειτουργούν ως βοηθητικά τα οποία, μετά την αλληλεπίδραση και αναγνώριση του συμπλόκου αντιγόνο-μόριο MHC τάξης ΙΙ, ενεργοποιούνται και εκκρίνουν αυξητικούς παράγοντες όπως οι κυτοκίνες. Οι κυτοκίνες παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση των Β κυττάρων, των T_C, των μακροφάγων και άλλων κυττάρων που συμμετέχουν στην ανοσοαπόκριση [1]. Από την άλλη, ένα Τ λεμφοκύτταρο που εκφράζει τον συνυποδοχέα CD8 δρα ως κυτταροτοξικό, αναγνωρίζει το σύμπλοκο αντιγόνο-μόριο MHC τάξης Ι, επιτυχής αναγνώριση οδηγεί σε επιπρόσθετες μοριακές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στους υποδοχείς των δύο κυττάρων με αποτέλεσμα το σχηματισμό μιας εκτεταμένης επιφάνειας μεταξύ των δύο κυττάρων (μολυσμένο κύτταρο και T_C), γνωστής ως ανοσολογική σύναψη και πυροδοτεί ένα καταρράκτη αντιδράσεων που οδηγούν σε απόπτωση και λύση του μολυσμένου κυττάρου [5],[6],[7],[8],[9].

2.2. Δενδριτικά κύτταρα

Τα δενδριτικά κύτταρα (DC) είναι ένα εξειδικευμένο είδος αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (APC), αναφέρονται και ως "επαγγελματίες" αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα ("professional" APC), που προέρχονται από το μυελό των οστών και διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση της ανοσοαπόκρισης [10],[11]. Οι ονομασία τους προήλθε από την παρουσία εκτεταμένων απολήξεων στην κυτταρική τους μεμβράνη, οι οποίες μοιάζουν με τους δενδρίτες των νευρικών κυττάρων και χαρακτηρίζονται από την ικανότητα τους να προσλαμβάνουν, επεξεργάζονται και να παρουσιάζουν αντιγόνα διεγείροντας τα Τ (και Β) λεμφοκύτταρα [12].

Τα νεοσυντιθέμενα δενδριτικά κύτταρα μεταφέρονται από το μυελό των οστών μέσω του κυκλοφορικού συστήματος και κατανέμονται στους διάφορους ιστούς ως πρώιμα δενδριτικά κύτταρα. Τα πρώιμα δενδριτικά κύτταρα παρόλο που δεν διαθέτουν τα απαραίτητα σηματοδοτικά μόρια για την ενεργοποίηση των Τ κυττάρων, όπως CD40, CD54 και CD86, είναι εξειδικευμένα στο να προσλαμβάνουν παθογόνα μέσω διαφορετικών μονοπατιών: α) μακροπινοκύτωση (macropinocytosis) και σχηματισμό μεγάλων πινοκυτικών κυστίδιων προσλαμβάνουν εξωκυτταρικά υγρά β) με ενδοκύτωση μέσω υποδοχέων, όπως οι υποδοχείς C-τύπου λεκτίνης (υποδοχείς μανόζης και DEC-205), Fcy και Fcε υποδοχείς γ) με φαγοκύτωση θραυσμάτων από αποπτωτικά κύτταρα, ιών, βακτηρίων όπως και ενδοκυτταρικών παρασίτων [13]. Επιπλέον τα πρώιμα δενδριτικά κύτταρα είναι εξειδικευμένα στο να επεξεργάζονται τα αντιγόνα που προσλαμβάνουν με σκοπό το σχηματισμό σταθερών συμπλόκων με τα μόρια ΜΗC (αντιγόνο-μόριο MHC) [10]. Αντιγόνα που έχουν εισέλθει στο εσωτερικό των πρώιμων DC κυττάρων με πινοκύτωση, ενδοκύτωση ή φαγοκύτωση αποικοδομούνται από τις πρωτεάσες των ενδοσωμάτων και τα σχηματιζόμενα πεπτίδια προσδένονται σε μόρια MHC ΙΙ μέσω του μονοπατιού της αντιγονοπαρουσίασης Μορίων Ιστοσυμβατότητας τύπου ΙΙ, ενώ ενδογενή καθώς και ορισμένα εξωγενή αντιγόνα αποικοδομούνται μέσω του πρωτεασώματος και προσδένονται σε μόρια ΜΗC Ι μέσω των μονοπατιών της αντιγονοπαρουσίασης Μορίων Ιστοσυμβατότητας τύπου Ι και διασταυρούμενης αντιγονοπαρουσίασης, αντίστοιχα, τα οποία περιγράφονται λεπτομερώς σε επόμενο κεφάλαιο.

Η σύλληψη και επεξεργασία ενός αντιγόνου από ένα πρώιμο DC κύτταρο οδηγεί σε φαινοτυπικές και μορφολογικές αλλαγές ώστε να ολοκληρωθεί η μετατροπή του (ωρίμανση) από κύτταρο πρόσληψης αντιγόνων σε αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο (εικόνα 3). Η διαδικασία της ωρίμανσης των DC κυττάρων πραγματοποιείται καθώς μεταφέρονται από τους περιφερικούς ιστούς στα συμπαγή λεμφικά όργανα (σπλήνα, λεμφαδένες) με την συμμετοχή διάφορων μορίων, όπως CD40, TNF-R και IL-1R [13]. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας λαμβάνει χώρα μεταφορά των σχηματιζόμενων συμπλόκων αντιγόνου-μορίου ΜΗC στην επιφάνεια του κυττάρου προς αναγνώριση από τα Τ λεμφοκύτταρα (Τ_H ή Τ_C) και έναρξη της ανοσοαπόκρισης. Συνοπτικά, το πρώιμο DC κύτταρο είναι αποτελεσματικό ως φαγοκύτταρο, ενώ то ώριμο ως αντιγονοπαρουσιαστικό [10].

Η κύρια λειτουργία των DC κυττάρων είναι η παρουσίαση αντιγόνων και η ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων. Ωστόσο, ορισμένοι τύποι δενδριτικών κυττάρων φαίνεται να συμβάλλουν στην διέγερση και των Β κυττάρων μέσω κυτοκινών και άλλων παραγόντων που εκκρίνουν, όπως τα πλασματοκυτταρικά δενδριτικά κύτταρα (pDC) που εκκρίνουν ιντερφερόνη τύπου Ι και ιντερλευκίνη-6 και προάγουν τη διαφοροποίηση των πλασματοκυττάρων και την έκκριση αντισωμάτων, καθώς και τον παράγοντα νέκρωσης CD40, οποίος προσδένεται στον υποδοχέα του CD27 που εκφράζεται στην επιφάνεια των Β κυττάρων μνήμης και προάγει την διαφοροποίηση των πλασματοκυττάρων μαι την έκκριση αντισωμάτων, καθώς και τον παράγοντα νέκρωσης CD40, οποίος προσδένεται στον υποδοχέα του CD27 που εκφράζεται στην επιφάνεια των Β κυττάρων μνήμης και προάγει την διαφοροποίηση των πλασματοκυττάρων και την έκκριση αντισωμάτων και στο θύμο αδένα, όπου πραγματοποιείται η θυμική επιλογή των κυττάρων και παρουσιάζουν σύμπλοκα αντιγόνων του ίδιου του οργανισμού-μορίων MHC στα νεοσυντιθέμενα Τ κύτταρα, ώστε θυμοκύτταρα με υψηλή δεσμευτική συγγένεια προς τα αντιγόνα του ίδιου του οργανισμού-μορίων MHC στα νεοσυντιθέμενα του ίδιου του οργανισμού-μορίων β





ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 Αντιγονοπαρουσίαση

3.1. Αντιγονοπαρουσίαση

Για να μπορέσει μια ξένη αντιγονική πρωτεΐνη να αναγνωριστεί από ένα Τ λεμφοκύτταρο πρέπει πρώτα να αποικοδομηθεί σε μικρότερα αντιγονικά πεπτίδια που στη συνέχεια θα παρουσιαστούν στην επιφάνεια του κυττάρου από τα μόρια MHC. Η διαδικασία αυτή της επεξεργασίας και παρουσίασης του αντιγόνου ονομάζεται αντιγονοπαρουσίαση. Το είδος των μορίων MHC που θα παρουσιάσουν το αντιγόνο καθορίζεται από τον τρόπο με τον οποίο το αντιγόνο εισέρχεται στο κύτταρο. Υπάρχουν τρία μονοπάτια αντιγονοπαρουσίασης: **1)** το μονοπάτι αντιγονοπαρουσίασης Μορίων Ιστοσυμβατότητας τύπου Ι, **2)** το μονοπάτι αντιγονοπαρουσίασης αντιγονοπαρουσίασης. Στην εικόνα 4 παριστάνονται σχηματικά και τα τρία μονοπάτια της αντιγονοπαρουσίασης.



Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση των μονοπατιών αντιγονοπαρουσίασης MHC τάξης Ι, MHC τάξης ΙΙ και διασταυρούμενης αντιγονοπαρουσίασης [15]

3.2. Μονοπάτια αντιγονοπαρουσίασης

3.2.1 Μονοπάτι αντιγονοπαρουσίασης τάξης Ι (ΜΗC Ι)

Τα μόρια MHC τάξης Ι προσδένουν πεπτίδια με σκοπό να τα παρουσιάσουν στα κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα. Τα πεπτίδια αυτά προέρχονται από την αποικοδόμηση ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών, μια διαδικασία που λαμβάνει χώρα στο κυτοσόλιο. Οι πρωτεΐνες των κυττάρων επιλεκτικά, τόσο οι λειτουργικές όσο και οι μη λειτουργικές πρωτεΐνες, οι DRiP (Defective Ribosomal Products), που έχουν συντεθεί ελαττωματικά και δεν μπορούν να αναδιπλωθούν τη σωστή τρισδιάστατη δομή τους, αποικοδομούνται μέσω του μονοπατιού ουβικιτίνης-πρωτεασώματος, έτσι ώστε να επιτυγχάνεται τόσο η ανακύκλωση των αμινοξέων, ως δομικών λίθων των πρωτεϊνών, όσο και η ρύθμιση της ποσότητας διαφόρων πρωτεϊνών στα επίπεδα που απαιτούν οι εκάστοτε φυσιολογικές συνθήκες [16],[17].

Στο μονοπάτι αυτό, ενδοκυτταρικές πρωτεϊνες που πρόκειται να καταστραφούν από το κύτταρο σημαίνονται με ουβικιτίνη (πολυουβικιτινιλίωση) και στη συνέχεια οδηγούνται στο πρωτεάσωμα. Το πρωτεάσωμα είναι ένα πολυενζυμικό σύστημα πολλών υπομονάδων με τρεις διαφορετικές ενζυμικές ενεργότητες που είναι ειδικές στο να αποικοδομούν πληθώρα πεπτιδικών δεσμών. Από την πρωτεολυτική δράση του πρωτεοσώματος προκύπτουν πεπτίδια μήκους 3-16 αμινοξέων [18]. Η ιντερφερόνη-γ (IFN-γ), μια κυτοκίνη που παράγεται από τα κύτταρα στα αρχικά στάδια τόσο της φυσικής όσο και της επίκτητης ανοσολογικής απόκρισης, επάγει την έκφραση μίας εξειδικευμένης μορφής πρωτεοσώματος, του ανοσοπρωτεοσώματος, το οποίο είναι πολύ αποτελεσματικό στην παραγωγή πρόδρομων αντιγονικών επιτόπων [19],[20]. Τα περισσότερα από αυτά τα πεπτίδια αποικοδομούνται περαιτέρω προς αμινοξέα από τη δράση πρωτεασών του κυτοσολίου, ενώ ένα μικρό μόνο ποσοστό τους μεταφέρεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο μέσω του διμερούς μεταφορέα TAP (Transporter Associated with Antigen Processing), ο οποίος καταλύει τη μεταφορά πεπτιδίων μήκους 8-19 αμινοξέων με παράλληλη υδρόλυση ATP [21].

Τα περισσότερα πεπτίδια που εισέρχονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο διαθέτουν Ντελικές επεκτάσεις οπότε χρειάζονται περαιτέρω επεξεργασία, για να προκύψουν οι ώριμοι αντιγονικοί επίτοποι ικανοί να προσδεθούν στα μόρια MHC τάξης Ι καθώς τα MHC Ι μόρια διαθέτουν μια κοιλότητα περιορισμένου μήκους που τους επιτρέπει να προσδένουν πεπτίδια μήκους 8-11 αμινοξέων. Στο ενδοπλασματικό δίκτυο εδράζονται αμινοπεπτιδάσες, που καλούνται ERAP (Endoplasmic Reticulum Amino Peptidases) και παίζουν καθοριστικό ρόλο στον καταβολισμό των πρόδρομων αντιγονικών επιτόπων και συνεπώς στην παραγωγή των ώριμων [22]. Στη συνέχεια, ο ώριμος αντιγονικός επίτοπος προσδένεται στο μόριο MHC τάξης Ι με τη βοήθεια ενός πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου, γνωστού ως Σύμπλοκο Φόρτωσης Πεπτιδίου (Peptide Loading Complex, PLC). Το σύμπλοκο PLC απαρτίζεται από την θειολο-δισουλφιδική οξειδοαναγωγάση (ERp57), την συνοδό πρωτεΐνη καλρετικουλίνη (CRT), τον μεταφορέα TAP, την δισουλφιδική ισομεράση (PDI) και την ταπασίνη [23],[24],[25],[26]. Τα μόρια MHC I που δεν έχουν προσδέσει κάποιο πεπτίδιο είναι ασταθή, παραμένουν στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στη συνέχεια αποικοδομούνται [27]. Η ταπασίνη φαίνεται να παίζει καθοριστικό ρόλο στη σταθεροποίηση των πρόδρομων MHC I μορίων [28], καθώς και στην επιλογή των πεπτιδίων που πρόκειται να προσδεθούν στα μόρια MHC I, διευκολύνοντας την πρόσδεση πεπτιδίων που εμφανίζουν μεγάλο χρόνο ημιζωής και υψηλή χημική συγγένεια ως προς τα MHC I μόρια [23],[26],[29]. Μόνο όταν προσδεθεί ισχυρά κάποιος ώριμος αντιγονικός επίτοπος στην κοιλότητα του μορίου MHC I, σταθεροποιούνται, απελευθερώνονται από το σύμπλοκο PLC, εγκαταλείπουν το ενδοπλασματική μεμβράνη, όπου λαμβάνει χώρα αναγνώριση του συμπλόκου MHC I-αντιγόνου από τους υποδοχείς (TCR) των κυτταροτοξικών Τ λεμφοκυττάρων [30],[31].

Η επιτυχής αναγνώριση του συμπλόκου MHC Ι-επιτόπου από τα κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα (Tc) υποδηλώνει ότι το συγκεκριμένο κύτταρο είναι μολυσμένο ή καρκινικό και πυροδοτεί ένα καταρράκτη μοριακών γεγονότων που τελικά οδηγούν στη λύση του κυττάρου. Αρχικά, εκκρίνονται από το λεμφοκύτταρο περφορίνη και κοκκιοένζυμα. Η περφορίνη σχηματίζει διαμεμβρανικούς πόρους και καθιστά διαπερατή τη μεμβράνη του κυττάρου στόχου επιτρέποντας την είσοδο των κοκκιοενζύμων στο εσωτερικό του κυττάρου τα οποία στη συνέχεια ενεργοποιούν τον καταρράκτη των κασπασών και συνεπώς την απόπτωση του μολυσμένου κυττάρου. Επιπλέον, εκκρίνουν ατή του κυττάρου τα οποία στη συνέχεια ενεργοποιούν τον καταρράκτη των κασπασών και συνεπώς την απόπτωση του μολυσμένου κυττάρου. Επιπλέον, εκκρίνουν κυτοκίνες όπως ιντερφερόνη-γ και ο παράγοντας νέκρωσης α. Ο παράγοντας νέκρωσης α (TNF A) δεσμεύεται στον υποδοχέα του στην επιφάνεια του κυττάρου-στόχου και πυροδοτεί τον καταρράκτη των κασπασών και την απόπτωση του, ενώ η ιντερφερόνη-γ αναστέλλει τον διπλασιασμό των ιών και επάγει την έκφραση των μορίων MHC Ι ενισχύοντας την αντιγονοπαρουσίαση ενδογενών αντιγόνων [4].

3.2.2 <u>Μονοπάτι αντιγονοπαρουσίασης τάξης ΙΙ (MHC II)</u>

Το μονοπάτι της αντιγονοπαρουσίασης τάξης ΙΙ είναι υπεύθυνο για την παρουσίαση πεπτιδίων τα οποία προέρχονται από εξωκυτταρικές πρωτεΐνες που έχουν εισέλθει στο εσωτερικό των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (μακροφάγα, δενδριτικά και Β κύτταρα) με ενδοκύτωση ή φαγοκύτωση [32]. Οι εξωκυτταρικές πρωτεΐνες αποικοδομούνται σε μικρότερα πεπτίδια μήκους 13-17 αμινοξέα από τις πρωτεάσες των ενδοσωμάτων. Το Ν-τελικό άκρο των πεπτιδίων αυτών σχηματίζεται από την πρωτεολυτική δραστικότητα καθεψινών και αμινοπεπτιδασών, ενώ το C-τελικό άκρο τους από τη δράση μιας καρβοξυπεπτιδάσης μετά την πρόσδεση τους στα μόρια MHC ΙΙ [33].

Τα νεοσυντιθέμενα μόρια MHC ΙΙ αποτελούνται από δύο ομόλογες πολυπεπτιδικές αλυσίδες και συγκροτούνται στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Τα ετεροδιμερή μόρια MHC ΙΙ διαθέτουν μια κοιλότητα για την πρόσδεση πεπτιδίων μήκους μεγαλύτερου από 9 αμινοξέα [34]. Μετά τη σύνθεση τους μια πολυπεπτιδική αλυσίδα που ονομάζεται αμετάβλητη αλυσίδα (Invariant Chain ή li) δεσμεύεται στην κοιλότητα πρόσδεσης πεπτιδίου των MHC ΙΙ. Η Ιι αλυσίδα κατευθύνει την απομάκρυνση των συμπλόκων MHC II-Ιι από το ενδοπλασματικό δίκτυο και την ενσωμάτωσή τους σε διαμερίσματα, τα ΜΙΙC (MHC Class II-containing Compartments). Μέσα στα MIIC διαμερίσματα λαμβάνει χώρα πρωτεόλυση της li αλυσίδας από τις S και L καθεψίνες και από τη δράση τους προκύπτει ένα μικρό πεπτίδιο που ονομάζεται CLIP (class II-associated invariant chain peptide) το οποίο προστατεύει την κοιλότητα των μορίων MHC ΙΙ από την πρόσδεση κάποιου πεπτιδίου [35],[36]. Στη συνέχεια τα διαμερίσματα MIIC συντήκονται με τα πρώιμα ενδοσώματα στα οποία περιέχονται τα αντιγονικά πεπτίδια που προέκυψαν από την αποικοδόμηση των εξωκυτταρικών πρωτεϊνών. Για να μπορέσει όμως το αντιγονικό πεπτίδιο να προσδεθεί στην κοιλότητα των μορίων MHC ΙΙ απαιτείται απομάκρυνση του πεπτιδίου CLIP, οπότε ακολουθεί μεταφορά των συμπλόκων MHC II-CLIP σε μεμβρανικές δομές των διαμερισμάτων MIIC, στις οποίες εντοπίζεται μια ομόλογη πρωτεΐνη μετά μόρια MHC ΙΙ, η HLA- DM [35],[37]. Η HLA- DM εμφανίζει παρόμοιο τρόπο δράσης με την ταπασίνη, η οποία συμμετέχει στο μονοπάτι αντιγονοπαρουσίασης τάξης Ι, συμβάλλοντας στη σταθεροποίηση και την επιλογή των πεπτιδίων που θα προσδεθούν στα μόρια MHC ΙΙ, προάγοντας τη πρόσδεση πεπτιδίων που οδηγούν στο σχηματισμό κινητικά και θερμοδυναμικά σταθερών συμπλοκών MHCII-πεπτιδίων [23],[38],[39],. Μετά την απομάκρυνση του πεπτιδίου CLIP και την πρόσδεση των αντιγονικών επιτόπων στα μόρια MHC ΙΙ, τα σχηματιζόμενα σταθερά σύμπλοκα MHCIIπεπτιδίων μεταφέρονται μέσω της εκκριτικής οδού στην πλασματική μεμβράνη των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων προς αναγνώριση από τους υποδοχείς των βοηθητικών Τ λεμφοκυττάρων (Τ_H) [32].

Η αναγνώριση του συμπλόκου MHCII-αντιγονικού πεπτιδίου από τα βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση, τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση τους σε κλώνους ειδικούς για το κάθε σύμπλοκο MHC II-πεπτίδιο. Οι κλώνοι αυτοί διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με το είδος των κυτοκινών που εκκρίνουν: Th τύπου 1 (Th1), Th τύπου 2 (Th2) και Th τύπου 17 (Th17). Τα Th1 κύτταρα εκκρίνουν ιντερφερόνη-γ και τον παράγοντα νέκρωσης όγκων β, που συμβάλουν στην προστασία των μακροφάγων από ενδοκυτταρικές μολύνσεις και στην καταστροφή των καρκινικών κυττάρων. Τα Th2 κύτταρα εκκρίνουν τις ιντερλευκίνες IL-4, -5, -10 και 13 οι οποίες ενισχύουν την παραγωγή αντισωμάτων και στοχεύουν παρασιτικούς

οργανισμούς. Επιπλέον τα Th2 κύτταρα ενεργοποιούν τα B λεμφοκύτταρα. Τα τελευταία χρόνια ανακαλύφθηκε και ένας επιπλέον τύπος βοηθητικών T κυττάρων, τα Th17. Τα κύτταρα αυτά εκκρίνουν IL-17, IL-17F, IL-6, IL-22 και TNF-α και φαίνεται να συμμετέχουν τόσο στη φλεγμονή όσο και στην ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων για την καταπολέμηση βακτηρίων [40].

3.2.3 Μονοπάτι διασταυρούμενης αντιγονοπαρουσίασης

Το μονοπάτι της διασταυρούμενης αντιγονοπαρουσίασης διεξάγεται από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (κυρίως από τα δενδριτικά κύτταρα και τα μακροφάγα) και περιλαμβάνει την παρουσίαση εξωγενών αντιγόνων από τα μόρια MHC I [41],[42]. Στα εξωγενή αντιγόνα που μονοπατιού της διασταυρούμενης αντιγονοπαρουσίασης συγκαταλέγονται κυτταρικές πρωτεΐνες προερχόμενες από αποπτωτικά κύτταρα, καθώς και τα προϊόντα έκφρασης εξωγενούς RNA ή DNA, τα οποία προσλαμβάνονται από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κυτταρά κυρίως με φαγοκύτωση και ενδοκύτωση [41],[43]. Μετά την φαγοκύτωση του, το αντιγόνο μπορεί να παρουσιαστεί στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων υπό μορφή πεπτιδίων σε σύμπλοκο με τα μόρια MHC I, μέσω τουλάχιστον δύο διακριτών μονοπατιών τα οποία διαφέρουν ως προς τον τρόπο επεξεργασίας του αντιγόνου [43].

Στο πρώτο μονοπάτι της διασταυρούμενης αντιγονοπαρουσίασης λαμβάνει χώρα σύντηξη του φαγοσώματος με την μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου προς σχηματισμό ενός εξειδικευμένου κυστιδίου ενδοπλασματικού δικτύου-φαγοσώματος το οποίο περιέχει το πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο φόρτωσης πεπτιδίου (PLC), μόρια MHC I, τον μεταφορέα TAP, τη μετατοπάση Sec61, καθώς και αμινοπεπτιδάσες του ενδοπλασματικού δικτύου [42],[44]. Στη συνέχεια πιθανολογείται ότι τα αντιγόνα μεταφέρονται από το φαγόσωμα στο κυτοσόλιο μέσω της μετατοπάσης Sec61 όπου αποικοδομούνται από το πρωτεάσωμα. Τα πεπτίδια που προκύπτουν από τη δράση του πρωτεασώματος μπορούν να επιστρέψουν και πάλι στο εξειδικευμένο φαγόσωμα ή στο ενδοπλασματικό δίκτυο μέσω του μεταφορέα TAP, όπου μετά τη δράση των αμινοπεπτιδασών του ενδοπλασματικού δικτύου (ERAP) προσδένονται στην κοιλότητα των μορίων MHC I με τη βοήθεια του συμπλόκου φόρτωσης των MHC I (PLC) και τα σταθερά σύμπλοκα MHC I-πεπτιδίου μεταφέρονται στην πλασματική μεμβράνη προς αντιγονοπαρουσίαση στα CD8⁺ κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα [45].

Το δεύτερο μονοπάτι της διασταυρούμενης αντιγονοπαρουσίασης, το οποίο είναι και το λιγότερο κατανοητό, φαίνεται ότι διεξάγεται σε ένα ενδοκυτταρικό κυστίδιο που σχηματίζεται μετά τη φαγοκύτωση του αντιγόνου κυρίως στα δενδριτικά κύτταρα (DC). Στο ενδοκυτταρικό αυτό κυστίδιο που αναφέρεται και ως ενδόσωμα Rab14⁺, έχει πιστοποιηθεί η παρουσία μιας αμινοπεπτιδάσης διαφορετικής από τις αμινοπεπτιδάσες του ενδοπλασματικού δικτύου, της αμινοπεπτιδάσης που ρυθμίζεται από ινσουλίνη (insulin-regulated aminopeptidase ή IRAP) όπως επίσης των μορίων MHC I και του μεταφορέα TAP. Το εξαρτώμενο από την IRAP μονοπάτι της διασταυρούμενης αντιγονοπαρουσίασης βασίζεται στην κυτοσολική από το πρωτεόσωμα αποικοδόμηση των πρωτεϊνικών αντιγόνων, χωρίς να είναι πλήρως κατανοητό πως μεταφέρονται από το Rab14⁺ ενδόσωμα στο κυτοσόλιο. Τα πεπτίδια που προκύπτουν από τον καταβολισμό των πρωτεϊνικών αντιγόνων μεταφέρονται μέσω του μεταφορέα TAP και πάλι στο ενδόσωμα όπου υφίστανται επεξεργασία από την IRAP πριν προσδεθούν στα MHC I μόρια. Τέλος, τα σταθερά σύμπλοκα MHC Ι-πεπτιδίων μεταφέρονται και πάλι στην πλασματική μεμβράνη προς αντιγονοπαρουσίαση στα CD8⁺ κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα [46].

Με βάση τα παραπάνω φαίνεται ότι η διασταυρούμενη αντιγονοπαρουσίαση διαχωρίζεται σε δύο παράλληλα εξαρτώμενα από το πρωτεόσωμα μονοπάτια, τα οποία λαμβάνουν χώρα σε διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα με τη συμμετοχή διαφορετικών αμινοπεπτιδασών (αμινοπεπτιδάσες του ενδοπλασματικού δικτύου και η IRAP αντίστοιχα) [46].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 Αμινοπεπτιδάσες

4.1. <u>Αμινοπεπτιδάσες</u>

Οι αμινοπεπτιδάσες είναι μια κατηγορία ενζύμων που καταλύουν την υδρόλυση αμινοξέων από το Ν-τελικό άκρο πρωτεϊνών ή πεπτιδικών υποστρωμάτων. Είναι ευρέως διαδεδομένες τόσο στο ζωικό και φυτικό βασίλειο, όσο και στα βακτήρια και τους μύκητες και παίζουν καθοριστικό ρόλο σε διάφορες βιολογικές λειτουργίες όπως η ωρίμανση και η αποικοδόμηση των πρωτεϊνών, η ρύθμιση των επιπέδων ορισμένων ορμονών και νευροδιαβιβαστών και ο έλεγχος του κυτταρικού κύκλου. Επιπλέον διάφορες παθολογικές καταστάσεις όπως ο καρκίνος, η κυστική ίνωση, η λευχαιμία και άλλες, έχουν συσχετιστεί με αλλαγές στην πρωτεολυτική δραστικότητα πολλών αμινοπεπτιδασών [47].

Οι αμινοπεπτιδάσες μπορούν να ταξινομηθούν σε διάφορες κατηγορίες με βάση:

A) Τον αριθμό των αμινοξέων που υδρολύουν από το αμινο-τελικό άκρο των υποστρωμάτων. Για παράδειγμα όταν διαδοχικά καταλύουν την υδρόλυση ενός αμινοξέος κάθε φορά από το Ν-τελικό άκρο των πρωτεϊνών ή των πεπτιδικών υποστρωμάτων καλούνται αμινοπεπτιδάσες, όταν αναγνωρίζουν ως υποστρώματα διπεπτίδια αμινοδιπεπτιδάσες, όταν υδρολύουν ένα τριπεπτίδιο αμινοτριπεπτιδάσες κ.τ.λ

B) Τη φύση του Ν-τελικού άκρου του υποστρώματος ως αμινοπεπτιδάσες λευκίνης, αργινίνης, μεθειονίνης, κ.λ.π.. Για παράδειγμα, η αμινοπεπτιδάση λευκίνης (LAP) παρουσιάζει μέγιστη σχετική δραστικότητα όταν στο αμινο-τελικό άκρο του υποστρώματος υπάρχει το αμινοξύ λευκίνη.

Γ) Το εντοπισμό τους μέσα στο κύτταρο ως μεμβρανικές, κυτοσολικές, λυσοσωμικές, πυρηνικές ή μιτοχονριακές αμινοπεπτιδάσες.

Δ) Το μεταλλικό ιόν που μπορεί να διαθέτουν (Zn^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+}).

E) Το pH στο οποίο παρουσιάζουν τη μέγιστη δραστικότητά τους ως όξινες, βασικές και ουδέτερες αμινοπεπτιδάσες [47].

4.2. Ο ρόλος των αμινοπεπτιδασών στην αντιγονοπαρουσίαση

Τα μόρια MHC Ι χαρακτηρίζονται από την παρουσία μιας κοιλότητας στην οποία μπορούν να προσδεθούν πεπτίδια περιορισμένου μήκους 8-11 αμινοξέων. Από την δράση όμως του πρωτεασώματος προκύπτουν πεπτίδια ποικίλου μήκους από 2 έως 22 αμινοξέων, με αποτέλεσμα κάποιοι αντιγονικοί επίτοποι να παράγονται απευθείας από

το πρωτεάσωμα, ενώ άλλοι ως πρόδρομοι. Η ομάδα των Craiu et.al απέδειξε ότι οι πρόδρομοι αντιγονικοί επίτοποι που παράγονται από την καταλυτική δράση του πρωτεασώματος διαθέτουν το κατάλληλο C-τελικό άκρο, που τους επιτρέπει πρόσδεση στα μόρια MHC I, αλλά διαθέτουν N-τελικές επεκτάσεις και επομένως χρειάζονται περαιτέρω επεξεργασία από κάποιες αμινοπεπτιδάσες ώστε να προκύψουν οι ώριμοι αντιγονικοί επίτοποι [19],[48],[49].

Στην προσπάθεια να προσδιοριστούν οι αμινοπεπτιδάσες που παίζουν καθοριστικό ρόλο στην αντιγονοπαρουσίαση, οι Beninga et al μελέτησαν την επίδραση της ιντερφερόνης-ν (IFN-v), η οποία είναι μια κυτοκίνη που διενείρει την πρωτεολυτική δράση του πρωτεασώματος επάγοντας την έκφραση του ανοσοπρωτεασώματος, καθώς και άλλων συστατικών της αντιγονοπαρουσίασης, στην αποικοδόμηση των πρόδρομων εκτεταμένων πεπτιδίων προς ώριμους επιτόπους. Από τη συγκεκριμένη μελέτη διαπιστώθηκε ότι η IFN-γ διεγείρει την υδρόλυση των πρόδρομων επιτόπων σε ώριμους επάγοντας την έκφραση μιας αμινοπεπτιδάσης του κυτοσολίου, της αμινοπεπτιδάσης LAP και κατέληξαν πως η LAP μπορεί να εμπλέκεται στην υδρόλυση των εκτεταμένων στο αμινο-τελικό άκρο πρόδρομων πεπτιδίων στο κυτοσόλιο [50]. Στη συνέχεια προσδιορίστηκε η παρουσία δύο ακόμα αμινοπεπτιδασών στο κυτοσόλιο που συμμετέχουν στην δημιουργία των ώριμων για τα MHC Ι μόρια επιτόπων της PSA (puromycin sensitive aminopeptidase), μιας αμινοπεπτιδάσης που ανήκει στην οικογένεια των μεταλλοπεπτιδασών Μ1 και της BH (bleomycin hydrolase) [51]. Η παρουσία αμινοπεπτιδασών στο κυτοσόλιο καθιστά δυνατή την περαιτέρω αποικοδόμηση των πεπτιδίων που προέρχονται από τη δράση του πρωτεοσώματος προς αμινοξέα, συμπεριλαμβανομένων τόσο των πρόδρομων όσο και των ώριμων αντιγονικών πεπτιδίων [52]. Παρόλα αυτά στο κυτοσόλιο εντοπίζονται συνοδοί πρωτεΐνες όπως οι Hsp70, Hsp90 και TRiC, οι οποίες προστατεύουν τα αντιγονικά πεπτίδια από περαιτέρω αποικοδόμηση τους. Τα πεπτίδια αυτά στη συνέχεια εισέρχονται στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου μέσω του μεταφορέα ΤΑΡ όπου προσδένονται στα μόρια MHC Ι [52],[53]. Έχει αποδειχθεί ότι ο μεταφορέας TAP εμφανίζει υψηλή συγγένεια και επομένως καταλύει κυρίως τη μεταφορά Ν-εκτεταμένων πρόδρομων αντιγονικών επιτόπων στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου [54].

Τέλος, οι ομάδες των Shastri και Van Endert διαπίστωσαν πως η παραγωγή των ώριμων αντιγονικών επιτόπων οφείλεται κυρίως στην καταλυτική δράση ενδοπλασματικού αμινοπεπτιδασών του δικτύου που κατατάσσονται στις μεταλλοπρωτεάσες ψευδαργύρου [22],[55].

4.3. <u>Ο ρόλος των αμινοπεπτιδασών του ενδοπλασματικού δικτύου στην</u> <u>αντιγονοπαρουσίαση</u>

Μέχρι το 2002 ήταν γνωστό ότι οι πρόδρομοι αντιγονικοί επίτοποι (μήκους 9-20 αμινοξέων) καταβολίζονται περαιτέρω σε ώριμους (μήκους 8-9 αμινοξέων) ικανούς να προσδεθούν στην κοιλότητα των μορίων MHC I από μια άγνωστη μέχρι τότε αμινοπεπτιδάση του ενδοπλασματικού δικτύου [55],[56]. Οι ερευνητικές ομάδες των Shastri, Rock και Goldberg ήταν οι πρώτες που προσδιόρισαν την αμινοπεπτιδάση αυτή, δίνοντας της το όνομα ERAAP (Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase associated with Antigen Processing) ή ERAP1 (ER-aminopeptidase 1) [57],[58],[59].

Για την ταυτοποίηση της ERAP1, η ομάδα του Shastri χρησιμοποίησε ένα διαλυτό κλάσμα μικροσωμάτων από ήπαρ και σπλήνα ποντικού από το οποίο με χρωματογραφία ιονανταλλαγής απομόνωσαν μια κορυφή με δραστικότητα αμινοπεπτιδάσης η οποία μπορούσε να ανασταλεί από λευκινοθειόλη, έναν κλασικό αναστολέα αμινοπεπτιδασών. Από την ανάλυση του κλάσματος μέσω SDS-PAGE ηλεκτροφόρησης προέκυψε μια πρωτεϊνική ζώνη στα 100kDa, η οποία στη συνέχεια υποβλήθηκε σε πέψη με θρυψίνη και τα πεπτιδικά θραύσματα ταυτοποιήθηκαν με φασματομετρία μάζας μέσω της οποίας διαπιστώθηκε ότι αντιστοιχούσε σε μια ήδη ταυτοποιημένη πρωτεϊνη, την A-LAP (Adipocyte-derived Leucine AminoPeptidase) [58].

Η ομάδα του Goldberg διαπίστωσε ότι η κορυφή με τη μεγαλύτερη δραστικότητα αμινοπεπτιδάσης, που απομονώθηκε με χρωματογραφία ιονανταλλαγής των πρωτεϊνών του ενδοπλασματικού δικτύου, εμφάνιζε δραστικότητα για L-AMC (L-leucine-7amido-4methyl coumarin), το οποίο είναι ένα χαρακτηριστικό υπόστρωμα για μια τυπική αμινοπεπτιδάση λευκίνης. Στη συνέχεια, η ομάδα επικεντρώθηκε στον προσδιορισμό του υποκυτταρικού εντοπισμού της και απέδειξαν ότι πρόκειται για μια αμινοπεπτιδάση του ενδοπλασματικού δικτύου [57]. Η ERAP1 εκφράζεται σε όλους τους ιστούς, αλλά μεγαλύτερη έκφραση της έχει παρατηρηθεί σε ιστούς όπου τα επίπεδα έκφραση των μορίων MHC Ι είναι υψηλά όπως το ήπαρ, ο πνεύμονας, ο θύμος και στο σπλήνα.

Τα πειράματα αποσιώπησης της αμινοπεπτιδάσης ERAP1 που πραγματοποιήθηκαν από την ομάδα του Shastri απέδειξαν ότι παίζει καθοριστικό ρόλο στην αντιγονοπαρουσίαση, καθώς απουσία της ERAP1 παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης των μορίων MHC I στην επιφάνεια των κυττάρων, διότι τα μόρια MHC I που δεν έχουν προσδέσει κάποιο πεπτίδιο είναι ασταθή με αποτέλεσμα τη μειωμένη έκφραση τους στην επιφάνεια του κυττάρου [27]. Μια άλλη σημαντική παρατήρηση ήταν ότι η απουσία της ERAP1 προκάλεσε μείωση της παραγωγής κάποιων επιτόπων και αύξηση της παραγωγής κάποιων άλλων, καταλήγοντας έτσι στο συμπέρασμα ότι η ERAP1 σε κάποιες περιπτώσεις παίζει καθοριστικό ρόλο στην παραγωγή του τελικού επιτόπου, ενώ σε άλλες περιπτώσεις τον καταστρέφει [58]. Επιπλέον διαπιστώθηκε ότι η ERAP1 δεν μπορεί να υδρολύσει το Ν-τελικό άκρο όταν το 2° αμινοξύ του πεπτιδίου είναι προλίνη. Αυτό το βασικό χαρακτηριστικό της συγκεκριμένης αμινοπεπτιδάσης είναι πιθανό να σχετίζεται με το γεγονός πολλά μόρια MHC Ι παρουσιάζουν πεπτίδια με το μοτίβο "X-Pro-X_n", όπου X ένα οποιοδήποτε αμινοξύ [58].

Η ERAP1 εμφανίζει μερικές ιδιότητες μοναδικές για μια αμινοπεπτιδάση. Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της είναι ότι, αν και εμφανίζει υψηλή εξειδίκευση για διπεπτικά υποστρώματα (υδρολύει με μεγαλύτερη ταχύτητα το L-AMC, με μικρότερη το M-AMC και δεν υδρολύει άλλα υποστρώματα της μορφής αμινοξύ-AMC), μπορεί να καταλύσει αποτελεσματικά την απομάκρυνση πολλών διαφορετικών αμινοξέων από το Ν-τελικό άκρο πολλών διαφορετικών προδρόμων πεπτιδίων εμφανίζοντας έτσι μια πιο ευρεία εξειδίκευση [57],[60],[61]. Επιπλέον, διαπιστώθηκε μπορεί να αποικοδομήσει υποστρώματα με το ίδιο Ν-τελικό άκρο με πολύ διαφορετικές ταχύτητες, υποδηλώνοντας ότι πιθανόν η ειδικότητά της δεν καθορίζεται μόνο από το Ν-τελικό άκρο αλλά και από άλλους παράγοντες όπως το μήκος και η αλληλουχία του πεπτιδίου [57],[59]. Οι ομάδες των Rock και Goldberg μελέτησαν την υδρόλυση διάφορων πρόδρομων αντιγονικών επιτόπων από την ERAP1 και διαπίστωσαν ότι η καταλυτική δραστικότητα της επηρεάζεται από το μήκος του υποστρώματος. Συγκεκριμένα, είδαν ότι το ERAP1 αποικοδομούσε με μεγαλύτερες ταχύτητες πεπτίδια μήκους 10-14 αμινοξέων μέχρι να φτάσουν σε μήκος 8-9 αμινοξέων ενώ δεν παρατηρήθηκε περαιτέρω αποικοδόμηση τους. Αντίστοιχα, τα 9μερή υποστρώματα είτε υδρολύονταν με πολύ χαμηλές ταχύτητες είτε πιο γρήγορα δίνοντας ως προϊόν μόνο το 8μερές αλλά όχι μικρότερα προϊόντα, ενώ τα 8μερή αποικοδομούνταν πολύ αργά. Από αυτά τα αποτελέσματα, κατέληξαν ότι η ERAP1 αποικοδομεί τα πρόδρομα πεπτίδια μέχρι να αποκτήσουν το κατάλληλο μήκος για να μπορέσουν να φορτωθούν στα MHC Ι. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η παραπάνω ιδιότητα αποτελεί ένα πρωτοφανές χαρακτηριστικό της συγκεκριμένης αμινοπεπτιδάσης γιατί καμία άλλη αμινοπεπτιδάση δεν παράγει πεπτίδια συγκεκριμένου μήκους. Μάλιστα, οι περισσότερες αποικοδομούν αποτελεσματικά μικρά πεπτίδια προς αμινοξέα [57],[59]. Οι Chang et al απέδειξαν ότι η ERAP1 αποικοδομεί πεπτίδια συγκεκριμένου μήκους 9-16 αμινοξέων και ότι η καταλυτική της δραστικότητα δεν εξαρτάται μόνο από τη φύση του Ν-τελικού άκρου αλλά και από αυτή του C-τελικού άκρου, καθώς υδρολύει ταχύτερα πεπτίδια με υδρόφοβο C-τελικό άκρο [62]. Τέλος, σε μελέτη που διεξάχθηκε για τις προτιμήσεις της ERAP1 ως προς τα πεπτιδικά υποστρώματα που καταβολίζει διαπιστώθηκε πως και η εσωτερική αλληλουχία του πρόδρομου πεπτιδίου επηρεάζει την καταλυτική της δράση [63].

Το 2003 η ομάδα του Tsujimoto κλωνοποίησε και χαρακτήρισε μια ακόμα αμινοπεπτιδάση, την L-RAP (leukocyte-derived arginine aminopeptidase) που ανήκει στην ίδια οικογένεια μεταλλοπρωτεασών ψευδαργύρου με την αμινοπεπτιδάση ERAP1. Η ίδια ερευνητική ομάδα παρατήρησε πως η αμινοπεπτιδάση L-RAP εντοπίζεται στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου και πως παρουσιάζει πολλά κοινά χαρακτηριστικά με την γνωστή για τον ρόλο της στην αντιγονοπαρουσίαση ERAP1. Συγκεκριμένα τα δύο

ένζυμα εμφανίζουν υψηλό βαθμό ομολογίας στην αμινοξική τους αλληλουχία, η έκφρασή τους επάγεται από την κυτοκίνη IFN-γ και υδρολύουν πρόδρομους αντιγονικούς επιτόπους σε ώριμους [64]. Από τη μελέτη των ενζυμικών ιδιοτήτων της διαπιστώθηκε ότι η ειδική δραστικότητα της L-RAP, ως προς την υδρόλυση συνθετικών διπεπτιδικών υποστρωμάτων, διαφέρει από αυτήν της ERAP1, καθώς η L-RAP εμφάνισε προτίμηση για φθορίζοντα διπεπτιδικά υποστρώματα με αργινίνη και λυσίνη στο N-τελικό άκρο τους (R-AMC ή K-AMC) σε αντίθεση με την ERAP1 που υδρολύει κυρίως το L-AMC [64]. Το ένζυμο L-RAP μετονομάστηκε σε ERAP2 από τους Saveanu et al [65].

To 2005 o Van Ender και οι συνεργάτες χρησιμοποίησαν ένα διαλυτό κλάσμα μικροσωμάτων από κύτταρα HeLa από το οποίο με χρωματογραφία ιονανταλλαγής απομόνωσαν δύο κορυφές με δραστικότητα αμινοπεπτιδάσης. Η πρώτη παρουσίαζε μέγιστη δραστικότητα υδρόλυσης ως προς το L-AMC, ενώ η δεύτερη ως προς το R-ΑΜC. Στη συνέχεια διαπιστώθηκε ότι οι δύο αμινοπεπτιδάσες συν-εντοπίζονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο καθώς και ότι ένα μικρό ποσοστό του κάθε ενζύμου είχε διπλάσιο μοριακό βάρος (περίπου 230kDa) από το αναμενόμενο (100-120kDa). Η ομάδα εξήγανε το συμπέρασμα ότι η παρουσία αυτής της πρωτεϊνικής ζώνης πιθανόν να οφείλεται στο σχηματισμό ενός ετεροδιμερούς των ERAP1/ERAP2 ή ενός ομοδιμερούς ή ακόμα στο σχηματισμό ενός συμπλέγματος των δύο ενζύμων με κάποια άγνωστη πρωτεΐνη. Τα πειράματα ανοσοπροσδιορισμού επιβεβαίωσαν τον σχηματισμό ετεροδιμερούς ERAP1/ERAP2 εντός του ενδοπλασματικού δικτύου [65]. Η ίδια ερευνητική ομάδα παρατήρησε ότι κάποιοι πρόδρομοι αντιγονικοί επίτοποι μπορούν να αποικοδομηθούν προς ώριμους μόνο παρουσία και των δύο αμινοπεπτιδασών, χαρακτηριστικό δε παράδειγμα αποτελεί η παραγωγή ώριμων αντιγονικών επιτόπων από πρόδρομους που διαθέτουν εκτεταμένα Ν-τελικά άκρα με υδρόφοβα ή βασικά αμινοξέα όπου απαιτείται η παρουσία τόσο της ERAP1 όσο και της ERAP2 [65].

Ο ρόλος της ERAP2 στην αντιγονοπαρουσίαση επιβεβαιώθηκε μέσω των πειραμάτων αποσιώπησης της, όπου απουσία της ERAP2 παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης των μορίων MHC Ι στην επιφάνεια των κυττάρων, όπως και στην περίπτωση της ERAP1. Επιπλέον, όταν έγινε αποσιώπηση και των δύο μαζί παρατηρήθηκε ακόμα μεγαλύτερη μείωση στην έκφραση των μορίων MHC Ι (περίπου διπλάσια). Τα παραπάνω αποτελέσματα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι παρόλο που η ERAP1 είναι η καθοριστική αμινοπεπτιδάση του ενδοπλασματικού δικτύου για την παραγωγή των ώριμων αντιγονικών επιτόπων οι οποίοι θα προσδεθούν στα μόρια MHC Ι δεν έχει την ικανότητα να υδρολύει κάποιους εκτεταμένους επίτοπους. Αυτές οι εξαιρέσεις μπορούν να καταβολιστούν από την ERAP2, δίνοντας της ένα δευτερεύοντα ή συμπληρωματικό ρόλο στο μονοπάτι αντιγονοπαρουσίασης τάξης Ι. Επιπλέον, ο σχηματισμός ετεροδιμερούς ERAP1/ERAP2, ο οποίος θα μπορούσε να επιτευχθεί με σύνδεση των καταλυτικών κέντρων των δύο ενζύμων ή με αλλοστερική τροποποίηση του ενός ή ακόμα και των δύο

καταλυτικών κέντρων, καθιστά δυνατή τη συνεργασία των δύο ενζύμων στην παραγωγή των ώριμων επιτόπων ενισχύοντας έτσι την άποψη ότι οι δύο αμινοπεπτιδάσες παίζουν συμπληρωματικό ρόλο η μία ως προς την άλλη, με την ERAP1 να παρουσιάζει ένα ευρύτερο πεδίο υδρολυτικής δραστικότητας των πρόδρομων επιτόπων σε σχέση με την ERAP2, ώστε οι δράσεις των δύο ενζύμων να μην αλληλεπικαλύπτονται αλλά να αλληλοσυμπληρώνονται. Ωστόσο, δεν έχει αποδειχθεί ότι είναι απαραίτητη η συγκρότηση τους σε σύμπλεγμα ώστε να δρούν συνεργιστικά [65].

Οι Chang et al παρατήρησαν πως, ενώ οι δύο αμινοπεπτιδάσες μοιράζονται πολλά κοινά χαρακτηριστικά, εμφανίζουν και σημαντικές διαφορές στην καταλυτική τους δραστικότητα. Πιο συγκεκριμένα διαπίστωσαν πως η ERAP2 εμφανίζει δραστικότητα υδρόλυσης πεπτιδικών υποστρωμάτων με μήκος μεγαλύτερο από εννιά αμινοξέα (9-16 αμινοξέα), όπως και η ERAP1, ταυτόχρονα όμως αποικοδομεί ταχύτατα και κάποια πεπτιδικά υποστρώματα μήκους 8-9 αμινοξέων, σε αντίθεση με την ERAP1, συμπεριλαμβανομένων και κάποιων επιτόπων (SIINFEKL και FAPGNYPAL) συμβάλλοντας έτσι στην καταστροφή κάποιων ώριμων επιτόπων. Επιπλέον, ενώ η ERAP1 καταβολίζει ταχύτερα πεπτίδια με υδρόφοβό C-τελικό άκρο, η ERAP2 πιθανόν να αποικοδομεί υποστρώματα με βασικές πλευρικές αλυσίδες στη συγκεκριμένη θέση [62].

Αξίζει να σημειωθεί ότι το ένζυμο ERAP2 εκφράζεται μόνο στους ανθρώπους και όχι στα ποντίκια. Για αυτό άλλωστε είναι η λιγότερο μελετημένη από τις τρεις αμινοπεπτιδάσες που παίζουν καθοριστικό ρόλο στην παράγωγη των ώριμων αντιγονικών επιτόπων. Η ERAP2 στα ποντίκια είναι πιθανόν να εξαλείφθηκε μέσω κάποιου ανασυνδυασμού. Η απουσία της ERAP2 στα ποντίκια είναι πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι οι περισσότεροι εκτεταμένοι επίτοποι που εισέρχονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο μέσω του μεταφορέα TAP στα ποντίκια δεν διαθέτουν στο Ν- τελικό τους άκρο αργινίνη και λυσίνη, αντίθετα ο ανθρώπινος μεταφορέας TAP εμφανίζει υψηλή συγγένεια για τέτοιους επίτοποι που εισέρχονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο αποτελούν υποστρώματα κυρίως για την ERAP1 [62].

4.4. Ο ρόλος της IRAP στην αντιγονοπαρουσίαση

Είναι γνωστό ότι ο ορός του ανθρώπινου πλακούντα και της μήτρας περιέχει αρκετές αμινοπεπτιδάσες που ρυθμίζουν την ενεργοποίηση πεπτιδικών ορμονών όπως η ωκυτοκίνη, η βαζοπρεσίνη και η αγγειοτενσίνη. Η αμινοπεπτιδάση του πλακούντα PLAP (Placental leucine aminopeptidase), γνωστή και ως CAP (αμινοπεπτιδάση κυστεΐνης), είναι ένα από τα ένζυμα που εκκρίνεται σε υψηλά επίπεδα από τον πλακούντα κατά τη διάρκεια της κύησης. Η PLAP απενεργοποιεί την ωκυτοκίνη, υδρολύοντας τον πεπτιδικό δεσμό μεταξύ της αμινο-τελικής κυστεΐνης και του παρακείμενου καταλοίπου τυροσίνης,
συμβάλλοντας έτσι στη διατήρηση των επιπέδων της κατά τη διάρκεια της κύησης. Επιπλέον, αποικοδομεί τη βαζοπρεσίνη και την αγγειοτενσίνη ΙΙΙ και παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της συγκέντρωσης πεπτιδίων που συνδέονται με τις συσπάσεις της μήτρας [66].

Οι Rogi et al κλωνοποίησαν το cDNA της PLAP και κατέταξαν το ένζυμο στην οικογένεια των μεταλλοπρωτεασών ψευδαργύρου. Επιπλέον, ανίχνευσαν με αποτύπωση Nothern δύο μορφές μεταγραφημάτων που κωδικοποιούν την PLAP. Οι δύο μορφές mRNA πιθανολογείται πως προέρχονται από εναλλακτικό μάτισμα και ίσως να κωδικοποιούν τις δύο μορφές PLAP, τη μεμβρανική και διαλυτή μορφή [67].

Η PLAP είναι το ανθρώπινο ομόλογο ένζυμο της IRAP (αμινοπεπτιδάση που ρυθμίζεται από την ινσουλίνη) στους αρουραίους. Ενώ η PLAP αρχικά απομονώθηκε ως διαλυτή πρωτεΐνη, η IRAP αρχικά προσδιορίστηκε ως μια μεμβρανική πρωτεΐνη που συνεντοπίζεται με τον μεταφορέα γλυκόζης GLUT4 σε ενδοκυτταρικά κυστίδια. Ο μεταφορέας GLUT4 εκφράζεται σε μυϊκά κύτταρα και λιποκύτταρα όπου καταλύει τη μεταφορά γλυκόζης, όταν τα επίπεδα της ινσουλίνης στο αίμα είναι υψηλά, προκειμένου να διατηρηθεί η ομοιόσταση της γλυκόζης. Παρουσία ινσουλίνης, τα κύτταρα διεγείρονται και επάγεται η μεταφορά των GLUT4 και IRAP από τα ενδοκυτταρικά κυστίδια στην επιφάνεια του κυττάρου. Κατά τη μεταφορά της IRAP στην πλασματική μεμβράνη του κυττάρου πιστεύεται πως η αμινοπεπτιδάση έρχεται σε επαφή με πεπτιδικές ορμόνες και τις καταβολίζει ρυθμίζοντας τα επίπεδά τους [68]. Τελικά αποδείχθηκε πως η PLAP και η IRAP είναι η ίδια πρωτεΐνη με ποικίλες παθοφυσιολογικές λειτουργίες [66].

Η IRAP/PLAP εκφράζεται σε διάφορους ιστούς στον άνθρωπο όπως στον πλακούντα, στην καρδιά, στο λεπτό έντερο και τους νεφρούς, ενώ χαμηλότερη έκφραση της έχει παρατηρηθεί στον εγκέφαλο, τους σκελετικούς μύες, το ήπαρ και το λάρυγγα [66]. Σε κάποιους ιστούς (πλακούντα, καρδιά και σκελετικούς μύες) ανιχνεύθηκαν και οι δύο μορφές mRNA, ενώ σε άλλους (σπλήνα, κόλον και λεπτό έντερο) ανιχνεύθηκε μόνο η μια, αυτή με το μεγαλύτερο αριθμό αμινοξέων. Με βάση αυτή την παρατήρηση είναι πιθανόν η έκφραση των δύο μορφών mRNA που κωδικοποιούν την IRAP/ PLAP να ρυθμίζεται ιστο-εκλεκτικά [67].

Ο ρόλος της IRAP στην αντιγονοπαρουσίαση άρχισε να διαφαίνεται λόγω της υψηλής ομολογία της με τις αμινοπεπτιδάσες ERAP1 και ERAP2, καθώς και τα κοινά χαρακτηριστικά τους. Οι Saveanu et al απέδειξαν τη συμμετοχή της IRAP στο μονοπάτι της διασταυρούμενης αντιγονοπαρουσίασης και συγκεκριμένα στον καταβολισμό πρόδρομων επιτόπων που έχουν περιέλθει στο εσωτερικό του κυττάρου μετά από φαγοκύτωση. Στα ανθρώπινα δενδριτικά κύτταρα η IRAP εντοπίστηκε στο ενδόσωμα Rab14⁺ όπου αλληλεπιδρά με τα μόρια MHC I. Η ομάδα του Van Ender ανακάλυψε την IRAP σε μια προσπάθεια χαρακτηρισμού των αμινοπεπτιδασών που εμπλέκονται στην αποικοδόμηση ενός συγκεκριμένου αντιγονικού επιτόπου ο οποίος προσδένεται στα

μόρια MHC I. Η ομάδα αρχικά αφού απομόνωσε το ένζυμο από τα μικροσώματα με χρωματογραφία ιονανταλλαγής, διαπίστωσε πως η κορυφή που απομονώθηκε εμφάνιζε δραστικότητα για το φθορίζον υπόστρωμα L-AMC, αν και όπως παρατήρησαν εμφάνιζε μια πιο ευρεία εξειδίκευση ως προς τα φθορίζοντα υποστρώματα από ότι οι αμινοπεπτιδάσες του ενδοπλασματικού δικτύου (εικόνα 5) [46].



Εικόνα 5: Σχετική δραστικότητα εκφρασμένη σε % ποσοστό υδρόλυσης των φθοριζόντων υποστρωμάτων X-AMC (όπου X ένα οποιοδήποτε αμινοξύ) από τις ανθρώπινες ανασυνδιασμένες IRAP, ERAP1 και ERAP2 [46]

Στη συνέχεια, διαπιστώθηκε πως η IRAP είχε την ικανότητα να αποικοδομεί επιτυχώς έναν εκτεταμένο πρόδρομο αντιγονικό επίτοπο μήκους 15 αμινοξέων προς παραγωγή του ώριμου επιτόπου μήκους 9 αμινοξέων ο οποίος για να παραχθεί στο ενδοπλασματικό δίκτυο απαιτείται οι ERAP1 και ERAP2 να δράσουν συνεργιστικά. Επιπλέον παρατήρησαν πως τα επίπεδα έκφρασης της διπλασιάστηκαν παρουσία ιντερφερόνης-γ (IFN-γ) [46].

Η IRAP φαίνεται να δρα σε ένα ενδοκυτταρικό κυστίδιο το οποίο σχηματίζεται μετά την φαγοκύτωση του εξωγενούς αντιγόνου εντός των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (κυρίως των δενδριτικών) στο οποίο εντοπίστηκαν οι Rab14 πρωτεΐνες (χαμηλού μοριακού βάρους GTPάσες που συμμετέχουν στην διαμεμβρανική μεταφορά) οι οποίες πιθανόν να αποτρέπουν την σύντηξη του φαγοσώματος με λυσοσώματα. Κατά τη διάρκεια της φαγοκύτωσης διαπιστώθηκε η παρουσία της IRAP στα πρώιμα αλλά όχι στα ώριμα φαγοσώματα όπου συνεντοπίζεται με μόρια MHC Ι που έχουν ενδοκυτωθεί από την πλασματική μεμβράνη σε κυστίδια γειτονικά των φαγοσωμάτων ή στη μεμβράνη των φαγοσωμάτων, ενώ παράλληλα δεν διαπιστώθηκε ο συνεντοπισμός της με ενδόλυσοσωμικές πρωτεΐνες, όπως τα μόρια MHC ΙΙ ή της Lamp-1. Ωστόσο δεν προσδιορίστηκε η παρουσία των ενδοκυτωμένων μορίων MHC Ι στα ώριμα

φαγοσώματα καθώς και ο συνεντοπισμός τους με τις ERAP. Ενώ, τέλος, διαπιστώθηκε η παρουσία του μεταφορέα TAP στο ενδοκυτταρικό κυστίδιο της IRAP αλλά όχι άλλων πρωτεϊνών του ER (endoplasmic reticulum) που συμμετέχουν στο ενδογενές μονοπάτι της αντιγονοπαρουσίασης τάξης Ι, όπως της ERAP1, της Sec61 [46].

Η ίδια ερευνητική ομάδα πραγματοποίησε πειράματα αποσιώπησης της IRAP στα διαπιστωθεί ο πιθανός δενδριτικά κύτταρα ώστε να ρόλος της στην αντιγονοπαρουσίαση. Από τα πειράματα αυτά προέκυψε ότι η απουσία της ΙRAP δεν είχε επίπτωση στην παραγωγή ενδογενών αντιγονικών επιτόπων, αποδεικνύοντας ότι είναι μια εξαρτώμενη από το πρωτεάσωμα και τις ERAP διαδικασία και αποκλείοντας έτσι την ενδεχόμενη συμμετοχή της IRAP στο ενδογενές ΜΗC Ι μονοπάτι. Η αποσιώπηση όμως της IRAP επηρέασε την παρουσίαση ενός συγκεκριμένου εξωγενούς επιτόπου από τα DG κύτταρα καθώς παρατηρήθηκε μείωση στα επίπεδα έκφρασης του κατά 50% με 70% στην επιφάνεια του κυττάρου [46]. Αντίστοιχη επίδραση είχε και η αποσιώπηση των ERAP στην παρουσίαση του συγκεκριμένου επιτόπου μέσω του μονοπατιού της διασταυρούμενης αντιγονοπαρουσίασης. Το αποτέλεσμα αυτό οδήγησε στο συμπέρασμα ότι τόσο οι ERAP όσο και η IRAP συμμετέχουν στην διασταυρούμενη αντιγονοπαρουσίαση. Τέλος, η απουσία τόσο της IRAP όσο και των ERAP μείωσε ακόμα περισσότερο την έκφραση των συμπλόκων ΜΗC Ι-πεπτιδίων που παρουσιάζονται στην πλασματική μεμβράνη, υποδηλώνοντας ότι τα ένζυμα αυτά εμπλέκονται σε δύο ανεξάρτητα μονοπάτια της διασταυρούμενης αντιγονοπαρουσίασης. Η ομάδα οδηγήθηκε στο συμπέρασμα ότι η ΙRAP παίζει σημαντικό ρόλο στον καταβολισμό των εξωγενών πρόδρομων αντιγονικών επιτόπων προς ώριμους, ώστε να προσδεθούν στα μόρια MHC Ι και ότι δρα σε ενδοκυτταρικά κυστίδια [46].

Σε μελέτη που έγινε από τους Georgiadou et al διαπιστώθηκε ότι η IRAP όπως και η ERAP1 καταβολίζει πεπτίδια με μήκος μεγαλύτερο από 9 αμινοξέα, μια ιδιότητα που εμφανίζει και η ERAP2 και είναι καθοριστική για την παραγωγή ώριμων επιτόπων από εκτεταμένους προδρόμους. Επιπλέον φάνηκε πως η υδρολυτική δράση της IRAP αυξάνεται ή μειώνεται ανάλογα με το μήκος και το C-τελικό άκρο του πεπτιδικού υποστρώματος. Συνεπώς, η ειδική δραστικότητα της, σε αντιστοιχία με της ERAP1, επηρεάζεται από την αλληλουχία του προς καταβολισμού πεπτιδίου, εμφανίζοντας όμως διαφορετικές προτιμήσεις ως προς τις πλευρικές ομάδες στην αλληλουχία του πεπτιδικού υποστρώματος. Ενώ διαπιστώθηκε πως οι ERAP1 και IRAP ακολουθούν ένα διαφορετικό πρότυπο στην ικανότητα τους να παράγουν ή να καταστρέφουν αντιγονικούς επιτόπους υποδηλώνοντας διαφορές στην εκλεκτικότητα μεταξύ των δύο ομόλογων ενζύμων.

Η IRAP φαίνεται να συγκεντρώνει τα βασικά χαρακτηριστικά που απαιτούνται για τη συμμετοχή της στην ενδοκυτταρική παραγωγή αντιγονικών επιτόπων, αλλά φαίνεται να

είναι ελαφρώς καταλληλότερη για την καταστροφή παρά την παραγωγή ώριμων επιτόπων [69].

4.5. Οικογένεια αμινοπεπτιδασών Μ1

Οι ERAP1 και ERAP2 είναι μονομερείς, διαλυτές αμινοπεπτιδάσες ψευδαργύρου 100-110kDa που ανήκουν στην οικογένεια μεταλλοπεπτιδασών M1 [70]. Στα θηλαστικά η οικογένεια αμινοπεπτιδασών M1 περιλαμβάνει εννιά διαφορετικές πρωτεΐνες, πέντε από τις οποίες είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες [71]. Οι αμινοπεπτιδάσες ERAP1 και ERAP2 μαζί με την αμινοπεπτιδάση IRAP/PLAP αποτελούν την υποοικογένεια ωκυτοκινασών των M1 αμινοπεπτιδασών (εικόνα 6) [66]. Οι τρεις αμινοπεπτιδάσες της υποοικογένειας ωκυτοκινασών διαθέτουν το μοτίβο HEXXH(X)₁₈E πρόσδεσης ψευδαργύρου και το μοτίβο εξωπεπτιδάσης GAMEN που είναι απαραίτητα για την καταλυτική δράση των ενζύμων αυτών [72]. Ένα μοναδικό ιόν ψευδαργύρου δεσμεύεται στις δύο ιστιδίνες, ενώ το δεύτερο γλουταμινικό του μοτίβου HEXXH(X)₁₈E είναι απαραίτητο για την κατάλυση, πιθανόν μέσω ενός μηχανισμού όμοιου με της θερμολυσίνης και το πρώτο γλουταμινικό δρα ως βάση ενώ μια συντηρημένη τυροσίνη ως δότης πρωτονίων.



Εικόνα 6: Φυλογενετική ανάλυση των μελών της οικογένειας αμινοπεπτιδασών M1 [66]

Η ανθρώπινη IRAP/PLAP είναι μια μεμβρανική τύπου ΙΙ πρωτεΐνη με τρεις δομικές περιοχές: μια αμινο-τελική κυτταροπλασματική δομική περιοχή 109 αμινοξέων, μια διαμεμβρανική 23 αμινοξέων και μια εξωκυτταρική δομική περιοχή 893 αμινοξέων. Η IRAP/PLAP διαφοροποιείται από τις άλλες δύο αμινοπεπτιδάσες εξαιτίας της συγκριτικά μακριάς κυτοπλασματικής περιοχής της. Στην Ν-τελική περιοχή της, η IRAP/PLAP περιλαμβάνει μοτίβα που την καθιστούν ικανή να διανέμεται μέσα σε κυστίδια και να μετατοπίζεται αποκρινόμενη σε κάποιο ερέθισμα (εικόνα 7). Η μακριά εξωκυτταρική της περιοχή περιέχει τα μοτίβα HEXXH(X)₁₈E (πρόσδεσης ψευδαργύρου) και GAMEN [66].



Εικόνα 7: Σχηματική αναπαράσταση της υποοικογένειας ωκυτοκινασών των αμινοπεπτιδασών Μ1 [66]

Οι ERAP1/A-LAP και ERAP2/L-RAP είναι διαλυτές πρωτεΐνες ωστόσο διαθέτουν μια σημαντική υδρόφοβη περιοχή (αμινοξέα 5-27) κοντά στο Ν-τελικό άκρο τους, όπως και η ΙRAP. Η αλληλουχία που πιθανώς να είναι υπεύθυνη για τη συγκράτηση τους στο ενδοπλασματικό δίκτυο εντοπίζεται στο μέσο της αλληλουχίας των μορίων (εικόνα 7). Η συγκεκριμένη αλληλουχία κωδικοποιείται από το εξώνιο 11 στα γονίδια των ERAP1 και ERAP2, το οποίο όμως απουσιάζει από γονίδιο της IRAP και στην οποία αποδίδεται ο διαφορετικός ενδοκυτταρικός εντοπισμός τους [66]. Οι ERAP1 και ERAP2 διαθέτουν τρεις δομικές περιοχές η κάθε μια: μια Ν-τελική δομική περιοχή 9 και 14 αμινοξέων αντίστοιχα, μια υδρόφοβη 22 αμινοξέων και μια C-τελική δομική περιοχή 930 και 924 αμινοξέων αντίστοιχα [64],[73]. Στην C-τελική δομική περιοχή τους, όπως και στην περίπτωση της IRAP, εντοπίζονται τα μοτίβα HEXXH(X)₁₈E (πρόσδεσης ψευδαργύρου) και GAMEN τα οποία και στις τρεις κωδικοποιούνται από τα εξώνια 6 και 7 των γονιδίων τους [66]. Τα ανθρώπινα γονίδια των αμινοπεπτιδασών της οικογένειας ωκυτοκινασών είναι παρακείμενα στο χρωμόσωμα 5q15. Η γειτνίαση αυτή των γονιδίων μπορεί να σηματοδοτεί την εξελικτική διαφοροποίησή τους από ένα κοινό προγονικό γονίδιο [64],[66].

Οι τρεις αμινοπεπτιδάσες παρουσιάζουν υψηλό βαθμό ομολογίας μεταξύ τους, όπως παρατηρείται από την ευθυγράμμιση των αμινοξικών τους αλληλουχιών (εικόνα 8). Συγκεκριμένα, οι ανθρώπινες ERAP1 και ERAP2 εμφανίζουν μεταξύ τους 51% ομοιότητα στην αλληλουχία τους, ενώ η IRAP παρουσιάζει ομοιότητα αλληλουχίας σε ποσοστό 43% με την ERAP1 και 49% με την ERAP2 [66].

IRAP MEPFTNDRLQLPRNMIENSMFEEEPDVVDLAKEPCLHPLEPDEVEYEPRGSRLLVRGLGE 60 ERAP1 MVFLPLKWSLAT 12 ERAP2 MFHSSAMVNSHRKPMFNIHRGFYC 24 IRAP HEMEEDEEDYESSAKLLGMSFMNRSSGLRNSATGYRQSPDGACSVPSARTMVVCAFVIVV 120 MSFLLSSLLALLTVSTPS---WCQSTEA---SPKRSDGTPFPWNKIRLPEYVIPVHYDLL 66 LTAILPQICICSQFSVPSSYHFTEDPGA---FPVATNGERFPWQELRLPSVVIPLHYDLF 81 ERAP1 ERAP2 AVSVIMVIYLLPRCTFTKEGCHKKNQSIGLIQPFATNGKLFPWAQIRLPTAVVPLRYELS 180 IRAP *:*:: ::* ERAP1 IHANLTTLTFWGTTKVEITASQPTSTIILHSHHLQISRATLRKGAGERLSE--EPLQVLE 124 ERAP2 VHPNLTSLDFVASEKIEVLVSNATQFIILHSKDLEITNATLQSEEDSRYMKPGKELKVLS 141 LHPNLTSMTFRGSVTISVQALQVTWNIILHSTGHNISRVTFMSA----VSSQEKQAEILE IRAP 236 ERAP1 HPRQEQIALLAPEPLLVGLPYTVVIHYAGNLSETF<mark>H</mark>GFYKSTYRTKEGELRILAST<mark>Q</mark>FEP 184 ERAP2 YPAHEQIALLVPEKLTPHLKYYVAMDFQAKLGDGFEGFYKSTYRTLGGETRILAVTDFEP 201 YAYHGQIAIVAPEALLAGHNYTLKIEYSANISSSYYGFYGFSYTDESNEKKYFAATQFEP TRAP 296 ERAP1 TAARMAFPCFDEPAFKASFSIKIRREPRHLAISNMPLVKSVTVAEGLIEDHFDVTVKMST 244 ERAP2 TOARMAFPCFDEPLFKANFSIKIRRESRHIALSNMPKVKTIELEGGLLEDHFETTVKMST 261 LAARSAFPCFDEPAFKATFIIKIIRDEQYTALSNMPKKSSVVLDDGLVQDEFSESVKMST IRAP 356 * * *: :: *:**** **::*.*. : .:: : ERAP1 YLVAFIISDFESVSKITKSGVKVSVYAVPDKINQADYALDAAVTLLEFYEDYFSIPYPLP 304 FRAP2 YLVAYIVCDFHSLSGFTSSGVKVSIYASPDKRNQTHYALQASLKLLDFYEKYFDIYYPLS 321 YLVAFIVGEMKNLSQDVN-GTLVSIYAVPEKIGQVHYALETTVKLLEFFQNYFEIQYPLK IRAP 415 ERAP1 KQDLAAIPDFQSGAMENWGLTTYRESALLFDAEKSSASSKLGITMTVAHELAHQWFGNLV 364 ERAP2 KLDLIAIPDFAPGAMENWGLITYRETSLLFDPKTSSASDKLWVTRVIAHELAHQWFGNLV 381 KLDLVAIPDFEAGAMENWGLLTFREETLLYDSNTSSMADRKLVTKIIAHELAHQWFGNLV IRAP 475 :**:*.:.** :.: : * ERAP1 TMEWWNDLWLNEGFAKFMEFVSVSVTHPELKVGDYFFGKCFDAMEVDALNSSHPVSTPVE 424 TMEWWNDIWLKEGFAKYMELIAVNATYPELQFDDYFLNVCFEVITKDSLNSSRPISKPAE ERAP2 441 IRAP TMKWWNDLWLNEGFATFMEYFSLEKIFKELSSYEDFLDARFKTMKKDSLNSSHPISSSV0 535 :****.:** . **. : *:. *..: * . * * * * . * . * : : . ERAP1 NPAQIREMFDDVSYDKGACILNMLREYLSADAFKSGIVQYLQKHSYKNTKNEDLWDSMAS 484 ERAP2 TPTQIQEMFDEVSYNKGACILNMLKDFLGEEKFQKGIIQYLKKFSYRNAKNDDLWSSLSN 501 TRAP SSEQIEEMFDSLSYFKGSSLLLMLKTYLSEDVFQHAVVLYLHNHSYASIQSDDLWDSFNE 595 . **.:** **:.:* **: :*. : *: .:: **::.** . :.:***.*: ERAP1 ICP----TDGVKGMDGFCSRSQHSSSSSHWHQEGVDVKTMMNTWTLQKGFPLITITVRG 539 ERAP2 SCLESDFTSGGVCHSDPKMTSNMLAFLG-----ENAEVKEMMTTWTLQKGIPLLVVKQDG 556 IRAP VTN-----QTLDVKRMMKTWTLQKGFPLVTVQKKG 625 ** ** ERAP1 RNVHMKQEHYMKGSDG-----APDTGYLWHVPLTFITSK---SDMVHRFLLKTKTDVLI 590 ERAP2 CSLRLQQERFLQGVFQEDPEWRALQERYLWHIPLTYSTSS---SNVIHRHILKSKTDTLD 613 KELFIQQERFFLN---MKPEIQPSDTSYLWHIPLSYVTEGRNYSKYQSVSLLDKKSGVIN IRAP 682 *. .: ::**::: . ERAP1 LPEEVEWIKFNVGMNGYYIVHYEDDGWDSLTGLLKGTHTAVSSNDRASLINNAFQLVSIG 650 ERAP2 LPEKTSWVKFNVDSNGYYIVHYEGHGWDQLITQLNQNHTLLRPKDRVGLIHDVFQLVGAG 673 LTEEVLWVKVNINMNGYYIVHYADDDWEALIHQLKINPYVLSDKDRANLINNIFELAGLG 742 IRAP ERAP1 KLSIEKALDLSLYLKHETEIMPVFQGLNELIPMYKLMEKRDMNEVETQFKAFLIRLLRDL 710 ERAP2 RLTLDKALDMTYYLOHETSSPALLEGLSYLESFYHMMDRRNISDISENLKRYLLOYFKPV 733 TRAP KVPLKRAFDLINYLGNENHTAPITEALFQTDLIYNLLEKLGYMDLASRLVTRVFKLLQNQ 802 ** :*. :*::::: . . : .: :.' :: ::: :: ERAP1 IDKQTWTDEGSVSERMLRSQLLLLACVHNYQPCVQRAEGYFRKWKESNGNLSLPVDVTLA 770 ERAP2 IDRQSWSDKGSVWDRMLRSALLKLACDLNHAPCIQKAAELFSQWMESSGKLNIPTDVLKI 793 IQQQTWTDEGTPSMRELRSALLEFACTHNLGNCSTTAMKLFDDWMASNGTQSLPTDVMTT 862 IRAP :** :*:*:*: . * *.*. .:*. ERAP1 VFAVGAQSTEGWDFLYSKYQFSLSSTEKSQIEFALCRTQNKEKLQWLLDESFKGDKIKTQ 830 ERAP2 VYSVGAQTTAGWNYLLEQYELSMSSAEQNKILYALSTSKHQEKLLKLIELGMEGKVIKTQ 853 VFKVGAKTDKGWSFLLGKYISIGSEAEKNKILEALASSEDVRKLYWLMKSSLNGDNFRTQ IRAP 922 ERAP1 EFPQILTLIGRNPVGYPLAWQFLRKNWNKLVQK<mark>FE</mark>LG<mark>S</mark>SSIAHMVMGTTNQFSTRTRLEE 890 ERAP2 NLAALLHAIARRPKGQQLAWDFVRENWTHLLKKFDLGSYDIRMIISGTTAHFSSKDKLQE 913 KLSFIIRTVGRHFPGHLLAWDFVKENWNKLVQKFPLGSYTIQNIVAGSTYLFSTKTHLSE IRAP 982 **:: :* ERAP1 VKGFFSSLKENGSQLRCVQQTIETIEENIGWMDKNFDKIRVWLQSEKLERM 941 ERAP2 VKLFFESLEAQGSHLDIFQTVLETITKNIKWLEKNLPTLRTWLMVNT 960 VQAFFENQSEATFRLRCVQEALEVIQLNIQWMEKNLKSLTWWL IRAP 1025 **.. .

Εικόνα 8: Ευθυγράμμιση αλληλουχίας των ομόλογων αμινοπεπτιδασών ERAP1, ERAP2 και IRAP. * - εντελώς

συντηρημένο αμινοξύ, : - συντήρηση δυνατών ομάδων, . – συντήρηση αδύναμων ομάδων,

GAMEN μοτίβο, μοτίβο πρόδσεσης ψευδαργύρου. Η ευθυγράμμιση έγινε με το πρόγραμμα VectorNTI, με τον αλγόριθμο ClustalX.

4.5.1 Καταλυτικός μηχανισμός

Οι ΕRAP1 και ERAP2 εμφανίζουν ομολογία σε ποσοστό 24% και 16% αντίστοιχα με την A4 υδρολάση των λευκοτριενίων (LTA4H) ένα ακόμα μέλος της οικογένεια μεταλλοπεπτιδασών M1. Οι Blomster et al πρότειναν ένα μηχανισμό για την υδρόλυση του πεπτιδικού δεσμού από την αμινοπεπτιδάση LTA4H, μια αντίδραση που καταλύεται από ένα ιόν ψευδαργύρου που βρίσκεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Έχει παρατηρηθεί ότι τα αμινοξέα που απαρτίζουν τα ενεργά κέντρα της LTA4H και των ERAP1 και ERAP2 είναι συντηρημένα και μπορεί να γίνει η υπόθεση ότι δρούν μέσω ενός παρόμοιου μηχανισμού. Σύμφωνα με το μοντέλο που προτάθηκε από τους Blomster et al, το ιόν ψευδαργύρου δεσμεύεται από τις δύο ιστιδίνες και το ένα γλουταμινικό οξύ του μοτίβου HEXXH(X)₁₈E (His353, His357 και Glu376). Στη συνέχεια, ακολουθεί πυρηνόφιλη προσβολή του πεπτιδικού δεσμού από ένα μόριο νερού, το οποίο πολώνεται από το καρβοξύλιο του γλουταμικού (Glu354) και το ιόν ψευδαργύρου, ενώ η Tyr438 δρα ως δότης πρωτονίων παρέχοντας το στο άζωτο του πεπτιδικού δεσμού ώστε να επιτευχθεί η υδρόλυση του (εικόνα 9) [74].





4.5.2 Κρυσταλλική δομή των ERAP1 και ERAP2

Πρόσφατα λύθηκαν οι κρυσταλλικές δομές της ανθρώπινης ERAP1 από τους Nguyen et al και Kochan et al καθώς και της ανθρώπινης ERAP2 από τους Birtley et al μέσω κρυσταλλογραφίας ακτινών Χ. Οι Nguyen et al συν-κρυστάλλωσαν την ERAP1 με έναν αναστολέα αμινοπεπτιδασών, την μπεστατίνη, σε μια ανοιχτή διαμόρφωση, ενώ οι Kochan et al σε μια κλειστή διαμόρφωση [75],[76]. Η ERAP2 κρυσταλλώθηκε ως ομοδιμερές, στο οποίο τα δύο μονομερή ήταν συνδεδεμένα μέσω των Ν-τελικών τους δομικών περιοχών, οι δομικές όμως περιοχές κάθε μονομερούς είχαν παρόμοια οργάνωση με την κλειστή διαμόρφωση της ERAP1 [77].

Με βάση την κρυσταλλική δομή που προτάθηκε από τις δύο ερευνητικές ομάδες, η ERAP1 αποτελείται από 4 δομικές περιοχές (I-IV) με μια εκτεταμένη κοιλότητα μεταξύ των δομικών περιοχών ΙΙ και ΙV, στην οποία αποδίδεται η ικανότητα της να αποικοδομεί πεπτιδικά υποστρώματα μεγαλύτερου μεγέθους σε σχέση με τις τυπικές αμινοπεπτιδάσες (εικόνα 10). Η δεύτερη δομική περιοχή (ΙΙ) αποτελεί το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου καθώς σε αυτή εντοπίστηκαν το ιόν ψευδαργύρου και τα μοτίβα GAMEN και HEXXH(X)₁₈Ε σε μια αναδίπλωση α/β θερμολυσίνης. Η δομική περιοχή Ι αποτελείται αποκλειστικά και μόνο από β-φύλλα και εντοπίζεται στην κορυφή της δομικής περιοχής θερμολυσίνης (δομική περιοχή ΙΙ) καλύπτοντας το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου και παρέχει τις περιοχές δέσμευσης των Ν-τελικών άκρων των πεπτιδικών υποστρωμάτων. Η τρίτη δομική περιοχή είναι ένα μικρό β-φύλλο μεταξύ των περιοχών ΙΙ και ΙV. Τέλος η δομική περιοχή IV αποτελείται από 16 α-έλικες διαφορετικού μεγέθους διατεταγμένες ως οκτώ αντι-παράλληλες armadillo ή ΗΕΑΤ επαναλήψεις και αποτελεί το C-τελικό άκρο του ενζύμου. Η δομή της ERAP1 φαίνεται να είναι πιο ανοιχτή σε σχέση με τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας Μ1, λόγω του προσανατολισμού της C-τελικής δομικής περιοχή της σε σχέση με το υπόλοιπο μόριο [75].[76]. Όμοια, κάθε μονομερές της ERAP2 αποτελείται από 4 δομικές περιοχές (Ι-ΙV) αντίστοιχης οργάνωσης, με την δομική περιοχή IV να αλληλεπιδρά με ένα εκτεταμένο τμήμα της περιοχής ΙΙ σχηματίζοντας μια μεγάλη κοιλότητα η οποία περιέχει αρκετά μόρια νερού ικανή να προσδέσει μακριά πεπτιδικά υποστρώματα, σε συμφωνία με το βιολογικό ρόλο της ERAP2 στην αποικοδόμηση εκτεταμένων αντιγονικών επιτόπων προς ώριμους, όπως άλλωστε και η ERAP1 (εικόνα 10) [77].



Εικόνα 10: (Α) Αναπαράσταση των δομικών περιοχών της ERAP1 υπό μορφή διαγράμματος "κορδέλας" χρωματισμένες με διαφορετικά χρώματα ανά περιοχή. Οι διακεκομμένες γραμμές στην δομική περιοχή ΙV αναπαριστούν τις θηλιές με μη συγκεκριμένο προσανατολισμό [75] (Β) Αναπαράσταση των δομικών περιοχών της ERAP2 υπό μορφή διαγράμματος"κορδέλας" χρωματισμένες με διαφορετικά χρώματα ανά περιοχή [77]

Στη κλειστή δομή που προτάθηκε για την ERAP1 η κοιλότητα δέσμευσης πεπτιδίου διατηρεί το εκτεταμένο μέγεθος της, ικανή να δεχθεί πεπτιδικά υποστρώματα μήκους 12-14 αμινοξέων, αλλά δεν έχει πλέον άμεση πρόσβαση με το εξωτερικό διάλυμα καθώς έχει καλυφθεί ύστερα από μετακίνηση των ελίκων 18-24 της C-τελικής δομικής περιοχής της. Επιπλέον στη κλειστή δομή η Tyr438 έχει προσανατολιστεί με περιστροφή της έλικας H5 κατά 30-40° προς την ενεργή περιοχή του ενζύμου ώστε να λάβει μέρος στην υδρόλυση του πεπτιδικού δεσμού. Όλες οι παραπάνω αλλαγές στη διαμόρφωση έχουν σαν αποτέλεσμα την αύξηση της καταλυτικής δραστικότητας της ERAP1 [75],[76]. Το γεγονός ότι η κοιλότητα δέσμευσης πεπτιδίου στην δομή που προτάθηκε για την ERAP2 δεν έχει άμεση πρόσβαση προς το εξωτερικό διάλυμα υποδηλώνει ότι το ένζυμο είναι πιθανό να υφίσταται παρόμοιες αλλαγές με της ERAP1 στη διαμόρφωση του ώστε να καθίσταται δυνατή η δέσμευση του υποστρώματος και η απελευθέρωση του προϊόντος από αυτό [77]. Συνολικά για την ERAP1 προτάθηκαν τρείς δομές: μια κλειστή και οι δύο ανοιχτές (εικόνα 11).



Εικόνα 11: Αναπαράσταση των τριών δομών της ERAP1, η κλειστή (Α) και οι δύο ανοιχτές (Β και C) υπό μορφή διαγράμματος "κορδέλας" χρωματισμένες με διαφορετικά χρώματα ανά περιοχή με εμφανείς τις διαφορές στην τοποθεσία της δομικής περιοχή ΙV [77]

Ωστόσο σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ενζύμων όπως προέκυψαν από τις κρυσταλλικές δομές, παρατηρούνται στους διάφορους θύλακες ειδικότητας (S θύλακες). Ο κυρίως θύλακας ειδικότητας (θύλακας S1, η περιοχή του ενεργού κέντρου του ενζύμου στην οποία δεσμεύεται η πλευρική ομάδα του αμινοξέος που βρίσκεται στο Ν-τελικό άκρο του πεπτιδικού υποστρώματος, ενώ οι ακόλουθοι θύλακες ειδικότητας ονομάζονται S1', S2' κ.λ.π) των δύο ενζύμων διαφοροποιείται λόγω της παρουσίας συγκεκριμένων αμινοξέων σε συγκεκριμένες θέσεις. Το Asp198 στην ERAP2 φαίνεται να είναι καθοριστικό για τη δραστικότητα της έναντι υποστρωμάτων με θετικά φορτισμένα Ντελικά άκρα όπως αποδείχθηκε και με κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση του σε γλουταμίνη. Το αντίστοιχο αμινοξύ της ERAP1 στη συγκεκριμένη θέση είναι GIn181 και σε αυτό αποδίδεται η ειδική δραστικότητα της έναντι υποστρωμάτων με υδρόφοβα Ντελικά άκρα. Επιπρόσθετες διαφορές μεταξύ ERAP1 και ERAP2 παρατηρήθηκαν και σε άλλα αμινοξέα που συγκροτούν την είσοδο του συγκεκριμένου θύλακα (His160 και Arg430 στην ERAP1 ενώ Glu177 και Gln447 στην ERAP2) με αποτέλεσμα τη μεταβολή του ηλεκτροστατικού δυναμικού του S1 θύλακα μεταξύ των δύο ενζύμων (πιο όξινος στην ERAP2 σε αντίθεση με της ERAP1 που είναι υδρόφοβος) (εικόνα 12) [77].Οι κρυσταλλικές δομές των δύο ενζύμων επιβεβαίωσαν την παρουσία μιας κοιλότητας δέσμευσης πεπτιδίων η οποία αποτελείται από ρηχούς ή βαθύτερους θύλακες, οι οποίοι λειτουργούν ως θύλακες ειδικότητας με διαφορετική κατανομή ηλεκτροστατικού δυναμικού σε κάθε θύλακα (εικόνα 13). Το συνολικό αρνητικό ηλεκτροστατικό δυναμικό στην κοιλότητα δέσμευσης πεπτιδίου της ERAP1 είναι υπεύθυνο για την ειδική δραστικότητα της έναντι υποστρωμάτων με θετικά φορτισμένες πλευρικές αλυσίδες σε διάφορες θέσεις στην αλληλουχία του πεπτιδίου. Από την άλλη παρατηρήθηκε μια διαφορετική κατανομή ηλεκτροστατικού δυναμικού στην κοιλότητα της ERAP2 υποδηλώνοντας ότι είναι πιθανό να εμφανίζει διαφορετική προτίμηση ως προς τα

υποστρώματα που υδρολύει συγκριτικά με την ERAP1, επιβεβαιώνοντας το διαφορετικό ή/και συμπληρωματικό ρόλο της στην αντιγονοπαρουσίαση [77].



Εικόνα 12: (Α) Χωροπληρωτικό μοντέλο του S1 θύλακα ειδικότητας της ERAP2 όπως προέκυψε από την κρυσταλλική δομή του ενζύμου με χρωματισμένο το ηλεκτροστατικό δυναμικό (Β) Χωροπληρωτικό μοντέλο του S1 θύλακα ειδικότητας της ERAP1 όπως προέκυψε από την κρυσταλλική δομή του ενζύμου με χρωματισμένο το ηλεκτροστατικό δυναμικό. Με κόκκινο αναπαρίσταται το αρνητικό ηλεκτροστατικό δυναμικό ενώ με μπλε το θετικό [77]



Εικόνα 13: (Α) Χωροπληρωτικό μοντέλο της κοιλότητας δέσμευσης πεπτιδίου της ΕRAP1, με χρωματισμένο το ηλεκτροστατικό δυναμικό και τον αναστολέα μπεστατίνη προσδεμένο στο ενεργό κέντρο της. Ο Zn²⁺ αναπαρίσταται με γκρι σφαίρα και τα γρι βέλη συμβολίζουν τις πιθανές διαμορφώσεις δέσμευσης του πεπτιδικού υποστρώματος (Β) Χωροπληρωτικό μοντέλο της κοιλότητας δέσμευσης πεπτιδίου της ERAP2, με χρωματισμένο το ηλεκτροστατικό δυναμικό, την λυσίνη και το MES (2-(Ν-μορφόλινο) αιθανοσουλφονικό οξύ) προσδεμένα στο ενεργό κέντρο της. Ο Zn²⁺ αναπαρίσταται με γκρι σφαίρα και τα γρι βέλη συμβολίζουν τις πιθανές διαμορφώσεις δέσμευσης του πεπτιδικού υποστρώματος. Με κόκκινο αναπαρίσταται το αρνητικό ηλεκτροστατικό δυναμικό ενώ με μπλε το θετικό [77]

4.6. Συσχέτιση των ERAP1, ERAP2 και IRAP με παθολογικές καταστάσεις

Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, γενετικές ποικιλομορφίες των ERAP1 και ERAP2 έχουν συσχετιστεί με ανθρώπινες ασθένειες όπως η αγκυλωτική σπονδυλίτιδα, ο διαβήτης και ο καρκίνος του τράχηλου της μήτρας. Η αγκυλωτική σπονδυλίτιδα είναι μια αυτοάνοση ασθένεια που κατατάσσεται στις σπονδυλο-αρθρίτιδες και οδηγεί στο σχηματισμό φλεγμονών μεταξύ των αρθρώσεων και των συνδέσμων της σπονδυλικής στήλης προκαλώντας δυσκαμψία στους σπόνδυλους με αποτέλεσμα να μειώνεται η ικανότητα κίνησης των ασθενών και κατ' επέκταση η ποιότητα της ζωής τους. Η συγκεκριμένη νόσος αρχικά είχε συσχετιστεί με το HLA-B27, ένα αλληλόμορφο των μορίων ΜΗC, από πρόσφατες όμως γονιδιακές μελέτες σε ανθρώπινους πληθυσμούς φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση της με πολυμορφισμούς και σε άλλα γονίδια εκτός των περιοχών που κωδικοποιούν τα μόρια MHC και κυρίως με της ERAP1 [78]. Οκτώ μονόνουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί, με διαφορετική συσχέτιση ως προς τον κίνδυνο εμφάνισης της αγκυλωτικής σπονδυλίτιδας, έχουν παρατηρηθεί στα αλληλόμορφα της ERAP1 [78],[79]. Η κρυσταλλική δομή της ERAP1 έδωσε σημαντικές πληροφορίες για τη θέση των οκτώ πολυμορφισμών που φαίνεται να σχετίζονται με τη νόσο μέσω των οποίων μπορούμε να προβλέψουμε πιθανές επιπτώσεις τους στη δραστικότητα του ενζύμου. Συγκεκριμένα ο πολυμορφισμός Μ349V εντοπίστηκε κοντά στο καταλυτικό κέντρο του ένζύμου, ενώ οι R725Q και Q730E στο εσωτερικό της C-τελική κοιλότητας και είναι πιθανό να επηρεάζουν την ειδικότητα της ERAP1 ως προς την αλληλουχία ή το μήκος του πεπτιδικού υποστρώματος. Άλλοι πολυμορφισμοί (R127P, K528R, D575N και V647Ι) εντοπίστηκαν στις διασυνδέσεις μεταξύ των δομικών περιοχών και πιθανόν να επιδρούν στη δραστικότητα ή στην εξειδίκευση του ενζύμου παρεμποδίζοντας την μετάβαση της ERAP1 από την ανοιχτή (μη δραστική) στην κλειστή (ενεργή) διαμόρφωση (εικόνα 14) [75]. Ένας ακόμα πολυμορφισμός, ο N392K στην ERAP2 αυτή τη φορά, έχει συσχετιστεί με υψηλό κίνδυνο εμφάνισης της αγκυλωτικής σπονδυλίτιδας. Με βάση την κρυσταλλική δομή της ERAP2 ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός εντοπίζεται πολύ κοντά στην καταλυτική περιοχή του ενζύμου και επιπλέον η μετάλλαξη Ν392Κ έχει σαν αποτέλεσμα την τοπική αλλαγή της διαμόρφωσης της ERAP2 που αποδίδεται στο μεγαλύτερο μέγεθος αλλά ή/και στο φορτίο της λυσίνης [77].



Εικόνα 14: Χωροπληρωτικό μοντέλο της ERAP1 όπου η επιφάνεια του ενζύμου είναι χρωματισμένη με γκρι ενώ οι πολυμορφισμοί που συσχετίζονται με την αγκυλωτική σπονδυλίτιδα με κόκκινο [75]

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας είναι μια μορφή καρκίνου που προκαλείται από έναν ογκογόνο τύπο του ανθρώπινου παπιλλωματοϊού (HPV). Δύο πολυμορφισμοί που εντοπίστηκαν στο γονίδιο της ERAP1, οι Q370Ε και R127P, έχουν συσχετιστεί με υψηλό κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του τραχήλου (Ρ<0.001) [80]. Επιπλέον έχει παρατηρηθεί ότι μεταβάλλονται τα επίπεδα έκφρασης των ERAP1 και ERAP2 σε κάποιες μορφές καρκίνου. Συγκεκριμένα στον καρκίνο του μαστού, των ωοθηκών, των νεφρών, του λάρυγγα και του στομάχου δεν παρατηρήθηκε καθόλου έκφραση της ERAP1 ενώ η ERAP2 δεν ανιχνεύτηκε στον καρκίνο των νεφρών, των ωοθηκών και του στομάχου [81]. Από την άλλη πλευρά σε αρκετούς καρκινικούς όγκους έχει παρατηρηθεί αυξημένη έκφραση των ERAP1 (στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης και του θυρεοειδούς) και ERAP2 (στον καρκίνο του μαστού και της ουροδόχου κύστης) [81]. Πρόσφατα, οι Cifaldi et al εξέφρασαν την άποψη ότι οι αμινοπεπτιδάσες ERAP είναι πιθανό να εμπλέκονται και να ρυθμίζουν την ογκογένεση καθώς μέσω πειραμάτων που πραγματοποίησαν σε ποντίκια διαπίστωσαν πως η αποσιώπηση των ERAP προκάλεσε μείωση στην έκφραση των μορίων ΜΗC Ι στην επιφάνεια των κυττάρων με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των φυσικών κυττάρων δολοφόνων (NK cells). Τα NK κύτταρα είναι μια κατηγορία κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος τα οποία ανιχνεύουν και καταστρέφουν μολυσμένα κύτταρα πυροδοτώντας έναν καταρράκτη χημικών αντιδράσεων που οδηγούν στη λύση των μολυσμένων κυττάρων. Η λειτουργία τους όμως είναι άμεσα εξαρτώμενη από την αλληλεπίδραση μέσω υποδοχέων που διαθέτουν στην επιφάνεια τους με τα μόρια ΜΗC Ι με αποτέλεσμα κύτταρα με μειωμένη έκφραση μορίων MHC Ι στην επιφάνεια τους καθίστανται ευάλωτα στη λύση από τα ΝΚ κύτταρα. Σύμφωνα με τα πειραματικά αποτελέσματα των Cifaldi et al η αποσιώπηση των ERAP οδήγησε σε εξάλειψη των

λεμφωμάτων στα ποντίκια και πιθανόν η αναστολή των ERAP να αποτελεί έναν νέο φαρμακευτικό στόχο στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου [82].

Ο πολυμορφισμός Lys528Arg της ERAP1 έχει συσχετιστεί με την αγκυλωτική σπονδυλίτιδα [79], με την υπέρταση [83] και το αιμολυτικό-ουραιμικό σύνδρομο [84]. Επίσης και ο πολυμορφισμός Asn392Lys της ERAP2 έχει συσχετιστεί με την αγκυλωτική σπονδυλίτιδα και την προεκλαμψία, μια κληρονομική διαταραχή που εμφανίζεται κατά τη διάρκεια της κύησης και προκαλεί υπέρταση και πρωτεϊνουρία [85],[86]. Πρόσφατα όμως οι Cagliani et al εξέφρασαν την άποψη πως ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός της ERAP2 αποτελεί ένα εξελικτικό πλεονέκτημα έναντι της μόλυνσης από τον ιό HIV-1 [87].

Όπως οι αμινοπεπτιδάσες ERAP έτσι και η IRAP φαίνεται να εμπλέκεται σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις κυρίως λόγω των τεσσάρων γνωστών λειτουργιών της: (A) Το 1995 n IRAP απομονώθηκε και κλωνοποιήθηκε από τους Keller et al σαν μια πρωτεΐνη των GLUT4 ενδοκυτταρικών κυστίδιων [88]. (B) Την επόμενη χρόνια κατατάχθηκε στις ωκυτοκινάσες και χαρακτηρίστηκε ως η αμινοπεπτιδάση που παράγεται από τον πλακούντα και αποικοδομεί την ωκυτοκίνη [67]. (Γ) Το 2001 η IRAP χαρακτηρίστηκε ως υποδοχέας αγγειοτενσίνης ΑΤ4, μια θέση δέσμευσης για το πεπτίδιο της αγγειοτενσίνη ΙV και εντοπίστηκε σε διάφορους ιστούς μεταξύ των οποίων και ο εγκέφαλος [89],[90]. (Δ) Τέλος, το 2009, οι Saveanu et al και Segura et al απέδειξαν πως η IRAP συμμετέχει στο μονοπάτι της διασταυρούμενης αντιγονοπαρουσίασης και συγκεκριμένα στον καταβολισμό πρόδρομων αντιγονικών πεπτιδίων προς ώριμους ώστε να μπορέσουν να προσδεθούν στα μόρια MHC Ι [46],[91]. Επιπλέον διαθέτει την ικανότητα να αποικοδομεί πεπτιδικές και αγγειοδραστικές ορμόνες καθώς και ορισμένα νευροπεπτίδια. Πιο συγκεκριμένα, αποικοδομεί in vitro πεπτιδικές ορμόνες όπως τη βαζοπρεσίνη, την ωκυτοκίνη, την Lys-βραδυκινίνη, την αγγειοτενσίνη ΙΙΙ καθώς και τα νευροπεπτίδια metεγκεφαλίνη και δυνορφίνη Α (dynorphin Α (1-8)), ενώ άλλες πεπτιδικές ορμόνες μεταξύ των οποίων και η ινσουλίνη δεν αποτελούν υποστρώματα για την IRAP [68].

Με βάση όλα τα παραπάνω είναι πιθανό η IRAP να συμβάλλει στη ρύθμιση κάποιων λειτουργιών των νευρικών κυττάρων και έχει ενοχοποιηθεί πως εμπλέκεται στην εμφάνιση παθολογικών καταστάσεων άνοιας, επιληψίας και ισχαιμίας [92]. Επιπλέον σε πειράματα αποσιώπησης σε ποντίκια παρατηρήθηκε πως απουσία тпс αμινοπεπτιδάσης μειώθηκαν τα επίπεδα έκφρασης του GLUT4 σε ένα ποσοστό 50-80% στους μύες, την καρδιά και το λιπώδη ιστό. Η μείωση των επιπέδων του μεταφορέα γλυκόζης είναι πιθανό να οφείλεται σε αλλαγές στην ενεργοποίηση πεπτιδικών ορμονών που ρυθμίζονται από την IRAP με αποτέλεσμα μειωμένη βιοσύνθεση ή αυξημένη αποικοδόμηση του GLUT4 [68]. Τέλος, σε ασθενείς που παρουσιάζουν διαβήτη τύπου ΙΙ. παρατηρήθηκε επίσης μειωμένη έκφραση του μεταφορέα GLUT4 στα μυϊκά κύτταρα και τα λιποκύτταρα παρόλο που τα επίπεδα έκφρασης της IRAP ήταν φυσιολογικά. Ωστόσο παρατηρήθηκε μειωμένη δραστικότητα της στην επιφάνεια των κυττάρων, καθώς η μεταφορά της από τα ενδοκυτταρικά κυστίδια στα οποία εντοπίζεται προς την επιφάνεια του κυττάρου διεγείρεται παρουσία ινσουλίνης, επομένως είναι πιθανό η αντίσταση στην ινσουλίνη να ενισχύεται απουσία της καταλυτικής δραστικότητας της IRAP [68]. Τέλος, λόγω του ότι πρόσφατα επιβεβαιώθηκε η εμπλοκή της στο μονοπάτι της διασταυρούμενης αντιγονοπαρουσίασης και συνεπώς είναι η λιγότερο μελετημένη από τις τρεις, αλλαγές στη δραστικότητα της δεν έχουν μέχρι στιγμής συσχετιστεί με αυτοάνοσα νοσήματα, καρκίνο ή ιογενείς λοιμώξεις.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ

5.1. Αναστολείς αμινοπεπτιδασών

Το γεγονός ότι οι αμινοπεπτιδάσες εμπλέκονται και ρυθμίζουν πολλά ενδο- και εξωκυτταρικά γεγονότα έχει στρέψει το ενδιαφέρων πολλών ερευνητών προς το σχεδιασμό και τη σύνθεση εκλεκτικών αναστολέων για πολλές από αυτές και ως εκ τούτου αποτελούν ελκυστικούς φαρμακευτικούς στόχους, καθώς ένας εκλεκτικός αναστολέας μπορεί να συμβάλλει στην κατανόηση και μελέτη της λειτουργίας τους τόσο in vitro όσο και *in vivo*. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί υπερέκφραση τους σε πολλές παθολογικές καταστάσεις όπως ο καρκίνος με την αμινοπεπτιδάση της μεθειονίνης να αποτελεί έναν πολλά υποσχόμενο στόχο για την ανάπτυξη αντι-αγγειογενετικών μεσολαβητών. Ωστόσο και άλλες αμινοπεπτιδάσες όπως η αμινοπεπτιδάση Ν (APN) φαίνεται να εμπλέκονται στη διείσδυση των μεταστατικών όγκων και την ογκογένεση, ενώ άλλες παίζουν σημαντικό ρόλο στα αρχικά στάδια ιογενών λοιμώξεων, όπως η αμινοπεπτιδάση λευκίνης (LAP) στην μόλυνση από τον ΗΙV όπου παρατηρείται υπερέκφραση της, ενώ μεταβολές στη δραστικότητα της έχουν διαπιστωθεί σε ορισμένες μορφές καρκίνου, σε φλεγμονώδεις καταστάσεις του ήπατος και στον καταρράκτη [93].

Οι αμινοπεπτιδάσες ψευδαργύρου μπορούν να ανασταλούν από μια ευρεία σειρά χηλικών υποκαταστατών, όπως το EDTA, leucinethiol και 1,10-phenanthroline οι οποίοι όμως αποτελούν αναστολείς πολλών μεταλλο-πεπτιδασών. Για την οικογένεια M1 των αμινοπεπτιδασών υπάρχουν στη βάση δεδομένων MEROPS αρκετοί σχετικά ισχυροί αναστολείς, όπως η μπεστατίνη ένας αποτελεσματικός αναστολέας αρκετών μεταλλοαμινοπεπτιδασών υπάρχουν στη βάση δεδομένων MEROPS αρκετοί σχετικά ισχυροί αναστολείς, όπως η μπεστατίνη ένας αποτελεσματικός αναστολέας αρκετών μεταλλοαμινοπεπτιδασών που κατατάσσονται σε διάφορες οικογένειες και η οποία λόγω της χαμηλής τοξικότητας της χρησιμοποιείται στη θεραπεία του καρκίνου [94]. Η αμαστατίνη, ένα προϊόν του ακτινομύκητα, αναστέλλει τις αμινοπεπτιδάσες Ν και Α καθώς και την αμινοπεπτιδάση λευκίνης [95]. Η actinonin, ένα αντιβιοτικό που παράγεται από τον ακτινομύκητα, συνήθως χρησιμοποιείται ως ειδικός αναστολέας της αμινοπεπτιδάσης Ν. Η πουρομυκίνη η οποία χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό της ενεργής αμινοπεπτιδάσης Μ από την κυτοσολική αμινοπεπτιδάση αλανίνης την οποία αναστέλλει. Όμως πολλές άλλες αμινοπεπτιδάσες δεν επηρεάζονται απο την πουρομυκίνη μεταξύ δε αυτών και η ERAP1 η οποία αρχικά ονομάστηκε "puromycin-insensitive aminopeptidase" (PILS-AP) προς διαφοροποίηση της από την κυτοσολική αμινοπεπτιδάση αλανίνης [60].

Κάποιοι από τους παραπάνω αναστολείς έχουν δοκιμαστεί για τις αμινοπεπτιδάσες ERAP. Πιο συγκεκριμένα τα leucinethiol και 1,10-phenanthroline αναστέλλουν τις ERAP1 και ERAP2 καθώς και πολλές άλλες αμινοπεπτιδάσες και ως εκ τούτου δεν μπορούν να χαρακτηριστούν ως εκλεκτικοί αναστολείς [64],[96],[97]. Η αμαστατίνη (με Ki της τάξης των μΜ) δεν αποτελεί πολύ ισχυρό αναστολέα των ERAP1 και ERAP2, όπως άλλωστε και η μπεστατίνη [64],[97]. Επιπλέον, πολύ λίγες πληροφορίες υπάρχουν για την επίδραση που έχουν οι αναστολείς των ERAP στην αντιγονοπαρουσίαση *in vivo*. Ωστόσο, το leucinethiol σε δοκιμασία που πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα επηρέασε την εξαρτώμενη από την ERAP1 αντιγονοπαρουσίαση, η συγκεκριμένη όμως ένωση εμφανίζει χαμηλή εκλεκτικότητα καθώς αναστέλλει και άλλα ενδο- και εξω- κυτταρικά μεταλλο-ένζυμα [98],[99]. Μέχρι στιγμής για τις αμινοπεπτιδάσες ERAP δεν υπάρχει κάποιος ισχυρός και εκλεκτικός αναστολέας σε αντίθεση με την IRAP.

Η IRAP λόγω των ποικίλων λειτουργιών της αποτελεί πιθανό θεραπευτικό στόχο για ορισμένες από αυτές. Πιο συγκεκριμένα, ο εντοπισμός της ΙRAP στην μεμβράνη των νευρικών κυττάρων, όπου αποικοδομεί διάφορα νευροπεπτίδια και δρα ως υποδοχέας της αγγειοτενσίνη IV, οδήγησε στην ανάπτυξη ορισμένων αναστολέων της IRAP που κατατάσσονται σε δύο κατηγορίες: (A) πεπτιδικοί αναστολείς, όπως η Leu-Val-Valhemorphin-7 (LVV-H7) και η αγγειστενσίνη IV, δύο συναγωνιστικοί αναστολείς με σταθερά αναστολής της τάξης των nM [100]. (B) Βενζοπυρενικά παράγωγα μικρού μοριακού βάρους με υψηλή δεσμευτική συγγένεια (της τάξης των nM) για την IRAP [101]. Οι αναστολείς αυτοί δοκιμάστηκαν τόσο σε φυσιολογικά ποντίκια όσο και σε ποντίκια με διαταραχές στη μνήμη και διαπιστώθηκε πως ενίσχυσαν τη δυνατότητα μνήμης και μάθησης [101],[102],[103],[104]. Πιθανολογείται πως η αναστολή της καταλυτικής δράσης της IRAP οδηγεί σε συσσώρευση νευροπεπτιδικών υποστρωμάτων της αμινοπεπτιδάσης, όπως βαζοπρεσίνης, ωκυτοκίνης, εγκεφαλίνης, σωματοστατίνης και άλλων, τα οποία παίζουν καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση της μνήμης [101]. Ωστόσο, μέχρι στιγμής δεν υπάρχουν πληροφορίες για την in vivo επίδραση των συγκεκριμένων αναστολέων της IRAP στην αντιγονοπαρουσίαση και συνεπώς δεν έχει εκτιμηθεί η αξία αναστολής της στην αντιγονοπαρουσίαση.

5.2. Εκλογικευμένος με βάση τη δομή σχεδιασμός αναστολέων

Ο εκλογικευμένος με βάση τη δομή σχεδιασμός αναστολέων ή φαρμάκων αναφέρεται στην πολύπλοκη διαδικασία της χρησιμοποίησης πληροφοριών όπως προέκυψαν από την τρισδιάστατη κρυσταλλική δομή ή μοριακών μοντέλων υψηλής ακρίβειας της πρωτεΐνης-στόχου ή του συμπλέγματος της πρωτεΐνης με κάποιο προσδέτη με σκοπό το σχεδιασμό νέων φαρμάκων για σημαντικές ανθρώπινες ασθένειες [105]. Προσεκτικά σχεδιασμένα μόρια, τα οποία σχετίζονται άμεσα με τον καταλυτικό μηχανισμό της ενζυμικής αντίδρασης, είναι συνήθως υψηλής εκλεκτικότητας και ισχύος αναστολείς μέσω των οποίων μπορούμε να εξάγουμε χρήσιμες πληροφορίες για το μηχανισμό της αντίδρασης και τη δομή των ενζύμων [106].

Στις περισσότερες ενζυμικές αντιδράσεις το υπόστρωμα μετατρέπεται σε προϊόν μέσω μιας ενδιάμεσης ή μεταβατικής κατάστασης. Τα ένζυμα χαρακτηρίζονται από την ικανότητα τους να επιταχύνουν την ταχύτητα της αντίδρασης ελαττώνοντας την ενέργεια ενεργοποίησης η οποία απαιτείται για να φτάσει το υπόστρωμα στην μεταβατική κατάσταση, όπως προτάθηκε το 1946 από τον Linus Pauling και εμφανίζουν εξειδίκευση τόσο ως προς τις αντιδράσεις που καταλύουν όσο και ως προς την επιλογή των υποστρωμάτων. Η εξειδίκευση τους ως προς ένα υπόστρωμα είναι αποτέλεσμα της διαφορετικής σταθεροποίησης του στη μεταβατική κατάσταση, σε σχέση με άλλα υποστρώματα και προσδιορίζεται από την κινητική παράμετρο k_{cat}/K_M (όπου η σταθερά k_{cat} εκφράζει τον αριθμό των μορίων υποστρώματος που μετατρέπονται σε προϊόν στη μονάδα του χρόνου από ένα μόριο ενζύμου και αναφέρεται ως αριθμός ανακύκλισης (turnover number) και K_M η σταθερά Michaelis-Menten). Για να κατανοήσουμε την ενζυμική κατάλυση είναι χρήσιμο να διασαφηνισθούν οι δομικές αλλαγές που λαμβάνουν χώρα στο ενεργό κέντρο του ενζύμου κατά την πρόσδεση του υποστρώματος προς σχηματισμό του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος στη μεταβατική κατάσταση, στην οποία τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου προσανατολίζονται κατάλληλα στο χώρο ώστε να αλληλεπιδρούν με την ενεργή μορφή των υποστρωμάτων προς σχηματισμό προϊόντος. Πληροφορίες που μπορούν να ληφθούν με τεχνικές όπως η κρυσταλλογραφία ακτινών Χ, NMR (φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού) καθώς και με κατασκευή υψηλής ακρίβειας ομόλογων μοριακών μοντέλων μέσω υπολογιστικών προγραμμάτων [106].

Οι πληροφορίες που παρέχουν οι παραπάνω τεχνικές αξιοποιούνται κατάλληλα ώστε να σχεδιαστούν ενώσεις οι οποίες να αναστέλλουν την λειτουργία της πρωτεΐνης-στόχου. Οι φαρμακευτικοί αναστολείς που έχουν προταθεί και χρησιμοποιηθεί για διάφορες πρωτεάσες ταξινομούνται στις ακόλουθες κατηγορίες: 1) Ανάλογα υποστρώματος, ενώσεις που στοχεύουν στο ενεργό κέντρο του ενζύμου με δομή ανάλογη με τη δομή των πεπτιδικών υποστρωμάτων 2) Ανάλογα μεταβατικής κατάστασης, ενώσεις που μιμούνται τα δομικά και ηλεκτροστατικά χαρακτηριστικά της μεταβατικής κατάστασης 3)

53

Αλλοστερικοί αναστολείς, μόρια που δεσμεύονται στο αλλοστερικό κέντρο του ενζύμου, μια θέση δέσμευσης διαφορετική από το ενεργό κέντρο και η οποία μπορεί να είναι όχι μόνο μακριά από την ενεργή περιοχή αλλά και σε διαφορετική υπομονάδα, προκαλώντας αλλαγές στη διαμόρφωση του ενεργού κέντρου με αποτέλεσμα να μεταβάλλεται η βιολογική δράση του ενζύμου [107].

Το είδος του αναστολέα που θα σχεδιαστεί σε κάθε περίπτωση εξαρτάται από τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του ενζύμου, το πόσο εκλεκτικός θέλουμε να είναι ο αναστολέας καθώς και από τη χρήση του (φαρμακευτική ή εργαστηριακή χρήση) [107]. Χαρακτηριστικά, αρκετοί αναστολείς πρωτεασών που έχουν αναπτυχθεί ήταν ανάλογα υποστρώματος βασισμένοι στην προτίμηση τους σε πεπτιδικά υποστρώματα. Από την συγκεκριμένη προσέγγιση προέκυψαν αρκετά ισχυροί πεπτιδο-μιμητικοί αναστολείς, ωστόσο υπήρξε δυσκολία στο να μετατραπούν σε μη-πεπτιδικές φαρμακευτικές ουσίες, οι οποίες να συγκεντρώνουν τα απαραίτητα φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά, όπως επαρκή απορρόφηση, κατανομή του στους ιστούς, μεταβολισμό, απέκκριση, χρόνος παραμονής του στην κυκλοφορία καθώς και τοξικολογικές παράμετροι [107],[108]. Από την άλλη, τα ανάλογα μεταβατικής κατάστασης εκτός του ότι μπορεί να αποτελέσουν ισχυρούς αναστολείς παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες για τη δομή του ενζύμου καθώς και τη χημική βάση της ενζυμικής κατάλυσης [106].

5.3. <u>Φωσφινικά ανάλογα μεταβατικής κατάστασης ως αναστολείς</u> <u>αμινοπεπτιδασών</u>

Για αρκετές αμινοπεπτιδάσες της οικογένειας των μεταλλο-πεπτιδασών M1 έχουν δοκιμαστεί και χαρακτηριστεί ως αναστολείς τους ορισμένες οργανικές ενώσεις που ανήκουν στην κατηγορία των α-αμινο-ακυλο φωσφορικών ενώσεων. Οι συγκεκριμένοι αναστολείς αποτελούν ανάλογα μεταβατικής κατάστασης και έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με το ιόν του Zn²⁺ μέσω των δύο ατόμων οξυγόνου της φωσφινικής ομάδας. Πρόσφατα οι Fournié-Zaluski et al κρυστάλλωσαν την αμινοπεπτιδάση N (APN) με έναν αμινο-φωσφινικό αναστολέα (PL250), ανάλογο μεταβατικής κατάστασης που αποτελεί τον ισχυρότερο αναστολέα για τη συγκεκριμένη αμινοπεπτιδάση που έχει αναφερθεί μέχρι σήμερα με σταθερά αναστολής Ki = 1.5 - 2.2nM (εικόνα 15) [109].



Εικόνα 15: (Α) Σχηματική αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων που λαμβάνουν χώρα στο ενεργό κέντρο της αμινοπεπτιδάσης Ν (ΑΡΝ) κατά το σχηματισμό συμπλόκου με τον αναστολέα PL250 (B) Χωροπληρωτική αναπαράσταση της καταλυτικής περιοχής στο σύμπλοκο APN-PL250. Στο μοντέλο εμφανίζονται οι θύλακες ειδικότητας S1, S1' και S2' της APN με τα αμινοξέα που απαρτίζουν κάθε θύλακα να εμφανίζονται ως stick models, το ιόν Zn²⁺ αναπαρίσταται ως ροζ σφαίρα ενώ ο προσδεμένος στο ενεργό κέντρο της APN αναστολέας PL250 ως κυανό stick model (Γ) Χημική δομή του αναστολέα PL250 [109]

Η αμινοπεπτιδάση Ν είναι ένα ακόμα μέλος της οικογένειας των μεταλλοπεπτιδασών ψευδαργύρου Μ1 και εμφανίζει 24% ομολογία στην αλληλουχία της με τις ERAP1 και ERAP2 και 33.8% ομολογία με την IRAP, ενώ παρατηρούνται υψηλότερα επίπεδα ομολογίας μεταξύ των ενζύμων στις περιοχές των καταλυτικών τους κέντρων που περιέχονται τα μοτίβα HEXXH(X)₁₈E πρόσδεσης ψευδαργύρου και εξωπεπτιδάσης GAMEN. Όπως προέκυψε από τα πειράματα των Fournié-Zaluski et al, ο φωσφινικός αναστολέας PL250 προσδένεται ισχυρά στο ενεργό κέντρο της APN. Στην εικόνα 15 (A) φαίνεται ο τρόπος δράσης των φωσφινικών αναστολέων όπου στο σύμπλοκο ενζύμουαναστολέα το μόριο νερού που αποτελεί προσδέτη για τον Zn²⁺ έχει αντικατασταθεί από τα δύο άτομα οξυγόνου της φωσφινικής ομάδας του αναστολέα και επιπλέον τα άτομα οξυγόνου της φωσφινικής ομάδας σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με τα Glu298, Glu320 και Tyr381. Το καταλυτικό κέντρο στο σύμπλοκο ενζύμου-αναστολέα χαρακτηρίζεται από την παρουσία ενός δικτύου γέφυρων άλατος μεταξύ των τριών γλουταμινικών (Glu121, Glu264 και Glu320) με την ε-αμινομάδα της Lys319 ενώ και το ελεύθερο N-τελικό άκρο του αναστολέα συμμετέχει σε αυτό το δίκτυο αλληλεπιδράσεων σχηματίζοντας δεσμούς υδρογόνου με τα Glu264 και Glu121. Τέλος, η κύρια αλυσίδα του αναστολέα βρίσκεται σε μια διαμόρφωση αντιπαράλληλη ως προς το β φύλλο του μοτίβου GAMEN με αποτέλεσμα την ανάπτυξη πολλαπλών αλληλεπιδράσεων. Ωστόσο η ισχύς δέσμευσης του αναστολέα εξαρτάται από της πλευρικές ομάδες των αμινοξέων του αναστολέα που θα δεσμευτούν στους θύλακες ειδικότητας του ενζύμου S1, S1', S2'... και συνεπώς από τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά κάθε θύλακα [109]. Για την ΑΡΝ έχει αναπτυχθεί και δοκιμαστεί μια σειρά φωσφινικών αναστολέων ανάλογα μεταβατικής κατάστασης που διαφέρουν ως προς το μέγεθος τους (διπεπτίδια ή τριπεπτίδια) καθώς και ως προς τη φύση των πλευρικών ομάδων που προσδένονται στους θύλακες ειδικότητας με διαφορετική δεσμευτική συγγένεια για την ΑΡΝ [110].

Μια άλλη αμινοπεπτιδάση ψευδαργύρου για την οποία έχουν σχεδιαστεί φωσφινικοί αναστολείς είναι και η αμινοπεπτιδάση λευκίνης (LAP) η οποία στα θηλάστικα εντοπίζεται στο κυτοσόλιο και εμπλέκεται στον καταβολισμό των αντιγονικών επιτόπων που πρόκειται να παρουσιαστούν από τα μόρια MHC Ι. Από μια σειρά φωσφινικών αναστολέων που δοκιμάστηκαν για το συγκεκριμένο ένζυμο προέκυψαν αρκετά ισχυροί αναστολείς με σταθερές Κi της τάξης των nM [111].

Με βάση τα παραπάνω φαίνεται πως τα φωσφινικά ανάλογα μεταβατικής κατάστασης αποτελούν μια δραστική σειρά αναστολέων για αμινοπεπτιδάσες που διαθέτουν στο καταλυτικό τους κέντρο ιόν Zn²⁺ και επιδρούν στην δραστικότητα τους πιθανώς μέσω ενός μηχανισμού αντίστοιχου με εκείνον της εικόνας 15.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 <u>Σκοπός της παρούσας εργασίας</u>

Η προστασία αλλά και η επιβίωση του οργανισμού έναντι συγκεκριμένων αντιγονικών προκλήσεων εξαρτάται από τον αυστηρό έλεγχο της αντιγονοπαρουσίασης που διασφαλίζεται από την παρουσία πολύπλοκων μοριακών μηχανισμών εντός των κυττάρων. Πολλά μόρια μέσα σε ένα κύτταρο συμμετέχουν στην δημιουργία, επεξεργασία και πρόσδεση αντιγονικών πεπτιδίων, με αποτέλεσμα την ύπαρξη διακριτών μονοπατιών καθένα από τα οποία υπόκειται σε διαφορετικούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς ως προς την επιλογή των πεπτιδίων που θα παρουσιαστούν στην επιφάνεια του κυττάρου, μια επιλογή κρίσιμη για την ενεργοποίηση ή μη του ανοσοποιητικού συστήματος. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα ρυθμιστικού μηχανισμού της επίκτητης ανοσοαπόκρισης αποτελεί το κρίσιμο και τελικό πρωτεολυτικό στάδιο της παραγωγής ώριμων αντιγονικών επιτόπων που σε σύμπλοκο με μόρια MHC Ι οδηγούνται προς παρουσίαση στην επιφάνεια των κυττάρων και στο οποίο, όπως αποδείχθηκε τα τελευταία χρόνια, εμπλέκονται τρεις ομόλογες αμινοπεπτιδάσες, οι ERAP1, ERAP2 και IRAP. Η αναγνώριση του αντιγονικού επιτόπου στα παραπάνω σύμπλοκα από τα κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα επάγει την ανοσοαπόκριση.

Η ανακάλυψη τριών διαφορετικών αμινοπεπτιδασών που συμμετέχουν στην επεξεργασία αντιγονικών πεπτιδίων δημιουργεί ορισμένα ερωτήματα σε σχέση με το λόγο ύπαρξης τριών ενζύμων με παρόμοιο βιολογικό ρόλο καθώς και για τη ρύθμιση του μηχανισμού παραγωγής αντιγονικών πεπτιδίων τα οποία είναι δύσκολο να απαντηθούν. Η παραγωγή των ώριμων αντιγονικών επιτόπων από μια αμινοπεπτιδάση και επομένως το ρεπερτόριο των αντιγονικών επιτόπων καθορίζεται από την ειδικότητα της να υδρολύει το Ν-τελικό άκρο του πρόδρομου πεπτιδικού υποστρώματος. Στην παρούσα μελέτη έγινε η υπόθεση ότι η ύπαρξη διαφορετικών αμινοπεπτιδασών με παρόμοιο βιολογικό ρόλο είναι πιθανό να οφείλεται σε διαφορές ως προς την Ν-τελική ειδικότητα των ενζύμων αυτών έναντι των υποστρωμάτων που αναγνωρίζουν. Με σκοπό να διαπιστωθεί η παραπάνω υπόθεση προσπαθήσαμε να προσδιορίσουμε το μέγεθος, σχήμα και τα αμινοξέα που απαρτίζουν τον κύριο θύλακα ειδικότητας (S1) των ενζύμων αυτών και τα οποία τους προσδίδουν διαφορετική Ν-τελική εκλεκτικότητα, χρησιμοποιώντας μια συλλογή 82 φθοριζόντων υποστρωμάτων σχεδιασμένη για αμινοπεπτιδάσες. Στη συνέχεια με μοριακά μοντέλα και την τοποθέτηση υποστρωμάτων ενεργό κέντρο των ενζύμων (substrate-docking) μέσω υπολογιστικών στο προγραμμάτων προσδιορίστηκαν οι πιθανές μοριακές αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα κατά την πρόσδεση τους. Τα ομόλογα μοριακά μοντέλα που προτείναμε επιβεβαιώθηκαν με κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση. Τέλος η εμπλοκή των ενζύμων αυτών σε ένα κρίσιμο και ρυθμιστικό για την ανοσοαπόκριση στάδιο καθώς και η συσχέτιση κυρίως των ERAP1 και ERAP2 με παθολογικές καταστάσεις υποδηλώνουν ότι η ρύθμιση της δραστικότητας τους μπορεί να επηρεάσει το ρεπερτόριο των αντιγονικών επιτόπων που παρουσιάζονται από τα MHC I, να συμβάλλει στην καλύτερη κατανόηση της επίκτητης ανοσοαπόκρισης ή/και να αποτελεί έναν νέο πιθανό φαρμακευτικό στόχο. Οπότε, στο δεύτερο μέρος της εργασίας χρησιμοποιήθηκαν οι πληροφορίες που προέκυψαν από την παραπάνω μελέτη στο να σχεδιαστούν χημικές ουσίες με πιθανή δράση αναστολέα για τα συγκεκριμένα ένζυμα. Οι ενώσεις αυτές δοκιμάστηκαν με σκοπό να διαπιστωθεί αρχικά η *in vitro* επίδραση τους στη δραστικότητα των τριών ενζύμων και πιθανόν στο μέλλον να βρουν *in vivo* ή και ακόμα *ex vivo* εφαρμογές στη ρύθμιση της αντιγονοπαρουσίασης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

7.1. <u>Κύτταρα Εντόμου – Ηί5</u>

Τα κύτταρα Hi5 είναι μια κυτταρική σειρά που αρχικά απομονώθηκε από τις ωοθήκες ενήλικου στελέχους *Trichopulsia ni* και χρησιμοποιούνται για την έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε ένα σύστημα έκφρασης με φορέα βακιλοϊό (Baculovirus Expression Vector System). Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό των κυττάρων Hi5 είναι ότι έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται, είτε σε καλλιέργειες αιωρήματος σε φιάλες καλλιέργειας, είτε προσκολλημένα σε πλάκες. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ένας κλώνος τέτοιων κυττάρων τα οποία είναι προσαρμοσμένα να αναπτύσσονται σε καλλιέργεια αιωρήματος απουσία συστατικών ορού (serum-free).

7.1.1 Καλλιέργεια κυττάρων εντόμου –Ηί5

- Απαγωγός νηματικής ροής (laminal air flow)
- Θάλαμος σταθερής θερμοκρασίας (27°C)
- Αναδευτήρας
- Αποστειρωμένα σιφώνια μιας χρήσης
- Θρεπτικό υλικό Invitrogen SF900II serum free
- Αποστειρωμένες φιάλες καλλιέργειας 50mL και 500mL
- Οπτικό μικροσκόπιο Axiovert 25C
- Αιματοκυτόμετρο (Sigma)
- Ειδική καλυπτρίδα
- Χρωστική trypan blue

Τα κύτταρα εντόμου Hi5 καλλιεργούνται στους 27°C υπό ανάδευση σε αιώρημα (125rpm). Η συγκέντρωση τους πρέπει να κυμαίνεται από 2 ×10⁵ κύτταρα/mL μέχρι 5 × 10⁶ κύτταρα/mL, καθώς τόσο σε χαμηλότερη όσο και σε υψηλότερη συγκέντρωση αναστέλλεται η ανάπτυξη τους. Ο πληθυσμός τους διπλιάζεται περίπου κάθε 24 ώρες, οπότε χωρίζονται ανά 3-4 ημέρες, όταν φτάσουν περίπου 2-3 × 10⁶ κύτταρα/mL ώστε να γίνουν 2-4 ×10⁵ κύτταρα/mL.

Για να μετρήσουμε τα κύτταρα λαμβάνουμε δείγμα από την καλλιέργεια περίπου 500μL υπο στείρες συνθήκες, σε απαγωγό νηματικής ροής. Στη συνέχεια αναμιγνύονται 18μL καλλιέργειας με 2μL χρωστικής trypan blue και το διάλυμα υποβάλλεται σε ισχυρή ανάδευση (vortex) για να σπάσουν τυχόν συσσωματώματα των κυττάρων. Η χρωστική μας βοηθάει να διακρίνουμε τα νεκρά από τα ζωντανά κύτταρα, καθώς οι σχισμές στη μεμβράνη των νεκρών κυττάρων επιτρέπουν την είσοδο της χρωστικής στα κύτταρα τα οποία χρωματίζονται μπλε. Το αιματοκυτόμετρο, αφού προσθέσουμε 10μL από το διάλυμα των κυττάρων με τη χρωστική, τοποθετείται στο μικροσκόπιο και υπολογίζουμε τη συγκέντρωση των κυττάρων στην καλλιέργεια.

7.1.2 Μακροπρόθεσμη συντήρηση κυττάρων Ηί5 σε υγρό άζωτο

Κρυοπροστατευτικό μέσο κυττάρων: 45% φρέσκο θρεπτικό υλικό, 45% θρεπτικό υλικό από υπερκείμενο της καλλιέργειας και 10% DMSO. Το μέσο φιλτράρεται σε στείρες συνθήκες σε απαγωγό νηματικής ροής, μέσω φίλτρου με οπές 0.22μm και ψύχεται στους 4°C ή σε πάγο.

Χρειαζόμαστε καλλιέργεια κυττάρων συγκέντρωσης περίπου 1-3 ×10⁶ κύτταρα/mL. Τα κύτταρα φυγοκεντρούνται για 10min σε 1250rpm. Ένα μέρος από το υπερκείμενο χρησιμοποιείται στην παρασκεύη του κρυοπροστατευτικού μέσου ενώ το υπόλοιπο αποχύνεται. Τα κύτταρα επαναιωρούνται σε κατάλληλο όγκο κρυοπροστατευτικού μέσου, ώστε τελικά η συγκέντρωση να είναι 10 ×10⁶ κύτταρα/mL. Χωρίζουμε τα κύτταρα σε κλάσματα του 1mL σε προψυγμένα cryovials. Στη συνέχεια μεταφέρονται στους -80°C μέσα σε μονωμένο δοχείο ώστε η ψύξη να γίνει όσο το δυνατόν πιο σταδιακά και μετά από μια ή δύο μέρες μεταφέρονται στο υγρό άζωτο. Το DMSO χρησιμοποιείται λόγω των κρυοπροστατευτικών του ιδιοτήτων. Είναι σημαντικό η ψύξη γίνει σταδιακά ώστε να διασφαλιστεί η ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης και συνεπώς των κυττάρων που επιτυγχάνεται αφενός με την παρουσία DMSO και αφετέρου με την μεταφορά τους πρώτα στους -80°C και στη συνέχεια στο υγρό άζωτο.

7.1.3 Επιμόλυνση κυττάρων Ηι5 για αναγέννηση ιού

Τη στιγμή της επιμόλυνσης η συγκέντρωση των κυττάρων θέλουμε να είναι περίπου 0.9-1.0 ×10⁶ κύτταρα/mL. Επιμολύνουμε τα κύτταρα σε αναλογία καλλιέργειας : ιού 40 : 1. Παρακολουθούμε τα κύτταρα καθημερινά στο μικροσκόπιο ώστε όταν διογκωθούν αρκετά να συλλεχθεί ο ιός, δηλαδή όταν ο αριθμός των διογκωμένων είναι μεγαλύτερος από το 50% του συνολικού αριθμού των κυττάρων, αλλά πριν αρχίσουν να λύονται πολλά κύτταρα. Η συλλογή του ιού έγινε μετά από 120 ώρες με φυγοκέντρηση για 10min σε 1250rpm. Το υπερκείμενο φυλάσσεται στους 4°C σε σκοτάδι ή στους –80°C για μακροχρόνια αποθήκευση.

7.2. Παραγωγή και καθαρισμός ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών

- Σωλήνας διαπίδυσης, 3 Spectra/Por, MW CO 3500 (Spectrum Laboratories)
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου (NaP) 500mM, pH 8.0

- NaCl (Merck)
- Ιμιδαζόλιο (Applichem)
- 0.1mM PMSF
- Διάλυμα διαπίδυσης:
 - 10mM φωσφορικού νατρίου (NaP), pH 8.0
 - 2mM χλωριούχου νατρίου (NaCl)
- Στήλη συγγενείας NiNTA
- Ρυθμιστικά διαλύματα:
 - > 50mM NaP pH 8.0, 300mM NaCl, 3mM imidazole
 - > 50mM NaP pH 8.0, 300mM NaCl, 5mM imidazole
 - > 50mM NaP pH 8.0, 300mM NaCl, 10mM imidazole
 - > 50mM NaP pH 8.0, 300mM NaCl, 20mM imidazole
 - > 50mM NaP pH 8.0, 300mM NaCl, 40mM imidazole
 - > 50mM NaP pH 8.0, 300mM NaCl, 150mM imidazole
- Hepes 1mM pH 7.0

Οι ανθρώπινες ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες ERAP1, ERAP2 και IRAP παράχθηκαν σε κύτταρα εντόμου Hi5 τα οποία καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό Invitrogen SF900II serum free. Για παραγωγή τους επιμολύναμε καλλιέργεια κυττάρων Hi5 συγκέντρωσης 1×10⁶ κύτταρα/mL με βακιλοϊό σε αναλογία καλλιέργειας : ιού 10 : 1, η αναλογία αυτή είναι άμεσα εξαρτώμενη από τον τίτλο του ιού. Ο βακιλοϊός που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε περίπτωση έφερε το γονίδιο της αντίστοιχης πρωτεΐνης με μια C-τελική ουρά έξι ιστιδινών. Τα ένζυμα εκκρίθηκαν στο κυτταρικό μέσο διότι τα γονίδια που χρησιμοποιήθηκαν για την επιμόλυνση περιείχαν μια αλληλουχία σήμα έκκρισης που οδηγεί τις παραγόμενες πρωτεΐνες στο ER και μέσω της εκκριτικής οδού έξω από το κύτταρο. Μετά από 3 μέρες από τη στιγμή της επιμόλυνσης συλλέγουμε το υπερκείμενο με δύο φυγοκεντρήσεις: α) 4500rpm, 15min, 4°C και β) 4500rpm, 45min, 4°C σε φυγόκεντρο Sorval. Το υπερκείμενο των κυττάρων, αφού προσθέσουμε 0.1mM PMSF (αναστολέας πρωτεασών), υποβλήθηκε σε 3 διαπιδύσεις με προψυγμένο ρυθμιστικό διάλυμα 10mM NaP pH 8.0 και 100mM NaCl στους 4°C. Στη συνέχεια, η σύνθεση του διαλύματος προσαρμόστηκε με ρυθμιστικό διάλυμα 50mM φωσφορικά (pH 8.0), 300mM NaCl, 1mM ιμιδαζόλιο πριν φορτωθεί στη στήλη NiNTA, η οποία ήταν εξισορροπημένη με το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα. Το διάλυμα αφέθηκε υπό ήπια ανάδευση για 1 ώρα στους 4°C ώστε να γίνει η δέσμευση της πρωτεΐνης στο NiNTA.

Η δέσμευση των πρωτεϊνών στη στήλη NiNTA επιτυγχάνεται διότι τα ανασυνδυασμένα γονίδια τους που χρησιμοποιήσαμε διαθέτουν στο C-τελικό άκρο τους μια ουρά έξι ιστιδινών. Οι ιστιδίνες συνδέονται μέσω του ιμιδαζολικού δακτυλίου τους στα ιόντα Ni²⁺

ενώ οι άλλες τέσσερις θέσεις πρόσδεσης των Ni²⁺ είναι κατειλημμένες από τις καρβοξυλικές ομάδες του νιτριλοτριοξικού οξέος (NTA). Το NTA είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο με ρητίνη αγαρόζης (εικόνα16).



Εικόνα 16: Δέσμευση της ουράς ιστιδίνης των ανασυνδιασμένων πρωτεϊνών στη στήλη ΝiNTA

Η αποδέσμευση της πρωτεΐνης από τη στήλη επιτυγχάνεται με προσθήκες διαλυμάτων αυξανόμενης συγκέντρωσης ιμιδαζολίου λόγω της παρόμοιας δομής του με την ιστιδίνη, οπότε ανταγωνίζεται τις ουρές ιστιδίνης για τη δέσμευση στα ιόντα Ni²⁺. Μετά την σύνδεση της πρωτεΐνης στο NiNTA, ακολουθεί έκπλυση της στήλης με ρυθμιστικά διαλύματα ιμιδαζολίου συγκέντρωσης 3, 5, 10, 20, 40 και 150mM. Συλλέγουμε τα κλάσματα για ενζυμική δοκιμασία. Τα κλάματα με τη μεγαλύτερη ενζυμική δραστικότητα υποβλήθηκαν σε διαπίδυση με προψυγμένο ρυθμιστικό διάλυμα 10mM Hepes pH 7.0 και 100mM NaCl στους 4°C όλη νύχτα και αποθηκεύθηκαν στους – 80°C αφού προστέθηκε 10% γλυκερόλη.

7.2.1 Μέτρηση ενζυμικής δραστικότητας αμινοπεπτιδασών

- Φθορισμόμετρο Quantamaster[™] 4 (Photon Technology International, New Jersey)
- Κυψελίδα Quartz (Helma)
- L-αργυννο- 7-αμιδο-4-μεθυλο- κουμαρίνη, R-AMC (Sigma-Aldrich)
- L- λευκινο -7-αμιδο-4-μεθυλο- κουμαρίνη, L-AMC (Sigma-Aldrich)
- Ρυθμιστικό διάλυμα 50mM Hepes, 100mM NaCl (pH 7.0)

Η δραστικότητα αμινοπεπτιδάσης της ανασυνδυασμένης ERAP2 κατά τα διάφορα στάδια έκφρασης και καθαρισμού προσδιορίστηκε από το σήμα φθορισμού που

παραγόταν από την υδρόλυση του υποστρώματος L-αργυνινο- 7-αμιδο-4-μεθυλοκουμαρίνη, R-AMC (Sigma-Aldrich). 60μL R-AMC 100μM σε 50mM Hepes, 100mM NaCl (pH 7.0) αναμίχθηκαν με 2μL από το εκάστοτε έκλουσμα και μετρήθηκε η εκπομπή φθορισμού για 2min. Η διέγερση έγινε στα 380nm και η εκπομπή στα 460nm. Ενώ η δραστικότητα των ανασυνδυασμένων ERAP1 και IRAP προσδιορίστηκε κάτω από τις ίδιες συνθήκες χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το L- λευκινο- 7-αμιδο-4-μεθυλοκουμαρίνη, L-AMC (Sigma-Aldrich). Εναλλακτικά για την IRAP μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα και το R-AMC.



Εικόνα 17: Υδρόλυση υποστρώματος (R-AMC) από την ERAP2 ή την IRAP



Εικόνα 18: Υδρόλυση υποστρώματος (L-AMC) από την IRAP ή την ERAP1

7.3. Αναπαραγωγή, απομόνωση και καθαρισμός πλασμιδιακού DNA

7.3.1 Παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος – Επίστρωση τρυβλίων

- Αυτόκαυστος (Sanyo, Labo Autoclave)
- Τρυπτόνη (Applichem)
- Εκχύλισμα ζύμης (Applichem)
- NaCl (Merck)
- Άγαρ (Applichem)
- Λύχνος
- Στείρα τρυβλία (Costar)
- Αμπικιλλίνη (Applichem)
- Αιθανόλη 70% ν/ν

Παρασκευάστηκε θρεπτικό υλικό LB με διαλυτοποίηση 10g τρυπτόνης, 5g εκχυλίσματος ζύμης και 10g NaCl σε 1L νερό. Μέρος του θρεπτικού υλικού μεταφέρθηκε σε κωνική φιάλη κατάλληλου όγκου, έτσι ώστε να καταλαμβάνεται το 1/5 του όγκου της. Στο υπόλοιπο διάλυμα LB προσθέσαμε άγαρ σε τελική συγκέντρωση 15g/L. Τόσο το LB όσο και το διάλυμα LB- άγαρ αποστειρώνονται σε αυτόκαυστο στους 120°C, υπο πίεση 1.5atm για 35min. Μετά την αποστείρωση τα σκεύη με τα διαλύματα αφήνονται να επανέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου πριν την προσθήκη του αντιβιοτικού (αμπικιλλίνη). Για να δημιουργηθούν στείρες συνθήκες ανάβεται λύχνος με χαμηλή φλόγα και η επιφάνεια του εργαστηριακού πάγκου καθαρίζεται με διάλυμα αιθανόλης 70% v/v. Όταν το διάλυμα LB-άγαρ δεν είναι πλέον ζεστό προστίθεται σε αυτό αμπικιλλίνη σε τελική συγκέντρωση 100μg/mL. Το διάλυμα αποχύνεται στο εσωτερικό αποστειρωμένων τρυβλίων ώστε να σχηματιστεί μία στιβάδα πάχους περίπου 0.5cm. Τα επιστρωμένα τρυβλία αφήνονται για λίγα λεπτά μέχρι να στερεοποιηθεί το περιεχόμενο διάλυμα LB-άγαρ και στη συνέχεια αποθηκεύονται στους 4°C αναποδογυρισμένα.

7.3.2 Κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση ανθρώπινης IRAP (E541R)

- QuikChange® II XL Kit (Agilent Technologies 2009)
- Αλληλουχία εκκινητών:

5'TCATCTGTTCAGTCTTCAGAACAAATTCGAGAAATGTTTGATTCTCTTTCC-3' (νοηματικός)

5'GGAAAGAGAATCAAACATTTCTCGAATTTGTTCTGAAGACTGAACAGATGA- 3' (αντι-νοηματικός)

- Πλασμίδιο: pcDNA6/myc-His
- Θερμικός κυκλοποιητής (Thermal Cycler)

Για την κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση E541R της ανθρώπινης IRAP χρησιμοποιήθηκε το QuikChange® II XL Kit σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας (Agilent Technologies). Συγκεκριμένα, στην αντίδραση σύνθεσης χρησιμοποιήθηκαν 5μL 10 × διαλύματος αντίδρασης (reaction buffer), 0.5μL (10ng) πλασμιδιακού DNA (dsDNA template), 0.5μL (125ng) από τον κάθε εκκινητή, 1μL μείγματος τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTP mix), 3μL Quik Solution και ddH₂O σε τελικό όγκο 50μL. Στη συνέχεια προστέθηκε 1μL DNA πολυμεράσης (*PfuUltra* HF DNA polymerase (2.5 U/μL) και ακολούθησε πολλαπλασιασμός του πλασμιδιακού DNA με μια αλυσιδωτή αντίδρασης πολυμεράσης στις συνθήκες του παρακάτω πίνακα 1.

	Κύκλοι	Θερμοκρασία	Χρόνος
1	1	95°C	1min
2	18	95°C	50 sec
2	10	60°C	50 sec
		68°C	1 min/kb of plasmid length
3	1	68°C	7min

<u>Πίνακας 1</u>: Παράμετροι των κύκλων της αντίδρασης σύνθεσης του μεταλλαγμένου κλώνου

Μετά τους θερμικούς κύκλους το προϊόν της αντίδρασης κατεργάστηκε με περιοριστική ενδονουκλεάση Dpn I και επωάστηκε στους 37°C για 1 ώρα. Η Dpn I είναι ειδική για μεθυλιωμένο και ημι-μεθυλιωμένο DNA και χρησιμοποιείται για αποικοδόμηση του πατρικού πλασμιδιακού DNA και επιλογή του DNA που περιέχει τη μετάλλαξη.

7.3.3 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων (Transformation)

- Επιδεκτικά κύτταρα (XL10-Gold Ultracompetent Cells)
- Μερκατοαιθανόλη (Agilent Technologies)
- Θρεπτικό υλικό SOC (Invitrogen)

Μετασχηματισμός είναι μια μέθοδος εισαγωγής νέων γονιδίων (ξένου DNA) σε έναν οργανισμό. Τα κύτταρα που υφίστανται μετασχηματισμό έχουν προηγουμένως καταστεί επιδεκτικά (competent) ώστε να μπορούν με μεταβολή της θερμοκρασίας να εισαγάγουν στο εσωτερικό τους τον φορέα κλωνοποίησης μέσω οπών που φέρουν στην πλασματική τους μεμβράνη. Τα επιδεκτικά κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη προμηθεύτηκαν μαζί με το QuikChange® ΙΙ ΧL Kit και ήταν ανθεκτικά στα αντιβιοτικά τετρακυκλίνη και χλωροαμφενικόλη.

Για να λάβει χώρα ο μετασχηματισμός μεταφέρονται τα επιδεκτικά κύτταρα από τους -80°C όπου φυλάσσονται, σε πάγο για να αποψυχθούν. Εισάγονται 45µL επιδεκτικών κυττάρων σε αποστειρωμένο φιαλίδιο τύπου «Eppendorf», προστίθεται σε αυτά 2µL μερκαπτοαιθανόλης και αφήνονται σε πάγο για 10min (ήπια ανάδευση τους κάθε 2min). Στα φιαλίδια των κυττάρων προσθέτουμε 2µL πλασμιδιακού DNA (το οποίο έχει κατεργαστεί με Dpn I), ακολουθεί ήπια ανάδευση των συστατικών και τοποθέτησή τους σε πάγο για 30min. Έπειτα θερμαίνονται για 30sec στους 42°C και μεταφέρονται πάλι σε πάγο για 2min. Στη συνέχεια προστίθενται 500µL προθερμασμένου θρεπτικού μέσου SOC. Το φιαλίδιο με τα κύτταρα που έχουν υποστεί μετασχηματισμό εισάγεται σε επωαστικό κλίβανο σε θερμοκρασία 37°C υπό ανάδευση (220rpm) για 1h. Μετά την επώαση φυγοκεντρούμε τα φιαλίδια για 10min σε 10,000g.

7.3.4 Αναπαραγωγή πλασμιδιακού DNA

- Επωαστικός κλίβανος με σύστημα ανάδευσης (LabTech)
- Φυγόκεντρος (Sorval)
- Στείρα τρυβλία (Costar)
- Γυάλινη ράβδος
- Μεταλλικός βρόχος
- LB (Sigma)
- Άγαρ (Applichem)
- Αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό LB (25g/L)
- Αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό LB-άγαρ (15g άγαρ/ L διαλύματος LB)
- Αμπικιλλίνη (Applichem)

Μεταφέρονται 100μL μετασχηματισμένων βακτηρίων σε καθένα από 4 αποστειρωμένα τρυβλία και διασπείρονται με χρήση γυάλινης ράβδου. Σε ένα τρυβλίο δεν μεταφέρονται βακτήρια και χρησιμοποιείται ως τυφλό. Τα τρυβλία μεταφέρονται σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C για 16h, προς ανάπτυξη των μετασχηματισμένων βακτηρίων και σχηματισμό αποικιών.

Στη συνέχεια σε ένα αποστειρωμένο δοχείο εισάγονται 50mL αποστειρωμένου διαλύματος LB και αμπικιλλίνη (σε τελική συγκέντρωση 100μg/mL). Μεταφέρονται 3mL του διαλύματος LB-αμπικιλλίνη σε καθένα από τέσσερα αποστειρωμένα δοχεία συνολικού όγκου 50mL. Στα δοχεία αυτά μεταφέρεται μία μοναδική αποικία με τη χρήση αποστειρωμένου βρόχου. Σε ένα δοχείο που περιέχονται 10mL διαλύματος LBαμπικιλλίνης δεν προστίθεται αποικία βακτηρίων και χρησιμοποιείται η καλλιέργεια ως μάρτυρας (τυφλό). Τα τέσσερα δοχεία με τις καλλιέργειες των μετασχηματισμένων βακτηρίων καθώς και η καλλιέργεια-μάρτυρας μεταφέρονται σε επωαστικό κλίβανο σε θερμοκρασία 37°C υπό ανάδευση (220rpm) όλη νύχτα.

7.3.5 Απομόνωση και καθαρισμός πλασμιδιακού DNA

• PureLink[™] Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen)

Μετά την ανάπτυξη τους οι καλλιέργειες των μετασχηματισμένων βακτηρίων φυγοκεντρούνται για 15min στα 1.500g, 4°C. Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται σε 250μL ρυθμιστικού διαλύματος R3 (50mM Tris-HCl, pH 8.0, 10mM EDTA, 20mg/mL RNase A). Ακολουθεί αλκαλική λύση των κυττάρων με 250μL ρυθμιστικού διαλύματος L7 (200mM NaOH, 1% w/v SDS), ήπια ανάδευση τους και επώαση για 5min σε θερμοκρασία δωματίου. Το SDS διαλυτοποιεί τα φωσφολιπιδικά και πρωτεϊνικά συστατικά της κυτταρικής μεμβράνης, επιφέροντας λύση των κυττάρων και απελευθέρωση των κυτταρικών συστατικών. Το NaOH αποδιατάσσει το χρωμοσωμικό και πλασμιδιακό DNA καθώς και τις πρωτεΐνες. Η RNάση A, που προστίθεται στην αρχή της διαδικασίας, πέπτει επαρκώς το ελευθερούμενο RNA κατά την αλκαλική λύση.

Στη συνέχεια, προσθέτουμε 350μL από το διάλυμα κατακρήμνισης N4 (Precipitation Buffer), αναδεύουμε ήπια και φυγοκεντρούμε για 10min στα 12.000g. Το υπερκείμενο τοποθετείται για δέσμευση σε στήλη του Kit (Silica membrane Column) και φυγοκεντρούμε για 1min στα 12.000g. Απορρίπτουμε το έκλουσμα και εκπλέουμε τη στήλη με διαλύματα πλύσης W10 (500μL) και W9 (700μL), τα οποία περιέχουν αιθανόλη, φυγοκεντρούμε για 1min στα 12.000g κάθε φορά και απορρίπτουμε τα εκλούσματα. Η χαμηλή συγκέντρωση αλκοόλης στο ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης μειώνει τις μη ειδικές υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις ενισχύοντας πιο πολύ την καθαρότητα του προσδεδεμένου DNA. Το DNA στη συνέχεια εκλούεται από το φίλτρο με προθερμασμένο στους 65-70°C ρυθμιστικό διάλυμα TE (10mM Tris·Cl, pH 8.0, 1mM EDTA) και φυγοκέντρηση για 2min στα 12.000g. Το έκλουσμα αντιστοιχεί στο καθαρό πλασμιδιακό DNA. Η συγκέντρωση και η καθαρότητα του πλασμιδιακού DNA μετρήθηκε σε όργανο Nano-Drop με μέτρηση της απορρόφησης στα 260 και 280nm. Στην εικόνα 19 παρουσιάζεται σχηματικά η πορεία που ακολουθήσαμε για την απομόνωση και των καθαρισμό του πλασμιδιακού DNA που έφερε την επιθυμητή μετάλλαξη.





(Τροποποιημένη εικόνα από το PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit, July 2005, Invitrogen)

7.3.6 Αλυσιδωτή Αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

- Ρυθμιστικό διάλυμα 10mM Tris-HCl pH 8.3, 50mM KCl 1.5mM MgCl
- Τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPS)
- Ταq DNA πολυμεράση
- Πλασμιδιακό DNA
- Ζεύγος εκκινητών:

5'-ΤCATCTGTTCAGTCTTCAGAACAAATTCGAGAAATGTTTGATTCTCTTTCC-3' (νοηματικός) 5'GGAAAGAGAATCAAACATTTCTCGAATTTGTTCTGAAGACTGAACAGATGA-3' (αντι-νοηματικός)

<u>Βασική αρχή αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)</u>

Η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR, Polymerase Chain Reaction) είναι μια *in-vitro* ενζυμική μέθοδος πολλαπλασιασμού αλληλουχιών του DNA, μεγάλης ευαισθησίας. Με τη χρήση της PCR τεχνολογίας του DNA μια συγκεκριμένη περιοχής του γονιδιώματος μπορεί να πολλαπλασιαστεί δισεκατομμύρια φορές υπό τον όρο ότι είναι γνωστή η νουκλεοτιδική του αλληλουχία. Η αλληλουχία του γονιδίου (ή του DNA θραύσματος) είναι απαραίτητη για το σχεδιασμό συνθετικών DNA ολιγονουκλεοτιδίων το καθένα συμπληρωματικό ως προς τη μια από τις αλυσίδες του δίκλωνου DNA. Τα ολιγονουκλεοτίδια που θα χρησιμοποιηθούν ως εκκινητές πρέπει να δεσμεύονται σε θέσεις αντίθετες από την αλληλουχία που πρόκειται να ενισχυθεί.

Ένας πλήρης κύκλος μιας PCR αντίδρασης περιλαμβάνει τρία στάδια:

- Αρχικά το DNA-στόχος μετουσιώνεται, με θέρμανση στους 92-95°C για 30 δευτερόλεπτα περίπου. Στο στάδιο αυτό το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται σε δύο μονόκλωνα μόρια.
- 2. Στη συνέχεια τα δύο συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (εκκινητές ή primers) συνδέονται ειδικά στους δύο κλώνους του DNA στόχου (primers annealing). Σε αυτό το στάδιο η θερμοκρασία ελαττώνεται στους 50-65°C για 1-2min ανάλογα με το ποσό των βάσεων Α/Τ, G/C των εκκινητών.
- 3. Τέλος, με τη δράση του ενζύμου Ταq DNA πολυμεράσης προστίθενται συμπληρωματικές βάσεις δεοξυριβονουκλεοτιδίων στο 3΄ άκρο κάθε εκκινητή και η αλυσίδα επιμηκύνεται. Η διαδικασία της επιμήκυνσης διαρκεί 1-2min και πραγματοποιείται στους 70-78°C.

Οπότε σχηματίζονται δύο καινούργιοι κλώνοι DNA συμπληρωματικοί ως προς τους δύο κλώνους του αρχικού DNA με αποτέλεσμα το διπλασιασμό του DNA στόχου. Ο επόμενος κύκλος ξεκινά πάλι απο το στάδιο 1 όπου γίνεται μετουσίωση των σχηματιζόμενων μορίων DNA. Όλη η αντίδραση PCR ολοκληρώνεται στο ίδιο μίγμα αντιδραστηρίων, για το οποίο απαιτούνται: DNA στόχος, εκκινητές (primers), τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια, Taq DNA πολυμεράση, ιόντα Mg²⁺ απαραίτητα για την ενζυμική δράση και κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα pH περίπου ίσο με 8.3 για τη δράση του ενζύμου.

<u>Συστατικά της PCR</u>

<u>DNA πολυμεράση</u>: Η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη DNA πολυμεράση είναι η Taq πολυμεράση. Η Taq πολυμεράση είναι μια θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση, η οποία απομονώθηκε από το βακτηρίδιο Thermus aquatiqus (Taq) και έχει την ιδιότητα να είναι ενεργή ακόμα και στους 95°C, θερμοκρασία η οποία απαιτείται για τη μετουσίωση του DNA στόχου. Η Taq DNA πολυμεράση είναι το ένζυμο που καταλύει την επιμήκυνση των εκκινητών. Το ένζυμο παρουσιάζει 5'→3' δράση εξωνουκλεάσης. Η βέλτιστη συγκέντρωση της θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης είναι μεταξύ 0.5 και 2.5units/50μL όγκος αντίδρασης.

Ολιγονουκλεοτίδια – Εκκινητές: Το μήκος των ολιγονουκλεοτιδίων που θα χρησιμοποιηθούν ως εκκινητές κυμαίνεται μεταξύ 15-25 νουκλεοτιδίων. Οι εκκινητές θα πρέπει να περιέχουν 40-60% γουανίνη (G) και κυτοσίνη (C), να έχουν παραπλήσιο αριθμό βάσεων G/C, να μην παρουσιάζουν συμπληρωματικότητα στα 3' ή 5' άκρο ώστε να αποφεύγεται ο σχηματισμός διμερών και η απόσταση τους να είναι μεγαλύτερη των 100 βάσεων ώστε να επιτρέπεται ο σχηματισμός του νέου κλώνου DNA. Οι εκκινητές θα πρέπει επίσης να έχουν παραπλήσια θερμοκρασία αποδιάταξη ή τήξης, Tm.

• <u>Ρυθμιστικά διαλύματα:</u> Το πιο κοινό ρυθμιστικό διάλυμα της PCR περιέχει 10mM Tris-HCI (pH 8.3), 50mM KCI και 1.5mM MgCl. Η παρουσία των ιόντων Mg είναι σημαντική για τη δράση της DNA πολυμεράσης. Τα ιόντα Mg σχηματίζουν διαλυτά σύμπλοκα με τα dNTPs ώστε να δημιουργήσουν το πραγματικό υπόστρωμα που αναγνωρίζει η πολυμεράση. Η συγκέντρωση των ελεύθερων ιόντων Mg εξαρτάται από τις συγκεντρώσεις των ενώσεων που δεσμεύουν το ιόν μεταξύ των οποίων τα dNTPs, το EDTA και φωσφορικά ιόντα. Περίσσεια ιόντων Mg στην αντίδραση μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τη μη ειδική πρόσδεση των εκκινητών και να οδηγήσει στο σχηματισμό μη ειδικών προϊόντων.

• <u>Τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs)</u>: Τα dNTPs χρησιμοποιούνται σε συγκεντρώσεις κορεσμού (200µM το καθένα). Γενικά οι συγκεντρώσεις των dNTPs κυμαίνονται μεταξύ 50-200µM καθώς υψηλότερες συγκεντρώσεις μπορεί να οδηγήσουν στο σχηματισμό παραπροϊόντων από την πολυμεράση. Τα dNTPs ενώνονται με τα Mg²⁺ και το ποσό των dNTPs προσδιορίζει από το ποσό των διαθέσιμων ιόντων Mg²⁺, καθώς έλλειψη ισορροπίας στο μίγμα των dNTPs μειώνει την πιστότητα της Taq DNA πολυμεράσης.

 <u>Αλληλουχίες - στόχοι</u>: Το DNA που περιέχει την αλληλουχία - στόχο μπορεί να προστεθεί στο μίγμα αντίδρασης της PCR σε μονόκλωνη αλλά και δίκλωνη μορφή.

<u>Πορεία PCR</u>

Για την πορεία της PCR χρησιμοποιήθηκαν 25ng πλασμιδιακού DNA ενώ οι συγκεντρώσεις των εκκινητών ήταν 0.3μΜ. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με προσθήκη: 2.5μL ρυθμιστικού διαλύματος (10mM Tris-HCI pH 8.3, 50mM KCI, 50mM

MgCl), 1μL δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs), 0.15μL Taq DNA πολυμεράσης και milli-Q νερό σε τελικό όγκο 25μL. Η ενίσχυση και ο πολλαπλασιασμός του πλασμιδιακού DNA πραγματοποιήθηκε στις συνθήκες που αναγράφονται στον ακόλουθο πίνακα 2.

	Κύκλοι	Θερμοκρασία	Χρόνος
1	1	95°C	5min
2	30	95°C	30 sec
Z	30	55°C	30 sec
		72°C	45 sec
3	1	72°C	5min

Πίνακας 2: Παράμετροι αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης

7.3.7 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης

- Συσκευή ηλεκτροφόρησης, Wide Mini-sub cell (Biorad)
- Αγαρόζη (Biodiagnostics S.A.)
- Ρυθμιστικό διάλυμα 50 x TAE (Tris-CH₃COOH 0.05M, EDTA 0.05M, pH 8.3)
- Ρυθμιστικό διάλυμα 1 x TAE (Γίνεται αραίωση 10mL διαλύματος 50 x TAE με Η₂Ο σε συνολικό όγκο 500mL)
- Βρωμιούχο αιθίδιο (Sigma)
- Τράπεζα UV (Vilber Loumat 365/312 nm)

Παρασκευή πηκτής αγαρόζης:

Παρασκευάζεται πηκτή διαχωρισμού με ανάμιξη 1g αγαρόζης με 100mL ρυθμιστικού διαλύματος 1 x TAE. Το μίγμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων στα 350watt ώστε να γίνει διαυγές. Στη συνέχεια, αφήνεται να επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου και προσθέτουμε 100μL βρωμιούχου αιθιδίου. Μετά από ανάδευση για να αναμιχθεί καλά το βρωμιούχο αιθίδιο με το μίγμα αγαρόζης, αποχύνεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, τοποθετείται ειδικό χτενάκι και αφήνεται να στερεοποιηθεί.

<u>Διαχωρισμός DNA με Ηλεκτροφόρηση:</u>

- Μίγματα προτύπων μορίων DNA (GeneRuler™ 1kb DNA ladder, Fermentas)
- 6 x διάλυμα φόρτωσης και βαφής δείγματος, loading dye (Fermentas)

Η συσκευή ηλεκτροφόρησης γεμίζεται με ρυθμιστικό διάλυμα 1 x TAE και τα δείγματα φορτώνονται στα πηγαδάκια της πηκτής αγαρόζης. Η ηλεκτροφόρηση έγινε με σταθερή τάση 70V για ~75min. Λαμβάνει χώρα διαχωρισμός του DNA και οι εμφανιζόμενες ζώνες είναι διακριτές σε τράπεζα UV. Η εμφάνιση των ζωνών είναι δυνατή καθώς το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβάλλεται στις βάσεις του DNA και φθορίζει υπό την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας. Η πηκτή αγαρόζης φωτογραφίζεται εκτεθημένη σε υπεριώδες φως.

7.4. Έκφραση μεταλλαγμένης IRAP (E541R)

Από το προϊόν της PCR διαπυστώθηκε πως ήταν επιτυχής η μεταλλαξιγένεση E541R της ανθρώπινης IRAP με την τεχνική της αλληλούχισης DNA (DNA sequencing). Στη συνέχεια, επιμολύναμε κύτταρα θηλαστικού 293F με το πλασμιδιακό DNA, ώστε να εκφράσουμε την ανθρώπινη ανασυνδιασμένη πρωτεΐνη IRAP που φέρει τη συγκεκριμένη μετάλλαξη.

7.4.1 Κύτταρα θηλαστικού 293F

Τα κύτταρα 293F είναι κύτταρα από νεφρά ανθρώπου που έχουν ανασυνδυαστεί με DNA αδενοϊού τύπου 5. Το E1A γονίδιο του αδενοϊού εκφράζεται σ' αυτά τα κύτταρα και συμμετέχει στην ενεργοποίηση ιικών εκκινητών, επιτρέποντας στα κύτταρα να παράγουν υψηλές ποσότητες πρωτεΐνης. Ο αδενοϊός, ωστόσο, έχει καταστεί ακίνδυνος για τα ανθρώπινα κύτταρα εφόσον έχουν απομακρυνθεί από αυτόν τα γονίδια τα υπεύθυνα για την έναρξη του λυτικού του κύκλου.

7.4.2 Επώαση κυττάρων 293Ε

- Απαγωγός κάθετης νηματικής ροής (MICROFLOW, Microsafe SL)
- Επωαστικός θάλαμος σταθερής θερμοκρασίας (37°C) και παροχής CO₂ (8%) (Heal FORCE®, HF90)
- Κυκλικά περιστρεφόμενος αναδευτήρας (Heidolph Rotamax 120)
- Αποστειρωμένα σιφώνια (Greiner bio-one)
- Θρεπτικό υλικό FreeStyle[™] 293 Expression Medium (Invitrogen)
- Αποστειρωμένες φιάλες καλλιέργειας Erlenmeyer
- Φυγόκεντρος (Hellenic Labware, K-100R)

Τα κύτταρα επωάζονται υπό μορφή αιωρήματος σε αποστειρωμένες φιάλες Erlenmeyer στους 37°C, εντός επωαστικού κλιβάνου, σε υγρή ατμόσφαιρα και σταθερή παροχή 8% CO₂. Οι φιάλες βρίσκονται πάνω σε κυκλικά περιστρεφόμενο αναδευτήρα (125rpm) ώστε να επιτυγχάνεται ανακύκλωση του CO₂ και καλός αερισμός των κυττάρων στις φιάλες
μέσω ημιπερατής μεμβράνης που διαθέτουν στο πώμα τους. Ο χειρισμός των κυττάρων γίνεται σε στείρες συνθήκες, εντός απαγωγού κάθετης νηματικής ροής, προκειμένου να αποφευχθεί η μόλυνσή τους από κάποιο βακτήριο ή μύκητα.

Τα κύτταρα επωάστηκαν σε θρεπτικό υλικό FreeStyle[™] 293 Expression Medium απουσία συστατικών ορού. Η συγκέντρωση των κυττάρων που βρίσκονται σε αιώρημα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 10⁵- 10⁶ κύτταρα/mL. Όταν η συγκέντρωση τους αυξηθεί και ξεπεράσει τα επιθυμητά όρια αραιώνονται ώστε η τελική συγκέντρωση του αιωρήματος να γίνει 1-2 x 10⁵ κύτταρα/mL. Τα 293-F κύτταρα διπλασιάζονται τυπικά μέσα σε 24 ώρες, αν και η ανάπτυξή τους εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως η πρόσφατη ή όχι απόψυξή τους, ο αριθμός ανακαλλιεργειών που έχουν υποστεί, κ.ά.

7.4.3 Επιμόλυνση κυττάρων 293F (TRANSFECTION)

- Αντιδραστήριο 93fectin[™] (Invitrogen)
- Opti-MEM I (Invitrogen)
- Πλασμιδιακό DNA που φέρει τη μετάλλαξη IRAP E541R
- Θρεπτικό υλικό FreeStyle[™] 293 Expression Medium (Invitrogen)
- Φυγόκεντρος (Hellenic Labware K-100R)

Πριν την επιμόλυνση τα κύτταρα θα πρέπει να έχουν ανακαλλιεργηθεί το λιγότερο 2 φορές ώστε να έχουν ανακάμψει από την απόψυξη και το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων να ξεπερνά το 90%. Για την επιμόλυνση χρησιμοποιείται το αντιδραστήριο 293fectinTM, ένα κατιονικό αντιδραστήριο λιπιδικής σύστασης κατάλληλο για υψηλής απόδοσης επιμόλυνση κυττάρων 293F. Συγκεκριμένα το 293fectin δημιουργεί λιπιδικά συμπλέγματα DNA-293 fectin, όταν αναμιχθεί με το πλασμιδιακό DNA που φέρει το προς έκφραση γονίδιο, καθώς λαμβάνει χώρα αλληλεπίδραση μεταξύ του αρνητικά φορτισμένου DNA με το θετικά φορτισμένο 293fectin. Τα συμπλέγματα αυτά συντήκονται με την πλασματική μεμβράνη των προς επιμόλυνση κυττάρων και έτσι επιτυγχάνεται εισαγωγή και έκφραση του επιθυμητού γονιδίου. Πριν την ανάμιξή τους, τόσο το 293 fectin καθώς και το πλασμιδιακό DNA διαλυτοποιούνται σε Opti-MEM I, ένα μέσο καλλιέργειας που διευκολύνει το σχηματισμό των συμπλεγμάτων DNA-293fectin. Το πλασμιδιακό DNA που χρησιμοποιείται πρέπει να είναι αποστειρωμένο, απαλλαγμένο από φαινόλη και αλάτι. Καθώς οι διάφορες προσμίξεις και η φαινόλη μπορεί να σκοτώσουν τα κύτταρα ενώ το αλάτι μειώνει την απόδοση της επιμόλυνσης, αφού εμπλέκεται στο σχηματισμό των συμπλεγμάτων DNA-293fectin.

Η συγκέντρωση των προς επιμόλυνση κυττάρων θα πρέπει να είναι 10⁶ κύτταρα/mL. Διαλυτοποιούμε 30μg πλασμιδιακού DNA σε Opti-MEM I σε συνολικό όγκο 1mL και ακολουθεί ήπια ανάδευση. Επίσης, διαλυτοποιούνται 60μL 293fectin σε Opti-MEM I σε συνολικό όγκο 1mL, το διάλυμα αναδεύεται ήπια και επωάζεται για 5min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί ανάμιξη του διαλύματος DNA με το διάλυμα 293fectin και ήπια ανάδευση. Το διάλυμα επωάζεται για 20-30min σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να σχηματιστούν τα συμπλέγματα DNA-293fectin. Φυγοκεντρούμε τα κύτταρα 293F και τα επαναιωρούμε σε προθερμασμένο στους 37°C θρεπτικό μέσο. Στο αιώρημα των κυττάρων προσθέτουμε στάγδην και υπό ανάδευση τα 2mL του διαλύματος DNA-293fectin. Τα κύτταρα μεταφέρονται στον επωαστικό και μετά από 48 ώρες το αιώρημα φυγοκεντρείται (20min, 1000g) και διαχωρίζεται το υπερκείμενο διάλυμα από τα κύτταρα.

7.4.4 Καθαρισμός μεταλλαγμένης ΙRAP με στήλη συγγενείας

Το υπερκείμενο του επιμολυσμένου αιωρήματος υποβάλλεται σε 3 διαπιδύσεις και δέσμευση σε στήλη NiNTA, με το ίδιο πρωτόκολλο καθαρισμού όπως περιγράφηκε για τις πρωτεΐνες ERAP1, ERAP2 και την IRAP WT (wild type). Η έκλουση της πρωτεΐνης έγινε με ρυθμιστικά διαλύματα αυξανόμενης συγκέντρωσης ιμιδαζολίου: 5, 10, 20 και 150mM. Συλλέγονται τα κλάσματα που παρουσιάζουν την μεγαλύτερη δραστικότητα αμινοπεπτιδάσης στην φθορισμομετρική δοκιμασία με υπόστρωμα LAMC (όπως έχει ήδη αναφερθεί) και συμπυκνώνονται με φυγοκέντρηση στα 10,000g υπό ψύξη σε φίλτρα Ultrafree-4 (Millpore).

7.5. <u>Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου κάτω από</u> <u>αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)</u>

- Tris (Applichem)
- Διάλυμα ακρυλαμιδίου/Ν-Ν'-μεθυλενο-δις-ακρυλαμιδίου 30% (Sigma)
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris 1.5M pH 8.8
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris 1.0M pH 6.8
- Διάλυμα 10% w/v δωδεκυλοθειϊκού vατρίου (SDS) (Sigma)
- Διάλυμα 10% w/v υπερθειϊκού αμμωνίου (APS) (Sigma)
- Ν,Ν-τετραμεθυλοαιθυλοδιαμίνη (TEMED) (Sigma)
- 5 x διάλυμα φόρτωσης δείγματος (sample loading buffer): 900μL 1M Tris-HCl pH
 6.8, 3.75mL γλυκερόλη, 3mL SDS 10%, 1.5mL 2-μερκαπτοαιθανόλη και 750μL
 κυανούν της βρωμοφαινόλης 1%
- Κυανούν της βρωμοφαινόλης (bromophenol blue, BPB): Το BPB είναι βαφήδείκτης. Επειδή είναι αρνητικά φορτισμένο σε pH>4.6 κινείται προς την κάθοδο.
 Λόγω του ότι είναι μικρό μόριο κινείται πιο γρήγορα στην πηκτή από τις πρωτεΐνες
- Πρότυπο διάλυμα πρωτεϊνών (Prestained Protein Marker Broad Range, Cell Signaling Technology). Περιέχει: β-γαλακτοσιδάση που έχει υποστεί συγχώνευση

με την πρωτεΐνη που προσδένεται σε μαλτόζη (175kDa), παραμυοσίνη που έχει υποστεί συγχώνευση με την πρωτεΐνη που προσδένεται σε μαλτόζη (83kDa), καναβιδιόλη που έχει υποστεί συγχώνευση με την πρωτεΐνη που προσδένεται σε μαλτόζη (62kDa), αλδολάση (47.5kDa), τριοζοφωσφορική ισομεράση (32.5kDa), β-λακτογλοβουλίνη Α (25kDa), λυσοζύμη (16.5kDa), απροτινίνη (6.5kDa).

- 10 x διάλυμα ηλεκτροφόρησης (running buffer): 30gr Tris, 143.5g γλυκίνη, 10g SDS
- Πρότυπο διάλυμα πρωτεϊνών
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης (Biorad)

Ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός των μορίων βασίζεται στην κίνηση φορτισμένων μορίων μέσα σε πηκτή ή στην επιφάνεια κάποιου υλικού (μεμβράνες οξικής κυτταρίνης) κάτω από την επίδραση ενός εξωτερικά εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού πεδίου. Τα φορτισμένα μόρια υπό την επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου αναγκάζονται να κινηθούν προς τον αντίθετα φορισμένο πόλο. Η πηκτή λειτουργώντας ως μοριακός ηθμός καθιστά ευκολότερους τους διαχωρισμούς μορίων. Τα μόρια που είναι μικρά σε σχέση με τους πόρους της πηκτής μετακινούνται εύκολα δια μέσου αυτής, ενώ τα μεγάλα μόρια παραμένουν σχεδόν αμετακίνητα. Μόρια ενδιάμεσου μεγέθους μετακινούνται μέσα στην πηκτή με διαφορετικές ταχύτητες. Έτσι, μόρια που φέρουν το ίδιο φορτίο διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθός τους. Οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου είναι προτιμητέες για ηλεκτροφόρηση, γιατί αποτελούνται από χημικά ουδέτερες ενώσεις και παρασκευάζονται εύκολα. Επίσης, το μέγεθος των πόρων μπορεί να ρυθμιστεί με την επιλογή διαφορετικών συγκεντρώσεων ακρυλαμιδίου και μεθυλενοδισακρυλαμιδίου (του απαραίτητου αντιδραστηρίου για τις διασυνδέσεις) κατά τον πολυμερισμό για τον σχηματισμό της πηκτής.

Ο πολυμερισμός επιταχύνεται λόγο της παρουσία APS, που παίζει το ρόλο του εκκινητή ο οποίος δημιουργεί ελεύθερες ρίζες, καθώς και TEMED που καταλύει τη διάδοση των ελευθέρων ριζών. Η ηλεκτροφόρηση λαμβάνει χώρα κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες καθώς στα δείγματα των πρωτεϊνών προστίθεται δωδεκυλοθειϊκό νάτριο, ένα ανιοντικό απορρυπαντικό που καταστρέφει σχεδόν όλες τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών και τις αποδιατάσσει. Το αρνητικά φορτισμένο SDS δεσμεύεται στις μετουσιωμένες πρωτεΐνες σε αναλογία ένα μόριο SDS ανά δύο αμινοξέα. Έτσι μετά τη δέσμευση του SDS οι πρωτεΐνες αποκτούν ένα αρκετά μεγάλο αρνητικό φορτίο οπότε το αρχικό τους φορτίο τους καθίσταται αμελητέο και δεν επιδρά στο διαχωρισμό τους. Τα αρνητικά σύμπλοκα πρωτεΐνης-SDS κινούνται από την κάθοδο προς την άνοδο και οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση το μέγεθος τους. Επιπλέον, προσθέτουμε μερκαπτοαιθανόλη, η οποία ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς των πρωτεϊνών συμβάλλοντας και αυτή στην αποδιάταξη τους.

7.5.1 <u>Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμιδίου</u>

Σε αυτό το είδος ηλεκτροφόρησης η πηκτή του πολυακρυλαμιδίου δημιουργείται από τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου παρουσία του δωδεκυλοθειϊκού νατρίου (SDS), ενός ανιοντικού απορρυπαντικού που καταστρέφει σχεδόν όλες τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μιας φυσικής πρωτεΐνης. Η πηκτή αποτελείται από δύο μέρη: την πηκτή διαχωρισμού (separating gel), που αποτελεί την περιοχή όπου γίνεται ο διαχωρισμός των μορίων και την πηκτή επιστίβασης (stacking gel), που εξασφαλίζει την ταυτόχρονη είσοδο των μορίων στην περιοχή διαχωρισμού.

Παρασκευάστηκε πηκτή διαχωρισμού πυκνότητας ακρυλαμιδίου 10% που περιέχει τα εξής: H₂O (2.0mL), 1.5M Tris-HCl pH 8.8 (1.25mL), 10% SDS (50µL), 30% ακρυλαμίδιο (1.65mL), TEMED (4µL) και 10% APS (200µL). Καθώς και πηκτή επιστίβασης με σύσταση: H₂O (1.7mL), 1M Tris-HCl pH 6.8 (315µL), 10% SDS (25µL), 30% ακρυλαμίδιο (415µL), TEMED (5µL) και 10% APS (50µL).

7.5.2 Ηλεκτροφόρηση και προετοιμασία δειγμάτων

Στα δείγματα πριν τοποθετηθούν στην πηκτή προστίθεται διάλυμα φόρτωσης δείγματος σε όγκο που να αντιστοιχεί στο 1/4 του όγκου του δείγματος της πρωτεΐνης και θερμαίνονται για 5min στους 95°C. Η ηλεκτροφόρηση έγινε κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες καθώς τόσο η θέρμανση όσο και το γεγονός ότι το ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης περιέχει SDS και μερκαπτοαιθανόλη οδηγούν στην αποδιάταξη των πρωτεϊνικών μορίων. Κατά την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται και πρότυπο μίγμα πρωτεϊνών. Η συσκευή γεμίζεται με 1 x διάλυμα ηλεκτροφόρησης έτσι ώστε να καλύπτεται πλήρως η πηκτή. Στο ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης περιέχεται γλυκερόλη, η οποία αυξάνει το συνολικό βάρος του μίγματος και επιτρέπει την καλύτερη είσοδο και τοποθέτηση των δειγμάτων στα πηγαδάκια. Τα δείγματα τοποθετούνται στην πηκτή και στη συνέχεια, γίνεται ηλεκτροφόρηση τους υπό σταθερή τάση 90V για το διάστημα που διατρέχουν την πηκτή επιστίβασης. Εφόσον τα δείγματα περιέλθουν στην πηκτή διαχωρισμού η ηλεκτροφόρηση συνεχίζεται με σταθερή τάση 100V για περίπου 1h.

7.6. Ανίχνευση και εμφάνιση διαχωρισμένων πρωτεϊνών

7.6.1 <u>Χρώση με Νιτρικό Άργυρο (Silver Stain)</u>

- Διάλυμα σταθεροποίησης (Fixing Solution): 50% αιθανόλη, 12% οξικό οξύ, 50μL φορμαλδεΰδη (37% v/v)
- Διάλυμα πλύσης (Rinse Solution): 50% αιθανόλη
- Διάλυμα ευαισθητοποίησης (Sensitizer): 8.3μL 3M Na₂S₂O₃
- Διάλυμα χρώσης (Stain): 0.2% νιτρικός άργυρος, 25μL φορμαλδεΰδη (37% v/v)

 Διάλυμα ανάπτυξης (Developer): 3.2g ανθρακικό νάτριο, 50μL φορμαλδεΰδη (37% v/v), 5μL 3M Na₂S₂O₃

Η χρώση με νιτρικό άργυρο αποτελεί μια διαδικασία ανίχνευσης πρωτεϊνών με αρκετά μεγάλη ευαισθησία (100 -1000 φορές μεγαλύτερη ευαισθησία από τη χρώση με Coomassie Brilliant Blue). Η τεχνική αυτή μας δίνει τη δυνατότητα να ανιχνεύσουμε πρωτεϊνες μέχρι και 0.1-1ng. Η τεχνική βασίζεται στην σύνδεση των ιόντων αργύρου με τις πλευρικές ομάδες των αμινοξέων της πρωτεϊνης (κυρίως με τις καρβοξυλικές και σουλφιδικές) με αποτέλεσμα τη αναγωγή των δεσμευμένων ιόντων αργύρου και τη δημιουργία οξειδοαναγωγικού δυναμικού μεταξύ των περιοχών της πρωτεϊνικές ζώνες εμφανίζονται ως κηλίδες στις περιοχές της πηκτής που συμβαίνει η αναγωγή των ιόντων αργύρου [112].

Η πηκτή με τις διαχωρισμένες πρωτεΐνες απομακρύνεται από το sandwich ηλεκτροφόρηση και τοποθετείται σε δοχείο με υπερ-καθαρό νερό (milli-Q) έτσι ώστε όλη η επιφάνεια της πηκτής να καλύπτεται από το νερό. Η πηκτή παραμένει στο νερό για 30min υπό συνεχή ανακίνηση. Στη συνέχεια απομακρύνεται το νερό, αντικαθίσταται με το διάλυμα σταθεροποίησης (Fixing) και αναδεύεται για 10min. Το διάλυμα αυτό περιορίζει τη μετακίνηση των πρωτεϊνών από την πηκτή και απομακρύνει τα ιόντα και το απορρυπαντικό από αυτή. Ακολουθούν εκπλύσεις με το διάλυμα πλύσης (Rinse) για 5min, το διάλυμα ευαισθητοποίησης (Sensitizer) για 1min, 3 μονόλεπτες πλύσεις με milli-Q νερό και επώαση της με το προψυγμένο διάλυμα χρώσης (Stain) για 20min. Τέλος πλένουμε 2 φορές με milli-Q νερό, για απομάκρυνση της περίσσειας των αδέσμευτων ιόντων αργύρου και εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών με το διάλυμα ανάπτυξης (Developer). Η αντίδραση σταματάει όταν λάβουμε την επιθυμητή ένταση ζωνών με το διάλυμα σταθεροποίησης (Fixing).

7.6.2 <u>Χρώση με Coomassie Brilliant Blue</u>

- Διάλυμα χρωστικής: 1g Coomassie Brilliant Blue, 480mL μεθανόλη, 100mL οξικό οξύ. Το διάλυμα συμπληρώνεται ως το 1L με απεσταγμένο νερό.
- > Διάλυμα αποχρωματισμού (destaining buffer): 5% οξικό οξύ

Η πηκτή με τις διαχωρισμένες πρωτεΐνες απομακρύνεται από το sandwich ηλεκτροφόρησης και τοποθετείται σε δοχείο με διάλυμα της χρωστικής Coomassie Blue, έτσι ώστε όλη η επιφάνεια της πηκτής να καλύπτεται από το διάλυμα. Η πηκτή παραμένει στο διάλυμα της χρωστικής για 10min υπό συνεχή ανακίνηση. Στη συνέχεια το διάλυμα της χρωστικής απομακρύνεται από το δοχείο και ο αποχρωματισμός της βαμμένης μπλε πηκτής γίνεται με προσθήκη στο διαλύματος αποχρωματισμού σε τέτοιο όγκο που να καλύπτεται η επιφάνεια της πηκτής. Μέσα στο δοχείο τοποθετούνται διπλωμένα κομμάτια χαρτοπετσέτας για να διευκολύνουν τον αποχρωματισμό της πηκτής απορροφώντας τη χρωστική.

7.7. <u>S1 Ειδικότητα αμινοπεπτιδασών</u>

Χρησιμοποιήσαμε μια συλλογή 82 φθοριζόντων υποστρωμάτων για να προσδιορίσουμε την Ν-τελική εκλεκτικότητα των τριών αμινοπεπτιδασών. Η συλλογή συντέθηκε στην Πολωνία από την ομάδα της Marcin Drag και περιλάμβανε 82 υποστρώματα φυσικών και μη φυσικών αμινοξέα τα οποία ήταν ομοιοπολικά συνδεδεμένα με μια φθορίζουσα ομάδα την 7-αμινο-4 καρβαμοϋλο- μεθυλο- κουμαρίνη (ACC), σχεδιασμένα έτσι ώστε οι πλευρικές ομάδες των αμινοξέων να δεσμεύονται στον S1 θύλακα ειδικότητας των ενζύμων. Τα περισσότερα υποστρώματα της συλλογής διαθέτουν ελεύθερη ααμινομάδα, καθώς σχεδιάστηκε για αμινοπεπτιδάσες, ωστόσο υπήρχαν και υποστρώματα με ορισμένες παραλλαγές, όπως για παράδειγμα μια ελεύθερη αυδροξυλομάδα ή ελεύθερη β-αμινομάδα, οι δομές όλων των υποστρωμάτων περιλαμβάνονται στο παράρτημα (πίνακας I).

7.7.1 Συσχέτιση σήματος φθορισμού με τη συγκέντρωση 7-αμινο-4 καρβαμοϋλο μεθυλο κουμαρίνη (ACC)

- Φθορισμόμετρο TECAN infinite® M200
- 7-αμινο-4 καρβαμοϋλο- μεθυλο- κουμαρίνη (ACC)
- Ρυθμιστικό διάλυμα 50mM Hepes, 100mM NaCl (pH 7.0)
- Μικροπλάκες TECAN 96 κελιών μαύρες (micro plates)

Παρασκευάζονται διαλύματα 0.05, 0.1, 0.2, 0.3 και 0.4μM ACC με αραίωση του σε ρυθμιστικό διάλυμα 50mM Hepes, 100mM NaCl, pH 7.0. Η διέγερση του διαλύματος ACC γίνεται στα 380nm ενώ η εκπομπή φθορισμού παρακολουθείται στα 460nm. Από την καμπύλη βαθμονόμησης, πραγματοποιήθηκε η συσχέτιση του σήματος φθορισμού με τη συγκέντρωση προϊόντος (ACC).

7.7.2 Σχεδιασμός βέλτιστων πειραματικών συνθηκών

Πριν προβούμε στον ποσοτικό προσδιορισμό της ταχύτητας υδρόλυσης των υποστρωμάτων της συλλογής από τις αμινοπεπτιδάσες ERAP1, ERAP2 (392N) και IRAP έπρεπε να καθοριστούν οι βέλτιστες πειραματικές συνθήκες κάτω από τις οποίες η ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης δεν επηρεάζεται από εξωτερικούς παράγοντες όπως το pH, η συγκέντρωση του ενζύμου, η συγκέντρωση του υποστρώματος, η θερμοκρασία και ο χρόνος των μετρήσεων.

Σύμφωνα με προηγούμενη μελέτη [69], βέλτιστο pH για τη δράση και των τριών ενζύμων είναι το 7.0, επιπλέον και οι τρεις είναι αρκετά σταθερές στους 24°C για σύντομο χρονικό διάστημα (5-10min). Έτσι η ενζυμική δοκιμασία πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα 50mM Hepes, 100mM NaCl pH 7.0, στους 24 °C.

Στη συνέχεια για να επιλέξουμε τη βέλτιστη συγκέντρωση υποστρώματος που θα χρησιμοποιούσαμε διεξάγαμε κινητική μελέτη με σκοπό τον προσδιορισμό της σταθερά Michaelis - Menten (K_{M}) του κάθε ενζύμου για το καλύτερο γνωστό υπόστρωμα. Γνωρίζοντας την προτίμηση των ERAP1 και IRAP για διπεπτίδια με λευκίνη στη θέση P1 καθώς και την προτίμηση της ERAP2 σε διπεπτίδια με θετικά φορτισμένη πλευρική αλυσίδα (αργινίνη) στη συγκεκριμένη θέση, πραγματοποιήσαμε τιτλοδότηση με αυξανόμενες συγκεντρώσεις υποστρώματος L- λευκινο 7-αμινο-4- καρβαμοϋλο μεθυλοκουμαρίνη (L-ACC) για τις ERAP1 και IRAP και L-αργυνινο 7-αμινο-4- καρβαμοϋλομεθυλο κουμαρίνη (R-ACC) για την ERAP2. Από τη χάραξη της καμπύλη Michaelis -Menten και υπολογίσαμε τη σταθερά K_M για την ERAP1 (μεγαλύτερη από 1mM), την IRAP (85 ± 30μM) και την ERAP2 (90 ± 3μM). Ακολούθως, επιλέξαμε να διεξάγουμε την ενζυμική δοκιμασία σε συγκέντρωση υποστρώματος τουλάχιστον δύο φορές χαμηλότερη από την τιμή της Κ_Μ ώστε να αποφύγουμε φαινόμενα κορεσμού του ενζύμου από το υπόστρωμα και τα δεδομένα της ταχύτητας να είναι ανάλογα της παραμέτρου k_{cat}/K_M που δηλώνει την εξειδίκευση ενός ενζύμου ως προς ένα υπόστρωμα μιας και βρισκόμαστε στην γραμμική περιοχή της καμπύλης Michaelis – Menten.

Τέλος, οι συγκεντρώσεις των ενζύμων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι χαμηλότερες δυνατές στις οποίες όμως λαμβάναμε ικανοποιητικό σήμα φθορισμού.

7.7.3 Φθορισμομετρική δοκιμασία

- Φθορισμόμετρο TECAN infinite® M200
- Βιβλιοθήκη φθοριζόντων υποστρωμάτων
- L-αργυνινο 7-αμιδο-4-μεθυλο- κουμαρίνη, R-AMC (Sigma-Aldrich)
- L- λευκινο 7-αμιδο-4-μεθυλο- κουμαρίνη, L-AMC(Sigma-Aldrich)
- Ρυθμιστικό διάλυμα 50mM Hepes, 100mM NaCl (pH 7.0)
- Μικροπλάκες TECAN 96 κελιών μαύρες (micro plates)

Η ταχύτητα υδρόλυση των υποστρωμάτων της συλλογής από τις ERAP1, ERAP2 (392N) και IRAP προσδιορίστηκε φθορισμομετρικά σε φθορισμόμετρο TECAN infinite® M200. Χρησιμοποιήθηκαν μαύρες μικροπλάκες 96 κελιών οι οποίες επιστρώθηκαν με τα υποστρώματα τελικής συγκέντρωσης 4μM για την IRAP και 10μM για τις ERAP1 και ERAP2 σε ρυθμιστικό διάλυμα 50mM Hepes, 100mM NaCl (pH 7.0) και στη συνέχεια επωάστηκαν με το ένζυμο, οι συγκεντρώσεις των ενζύμων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν

11.1nM για την ERAP1, 5.93nM για την ERAP2 και 3nM για την IRAP. Σε κάθε μικροπλάκα είχαμε τοποθετήσει ως θετικό μάρτυρα L-AMC ή R-AMC, στην ίδια συγκέντρωση με τα υποστρώματα της συλλογής για να μπορούμε να συγκρίνουμε τα αποτελέσματα μεταξύ διαφορετικών πλακών. Η εκπομπή φθορισμού μετρήθηκε για 5-10min στους 24°C, σε όλες τις περιπτώσεις η αύξηση του σήματος φθορισμού με την πάροδο του χρόνου ήταν γραμμική, από την κλίση της οποίας προσδιορίζαμε την αρχική ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης. Η διέγερση έγινε στα 380nm και η εκπομπή στα 460nm. Όλα τα πειράματα επαναλήφθηκαν τουλάχιστον τρεις φορές και τα αποτελέσματα αντιστοιχούν στο μέσο όρο. Τέλος για τα υποστρώματα στα οποία δεν λάβαμε σήμα φθορισμού η δοκιμασία επαναλήφθηκε σε υψηλότερη συγκέντρωση υποστρώματος (100μM).

Κάτω από τις ίδιες συνθήκες προσδιορίσαμε την ταχύτητα υδρόλυσης των υποστρωμάτων της συλλογής για την μεταλλαγμένη IRAP E451R (σε συγκέντρωση ενζύμου 23.7nM και συγκέντρωση υποστρωμάτων στα 4μM) καθώς και για το μείγμα ERAP1 και ERAP2 σε αναλογία συγκεντρώσεων ενζύμων 2:1 και συγκέντρωση υποστρωμάτων το μαι συγκέντρωση υποστρωμάτων ενζύμων 2:1 και συγκέντρωση υποστρωμάτων το μείναι συγκέντρωση υποστρωμάτων ενζύμων 2:1 και συγκέντρωση υποστρωμάτων ενζύμων 2:1 και συγκέντρωση υποστρωμάτων το μαι συγκέντρωση υποστρωμάτων ενζύμων 2:1 και συγκέντρωση υποστρωμάτων το μείναι συγκέντρωση υποστρωμάτων ενζύμων 2:1 και συγκέντρωση υποστρωμάτων το μείναι συγκέντρωση υποστρωμάτων το μαι συγκέντρωση υποστρωμάτων ενζύμων 2:1 και συγκέντρωση υποστρωμάτων το μαι συγκέντρωση υποστρωμάτων το μαι συγκεντρωση υποστρωμάτων το μαι συγκεντρωση υποστρωμα το μαι συγκεντρωση υποστρωμάτων το μαι συγκεντρωση υποστρωμα και το μαι συγκεντρωση υποστρωμάτων το μαι συγκεντρωση υποστρωμα το μαι συγκεντρω συ μαι συ μα

7.8. <u>Αναστολείς</u>

7.8.1 Δοκιμή πυριδινικών και ανιλινικών αναστολέων

- Φθορισμόμετρο Quantamaster[™] 4 (Photon Technology International, New Jersey)
- Κυψελίδα Quartz (Helma)
- L-αργυνινο 7-αμιδο-4-μεθυλο- κουμαρίνη, R-AMC (Sigma-Aldrich)
- L- λευκινο 7-αμιδο-4-μεθυλο- κουμαρίνη, L-AMC (Sigma-Aldrich)
- Ρυθμιστικό διάλυμα 50mM Hepes, 100mM NaCl (pH 7.0)

Δοκιμάστηκαν πυριδινικά και ανιλινικά παράγωγα, τα οποία συντέθηκαν από τον Δρ. Θάνο Παπακυριακού (Ινστιτούτο Φυσικοχημείας, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»), ως αναστολείς και προσδιορίστηκε η δραστικότητας τους φθορισμομετρικά σε φθορισμόμετρο Quantamaster[™] 4. Στην κυψελίδα προσθέτουμε ορισμένης συγκέντρωσης αναστολέα, αραιωμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα 50mM Hepes, 100mM NaCl (pH 7.0), το υπόστρωμα σε συγκέντρωση 10μM, χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα το L-AMC για τις ERAP1 και IRAP ενώ για την ERAP2 (392N) το R-AMC και τέλος το ένζυμο, οι τελικές συγκεντρώσεις των ενζύμων ήταν 11.1nM για την ERAP1, 5.6nM για την ERAP2 και 3nM για την IRAP. Στη συνέχεια μετρήθηκε η εκπομπή φθορισμού για 2min. Η διέγερση έγινε στα 380nm και η εκπομπή στα 460nm. Οι συγκεντρώσεις των αναστολέων, στις οποίες προσδιορίστηκε το ποσοστό αναστολής ήταν 10, 100 και 1000μΜ και ο τελικός όγκος της αντίδρασης 60μL.

7.8.2 <u>Φωσφινικοί αναστολείς</u>

Τα αποτελέσματα της βιβλιοθήκης και η μοντελοποίηση που πραγματοποιήθηκε από τον Δρ. Θάνο Παπακυριακού (Ινστιτούτο Φυσικοχημείας, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος») μας έδωσαν πολύτιμες πληροφορίες για το μέγεθος, το σχήμα και τα χαρακτηριστικά του S1 θύλακα των αμινοπεπτιδασών ERAP1, ERAP2 (392N) και IRAP. Οι πληροφορίες αυτές οδήγησαν στην ανάπτυξη μιας σειράς δραστικών φωσφινικών ενώσεων, ανάλογα μεταβατικής κατάστασης, οι οποίοι συντέθηκαν από την ομάδα του Δρ. Δημήτρη Γεωργιάδη (Τμήμα Χημείας, Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τομέας Οργανικής). Οι ουσίες αυτές διαθέτουν μια φωσφινική ομάδα, μέσω της οποίας αλληλεπιδρούν με το ιόν Zn²⁺ που υπάρχει στο καταλυτικό κέντρο των τριών αμινοπεπτιδασών και έτσι παρεμποδίζουν την κατάλυση, ενώ οι πλευρικές ομάδες δεξιά και αριστερά της φωσφινικής ομάδας τοποθετούνται στους διάφορους θύλακες ειδικότητας των ενζύμων (S θύλακες).

7.8.3 Καθαρισμός φωσφινικών αναστολέων

- Ημιπαρασκευαστική στήλη C18 (Merck Chromolith[®] SemiPrep)
- Τριφθορικό οξύ, TFA (Applichem)
- Ακετονιτρίλιο καθαρότητας HPLC (Sigma-Aldrich)

Οι αναστολείς καθαρίστηκαν με HPLC ανάστροφης φάσης με ημιπαρασκευαστική στήλη C18. Η ημιπαρασκευαστική στήλη εξισορροπήθηκε με 0.05% TFA πριν την ένεση του δείγματος. Η έκλουση έγινε με βαθμίδωση ροής 2mL/min από 0.05% TFA, 5% ACN σε 50% ACN και 0.05% TFA ή 0% ACN σε 50% ACN (ανάλογα με την υδροφοβικότητα του πεπτιδίου), ενώ η απορρόφηση μετράται στα 257nm (απορρόφηση φαινολικού δακτυλίου). Αρχικά, καθαρίστηκε μικρή ποσότητα δείγματος για να υπολογιστεί ο χρόνος έκλουσης και μετά καθαρίστηκε μια ποσότητα του πεπτιδίου. Τα κλάσματα που αντιστοιχούν στις κυρίως κορυφές λυοφιλιώνονται.

7.8.4 <u>Λυοφιλίωση</u>

• Λυοφιλιωτής Beta 1-8 (Christ)

Μετά τον καθαρισμό με HPLC τα κλάσματα που αντιστοιχούν στον καθαρισμένο αναστολέα φυλάσσονται στους -80°C. Η λυοφιλίωση γίνεται υπό πίεση 0.180mbar, με θερμοκρασία θαλάμου λυοφιλίωσης -53°C, για 24 ώρες. Η σκόνη που παραλαμβάνεται για κάθε πεπτίδιο, φυλάσσεται στους -80°C.

7.8.5. Διαλυτοποίηση και ποσοτικοποίηση λιοφιλιωμένου αναστολέα

- Φασματοφωτόμετρο Nano-Drop
- Νερό καθαρότητας milliQ

Η σκόνη των λιοφιλιωμένων αναστολέων διαλύεται σε νερό milli-Q. Στη συνέχεια μετράται η απορρόφηση των πεπτιδικών δεσμών στα 220nm και στα 257nm απορρόφηση φαινολικού δακτυλίου σε όργανο Nano-Drop.

Η ποσοτικοποίηση έγινε με βάση την απορρόφηση στα 257nm και συγκέντρωση των αναστολέων υπολογίζεται από τον τύπο A = ε · c · l. Τέλος οι ενώσεις ταυτοποιήθηκαν με φασματοσκοπία μάζας.

7.8.6 Προσδιορισμός της σταθεράς Κί των φωσφινικών αναστολέων

- Φθορισμόμετρο TECAN infinite® M200
- L-αργυνΙνο 7-αμιδο-4-μεθυλο- κουμαρίνη, R-AMC (Sigma-Aldrich)
- L- λευκΙνο 7-αμιδο-4-μεθυλο- κουμαρίνη, L-AMC (Sigma-Aldrich)
- Ρυθμιστικό διάλυμα 50mM Hepes, 100mM NaCl (pH 7.0)
- Μικροπλάκες TECAN 96 κελιών μαύρες (micro plates)

Η δραστικότητα των αναστολέων προσδιορίστηκε φθορισμομετρικά σε φθορισμόμετρο TECAN infinite® M200 χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα L- λευκίlo 7-αμιδο-4-μεθυλοκουμαρίνη, L-AMC για την ERAP1 και L-αργυνΙνο 7-αμιδο-4-μεθυλο- κουμαρίνη, R-AMC για τις ERAP2 (392N), ERAP2 (392K) και IRAP συγκέντρωσης 50μM σε ρυθμιστικό διάλυμα 50mM Hepes, 100mM NaCl (pH 7.0). Οι μικροπλάκες επιστρώθηκαν με αυξημένες συγκεντρώσεις αναστολέα σε ένα εύρος συγκεντρώσεων από 0 μέχρι και 20μΜ και στη συνέχεια προστέθηκε το διάλυμα ενζύμου (τελικής συγκέντρωση 5-30nM) και υποστρώματος (τελικής συγκέντρωσης 50μM) σε συνολικό όγκο 150μL. Η εκπομπή φθορισμού μετρήθηκε για 5-10min στους 24°C. Η διέγερση έγινε στα 380nm και η εκπομπή στα 460nm. Από την κλίση της ευθείας της έντασης του φθορισμού σε συνάρτηση με το χρόνο προσδιορίζουμε την αρχική ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης. Στη συνέχεια από την γραφική παράσταση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης σε συνάρτηση με την συγκέντρωση του αναστολέα υπολογίζουμε την σταθερά Κί για κάθε αναστολέα. Η σταθερά Κί για τις περιπτώσεις της πλήρης αναστολής υπολογίστηκε από την εξίσωση V=V_{max}*[I]/(Ki+[I])-V_{max} ενώ για τις περιπτώσεις της μερικής αναστολής με βάση την εξίσωση $V=V_{max}*[I]/(Ki+[I])-V_{max}+b$.

Όπου V η ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης παρουσία αναστολέα, V_{max} η μέγιστη ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης, [Ι] η συγκέντρωση του αναστολέα, Κi η σταθερά

αναστολής και b η μικρότερη τιμή της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης παρουσία αναστολέα. Η μοντελοποίηση έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος Graph pad prism5.

7.8.7 Χαρακτηρισμός φωσφινικών αναστολέων

Για να χαρακτηρίσουμε το είδος της αναστολής που προκαλεί η συγκεκριμένη κατηγορία αναστολέων στις τρεις αμινοπεπτιδάσες πραγματοποιήθηκε τιτλοδότηση με αυξανόμενες συγκεντρώσεις υποστρώματος και σταθερή συγκέντρωση αναστολέα με σκοπό να διαπιστώσουμε πια παράμετρο μεταβάλλεται η K_M ή η V_{max} ώστε να χαρακτηριστούν ως ανταγωνιστικοί ή μη ανταγωνιστικοί.

Χρησιμοποιήθηκε φθορισμόμετρο TECAN infinite® M200 και μικροπλάκες 96 κελιών μαύρες οι οποίες επιστρώθηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις υποστρώματος 0, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 και 150μM R-AMC σε ρυθμιστικό διάλυμα 50mM Hepes, 100mM NaCl (pH 7.0). Στη συνέχεια προστέθηκε ο αναστολέας και τέλος το ένζυμο ERAP2 (392N) σε τελική συγκέντρωση 23.7nM. Μετρήθηκε η εκπομπή φθορισμού για 5-10min στους 24°C. Η διέγερση έγινε στα 380nm και η εκπομπή στα 460nm. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε και απουσία αναστολέα.

Από τις μετρήσεις προκύπτει η καμπύλη Michaelis-Menten (ταχύτητα αντίδρασης συναρτήσει της συγκέντρωσης υποστρώματος). Για τον υπολογισμό των δύο παραμέτρων της ενζυμικής αντίδρασης τα πειραματικά σημεία της καμπύλης Michaelis-Menten μοντελοποιήθηκαν με βάση την εξίσωση:

$$y = V_{max} * x / (K_M + x)$$

όπου y είναι η ταχύτητα αντίδρασης, x η συγκέντρωση υποστρώματος, V_{max} η μέγιστη ταχύτητα της αντίδρασης και K_M η σταθερά Michaelis-Menten. Η μοντελοποίηση έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος Graph pad prism5.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

8.1. Παραγωγή και καθαρισμός ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών

Για την έκφραση των ανθρώπινων ανασυνδιασμένων πρωτεϊνών ERAP1 (K598R Q730E), ERAP2 (392N) και IRAP χρησιμοποιήθηκαν βακιλοϊοί που κατασκευάστηκαν από την υποψήφια διδάκτορα Ειρήνη Ευνουχίδου (Ινστιτούτο ΡΡΠ, ΕΚΕΦΕ

«Δημόκριτος»), από την ομάδα του Akira Hattori (Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto) και από τον James Birtley (Ινστιτούτο Φυσικοχημείας, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»), αντίστοιχα, με βάση εδραιωμένα πρωτόκολα του συστήματος Bac-to-Bac της εταιρείας Invitrogen. Το γονίδιο που εκφράστηκε για κάθε πρωτεΐνη κωδικεύει μια αλληλουχία-σήμα στο Ν-τελικό άκρο της πρωτεΐνης που την οδηγεί στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Επίσης, στο C-τελικό άκρο των πρωτεϊνών που εκφράστηκαν υπάρχει μια ουρά έξι ιστιδινών, η οποία επιτρέπει τον καθαρισμό τους με στήλη NiNTA. Οι τρεις ανασυνδιασμένες πρωτεΐνες εκφράστηκαν σε κύτταρα εντόμου Ηi5 μετά από επιμόλυνση με τους βακιλοϊούς και καθαρίστηκαν όπως αναφέρθηκε στις Μεθόδους και Υλικά (παράγραφος 7.2). Για την έκφραση της ανασυνδιασμένης πρωτεΐνης ERAP2 (392K) χρησιμοποιήθηκε βακιλοϊός που κατασκευάστηκε από τον μεταδιδακτορικό James Birtley (Ινστιτούτο Φυσικοχημείας, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»). Στην παρούσα εργασία δεν έλαβε χώρα έκφραση, απομόνωση και καθαρισμός της αμινοπεπτιδάσης ERAP2 (392K), καθώς χρησιμοποιήθηκε καθαρή και δραστική η ERAP2 που εκφράστηκε από την υποψήφια διδάκτορα Ειρήνη Ευνουχίδου (Ινστιτούτο ΡΡΠ ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»).

Για να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητα του καθαρισμού, έγινε ηλεκτροφόρηση των καθαρισμένων πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες και χρώση με νιτρικό άργυρο. Παρατηρήθηκε μόνο μία ζώνη για κάθε πρωτεΐνη, η οποία αντιστοιχούσε στο αναμενόμενο μοριακό βάρος (100-110kDa για τις ERAP1 και ERAP2, 121kDa για την IRAP) (σχήματα 1 και 2).



Σχήμα 1: Πηκτή πολυακρυλαμιδίου 10% βαμμένη με νιτρικό άργυρο για τον καθαρισμό της ανασυνδιασμένης ERAP2. Αριστερή διαδρομή: Πρότυπο διάλυμα πρωτεϊνών (marker). Το πρότυπο είναι μίγμα πρωτεϊνών: μυοσίνη (200kDa), β-γαλακτοζιδάση (116kDa), αλβουμίνη βοός (86kDa), οβαλβουμίνη (50.9kDa), καρβονική ανυδράση (37.2kDa). Στη 2^η διαδρομή αναλύθηκε διάλυμα ERAP2 πριν τον καθαρισμό με στήλη ιονανταλλαγής, ενώ στις υπόλοιπες διαδρομές αναλύθηκαν τα κλάσματα που εκλούστηκαν κατά τον καθαρισμό της ERAP2 με στήλη ιονανταλλαγής καθώς και control ERAP2



Σχήμα 2: Πηκτές πολυακρυλαμιδίου 10% βαμμένες με νιτρικό άργυρο. (Α) Αριστερή διαδρομή: Καθαρισμένη ERAP1. Δεξιά διαδρομή: Πρότυπο διάλυμα πρωτεϊνών (marker). Το πρότυπο είναι μίγμα πρωτεϊνών: μυοσίνη (199kDa), β-γαλακτοζιδάση (116kDa), αλβουμίνη βοός (86kDa), οβαλβουμίνη (51kDa), καρβονική ανυδράση (37kDa). (Β) Αριστερή διαδρομή: Πρότυπο διάλυμα πρωτεϊνών (marker). Δεξιά διαδρομή: Καθαρισμένη IRAP

8.1.1 <u>Παραγωγή και καθαρισμός μεταλλαγμένης IRAP(E541R)</u>

Το πλασμίδιο που χρησιμοποιήθηκε για την έκφραση της αμινοπεπτιδάσης IRAP παρασκευάστηκε από το εργαστήριο του Kenneth L. Rock (University of Massachusetts Medical School) και περιέχει το γονίδιο που κωδικοποιεί μια υδατοδιαλυτή μορφή της IRAP (MB 121kDa), καθώς στην αλληλουχία νουκλεοτιδίων του γονιδίου απουσιάζει ένα μικρό τμήμα που κωδικεύει μία πιθανή διαμεμβρανική περιοχή του ενζύμου. Επιπλέον το γονίδιο irap κωδικοποιεί μια αλληλουχία-ετικέτα έξι ιστιδινών στο C- τελικό άκρο της εκφραζόμενης πρωτεΐνης καθώς και μία αλληλουχία-οδηγό στο Ν-τελικό άκρο που την την κατευθύνει στην εκκριτική οδό. Για κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση χρησιμοποιήθηκε το QuikChange® ΙΙ ΧL Κit σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας. Στη συνέχεια το πλασμίδιο αναπαρήχθηκε, απομονώθηκε και καθαρίστηκε, όπως περιγράφηκε στις Μεθόδους και Υλικά (παράγραφος 7.3.5), προκειμένου να παραχθούν 100μα που απαιτούνται για την επιμόλυνση 100mL αιωρήματος κυττάρων 293-F. Η επιτυχής μεταλλαξιγένεση επιβεβαιώθηκε με την τεχνική της αλληλούχισης DNA (DNA sequencing).

Μετά το τέλος του καθαρισμού του υπερκειμένου με στήλη NiNTA, μετρήθηκαν οι ενεργότητες των κλασμάτων ως προς L-AMC. Όπως φαίνεται στο παρακάτω γράφημα,

το κλάσμα με τη μεγαλύτερη ενεργότητα ήταν αυτό που εκλούστηκε με 150mM ιμιδαζόλιο (σχήμα 3).



Σχήμα 3: Δραστικότητα της αμινοπεπτιδάσης IRAP (E541R) κατά τον καθαρισμό με στήλη συγγενείας

Στη συνέχεια το κλάσμα με την μεγαλύτερη δραστικότητα υποβλήθηκε σε διαπίδυση με ρυθμιστικό διάλυμα 10mM Hepes (pH 7.0), 100mM NaCl για απομάκρυνση του ιμιδαζολίου. Πριν την συμπύκνωση της καθαρισμένης IRAP (E541R), έλαβε χώρα ηλεκτροφόρηση των κλασμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου. Μετά από χρώση με Coomassie Blue και αποχρωματισμό της πηκτής λάβαμε μονή ζώνη με το αναμενόμενο μοριακό βάρος (σχήμα 4).



Σχήμα 4: Πηκτή πολυακρυλαμιδίου 10% βαμμένη με Coomassie Blue. Αριστερή διαδρομή: Πρότυπο διάλυμα πρωτεϊνών (marker). Το πρότυπο είναι μίγμα πρωτεϊνών: μυοσίνη (200kDa), βγαλακτοζιδάση (116kDa), αλβουμίνη βοός (86kDa), οβαλβουμίνη (50.9kDa), καρβονική ανυδράση (37.2kDa), αναστολέας θρυψίνης σόγιας (29.1kDa). Δεξιά διαδρομή: Καθαρισμένη IRAP WT και μεταλλαγμένη IRAP E541R

Το κλάσμα συγκεντρώθηκε και συμπυκνώθηκε με διαδοχικές φυγοκεντρήσεις με τη χρήση φίλτρου σε τελικό όγκο 43μL. Στο διάλυμα της ανασυνδυασμένης IRAP E541R προστέθηκε γλυκερόλη σε αναλογία 1:1 και το μίγμα αποθηκεύθηκε στους -20°C.

8.2. Πρότυπες καμπύλες τιτλοδότησης Michaelis – Menten

8.2.1 <u>Καμπύλη τιτλοδότησης Michaelis – Menten για την υδρόλυση του R-ACC</u> <u>από την ERAP2 και του L-ACC από τις ERAP1 και IRAP</u>

Για να επιλέξουμε τη βέλτιστη συγκέντρωση υποστρώματος που θα χρησιμοποιούσαμε κατά τον προσδιορισμό της ταχύτητας υδρόλυσης των υποστρωμάτων της συλλογής από τις τρεις αμινοπεπτιδάσες κάναμε κινητική μελέτη με σκοπό τον προσδιορισμό της

σταθερά Michaelis - Menten (K_M) του κάθε ενζύμου για το καλύτερο γνωστό υπόστρωμα (σχήμα 5).

Από τον προσδιορισμό της αρχικής ταχύτητας υδρόλυσης του L-ACC από τις ERAP1 και IRAP καθώς και του R-ACC από την ERAP2 (392N), σε διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος προέκυψαν οι ακόλουθες πρότυπες καμπύλες τιτλοδότησης από τις οποίες υπολογίσαμε τη σταθερά Michaelis- Menten (K_M) του κάθε ενζύμου για το συγκεκριμένο υπόστρωμα.

Για τον υπολογισμό της σταθεράς Κ_M της ενζυμικής αντίδρασης τα πειραματικά σημεία της καμπύλης Michaelis-Menten μοντελοποιήθηκαν με βάση την εξίσωση:

$$y = V_{max} * x / (K_M + x)$$

όπου y είναι η ταχύτητα αντίδρασης, x η συγκέντρωση υποστρώματος, V_{max} η μέγιστη ταχύτητα της αντίδρασης και K_M η σταθερά Michaelis-Menten. Η μοντελοποίηση έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος Graph pad prism 5



Σχήμα 5: Πρότυπες καμπύλες τιτλοδότησης Michaelis- Menten για την υδρόλυση του L-ACC από τις ERAP1 και IRAP καθώς και για την υδρόλυση του R-ACC από την ERAP2

Από τις παραπάνω γραφικές παραστάσεις υπολογίστηκε ότι η K_M για την ERAP1 είναι ίση με 1150±305μM, για την ERAP2 ίση με 90±3μM και για την IRAP ίση με 85±30μM. Τα δεδομένα αυτά χρησιμοποιήθηκαν ώστε να επιλέξουμε τη βέλτιστη συγκέντρωση υποστρώματος κατά τον προσδιορισμό της ταχύτητας υδρόλυσης των υποστρωμάτων της συλλογής από τις ERAP1, ERAP2 και IRAP και ως ετούτου επιλέξαμε να διεξάγουμε την ενζυμική δοκιμασία σε συγκέντρωση υποστρώματος ίση με 10μΜ για τις ERAP1 και ERAP2 ενώ για την IRAP στα 4μΜ (τουλάχιστον δύο φορές χαμηλότερη από την Κ_M).

8.3. <u>S1 Ειδικότητα αμινοπεπτιδασών</u>

8.3.1 Συσχέτιση σήματος φθορισμού με τη συγκέντρωση 7-αμινο-4 καρβαμοϋλομεθυλο-κουμαρίνη (ACC)

Ο προσδιορισμός της ταχύτητας υδρόλυσης των υποστρωμάτων της συλλογής από τις ERAP1, ERAP2 (392N) και IRAP γίνεται με φθορισμομετρική δοκιμασία. Κατά τη δοκιμασία η δραστικότητα αμινοπεπτιδάσης είναι ανάλογη προς την ένταση του φθορισμού που εκπέμπεται από την 7-αμινο-4 καρβαμοϋλο- μεθυλο κουμαρίνη (ACC). Το φθορίζον ACC αποτελεί προϊόν της υδρόλυσης του πεπτιδικού δεσμού των υποστρωμάτων με γενική δομή X-ACC (όπου X η χαρακτηριστική πλευρική ομάδα κάθε υποστρώματος). Για να μετατραπεί το σήμα φθορισμού που λαμβάνεται κατά την υδρόλυση του X-ACC σε ενζυμική δραστικότητα αμινοπεπτιδάσης συγκέντρωση (Μέθοδοι και Υλικά παράγραφος 7.7.1). Η εξίσωση της καμπύλης βαθμονόμησης ήταν s=22175[ACC]+ 648.8 (1) όπου s είναι το σήμα φθορισμού και [ACC] είναι η συγκέντρωση ACC σε μονάδες μΜ.



Σχήμα 6: Γραφική παράσταση του σήματος φθορισμού σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της 7αμινο-4 καρβαμοϋλο- μεθυλο κουμαρίνη (ACC)

Χρησιμοποιώντας την εξίσωση (1) έγινε η μετατροπή του σήματος φθορισμού σε συγκέντρωση προϊόντος για τις αντιδράσεις των φθορισμογόνων υποστρωμάτων. Πιο

συγκεκριμένα η κλίση της εξίσωσης (1) που αντιστοιχεί στο σήμα φθορισμού / μΜ ACC διαιρείται με τον συνολικού όγκου της αντίδρασης (150μL) και προκύπτει η ακόλουθη τιμή για το συντελεστή διόρθωσης σήματος φθορισμού: 148 σήμα φθορισμού/ pmol ACC. Στη συνέχεια η ένταση του σήματος φθορισμού που λάβαμε από την υδρόλυση κάθε υποστρώματος διαιρέθηκε με τον παραπάνω συντελεστή ώστε τα δεδομένα να μετατραπούν σε ποσότητα προϊόντος (pmol ACC) ανά pmol ενζύμου. Η κλίση της γραφικής παράστασης της ποσότητας προϊόντος (pmol ACC) που σχηματίζεται ανά pmol ενζύμου σε συνάρτηση με το χρόνο αντιστοιχεί στην ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης.

8.3.2 <u>Υδρόλυση των υποστρωμάτων της συλλογής από τις ERAP1, ERAP2 και</u> IRAP

Τα δεδομένα της ταχύτητας υδρόλυσης κάθε υποστρώματος από τις ERAP1, ERAP2 και IRAP, κανονικοποιήθηκαν ως προς το καλύτερο υπόστρωμα για κάθε ένζυμο και προέκυψαν τα ακόλουθα ιστογράμματα της σχετικής δραστικότητας κάθε ενζύμου ως προς τα φυσικά και μη φυσικά αμινοξέα της βιβλιοθήκης (σχήμα 7). Η τυπική απόκλιση και τα σχετικά σφάλματα που απεικονίζονται στα παρακάτω γραφήματα αντιστοιχούν στις τρείς επαναλήψεις που έγιναν κάτω από τις ίδιες συνθήκες για κάθε ένζυμο (Μέθοδοι και Υλικά παράγραφος 7.7.3). Τέλος, τα υποστρώματα χωρίς μπάρες αντιστοιχούν σε εκείνες στις περιπτώσεις που δεν ανιχνεύθηκε υδρόλυση των υποστρωμάτων, παρόλο που η δοκιμασία επαναλήφθηκε και σε υψηλότερη συγκέντρωση υποστρώματος ίση με 100μΜ.



Σχήμα 7: (Α) Γραφική παράσταση της σχετικής δραστικότητας των ERAP1, ERAP2 και IRAP ως προς τα φυσικά αμινοξέα L- και D- διαμόρφωσης (Β) Γραφική παράσταση της σχετικής δραστικότητας των ERAP1, ERAP2 και IRAP ως προς τα μη φυσικά αμινοξέα

Από τα παραπάνω γραφήματα διαπιστώσαμε ότι τα τρία ένζυμα εμφανίζουν μερικές κοινές προτιμήσεις ως προς τα υποστρώματα που αναγνωρίζουν αλλά και σημαντικές διαφορές. Η ERAP1 κατάφερε να υδρολύσει 16 από τα 82 υποστρώματα, με έντονη προτίμηση σε υδρόφοβες, αρωματικές και μακριές αλειφατικές πλευρικές αλυσίδες στη θέση Ρ1, με καλύτερο υπόστρωμα την hTyr. Η ERAP2 εμφανίζει ένα διαφορετικό μοτίβο με προτίμηση σε εκτεταμένες θετικά φορτισμένες πλευρικές ομάδες στην Ρ1 και συνολικά υδρόλυσε 10 από τα 82 υποστρώματα, με καλύτερα υποστρώματα την Arg και hArg. Η IRAP υδρόλυσε τόσο τα υποστρώματα που αναγνώρισε η ERAP1 όσο και η ERAP2 (25 από τα 82 υποστρώματα) και φάνηκε να συνδυάζει την Ν-τελική εκλεκτικότητα των ERAP1 και ERAP2. Ωστόσο παρατηρήθηκαν και ορισμένες εξαιρέσεις όπου κάποια υποστρώματα δεν υδρολύθηκαν από την ERAP1 ή την ERAP2 αλλά αποτέλεσαν υπόστρωμα για την IRAP (όπως cyclopentyl-glycine, Abu, Bpa) και αντίστροφα (3-NO₂-tyrosine). Η παραπάνω παρατήρηση μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η ΙRAP μπορεί να συνδυάζει την Ν-τελική εκλεκτικότητα των ERAP1 και ERAP2, αλλά διαθέτει και ορισμένα δικά της μοναδικά χαρακτηριστικά που την διαφοροποιούν από τις άλλες δύο υποδηλώνοντας διαφορές ως προς τα αμινοξέα που απαρτίζουν τον S1 θύλακα της.

Αξίζει να σημειωθεί ότι τα καλύτερα υποστρώματα και για τα τρία ένζυμα διέθεταν μη φυσικά αμινοξέα ως πλευρικές αλυσίδες στην θέση P1 (hTyr για την ERAP1, h-Arg για την ERAP2 ενώ για την IRAP και τα δύο ήταν εξίσου καλά) υποδηλώνοντας πως ο S1 θύλακας των ενζύμων δεν προσδένει μόνο πλευρικές ομάδες φυσικών αμινοξέων αλλά και πιο πολύπλοκές δομές. Επιπλέον παρατηρήθηκε πως ο S1 θύλακας μπορεί να δεχθεί πλευρικές ομάδες συγκεκριμένης διαμόρφωσης (L και όχι D) προσδίδοντας και στα τρία ένζυμα στερεοχημική εξειδίκευση ως προς τη διαμόρφωση των υποστρωμάτων που υδρολύουν.

Ορισμένα υποστρώματα της συλλογής διέθεταν ογκώδεις πλευρικές ομάδες οι οποίες μπορούν να προσδεθούν μόνο σε έναν εκτεταμένο θύλακα. Η ικανότητα της ΙRAP να υδρολύει αρκετά ογκώδη υποστρώματα της βιβλιοθήκης (Bpa και IgI) σε αντίθεση με τις ERAP1 και ERAP2 μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο S1 θύλακας της πιθανόν να είναι λίγο μεγαλύτερος σε μέγεθος σε σχέση με τις άλλες δύο. Ωστόσο, το γεγονός ότι κανένα ένζυμο δεν μπόρεσε να υδρολύσει υποστρώματα με δύσκαμπτες πλευρικές ομάδες, όπως τα 1-Nal, 2-Nal και Bip, υποδηλώνει ότι ο S1 θύλακας των τριών ενζύμων είναι αρκετά μεγάλος ώστε να προσδέσει ογκώδεις αλλά εύκαμπτες ομάδες ικανές να προσανατολιστούν κατάλληλα στο συγκεκριμένο χώρο.

Τέλος, παρά τις διαφορές στην εκλεκτικότητα μεταξύ των τριών ενζύμων από τη μελέτη μας διαπιστώθηκαν και σημαντικές ομοιότητες ως προς τη φύση των υποστρωμάτων τα οποία δεν μπόρεσαν να υδρολύσουν. Πιο συγκεκριμένα, υποστρώματα με αρνητικά φορτισμένες πλευρικές ομάδες (Glu, Asp) δεν υδρολύθηκαν από κανένα ένζυμο.

Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκε ενζυμική δραστικότητα για υποστρώματα με διακλαδισμένες στο β άνθρακα πλευρικές ομάδες, όπως Val, Ile και Thr, καθώς και για υποστρώματα με μικρές υδρόφιλες πλευρικές ομάδες (Ser).

8.3.3 <u>Καμπύλη τιτλοδότησης Michaelis – Menten για την υδρόλυση του R-ACC</u> και D-RACC από την ERAP2

Από την κινητική μελέτη της υδρόλυσης των φυσικών αμινοξέων L- και D- διαμόρφωσης, όπως φαίνεται και από το παραπάνω γράφημα, προέκυψε ότι τα D-αμινοξέα δεν αποτελούν καλά υποστρώματα για τις ERAP1, ERAP2 και IRAP αποδεικνύοντας ότι ο S1 θύλακας των συγκεκριμένων ενζύμων εμφανίζει στερεοχημική εξειδίκευση ως προς τη διαμόρφωση των πλευρικών ομάδων που μπορεί να δεχθεί. Από τις τρεις αμινοπεπτιδάσες μόνο η ERAP2 μπόρεσε να υδρολύσει την D-αργινίνη όμως με περίπου 50 φορές χαμηλότερη ταχύτητα σε σχέση με την L-αργινίνη. Προκειμένου να διαπιστώσουμε τον λόγο αυτής της μείωσης στην ταχύτητα υδρόλυσης των δύο υποστρωμάτων από την ERAP2 διεξάγαμε κινητική μελέτη με σκοπό τον προσδιορισμό της σταθερά Michaelis - Menten (K_M) καθώς και της σταθεράς k_{cat} (ρυθμός ανακύκλισης). Από την ανάλυση Michaelis – Menten προέκυψε ότι η μείωση της ταχύτητας υδρόλυσης οφείλεται σε μεταβολή και των δύο κρίσιμων σταθερών οι οποίες υπολογίστηκαν και είχαν τις ακόλουθες τιμές: για την L-αργινίνη K_{M} =90±3μM και k_{cat} = 0.177±0.003sec⁻¹ ενώ για την D-αργινίνη K_M=1053±304μM και k_{cat} =0.038±0.018sec⁻¹, αποδεικνύοντας ότι η L διαμόρφωση είναι κρίσιμη για τη πρόσδεση του υποστρώματος αλλά και για την κατάλυση (σχήμα 8).



Σχήμα 8: (Α) Πρότυπη καμπύλη Michaelis-Menten για την υδρόλυση του L-RACC και του D-RACC από την ERAP2 (Β)Εξειδίκευση της ERAP2 (k_{cat}/K_M) ως προς την υδρόλυση της L- και D- αργινίνης

8.3.4 Σύγκριση δραστικότητας του μείγματος ERAP1 και ERAP2 με της IRAP

Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες από τους Saveanu et al. οι αμινοπεπτιδάσες ERAP1 και ERAP2 συν-εντοπίζονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο όπου λειτουργούν συνεργιστικά, ενώ η IRAP δρα σε ένα διαφορετικό κυτταρικό διαμέρισμα και εμπλέκεται στο μονοπάτι της διασταυρούμενης αντιγονοπαρουσίασης [46],[65]. Προσπαθώντας να "μιμηθούμε" τις συνθήκες του κυττάρου, όπου σύμφωνα με τη μελέτη των Saveanu et al η συγκέντρωση της ERAP1 είναι διπλάσια από εκείνη της ERAP2 στο ER, αναμείξαμε τα δύο ένζυμα σε αναλογία συγκέντρωσης 2:1 (ERAP1:ERAP2) και προσδιορίσαμε την ταχύτητα υδρόλυσης των L-υποστρωμάτων της συλλογής, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Στη συνέχεια τα δεδομένα της ταχύτητας κανονικοποιήθηκαν ως προς το καλύτερο υπόστρωμα για το μείγμα ERAP1 και ERAP2 και κατασκευάστηκε το ιστόγραμμα της σχετικής δραστικότητας του μείγματος ERAP1 και ERAP2 ως προς τα διάφορα υποστρώματα. Τέλος, το πρότυπο για την SI ειδικότητα του μείγματος ERAP1 και ERAP2 συγκρίθηκε με εκείνο που λάβαμε για την IRAP.



Σχήμα 9: Σύγκριση της S1 ειδικότητας μεταξύ του μείγματος ERAP1 και ERAP2 με της IRAP

Από τη σύγκριση των παραπάνω γραφημάτων φάνηκε ότι το μοτίβο εκλεκτικότητας του μείγματος ERAP1 και ERAP2 μοιάζει κατά πολύ με εκείνο της IRAP, όμως υπάρχουν εμφανείς διαφορές, καταλήγοντας έτσι στο συμπέρασμα ότι η IRAP συνδυάζει μεν την εκλεκτικότητα των ERAP1 και ERAP2, αλλά διαθέτει και δικά της μοναδικά χαρακτηριστικά τα οποία οφείλονται στα διαφορετικά αμινοξέα του απαρτίζουν τον S1 θύλακα της.

8.4. Προτεινόμενο Μοντέλο για τον S1 θύλακα των ERAP1, ERAP2 και IRAP

Η S1 εκλεκτικότητα των τριών ενζύμων, όπως προέκυψε από τη "σάρωση" των υποστρωμάτων της συλλογής, οφείλεται στα κατάλοιπα που απαρτίζουν τον S1 θύλακα κάθε ενζύμου καθώς και από στη φύση των αλληλεπιδράσεων που λαμβάνουν χώρα μεταξύ αυτών και των πλευρικών ομάδων των υποστρωμάτων. Για να κατανοήσουμε σε μοριακό επίπεδο το είδος αυτών των αλληλεπιδράσεων χρησιμοποιήθηκε η πρόσφατη κρυσταλλική δομή της ERAP1 (PDB 2XDT) [75],[76] για να κατασκευαστούν υπολογιστικά μοριακά μοντέλα για τον S1 θύλακα των ERAP2 και IRAP, από τον Δρ. Θάνο Παπακυριακού (Ινστιτούτο Φυσικοχημείας, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»), λόγω του υψηλού βαθμού ομολογίας που εμφανίζουν οι τρεις αμινοπεπτιδάσες και τα οποία αποκάλυψαν τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του συγκεκριμένου θύλακα στα οποία οφείλεται η Ν-τελική ειδικότητα κάθε ενζύμου.

Πίνακας 3: Τα κρίσιμα κατάλοιπα του S1 θύλακα των ERAP1, ERAP2 και IRAP, όπως προέκυψαν από τη μοντελοποίηση, τα οποία παίζουν καθοριστικό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις με τα υποστρώματα καθώς και στη συγκρότηση του συγκεκριμένου θύλακα. Τα συντηρημένα κατάλοιπα μεταξύ των τριών ενζύμων εμφανίζονται με έντονη γραμματοσειρά

	ERAP1	ERAP2	IRAP
	His ¹⁶⁰	Glu ¹⁷⁷	Tyr ²⁷²
	Gln ¹⁸¹	Asp ¹⁹⁸	Gln ²⁹³
-N. Jerninus	N terminus Pro ¹⁸⁴	Pro ²⁰¹	Pro ²⁹⁶
N-terminus	Phe ³¹⁴	Phe ³³¹	Phe ⁴²⁵
ERAP1 ERAP2 IF	Gln ³¹⁵	Ala ³³²	Glu ⁴²⁶
	Ser ³¹⁶	Pro ³³³	Ala ⁴²⁷
	Met ³¹⁹	Met ³³⁶	Met ⁴³⁰
	Arg ⁴³⁰	Gln ⁴⁴⁷	Glu ⁵⁴¹
	Phe ⁴³³	Phe ⁴⁵⁰	Phe ⁵⁴⁴
90% 90% 90%	Phe ⁸⁶⁴	Phe ⁸⁸⁷	Phe ⁹⁵⁶
ERAP1 4 ERAP2 4 Contraction	RAP Glu ⁸⁶⁵	Asp^{888}	Pro ⁹⁵⁷
-100.205	Ser ⁸⁶⁸	Ser ⁸⁹¹	Ser ⁹⁶⁰

Εικόνα 20: Αναπαράσταση του S1 θύλακα των ERAP1, ERAP2 και IRAP εσωτερικά του οποίου έχουν τοποθετηθεί τα καλύτερα υποστρώματα για κάθε ένζυμο. Το αρνητικό ηλεκτροστατικό δυναμικό εμφανίζεται με κόκκινο χρώμα, το θετικό με μπλε ενώ το καταλυτικό ιόν Zn²⁺ με πράσινη σφαίρα

Από τη "σάρωση" των υποστρωμάτων της συλλογής προέκυψε ότι και οι τρεις αμινοπεπτιδάσες δεν μπόρεσαν να υδρολύσουν υποστρώματα με αρνητικά φορτισμένες πλευρικές ομάδες στη θέση P1 (Glu και Asp). Το αποτέλεσμα αυτό βρίσκεται σε απόλυτη συμφωνία με το προτεινόμενο μοντέλο για τον S1 θύλακα το οποίο αποκάλυψε ότι το συνολικό ηλεκτροστατικό δυναμικό στη βάση του θύλακα και στα τρία ένζυμα είναι αρνητικό (εικόνα 20).

Όπως φαίνεται από τον παραπάνω πίνακα (πίνακας 2) τα μισά αμινοξέα του S1 θύλακα είναι συντηρημένα μεταξύ των τριών ενζύμων και συμβάλλουν στα κοινά χαρακτηριστικά του θύλακα (θέσεις 184, 314, 319, 433, 864 και 868 σύμφωνα με την αρίθμηση της ERAP1). Για παράδειγμα, το γεγονός ότι τα πέντε από τα έξι συντηρημένα κατάλοιπα είναι μη πολικά μπορεί να εξηγήσει την προτίμηση και των τριών ενζύμων για υποστρώματα με υδρόφοβες πλευρικές αλυσίδες στη θέση Ρ1. Επιπλέον, υπολογιστικά τοποθετήθηκε η L-Leu και η D-Leu στον θύλακα της ERAP1 (εικόνα 21 A και B) καθώς και η 4-γουανιλο-Phe στον θύλακα της IRAP (εικόνα 21 Γ) και διαπιστώθηκε ότι η Phe⁴³³/Phe⁴⁵⁰/Phe⁵⁴⁴ βρίσκεται πολύ κοντά με τον β άνθρακα της πλευρικής ομάδας του υποστρώματος με αποτέλεσμα να παρεμποδίζει, λόγω στερεοχημικών συγκρούσεων. τη δέσμευση υποστρωμάτων με διακλαδισμένες πλευρικές ομάδες (Val, Ile κτλ) ενώ ευνοείται η δέσμευση, μέσω π αρωματικών αλληλεπιδράσεων, υποστρωμάτων με αρωματικές πλευρικές ομάδες στην θέση P1 (4-γουανιλο-Phe, hPhe κτλ). Απο την άλλη πλευρά, η παρουσία της Met³¹⁹/Met³³⁶/Met⁴³⁰ παρεμποδίζει τη δέσμευση πλευρικών ομάδων D διαμόρφωσης λόγω στερεοχημικών συγκρούσεων της με το β άτομο άνθρακα του υποστρώματος.



Εικόνα 21: Κρίσιμα αμινοξέα που απαρτίζουν τον S1 θύλακα ειδικότητας των τριών αμινοπεπτιδασών. (Α) Αλληλεπίδραση της L-Leu με τα κατάλοιπα του S1 θύλακα της ERAP1 (Β) Αλληλεπίδραση της D-Leu με τα κατάλοιπα του S1 θύλακα της ERAP1 (C) Αλληλεπίδραση της 4γουανιλο-Phe με την Phe⁵⁴⁴ και το Glu⁵⁴¹ στον S1 θύλακα της IRAP Τα υπόλοιπα αμινοξέα που απαρτίζουν τον S1 θύλακα διαφέρουν μεταξύ των τριών ενζύμων και είναι εκείνα που καθορίζουν την εκλεκτικότητα τους (εικόνα 22). Συγκεκριμένα, η προτίμηση της ERAP2 για θετικά φορτισμένες πλευρικές αλυσίδες στην θέση P1 οφείλεται στην παρουσία του Asp¹⁹⁸, όπως έχει επιβεβαιωθεί με κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση [113]. Στην αντίστοιχη θέση τόσο η ERAP1 όσο και η IRAP διαθέτουν γλουταμίνη. Επιπλέον, η παρουσία της Arg⁴³⁰ στον θύλακα της ERAP1 εξηγεί την αδυναμία της να υδρολύει υποστρώματα με θετικά φορτισμένες πλευρικές ομάδες στην θέση P1. Οι ERAP2 και IRAP στην συγκεκριμένη θέση διαθέτουν Gln⁴⁴⁷ και Glu⁵⁴¹ αντίστοιχα.



Εικόνα 22: Τα έξι μη συντηρημένα αμινοξέα του S1 θύλακα των τριών ενζύμων και οι πιθανές αλληλεπιδράσεις τους με τη hArg

8.4.1 <u>Σύγκριση της δραστικότητας της IRAP και της IRAP Ε541R ως προς τα</u> υποστρώματα της συλλογής

Από τη μοντελοποίηση προέκυψε ότι στον S1 θύλακα της IRAP υπάρχουν δύο γλουταμινικά οξέα το Glu⁴²⁶ και το Glu⁵⁴¹ η παρουσία των οποίων πιθανόν να εξηγεί την προτίμηση της σε θετικά φορτισμένες πλευρικές ομάδες στη θέση P1. Για να διαπιστώσουμε κατά πόσο η παρουσία του Glu⁵⁴¹ είναι καθοριστική για την δραστικότητα

του ενζύμου έναντι των υποστρωμάτων με θετικά φορτισμένες πλευρικές ομάδες πραγματοποιήθηκε κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση του σε αργινίνη, καθώς το ERAP1 στη συγκεκριμένη θέση διαθέτει αργινίνη. Η μεταλλαγμένη μορφή της IRAP (IRAP E541R) εκφράστηκε ως ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη, όπως αναφέρθηκε στις Μεθόδους και Υλικά (παράγραφος 7.4) και στη συνέχεια προσδιορίστηκε η δραστικότητα της ως προς τα L υποστρώματα της συλλογής. Έγινε επεξεργασία των αποτελεσμάτων που λάβαμε με τον ίδιο τρόπο, όπως στην περίπτωση της IRAP WT, και προέκυψε το ακόλουθο ιστόγραμμα της σχετικής δραστικότητας της IRAP WT (σχήμα 10).



Σχήμα 10: Σύγκριση της S1 ειδικότητας μεταξύ της IRAP E541R και της IRAP WT. Οι διαφορές μεταξύ τους σημειώνονται με τα βέλη

Το μοτίβο εκλεκτικότητας της μεταλλαγμένης μορφής της IRAP ήταν διαφορετικό από εκείνο της IRAP WT καθώς φάνηκε ξεκάθαρα η μείωση της δραστικότητας της έναντι υποστρωμάτων με θετικά φορτισμένες πλευρικές ομάδες στην θέση P1 (σχήμα 10, βέλη). Πιο συγκεκριμένα, το μοτίβο εκλεκτικότητας της IRAP E541R ομοίαζε με το μοτίβο εκλεκτικότητας της ERAP1 (σχήμα 7).

8.4.2 <u>Πρότυπη καμπύλη τιτλοδότησης Michaelis – Menten για την υδρόλυση του</u> <u>R-AMC από την IRAP και την IRAP E541R</u>

Από την ανάλυση Michaelis-Menten που έγινε με υπόστρωμα το φθορίζον R-AMC για την IRAP WT και την μεταλλαγμένη IRAP E541R λάβαμε τις παρακάτω γραφικές παραστάσεις της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης (mol AMC/ mol ενζύμου sec) σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος (μM), μέσω τον οποίων και με τη χρήση του προγράμματος Graph pad prism5 υπολογίστηκαν οι κινητικές παράμετροι K_M και ο ρυθμός ανακύκλισης (k_{cat}), οι τιμές των οποίων αναγράφονται στα ακόλουθα γραφήματα (σχήμα 11).



Σχήμα 11: Πρότυπες καμπύλες τιτλοδότησης Michaelis-Menten για την υδρόλυση του R-AMC από τις IRAP WT και την μεταλλαγμένη IRAP E541R

Με βάση τις παραπάνω τιτλοδοτήσεις παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στη σταθερά K_M (από 11±3µM για την IRAP WT σε 54±8µM για την IRAP E541R) καθώς και μια σχετική μείωση στην k_{cat} (από 0.39±0.015sec⁻¹ για την IRAP WT σε 0.26±0.01 sec⁻¹ για την IRAP E541R), με αποτέλεσμα την μεταβολή του πηλίκου k_{cat}/K_M , με άλλα λόγια του συντελεστή που δηλώνει την εξειδίκευση του κάθε ενζύμου ως προς ένα υπόστρωμα. Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων αυτών μας οδήγησε στο συμπέρασμα ότι οι διαφορές στην εκλεκτικότητα της IRAP E541R που παρατηρήσαμε ήταν αποτέλεσμα της μειωμένης συγγένειας της (υψηλότερη K_M) για υποστρώματα με θετικά φορτισμένες πλευρικές ομάδες στη θέση P1, υποδηλώνοντας ότι το Glu⁵⁴¹ επιτρέπει στην IRAP να "μιμείται" τις προτιμήσεις σε υποστρώματα της ERAP2 και παράλληλα να διατηρεί το μοτίβο εκλεκτικότητας της ERAP1.

8.5. <u>Αναστολείς</u>

Οι πληροφορίες που λάβαμε από την λεπτομερή ανάλυση των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών του S1 θύλακα των ERAP1, ERAP2 (392N) και IRAP χρησιμοποιήθηκαν στο να κατευθύνουμε τον σχεδιασμό εκλεκτικών αναστολέων για τα συγκεκριμένα ένζυμα.

Οι αναστολείς που δοκιμάστηκαν σχεδιάστηκαν έτσι, ώστε να διαθέτουν κάποιο προσδέτη για το ιόν ψευδαργύρου που υπάρχει στο καταλυτικό κέντρο των τριών ενζύμων και συμμετέχει στην κατάλυση (εικόνα 9). Επιπλέον, χαρακτηρίζονται από την παρουσία πλευρικών αλυσίδων σχεδιασμένων έτσι, ώστε να προσδεθούν στους δυο πρώτους θύλακες ειδικότητα των ενζύμων (S1 και S1' αντίστοιχα) (σχήμα 12).



Σχήμα 12: Γενική στρατηγική ανάπτυξης πιθανόν αναστολέων για τις ERAP1, ERAP2 και IRAP. Όπου R και R2 οι χαρακτηριστικές πλευρικές αλυσίδες που θα προσδεθούν στους θύλακες ειδικότητας S1 και S1' αντίστοιχα

8.5.1 Δοκιμή πυριδινικών και ανιλινικών αναστολέων

Η πρώτη κατηγορία αναστολέων που δοκιμάσαμε ήταν μια σειρά από ανιλινικά (H1-I4b) και πυριδινικά (P2-P6) παράγωγα με γενική δομή που φένεται στο σχήμα 13, ενώ όλες οι δομές των ενώσεων παρατίθενται στο παράρτημα (πίνακας III). Η συγκεκριμένη κατηγορία αναστολέων συντέθηκε από τον Δρ. Θάνο Παπακυριακού (Ινστιτούτο Φυσικοχημείας, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος») και δοκιμάστηκαν σε συνθήκες που αναφέρθηκαν στις Μεθόδους και Υλικά (παράγραφος 7.8.1). Στη συνέχεια, τα δεδομένα της ταχύτητας που λάβαμε για κάθε ένζυμο εκφράστηκαν σε ποσοστό επί τις εκατό, όπου 100% η ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης απουσία αναστολέα και κατασκευάστηκαν τα παρακάτω ιστογράμματα (σχήμα 14).



Σχήμα 13: Απεικόνιση της γενικής δομής των ανιλινικών και πυριδινικών παραγώγων που δοκιμάστηκαν ως αναστολείς για τα τρία ένζυμα



Σχήμα 14: Παριστάνεται η επίδραση των ανιλινικών και πυριδινικών αναστολέων (εκφρασμένη σε % ποσοστό αναστολής) στη δραστικότητα των ERAP1, ERAP2 (392N) και IRAP, σε συγκεντρώσεις αναστολέα 0, 10, 100 και 1000μΜ

Από τα παραπάνω γραφήματα φάνηκε ότι τα πυριδινικά παράγωγα (ενώσεις P1-P6) είχαν παρόμοια επίδραση, με μέτρια ανασταλτική ικανότητα (Ki >100μM) για την ERAP1. Από τα ανιλινικά παράγωγα οι ενώσεις (H1-H4) που διέθεταν υδρόφοβες ομάδες (Leu ή lle) που θα προσδεθούν στον S1 θύλακα και Tyr ως πλευρική ομάδα που θα προσδεθεί στον S1' θύλακα του ενζύμου (H1-H4) αποτέλεσαν τους λιγότερο δραστικούς αναστολείς (Ki >1000μM). Ενώ η αντικατάσταση της Tyr με Lys (ενώσεις l2b-l4b) αύξησε ελαφρώς την ισχύς πρόσδεσης του αναστολέα (με Ki≈100μM).

Για την ERAP2 τόσο τα ανιλινικά όσο και τα πυριδινικά παράγωγα είχαν παρόμοια επίδραση στη δραστικότητα της συνεπώς δεν μπορούν να χαρακτηριστούν ως εκλεκτικοί αναστολείς. Επιπλέον σημαντική μείωση στη δραστικότητα της παρατηρήθηκε μόνο σε υψηλές συγκεντρώσεις αναστολέα (100 και 1000μΜ). Αντίθετα, για την IRAP, η συγκεκριμένη σειρά αναστολέων έδωσε πιο ικανοποιητικά αποτελέσματα καθώς για ορισμένες ενώσεις (P3, P4 και H4), με υδρόφοβες ή λιγότερο υδρόφοβες πλευρικές ομάδες που θα προσδεθούν στους S1 και S1' θύλακες (Met, Leu ή IIe και Ala εστεροποιημένη ή Tyr αντίστοιχα), η σταθερά Κι εκτιμήθηκε στα ≈10μΜ.

Συνοψίζοντας, οι συγκεκριμένες ενώσεις δεν μπορούν να χαρακτηριστούν ως ιδιαίτερα αποτελεσματικές ως αναστολείς. Μια πιθανή εξήγηση της μη αποτελεσματικότητας των συγκεκριμένων ενώσεων είναι η επιλογή των πλευρικών ομάδων που θα προσδεθούν στους θύλακες ειδικότητας (S1 και S1') των ενζύμων ή ο κατάλληλος συνδυασμός τους. Παρόλα αυτά αρκετές από αυτές τις ουσίες παρουσίασαν μια μέτρια ικανότητα αναστολής των ενζύμων (Ki≈100μM) που μπορεί να υποδεικνύει ότι μπορεί να είναι χρήσιμοι ως αρχικά δομικά μοτίβα (leads) για σχεδιασμό ισχυρότερων αναστολέων.

8.5.2 <u>Φωσφινικοί αναστολείς</u>

Η δεύτερη κατηγορία αναστολέων που δοκιμάσαμε ήταν οι φωσφινικοί (ανάλογα μεταβατικής κατάστασης), οι οποίοι συντέθηκαν από τον Δρ. Δημήτρη Γεωργιάδη (Τμήμα Χημείας, Εργαστήριο Οργανικής, Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών). Ο σχεδιασμός της συγκεκριμένης κατηγορίας αναστολέων βασίστηκε στα μοτίβα εκλεκτικότητας των ERAP1, ERAP2 (392N) και IRAP, όπως εξάχθηκαν από τη "σάρωση" της συλλογής. Πιο συγκεκριμένα, δοκιμάστηκαν δύο ενώσεις μικρού μοριακού βάρους (διπεπτίδια) με ελεύθερη α-αμινομάδα, στις οποίες επιλέχθηκε η hPhe (L διαμόρφωσης) ως η πλευρική ομάδα που θα προσδεθεί στον S1 θύλακα των ενζύμων καθώς αποδείχθηκε μια πλευρική ομάδα με υψηλή δεσμευτική συγγένεια για τον S1 θύλακα και των τριών ενζύμων, με άλλα λόγια ένα αρκετά καλό υπόστρωμα και για τα τρία ένζυμα (σχήμα 7). Ενώ η επιλογή της πλευρικής ομάδας που θα προσδεθεί στον S1' θύλακα των ενζύμων βασίστηκε σε προηγούμενη μελέτη των Evnouchidou et al στην οποία διαπιστώθηκε πως στο συγκεκριμένο θύλακα, κυρίως της ERAP1, προσδένονται με υψηλότερη συνάφεια υδρόφοβες πλευρικές ομάδες, όπως Leu (σχήμα 15) [63].

Δοκιμάστηκαν και δύο μεγαλύτερα ψευδο-φωσφινικά πεπτιδικά παράγωγα με ελεύθερη α-αμινομάδα (εννιαπεπτίδια) και αλληλουχίες αμινοξέων αντίστοιχες με τις αλληλουχίες κάποιων επιτόπων που αναγνωρίζουν οι ERAP1 και ERAP2 (DG001 και DG014). Όλες οι δομές περιλαμβάνονται στο παράρτημα Ι (πίνακας ΙΙ).



S1 Θύλακας

Σχήμα 15: Απεικόνιση της γενικής δομής των φωσφινικών ενώσεων που δοκιμάστηκαν ως αναστολείς για τα τρία ένζυμα

8.5.3 Καθαρισμός φωσφινικών αναστολέων

Οι φωσφινικοί αναστολείς, που δοκιμάστηκαν και χαρακτηρίστηκαν, υποβλήθηκαν πρωταρχικά σε καθαρισμό μέσω ημιπαρασκευαστικής στήλης ανάστροφης φάσης σε HPLC, όπως αναφέρθηκε στις Μεθόδους και Υλικά (παράγραφος 7.8.3). Στόχος του καθαρισμού ήταν η απομάκρυνση τυχόν προσμίξεων που μπορεί να περιέχονταν στο διάλυμα του αναστολέα και μπορεί να επηρεάσουν την δραστικότητα των ενζύμων καθώς και ο διαχωρισμός των δύο διαστερεομερών, που σχηματίζονται κατά την σύνθεση τους και από τα οποία το ένα ενδέχεται να αντιστοιχεί στον δραστικό αναστολέα. Μετά την ανάλυση στην HPLC των διαλυμάτων των αναστολέων και τη συλλογή των κορυφών που αντιστοιχούσαν στον καθαρό αναστολέα, έγινε λυοφιλίωση,

επαναδιαλυτοποίηση και προσδιορισμός της συγκέντρωσης του κάθε αναστολέα (Μέθοδοι και Υλικά 7.8.5). Παρουσιάζονται ενδεικτικά δύο χρωματογραφήματα ενός εννιαπεπτιδικού αναστολέα και ενός διπεπτιδικού (σχήμα 16). Λόγω ύπαρξης χειραλικών κέντρων και μη στερεό εκλεκτικής σύνθεσης τους, από τον καθαρισμό απομονώθηκαν διαστερεομερή που χαρακτηρίστηκαν ξεχωριστά (κορυφές Α και Β).



Σχήμα 16; (Α) Χαρακτηριστικά χρωματογραφήματα του καθαρισμού του εννιαπεπτιδικού αναστολέα DG001 (Β) Χαρακτηριστικά χρωματογραφήματα του καθαρισμού του διπεπτιδικού αναστολέα DG002. Τα μαύρα βέλη αντιστοιχούν στις κορυφές που συλλέχθηκαν

Οι κορυφές που συλλέχθηκαν ταυτοποιήθηκαν με την τεχνική της φασματοσκοπίας μάζας, πριν προσδιοριστεί η επίδραση τους στη δραστικότητα των ERAP1, ERAP2 (392N) και IRAP.

8.5.4 Προσδιορισμός της σταθεράς αναστολής Κί των φωσφινικών αναστολέων

Μετά τον καθαρισμό και την ταυτοποίηση των αναστολέων προσδιορίστηκε η δραστικότητα τους έναντι των ERAP1, ERAP2 (392N) και IRAP, σε συνθήκες που αναφέρθηκαν στις Μεθόδους και Υλικά (παράγραφος 7.8.6). Ως υπόστρωμα για την ERAP1 χρησιμοποιήθηκε το L-AMC ενώ, για τις ERAP2 και IRAP το R-AMC σε συγκέντρωση 50μM.

Στη συνέχεια, για να προσδιορίσουμε τη σταθερά αναστολής Κι κατασκευάστηκαν οι πρότυπες καμπύλες τιτλοδότησης εκφρασμένες σε % ποσοστό αναστολής σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αναστολέα (μΜ). Η σταθερά Κι υπολογίστηκε μέσω της εξίσωσης V=V_{max}*[I]/(Ki+[I])-V_{max} (Graph pad prism), όπου V η ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης παρουσία αναστολέα, V_{max} η μέγιστη ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης, [I] η συγκέντρωση του αναστολέα και Κι η σταθερά αναστολής. Θα πρέπει να αναφερθεί ότι τα δύο κλάσματα που απομονώθηκαν από την HPLC (σχήμα 16) συμβολίστηκαν για λόγους ευκολίας ως A (η πρώτη κορυφή) και B (η δεύτερη). Στις ακόλουθες γραφικές παραστάσεις παρουσιάζονται οι καμπύλες τιτλοδότησης, μέσω των οποίων προσδιορίστηκε η Κι των αναστολέων.




Σχήμα 17: Πρότυπες καμπύλες τιτλοδότησης μέσω τον οποίων υπολογίστηκε η σταθερά Κi για τους φωσφινικούς αναστολείς της ERAP1, σε σταθερή συγκέντρωση υποστρώματος (L-AMC) 50μΜ ενώ αναγράφονται και οι σταθερές Ki. Τα Α και Β αναφέρονται στο πρώτο και δεύτερο κλάσμα αντίστοιχα που απομονώθηκαν κατά τον καθαρισμό των αναστολέων

ERAP2



Σχήμα 18: Πρότυπες καμπύλες τιτλοδότησης μέσω τον οποίων υπολογίστηκε η σταθερά Κi για τους φωσφινικούς αναστολείς της ERAP2, σε σταθερή συγκέντρωση υποστρώματος (R-AMC) 50μΜ ενώ αναγράφονται και οι σταθερές Ki. Τα Α και Β αναφέρονται στο πρώτο και δεύτερο κλάσμα αντίστοιχα που απομονώθηκαν κατά τον καθαρισμό των αναστολέων

<u>IRAP</u>



Σχήμα 19: Πρότυπες καμπύλες τιτλοδότησης μέσω τον οποίων υπολογίστηκε η σταθερά Κi για τους φωσφινικούς αναστολείς της IRAP, σε σταθερή συγκέντρωση υποστρώματος (R-AMC) 50μΜ ενώ αναγράφονται και οι σταθερές Ki. Τα Α και Β αναφέρονται στο πρώτο και δεύτερο κλάσμα αντίστοιχα που απομονώθηκαν κατά τον καθαρισμό των αναστολέων

8.5.5 Μερική αναστολή

Ένας από τους αναστολείς προκάλεσε μερική αναστολή και στα τρία ένζυμα στην περίπτωση αυτή η σταθερά αναστολής Κι υπολογίστηκε από την εξίσωση για τη μερική αναστολή V=V_{max}*[I]/(Ki+[I])-V_{max}+b, όπου b η μικρότερη τιμή της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης παρουσία αναστολέα (Graph Pad prism5).



Σχήμα 20: Πρότυπες καμπύλες τιτλοδότησης για τον μερικό αναστολέα DG001 των ERAP1, ERAP2 και IRAP σε σταθερή συγκέντρωση υποστρώματος 50μΜ με τις αντίστοιχες σταθερές Ki

Μερική αναστολή προκάλεσε και στα τρία ένζυμα το ένα από τα δύο εννιαπεπτιδικά ψευδο-φωσφινικά παράγωγα που δοκιμάστηκαν (DG001), σε αντίθεση με το άλλο (DG014). Τα δύο αυτά πεπτιδικά παράγωγα διαφέρουν ως προς την εσωτερική τους αλληλουχία και είναι πιθανό η μερική αναστολή να οφείλεται σε αλληλεπιδράσεις συγκεκριμένων αμινοξέων στην αλληλουχία του DG001, καθώς διαθέτει δύο θετικά φορτισμένες πλευρικές αλυσίδες (Lys και Arg) με αμινοξέα δομικών περιοχών των τριών ενζύμων.

8.5.6 <u>Συγκεντρωτικά αποτελέσματα από τη δοκιμή των φωσφινικών</u> <u>αναστολέων</u>

Οι συγκεκριμένοι αναστολείς μας έδωσαν ικανοποιητικά αποτελέσματα, σε αντίθεση με την προηγούμενη κατηγορία των ανιλινικών και πυριδινικών αναστολέων, καθώς για τους περισσότερους υπολογίστηκαν σταθερές αναστολής μικρότερες του 1μΜ όπως φαίνεται στον ακόλουθο πίνακα 4. Σε μια προσπάθεια να εξαχθούν πληροφορίες ως προς την εκλεκτικότητα των φωσφινικών αναστολέων έναντι των ERAP1, ERAP2 και IRAP κατασκευάστηκε το ακόλουθο ιστόγραμμα (σχήμα 21) των σταθερών αναστολής (nM) για κάθε ένωση και για τα τρία ένζυμα, όπου τα (A) και (B) αναφέρονται στο πρώτο και δεύτερο κλάσμα που απομονώθηκε κατά τον καθαρισμό τους.

Πίνακας 4; Παρουσιάζονται συγκεντρωτικά όλοι οι φωσφινικοί αναστολείς που δοκιμάστηκαν με τις αντίστοιχες σταθερές αναστολής σε nM και τα σχετικά σφάλματα για τις ERAP1, ERAP2 και IRAP, με αστερίσκο συμβολίζεται η μερική αναστολή και με μπλε χρώμα οι λιγότερο δραστικοί αναστολείς

Αναστολέας	ERAP1	ERAP2	IRAP
		Ki(nM)	
DG001*(A)	325±115	58±8	153±11
DG002(A)	477±47	565±122	158±23
DG002(B)	393±73	532±60	382±59
DG003	(23±2)*10^3	(1.3±0.2)*10^3	(35±2)*10^3
DG014(A)	(1.8±0.3)*10^3	260±30	318±28
DG014(B)	363±48	206±38	631±45

Οι ενώσεις της σειράς των φωσφινικών ανάλογων μεταβατικής κατάστασης που δοκιμάστηκαν προκάλεσαν δύο τύπους αναστολής: πλήρη και μερική.



Σχήμα 21: Σύγκριση της δραστικότητας των φωσφινικών αναστολέων που προκάλεσαν πλήρη αναστολή με βάση την σταθερά Κi εκφρασμένη σε nM για τις ERAP1, ERAP2 και IRAP

Από το παραπάνω γράφημα διαπιστώθηκε πως τα ανάλογα μεταβατικής κατάστασης μπορεί να αποτελέσουν δραστικούς αναστολείς καθώς για αρκετές ενώσεις υπολογίστηκαν σταθερές αναστολής μικρότερες από 1μΜ. Ωστόσο, ο ασθενέστερος αναστολέας και για τα τρία ένζυμα αποδείχθηκε η ένωση DG003 (με Ki ≥1.3μM). Πιθανόν, η παρουσία της καρβοξυλο-ομάδας στο C-τελικό άκρο του αναστολέα να παρεμποδίζει την πρόσδεση του (λόγω του αρνητικού φορτίου της), ενώ η αντικατάσταση της με αμινοομάδα (DG002) αύξησε κατά πολύ την ισχύς πρόσδεσης του αναστολέα (Ki≤600nM). Επιπλέον, διαπιστώθηκε πως στην περίπτωση του διπεπτιδικού αναστολέα DG002 και τα δύο στερεοϊσομερή είχαν περίπου την ίδια επίδραση στη δραστικότητα των τριών ενζύμων, αν και για την IRAP το πρώτο (A) ισομερές ήταν δραστικότερο. Αντίθετα, από τη δοκιμή των δύο διαστερεομερών του εννιαπεπτιδικού αναστολέα DG014 προέκυψε για την ERAP1 πως το δεύτερο (B) ήταν δραστικότερο (Ki=368±48nM) σε σχέση με το πρώτο (A) (Ki= 1.8±0.3μM), για την ERAP2 ότι και τα δύο είχαν περίπου την ίδια επίδραση (Κi≈ 200nM), ενώ τέλος για την IRAP το πρώτο ήταν δύο φορές δραστικότερος αναστολέας (Ki= 318±28nM) σε σχέση με το δεύτερο (Ki= 631±45nM).

Τέλος, από τη σύγκριση του εννιαπεπτιδικού ανάλογου DG014, που διέθετε τον ίδιο κορμό με τον ένα διπεπτιδικό DG002 διαπιστώθηκε πως η παρουσία οκτώ επιπλέον αμινοξέων στην αλληλουχία του πεπτιδικού αναστολέα δεν προκάλεσε σημαντικές αλλαγές στην ισχύς πρόσδεσης του αναστολέα και μάλιστα το πρώτο στερεοϊσομερές του για την ERAP1 ήταν ~5 φορές ασθενέστερος αναστολέας συγκριτικά με τα στερεοϊσομερή του DG002.



Σχήμα 22: Σύγκριση της δραστικότητας του φωσφινικού αναστολέα που προκάλεσε μερική αναστολή με βάση την σταθερά Κί εκφρασμένη σε nM για τις ERAP1, ERAP2 και IRAP. Τα ποσοστά επάνω από τις μπάρες αντιπροσωπεύουν το % ποσοστό αναστολής που προκάλεσε ο αναστολέας

Η μια από τις τέσσερις ενώσεις που δοκιμάστηκαν προκάλεσε μερική αναστολή και στα τρία ένζυμα σε ποσοστό 79%, 50% και 76% (για τις ERAP1, ERAP2 και IRAP αντίστοιχα) (σχήμα 22).

8.5.7 Χαρακτηρισμός Αναστολέων

Για να προσδιορίσουμε το είδος της αναστολής (ανταγωνιστική ή μη ανταγωνιστική) που προκαλεί η συγκεκριμένη κατηγορία αναστολέων έγινε κινητική μελέτη Michaelis-Menten ώστε να διαπιστώσουμε ποιά κινητική παράμετρο επηρεάζει ο αναστολέας, τη σταθερά K_M ή τη μέγιστη ταχύτητα V_{max}. Για το σκοπό αυτό επιλέξαμε έναν καλό αναστολέα και για τα τρία ένζυμα DG002(A) και πραγματοποιήσαμε τιτλοδότηση με αυξανόμενες συγκεντρώσεις R-AMC για την ERAP2 (392N) σε σταθερή συγκέντρωση αναστολέα ίση με την σταθερά Ki που είχαμε υπολογίσει (0.5μM) καθώς και μια σε μεγαλύτερη συγκέντρωση αναστολέα ίση με 0.8μM (σχήμα 23).





Από την παραπάνω ανάλυση διαπιστώθηκε ότι ο αναστολέας δρα μειώνοντας τη συγγένεια του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα καθώς αυξήθηκε η σταθερά K_M από 68±5μM (απουσία αναστολέα) σε 118±10μM (παρουσία αναστολέα συγκέντρωσης 0.5μM) και 225±20μM (παρουσία αναστολέα συγκέντρωσης 0.8μM), ενώ δεν είχε επίδραση στη V_{max} η οποία παρέμεινε σταθερή και ίση με 0.066±0.002μMsec⁻¹. Με άλλα λόγια, ο αναστολέας ανταγωνίζεται το υπόστρωμα για πρόσδεση στην καταλυτική περιοχή του ενζύμου και επομένως πρόκειται για έναν ανταγωνιστικό αναστολέα.

Τέλος, επιλέξαμε την ένωση που προκάλεσε μερική αναστολή και στα τρία ένζυμα (DG001) και έγινε και πάλι κινητική μελέτη Michaelis-Menten ώστε να χαρακτηριστεί το είδος της μερικής αναστολής (ανταγωνιστική ή μη). Στην συγκεκριμένη περίπτωση, για τη χάραξη της καμπύλης Michaelis-Menten πραγματοποιήσαμε τιτλοδότηση με αυξανόμενες συγκεντρώσεις R-AMC για την ERAP2 σε σταθερή συγκέντρωση

αναστολέα ίση με την σταθερά Κί που είχαμε υπολογίσει (58nM) καθώς και μια σε μεγαλύτερη συγκέντρωση αναστολέα ίση με 0.5μM (σχήμα 24).



Σχήμα 24: (Α) Πρότυπη καμπύλη τιτλοδότησης Michaelis-Menten για την υδρόλυση του R-AMC από την ERAP2 απουσία και παρουσία αναστολέα DG001 συγκέντρωσης 0.05 και 0.5μΜ (Β) Μεταβολή της σταθεράς Κ_M (μΜ) σε συνάρτηση με την προστιθέμενη συγκέντρωση αναστολέα (μΜ) (Γ) Μεταβολή της V_{max} (μMsec⁻¹) σε συνάρτηση με την προστιθέμενη συγκέντρωση αναστολέα (μΜ)

Όπως φαίνεται από το παραπάνω γράφημα ο αναστολέας μειώνει τόσο τη συγγένεια του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα, προκαλώντας αύξηση της σταθεράς K_M από 68±5μM (απουσία αναστολέα) σε 87±10μM και 85±8μM (παρουσία αναστολέα συγκέντρωσης 0.058 και 0.5μM αντίστοιχα), όσο και μείωση της μέγιστης ταχύτητας V_{max} από 0.066±0.002μMsec⁻¹ (απουσία αναστολέα) σε 0.04μMsec⁻¹ (παρουσία αναστολέα). Με βάση τα παραπάνω δεδομένα το συγκεκριμένο είδος αναστολής θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως μερικώς μικτή.

8.5.8 <u>Επίδραση των φωσφινικών αναστολέων στους δύο πολυμορφισμούς της</u> <u>ERAP2 (392N και 392K)</u>

Στη συνέχεια προσδιορίστηκε η επίδραση των φωσφινικών αναστολέων στη δραστικότητα των δύο πολυμορφισμών της ERAP2 (392N και 392K). Για το σκοπό αυτό διεξάχθηκε τιτλοδότηση με αυξανόμενες συγκεντρώσεις του διπεπτιδικού αναστολέα DG002(A), του εννιαπεπτιδικού αναστολέα DG001 καθώς και του γενικού αναστολέα αμινοπεπτιδασών της αμαστατίνης σε σταθερή συγκέντρωση υποστρώματος (R-AMC 50μM) και ακολούθως υπολογίστηκε η σταθερά Ki (σχήματα 25 και 26).



Σχήμα 25: Επίδραση του διπεπτιδικού αναστολέα DG002 στη δραστικότητα των δύο πολυμορφισμών της ERAP2 392N και 392K σε σταθερή συγκέντρωση R-AMC 50μM

Απο την παραπάνω ανάλυση προέκυψε ότι η συγκεκριμένη ένωση έχει περίπου πέντε φορές ασθενέστερη επίδραση στη δραστικότητα της ERAP2 392K (Ki=3.1±1.1µM) προκαλώντας μερική μόνο αναστολή του ενζύμου, στη συγκεκριμένη περιοχή συγκεντρώσεων αναστολέα που μετρήθηκε, σε ποσοστό 53%. Αντίθετα για τον πολυμορφισμό 392N ήταν ένας αρκετά καλός πλήρης αναστολέας (Ki=0.708±0.058µM).



Σχήμα 26: (Α) Επίδραση του εννιαπεπτιδικού αναστολέα DG001 στη δραστικότητα των δύο πολυμορφισμών της ERAP2 392N και 392K σε σταθερή συγκέντρωση R-AMC 50μM (Β) Επίδραση της αμαστατίνης στη δραστικότητα των δύο πολυμορφισμών της ERAP2 392N και 392K σε σταθερή συγκέντρωση R-AMC 50μM

Ο εννιαπεπτιδικός αναστολέας προκάλεσε μερική αναστολή και στους δύο πολυμορφισμούς της ERAP2 σε ποσοστό περίπου 50-60%, με σημαντική όμως διαφορά στην δεσμευτική συγγένεια του ως προς τα δύο ένζυμα. Πιο συγκεκριμένα για τον πολυμορφισμό 392N φάνηκε να είναι 10 φορές δραστικότερος (Ki=58±8nM) σε σχέση με τον πολυμορφισμό 392K (Ki=524±107nM). Ενώ η αμαστατίνη, που αποτελεί ένα ανάλογο υποστρώματος, αποδείχθηκε ένας ασθενής αναστολέας με παρόμοια επίδραση και στα δύο ένζυμα.

Από την παραπάνω μελέτη διαπιστώθηκε πως τα ανάλογα μεταβατικής κατάστασης προσδένονται με διαφορετική ισχύς στα δυο αλλήλια της ERAP2, σε αντίθεση με τα ανάλογα υποστρώματος, υποδηλώνοντας διαφορές στον μηχανισμό σταθεροποίησης της μεταβατικής κατάστασης μεταξύ των δύο αλληλίων και συνεπώς στο μηχανισμό κατάλυσης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα τελευταία χρόνια αποδείχθηκε πως η παραγωγή ώριμων αντιγονικών επιτόπων ικανών να προσδεθούν στην κοιλότητα δέσμευσης πεπτιδίων των μορίων MHC I οφείλεται στην καταλυτική δραστικότητα τριών κυρίως αμινοπεπτιδασών. Πιο συγκεκριμένα οι αμινοπεπτιδάσες ERAP1 και ERAP2 (αμινοπεπτιδάσες του ER) εντοπίστηκαν στο ενδοπλασματικό δίκτυο και αποδείχθηκε πως συμβάλουν στην υδρόλυση των εκτεταμένων πρόδρομων αντιγονικών επιτόπων προς ώριμους [57],[58],[59],[65]. Πρόσφατα, μια ομόλογη αμινοπεπτιδάση, η IRAP/PLAP με παρόμοιο βιολογικό ρόλο, διαπιστώθηκε πως συμμετέχει στο μονοπάτι της διασταυρούμενης αντιγονοπαρουσίασης όπου εντοπίστηκε σε ενδοκυτταρικά κυστίδια [46]. Οι τρεις αυτές αμινοπεπτιδάσες λόγω του υψηλού βαθμού ομολογίας στην αλληλουχία τους (περίπου 50%) και τις αντίστοιχες βιοχημικές και βιολογικές λειτουργίες τους κατατάσσονται σε μια ξεχωριστή υποοικογένεια, την υποοικογένεια M1 των ωκυτοκινασών [66].

Η ERAP1 είναι η καλύτερα χαρακτηρισμένη από τις τρεις αμινοπεπτιδάσες και τα πειράματα αποσιώπησης του γονιδίου της σε ποντίκια απέδειξαν πως η απουσία της επηρέασε σε μεγάλο βαθμό το ρεπερτόριο των αντιγονικών επιτόπων που παρουσιάζονταν από τα ΜΗC Ι και επομένως την ανοσοκυριαρχία. Τα επίπεδα κάποιων επιτόπων αυξήθηκαν, κάποιων άλλων μειώθηκαν και, τέλος, υπήρχαν και κάποιοι επίτοποι των οποίων η παρουσίαση παρέμεινε στα ίδια επίπεδα. Άρα, οι συνέπειες της δράσης του ERAP1 in vivo φαίνεται να είναι περίπλοκες και να εξαρτώνται κάθε φορά από τον επίτοπο [98],[114],[115],[116]. Η αναστολή της ERAP1 από έναν γενικό αναστολέα μεταλλοπρωτεασών, τη λευκινοθειόλη, είχε αντίστοιχη επίδραση στο ρεπερτόριο των αντιγονικών επιτόπων σε κυτταρικές σειρές με εκείνη που προκλήθηκε από την αποσιώπηση του γονιδίου της και πιθανόν να αποτελεί έναν εναλλακτικό και εύκολο τρόπο ρύθμισης της δραστικότητας του ενζύμου και συνεπώς της αντιγονοπαρουσίασης [98]. Επιπλέον, τα τελευταία χρόνια, γενετικές ποικιλομορφίες των ERAP1 και ERAP2 έχουν συσχετιστεί με ανθρώπινες ασθένειες όπως η αγκυλωτική σπονδυλίτιδα, ο διαβήτης και διάφορες μορφές καρκίνου. Μάλιστα σε πρόσφατη μελέτη των Cifaldi et al αποδείχθηκε για πρώτη φορά πως η ERAAP (ERAP1 στα ποντίκια) ρυθμίζει την ογκογένεση καθώς, όπως παρατηρήθηκε, η αποσιώπηση της οδήγησε σε μεσολαβούμενη από τα φυσικά κύτταρα δολοφόνους εξάλειψη των λεμφωμάτων στα ποντίκια [82]. Ακόμα, ο πολυμορφισμός Asn392Lys στην ERAP2 έχει συσχετιστεί με την αγκυλωτική σπονδυλίτιδα και την προεκλαμψία, ενώ φαίνεται ότι αποτελεί ένα εξελικτικό πλεονέκτημα έναντι της μόλυνσης από τον ιό HIV-1. Με βάση όλα τα παραπάνω διαφαίνεται ότι ο σχεδιασμός εκλεκτικών φαρμακευτικών αναστολέων (μικρού μοριακού

βάρους) για τις ERAP1, ERAP2 και IRAP πιθανόν στο μέλλον να αποτελέσει μια νέα προσέγγιση στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου άλλα και της αυτοανοσίας.

Στην παρούσα μελέτη έγινε η υπόθεση ότι η ύπαρξη τριών αμινοπεπτιδασών με παρόμοιο βιολογικό ρόλο είναι πιθανό να οφείλεται σε διαφορές στην εκλεκτικότητα μεταξύ των τριών ενζύμων. Με σκοπό να διαπιστώσουμε την παραπάνω υπόθεση προσδιορίσαμε την Ν-τελική εκλεκτικότητα των ERAP1, ERAP2 (392N) και IRAP και η οποία καθορίζεται από τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του κύριου θύλακα ειδικότητας (S1 θύλακας) κάθε ενζύμου χρησιμοποιώντας μια συλλογή 82 φθοριζόντων διπεπτιδικών υποστρωμάτων. Από την συγκεκριμένη μελέτη διαπιστώθηκε πως τα τρία ένζυμα εμφανίζουν πολλά κοινά χαρακτηριστικά στον κύριο θύλακα ειδικότητας τους αλλά ταυτόχρονα παρατηρούνται και σημαντικές διαφορές στις οποίες είναι πιθανόν να αποδίδονται οι διαφορετικές βιολογικές λειτουργίες τους.

Πιο συγκεκριμένα φάνηκε πως η ERAP1 αποικοδομεί ταχύτερα υποστρώματα με υδρόφοβες, αρωματικές και μακριές αλειφατικές πλευρικές αλυσίδες στη θέση P1 (αριστερά του πεπτιδικού δεσμού που θα υδρολυθεί), η ERAP2 υδρολύει ταχύτερα υποστρώματα με εκτεταμένες θετικά φορτισμένες πλευρικές αλυσίδες στην θέση P1, ενώ η IRAP μπορούσε να υδρολύσει εξίσου καλά τόσο τα υποστρώματα που αναγνώρισε η ERAP1 όσο και η ERAP2 και πιθανόν να συνδυάζει την Ν-τελική εκλεκτικότητα των ERAP1 και ERAP2.

Η παρατήρηση μας ότι η IRAP συνδυάζει την Ν-τελική εκλεκτικότητα των ERAP1 και ERAP2 είναι σύμφωνη με τον πρόσφατα προτεινόμενο βιολογικό ρόλο της IRAP που φαίνεται να δρα μόνη της στα ενδοκυτταρικά κυστίδια της διασταυρούμενης αντιγονοπαρουσίασης όπου αποικοδομεί τους πρόδρομους αντιγονικούς επιτόπους, ενώ οι ERAP1 και ERAP2 συν-εντοπίζονται στο ER όπου δρουν συνεργιστικά [46],[65]. Η ικανότητα της ERAP2 να υδρολύει υποστρώματα με θετικά φορτισμένες ομάδες οφείλεται σε μια αλλαγή στο αμινοξύ που υπάρχει στη θέση 181/198/293 (ERAP1/ERAP2/IRAP, αρίθμηση) [113]. Η συγκεκριμένη αλλαγή απο Gln στις ERAP1 και IRAP σε Asp στην ERAP2 μειώνει τη συγγένεια της προς υδρόφοβες αλυσίδες ευνοώντας την πρόσδεση θετικά φορτισμένων ομάδων. Αντίθετα στην IRAP η συγκεκριμένη θέση είναι συντηρημένη ώστε να μπορεί να αποικοδομεί τα υποστρώματα της ERAP1, αλλά παρατηρείται μια αλλαγή στη θέση 430/447/541, από Arg στην ERAP1 και Gln στην ERAP2, σε Glu στην IRAP και η παρουσία του οποίου πιθανόν να εξηγεί την προτίμηση της σε θετικά φορτισμένες πλευρικές ομάδες στη θέση Ρ1. Για να διαπιστώσουμε κατά πόσο η παρουσία του Glu⁵⁴¹ είναι καθοριστική για την δραστικότητα του ενζύμου έναντι των υποστρωμάτων με θετικά φορτισμένες πλευρικές ομάδες πραγματοποιήθηκε κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση του σε αργινίνη, καθώς η ERAP1 στη συγκεκριμένη θέση διαθέτει αργινίνη. Από τα αποτελέσματα μας προέκυψε πως το Glu⁵⁴¹ επιτρέπει στην IRAP να "μιμείται " τις προτιμήσεις σε υποστρώματα της ERAP2

διατηρώντας όμως και τις προτιμήσεις της ERAP1 και συνεπώς αποτελεί ένα κρίσιμο για τη δραστικότητα του ενζύμου αμινοξύ έναντι υποστρωμάτων με θετικά φορτισμένες πλευρικές ομάδες.

Αξίζει να σημειωθεί ότι τα καλύτερα υποστρώματα και για τα τρία ένζυμα διέθεταν μη φυσικά αμινοξέα ως πλευρικές αλυσίδες στην θέση Ρ1 υποδηλώνοντας πως ο S1 θύλακας των ενζύμων δεν προσδένει μόνο πλευρικές ομάδες φυσικών αμινοξέων αλλά και πιο πολύπλοκες δομές. Επιπλέον παρατηρήθηκε πως ο S1 θύλακας μπορεί να δεχθεί πλευρικές ομάδες συγκεκριμένης στερεοδιαμόρφωσης (L και όχι D), προσδίδοντας και στα τρία ένζυμα στερεοχημική εξειδίκευση ως προς τη διαμόρφωση των υποστρωμάτων που υδρολύουν. Εξαίρεση αποτέλεσε η ERAP2 η οποία υδρόλυσε την D-Arg αλλά με ~50 φορές χαμηλότερη ταχύτητα σε σχέση με την L-Arg, μια μείωση που όπως προέκυψε από την ανάλυση Michaelis – Menten οφείλεται σε μεταβολή και των δύο κρίσιμων σταθερών της ενζυμικής αντίδρασης K_M και k_{cat} (σχήμα 8), αποδεικνύοντας πως η L διαμόρφωση είναι κρίσιμη για την πρόσδεση του υποστρώματος αλλά και για την ενζυμική κατάλυση. Τέλος ορισμένα υποστρώματα της συλλογής διέθεταν ογκώδης πλευρικές ομάδες οι οποίες μπορούν να δεσμευθούν μόνο σε έναν εκτεταμένο θύλακα. Η ικανότητα της IRAP να υδρολύει αρκετά ογκώδεις υποστρώματα της συλλογής, σε αντίθεση με τις ERAP1 και ERAP2, μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο S1 θύλακας της πιθανόν να είναι λίγο μεγαλύτερος σε μέγεθος σε σχέση με τις άλλες δύο. Ωστόσο, το γεγονός ότι κανένα ένζυμο δεν μπόρεσε να υδρολύσει υποστρώματα με δύσκαμπτες πλευρικές ομάδες, υποδηλώνει ότι ο S1 θύλακας των τριών ενζύμων είναι δομικά άκαμπτος ώστε εύκαμπτες ομάδες ικανές να προσανατολιστούν κατάλληλα στο συγκεκριμένο χώρο, να αποτελούν καλά υποστρώματα.

Παρά τις διαφορές στην εκλεκτικότητα μεταξύ των τριών ενζύμων από τη μελέτη μας διαπιστώθηκαν και σημαντικές ομοιότητες ως προς τη φύση των υποστρωμάτων τα οποία δεν μπόρεσαν να υδρολύσουν. Πιο συγκεκριμένα, υποστρώματα με αρνητικά φορτισμένες πλευρικές ομάδες (Glu, Asp) δεν υδρολύθηκαν από κανένα ένζυμο λόγω του αρνητικού ηλεκτροστατικού δυναμικού στη βάση του S1 θύλακα (εικόνα 20). Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκε ενζυμική δραστικότητα για υποστρώματα με β-διακλαδισμένες πλευρικές ομάδες όπως Val, Ile και Thr λόγω της συντηρημένης Phe⁴³³/ Phe^{450/} Phe⁵⁴⁴ η οποία όπως φαίνεται από το προτεινόμενο μοντέλο βρίσκεται πολύ κοντά με τον β άνθρακα της πλευρικής ομάδας του υποστρώματος με αποτέλεσμα να παρεμποδίζει, λόγω στερεοχημικών συγκρούσεων, τη πρόσδεση αυτών των υποστρωμάτων (εικόνα 21). Άλλωστε πρόσφατα αποδείχθηκε ως η Phe⁴³³/ Phe^{450/} Phe⁵⁴⁴ είναι καθοριστική για την ενζυμική δραστικότητα [117].

Ωστόσο, είναι γνωστό πως ότι αρκετοί πρόδρομοι αντιγονικοί επίτοποι που στο Ν-τελικό άκρο τους υπάρχουν αμινοξέα, όπως η Val, Ile, Glu και άλλα, αποικοδομούνται από τα συγκεκριμένα ένζυμα, με χαρακτηριστικό παράδειγμα την παραγωγή του ώριμου αντιγονικού επιτόπου από την ανθρώπινη οβαλβουμίνη SIINEKL, από την ERAP1 ο πρόδρομος του οποίου διαθέτει Glu στο N-τελικό άκρο του [59]. Μια πιθανή εξήγηση αποτελεί το γεγονός ότι μια σημαντική ιδιότητα της ERAP1, που πιθανώς να είναι κοινή και για τις ERAP2 και IRAP, είναι ότι η καταλυτική της δραστικότητα επηρεάζεται και από την εσωτερική αλληλουχία του πεπτιδίου [63]. Ως αποτέλεσμα, τα συμπεράσματα που βγήκαν από το πρώτο μέρος της συγκεκριμένης μελέτης δεν θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν αυτόνομα ώστε να προβλέψουμε την ικανότητα των τριών ενζύμων να καταβολίζουν αντιγονικά πεπτίδια, καθώς η συγκεκριμένη ικανότητα εξαρτάται από πολλούς παράγοντες (όπως το μήκος και η αλληλουχία του πεπτιδίου), αλλά πιθανώς μπορούν να μας κατευθύνουν στο σχεδιασμό εκλεκτικών αναστολέων ικανών να επηρεάσουν την αντιγονοπαρουσίαση. Κάτι τέτοιο θα ήταν πιθανώς και χρήσιμο θεραπευτικά μιας και τα τελευταία χρόνια αλλαγές στη δραστικότητα αυτών των ενζύμων έχουν συσχετιστεί με διάφορες ανθρώπινες παθολογικές καταστάσεις [118].

Στο δεύτερο μέρος της εργασίας δοκιμάστηκαν δύο κατηγορίες αναστολέων και προσδιορίστηκε *in vitro* η επίδραση τους στη δραστικότητα των ενζύμων. Η πρώτη κατηγορία περιλάμβανε ανιλινικά και πυριδινικά παράγωγα τα οποία αποτελούν χηλικούς υποκαταστάτες του ψευδαργύρου. Από τη δοκιμή των συγκεκριμένων ενώσεων διαπιστώθηκε πως προκάλεσαν σημαντική μείωση στη δραστικότητα των ενζύμων μόνο σε υψηλές συγκεντρώσεις αναστολέα (100 και 1000μM) υποδεικνύοντας ότι έχουν χαμηλή αποτελεσματικότητα ως αναστολείς αν και πιθανώς να είναι χρήσιμα ως πρότυπα μόρια για περαιτέρω σχεδιασμό.

Οι ενώσεις της δεύτερης κατηγορίας κατατάσσονται στις α-αμινο-ακυλο φωσφορικές ενώσεις και ο σχεδιασμός των οποίων βασίστηκε στα αποτελέσματα που βγήκαν από το πρώτο μέρος της μελέτης. Πιο συγκεκριμένα, δοκιμάστηκαν δύο ενώσεις μικρού μοριακού βάρους (διπεπτίδια) με hPhe ως πλευρική ομάδα που θα δεσμευτεί στον S1 θύλακα των ενζύμων, καθώς ήταν αρκετά καλό υπόστρωμα όπως προέκυψε από το πρώτο μέρος της μελέτης μας. Επιπλέον δοκιμάστηκαν και δύο ψευδο-πεπτιδικές ουσίες (ανάλογα μεταβατικής κατάστασης) μεγαλύτερου μοριακού βάρους (εννιαπεπτίδια) με αλληλουχίες αμινοξέων αντίστοιχες με τις αλληλουχίες κάποιων επιτόπων που αναγνωρίζουν οι ERAP1 και ERAP2. Τέλος, το ένα από τα δύο εννιαπεπτιδικά DG002 στον οποίο έχουν προστεθεί οκτώ επιπλέον αμινοξέα.

Από τη μελέτη μας φάνηκε πως τα δύο διαστερεομερή των αναστολέων επιδρούν διαφορετικά στην δραστικότητα των τριών ενζύμων. Πιο συγκεκριμένα, σε άλλες περιπτώσεις είχαν παρόμοια επίδραση (αναστολέας DG002 για τις ERAP1 και ERAP2), σε άλλες το πρώτο ήταν δραστικότερο (αναστολείς DG002 και DG014 για την IRAP), ενώ σε άλλες το δεύτερο αποτέλεσε τον δραστικό αναστολέα (ένωση DG014 για την ERAP1), αποδεικνύοντας πως η διαφόρφωση της πλευρικής ομάδας που θα προσδεθεί στους διάφορους θύλακες εξειδίκευσης ανάλογα με το ενζύμου είναι πιθανώς κρίσιμη για την ισχύ πρόσδεσης του αναστολέα, όπως άλλωστε και του υποστρώματος. Εξάλλου, η χειρομορφία, σε αρκετές περιπτώσεις, αποτέλεσε έναν καθοριστικό παράγοντα για την ανάπτυξη αποτελεσματικών φαρμακευτικών σκευασμάτων [119]. Ο διπεπτιδικός φωσφινικός αναστολέας ανάλογο μεταβατικής κατάστασης (DG002(A)) χαρακτηρίστηκε ως ανταγωνιστικός αναστολέας μεταβάλλοντας τη σταθερά K_M.

Τα ανάλογα μεταβατικής κατάστασης που προκάλεσαν πλήρη αναστολή των τριών ένζύμων αποτέλεσαν σχετικά δραστικούς αναστολείς με Ki<1μM (με εξαίρεση τους DG014(A) για την ERAP1 και DG003). Ενώ η παρουσία οκτώ επιπλέον αμινοξέων στην αλληλουχία του πεπτιδικού αναστολέα DG014 δεν προκάλεσε σημαντικές αλλαγές στην ισχύς πρόσδεσης του συγκριτικά με τον DG002. Ωστόσο, μπορεί να βρει ενδιαφέρουσες εργαστηριακές εφαρμογές, όπως κρυσταλλογραφικές εφαρμογές, επειδή η συνκρυστάλλωση του με ένα ή/και με τα τρία ένζυμα θα μας έδινε ενδιαφέρουσες πληροφορίες για το είδος των αλληλεπιδράσεων που λαμβάνουν χώρα κατά την πρόσδεση του στο καταλυτικό κέντρο των ενζύμων καθώς και για το μηχανισμό της κατάλυσης.

Ο δεύτερος εννιαπεπτιδικός αναστολέας που δοκιμάσαμε προκάλεσε μερική αναστολή και στα τρία ένζυμα σε ποσοστό 79%, 50% και 76% (για τις ERAP1, ERAP2 και IRAP αντίστοιχα). Από τις σταθερές Κί που υπολογίστηκαν για τα τρία ένζυμα με βάση την εξίσωση μερικής αναστολή αποτέλεσε έναν αρκετά δραστικό αναστολέα (κυρίως για την ERAP2) οποίος χαρακτηρίστηκε ως μερικώς μεικτός αναστολέας επιδρώντας και στις δύο σταθερές (K_M και V_{max}) της ενζυμικής αντίδρασης, με κύρια όμως επίδραση στη V_{max}. Αν και είναι δύσκολο να ερμηνεύσουμε το φαινόμενο της μερικής αναστολής, είναι πιθανό να οφείλεται είτε σε αλληλεπίδραση των δύο θετικά φορτισμένων πλευρικών ομάδων (Lys και Arg) που διαθέτει στην αλληλουχία του με πλευρικές ομάδες αμινοξέων δομικών περιοχών των ενζύμων είτε σε κάποιου είδους αλλοστερική αλληλεπίδραση τους. Η συν-κρυστάλλωση των ενζύμων με τον συγκεκριμένο αναστολέα θα μπορούσε να μας δώσει πληροφορίες για το είδος των αλληλεπιδράσεων που λαμβάνουν χώρα καθώς και για τον τρόπο δράσης του.

Στην παρούσα μελέτη επιλέξαμε να χαρακτηρίσουμε τα φωσφινικά ανάλογα μεταβατικής κατάστασης ως αναστολείς για τα δυο αλλήλια της ERAP2 (392N και 392K) βασισμένοι στο γεγονός ότι παρουσιάζουν την ίδια συχνότητα εμφάνισης στον ανθρώπινο πληθυσμό καθώς και ότι ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός (N392K) έχει σχετιστεί με παθολογικές καταστάσεις. Από την συγκεκριμένη μελέτη φάνηκε πως τα φωσφινικά ανάλογα μεταβατικής κατάστασης που έφεραν στο Ν-τελικό τους άκρο υδρόφοβα αμινοξέα αποτέλεσαν ασθενέστερους (5-10 φορές) αναστολείς για το αλλήλιο 392K της ERAP2. Η παραπάνω διαφορά στην ισχύς πρόσδεσης των αναστολέων είναι πιθανό να

οφείλεται σε αλλαγές στην αναγνώριση και σταθεροποίηση της μεταβατικής κατάστασης. Άλλωστε σε παράλληλη μελέτη διαπιστώθηκε πως τα δυο αλλήλια διαφοροποιούνται ως προς την ικανότητα τους να αποικοδομούν υποστρώματα με υδρόφοβο N-τελικό άκρο, οφειλόμενη σε μεταβολή της κρίσιμης σταθεράς k_{cat} των δύο ενζύμων υποδηλώνοντας αλλαγές στη σταθεροποίηση της μεταβατικής κατάστασης (Evnouchidou et al, unpublished data). Αντίθετα, το ανάλογο υποστρώματος αμαστατίνη είχε περίπου την ίδια επίδραση και στα δυο αλλήλια της ERAP2 ενισχύοντας την άποψη ότι οι διαφορές στην καταλυτική δραστικότητα μεταξύ τους οφείλονται στο διαφορετικό μηχανισμό σταθεροποίησης της μεταβατικής κατάστασης και όχι στην συγγένεια τους ως προς το υπόστρωμα. Τέλος, η αποτελεσματικότητα των φωσφινικών ανάλογων μεταβατικής κατάστασης σε μια ενδεχόμενη φαρμακευτική ανάπτυξη τους φάνηκε να εξαρτάται από την γενετική ποικιλομορφία ένας παράγοντας που θα πρέπει να συνυπολογιστεί.

Αξίζει να σημειωθεί ότι τα πρώτα *in vivo* πειράματα που διεξάχθηκαν από συνεργάτες μας (ομάδα Dr. A. Amalfitano, Michigan State Univ, USA) σε κύτταρα HeLa για τον αναστολέα DG002 υποδεικνύουν ότι ο αναστολέας αυτός μπορεί να επηρεάσει ποσοτικά την αντιγονοπαρουσίαση.

Συνοψίζοντας, στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν και προσδιορίστηκαν τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του κύριου θύλακα ειδικότητας (S1) των ERAP1, ERAP2 και IRAP και διαπιστώθηκε πως πρόκειται για έναν σχετικά βαθύ και υδρόφοβο θύλακα με αρνητικό ηλεκτροστατικό δυναμικό στη βάση του. Επιπλέον εντοπίστηκαν τόσο ομοιότητες όσο και σημαντικές διαφορές στα αμινοξέα που τον απαρτίζουν και στις οποίες αποδίδεται η διαφορετική εξειδίκευση τριών ενζύμων που εμπλέκονται των στην αντιγονοπαρουσίαση. Η παραπάνω προσέγγιση μας έδωσε χρήσιμες πληροφορίες ώστε να κατευθύνουμε τον σχεδιασμό ισχυρών και εκλεκτικών αναστολέων για τα τρία ένζυμα. Τέλος, αν και τα φωσφινικά ανάλογα μεταβατικής κατάστασης έχουν χρησιμοποιηθεί ως αναστολείς στο παρελθόν για άλλες αμινοπεπτιδάσες [93],[109], [111] μέσω της εργασίας μας προτείνουμε για πρώτη φορά μια σειρά σχετικά δραστικών αναστολέων με Ki < μ M για τις ERAP1, ERAP2 και IRAP.

ΠΙΝΑΚΑΣ 5: ΟΡΟΛΟΓΙΑ- ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

ΣΥΝΤΜΗΣΗ	ΟΡΟΛΟΓΙΑ			
ACC	7-αμινο-4 καρβαμοϋλο- μεθυλο- κουμαρίνη			
ACN	Ακετονιτρίλιο			
A-LAP	Αμινοπεπτιδάση λευκίνης προερχόμενη από λιποκύτταρα			
AMC	7-αμινο-4-μεθυλο κουμαρίνη			
APCs	Αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα			
APN	Αμινοπεπτιδάση Ν			
APS	Υπερθειϊκό αμμώνιο			
ATP	Τριφωσφορική αδενοσίνη			
BCR	Υποδοχέας Β λεμφοκυττάρου			
BH	bleomycin hydrolase			
BPB	Κυανούν της βρωμοφαινόλης			
BSA	Βόειος ορός αλβουμίνης			
CAP	Αμινοπεπτιδάση κυστεΐνης			
CD	Σύμπλεγμα διαφοροποίησης			
cDNA	Συμπληρωματικό DNA			
	Πεπτίδιο αμετάβλητης αλυσίδας που συνδέεται με μόρια ιστοσυμβατότητας			
CLIP	τάξης ΙΙ			
CRT	Καλρετικουλίνη			
DMSO	Διμεθυλοσουλφοξείδιο			
DNA	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ			
DRP	Ελαττωματικό ριβοσωμικό προϊόν			
ER	Ενδοπλασματικό δίκτυο			
ERp57	Θειολο-δισουλφιδική οξειδοαναγωγάση			
	Αμινοπεπτιδάση ενδοπλασματικού δικτύου σχετιζόμενη με την			
ERAAP	αντιγονοπαρουσίαση			
ERAP	Αμινοπεπτιδάση ενδοπλασματικού δικτύου			
GLUT4	Μεταφορέας γλυκόζης 4			
HLA	Ανθρώπινο λευκοκυτταρικό αντιγόνο			
HSP	Πρωτεϊνη θερμικής προσβολής			
IFN	Ιντερφερόνη			
	Αμινοπεπτιδάση ρυθμιζόμενη από ινσουλίνη			
Lamp-1				
LAP	Αμινοπεπτιοαση λευκινης			
	Luria-Bertani broth, θρεπτικό υλικό αποτελουμενό από τρυπτόνη, εκχυλισμά			
	ζυμης και αλας			
L-RAP	Αμινοπεπτιοασή αργινινής προερχομένη από λευκοκυττάρα			
LTA4H	Α4 υδρολάση των λευκοτριενίων			
MES	2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid			
МНС	Μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας			
MIIC	Διαμερίσματα που περιέχουν μόρια μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξης ΙΙ			
MW	Μοριακό βάρος			

NaP	Φωσφορικό νάτριο			
NK	Κύτταρα δολοφόνοι			
ΝΤΑ	Νιτριλοτριοξικό οξύ			
PDI	Πρωτεϊνική δισουλφιδική ισομεράση			
PILS-AP	Αμινοπεπτιδάση λευκίνης ανθεκτική στην πουρομυκίνη			
PSA	Αμινοπεπτιδάση ανθεκτική στην πουρομυκίνη (puromycin sensitive aminopeptidase)			
PLAP	Αμινοπεπτιδάσης λευκίνης του πλακούντα			
PLC	Σύμπλοκο φόρτωσης πεπτιδίου			
Rab14	Χαμηλού μοριακού βάρους GTΡάσες που συμμετέχουν στην διαμεμβρανική μεταφορά			
Sec61	Μετατοπάση 61			
SDS-PAGE	Ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου με δωδεκυλοθειϊκό νάτριο			
SOC	Super Optimal Broth with Catabolite repression, υλικό ανάπτυξης βακτηρίων υψηλής θρεπτικής αξίας			
ТАР	Μεταφορέας που σχετίζεται με την αντιγονοπαρουσίαση			
T _c	κυτταροτοξικό Τ λεμφοκύτταρο			
Т _н	βοηθητικό Τ λεμφοκύτταρο			
TCR	Υποδοχέας Τ κυττάρου			
TEMED	Τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη			
TNF-α	Παράγοντας νέκρωσης όγκων-α			
TFA	Τριφθοροξικό οξύ			

Αμινοξέα				
Α	Ala	αλανίνη		
С	Cys	κυστεΐνη		
D	Asp	ασπαρτικό οξύ		
E	Glu	γλουταμικό οξύ		
F	Phe	φαινυλαλανίνη		
G	Gly	γλυκίνη		
Н	His	ιστιδίνη		
	lle	ισολευκίνη		
К	Lys	λυσίνη		
L	Leu	λευκίνη		
Μ	Met	μεθειονίνη		
Ν	Asn	ασπαραγίνη		
Р	Pro	προλίνη		
Q	Gln	γλουταμίνη		
R	Arg	αργινίνη		

<u>Παράρτημα</u>

<u>Πίνακας Ι:</u> Αναγράφονται τα ονόματα, οι δομές και τα μοριακά βάρη των υποστρωμάτων της βιβλιοθήκης

ONOMA	ΔΟΜΗ	ONOMA	ΔΟΜΗ	ONOMA	ΔΟΜΗ
Ala	CONH	Arg	CONH ₂	Asn	CONHa
M.W: 289.1	H ₂ N HN x TFA	M.W: 376.2	$H_2N + H_1N + H_2N + H_1N + H_2N + H_1N + H_2N + H_1N + H_2N + $	M.W: 332.1	H ₂ N H _N x TFA H ₂ C x TFA
Asp	001/1	Gln	CONH ₂	Glu	_CONH ₂
M.W: 333.1	H ₂ N HN TFA	M.W: 346.2	H ₂ N H _N x TFA CH ₂ C=O NH ₂	M.W: 347.1	O H ₂ N H _N X TFA CH ₂ C=O OH
Gly	CONH	His	CONH ₂	lle	CONH ₂
M.W: 275.1		M.W: 355.2	H ₂ N H _N X 2TFA	M.W: 331.2	H ₂ N H _N x TFA
Leu	CONU	Lys	CONH ₂	Met	_CONH ₂
M.W: 331.2	H ₂ N H ₁ N X TFA CHCH ₃ CH ₃	M.W: 346.2	$\begin{array}{c} \begin{array}{c} & \\ H_2N \\ & \\ H_2N \\ & \\ H_2 \\ & \\ H_2 \\ & \\ CH_2 \\ & \\ NH_2 \end{array} \times 2 \text{TFA}$	M.W: 349.1	$\begin{array}{c} 0 \\ H_2N \\ \vdots \\ H_2 \\ CH_2 \\ CH_2 \\ x \\ CH_3 \end{array} x \\ TFA \\ CH_3 \\ \end{array}$
Phe	CONH ₂	Pro	_CONH ₂	Ser	CONH ₂
M.W: 365.2	H ₂ N HN x TFA	M.W: 315.1		M.W: 305.1	H ₂ N HN TFA



D-Tyr	CONH ₂	D-Val	CONH ₂	D-hPhe	CONH ₂
M.W: 381.2		M.W: 317.2		M.W: 379.2	
			ČHCH₃ x TFA ĊH₃		CH ₂
D-Phg	CONH ₂	hPhe	CONH ₂	(1-	CONH ₂
M.W: 351.2		M.W: 379.2		pyrrolidin -2-yl)-Ala	H ₂ N HN COO
	x TFA		CH ₂	M.W: 358.2	CH ₂ x 2TFA
Apns (2S,3S)	CONH ₂	Dap	CONH ₂	cyclopent yl-Gly	CONH ₂
M.W: 395.2		M.W: 304.1		M.W: 343.2	
			NH ₂	-	
3-CN- Phe		(1- piperidin-4- vl)-Ala		Dab M.W:	CONH ₂
M.W: 390.2	H ₂ N HN O CH ₂ x TFA	M.W:		318.2	
	CN	572.2	L H H		CH2 NH2
hArg	CONH ₂	1-Nal	CONH ₂	2-Nal	CONH ₂
M.W: 388.2	H ₂ N HN x 2TFA CH ₂ x 2TFA CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂	M.W: 415.2	H ₂ N H _N K TFA	M.W: 415.2	H ₂ N HN KTFA
	NH Ç=NH NH2				
Tic	CONH	Cha	CONH ₂	4-NO ₂ - Phe	CONH ₂
M.W: 377.2		M.W: 371.2		M.W: 410.1	
	X IFA				NO ₂





Πίνακας ΙΙ: Αναγράφονται οι δομές, οι συμβολισμοί και τα μοριακά βάρη των φωσφινικών ενώσεων καθώς και της αμαστατίνης



<u>Πίνακας ΙΙΙ</u>: Αναγράφονται οι δομές, οι συμβολισμοί και τα μοριακά βάρη των πυριδινικών και ανιλινικών παραγώγων

ΣΥΜΒΟΛΙΣΜΟΣ	ΔΟΜΗ	ΣΥΜΒΟΛΙΣΜΟΣ	ΔΟΜΗ
P2		P3	CH ₃
M.W: 283.3	H ₃ COOC	M.W: 336.4	CH ₃ NH ₂
P4	CH ₃	P5	CH3
M.W: 354.4		M.W: 393.5	
De		126	NH ₂
M.W: 411.5		M.W: 443.5	
I3b	NH2 NH2	l4b	со LYS он
M.W: 407.5	NH LEU NH2	M.W: 407.5	NHILE _{NH2}
	со LYS он		со LYS он
H1	NH ₂	H2	NH ₂
M.W: 442.5	NH LEU NH ₂	M.W: 442.5	NH ILE NH ₂
	со ТҮК он		со ТҮК он
H3 M.W: 456.5	NHILENH ₂	H4 M.W: 456.5	NHLEUNH ₂
	CO TYR OCH ₃		CO TYR OCH ₃

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- 1. Richard A. Goldsby TJK: Kuby Immunology, 5th edn: W.H. Freeman; 2003.
- 2. Palm NW, Medzhitov R: Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. Immunol Rev 2009, 227(1):221-233.
- 3. Murphy K. TP, Walport M., Janeway's: immunology; 2008.
- 4. Andersen MH, Schrama D, Thor Straten P, Becker JC: Cytotoxic T cells. J Invest Dermatol 2006, 126(1):32-41.
- 5. Krummel MF, Davis MM: Dynamics of the immunological synapse: finding, establishing and solidifying a connection. Curr Opin Immunol 2002, 14(1):66-74.
- 6. Jacobelli J, Andres PG, Boisvert J, Krummel MF: New views of the immunological synapse: variations in assembly and function. Curr Opin Immunol 2004, 16(3):345-352.
- 7. Davis DM, Dustin ML: What is the importance of the immunological synapse? Trends Immunol 2004, 25(6):323-327.
- 8. Davis DM: Assembly of the immunological synapse for T cells and NK cells. Trends Immunol 2002, 23(7):356-363.
- 9. Friedl P, den Boer AT, Gunzer M: Tuning immune responses: diversity and adaptation of the immunological synapse. Nat Rev Immunol 2005, 5(7):532-545.
- 10. Banchereau J, Steinman RM: Dendritic cells and the control of immunity. Nature 1998, 392(6673):245-252.
- 11. Hart DN: Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. Blood 1997, 90(9):3245-3287.
- MacDonald KP, Munster DJ, Clark GJ, Dzionek A, Schmitz J, Hart DN: Characterization of human blood dendritic cell subsets. Blood 2002, 100(13):4512-4520.
- Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K: Immunobiology of dendritic cells. Annu Rev Immunol 2000, 18:767-811.
- 14. Shaw J, Wang YH, Ito T, Arima K, Liu YJ: Plasmacytoid dendritic cells regulate Bcell growth and differentiation via CD70. Blood, 115(15):3051-3057.
- 15. Georgiadou D, Stratikos E: Cellular Mechanisms that Edit the Immunopeptidome. Curr Proteomics 2009, 6(1):13-24.

- 16. Yamao F: [Ubiquitin pathways conferring cell cycle control]. Tanpakushitsu Kakusan Koso 1999, 44(12 Suppl):1717-1724.
- 17. Norbury CC, Tewalt EF: Upstream toward the "DRiP"-ing source of the MHC class I pathway. Immunity 2006, 24(5):503-506.
- Kisselev AF, Akopian TN, Woo KM, Goldberg AL: The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes. Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation. J Biol Chem 1999, 274(6):3363-3371.
- Cascio P, Hilton C, Kisselev AF, Rock KL, Goldberg AL: 26S proteasomes and immunoproteasomes produce mainly N-extended versions of an antigenic peptide. Embo J, 2001, 20(10):2357-2366.
- Kincaid EZ, Che JW, York I, Escobar H, Reyes-Vargas E, Delgado JC, Welsh RM, Karow ML, Murphy AJ, Valenzuela DM et al: Mice completely lacking immunoproteasomes show major changes in antigen presentation. Nat Immunol, 2012 13(2):129-135.
- 21. Abele R, Tampe R: Modulation of the antigen transport machinery TAP by friends and enemies. FEBS Lett 2006, 580(4):1156-1163.
- 22. Brouwenstijn N, Serwold T, Shastri N: MHC class I molecules can direct proteolytic cleavage of antigenic precursors in the endoplasmic reticulum. Immunity 2001, 15(1):95-104.
- Cabrera CM: The double role of the endoplasmic reticulum chaperone tapasin in peptide optimization of HLA class I molecules. Scand J Immunol 2007, 65(6):487-493.
- 24. Park B, Lee S, Kim E, Cho K, Riddell SR, Cho S, Ahn K: Redox regulation facilitates optimal peptide selection by MHC class I during antigen processing. Cell 2006, 127(2):369-382.
- 25. Peaper DR, Wearsch PA, Cresswell P: Tapasin and ERp57 form a stable disulfidelinked dimer within the MHC class I peptide-loading complex. Embo J 2005, 24(20):3613-3623.
- 26. Dick TP, Bangia N, Peaper DR, Cresswell P: Disulfide bond isomerization and the assembly of MHC class I-peptide complexes. Immunity 2002, 16(1):87-98.
- 27. York IA, Goldberg AL, Mo XY, Rock KL: Proteolysis and class I major histocompatibility complex antigen presentation. Immunol Rev 1999, 172:49-66.
- Ortmann B, Copeman J, Lehner PJ, Sadasivan B, Herberg JA, Grandea AG, Riddell SR, Tampe R, Spies T, Trowsdale J et al: A critical role for tapasin in the assembly and function of multimeric MHC class I-TAP complexes. Science 1997, 277(5330):1306-1309.

- 29. Howarth M, Williams A, Tolstrup AB, Elliott T: Tapasin enhances MHC class I peptide presentation according to peptide half-life. Proc Natl Acad Sci U S A 2004, 101(32):11737-11742.
- Sadegh-Nasseri S, Chen M, Narayan K, Bouvier M: The convergent roles of tapasin and HLA-DM in antigen presentation. Trends Immunol 2008, 29(3):141-147.
- Marrack P, Rubtsova K, Scott-Browne J, Kappler JW: T cell receptor specificity for major histocompatibility complex proteins. Curr Opin Immunol 2008, 20(2):203-207.
- 32. Rocha N, Neefjes J: MHC class II molecules on the move for successful antigen presentation. Embo J 2008, 27(1):1-5.
- Rudensky A, Preston-Hurlburt P, Hong SC, Barlow A, Janeway CA, Jr.: Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. Nature 1991, 353(6345):622-627.
- 34. Stern LJ, Wiley DC: Antigenic peptide binding by class I and class II histocompatibility proteins. Behring Inst Mitt 1994(94):1-10.
- Beers C, Burich A, Kleijmeer MJ, Griffith JM, Wong P, Rudensky AY: Cathepsin S controls MHC class II-mediated antigen presentation by epithelial cells in vivo. J Immunol 2005, 174(3):1205-1212.
- 36. Thayer WP, Ignatowicz L, Weber DA, Jensen PE: Class II-associated invariant chain peptide-independent binding of invariant chain to class II MHC molecules. J Immunol 1999, 162(3):1502-1509.
- Zwart W, Griekspoor A, Kuijl C, Marsman M, van Rheenen J, Janssen H, Calafat J, van Ham M, Janssen L, van Lith M et al: Spatial separation of HLA-DM/HLA-DR interactions within MIIC and phagosome-induced immune escape. Immunity 2005, 22(2):221-233.
- Zarutskie JA, Busch R, Zavala-Ruiz Z, Rushe M, Mellins ED, Stern LJ: The kinetic basis of peptide exchange catalysis by HLA-DM. Proc Natl Acad Sci U S A 2001, 98(22):12450-12455.
- 39. Vogt AB, Kropshofer H, Hammerling GJ: How HLA-DM affects the peptide repertoire bound to HLA-DR molecules. Hum Immunol 1997, 54(2):170-179.
- Kaiko GE, Horvat JC, Beagley KW, Hansbro PM: Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response? Immunology 2008, 123(3):326-338.
- 41. Rock KL, Shen L: Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance. Immunol Rev 2005, 207:166-183.

- 42. Ackerman AL, Kyritsis C, Tampe R, Cresswell P: Early phagosomes in dendritic cells form a cellular compartment sufficient for cross presentation of exogenous antigens. Proc Natl Acad Sci U S A 2003, 100(22):12889-12894.
- 43. Ackerman AL, Cresswell P: Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens. Nat Immunol 2004, 5(7):678-684.
- Houde M, Bertholet S, Gagnon E, Brunet S, Goyette G, Laplante A, Princiotta MF, Thibault P, Sacks D, Desjardins M: Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. Nature 2003, 425(6956):402-406.
- 45. Amigorena S, Savina A: Intracellular mechanisms of antigen cross presentation in dendritic cells. Curr Opin Immunol, 2010, 22(1):109-117.
- 46. Saveanu L, Carroll O, Weimershaus M, Guermonprez P, Firat E, Lindo V, Greer F, Davoust J, Kratzer R, Keller SR et al: IRAP identifies an endosomal compartment required for MHC class I cross-presentation. Science 2009, 325(5937):213-217.
- 47. Taylor A: Aminopeptidases: structure and function. Faseb J 1993, 7(2):290-298.
- Craiu A, Akopian T, Goldberg A, Rock KL: Two distinct proteolytic processes in the generation of a major histocompatibility complex class I-presented peptide. Proc Natl Acad Sci U S A 1997, 94(20):10850-10855.
- Mo XY, Cascio P, Lemerise K, Goldberg AL, Rock K: Distinct proteolytic processes generate the C and N termini of MHC class I-binding peptides. J Immunol 1999, 163(11):5851-5859.
- 50. Beninga J, Rock KL, Goldberg AL: Interferon-gamma can stimulate postproteasomal trimming of the N terminus of an antigenic peptide by inducing leucine aminopeptidase. J Biol Chem 1998, 273(30):18734-18742.
- Stoltze L, Schirle M, Schwarz G, Schroter C, Thompson MW, Hersh LB, Kalbacher H, Stevanovic S, Rammensee HG, Schild H: Two new proteases in the MHC class I processing pathway. Nat Immunol 2000, 1(5):413-418.
- 52. Hattori A, Tsujimoto M: Processing of antigenic peptides by aminopeptidases. Biol Pharm Bull 2004, 27(6):777-780.
- 53. Srivastava P: Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. Nat Rev Immunol 2002, 2(3):185-194.
- 54. Lauvau G, Kakimi K, Niedermann G, Ostankovitch M, Yotnda P, Firat H, Chisari FV, van Endert PM: Human transporters associated with antigen processing (TAPs) select epitope precursor peptides for processing in the endoplasmic reticulum and presentation to T cells. J Exp Med 1999, 190(9):1227-1240.
- 55. Fruci D, Niedermann G, Butler RH, van Endert PM: Efficient MHC class Iindependent amino-terminal trimming of epitope precursor peptides in the endoplasmic reticulum. Immunity 2001, 15(3):467-476.

- 56. Serwold T, Gaw S, Shastri N: ER aminopeptidases generate a unique pool of peptides for MHC class I molecules. Nat Immunol 2001, 2(7):644-651.
- Saric T, Chang SC, Hattori A, York IA, Markant S, Rock KL, Tsujimoto M, Goldberg AL: An IFN-gamma-induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides. Nat Immunol 2002, 3(12):1169-1176.
- 58. Serwold T, Gonzalez F, Kim J, Jacob R, Shastri N: ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. Nature 2002, 419(6906):480-483.
- 59. York IA, Chang SC, Saric T, Keys JA, Favreau JM, Goldberg AL, Rock KL: The ER aminopeptidase ERAP1 enhances or limits antigen presentation by trimming epitopes to 8-9 residues. Nat Immunol 2002, 3(12):1177-1184.
- 60. Hattori A, Matsumoto H, Mizutani S, Tsujimoto M: Molecular cloning of adipocytederived leucine aminopeptidase highly related to placental leucine aminopeptidase/oxytocinase. J Biochem 1999, 125(5):931-938.
- 61. Schomburg L, Kollmus H, Friedrichsen S, Bauer K: Molecular characterization of a puromycin-insensitive leucyl-specific aminopeptidase, PILS-AP. Eur J Biochem 2000, 267(11):3198-3207.
- 62. Chang SC, Momburg F, Bhutani N, Goldberg AL: The ER aminopeptidase, ERAP1, trims precursors to lengths of MHC class I peptides by a "molecular ruler" mechanism. Proc Natl Acad Sci U S A 2005, 102(47):17107-17112.
- 63. Evnouchidou I, Momburg F, Papakyriakou A, Chroni A, Leondiadis L, Chang SC, Goldberg AL, Stratikos E: The internal sequence of the peptide-substrate determines its N-terminus trimming by ERAP1. PLoS One 2008, 3(11):e3658.
- Tanioka T, Hattori A, Masuda S, Nomura Y, Nakayama H, Mizutani S, Tsujimoto M: Human leukocyte-derived arginine aminopeptidase. The third member of the oxytocinase subfamily of aminopeptidases. J Biol Chem 2003, 278(34):32275-32283.
- Saveanu L, Carroll O, Lindo V, Del Val M, Lopez D, Lepelletier Y, Greer F, Schomburg L, Fruci D, Niedermann G et al: Concerted peptide trimming by human ERAP1 and ERAP2 aminopeptidase complexes in the endoplasmic reticulum. Nat Immunol 2005, 6(7):689-697.
- 66. Tsujimoto M, Hattori A: The oxytocinase subfamily of M1 aminopeptidases. Biochim Biophys Acta 2005, 1751(1):9-18.
- 67. Rogi T, Tsujimoto M, Nakazato H, Mizutani S, Tomoda Y: Human placental leucine aminopeptidase/oxytocinase. A new member of type II membrane-spanning zinc metallopeptidase family. J Biol Chem 1996, 271(1):56-61.

- 68. Keller SR: Role of the insulin-regulated aminopeptidase IRAP in insulin action and diabetes. Biol Pharm Bull 2004, 27(6):761-764.
- Georgiadou D, Hearn A, Evnouchidou I, Chroni A, Leondiadis L, York IA, Rock KL, Stratikos E: Placental leucine aminopeptidase efficiently generates mature antigenic peptides in vitro but in patterns distinct from endoplasmic reticulum aminopeptidase 1. J Immunol, 2010, 185(3):1584-1592.
- 70. Rawlings ND, Barrett AJ: Evolutionary families of metallopeptidases. Methods Enzymol 1995, 248:183-228.
- 71. Albiston AL, Ye S, Chai SY: Membrane bound members of the M1 family: more than aminopeptidases. Protein Pept Lett 2004, 11(5):491-500.
- 72. Hooper NM: Families of zinc metalloproteases. FEBS Lett 1994, 354(1):1-6.
- 73. Kanaseki T, Blanchard N, Hammer GE, Gonzalez F, Shastri N: ERAAP synergizes with MHC class I molecules to make the final cut in the antigenic peptide precursors in the endoplasmic reticulum. Immunity 2006, 25(5):795-806.
- 74. Blomster M, Wetterholm A, Mueller MJ, Haeggstrom JZ: Evidence for a catalytic role of tyrosine 383 in the peptidase reaction of leukotriene A4 hydrolase. Eur J Biochem 1995, 231(3):528-534.
- Nguyen TT, Chang SC, Evnouchidou I, York IA, Zikos C, Rock KL, Goldberg AL, Stratikos E, Stern LJ: Structural basis for antigenic peptide precursor processing by the endoplasmic reticulum aminopeptidase ERAP1. Nat Struct Mol Biol, 2011, 18(5):604-613.
- 76. Kochan G, Krojer T, Harvey D, Fischer R, Chen L, Vollmar M, von Delft F, Kavanagh KL, Brown MA, Bowness P et al: Crystal structures of the endoplasmic reticulum aminopeptidase-1 (ERAP1) reveal the molecular basis for N-terminal peptide trimming. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(19):7745-7750.
- 77. Birtley JR, Saridakis E, Stratikos E, Mavridis IM: Crystal Structure of Human ER Aminopeptidase 2 Reveals Atomic Basis for Distinct Roles in Antigen Processing. Biochemistry, 2012.
- Burton PR, Clayton DG, Cardon LR, Craddock N, Deloukas P, Duncanson A, Kwiatkowski DP, McCarthy MI, Ouwehand WH, Samani NJ et al: Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants. Nat Genet 2007, 39(11):1329-1337.
- Harvey D, Pointon JJ, Evans DM, Karaderi T, Farrar C, Appleton LH, Sturrock RD, Stone MA, Oppermann U, Brown MA et al: Investigating the genetic association between ERAP1 and ankylosing spondylitis. Hum Mol Genet 2009, 18(21):4204-4212.
- 80. Mehta AM, Jordanova ES, van Wezel T, Uh HW, Corver WE, Kwappenberg KM, Verduijn W, Kenter GG, van der Burg SH, Fleuren GJ: Genetic variation of antigen

processing machinery components and association with cervical carcinoma. Genes Chromosomes Cancer 2007, 46(6):577-586.

- Fruci D, Giacomini P, Nicotra MR, Forloni M, Fraioli R, Saveanu L, van Endert P, Natali PG: Altered expression of endoplasmic reticulum aminopeptidases ERAP1 and ERAP2 in transformed non-lymphoid human tissues. J Cell Physiol 2008, 216(3):742-749.
- 82. Cifaldi L, Lo Monaco E, Forloni M, Giorda E, Lorenzi S, Petrini S, Tremante E, Pende D, Locatelli F, Giacomini P et al: Natural killer cells efficiently reject lymphoma silenced for the endoplasmic reticulum aminopeptidase associated with antigen processing. Cancer Res, 2011, 71(5):1597-1606.
- Yamamoto N, Nakayama J, Yamakawa-Kobayashi K, Hamaguchi H, Miyazaki R, Arinami T: Identification of 33 polymorphisms in the adipocyte-derived leucine aminopeptidase (ALAP) gene and possible association with hypertension. Hum Mutat 2002, 19(3):251-257.
- 84. Taranta A, Gianviti A, Palma A, De Luca V, Mannucci L, Procaccino MA, Ghiggeri GM, Caridi G, Fruci D, Ferracuti S et al: Genetic risk factors in typical haemolytic uraemic syndrome. Nephrol Dial Transplant 2009, 24(6):1851-1857.
- 85. Tsui FW, Haroon N, Reveille JD, Rahman P, Chiu B, Tsui HW, Inman RD: Association of an ERAP1 ERAP2 haplotype with familial ankylosing spondylitis. Ann Rheum Dis, 2010, 69(4):733-736.
- 86. Johnson MP, Roten LT, Dyer TD, East CE, Forsmo S, Blangero J, Brennecke SP, Austgulen R, Moses EK: The ERAP2 gene is associated with preeclampsia in Australian and Norwegian populations. Hum Genet 2009, 126(5):655-666.
- 87. Cagliani R, Riva S, Biasin M, Fumagalli M, Pozzoli U, Lo Caputo S, Mazzotta F, Piacentini L, Bresolin N, Clerici M et al: Genetic diversity at endoplasmic reticulum aminopeptidases is maintained by balancing selection and is associated with natural resistance to HIV-1 infection. Hum Mol Genet, 2010, 19(23):4705-4714.
- Keller SR, Scott HM, Mastick CC, Aebersold R, Lienhard GE: Cloning and characterization of a novel insulin-regulated membrane aminopeptidase from Glut4 vesicles. J Biol Chem 1995, 270(40):23612-23618.
- Albiston AL, McDowall SG, Matsacos D, Sim P, Clune E, Mustafa T, Lee J, Mendelsohn FA, Simpson RJ, Connolly LM et al: Evidence that the angiotensin IV (AT(4)) receptor is the enzyme insulin-regulated aminopeptidase. J Biol Chem 2001, 276(52):48623-48626.
- Matsumoto H, Nagasaka T, Hattori A, Rogi T, Tsuruoka N, Mizutani S, Tsujimoto M: Expression of placental leucine aminopeptidase/oxytocinase in neuronal cells and its action on neuronal peptides. Eur J Biochem 2001, 268(11):3259-3266.

- 91. Segura E, Albiston AL, Wicks IP, Chai SY, Villadangos JA: Different crosspresentation pathways in steady-state and inflammatory dendritic cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2009, 106(48):20377-20381.
- Stragier B, De Bundel D, Sarre S, Smolders I, Vauquelin G, Dupont A, Michotte Y, Vanderheyden P: Involvement of insulin-regulated aminopeptidase in the effects of the renin-angiotensin fragment angiotensin IV: a review. Heart Fail Rev 2008, 13(3):321-337.
- Drag M, Grembecka J, Pawelczak M, Kafarski P: alpha-Aminoalkylphosphonates as a tool in experimental optimisation of P1 side chain shape of potential inhibitors in S1 pocket of leucine- and neutral aminopeptidases. Eur J Med Chem 2005, 40(8):764-771.
- Umezawa H, Aoyagi T, Suda H, Hamada M, Takeuchi T: Bestatin, an inhibitor of aminopeptidase B, produced by actinomycetes. J Antibiot (Tokyo) 1976, 29(1):97-99.
- Kim H, Lipscomb WN: X-ray crystallographic determination of the structure of bovine lens leucine aminopeptidase complexed with amastatin: formulation of a catalytic mechanism featuring a gem-diolate transition state. Biochemistry 1993, 32(33):8465-8478.
- 96. Akada T, Yamazaki T, Miyashita H, Niizeki O, Abe M, Sato A, Satomi S, Sato Y: Puromycin insensitive leucyl-specific aminopeptidase (PILSAP) is involved in the activation of endothelial integrins. J Cell Physiol 2002, 193(2):253-262.
- Hattori A, Kitatani K, Matsumoto H, Miyazawa S, Rogi T, Tsuruoka N, Mizutani S, Natori Y, Tsujimoto M: Characterization of recombinant human adipocyte-derived leucine aminopeptidase expressed in Chinese hamster ovary cells. J Biochem 2000, 128(5):755-762.
- 98. Hammer GE, Gonzalez F, Champsaur M, Cado D, Shastri N: The aminopeptidase ERAAP shapes the peptide repertoire displayed by major histocompatibility complex class I molecules. Nat Immunol 2006, 7(1):103-112.
- 99. Hammer GE, Gonzalez F, James E, Nolla H, Shastri N: In the absence of aminopeptidase ERAAP, MHC class I molecules present many unstable and highly immunogenic peptides. Nat Immunol 2007, 8(1):101-108.
- 100. Lee J, Mustafa T, McDowall SG, Mendelsohn FA, Brennan M, Lew RA, Albiston AL, Chai SY: Structure-activity study of LVV-hemorphin-7: angiotensin AT4 receptor ligand and inhibitor of insulin-regulated aminopeptidase. J Pharmacol Exp Ther 2003, 305(1):205-211.
- 101. Albiston AL, Morton CJ, Ng HL, Pham V, Yeatman HR, Ye S, Fernando RN, De Bundel D, Ascher DB, Mendelsohn FA et al: Identification and characterization of a

new cognitive enhancer based on inhibition of insulin-regulated aminopeptidase. Faseb J 2008, 22(12):4209-4217.

- 102. Lee J, Albiston AL, Allen AM, Mendelsohn FA, Ping SE, Barrett GL, Murphy M, Morris MJ, McDowall SG, Chai SY: Effect of I.C.V. injection of AT4 receptor ligands, NLE1-angiotensin IV and LVV-hemorphin 7, on spatial learning in rats. Neuroscience 2004, 124(2):341-349.
- Pederson ES, Harding JW, Wright JW: Attenuation of scopolamine-induced spatial learning impairments by an angiotensin IV analog. Regul Pept 1998, 74(2-3):97-103.
- 104. Albiston AL, Pederson ES, Burns P, Purcell B, Wright JW, Harding JW, Mendelsohn FA, Weisinger RS, Chai SY: Attenuation of scopolamine-induced learning deficits by LVV-hemorphin-7 in rats in the passive avoidance and water maze paradigms. Behav Brain Res 2004, 154(1):239-243.
- 105. Joseph-McCarthy D: Computational approaches to structure-based ligand design. Pharmacol Ther 1999, 84(2):179-191.
- 106. Hiratake J: Enzyme inhibitors as chemical tools to study enzyme catalysis: rational design, synthesis, and applications. Chem Rec 2005, 5(4):209-228.
- 107. Drag M, Salvesen GS: Emerging principles in protease-based drug discovery. Nat Rev Drug Discov, 2010 9(9):690-701.
- 108. Wood WJ, Patterson AW, Tsuruoka H, Jain RK, Ellman JA: Substrate activity screening: a fragment-based method for the rapid identification of nonpeptidic protease inhibitors. J Am Chem Soc 2005, 127(44):15521-15527.
- 109. Fournie-Zaluski MC, Poras H, Roques BP, Nakajima Y, Ito K, Yoshimoto T: Structure of aminopeptidase N from Escherichia coli complexed with the transitionstate analogue aminophosphinic inhibitor PL250. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 2009, 65(Pt 8):814-822.
- Chen H, Roques BP, Fournie-Zaluski MC: Design of the first highly potent and selective aminopeptidase N (EC 3.4.11.2) inhibitor. Bioorg Med Chem Lett 1999, 9(11):1511-1516.
- 111. Vassiliou S, Xeilari M, Yiotakis A, Grembecka J, Pawelczak M, Kafarski P, Mucha A: A synthetic method for diversification of the P1' substituent in phosphinic dipeptides as a tool for exploration of the specificity of the S1' binding pockets of leucine aminopeptidases. Bioorg Med Chem 2007, 15(9):3187-3200.
- 112. Celis JE, Carter N., Hunter T., Simons K., Small J.V. and Shotton D: Protein Detection in Gels by Silver Staining: A Procedure Compatible with Mass-Spectrometry. In: Cell Biology: A Laboratory Handbook. Edited by Edition r: Elsevier. Academic Press; 2006.
- Goto Y, Tanji H, Hattori A, Tsujimoto M: Glutamine-181 is crucial in the enzymatic activity and substrate specificity of human endoplasmic-reticulum aminopeptidase-1. Biochem J 2008, 416(1):109-116.
- 114. York IA, Brehm MA, Zendzian S, Towne CF, Rock KL: Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 (ERAP1) trims MHC class I-presented peptides in vivo and plays an important role in immunodominance. Proc Natl Acad Sci U S A 2006, 103(24):9202-9207.
- 115. Yan J, Parekh VV, Mendez-Fernandez Y, Olivares-Villagomez D, Dragovic S, Hill T, Roopenian DC, Joyce S, Van Kaer L: In vivo role of ER-associated peptidase activity in tailoring peptides for presentation by MHC class Ia and class Ib molecules. J Exp Med 2006, 203(3):647-659.
- 116. Firat E, Saveanu L, Aichele P, Staeheli P, Huai J, Gaedicke S, Nil A, Besin G, Kanzler B, van Endert P et al: The role of endoplasmic reticulum-associated aminopeptidase 1 in immunity to infection and in cross-presentation. J Immunol 2007, 178(4):2241-2248.
- 117. Albiston AL, Pham V, Ye S, Ng L, Lew RA, Thompson PE, Holien JK, Morton CJ, Parker MW, Chai SY: Phenylalanine-544 plays a key role in substrate and inhibitor binding by providing a hydrophobic packing point at the active site of insulinregulated aminopeptidase. Mol Pharmacol, 2010, 78(4):600-607.
- 118. Haroon N, Inman RD: Endoplasmic reticulum aminopeptidases: Biology and pathogenic potential. Nat Rev Rheumatol, 2010, 6(8):461-467.
- 119. Caner H, Groner E, Levy L, Agranat I: Trends in the development of chiral drugs. Drug Discov Today 2004, 9(3):105-110.