



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ»**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Μελέτη της επίδρασης των αμινοξικών καταλοίπων
στις θέσεις 406, 435, 439 και 841 της
αμινοπεπτιδάσης ERAP1 στη δραστικότητα και την
εξειδίκευση του ενζύμου**

**ΚΟΥΜΑΝΤΟΥ ΔΕΣΠΟΙΝΑ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΑΘΗΝΑ

ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2014



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ»**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Μελέτη της επίδρασης των αμινοξικών καταλοίπων
στις θέσεις 406, 435, 439 και 841 της
αμινοπεπτιδάσης ERAP1 στη δραστικότητα και την
εξειδίκευση του ενζύμου**

**ΚΟΥΜΑΝΤΟΥ ΔΕΣΠΟΙΝΑ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΑΘΗΝΑ

ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2014

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Μελέτη της επίδρασης των αμινοξικών καταλοίπων στις θέσεις 406, 435, 439 και 841 της αμινοπεπτιδάσης ERAP1 στη δραστικότητα και την εξειδίκευση του ενζύμου

ΚΟΥΜΑΝΤΟΥ ΔΕΣΠΟΙΝΑ

A.M.: 61204

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ:

ΓΑΛΑΝΟΠΟΥΛΟΥ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΑ , Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΓΑΛΑΝΟΠΟΥΛΟΥ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΑ , Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

ΣΤΡΑΤΙΚΟΣ ΕΥΣΤΡΑΤΙΟΣ, Ερευνητής Β', Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. "Δημόκριτος"

ΓΕΩΡΓΙΑΔΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ, Επίκουρος Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 17/10/2014

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σε αυτή τη διατριβή μελετήσαμε την επίδραση τεσσάρων αμινοξέων, μιας συστάδας τριών ασπαρτικών οξέων στις θέσεις 406, 435 και 439 και της αργινίνης στη θέση 841, στην εξειδίκευση και τη δραστικότητα της αμινοπεπτιδάσης ERAP1. Η ανθρώπινη αμινοπεπτιδάση ERAP1 αποτελεί βασικό συστατικό του ανοσοποιητικού συστήματος καθώς παράγει ή καταστρέφει αντιγονικούς επιτόπους οι οποίοι αναγνωρίζονται από τα κυτταροτοξικά Τ-λεμφοκύτταρα, ρυθμίζοντας έτσι την ανοσοαπόκριση. Η αμινοπεπτιδάση ERAP1 παρουσιάζει ιδιαίτερα χαρακτηριστικά σε σχέση με άλλες αμινοπεπτιδάσες καθώς επιλέγει υποστρώματα τόσο βάσει μήκους όσο και αλληλουχίας. Συγκεκριμένα κατάλοιπα στην ERAP1 έχουν προταθεί ότι είναι σημαντικά για την επιλογή υποστρώματος. Για να διερευνήσουμε την επίδραση συγκεκριμένων αμινοξικών καταλοίπων στην δραστικότητα και εξειδίκευση της ERAP1 παρασκευάσαμε ανασυνδυασμένη ERAP1 στην οποία τα προς μελέτη αμινοξέα έχουν αντικατασταθεί από αλανίνη με τη βοήθεια στοχευόμενης μεταλλαξιγένεσης. Οι πρωτεΐνες παράχθηκαν σε σύστημα έκφρασης με φορέα βακίλοϊδο σε κύτταρα εντόμου και μελετήθηκαν οι διαφορές τους με την πρωτεΐνη αγρίου τύπου με χρήση φθορισμομετρικών δοκιμασιών και υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης. Τα πειράματα έδειξαν ότι η αργινίνη 841 έχει μια μικρή επίδραση στη δραστικότητα του ενζύμου αλλά δεν επηρεάζει την προτίμηση της ERAP1 για πεπτίδια μεγάλου μήκους. Τα ασπαρτικά οξέα στις θέσεις 406, 435 και 439 συνεισφέρουν στην εξειδίκευση της ERAP1 για υποστρώματα με θετικά φορτισμένα αμινοξέα και μπορούν να επηρεάσουν την καταστροφή επιτόπου μέσω αναστολής περαιτέρω υδρόλυσης του.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Ανοσολογία

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: ERAP1, επεξεργασία επιτόπων, ρυθμιστική περιοχή, συστάδα ασπαρτικών, εξειδίκευση υποστρώματος

ABSTRACT

In this thesis we study the effect of four aminoacids, a three-aspartate cluster at positions 406, 435 and 439 and an arginine at position 841, on the specificity and activity of aminopeptidase ERAP1. Human aminopeptidase ERAP1 constitutes a key component of the adaptive immune system, as it either produces or destroys antigenic epitopes that are normally recognized by cytotoxic T-lymphocytes and in this context it can regulate the adaptive immune response. ERAP1 has some unusual characteristics compared to typical aminopeptidases as it selects its substrates depending on length as well as sequence. Several key amino acids in ERAP1 have been proposed to be involved in substrate selection. To investigate the effect of these residues in the enzymatic properties we produced recombinant ERAP1 in which particular aminoacids are converted to alanine by site-directed mutagenesis. The proteins were expressed in insect cells using a baculovirus vector system and possible differences concerning specific activity, hydrolysis rate and peptide production were studied using fluorimetric assays and high performance liquid chromatography. Arginine 841 appears to have a mild effect on enzyme activity but no effect on ERAP1's substrate length specificity towards long peptides. Aspartic acids in positions 406, 435 and 439 contribute to ERAP1's specificity towards substrates with positively charged aminoacids and possibly control epitope destruction by preventing further hydrolysis.

SUBJECT AREA: Immunology

KEYWORDS: ERAP1, epitope processing, regulatory domain, aspartate cluster, substrate specificity

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για τη διεκπεραίωση της παρούσας ερευνητικής εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα ερευνητή στο Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. “Δημόκριτος” Ευστράτιο Στρατίκο για την ανεκτίμητη βοήθεια και καθοδήγηση του. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια στο Πανεπιστήμιο, Γαλανοπούλου Κωνσταντία για την στήριξη και τις συμβουλές της, όπως και τον κύριο Γεωργιάδη Δημήτριο επίκουρο καθηγητή, για την πολύτιμη συμβολή του κατά τη συγγραφή της παρούσας ερευνητικής εργασίας. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συναδέλφους, Δρ. Ευνουχίδου Ειρήνη, Ζερβούδη Ευθαλία, Δρ. Μπακάλη Αναστασία, Δρ. Γεωργιάδου Δήμητρα και Dr. James Birtley για την πολύτιμη βοήθεια τους κατά το πειραματικό μέρος της ερευνητικής εργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ	23
1.1 Ανθρώπινο ανοσοποιητικό σύστημα.....	23
1.1.1 Φυσική ανοσολογική απόκριση	24
1.1.2 Επίκτητη ανοσολογική απόκριση	25
1.2 Επίκτητη κυτταρική ανοσολογική απόκριση.....	26
1.3 Αντιγονοπαρουσίαση	27
1.3.1 Μονοπάτι MHC I.....	28
1.3.2 Ενεργοποίηση CD8 ⁺ κυτταροτοξικών T- λεμφοκυττάρων	30
1.3.3 Μονοπάτι MHC II.....	31
1.3.4 Διασταυρούμενη αντιγονοπαρουσίαση	33
1.4 Οικογένεια M1 των αμινοπεπτιδασών.....	35
1.4.1 Μηχανισμός δράσης.....	36
1.4.2 Υποοικογένεια των ωκυτοκινασών	38
1.5 Η αμινοπεπτιδάση ενδοπλασματικού δικτύου 1 (ERAP1).....	40
1.5.1 Ανακάλυψη της ERAP1	40
1.5.2 Ρόλος της ERAP1 στην αντιγονοπαρουσίαση.....	41
1.5.3 Άλλες φυσιολογικές λειτουργίες της ERAP1	42
1.5.4 Εμπλοκή της ERAP1 σε ασθένειες.....	44
1.5.5 Η δομή της ERAP1.....	46
1.5.6 Εξειδίκευση και επιλογή μήκους υποστρωμάτων από την ERAP1. 48	
1.6 Υπόθεση και στόχος της παρούσας μελέτης	51
2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ	53
2.1 Καλλιέργειες κυττάρων	53

2.1.1	Κύτταρα Sf9	53
2.1.2	Κύτταρα Hi5	53
2.2	Μέτρηση κυττάρων	54
2.3	Προετοιμασία κυττάρων για συντήρηση σε βαθιά ψύξη.....	55
2.3.1	Κύτταρα Sf9	55
2.3.2	Κύτταρα Hi5	55
2.4	Απόψυξη κυττάρων από υγρό άζωτο	56
2.4.1	Κύτταρα Sf9	56
2.4.2	Κύτταρα Hi5	57
2.5	Επιδεκτικά (competent) κύτταρα <i>E.coli</i> DH10Bac.....	58
2.6	Μετασχηματισμός (transformation) επιδεκτικών κυττάρων <i>E.coli</i> DH10Bac για παραγωγή βακμιδιακού DNA	59
2.7	Απομόνωση βακμιδιακού DNA	62
2.8	Επιβεβαίωση ανασυνδυασμού με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	64
2.9	Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης.....	65
2.10	Επιμόλυνση (transfection) κυττάρων Sf9 με βακμιδιακό DNA για παραγωγή βακιλοϊού (P0)	66
2.11	Επιμόλυνση κυττάρων Sf9 για παραγωγή βακιλοϊού (P1).....	67
2.12	Επιμόλυνση κυττάρων Hi5 για παραγωγή βακιλοϊού (P2).....	68
2.13	Επιμόλυνση κυττάρων Hi5 για παραγωγή ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης.....	69
2.14	Έκφραση και καθαρισμός ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών από κύτταρα Hi5.....	69
2.15	Μέτρηση ενζυμικής δραστηριότητας των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών ERAP1	72
2.16	Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)	73

2.17	Εμφάνιση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου με χρώση αργύρου	74
2.18	Εμφάνιση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου με χρώση coomassie blue	76
2.19	Αναγέννηση στήλης συγγενείας ιόντων Ni ²⁺ NiNTA.....	76
2.20	Επισήμανση του πεπτιδίου WRVYEKCALK με δινιτροφαινόλη.....	77
2.21	Καθαρισμός του επισημασμένου πεπτιδίου WRVYEKC*ALK	78
2.22	Μέτρηση δραστηριότητας της ERAP1 για το πεπτίδιο WRVYEKC*ALK με ανίχνευση φθορισμού.....	79
2.23	Καθαρισμός του πεπτιδίου LSIINFEKL	81
2.24	Αντιδράσεις ERAP1 με πεπτιδικά υποστρώματα	81
2.25	Ανάλυση προϊόντων ενζυμικών αντιδράσεων με HPLC ανάστροφής φάσης	82
3.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΜΙΝΟΠΕΠΤΙΔΑΣΗΣ ERAP1 R841A.....	85
3.1	Υπόθεση και στόχος της μελέτης.....	85
3.2	Αποτελέσματα.....	88
3.2.1	Μετασχηματισμός πλασμιδίου pDEST8 ERAP1 R841A σε <i>E.coli</i> DH10Bac και απομόνωση βακμιδιακού DNA.....	88
3.2.2	Επιβεβαίωση του ανασυνδυασμού με PCR.....	89
3.2.3	Παραγωγή βακιλοϊού από κύτταρα εντόμου	89
3.2.4	Έκφραση και καθαρισμός των ανθρώπινων ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών ERAP1 WT και ERAP1 R841A.....	90
3.2.5	Ποσοτικοποίηση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών ERAP1 WT και R841A.....	92
3.2.6	Ειδική δραστηριότητα των ανθρώπινων ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών ERAP1 WT και R841A ως προς την υδρόλυση του L-AMC. 93	
3.2.7	Μελέτη των ενζύμων ERAP1 WT και R841A ως προς την επιλογή μήκους των υποστρωμάτων τους.....	95

3.2.8	Μελέτη της παραγωγής του επιτόπου της वालουμίνης SIINFEKL από τις αμινοπεπτιδάσες ERAP1 WT και ERAP1 R841A.....	98
4.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΜΙΝΟΠΕΠΤΙΔΑΣΗΣ ERAP1 D406A/D435A/D439A	99
4.1	Υπόθεση και στόχος της μελέτης.....	99
4.2	Αποτελέσματα.....	101
4.2.1	Μετασχηματισμός πλασμιδίου pDEST8 ERAP1 D406A/D435A/D439A σε <i>E.coli</i> DH10Bac και απομόνωση βακτηριακού DNA	101
4.2.2	Επιβεβαίωση του ανασυνδυασμού με PCR	102
4.2.3	Παραγωγή βακίλλου από κύτταρα εντόμου.....	103
4.2.4	Έκφραση και καθαρισμός της ανθρώπινης ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης ERAP1 D406A/D439A/D435A.....	104
4.2.5	Ποσοτικοποίηση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης ERAP1 D406A/D435A/D439A.....	105
4.2.6	Ειδική δραστικότητα των ανθρώπινων ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών ERAP1 WT και ERAP1 D406A/D435A/D439A ως προς την υδρόλυση του L-AMC.	106
4.2.7	Μελέτη της παραγωγής του επιτόπου της वालουμίνης SIINFEKL από τις αμινοπεπτιδάσες ERAP1 WT και ERAP1 D406A/D435A/D439A.....	107
4.2.8	Σάρωση αργινίνης στη σειρά πεπτιδίων LSIINFEKL.....	110
4.2.9	Μελέτη της αντίδρασης των ERAP1 WT και D406A/D435A/D439A με το πεπτίδιο WRVYEKC*ALK	111
4.2.10	Μελέτη των ενζύμων ERAP1 WT και D406A/D435A/D439A ως προς την επιλογή μήκους των υποστρωμάτων τους.	112
5.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	115
6.	ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ-ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ-ΑΡΤΙΚΟΛΕΞΑ	119
7.	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι.....	123

8. ΑΝΑΦΟΡΕΣ	125
--------------------------	------------

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

- Σχήμα 1: Σχηματική αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του N-τελικού άκρου ενός πεπτιδίου και των αμινοξέων του ενεργού κέντρου της αμινοπεπτιδάσης A. Το Glu-352 ανήκει στο μοτίβο εξωπεπτιδάσης το οποίο φαίνεται να αλληλεπιδρά με την αμινομάδα του υποστρώματος. Τα κατάλοιπα His-385, Glu-386, His-389 και Glu-408 ανήκουν στο μοτίβο πρόσδεσης Zn^{2+} . Η Tyr-471 σταθεροποιεί το τετραεδρικό ενδιάμεσο [17].....37
- Σχήμα 2: Σχηματική αναπαράσταση της υδρόλυσης του αμινοξέος στο N-τελικό άκρο ενός πεπτιδίου από την αμινοπεπτιδάση N [18]37
- Σχήμα 3: Φυλογενετική ανάλυση των M1 αμινοπεπτιδασών των θηλαστικών, στην οποία φαίνεται ότι οι αμινοπεπτιδάσες P-LAP, A-LAP και L-RAP μπορούν να ταξινομηθούν στην ίδια υποοικογένεια [20].....38
- Σχήμα 4: Σχηματική αναπαράσταση των δομικών περιοχών των αμινοπεπτιδασών της υποοικογένειας των ωκυτοκινασών [20]39
- Σχήμα 5: Πλασμίδιο pDEST8 που φέρει το γονίδιο της ERAP1 (<http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/11804010>).....61
- Σχήμα 6: Σχηματικό διάγραμμα πορείας παρασκευής του βακιλοϊού από το αρχικό πλασμίδιο (http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/bactobac_man.pdf) ...63
- Σχήμα 7: Θέσεις υβριδοποίησης των primers στο βακμιδιακό DNA εκατέρωθεν του σημείου του ανασυνδυασμού (http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/bactobac_man.pdf) ...65
- Σχήμα 8: Στη στήλη NiNTA το Ni^{2+} είναι δεσμευμένο ομοιοπολικά σε ρητίνη αγαρόζης. Η ουρά ιστιδινών της πρωτεΐνης δεσμεύεται από το Ni^{2+} και στη συνέχεια, με τη σταδιακή προσθήκη αυξανόμενων συγκεντρώσεων ιμιδαζολίου που ανταγωνίζεται τις ομάδες ιστιδίνης, η πρωτεΐνη ελευθερώνεται από τη στήλη (<http://www.agr.kuleuven.ac.be/dp/logt/practicum2001/proef9.htm>)70
- Σχήμα 9: L- λευκίνο-7-αμινο-4-μεθυλοκουμαρίνη (L-AMC) (<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/61888?lang=en®ion=GR>)72

Σχήμα 10: Αντίδραση επισήμανσης του πεπτιδίου με το DNP C2 μαλεϊμίδιο [53].....	77
Σχήμα 11: Αρχή μεθόδου για τη μέτρηση δραστικότητας της ERAP1 με το φθορίζον πεπτίδιο WRVYEKC*ALK [53].....	80
Σχήμα 12: Τυπικό χρωματογράφημα του πεπτιδίου LSIINFEKL μετά από επώαση με την ERAP1, όπου και εμφανίζεται μια κορυφή σε μικρότερο χρόνο έκλουσης σε σχέση με το αρχικό υπόστρωμα	83
Σχήμα 13: Δραστικότητα των κλασμάτων από τα στάδια του καθαρισμού της ERAP1 WT ως προς την υδρόλυση του L-AMC	91
Σχήμα 14: Δραστικότητα των κλασμάτων από τα στάδια του καθαρισμού της ERAP1 R841A ως προς την υδρόλυση του L-AMC	92
Σχήμα 15: Πρότυπη καμπύλη της έντασης φθορισμού ως προς την συγκέντρωση του AMC	94
Σχήμα 16: Ειδική δραστικότητα των δύο ενζύμων ως προς την υδρόλυση του L-AMC.....	95
Σχήμα 17: Ειδική δραστικότητα των ERAP1 WT και ERAP1 R841A ως προς τη σειρά πολυγλυκινικών πεπτιδίων LGnL (n=2-10)	96
Σχήμα 18: Κανονικοποίηση των ειδικών δραστικότητων των δύο ενζύμων για τα πολυγλυκινικά πεπτίδια, ως προς την ERAP1 R841A	97
Σχήμα 19: Ειδική δραστικότητα των ERAP1 WT και ERAP1 R841A ως προς το πεπτίδιο LSIINFEKL	98
Σχήμα 20: Δραστικότητα των κλασμάτων από τα στάδια του καθαρισμού της ERAP1 D406A/D435A/D439A ως προς την υδρόλυση του L-AMC	105
Σχήμα 21: Ειδική δραστικότητα των δύο ενζύμων ως προς την υδρόλυση του L-AMC.....	107
Σχήμα 22: Ειδική δραστικότητα των ERAP1 WT και ERAP1 D406A/D435A/D439A ως προς την καταστροφή του πεπτιδίου LSIINFEKL.....	108
Σχήμα 23: Χρωματογραφήματα των αντιδράσεων των δύο ενζύμων με το πεπτίδιο LSIINFEKL	109

Σχήμα 24: Ειδική δραστικότητα των ERAP1 WT και ERAP1 D406A/D435A/D439A ως προς την καταστροφή των πεπτιδίων της σειράς LSIINFEKL.....	110
Σχήμα 25: Δραστικότητα των ERAP1 WT και ERAP1 D406A/D435A/D439A ως προς το πεπτίδιο WRVYEKC*ALK.....	111
Σχήμα 26: Ειδική δραστικότητα των ERAP1 WT και ERAP1 D406A/D435A/D439A ως προς τη σειρά πολυγλυκινικών πεπτιδίων LGnL, n=3-10.....	112

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση των κύριων σταδίων του μονοπατιού αντιγονοπαρουσίασης των MHC I. Ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες οδηγούνται στο πρωτεάσωμα προς αποικοδόμηση μετά από πολυουβικιτινιλίωση (1) παράγοντας πρόδρομα αντιγονικά πεπτίδια (2) τα οποία μεταφέρονται από το μεταφορέα TAP στο ενδοπλασματικό δίκτυο (3). Εκεί υδρολύονται περαιτέρω στο N-τελικό άκρο από τις ERAP (4) προς ώριμους αντιγονικούς επιτόπους οι οποίοι, αφού προσδεθούν στα MHC I, μεταφέρονται στην πλασματική μεμβράνη (5) [10].....	29
Εικόνα 2: Μηχανισμοί κυτταροτοξικότητας επαγόμενοι από κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα [1]	30
Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση των κυριότερων σταδίων του μονοπατιού αντιγονοπαρουσίασης τάξης II. Τα MHC II αφού συναρμολογηθούν στο ΕΔ μεταφέρονται στο MHC μέσω ενδοσωμάτων ή της συσκευής Golgi. Εκεί προσδένουν το αντιγονικό πεπτίδιο και μεταφέρονται στην πλασματική μεμβράνη για παρουσίαση στα CD4 ⁺ T-λεμφοκύτταρα [9].....	32
Εικόνα 4: Μοριακοί μηχανισμοί για ενεργοποίηση του μονοπατιού της διασταυρούμενης αντιγονοπαρουσίασης στα δενδριτικά κύτταρα προς ενεργοποίηση των κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων. Με την ενδοκύτωση τους, τα αντιγόνα παρουσιάζονται σε CD4 ⁺ και CD8 ⁺ T-λεμφοκύτταρα. Τα βοηθητικά T-λεμφοκύτταρα εκκρίνουν ιντερλευκίνη-2 η οποία ενεργοποιεί τα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα. Επίσης παράλληλα με τους TLRs ενεργοποιούν το μονοπάτι της διασταυρούμενης αντιγονοπαρουσίασης στα δενδριτικά κύτταρα [11].....	34
Εικόνα 5: Πολυμορφισμοί του ERAP1 που σχετίζονται με την αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα [44].....	45
Εικόνα 6: Η δομή της ERAP1 [44].....	46
Εικόνα 7: Αλληλεπιδράσεις των αμινοξέων του καταλυτικού κέντρου της ERAP1 με τον αναστολέα αμινοπεπτιδάσων μπεστατίνη (μπλε ράβδοι) [44]	47
Εικόνα 8: Η αμινοπεπτιδάση ERAP1 στην ανοιχτή (PDB ID: 3MDJ) και στην κλειστή (PDB ID: 2YDO) διαμόρφωση [44].....	48

Εικόνα 9: Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού του “μοριακού κανόνα”. Μικρά υποστρώματα, όπως το L-AMC δεν προσδένονται στη ρυθμιστική περιοχή και δεν ενεργοποιούν αλλοστερικά το ένζυμο. Αντίθετα πεπτίδια κατάλληλου μήκους αλληλεπιδρούν και με τις δύο περιοχές προσδίδοντας στο ERAP1 υψηλή δραστικότητα [52].....	86
Εικόνα 10: Σχηματική αναπαράσταση του θύλακα ειδικότητας της ρυθμιστικής περιοχής της ERAP1 γύρω από το τριπεπτίδιο RAF όπου φαίνεται και η θέση της 841R σε αυτόν [52]	87
Εικόνα 11: Χαρακτηριστική εικόνα βακμιδιακού DNA σε πηκτή αγαρόζης 1% όπου εμφανίζεται μια χαρακτηριστική ζώνη σε μεγάλο μοριακό βάρος	88
Εικόνα 12: Χαρακτηριστική εικόνα προϊόντος διαγνωστικής PCR για την επιβεβαίωση του ανασυνδυασμού σε πηκτή αγαρόζης 1%	89
Εικόνα 13: Έλεγχος των διαφόρων σταδίων καθαρισμού της πρωτεΐνης ERAP1 WT με SDS-PAGE, όπου αναμένεται ζώνη στα 100-110 kDa. Η πρωτεΐνη εκλούεται καθαρή από τη στήλη συγγενείας σε συγκέντρωση 150mM ιμιδαζόλιο	90
Εικόνα 14: Έλεγχος των σταδίων καθαρισμού της πρωτεΐνης ERAP1 R841A με SDS-PAGE. Η πρωτεΐνη εκλούεται καθαρή από τη στήλη συγγενείας σε συγκέντρωση 150mM ιμιδαζόλιο	91
Εικόνα 15: Ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών ERAP1 WT και R841A με SDS-PAGE. Στην πηκτή φορτώνονται γνωστές ποσότητες από πρότυπο διάλυμα ERAP1 γνωστής συγκέντρωσης και μια ποσότητα από τα προς ποσοτικοποίηση ένζυμα.....	93
Εικόνα 16: Η δομή της ERAP1 με αναπαράσταση επιφάνειας. Με κόκκινο επισημαίνονται οι περιοχές με αρνητικό ηλεκτροστατικό δυναμικό ενώ με μπλε φαίνονται οι θετικά φορτισμένες περιοχές του ενζύμου [44].....	100
Εικόνα 17: Δομή της ERAP1 στην ανοιχτή διαμόρφωση σε αναπαράσταση cartoon. Ο ψευδάργυρος αναπαριστάται σαν κόκκινη σφαίρα, ενώ τα τρία ασπαρτικά που σχηματίζουν τη συστοιχία παρουσιάζονται σαν ράβδοι. Με πράσινο αναπαριστάται το ασπαρτικό 406 με κίτρινο το 435 και με πορτοκαλί το 439	101

Εικόνα 18: Χαρακτηριστική εικόνα βακμιδιακού DNA σε πηκτή αγαρόζης 1% όπου εμφανίζεται μια χαρακτηριστική ζώνη σε μεγάλο μοριακό βάρος	102
Εικόνα 19: Χαρακτηριστική εικόνα προϊόντος διαγνωστικής PCR για την επιβεβαίωση του ανασυνδυασμού σε πηκτή αγαρόζης 1%	103
Εικόνα 20: Έλεγχος των διαφόρων σταδίων καθαρισμού της πρωτεΐνης ERAP1 D406A/D435A/D439A με SDS-PAGE, όπου αναμένεται ζώνη στα 100-110 kDa. Η πρωτεΐνη εκλούεται από τη στήλη συγγενείας σε συγκέντρωση 150mM ιμιδαζόλιο	104
Εικόνα 21: Ποσοτικοποίηση πρωτεΐνης με SDS-PAGE. Στην πηκτή φορτώνονται γνωστές ποσότητες από πρότυπο διάλυμα ERAP1 γνωστής συγκέντρωσης και μια ποσότητα από το προς ποσοτικοποίηση ένζυμο	106

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή διενεργήθηκε στα πλαίσια απόκτησης Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στη Βιοχημεία, του τμήματος Χημείας της Σχολής Θετικών Επιστημών του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Το πειραματικό τμήμα της μελέτης εκπονήθηκε στο Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. Δημόκριτος, στο Εργαστήριο Χημείας Πρωτεϊνών του Ινστιτούτου Πυρηνικών & Ραδιολογικών Επιστημών & Τεχνολογίας, Έρευνας & Ασφάλειας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ανθρώπινο ανοσοποιητικό σύστημα

Το ανοσοποιητικό σύστημα αποτελεί έναν μηχανισμό άμυνας που έχει εξελιχθεί στα σπονδυλωτά με σκοπό την προστασία τους από παθογόνους μικροοργανισμούς. Αυτό επιτυγχάνεται με την συντονισμένη δράση μιας πληθώρας διαφορετικών ειδών κυττάρων και μορίων, τα οποία αναγνωρίζουν και εξαλείφουν μια μεγάλη ποικιλία παθογόνων. Μόλις αναγνωριστεί ένα παθογόνο, το ανοσοποιητικό σύστημα επιστρατεύει εξειδικευμένα κύτταρα και μόρια τα οποία θα προκαλέσουν την κατάλληλη απόκριση έτσι, ώστε να εξουδετερωθεί η απειλή. Το ανοσοποιητικό σύστημα έχει το χαρακτηριστικό ότι αποκτά μνήμη για τα παθογόνα τα οποία έχει αντιμετωπίσει. Επόμενη έκθεση στον ίδιο παθογόνο μικροοργανισμό έχει ως αποτέλεσμα μια πιο γρήγορη και έντονη απόκριση. Το ανοσοποιητικό σύστημα αποτελείται από δύο συνιστώσες, τη φυσική και την επίκτητη ανοσία. Σε αντίθεση με τη φυσική ανοσία, η οποία αντιμετωπίζει μια ποικιλία παθογόνων, η επίκτητη ανοσολογική απόκριση χαρακτηρίζεται από απόλυτη εξειδίκευση, η οποία επιτυγχάνεται μέσω γονιδιακού ανασυνδυασμού. Η φυσική και η επίκτητη ανοσολογική απόκριση, όπως θα δούμε και στη συνέχεια, δε δρουν ανεξάρτητα, αντιθέτως συνεργάζονται συντονισμένα για να προκαλέσουν μια αποτελεσματική απόκριση ενάντια στο παθογόνο που αντιμετωπίζουν [1].

1.1.1 Φυσική ανοσολογική απόκριση

Η φυσική ανοσία αποτελείται από μια σειρά μηχανισμών αντίστασης ενάντια στις μολύνσεις οι οποίοι δεν είναι ειδικοί για ένα συγκεκριμένο παθογόνο. Επειδή η επίκτητη ανοσολογική απόκριση απαιτεί κάποιο χρόνο για να κινητοποιηθεί, η φυσική ανοσία αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας ενάντια στους παθογόνους μικροοργανισμούς. Η πρώτη άμυνα του οργανισμού αποτελείται από φυσικούς και χημικούς φραγμούς οι οποίοι εμποδίζουν την είσοδο του παθογόνου σ' αυτόν. Παραδείγματα τέτοιων φραγμών είναι οι αντιμικροβιακές πρωτεΐνες των βλεννογόνων, το δέρμα, το όξινο pH του στομάχου κ.α. [1]. Ένα άλλο κομμάτι της φυσικής ανοσολογικής απόκρισης, που ενεργοποιείται σε περίπτωση εισβολής ενός μικροοργανισμού, είναι ο καταρράκτης του συμπληρώματος που αναγνωρίζει και καταστρέφει άμεσα ξένους οργανισμούς ενώ συμμετέχει και στην αποτελεσματική λειτουργία των αντισωμάτων. Επιπλέον τα κύτταρα της φυσικής ανοσίας, όπως τα μακροφάγα, τα ουδετερόφιλα και τα δενδριτικά κύτταρα, φαγοκυτώνουν και καταστρέφουν τους παθογόνους μικροοργανισμούς [2]. Τα συστατικά της φυσικής ανοσίας, προκειμένου να αναγνωρίσουν τους ξένους μικροοργανισμούς, εκφράζουν υποδοχείς οι οποίοι αναγνωρίζουν κάποια κοινά μοριακά μοτίβα των παθογόνων που δεν υπάρχουν στους ξενιστές. Αυτοί οι υποδοχείς ονομάζονται υποδοχείς αναγνώρισης μοτίβων (pattern recognition receptors ή PRRs). Μερικές από τις πιο μελετημένες οικογένειες τέτοιων υποδοχέων είναι οι υποδοχείς τύπου Toll (Toll like receptors ή TLRs), οι RLRs και οι NLRs, οι οποίοι αναγνωρίζουν πολλά διαφορετικά μοριακά μοτίβα [3]. Κάποια από αυτά είναι οι λιποπολυσακχαρίτες (LPS) ο οποίος είναι συστατικό του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος, οι πεπτιδογλυκάνες και το βακτηριακό DNA [4].

Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα εκκρίνουν μια σειρά κυτταροκινών και χημειοκινών οι οποίες προάγουν τη φλεγμονή. Η φλεγμονώδης αντίδραση αντιμετωπίζει τις μολύνσεις επιστρατεύοντας δραστικές πρωτεΐνες και κύτταρα στο σημείο της μόλυνσης, όπως ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα. Επίσης δημιουργούνται θρόμβοι τοπικά προκειμένου να μην μεταφερθεί η μόλυνση

μέσω της κυκλοφορίας του αίματος, ενώ παράλληλα αναδομείται ο κατεστραμμένος ιστός [2].

1.1.2 Επίκτητη ανοσολογική απόκριση

Αντίθετα με τη φυσική ανοσία η επίκτητη παρουσιάζει υψηλό βαθμό εξειδίκευσης, ενώ είναι και η συνιστώσα του ανοσοποιητικού συστήματος που εμφανίζει την ιδιότητα της μνήμης. Η επίκτητη ανοσολογική απόκριση χωρίζεται με τη σειρά της στην κυτταρική ανοσολογική απόκριση, η οποία περιλαμβάνει τη δράση των Τ-λεμφοκυττάρων, και στη χυμική ανοσολογική απόκριση που περιλαμβάνει τη δράση των Β-λεμφοκυττάρων. Ενώ και τα δύο είδη λεμφοκυττάρων παράγονται στο μυελό των οστών, τα Τ-λεμφοκύτταρα χρειάζεται να μεταναστεύουν στο θύμο αδένι για να ωριμάσουν. Αυτή η ωρίμανση οριοθετείται με την έκφραση των υποδοχέων των Τ-λεμφοκυττάρων (TCRs) στην επιφάνεια των κυττάρων [1]. Ανάλογα με το ποιες πρωτεΐνες εκφράζουν τα Τ-λεμφοκύτταρα στην πλασματική τους μεμβράνη έχουν και διαφορετικές λειτουργίες. Χωρίζονται λοιπόν στα κυτταροτοξικά, στα βοηθητικά και στα ρυθμιστικά Τ-λεμφοκύτταρα των οποίων η λειτουργία θα περιγραφεί εκτενέστερα παρακάτω. Κύρια λειτουργία των Τ-λεμφοκυττάρων είναι η αντιμετώπιση των ενδοκυτταρικών παθογόνων [1].

Η χυμική ανοσία καλείται να αντιμετωπίσει παθογόνα τα οποία βρίσκονται εξωκυτταρικά και μεταφέρονται από το ένα σημείο του οργανισμού στο άλλο μέσω της κυκλοφορίας του αίματος. Για να ενεργοποιηθούν τα Β-λεμφοκύτταρα πρέπει να λάβουν χώρα μια σειρά από γεγονότα. Πολύ σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίησή τους παίζουν τα βοηθητικά CD40L⁺ Τ-λεμφοκύτταρα, οι υποδοχείς των οποίων αναγνωρίζουν σύμπλοκα κάποιων πρωτεϊνών που ονομάζονται μόρια τάξης II του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC II) με αντιγονικά πεπτίδια. Επίσης τα βοηθητικά CD40L⁺ Τ-λεμφοκύτταρα εκκρίνουν μια σειρά κυτταροκινών που συνεισφέρουν στην ενεργοποίηση των Β-λεμφοκυττάρων. Ακόμα, πρέπει οι

μεμβρανοσύνδετες ανοσοσφαιρίνες των Β-λεμφοκυττάρων να προσδέσουν το αντιγόνο. Κατόπιν τα Β-λεμφοκύτταρα πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται είτε σε Β-κύτταρα μνήμης είτε σε πλασματοκύτταρα [5]. Βασική λειτουργία των πλασματοκυττάρων είναι η έκκριση αντισωμάτων. Τα αντισώματα συνεισφέρουν στην καταπολέμηση μιας μόλυνσης με πολλούς τρόπους. Ένας από αυτούς είναι η αδρανοποίηση του αντιγόνου, καθώς μετά από πρόσδεση τους στην επιφάνεια του, εμποδίζουν την είσοδο του σε υγιή κύτταρα. Επίσης συμβάλουν στην οψωνινοποίηση των αντιγόνων. Οψωνινοποίηση καλείται η διαδικασία κατά την οποία το παθογόνο καλύπτεται από αντισώματα ή πρωτεΐνες του συμπληρώματος, κάτι που διευκολύνει την άμεση ενδοκυττάρωση και καταστροφή του από τα φαγοκύτταρα [6].

1.2 Επίκτητη κυτταρική ανοσολογική απόκριση

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, με τον όρο επίκτητη κυτταρική ανοσολογική απόκριση αναφερόμαστε στον μηχανισμό με τον οποίο τα Τ-λεμφοκύτταρα αντιμετωπίζουν παθογόνους μικροοργανισμούς. Με το χαρακτηρισμό κυτταρική εννοούμε ότι για να εξαλειφθεί η μόλυνση δρουν κύτταρα, τα κυτταροτοξικά Τ-λεμφοκύτταρα. Τα ώριμα Τ-λεμφοκύτταρα εκφράζουν στην επιφάνεια τους είτε τους CD8 είτε τους CD4 υποδοχείς κάτι που καθορίζει και τη λειτουργία τους. Τα CD8⁺ διαφοροποιούνται σε κυτταροτοξικά Τ-λεμφοκύτταρα ενώ τα CD4⁺ σε βοηθητικά ή σε ρυθμιστικά Τ-λεμφοκύτταρα [1].

Λειτουργία των κυτταροτοξικών Τ-λεμφοκυττάρων είναι να παρακολουθούν όλα τα κύτταρα του οργανισμού με σκοπό να εξαλείψουν αυτά τα οποία έχουν μολυνθεί και αποτελούν απειλή για τον οργανισμό. Επίσης πιστεύεται ότι προστατεύουν μερικώς σε περιπτώσεις κακοήθων νεοπλασιών. Και στις δυο περιπτώσεις αλλάζει το ρεπερτόριο των πρωτεϊνών μέσα στα κύτταρα και κατ' επέκταση των αντιγονικών επιτόπων που προσδέονται σε κάποιες ειδικές μεμβρανικές πρωτεΐνες των κυττάρων, οι οποίες λέγονται μόρια τάξης I του

μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC I), τους οποίους αναγνωρίζουν τα CD8⁺ T-λεμφοκύτταρα. Τα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα ενεργοποιούνται μετά από αναγνώριση του αντιγόνου το οποίο παρουσιάζεται από τα MHC I στην επιφάνεια των κυττάρων, από τους TCR υποδοχείς [1]. Αντίθετα, με την αναγνώριση ενός αντιγονικού επιτόπου συνδεδεμένου στα MHC II μέσω των TCR υποδοχέων, τα μη ενεργοποιημένα CD4⁺ T-λεμφοκύτταρα πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται σε βοηθητικά Th1, Th2, Th17 λεμφοκύτταρα και ρυθμιστικά T-λεμφοκύτταρα [7]. Καθένα από αυτά τα είδη έχει διακριτή βιολογική σημασία χάρη στο μοναδικό τους προφίλ για έκκριση κυτταροκινών. Συγκεκριμένα τα Th1 ενεργοποιούν τα μακροφάγα και τα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα αντιμετωπίζοντας έτσι ενδοκυτταρικά παθογόνα. Αντίθετα, τα βοηθητικά Th2 βοηθούν στην ισχυρή έκκριση αντισωμάτων και κυρίως των IgE. Τα Th17 συνεισφέρουν στην αντιμετώπιση βακτηριακών μολύνσεων μέσω ενεργοποίησης των ουδετερόφιλων. Τέλος τα ρυθμιστικά T-λεμφοκύτταρα παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης καθώς έχουν ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες και προστατεύουν έτσι από αυτοάνοση ανοσολογική απόκριση [8].

1.3 Αντιγονοπαρουσίαση

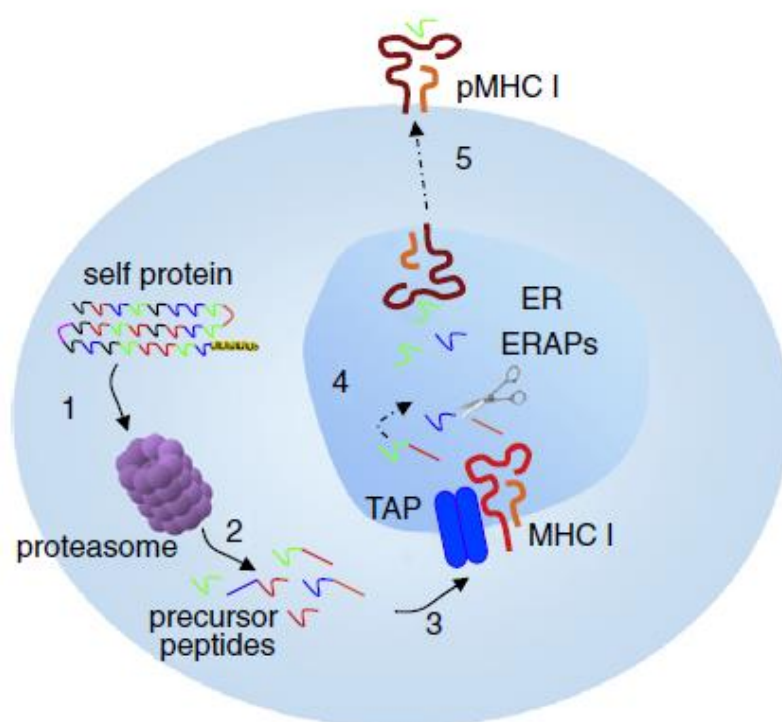
Όπως έχει αναφερθεί, για την ενεργοποίηση πολλών κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος και συγκεκριμένα της επίκτητης κυτταρικής ανοσολογικής απόκρισης, απαραίτητη είναι η αναγνώριση πεπτιδίων τα οποία προέρχονται από πρωτεΐνες των παθογόνων και ονομάζονται αντιγονικοί επίτοποι. Για την επίτευξη αυτής της διαδικασίας, οι επίτοποι προσδένονται σε πρωτεΐνες που ονομάζονται μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC). Αυτή η λειτουργία των κυττάρων ονομάζεται αντιγονοπαρουσίαση. Υπάρχουν δυο τάξεις μορίων MHC με ξεχωριστό ρόλο η κάθε μία στην αντιγονοπαρουσίαση. Και οι δύο τάξεις MHC έχουν παρόμοια δομή στο χώρο και παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα πολυμορφισμού. Στον ανθρώπινο οργανισμό κωδικοποιούνται από τρία γονίδια η κάθε μία. Για τα MHC I τα γονίδια αυτά ονομάζονται HLA-A, HLA-B και HLA-C ενώ για τα MHC

II, HLA-DR, HLA-DQ και HLA-DP. Τα αντιγονικά πεπτίδια που παρουσιάζουν οι διαφορετικές τάξεις των MHC δεν είναι ίδιου τύπου καθώς προκύπτουν από διαφορετικά μονοπάτια. Τα μονοπάτια αυτά περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω [9].

1.3.1 Μονοπάτι MHC I

Τα MHC I εκφράζονται σε όλα τα είδη εμπύρηνων κυττάρων και παρουσιάζουν αντιγονικά πεπτίδια που προέρχονται από ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες. Τα αντιγονικά πεπτίδια προκύπτουν μετά από αποικοδόμηση μη λειτουργικών πρωτεϊνών στο πρωτεάσωμα όπου και κατευθύνονται μετά από σηματοδότηση τους με ουβικιτίνη. Το πρωτεάσωμα εμφανίζει δραστικότητα πρωτεάσης και καθορίζει το αμινοξύ στο C-τελικό άκρο των αντιγονικών επιτόπων. Εκτός από το πρωτεάσωμα 26S έχουν χαρακτηριστεί και άλλοι δύο τύποι πρωτεασώματος, το ανοσοπρωτεάσωμα που εκφράζεται σε πολλά κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και το πρωτεάσωμα ειδικό για τον θύμο αδένα. Παρόλο που είναι πιθανό πεπτίδια μετά από αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα να έχουν N-τελικό άκρο το οποίο να επιτρέπει την πρόσδεση τους στα MHC I, οι αντιγονικοί επίτοποι στην πλειοψηφία τους έχουν εκτεταμένο N-τελικό άκρο κατά ένα ή περισσότερα αμινοξέα μετά την απελευθέρωση από το πρωτεάσωμα. Στο κυτοσόλιο τα πεπτίδια αποτελούν υποστρώματα πολλών αμινοπεπτιδάσων όπως η αμινοπεπτιδάση λευκίνης (LAP), η τριπεπτιδυλο-πεπτιδάση II (TPP-II), η ολιγοπεπτιδάση του θύμου (TOP) και άλλες. Ένα ποσοστό αυτών των πεπτιδίων μεταφέρεται στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου από τον μεταφορέα που σχετίζεται με την αντιγονοπαρουσίαση (TAP) ώστε να αποκτήσουν πρόσβαση στα MHC I. Ο μεταφορέας TAP μεταφέρει επιλεκτικά στο ενδοπλασματικό δίκτυο πεπτίδια μήκους 8-16 αμινοξέων. Εκτός από μεταφορέας πρόδρομων αντιγονικών επιτόπων, ο TAP λειτουργεί και ως πλατφόρμα για τον σχηματισμό του συμπλόκου MHC I-πεπτιδίου. Αυτό επιτυγχάνεται με πρόσδεση μορίων ταπασίνης, η οποία είναι πρωτεΐνη συνοδός των MHC I, στον μεταφορέα TAP. Στο ενδοπλασματικό δίκτυο, τα MHC I είναι μερικώς σταθεροποιημένα

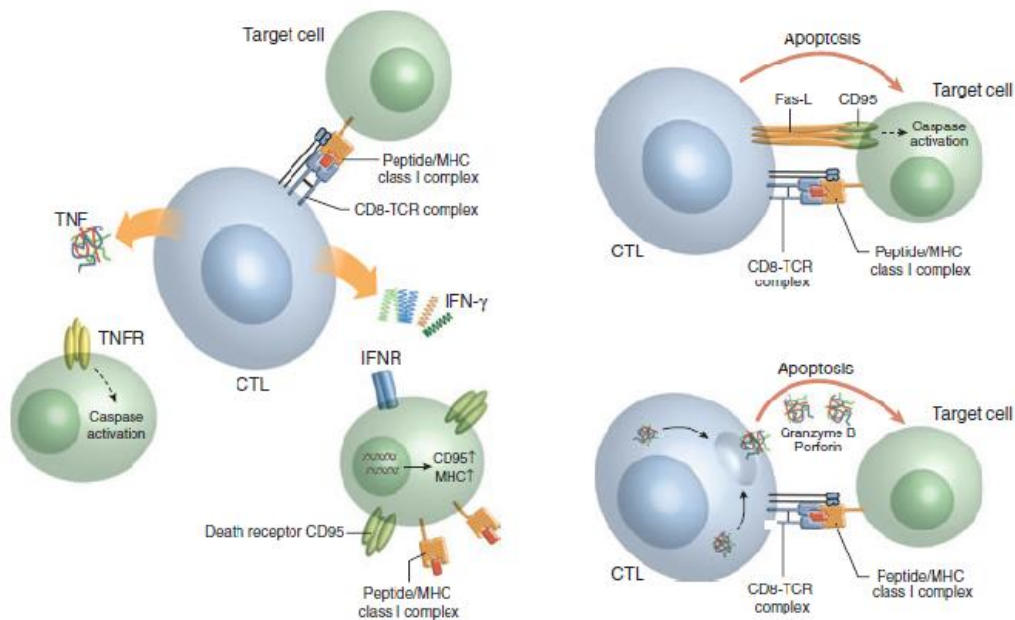
μετά από πρόσδεση με άλλες 2 πρωτεΐνες συνοδούς, την καρλετικιουλίνη και την ERp57. Το σύμπλεγμα όλων αυτών των μορίων ονομάζεται σύμπλεγμα πρόσδεσης πεπτιδίων και διασφαλίζει την αποτελεσματική τους σύνδεση με τα MHC I. Μετά την πρόσδεση το σύμπλοκο πεπτίδιο-MHC I απελευθερώνεται από τις πρωτεΐνες συνοδούς και μεταφέρεται στην κυτταρική μεμβράνη. Τα MHC I προσδέουν πεπτίδια 8-10 αμινοξέων γεγονός που σημαίνει ότι πολλά από τα πεπτίδια που μεταφέρονται από τον TAP πρέπει να αποικοδομηθούν περαιτέρω στο N-τελικό τους άκρο. Αυτή την επεξεργασία τη φέρνουν εις πέρας στον ανθρώπινο οργανισμό οι αμινοπεπτιδάσες ενδοπλασματικού δικτύου 1 και 2 (ERAP1 και 2) οι οποίες παράγουν ώριμους αντιγονικούς επιτόπους προς παρουσίαση στα κυτταροτοξικά CD8⁺ T-λεμφοκύτταρα [9], κάτι το οποίο, όπως φαίνεται και στην εικόνα 1, απαιτεί μεταφορά των MHC I στην πλασματική μεμβράνη.



Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση των κύριων σταδίων του μονοπατιού αντιγονοπαρουσίασης των MHC I. Ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες οδηγούνται στο πρωτεάσωμα προς αποικοδόμηση μετά από πολυουβικιτινίωση (1) παράγοντας πρόδρομα αντιγονικά πεπτίδια (2) τα οποία μεταφέρονται από το μεταφορέα TAP στο ενδοπλασματικό δίκτυο (3). Εκεί υδρολύονται περαιτέρω στο N-τελικό άκρο από τις ERAP (4) προς ώριμους αντιγονικούς επιτόπους οι οποίοι, αφού προσδεθούν στα MHC I, μεταφέρονται στην πλασματική μεμβράνη (5) [10]

1.3.2 Ενεργοποίηση CD8⁺ κυτταροτοξικών T- λεμφοκυττάρων

Η αλληλεπίδραση του συμπλόκου MHC I – επιτόπου με τους υποδοχείς TCR παρουσιάζει χαμηλή συγγένεια. Προκειμένου τα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα να εμφανίσουν ισχυρή απόκριση απαιτείται επιπλέον σύνδεση προσδετών με τους υποδοχείς CD8 καθώς και άλλους υποδοχείς. Το πρώτο στάδιο της ενεργοποίησης των κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων περιλαμβάνει τη διαφοροποίηση των παρθένων T-λεμφοκυττάρων (T-λεμφοκύτταρα που δεν έχουν έρθει σε επαφή με το αντιγόνο) σε δραστικά, ενώ το δεύτερο την καταστροφή των κυττάρων στόχων μετά την αναγνώριση των αντιγόνων από τα δραστικά T-λεμφοκύτταρα. Εκτός από τις αλληλεπιδράσεις των υποδοχών απαραίτητη για την ενεργοποίηση των κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων είναι η σηματοδότηση μέσω ιντερλευκίνης-2 καθώς και σημάτων από αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και βοηθητικά T-λεμφοκύτταρα. Όπως φαίνεται στην εικόνα 2, υπάρχουν τρεις μηχανισμοί κυτταροτοξικότητας που επάγονται από τα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα [1]:



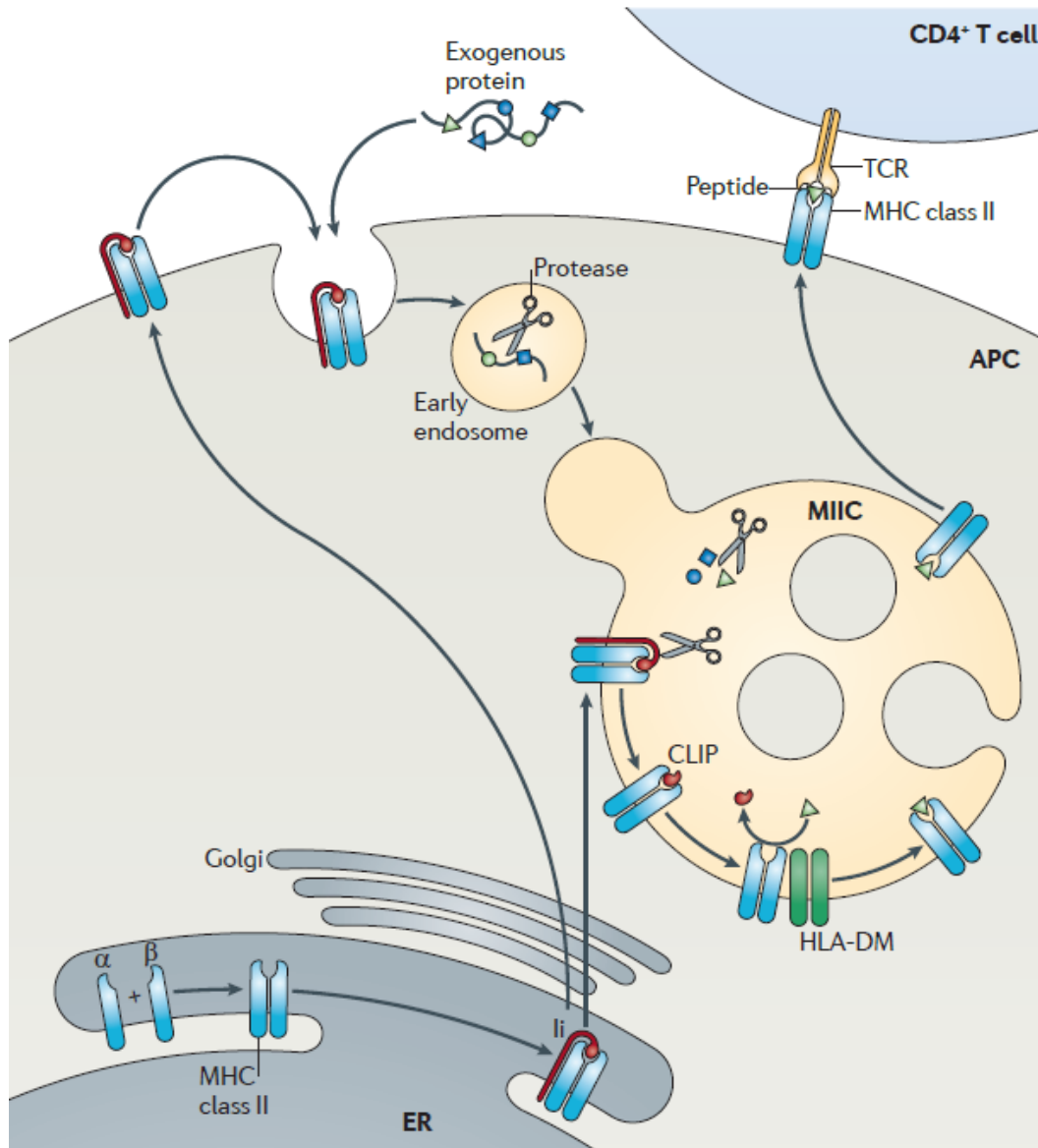
Εικόνα 2: Μηχανισμοί κυτταροτοξικότητας επαγόμενοι από κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα [1]

Το πρώτο μονοπάτι σηματοδοτείται από κυτταροκίνες όπως η INF γ και ο TNF α . Ο TNF α προσδένεται στον υποδοχέα του σε γειτονικά κύτταρα και έτσι ενεργοποιείται ο καταρράκτης των κασπασών ενώ η INF γ προάγει τη μεταγραφή συστατικών του μονοπατιού αντιγονοπαρουσίασης των MHC I και του Fas [1]. Οι άλλοι δύο μηχανισμοί, σε αντίθεση με τον προηγούμενο, απαιτούν επαφή μεταξύ του T-λεμφοκυττάρου και του κυττάρου στόχου και οδηγούν σε απόπτωση. Στο πρώτο από αυτά τα μονοπάτια γίνεται πρόσδεση του Fas στον αντίστοιχο υποδοχέα του και ενεργοποίηση του κλασσικού καταρράκτη των κασπασών. Ο δεύτερος μηχανισμός περιλαμβάνει έκκριση περφορίνης και κοκκιοενζύμων τα οποία είναι πολύ τοξικά για τα κύτταρα και προκαλούν κυτταρικό θάνατο και μέσω κασπασών αλλά και άλλων μηχανισμών [1].

1.3.3 Μονοπάτι MHC II

Σε αντίθεση με τα MHC I, τα MHC II εκφράζονται σε αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα όπως τα μακροφάγα, τα B λεμφοκύτταρα και τα δενδριτικά κύτταρα. Η έκφραση τους είναι δυνατή και σε άλλα είδη κυττάρων κατόπιν διεγέρσεως με INF γ . Παρόλο που και τα MHC II συναρμολογούνται στο ενδοπλασματικό δίκτυο πρέπει να μεταφερθούν σε ένα ξεχωριστό κυτταρικό διαμέρισμα (MIIC) όπου και θα δεσμεύσουν το αντιγονικό πεπτίδιο. Τα περισσότερα πεπτίδια που παρουσιάζονται από τα MHC II προέρχονται από πρωτεΐνες που έχουν ενδοκυτταρωθεί και προκύπτουν από την αποικοδόμηση τους σε πρώιμα ενδοσώματα τα οποία συντήκονται με το MIIC. Τα MHC II πριν μεταφερθούν στο MIIC προσδένουν στην κοιλότητα πρόσδεσης πεπτιδίου μιας ειδικευμένης πρωτεΐνης που ονομάζεται μη μεταβλητή αλυσίδα Ii. Ενώ είχε προταθεί ότι η αλυσίδα Ii προσδένεται στα MHC II ώστε αυτά να μη δεσμεύουν πεπτίδια του ΕΔ, πειράματα έδειξαν ότι, απουσία της Ii, τα MHC II δεν έχουν κατάλληλη διαμόρφωση η οποία να επιτρέπει δέσμευση πεπτιδίων και άρα η Ii είναι

απαραίτητη για την επίτευξη της σωστής διαμόρφωσης των MHC II. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 3, η κυτταροπλασματική περιοχή της Ii, οδηγεί τα MHC II σε ενδοσώματα μέσω της πλασματικής μεμβράνης ή στη συσκευή Golgi προκειμένου να φτάσουν τελικά στο MIIC [9].



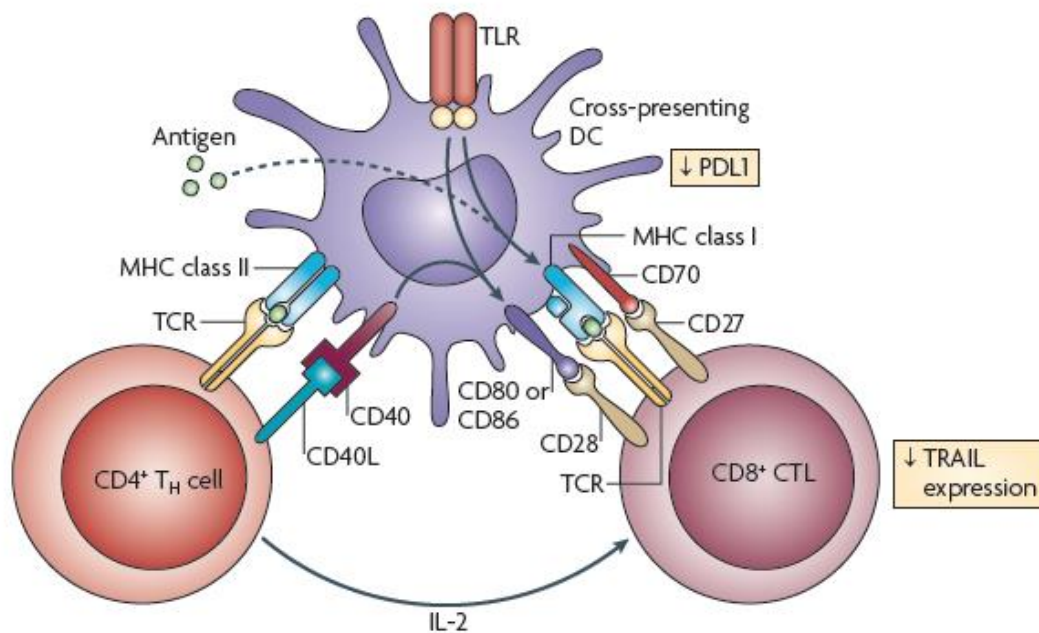
Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση των κυριότερων σταδίων του μονοπατιού αντιγеноπαρουσίασης τάξης II. Τα MHC II αφού συναρμολογηθούν στο ΕΔ μεταφέρονται στο MIIC μέσω ενδοσωμάτων ή της συσκευής Golgi. Εκεί προσδένουν το αντιγονικό πεπτίδιο και μεταφέρονται στην πλασματική μεμβράνη για παρουσίαση στα CD4⁺ T-λεμφοκύτταρα [9]

Στο MHC II η αλυσίδα Ii υδρολύεται από πρωτεάσες ενώ τα MHC II σταθεροποιούνται μέσω αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη συνοδό HLA-DM μέχρι να προσδεθεί σε αυτά κάποιο πεπτίδιο. Η μεταφορά των MHC II στην πλασματική μεμβράνη, όπου παρουσιάζουν τα αντιγονικά πεπτίδια στα CD4⁺ T-λεμφοκύτταρα, γίνεται μέσω κυστιδίων και ελέγχεται από πολλούς παράγοντες όπως η χοληστερόλη το κυτοσολικό pH καθώς και η δράση κινασών και GTPασών [9].

1.3.4 Διασταυρούμενη αντιγονοπαρουσίαση

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω τα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα προκειμένου να εμφανίσουν κυτταρολυτική δράση πρέπει να αναγνωρίσουν αντιγονικούς επιτόπους προσδεμένους στα MHC I στην επιφάνεια αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων. Εύλογα λοιπόν προκύπτει το ερώτημα πως εμφανίζεται απόκριση των κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων έναντι σε παθογόνα τα οποία δεν προσβάλλουν τα εξειδικευμένα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα ή σε όγκους οι οποίοι δεν προέρχονται από αυτά. Σε αυτές τις περιπτώσεις τα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα μπορούν να ενεργοποιηθούν στην περίπτωση που εξωκυτταρικά αντιγόνα παρουσιαστούν από τα MHC I. Αυτή η λειτουργία των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων καλείται διασταυρούμενη αντιγονοπαρουσίαση. Το αποτέλεσμα της διασταυρούμενης αντιγονοπαρουσίασης εξαρτάται από το είδος του αντιγονοπαρουσιαστικού κυττάρου που θα λάβει χώρα. Τα δενδριτικά κύτταρα φαίνεται να είναι αυτά που συμβάλλουν κυρίως στην κυτταρολυτική δράση των κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων, χωρίς αυτό να σημαίνει ότι όλα τα δενδριτικά κύτταρα έχουν μηχανισμούς για διασταυρούμενη αντιγονοπαρουσίαση. Αυτά που φαίνεται ότι έχουν αυτή τη λειτουργία εκφράζουν στην επιφάνεια τους δείκτες CD24, CD8a και CD103, χωρίς αυτό να μπορεί να εξηγήσει μηχανιστικά αυτή την επιλογή [11]. Μια υπόθεση προτείνει ότι μόνο τα συγκεκριμένα δενδριτικά έχουν συστατικά για την επεξεργασία εξωκυτταρικών επιτόπων που θα τους

καταστήσει κατάλληλους για παρουσίαση από τα MHC I. Επίσης έχει προταθεί ότι τα αντιγόνα ενδοκυττάρωνονται με διακριτούς μηχανισμούς και έτσι οδηγούνται σε οργανίδια όπου λαμβάνει χώρα η διασταυρούμενη αντιγονοπαρουσίαση. Για να ενεργοποιηθεί το μονοπάτι της διασταυρούμενης αντιγονοπαρουσίασης πρέπει να συμβούν μια σειρά από γεγονότα. Κατ' αρχάς τα δενδριτικά κύτταρα πρέπει να ανιχνεύσουν μέσω υποδοχέων την παρουσία παθογόνων. Επιπλέον απαραίτητη φαίνεται η παρουσία βοηθητικών T-λεμφοκυττάρων τα οποία αναγνωρίζουν τους αντιγονικούς επιτόπους στα MHC II, κάτι που ενδέχεται να αποτελεί προστατευτικό μηχανισμό έναντι σε αυτοάνοση ανοσολογική απόκριση [11].



Εικόνα 4: Μοριακοί μηχανισμοί για ενεργοποίηση του μονοπατιού της διασταυρούμενης αντιγονοπαρουσίασης στα δενδριτικά κύτταρα προς ενεργοποίηση των κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων. Με την ενδοκυττάρωση τους, τα αντιγόνα παρουσιάζονται σε CD4+ και CD8+ T-λεμφοκύτταρα. Τα βοηθητικά T-λεμφοκύτταρα εκκρίνουν ιντερλευκίνη-2 η οποία ενεργοποιεί τα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα. Επίσης παράλληλα με τους TLRs ενεργοποιούν το μονοπάτι της διασταυρούμενης αντιγονοπαρουσίασης στα δενδριτικά κύτταρα [11]

1.4 Οικογένεια M1 αμινοπεπτιδασών

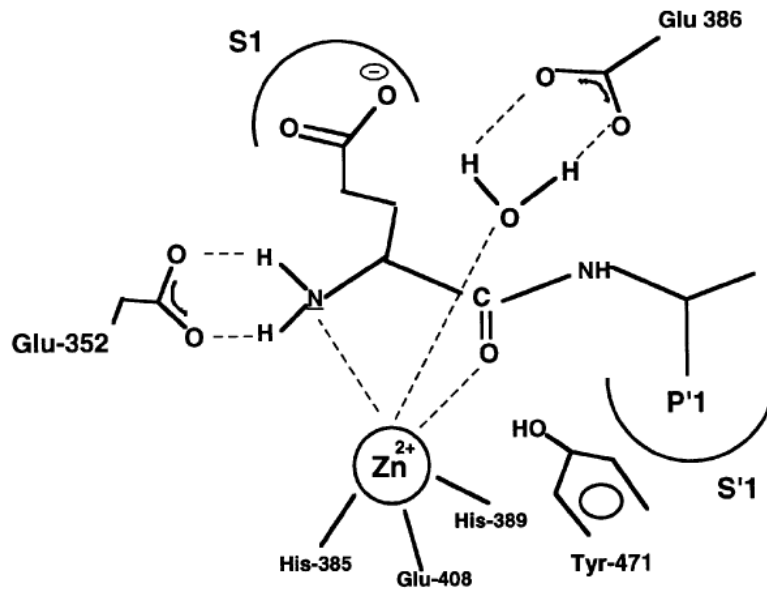
Οι αμινοπεπτιδάσες είναι εξωπεπτιδάσες οι οποίες καταλύουν την υδρόλυση αμινοξέων από το N-τελικό άκρο πρωτεϊνικών και πεπτιδικών υποστρωμάτων. Παρουσιάζουν ευρεία κατανομή ανάμεσα στα είδη ενώ απαντώνται σε πολλά υποκυτταρικά οργανίδια, στο κυτοσόλιο αλλά και σε μεμβράνες. Τα ένζυμα αυτά είναι απαραίτητα για την ωρίμανση πρωτεϊνών και για την αποικοδόμηση πεπτιδίων με ορμονική ή μη δράση [12]. Οι αμινοπεπτιδάσες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ανάλογα με το είδος του μεταλλικού ιόντος που προσδένουν στο ενεργό τους κέντρο, καθώς και με τα αμινοξέα με τα οποία προσδένεται το ιόν στο ένζυμο. Η οικογένεια M1 των αμινοπεπτιδασών αποτελείται από αμινοπεπτιδάσες ψευδαργύρου οι οποίες έχουν ένα πολύ συντηρημένο καταλυτικό κέντρο που περιέχει τμήμα της N-τελικής περιοχής της πρωτεΐνης. Επίσης αποτελούνται από μια δομική περιοχή τύπου θερμολυσίνης ενώ, σε αντίθεση με τη N-τελική περιοχή, το C-τελικό τους άκρο δεν εμφανίζει κάποια ομολογία [13]. Οι αμινοπεπτιδάσες αυτές φέρουν στο καταλυτικό τους κέντρο το χαρακτηριστικό μοτίβο πρόσδεσης Zn^{2+} HEXXH(X)₁₈E [14]. Από αυτά τα αμινοξέα οι δύο ιστιδίνες και το γλουταμινικό οξύ 19 κατάλοιπα μετά τη δεύτερη ιστιδίνη συμμετέχουν στην πρόσδεση του Zn^{2+} [15],[16]. Επιπλέον οι αμινοπεπτιδάσες αυτής της οικογένειας έχουν στο μόριο τους σε σταθερή απόσταση από το μοτίβο πρόσδεσης Zn^{2+} ένα συντηρημένο μοτίβο εξωπεπτιδάσης GAMEN [14]. Βάσει πειραμάτων σημειακών μεταλλαξιγενέσεων στην αμινοπεπτιδάση A έχει προταθεί ότι το γλουταμινικό οξύ και η ασπαραγίνη αλληλεπιδρούν με την αμινομάδα στο N-τελικό άκρο του πεπτιδίου [17],[18].

Οι αμινοπεπτιδάσες αυτής της οικογένειας έχουν πολλούς και σημαντικούς παθοφυσιολογικούς ρόλους στον ανθρώπινο οργανισμό. Συμμετέχουν στη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης καταβολίζοντας τα πεπτίδια του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης, ελέγχουν την αγγειογένεση και την ομαλή εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου. Επίσης, συμβάλουν σε λειτουργίες όπως η μνήμη και η φυσιολογική έκβαση της εγκυμοσύνης. Τέλος παίζουν καθοριστικό ρόλο στην επίκτητη ανοσολογική απόκριση καθώς παράγουν ώριμους αντιγονικούς

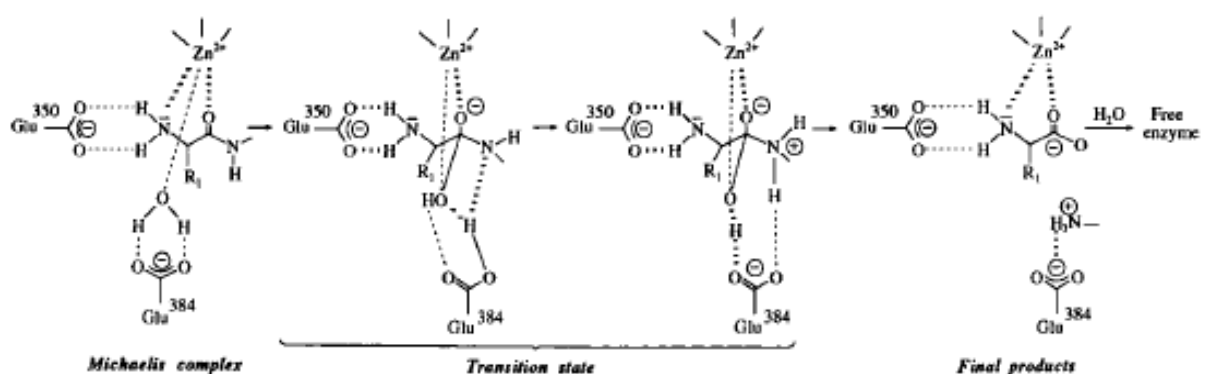
επιτόπους οι οποίοι προσδένονται στα MHC προς παρουσίαση σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος [14].

1.4.1 Μηχανισμός δράσης

Μέσα από δομικές μελέτες μελών της οικογένειας M1 των αμινοπεπτιδασών έχει προταθεί ένας μηχανισμός δράσης των ενζύμων αυτών σύμφωνα με τον οποίο η υδρόλυση του υποστρώματος λαμβάνει χώρα μέσω σχηματισμού ενός τετραεδρικού ενδιάμεσου. Σε αντίθεση με άλλες οικογένειες αμινοπεπτιδασών οι οποίες προσδένουν τον ψευδάργυρο μέσω τριών καταλοίπων ιστιδίνης, στην οικογένεια M1 απαιτούνται δύο ιστιδίνες και ένα γλουταμινικό οξύ, όπως φαίνεται και στο σχήμα 1. Το δεύτερο γλουταμινικό οξύ του μοτίβου πρόσδεσης ψευδαργύρου λειτουργεί ως βάση καθώς πολώνει το μόριο H_2O αποσπώντας ένα πρωτόνιο και έτσι προάγει την πυρηνόφιλη προσβολή του καρβονυλίου του πεπτιδικού δεσμού [14]. Το τετραεδρικό ενδιάμεσο που σχηματίζεται σταθεροποιείται μέσω ενός δεσμού υδρογόνου στον οποίο συμμετέχει ένα συντηρημένο κατάλοιπο τυροσίνης [19]. Στη συνέχεια διασπάται ο πεπτιδικός δεσμός και απελευθερώνεται η αμινομάδα ενώ αποσπάται και η καρβοξυλομάδα του προϊόντος από τον ψευδάργυρο καθώς αυτός προσλαμβάνει ένα μόριο H_2O [14].



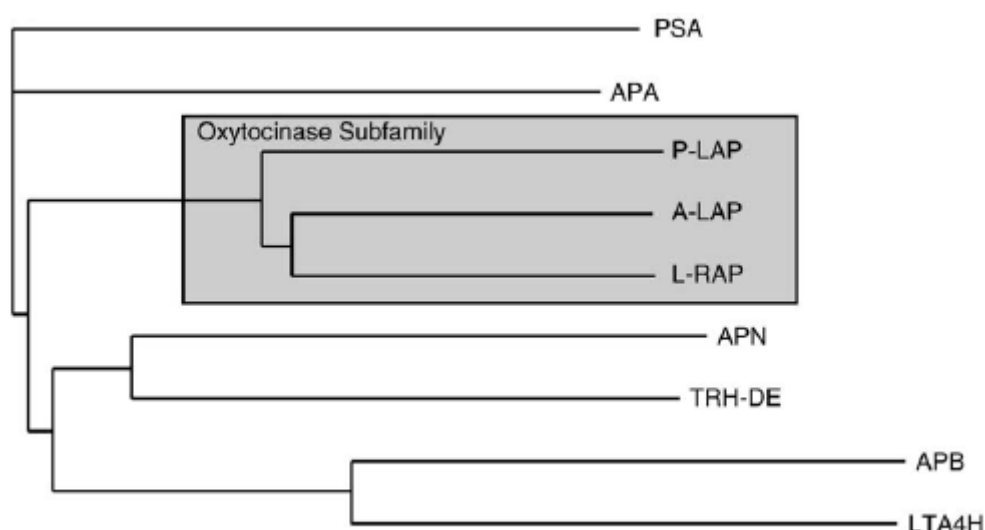
Σχήμα 1: Σχηματική αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του N-τελικού άκρου ενός πεπτιδίου και των αμινοξέων του ενεργού κέντρου της αμινοπεπτιδάσης A. Το Glu-352 ανήκει στο μοτίβο εξωπεπτιδάσης το οποίο φαίνεται να αλληλεπιδρά με την αμινομάδα του υποστρώματος. Τα κατάλοιπα His-385, Glu-386, His-389 και Glu-408 ανήκουν στο μοτίβο πρόσδεσης Zn^{2+} . Η Tyr-471 σταθεροποιεί το τετραεδρικό ενδιάμεσο [17]



Σχήμα 2: Σχηματική αναπαράσταση της υδρόλυσης του αμινοξέος στο N-τελικό άκρο ενός πεπτιδίου από την αμινοπεπτιδάση N [18]

1.4.2 Υποοικογένεια των ωκυτοκινασών

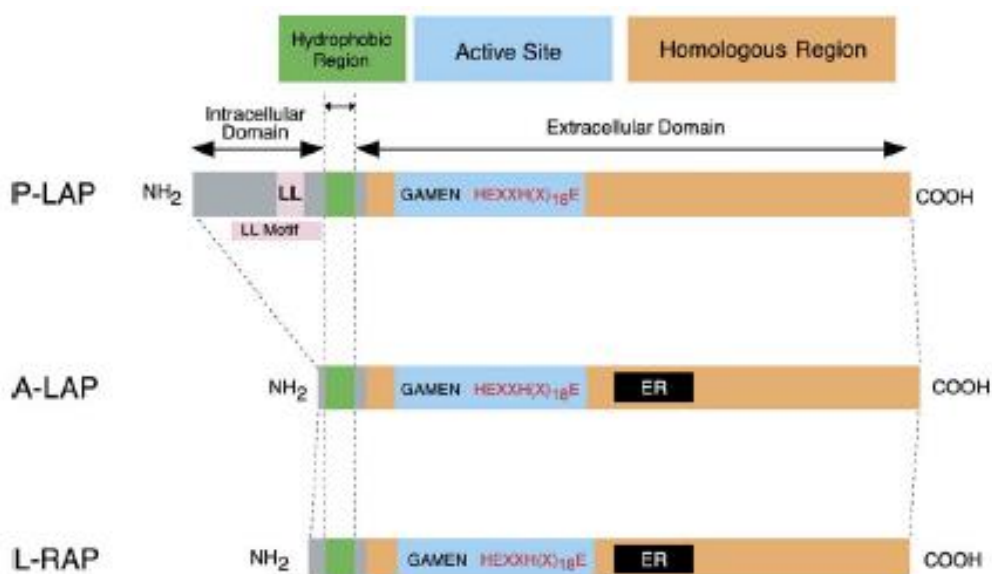
Μέχρι στιγμής, έχουν ταυτοποιηθεί εννέα αμινοπεπτιδάσες της οικογένειας M1 στα θηλαστικά. Τρεις από αυτές, η P-LAP (Placental Leucine Aminopeptidase) η A-LAP (Adipocyte-derived Leucine Aminopeptidase) και η L-RAP (Leucocyte-derived Arginine Aminopeptidase) έχουν μεταξύ τους υψηλά επίπεδα ομολογίας ειδικά στις περιοχές της πρωτεΐνης γύρω από τα μοτίβα HEXXH(X)₁₈E και GAMEN. Φυλογενετική ανάλυση έχει δείξει ότι μπορούν να καταταγούν σε μια ξεχωριστή υποοικογένεια, η οποία ονομάζεται υποοικογένεια των ωκυτοκινασών. Η ονομασία δόθηκε λόγω της ιδιότητας της P-LAP να υδρολύει την ωκυτοκίνη [20].



Σχήμα 3: Φυλογενετική ανάλυση των M1 αμινοπεπτιδασών των θηλαστικών, στην οποία φαίνεται ότι οι αμινοπεπτιδάσες P-LAP, A-LAP και L-RAP μπορούν να ταξινομηθούν στην ίδια υποοικογένεια [20]

Η ανθρώπινη αμινοπεπτιδάση P-LAP είναι μία τύπου II μεμβρανοσύνδετη πρωτεΐνη με τρεις δομικές περιοχές. Μια κυτοσολική περιοχή 109 αμινοξέων στο N-τελικό άκρο της πρωτεΐνης, μια υδρόφοβη διαμεμβρανική περιοχή 23 αμινοξέων καθώς και μια εξωκυτταρική δομική περιοχή 893 αμινοξέων [21].

Στον πλακούντα, μετά από πρωτεόλυση παράγεται η διαλυτή μορφή του ενζύμου. Η αμινοπεπτιδάση P-LAP εκφράζεται όχι μόνο στον πλακούντα, αλλά και στην καρδιά, στους νεφρούς και στο λεπτό έντερο. Χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης έχουν παρατηρηθεί σε ιστούς όπως ο εγκέφαλος, οι σκελετικοί μύες, οι πνεύμονες και το ήπαρ. Αντίθετα οι αμινοπεπτιδάσες A-LAP και L-RAP είναι διαλυτές πρωτεΐνες που βρίσκονται στο ΕΔ και εκφράζονται σε όλα τα κύτταρα του οργανισμού [22, 23]. Τα ανθρώπινα γονίδια για τις τρεις αυτές αμινοπεπτιδάσες έχουν παρόμοια οργάνωση και συναντώνται στο χρωμόσωμα 5q15. Τα μοτίβα HEXXH(X)₁₈E και GAMEN κωδικοποιούνται από τα εξώνια 6 και 7 αντίστοιχα, ενώ σε αντίθεση με την P-LAP οι A-LAP και L-RAP κωδικοποιούν στο εξώνιο 11 μια αλληλουχία για διατήρηση στο ΕΔ [20].



Σχήμα 4: Σχηματική αναπαράσταση των δομικών περιοχών των αμινοπεπτιδασών της υποοικογένειας των ωκυτοκινάσων [20]

1.5 Η αμινοπεπτιδάση του ενδοπλασματικού δικτύου 1 (ERAP1)

1.5.1 Ανακάλυψη της ERAP1

Η αμινοπεπτιδάση ERAP1 ανακαλύφθηκε και χαρακτηρίστηκε ως ένα ένζυμο του ενδοπλασματικού δικτύου το 2002, από τις ομάδες των Goldberg, Rock και Shastri. Στην ανακάλυψη αυτή οδήγησε η προσπάθεια να ταυτοποιήσουν ποια ή ποιες αμινοπεπτιδάσες καταλύουν τα τελικά στάδια επεξεργασίας των αντιγονικών επιτόπων [22-24]. Μετά από διαχωρισμό του αυλού και του μεμβρανικού τμήματος του αδρού ενδοπλασματικού δικτύου, διαπιστώθηκε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό δραστικότητας έναντι σε μη φυσικά υποστρώματα αλλά και στον πρόδρομο επίτοπο ESIINFEKL μετρήθηκε στο κλάσμα του αυλού. Οι πρωτεΐνες του αυλού του ΕΔ διαχωρίστηκαν περαιτέρω με χρωματογραφία ανιονανταλλαγής και το κλάσμα που φαινόταν να υδρολύει το ESIINFEKL και το μη φυσικό υπόστρωμα L-AMC αναλύθηκε με ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες [22]. Μετά από ανάλυση των διαφορετικών πρωτεϊνών με φασματομετρία μάζας βρέθηκε ότι μια από αυτές αντιστοιχούσε σε μια μεταλλοπεπτιδάση ψευδαργύρου που είχε ήδη χαρακτηριστεί και της είχαν αποδοθεί τα ονόματα A-LAP [25], PILS-AP (Puromycin-insensitive leucyl-specific Aminopeptidase) [26] και ARTS-1 (Aminopeptidase Regulator of TNFR1 Shedding) [27]. Παρόλο που η απομόνωση της συγκεκριμένης αμινοπεπτιδάσης από κλάσμα μικροσωμάτων αποτελούσε ένδειξη ότι τοποθετείται στο ΕΔ, σε παλαιότερες μελέτες περιγράφεται ως κυτοσολικό [25], εκκρινόμενο [27] και σχετιζόμενο με ενδοκυτταρικά κυστίδια ένζυμο [26]. Πειράματα ανοσοκυταροχημείας έδειξαν ότι η ERAP1 συνεντοπίζεται μαζί με πρωτεΐνες που φέρουν την αλληλουχία διατήρησης στο ΕΔ, KDEL [22].

Η αμινοπεπτιδάση ERAP1 εκφράζεται καθολικά, αλλά παρουσιάζει υψηλότερα επίπεδα έκφρασης σε ιστούς όπως το ήπαρ, οι πνεύμονες, ο σπλήνας και ο θύμος αδένος [28]. Οι συγκεκριμένοι ιστοί εκφράζουν σε μεγάλες συγκεντρώσεις και MHC I. Η έκφραση της ERAP1 επάγεται από μια

φλεγμονώδη κυτταροκίνη, την INF- γ , η οποία προάγει την έκφραση και άλλων μορίων του μονοπατιού αντιγονοπαρουσίασης τάξης I [22, 28].

Προκειμένου να ελεγχθεί η σπουδαιότητα της ERAP1 στην παραγωγή αντιγονικών πεπτιδίων, οι Serwold et al., μείωσαν την έκφραση της με χρήση siRNA και στη συνέχεια εξέτασαν την μεταβολή της ποσότητας της. Στα κύτταρα μυός που είχαν επεξεργαστεί με siRNA συμπληρωματικό για το ERAP1 μυός η έκφραση του ενζύμου είχε μειωθεί κατά 90%. Σε αυτά τα κύτταρα παρατηρήθηκε και μειωμένη έκφραση των μορίων ιστοσυμβατότητας MHC I K^k και L^d κατά 23% και 44% αντίστοιχα. Η μείωση των MHC στην επιφάνεια των κυττάρων οφείλεται στην αστάθεια τους όταν δεν προσδένουν πεπτίδιο. Έτσι, προτάθηκε ότι η ERAP1 εμπλέκεται στην παραγωγή των διαθέσιμων πεπτιδίων προς αντιγονοπαρουσίαση [28].

1.5.2 Ρόλος της ERAP1 στην αντιγονοπαρουσίαση

Η αμινοπεπτιδάση ERAP1 είναι απαραίτητη για την πέψη πρόδρομων πεπτιδικών επιτόπων στο ΕΔ. Πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε κύτταρα HeLa στα οποία έχει γίνει αποσιώπηση της ERAP1 με χρήση siRNA, ο επίτοπος της ωαλβουμίνης SIINFEKL ήταν σχεδόν μη ανιχνεύσιμος [24]. Για να επιβεβαιώσουν ότι το φαινόμενο οφείλεται στην ERAP1, χορήγησαν στα κύτταρα τον εκτεταμένο στο N-τελικό άκρο επίτοπο LEQLESIIINFEKL ο οποίος έφερε αλληλουχία για μετανάστευση στο ΕΔ. Έτσι αποκλείεται πιθανή καταστροφή του επιτόπου από άλλες κυτοσολικές αμινοπεπτιδάσες. Επίσης για να ελέγξουν ότι η μείωση στην αντιγονοπαρουσίαση οφειλόταν στην έλλειψη αποικοδόμησης του επιτόπου και όχι σε κάποιο άλλο φαινόμενο επαγόμενο από την ERAP1, μελέτησαν την παρουσίαση ενός επιτόπου που δεν χρειαζόταν αποικοδόμηση όταν είχε εξαλειφθεί η ERAP1. Τα επίπεδα παρουσίασης του πεπτιδίου παρέμειναν αμετάβλητα, συνεπώς η ERAP1 επάγει την αντιγονοπαρουσίαση μέσω αποικοδόμησης πεπτιδίων [24].

Η ίδια ομάδα θέλοντας να διαλευκάνει τη συνεισφορά της ERAP1 στην αντιγονοπαρουσίαση συνολικά, μελέτησε την επίδραση της αποσιώπησης καθώς και της υπερέκφρασης της ERAP1 σε κύτταρα HeLa και κύτταρα COS.

Παρατήρησαν ότι στην πρώτη περίπτωση ο συνολικός αριθμός των MHC I αυξήθηκε, ενώ στη δεύτερη μειώθηκε. Κατέληξαν λοιπόν στο συμπέρασμα ότι η ERAP1 οδηγεί στην καταστροφή κάποιων επιτόπων. Αντίθετα αποτελέσματα είχε η αποσιώπηση του ERAP1 σε κύτταρα HeLa τα οποία είχαν επεξεργαστεί με INF- γ , όπου τα MHC I παρέμειναν σταθερά ή μειώθηκαν σε σύγκριση με κύτταρα που δεν είχε εξαλειφθεί η δράση της ERAP1. Φαίνεται λοιπόν ότι σε φυσιολογικές συνθήκες η ERAP1 περιορίζει την αντιγονοπαρουσίαση, ενώ παρουσία κυτταροκινών που επάγουν την αντιγονοπαρουσίαση φαίνεται να οδηγεί στην παραγωγή επιτόπων κατάλληλων για τα MHC I [24].

Παρά την ασθενή επίδραση της απώλειας της ERAP1 στην έκφραση των MHC I, πειράματα σε ποντίκια έδειξαν ισχυρή απόκριση των κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων έναντι κυττάρων τα οποία δεν εξέφραζαν ERAP1, υποδηλώνοντας ότι απουσία του ενζύμου αλλάζει το ρεπερτόριο των αντιγονικών επιτόπων όχι μόνο ποσοτικά αλλά και ποιοτικά. Ξεχωριστές αναλύσεις των πεπτιδίων που παρουσιάζονται στα MHC I δείχνουν ότι κάποια πεπτίδια παραμένουν ανεπηρέαστα, άλλα είναι απόντα, ενώ κάποια βρίσκονται σε μεγαλύτερα ποσοστά από το φυσιολογικό [29].

Τέλος η ERAP1 φαίνεται να αποτελεί καθοριστικό παράγοντα της ανοσοκυριαρχίας των αντιγονικών επιτόπων. Με τον όρο ανοσοκυριαρχία περιγράφεται το φαινόμενο κατά το οποίο μόνο ορισμένοι αντιγονικοί επίτοποι είναι ικανοί να επάγουν ανοσολογική απόκριση. In vivo πειράματα σε ποντίκια τα οποία δεν εξέφραζαν ERAP1 εμφάνισαν διαφοροποιημένη απόκριση για συγκεκριμένους επιτόπους ιών, η οποία όμως δεν οφειλόταν σε διαφορετικό ρεπερτόριο T-λεμφοκυττάρων [30].

1.5.3 Άλλες φυσιολογικές λειτουργίες της ERAP1

Η ERAP1, εκτός από το ρόλο της στην αντιγονοπαρουσίαση, έχει εμπλακεί και σε άλλες λειτουργίες του οργανισμού. Έχει δειχθεί ότι οδηγεί σε αύξηση

της παραγωγής των διαλυτών τμημάτων διαφόρων υποδοχέων κυτταροκινών, όπως του παράγοντα νέκρωσης όγκων α (TNF α) και των ιντερλευκινών 1 και 6 (IL-1, IL-6) [27, 31, 32]. Οι Cui et al. έδειξαν ότι η ERAP1 προσδένεται στην εξωκυτταρική περιοχή του υποδοχέα 1 του TNF (TNFR1) διευκολύνοντας την αποδέσμευση του από τη μεμβράνη. Παρόλο που υπερέκφραση της ERAP1 οδηγεί σε παραγωγή διαλυτού TNFR1, δεν είναι απαραίτητη γι' αυτό η καταλυτική δραστηριότητα του ενζύμου [27]. Η ίδια ομάδα έδειξε ότι η ERAP1 ρυθμίζει την αποικοδόμηση του τύπου I υποδοχέα της IL-6 και του τύπου II υποδοχέα της IL-1 [31, 32]. Βάσει αυτής της λειτουργίας, έχει προταθεί ότι η ERAP1 συμβάλλει στη ρύθμιση της φλεγμονής και της φυσικής ανοσίας.

Πρόσφατα έλαβε χώρα ένας ακόμα συσχετισμός της ERAP1 με τη φυσική ανοσία. Η ομάδα του Tsujimoto ανακάλυψε ότι η ERAP1 εκκρίνεται από μακροφάγα μυός, ως απόκριση σε ενεργοποίηση από LPS και ιντερφερόνη. Η έκκριση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της φαγοκυττάρωσης. Επίσης διαπίστωσαν ότι για αυτή την ενεργοποίηση είναι απαραίτητη η καταλυτική δραστηριότητα του ενζύμου. Η ενεργοποίηση αυτή αποδίδεται πιθανώς στην παραγωγή βιοδραστικών πεπτιδίων τα οποία ενεργοποιούν τα μακροφάγα, καθώς παρατήρησαν ότι η φαγοκυττάρωση αυξάνεται και σε κύτταρα τα οποία καλλιεργήθηκαν σε μέσο στο οποίο έχει πρωτίστως εκκριθεί και απομακρυνθεί η ERAP1 [33].

Η αμινοπεπτιδάση ERAP1 φαίνεται να παίζει ρόλο και στη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης λόγω εμπλοκής της στο σύστημα ρενίνης – αγγιοτενσίνης [34]. Οι Hattori et al. διαπίστωσαν ότι η ERAP1 μετατρέπει την αγγιοτενσίνη II στη βιολογικά ανενεργή αγγιοτενσίνη IV με ενδιάμεσο σχηματισμό της αγγιοτενσίνης III. Επίσης η ERAP1 καταλύει τη μετατροπή της καλλιδίνης σε βραδυκινίνη και μάλιστα οδηγεί σε παραγωγή της, καθώς δεν ανιχνεύτηκε άλλο προϊόν υδρόλυσης μετά από ανάλυση των αντιδράσεων με HPLC ανάστροφης φάσης [34].

Τέλος η ERAP1 φαίνεται να συμμετέχει στον έλεγχο της αγγειογένεσης μετά τη γέννηση, με το να ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων [35]. Μελέτες έδειξαν ότι η έκφραση της ERAP1 επάγεται κατά τη διαφοροποίηση ενδοθηλιακών κυττάρων *in vitro*, ενώ *in vivo*

εκφράζεται στο σημείο της αγγειογένεσης μετά από διέγερση από τον αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα (VEGF) [36].

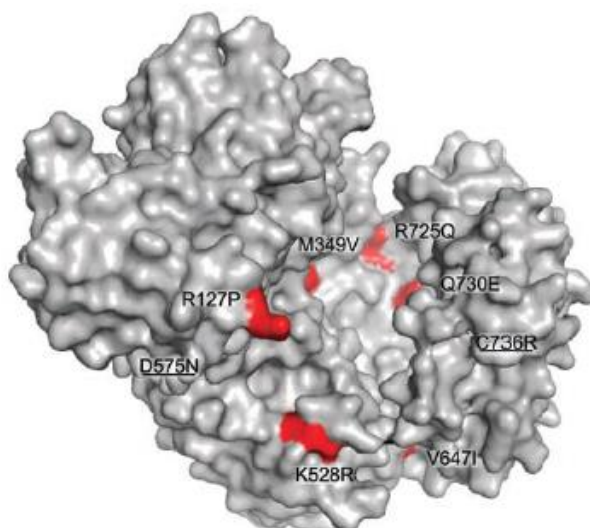
1.5.4 Εμπλοκή της ERAP1 σε ασθένειες

Το γονίδιο που κωδικοποιεί την ERAP1 είναι ένα πολυμορφικό γονίδιο, ενώ πολλοί φυσικά απαντώμενοι πολυμορφισμοί μονού νουκλεοτιδίου (SNP) στο γονίδιο έχουν συσχετιστεί με ασθένειες αυτοάνοσης ή μη αιτιολογίας [10, 37]. Επειδή τα σύμπλοκα των μορίων MHC I με τα αντιγονικά πεπτιδία αναγνωρίζονται τόσο από τα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα όσο και από τα φυσικά φονικά κύτταρα, η επεξεργασία των αντιγονικών πεπτιδίων είναι απαραίτητη για τη σωστή επιτήρηση έναντι ενδοκυτταρικών ιών, βακτηρίων αλλά και απέναντι σε μεταλλαγμένες πρωτεΐνες καρκινικών κυττάρων. Μικρές λοιπόν διαφορές κατά την επεξεργασία των αντιγονικών πεπτιδίων λόγω πολυμορφισμών της ERAP1 ενδέχεται να οδηγήσουν σε διαφοροποιημένη απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος.

Η ERAP1, λοιπόν, αποτελεί παράγοντα προδιάθεσης σε βακτηριακές και ιικές μολύνσεις. Έχειδειχτεί σε ποντίκια τα οποία δεν εκφράζουν ERAP1 ότι δεν εμφανίζεται προστατευτική απόκριση απέναντι σε μόλυνση από *Toxoplasma gondii* [38] και *mCMV* [30]. Έχει προταθεί επίσης ότι μεταλλάξεις διαφυγής του HIV από το ανοσοποιητικό σύστημα μπορεί να επηρεάζουν την επεξεργασία των επιτόπων από την ERAP1. Με αυτό τον τρόπο τα αντιγονικά πεπτιδία από τον HIV καταφέρνουν να μην παρουσιάζονται στην επιφάνεια του κυττάρου και να διαφεύγουν του ανοσοποιητικού συστήματος [39].

Σε μελέτη κατά την οποία πραγματοποιήθηκε σάρωση των 33 πολυμορφισμών του γονιδίου της ERAP1, βρέθηκε συσχετισμός μεταξύ ενός αλληλόμορφου γονιδίου της ERAP1 το οποίο στη θέση 528 περιέχει αργινίνη αντί για λυσίνη (K528R) και της εμφάνισης υπέρτασης [37]. Το αλληλίο 528R εμφανίζει χαμηλότερη δραστηριότητα σε σχέση με το 528K οπότε στον οργανισμό εμφανίζεται μειωμένη παραγωγή βραδυκίνινης και χαμηλότερη αδρανοποίηση της αγγειοτενσίνης II.

Πρόσφατες μελέτες συσχέτισμού του γονιδιώματος (GWAS) με διάφορες ασθένειες, ταυτοποίησαν πολλούς πολυμορφισμούς στην ERAP1 οι οποίοι φαίνεται να συσχετίζονται με αυτοάνοσα νοσήματα όπως η αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα [40], ο διαβήτης τύπου Ι [41], η σκλήρυνση κατά πλάκας [42] και η ψωρίαση [43].



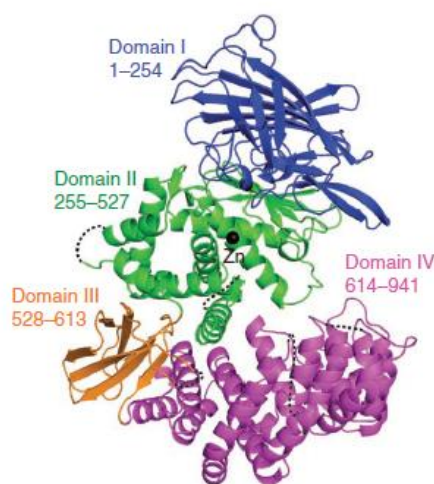
Εικόνα 5: Πολυμορφισμοί του ERAP1 που σχετίζονται με την αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα [44]

Η έκφραση της ERAP1 έχει αξιολογηθεί σε πολλά είδη κακοηθών νεοπλασιών σε σύγκριση με αυτή των αντίστοιχων υγιών ιστών. Τα αποτελέσματα από αυτές τις μελέτες έδειξαν ότι η ERAP1 εκφράζεται σε όλα τα είδη νεοπλασιών που εξετάστηκαν, όμως εμφάνιζε ποικίλα επίπεδα έκφρασης είτε αυξημένα είτε χαμηλότερα από το φυσιολογικό. Ευρήματα έχουν δείξει ότι διαφοροποιημένη έκφραση της ERAP1 στα καρκινικά κύτταρα ενδέχεται να συμβάλλει στη διαφυγή τους από την ανοσολογική επιτήρηση [45]. Οι Cifaldi et al. έδειξαν ότι με σταδιακή μείωση της έκφρασης της ERAP1 οι όγκοι σε ποντίκια με λέμφωμα T-κυττάρων απορρίπτονταν. Αυτή η απόκριση οφειλόταν κυρίως στην δράση των φυσικών φονικών κυττάρων κάτι που σημαίνει ότι αποσιώπηση της ERAP1 μπορεί να μεταβάλλει την ισορροπία

μεταξύ σημάτων ενεργοποίησης και καταστολής από τους υποδοχείς των φυσικών φονικών κυττάρων, οδηγώντας σε κυτταρικό θάνατο [46].

1.5.5 Η δομή της ERAP1

Η ERAP1 είναι μέλος της οικογένειας M1 των μεταλλοπεπτιδασών η οποία χαρακτηρίζεται από τα συντηρημένα μοτίβα GAMEN και HExxHx₁₈E. Η κρυσταλλική της δομή αποτελείται από τέσσερις δομικές περιοχές οι οποίες σχηματίζουν μια κοιλότητα η οποία εκτείνεται μεταξύ των δομικών περιοχών II και IV μήκους 36Å [44, 47]. Η περιοχή I αποτελείται εξ' ολοκλήρου από β-πτυχωτές επιφάνειες και φαίνεται να αλληλεπιδρά με το N-τελικό άκρο του πεπτιδικού υποστρώματος.

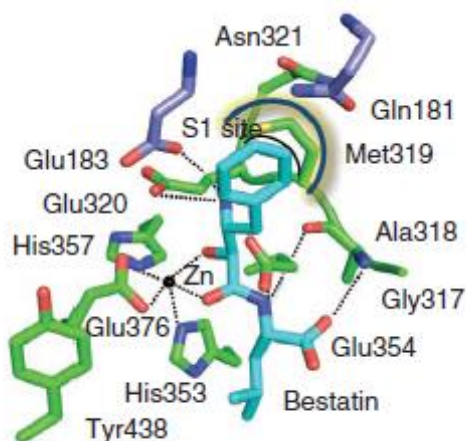


Εικόνα 6: Η δομή της ERAP1 [44]

Το καταλυτικό κέντρο της ERAP1 βρίσκεται στη δομική περιοχή II η οποία εμφανίζει μεγάλη ομολογία με τη θερμολυσίνη. Σε αυτό το τμήμα του μορίου βρίσκεται το ιόν ψευδαργύρου καθώς και το μοτίβα πρόσδεσης ψευδαργύρου. Ο Zn²⁺ συντονίζεται από τις πλευρικές ομάδες των ιστιδινών 353 και 357 και του γλουταμινικού οξέος 376. Σε αυτή τη δομική περιοχή βρίσκεται και η τυροσίνη 438 η οποία είναι απαραίτητη για την εμφάνιση της καταλυτικής

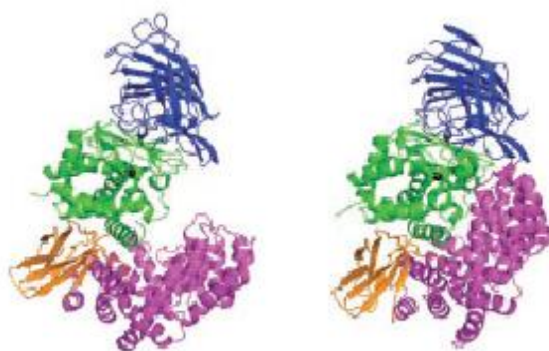
δραστηκότητας. Με αντικατάσταση της τυροσίνης από φαινυλαλανίνη παρουσιάζεται μείωση της δραστηκότητας κατά 99,5%. Η δομική περιοχή III αποτελείται από β-πτυχωτές επιφάνειες και συνδέει την περιοχή II με την IV. Η τελευταία αποτελεί το C-τελικό άκρο του μορίου της ERAP1 η οποία και εκτείνεται μακριά από το καταλυτικό κέντρο σχηματίζοντας την εκτεταμένη κοιλότητα δέσμησης υποστρώματος [44].

Η συν-κρυστάλλωση του ERAP1 με την μπεστατίνη, έναν αναστολέα των αμινοπεπτιδασών, προσφέρει μια προσομοίωση της δέσμησης των πρώτων αμινοξέων ενός φυσικού υποστρώματος από την ERAP1. Όπως φαίνεται στην εικόνα 1, η μπεστατίνη αλληλεπιδρά με τον ψευδάργυρο μέσω των οξυγόνων της 2-υδροξυλομάδας και της αμιδομάδας, ενώ η α-υδροξυλομάδα αλληλεπιδρά με το γλουταμινικό στη θέση 354. Το N-τελικό άκρο της μπεστατίνης δεσμεύεται από τα γλουταμινικά 183 και 320 (GAMEN). Από τα υπόλοιπα αμινοξέα του μοτίβου εξωπεπτιδάσης, η γλυκίνη 317 και η αλανίνη 318 αλληλεπιδρούν με το μόριο της μπεστατίνης, ενώ η πλευρική ομάδα της μεθειονίνης 319 συμμετέχει στο σχηματισμό του S1 θύλακα. Τέλος η ασπαραγίνη 321 σταθεροποιεί τη διαμόρφωση της θηλιάς μέσω δεσμών υδρογόνου [44].



Εικόνα 7: Αλληλεπιδράσεις των αμινοξέων του καταλυτικού κέντρου της ERAP1 με τον αναστολέα αμινοπεπτιδασών μπεστατίνη (μπλε ράβδοι) [44]

Η αμινοπεπτιδάση ERAP1 αλλάζει διαμόρφωση κατά την κατάλυση αποκτώντας μια κλειστή διαμόρφωση. Κρυστάλλωση της ERAP1 από τους Kochan et al. έδειξε κάποιες διαφορές στη οργάνωση των διαφόρων δομικών περιοχών, καθώς η C-τελική περιοχή βρίσκεται πιο κοντά στην καταλυτική περιοχή αποκτώντας διαμόρφωση που μοιάζει περισσότερο σε αυτές άλλων αμινοπεπτιδασών της M1 οικογένειας. Στην κλειστή διαμόρφωση η κοιλότητα πρόσδεσης του υποστρώματος παραμένει αρκετά μεγάλη ώστε να χωρέσει ένα πεπτίδιο μήκους 12-14 αμινοξέων [47]. Το καταλυτικό κέντρο δεν υφίσταται ιδιαίτερες αλλαγές με εξαίρεση την τυροσίνη 438 η οποία αποκτά πλέον κατάλληλη θέση προκειμένου να συμμετέχει στην κατάλυση [44].



Εικόνα 8: Η αμινοπεπτιδάση ERAP1 στην ανοιχτή (PDB ID: 3MDJ) και στην κλειστή (PDB ID: 2YDO) διαμόρφωση [44]

1.5.6 Εξειδίκευση και επιλογή μήκους υποστρωμάτων από την ERAP1

Όπως φαίνεται από το βιολογικό ρόλο της, η ERAP1 πρέπει να είναι ικανή να αποικοδομεί έναν ευρύ αριθμό υποστρωμάτων. Οι Serwold et al., θέλοντας να καθορίσουν την εξειδίκευση του ενζύμου, μελέτησαν τα προϊόντα επώασης της ERAP1 με το πεπτίδιο SHL8 το οποίο είναι εκτεταμένο στο N-τελικό άκρο με διάφορα αμινοξέα. Παρατήρησαν ότι η ERAP1 αποικοδομεί πεπτίδια που

στο N-τελικό άκρο είχαν λυσίνη, λευκίνη, τυροσίνη και ασπαραγίνη. Επιπλέον η ERAP1 δεν μπορούσε να καταλύσει την απομάκρυνση του N-τελικού αμινοξέος όταν το πεπτιδίο είχε το μοτίβο X-P-Xn [28]. Την εξειδίκευση του ενζύμου ως προς το N-τελικό αμινοξύ, είχαν μελετήσει και οι Hattori et al. οι οποίοι βρήκαν ότι από τη σειρά μη φυσικών υποστρωμάτων X-AMC πιο αποτελεσματικά υδρολύεται το L-AMC, ενώ δεύτερο είναι το M-AMC. Μικρή δραστηριότητα μετρήθηκε για το C-AMC και το F-AMC. Σε συνέχεια αυτής της μελέτης βρήκαν ότι η ERAP1 αποικοδομεί τις πεπτιδικές ορμόνες αγγειοτενσίνη II και καλλιδίνη [34]. Με την επίλυση της δομής του ενζύμου, βρέθηκε ότι ο S1 θύλακας εξειδίκευσης, δηλαδή ο θύλακας ο οποίος προσδένει το N-τελικό άκρο του πεπτιδίου, σχηματίζεται από τα αμινοξέα σερίνη 316, μεθειονίνη 319, γλουταμίνη 181 και γλουταμινικό 183. Στον υδρόφοβο θύλακα που σχηματίζεται ταιριάζουν ιδανικά λευκίνη και μεθειονίνη κάτι που συνάδει με τις βιοχημικές δοκιμασίες [44]. Σημαντικό ρόλο στην εξειδίκευση του ενζύμου παίζει η γλουταμίνη 181 [48]. Πειράματα αντικατάστασης της από άλλα αμινοξέα έδειξαν μεταβολή στην εξειδίκευση της ERAP1. Πιο συγκεκριμένα, η αντικατάσταση Q181D οδήγησε στην υδρόλυση βασικών αμινοξέων, ενώ άλλες μεταλλάξεις όπως οι Q181N και Q181A οδήγησαν σε μειωμένη δραστηριότητα απέναντι σε συνθετικά και φυσικά υποστρώματα [48]. Ενώ λοιπόν η ERAP1 φαίνεται να έχει περιορισμένη εξειδίκευση για μη φυσικά υποστρώματα, στον οργανισμό καταλύει την αποικοδόμηση μεγάλου εύρους υποστρωμάτων. Είναι λοιπόν πιθανό, οι αλληλεπιδράσεις άλλων αμινοξικών καταλοίπων, εκτός του N-τελικού αμινοξέος, με το ένζυμο, να επηρεάζουν την ταχύτητα υδρόλυσης του επιτόπου. Πράγματι, η αλληλουχία ενός πεπτιδίου είναι καθοριστική για το μεταβολισμό του, καθώς έχουν παρατηρηθεί μεγάλες διακυμάνσεις στην ταχύτητα υδρόλυσης πεπτιδίων τα οποία διαφέρουν ακόμα και κατά ένα αμινοξύ [49]. Υδρόφοβα και θετικά φορτισμένα αμινοξέα φαίνεται να αυξάνουν την ενζυμική δραστηριότητα της ERAP1 [49], κάτι που συνάδει με το γεγονός ότι η κοιλότητα πρόσδεσης του υποστρώματος απαρτίζεται από υδρόφοβα και αρνητικά φορτισμένα αμινοξέα [44].

Η ERAP1, σε αντίθεση με άλλες αμινοπεπτιδάσες, παρουσιάζει μεγαλύτερη συγγένεια για υποστρώματα μήκους μεγαλύτερου από δέκα αμινοξέα. Οι York

et al., το 2002, παρατήρησαν ότι η ERAP1 εμφάνιζε μεγαλύτερη ταχύτητα υδρόλυσης για πεπτίδια μήκους 10-14 αμινοξέα σε σχέση εννιαμερή ή οκταμερή όπου η ταχύτητα ήταν είτε πολύ μικρή είτε μηδενική [24]. Αυτή την προτίμηση επιβεβαίωσαν το 2005 οι Chang et al. οι οποίοι, μελετώντας in vitro αντιδράσεις της ERAP1 με μια σειρά πεπτιδίων ποικίλων μεγεθών, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η ERAP1 προτιμά πεπτίδια μήκους 9-16 αμινοξέων [50]. Για να ελέγξουν κατά πόσο αυτή η προτίμηση οφείλεται στο μήκος και όχι στην αλληλουχία, χρησιμοποίησαν πεπτίδια διαφόρων μεγεθών με το επαναλαμβανόμενο μοτίβο QLES. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το πεπτίδιο με 13 αμινοξέα υδρολύεται πολύ πιο γρήγορα από το εννιαμερές και το πενταμερές. Παραγωγή των ενδιάμεσων προϊόντων οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η ERAP1 δρα με μη επεξεργαστικό τρόπο [50]. Επιπλέον, απουσία ERAP1 τα μόρια ιστοσυμβατότητας τείνουν να παρουσιάζουν πεπτίδια μεγαλύτερου μήκους από το φυσιολογικό. Το συγκεκριμένο μήκος των επιτόπων (8-9) είναι βέλτιστο για πρόσδεση στα MHC I οπότε είναι πιθανό η ERAP1 και τα MHC I να εξελίχτηκαν παράλληλα προκειμένου να εμφανίσουν παρόμοιες προτιμήσεις στο μήκος των πεπτιδίων [51]. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι η κρυσταλλική δομή του ενζύμου αποκαλύπτει έναν εκτεταμένο θύλακα ο οποίος εκτείνεται από το καταλυτικό κέντρο μέχρι το C-τελικό άκρο του μορίου, ικανό να προσδέσει μεγάλα υποστρώματα [44, 47]. Συνκρυστάλλωση του C-τελικού άκρου της ERAP1 με ένα πεπτίδιο αποκαλύπτει πιθανές αλληλεπιδράσεις συγκεκριμένων αμινοξέων του ενζύμου με το υπόστρωμα [52].

1.6 Υπόθεση και στόχοι της παρούσας μελέτης

Λόγω του ρυθμιστικού ρόλου της στην αντιγονοπαρουσίαση και στην κυτταροτοξική ανοσολογική απόκριση, η ERAP1, σχετίζεται με όλο και περισσότερες ασθένειες. Η ρύθμιση της δραστηριότητας αυτού του ενζύμου ενδέχεται λοιπόν να αποτελεί στόχο για την αντιμετώπιση πολλών ασθενειών. Επειδή στα κύτταρα υπάρχουν πολλές αμινοπεπτιδάσες που εμφανίζουν υψηλά επίπεδα ομολογίας με το καταλυτικό κέντρο της ERAP1, είναι πολύ σημαντική η επίτευξη εκλεκτικότητας στην παρέμβαση στο μονοπάτι της ERAP1. Για να καταστεί αυτό εφικτό πρέπει να διαλευκανθεί ο μηχανισμός δράσης της ERAP1 και να γίνουν κατανοητές οι μοριακές αλληλεπιδράσεις που οδηγούν στην επιλογή του υποστρώματος.

Η ERAP1 εμφανίζει ορισμένα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά σε σχέση με άλλες αμινοπεπτιδάσες καθώς επιλέγει υποστρώματα τόσο βάσει μήκους όσο και αλληλουχίας. Με επίλυση της κρυσταλλικής δομής της ERAP1 αλλά και συνκρυστάλλωσης του C-τελικού άκρου του μορίου με ένα πεπτίδιο αποκαλύφθηκαν κάποια αμινοξέα τα οποία πιθανώς να συνεισφέρουν στην επιλογή υποστρώματος σύμφωνα με το μήκος αλλά και στην προτίμηση του ενζύμου για πεπτίδια που φέρουν στην αλληλουχία τους θετικά φορτισμένα αμινοξέα.

Στόχος αυτής της διατριβής είναι να ελέγξουμε το ρόλο ενός καταλοίπου αργινίνης στη θέση 841 και τριών ασπαρτικών οξέων στις θέσεις 406 435 και 439, τα οποία συμμετέχουν στο σχηματισμό της κοιλότητας πρόσδεσης υποστρώματος της ERAP1, στη δραστηριότητα του ενζύμου. Με αυτό τον τρόπο θα αξιολογήσουμε τη συνεισφορά τους στην εξειδίκευση της ERAP1 καθώς και στην ικανότητα του να επιλέγει πεπτίδια συγκεκριμένου μήκους.

Για να το επιτύχουμε αυτό, θα πραγματοποιηθεί παραγωγή ανασυνδυασμένων ενζύμων που φέρουν σημειακές μεταλλάξεις, όπου το επιθυμητό αμινοξύ έχει αντικατασταθεί από αλανίνη, με φορέα έκφρασης βακιλοϊό. Η αλανίνη επιλέγεται επειδή επιτρέπει τη μελέτη της επίδρασης της πλευρικής ομάδας του αμινοξέος, χωρίς όμως να χάνεται η χειρομορφία του μορίου, όπως στην περίπτωση της γλυκίνης. Στη συνέχεια τα μεταλλαγμένα

ένζυμα θα συγκριθούν ως προς την ενζυμική δραστικότητα με την ERAP1 αγρίου τύπου χρησιμοποιώντας φθορισμομετρικές δοκιμασίες και υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης ανάστροφης φάσης. Ως υποστρώματα του ενζύμου θα χρησιμοποιηθούν κάποια συνθετικά πεπτίδια βελτιστοποιημένα για τους στόχους της μελέτης μας, αλλά και πρόδρομα πεπτίδια φυσικών επιτόπων οι οποίοι έχουν μελετηθεί εκτεταμένα.

Μέσω αυτής της μελέτης θα αποκτήσουμε κάποιες ενδείξεις για τον τρόπο με τον οποίο προσδένεται το πεπτιδικό υπόστρωμα στο ένζυμο και πως η ERAP1 επιτυγχάνει τους περιορισμούς στην αλληλουχία και το μήκος κατά την επιλογή του επιτόπου που θα επεξεργαστεί.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

2.1 Καλλιέργειες κυττάρων

Κύτταρα Sf9

- Απαγωγός κάθετης νηματικής ροής (BIOAIR)
- Επωαστικός κλίβανος (Heal Force)
- Θρεπτικό μέσο SF900II SFM (Invitrogen)
- Αποστειρωμένες πιπέτες μιας χρήσης (Greiner Bio One)
- Αποστειρωμένες πλάκες T25 (Greiner Bio One)
- Αιθανόλη 70%

Τα κύτταρα Sf9 καλλιεργούνται στους 27°C σε επιφάνεια πλακών T25. Όταν τα κύτταρα καλύψουν την πλάκα κατά 90-95% αραιώνονται 1:5 του αρχικού όγκου. Τα κύτταρα, το θρεπτικό μέσο και οι αποστειρωμένες πιπέτες μεταφέρονται σε απαγωγό κάθετης νηματικής ροής. Για να γίνει η ανακαλλιέργεια κτυπάμε ελαφρά την πλάκα μέχρι να αποκολληθούν τα κύτταρα και αφαιρούμε ένα μέρος της καλλιέργειας. Στη συνέχεια προσθέτουμε θρεπτικό υλικό μέχρι τον επιθυμητό όγκο.

Κύτταρα Hi5

- Απαγωγός κάθετης νηματικής ροής (BIOAIR)
- Επωαστικός κλίβανος με σύστημα ανάδευσης (LabTech)

- Θρεπτικό μέσο SF900II SFM (Invitrogen)
- Αποστειρωμένες πιπέτες μιας χρήσης (Greiner Bio One)
- Αποστειρωμένες φιάλες καλλιέργειας (VWR 125mL και 500mL)
- Αιθανόλη 70%

Τα κύτταρα Hi5 καλλιεργούνται στους 27°C υπό ανάδευση (125rpm) σε αιώρημα. Όταν τα κύτταρα έχουν συγκέντρωση $2-4 \times 10^6$ αραιώνονται μέχρι τα $3-5 \times 10^5$ κύτταρα/mL. Τα κύτταρα, το θρεπτικό μέσο και οι αποστειρωμένες πιπέτες μεταφέρονται σε απαγωγό κάθετης νηματικής ροής. Για να γίνει η ανακαλλιέργεια αφαιρούμε ένα μέρος της καλλιέργειας και συμπληρώνουμε με θρεπτικό υλικό μέχρι τον επιθυμητό όγκο.

2.2 Μέτρηση κυττάρων

- Οπτικό μικροσκόπιο (Zeiss)
- Αιματοκυτόμετρο (Zeiss)
- Ειδική καλυπτρίδα (Zeiss)
- Χρωστική trypan blue (BIOCROM AG)

Για την μέτρηση των κυττάρων λαμβάνουμε δείγμα της καλλιέργειας (~0,5mL) υπό ασηπτικές συνθήκες. Αναμιγνύονται 18μL δείγματος και 2μL χρωστικής και υποβάλλονται σε ισχυρή ανάδευση (vortex) προκειμένου να σπάσουν συσσωματώματα των κυττάρων. Η χρωστική διαπερνά την μεμβράνη των νεκρών κυττάρων τα οποία αφού βαφτούν μπλε μπορούν να διακριθούν από τα ζωντανά. Αφού τοποθετηθεί η καλυπτρίδα στο αιματοκυτόμετρο, τοποθετούνται 10μL μείγματος, μετρώνται τα κύτταρα στην κεντρική περιοχή του αιματοκυτομέτρου και υπολογίζεται η συγκέντρωση των κυττάρων σύμφωνα με τον τύπο $\frac{cells}{0.9} \times 10^4$.

2.3 Προετοιμασία κυττάρων για συντήρηση σε βαθιά ψύξη

Κύτταρα Sf9

- Απαγωγός κάθετης νηματικής ροής (BIOAIR)
- Φυγόκεντρος Universal 320R, Hettich Zentrifugen
- Αποστειρωμένες πλάκες T175 (Greiner Bio One)
- Φίλτρα οπών 0,22 μm (Greiner Bio One)
- Κρυσταλλοειδή (Greiner Bio One)
- Κρυσταλλοπροστατευτικό μέσο: 90% θρεπτικό μέσο SF900II SFM, 10% DMSO

Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε πλάκες T175 μέχρι να καλύψουν το 90-95% της πλάκας. Το κρυσταλλοπροστατευτικό μέσο φιλτράρεται υπό ασηπτικές συνθήκες και τοποθετείται σε πάγο. Τα κύτταρα μετριοούνται καθώς πρέπει να έχουν συγκέντρωση 10^7 κύτταρα/mL. Η καλλιέργεια φυγόκεντρείται στα 500g για 10min. Αφαιρείται το υπερκείμενο και τα κύτταρα αναδιασπείρονται σε κατάλληλο όγκο κρυσταλλοπροστατευτικού μέσου ώστε να έχουν συγκέντρωση 10^7 κύτταρα/mL. Οι σωλήνες με τα κύτταρα (1mL) τοποθετούνται για 24 ώρες στους -80°C και στη συνέχεια σε υγρό άζωτο.

Κύτταρα Hi5

- Απαγωγός κάθετης νηματικής ροής (BIOAIR)
- Φυγόκεντρος Universal 320R, Hettich Zentrifugen
- Αποστειρωμένες φιάλες 500mL (VWR)
- Φίλτρα οπών 0,22 μm (Greiner Bio One)

- Κρυοφιαλίδια (Greiner Bio One)
- Κρυοπροστατευτικό μέσο: 45% θρεπτικό μέσο από το υπερκείμενο των κυττάρων, 45% SF900II SFM, 10% DMSO

Τα κύτταρα καλλιεργούνται μέχρι να φτάσουν σε συγκέντρωση $2-3 \times 10^6$ κύτταρα/mL δηλαδή στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης. Η καλλιέργεια φυγοκεντρείται στα 500g για 10min. Λαμβάνεται μέρος από το υπερκείμενο για την παρασκευή του κρυοπροστατευτικού μέσου, το οποίο φιλτράρεται υπό ασηπτικές συνθήκες και τοποθετείται σε πάγο. Τα κύτταρα αναδιασπείρονται σε κατάλληλο όγκο κρυοπροστατευτικού μέσου ώστε να έχουν συγκέντρωση 10^7 κύτταρα/mL. Οι αμπούλες με τα κύτταρα (1mL) τοποθετούνται για 24h στους -80°C και στη συνέχεια σε υγρό άζωτο.

2.4 Απόψυξη κυττάρων από υγρό άζωτο

Κύτταρα Sf9

- Απαγωγός κάθετης νηματικής ροής (BIOAIR)
- Επωαστικός κλίβανος (Heal Force)
- Θρεπτικό μέσο SF900II SFM (Invitrogen)
- Αποστειρωμένες πιπέτες μιας χρήσης (Greiner Bio One)
- Αποστειρωμένες πλάκες T25 (Greiner Bio One)
- Αιθανόλη 70%

Το θρεπτικό μέσο προθερμαίνεται σε θερμοκρασία δωματίου. Η αμπούλα με τα κύτταρα τοποθετείται σε υδρόλουτρο (25°C) μέχρι να υγροποιηθούν τα κύτταρα και στη συνέχεια απολυμαίνεται με EtOH 70% και τοποθετείται στον απαγωγό. Τα κύτταρα μεταφέρονται σε σωλήνα τύπου falcon των 50mL και προστίθενται στάγδην 10mL θρεπτικού μέσου. Τα κύτταρα αναδιασπείρονται ελαφρά και μεταφέρονται σε 2 πλάκες T25. Τοποθετούνται σε επωαστικό θάλαμο μέχρι να προσκολληθούν στην πλάκα (30-60min) και όχι για περισσότερο από 2 ώρες καθώς το DMSO που περιέχει το κρυοπροστατευτικό μέσο είναι επιβλαβές για τα κύτταρα. Το θρεπτικό μέσο αντικαθίσταται με φρέσκο και η καλλιέργεια επωάζεται στους 27°C.

Κύτταρα Hi5

- Απαγωγός κάθετης νηματικής ροής (BIOAIR)
- Επωαστικός κλίβανος με σύστημα ανάδευσης (LabTech)
- Φυγόκεντρος Universal 320R, Hettich Zentrifugen
- Θρεπτικό μέσο SF900II SFM (Invitrogen)
- Αποστειρωμένες πιπέτες μιας χρήσης (Greiner Bio One)
- Αποστειρωμένες φιάλες 125mL (VWR)
- Αιθανόλη 70%

Το θρεπτικό μέσο προθερμαίνεται σε θερμοκρασία δωματίου. Η αμπούλα με τα κύτταρα τοποθετείται σε υδρόλουτρο (25°C) μέχρι να υγροποιηθούν τα κύτταρα και στη συνέχεια απολυμαίνεται με EtOH 70% και τοποθετείται στον απαγωγό. Τα κύτταρα μεταφέρονται σε σωλήνα τύπου falcon των 50mL που περιέχει 10mL θρεπτικού μέσου και φυγοκεντρώνονται στα 500g για 10min. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και τα κύτταρα επαναδιασπείρονται σε 20mL φρέσκου θρεπτικού μέσου. Στη συνέχεια μεταφέρονται σε αποστειρωμένη

φιάλη των 125mL και τοποθετούνται σε επωαστικό θάλαμο στους 27°C υπό ανάδευση (125 rpm).

2.5 Επιδεκτικά (competent) κύτταρα *E.coli* DH10Bac

- Κύτταρα *E.coli* DH10Bac (Invitrogen)
- Αποστειρωμένο θρεπτικό μέσο LB
- Επωαστικός κλίβανος με σύστημα ανάδευσης (LabTech)
- Αυτόκαυστο
- Αποστειρωμένη γλυκερόλη (Applichem)
- Διάλυμα 100mM CaCl₂, 20mM Tris pH 8,0 (Παρασκευάζεται φρέσκο και αποστειρώνεται)
- Διάλυμα 100mM CaCl₂, 20mM Tris pH 8,0, 15% γλυκερόλη v/v (Παρασκευάζεται φρέσκο και αποστειρώνεται)
- Φυγόκεντρος Universal 320R, Hettich Zentrifugen
- Φασματοφωτόμετρο UV-1800, SHIMADZU

Λαμβάνεται μικρή ποσότητα κυττάρων *E.coli* DH10Bac, με τη βοήθεια αποστειρωμένου μεταλλικού βρόχου, και μεταφέρεται παρουσία φλόγας σε σωλήνα τύπου falcon των 15mL που περιέχει 4mL στείρο διάλυμα LB. Η καλλιέργεια επωάζεται (πώμα χαλαρά βιδωμένο) overnight στους 37°C υπό ανάδευση στα 200 rpm. Την επόμενη μέρα, 2 mL καλλιέργειας μεταφέρονται σε φιάλη του 1L που περιέχει 198mL αποστειρωμένο LB (αραίωση 1:100), η οποία τοποθετείται στους 37°C υπό ανάδευση (200 rpm) για τουλάχιστον 2h. Τα κύτταρα αναπτύσσονται μέχρι η απορρόφηση της καλλιέργειας να έχει τιμή 0,6 στα 590nm. Η φιάλη τοποθετείται σε πάγο και το αιώρημα φυγοκεντρείται στα 2500 rpm για 20min στους 4°C. Αφαιρείται το υπερκείμενο και τα κύτταρα αναδιασπείρονται σε 100 mL αποστειρωμένου διαλύματος 100mM CaCl₂, 20mM Tris pH 8,0. Τα κύτταρα αφήνονται σε πάγο για 30min και ύστερα

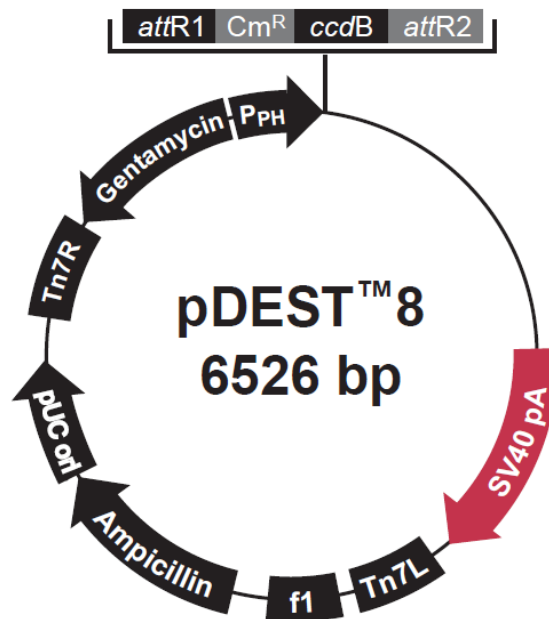
φυγοκεντρώνονται στα 2500 rpm για 20min στους 4°C. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα των κυττάρων επαναδιασπείρεται σε 2mL αποστειρωμένου διαλύματος 100mM CaCl₂, 20mM Tris pH 8.0, 15% γλυκερόλη το οποίο έχει προψυχθεί. Το αιώρημα των κυττάρων χωρίζεται σε κλάσματα των 50μL σε σωλήνες τύπου erpendorf των 1.5mL. Οι σωλήνες ψύχονται αμέσως σε υγρό άζωτο και αποθηκεύονται στους -80°C για μακροχρόνια συντήρηση.

2.6 Μετασχηματισμός (transformation) επιδεκτικών κυττάρων E.coli DH10Bac για παραγωγή βακμιδιακού DNA

- Επιδεκτικά κύτταρα E.coli DH10Bac (Invitrogen)
- Πλασμίδια ERAP1: pDEST8 ERAP1 (Προσφορά του εργαστηρίου του Dr Akira Hattori, Πανεπιστήμιο του Κιότο, Κιότο, Ιαπωνία)
- Θρεπτικό μέσο SOC
- Αποστειρωμένο θρεπτικό μέσο LB
- Αποστειρωμένο θρεπτικό μέσο LB-άγαρ
- 100mg/mL καναμυκίνη (Applichem)
- 20mg/mL γενταμυκίνη (Applichem)
- 10mg/mL τετρακυκλίνη (Applichem)
- 2% X-gal (Applichem)
- 100mM IPTG (Applichem)
- Αυτόκαυστο
- Επωαστικός κλίβανος (LabTech)
- Επωαστικός κλίβανος με σύστημα ανάδευσης (LabTech)
- Θερμαντική πλάκα (Labnet)
- Αποστειρωμένα τρυβλία Petri διαμέτρου 6cm (Greiner Bio One)

Αρχή της μεθόδου

Το πλασμίδιο-φορέας του γονιδίου της ανθρώπινης ανασυνδυασμένης ERAP1, είτε στην αγρίου τύπου μορφή είτε με σημειακές μεταλλάξεις, είναι το ρDEST8 το οποίο φέρει επιπλέον γονίδιο ανθεκτικότητας στην γενταμικίνη καθώς και τα μεταθετά στοιχεία Tn7. Ο φορέας ρDEST8 εισέρχεται μέσα σε κύτταρα *E.coli* διεσπαρμένα σε διάλυμα CaCl_2 . Το ασβέστιο επιτρέπει την είσοδο του πλασμιδιακού DNA μέσα από την πλασματική μεμβράνη μετά από επώαση των βακτηρίων και του πλασμιδίου για μικρό χρονικό διάστημα στους 42°C (heat shock). Τα κύτταρα *E.coli* της σειράς DH10Bac έχουν ενσωματωμένο τον φορέα του βακίλοϊού ο οποίος έχει γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμικίνη, καθώς και ένα τμήμα DNA που κωδικοποιεί το LacZα. Μέσα σε αυτή την περιοχή υπάρχει το στοιχείο miniatt Tn7 που είναι θέση ανασυνδυασμού των βακτηριακών μεταθετών στοιχείων Tn7. Ενσωμάτωση του miniatt Tn7 δεν διαταράσσει το αναγνωστικό πλαίσιο του LacZα. Επιπλέον τα DH10Bac περιέχουν ένα βοηθητικό πλασμίδιο το οποίο, εκτός από γονίδιο ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη, κωδικοποιεί την τρανσποζάση που θα καταλύσει τον ανασυνδυασμό. Επιτυχημένος ανασυνδυασμός θα διαταράξει την έκφραση του LacZα, κάτι που προσδιορίζεται με καλλιέργεια των κυττάρων παρουσία IPTG και X-gal. Το IPTG είναι ένα μη αποικοδομήσιμο ανάλογο της λακτόζης που απενεργοποιεί τον καταστολέα του LacZα και έτσι επάγει την μεταγραφή του (Barkley and Bourgeois 1978). Όταν εκφράζεται το LacZα παρουσία X-gal (χρωμογενές υπόστρωμα) οδηγεί στο σχηματισμό αδιάλυτης μπλε ένωσης (Horwitz et al. 1964) με αποτέλεσμα οι αποικίες να βάφονται μπλε. Έτσι μπορούν να διαχωριστούν οι αποικίες στις οποίες έχει επιτευχθεί η μετάθεση.



Σχήμα 5: Πλασμίδιο pDEST8 που φέρει το γονίδιο της ERAP1
 (<http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/11804010>)

Πειραματική πορεία

Αποψύχονται σε πάγο αμπούλες με 50 μ L επιδεκτικά κύτταρα *E.coli* DH10Bac ειδικά για την παραγωγή βακμιδιακού DNA. Στα βακτηριακά κύτταρα προστίθενται 20 ng από τα πλασμίδια και γίνεται ήπια αναδιασπορά για να μην καταστραφεί το πλασμιδιακό DNA. Τα κύτταρα αφήνονται για 30 min σε πάγο, στη συνέχεια επωάζονται για 45 sec στους 42°C χωρίς ανάδευση (heat shock) και ύστερα μεταφέρονται αμέσως για 2 min σε πάγο. Προστίθενται 180 μ L θρεπτικού μέσου SOC και τα κύτταρα επωάζονται στους 37°C υπό ανάδευση (200 rpm) για 4 h. Με το πέρας των 4h, 70 μ L από τα βακτηριακά κύτταρα απλώνονται σε τρυβλία LB-άγαρ 6 mm τα οποία περιέχουν 50 μ g/mL καναμυκίνη, 7 μ g/mL γενταμυκίνη, 10 μ g/mL τετρακυκλίνη, 0.02% X-gal και 40 μ g/mL IPTG. Οι καλλιέργειες επωάζονται στους 37°C για 48 h. Κατόπιν, επιλέγονται 2 λευκές αποικίες από κάθε καλλιέργεια και αναδιασπείρονται σε νέα τρυβλία προκειμένου να

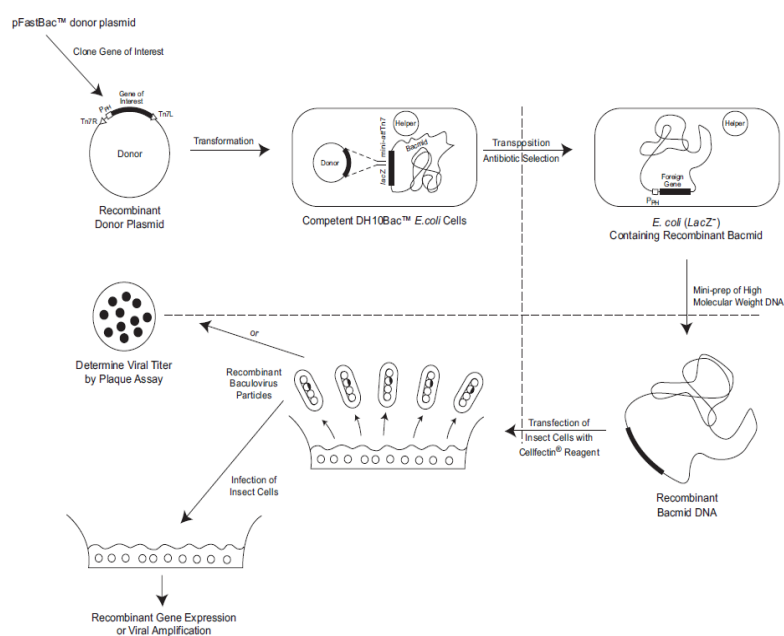
επιβεβαιωθεί ο λευκός φαινότυπος των αποικιών. Οι καλλιέργειες επωάζονται στους 37°C overnight. Από μια αποικία με λευκό φαινότυπο εκκινείται υγρή καλλιέργεια σε 3 mL LB που περιέχει 50 µg/mL καναμικίνη. Οι καλλιέργειες επωάζονται για 6-7 h στους 37°C στα 200 rpm. Στη συνέχεια 1 mL από κάθε καλλιέργεια μεταφέρεται σε 40 mL LB το οποίο περιέχει 50 µg/mL καναμικίνη και οι νέες καλλιέργειες επωάζονται στους 37°C στα 200 rpm overnight.

2.7 Απομόνωση βακμιδιακού DNA

- Διάλυμα A: σακχαρόζη 8%, 100mM Tris pH 8,0, 10mM EDTA pH 8,0, 50µg/mL λυσοζύμη, 10µg/mL RNAση. Η λυσοζύμη και η RNAση προστίθενται πριν τη χρήση
- Διάλυμα B: 1% SDS σε TE (5mL SDS 10%, 625µL 0,8M Tris pH 8,0 και 125µL 0,4M EDTA pH 8,0. Το διάλυμα συμπληρώνεται ως τα 50 mL με H₂O)
- Διάλυμα CH₃COOK 5M
- Απόλυτη ισοπροπανόλη (Sigma-Aldrich)
- Αιθανόλη 70%
- Διάλυμα TE: 10mM Tris pH 8,0, 1mM EDTA pH 8,0
- Φυγόκεντρος Universal 320R, Hettich Zentrifugen
- Φυγόκεντρος Heraeus Fresco 17 Centrifuge, Thermo Electron Corporation
- Επωαστικός κλίβανος

Μεταφέρονται 9mL από κάθε καλλιέργεια σε σωλήνες τύπου falcon των 15mL και φυγοκεντρούνται στα 5000 rpm για 20min. Τα υπόλοιπα 31mL φυγοκεντρούνται και αυτά στις ίδιες συνθήκες και φυλάσσονται στους -20°C μέχρι να ολοκληρωθεί η διαδικασία. Απορρίπτεται το υπερκείμενο και προστίθενται 1200µL διαλύματος A. Το μίγμα μεταφέρεται σε σωλήνες τύπου

erpendorf των 1,5mL και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10min. Στη συνέχεια προστίθενται 200 μL διαλύματος B και ακολουθεί επώαση στους 37°C για 10min. Κατόπιν προστίθενται 200μL διαλύματος CH₃COOK 5M και το μίγμα αφήνεται σε πάγο για 30min. Μετά από φυγοκέντρηση στα 12000 rpm για 15min στους 4°C παραλαμβάνεται το υπερκείμενο με προσοχή ώστε να μην ληφθεί ποσότητα ιζήματος το οποίο περιέχει πρωτεΐνες και το γενωμικό DNA της *E.coli*. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε σωλήνα τύπου erpendorf των 1,5mL που περιέχει 800μL απόλυτης ισοπροπανόλης και φυγοκεντρείται στα 12000 rpm για 10min στους 4°C ώστε το DNA να καταβυθιστεί. Με προσοχή απορρίπτεται το υπερκείμενο και προστίθενται 500μL 70% αιθανόλης. Οι σωλήνες αναδεύονται ήπια για να ξεπλυθεί το ίζημα και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10min στα 12000 rpm στους 4°C. Το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει σε απαγωγό και διαλυτοποιείται σε 50μL διαλύματος TE pH 8,0. Για καλύτερη διαλυτοποίηση τα σωληνάκια περιστρέφονται overnight. Το βακμιδιακό DNA φυλάσσεται στους -20°C. Η ύπαρξη βακμιδιακού DNA διαπιστώνεται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης όπου επιβεβαιώνεται η ύπαρξη ζώνης σε μεγάλο μοριακό βάρος.

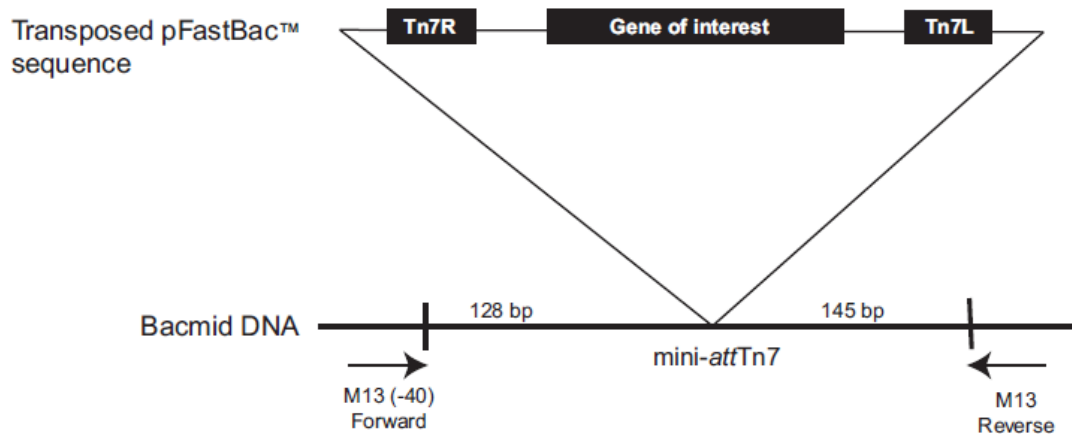


Σχήμα 6: Σχηματικό διάγραμμα πορείας παρασκευής του βακιλοϊού από το αρχικό πλασμίδιο (http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/bactobac_man.pdf)

2.8 Επιβεβαίωση ανασυνδυασμού με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

- Συσκευή PCR (Biometra)
- Taq PCR kit (neb)
- Εκκινητής M13 πρόσθιος (-40) (5'd[GTTTTCCCAGTCACGAC]3')
- Εκκινητής M13 ανάστροφος (5'd[CAGGAAACAGCTATGAC]3')

Για την επιβεβαίωση του ανασυνδυασμού του επιθυμητού γονιδίου στο βακμιδιακό DNA πραγματοποιείται αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιώντας εκκινητές που υβριδοποιούνται εκατέρωθεν αυτού στις περιοχές που φαίνονται στο σχήμα 8. Σε κάθε αντίδραση αναμιγνύονται 100ng βακμιδιακού DNA, 5μL διάλυμα PCR 10X, 1μL dNTPs 10mM, 1,25μL ευθύ εκκινητή M13 (-40) 10μM, 1,25μL ανάστροφου εκκινητή M13 10μM και 0,5μL Taq πολυμεράση. Προστίθεται αποστειρωμένο νερό μέχρι 50μL τελικό όγκο. Η επιθυμητή περιοχή πολλαπλασιάζεται με αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 5min και στη συνέχεια για 30 κύκλους πραγματοποιείται αποδιάταξη για 45sec στους 94°C, υβριδοποίηση για 45sec στους 62°C και επιμήκυνση για 5min στους 72°C. Η τελική επιμήκυνση πραγματοποιείται στους 72°C για 7min και στη συνέχεια οι αντιδράσεις ψύχονται στους 4°C. Η ανάλυση των δειγμάτων γίνεται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1%. Στο ηλεκτροφόρημα αναμένεται ζώνη DNA στα 5000 bp.



Σχήμα 7: Θέσεις υβριδοποίησης των primers στο βακμιδιακό DNA εκατέρωθεν του σημείου του ανασυνδυασμού
(http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/bactobac_man.pdf)

2.9 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης

- Συσκευή ηλεκτροφόρησης (Biorad)
- Αγαρόζη (Applichem)
- Διάλυμα 0,8mM Tris, 0,4mM CH₃COOH, 0,02mM EDTA (TAE)
- Βρωμιούχο αιθίδιο 1% (Applichem)
- Δείκτης μοριακών βαρών DNA 1kb (neb)
- Διάλυμα φόρτωσης δειγμάτων 6X (Fermentas)

Σε κωνική φιάλη μεταφέρονται 70mL διαλύματος TAE και 0,7g αγαρόζης ώστε να έχουμε πηκτή αγαρόζης 1%. Η αγαρόζη διαλύεται σε φούρνο μικροκυμάτων και αφού κρυώσει προστίθενται 5μL βρωμιούχου αιθιδίου 1%. Το διάλυμα αναδεύεται ελαφρά και μεταφέρεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης με προσοχή ώστε να μην δημιουργηθούν φυσαλίδες. Όταν στερεοποιηθεί η πηκτή αφαιρείται το ειδικό κτενάκι και φορτώνονται τα

δείγματα τα οποία περιέχουν χρωστική σε αναλογία 1:5. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 100V μέχρι οι ζώνες να αναλυθούν ικανοποιητικά.

2.10 Επιμόλυνση (transfection) κυττάρων Sf9 με βακμιδιακό DNA για παραγωγή βακιλοϊού (P0)

- Απαγωγός κάθετης νηματικής ροής (BIOAIR)
- Επωαστικός κλίβανος (Heal Force)
- Φυγόκεντρος
- Θρεπτικό μέσο SF900II SFM (Invitrogen)
- Θρεπτικό μέσο IPL41 basal (Invitrogen)
- Cellfectin (Invitrogen)
- Γενταμικίνη 20mg/mL (Applichem)
- Αποστειρωμένη πλάκα έξι θέσεων (Greiner Bio One)
- Φίλτρα οπών 0,22 μm (Greiner Bio One)

Σε μια πλάκα T25 όπου καλλιεργούνται κύτταρα Sf9 αφαιρείται το θρεπτικό μέσο και μεταφέρονται 15mL φρέσκου θρεπτικού μέσου SF900II SFM όταν τα κύτταρα καλύψουν το 90-95% της πλάκας. Χτυπώντας την πλάκα τα κύτταρα αποκολλώνται και 2mL από το αιώρημα μεταφέρονται σε κάθε πηγάδι έτσι ώστε την επόμενη μέρα που θα πραγματοποιηθεί η επιμόλυνση το καθένα από αυτά να έχει περίπου 2×10^6 κύτταρα. Σε σωλήνα τύπου falcon των 15mL αραιώνονται 15μL cellfectin σε 250μL θρεπτικού μέσου IPL41 basal για κάθε δείγμα και αναδεύονται ελαφρά (vortex). Το cellfectin επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 30-45min. Παράλληλα αφαιρείται το θρεπτικό μέσο από τα κύτταρα και προστίθεται 1mL θρεπτικού μέσου IPL41 basal. Η έκπλυση των κυττάρων επαναλαμβάνεται άλλη μια φορά ώστε να απομακρυνθούν πρωτεΐνες που μπορεί να υπάρχουν στο θρεπτικό μέσο και πιθανώς να παρεμποδίσουν την επιμόλυνση. Σε 250μL IPL41 basal

προστίθενται 5μg βακμιδιακού DNA, αναδεύονται ελαφρά (vortex) και αφήνονται σε πάγο. Όταν περάσουν τα 45min αναμιγνύονται το διάλυμα του DNA και του cellfectin αναδεύονται ελαφρά και αφήνονται για 15min σε πάγο. Στη συνέχεια αφαιρείται το θρεπτικό μέσο από τα κύτταρα και προστίθεται το διάλυμα επιμόλυνσης. Τα κύτταρα επωάζονται στους 27°C για 4-6h. Με το πέρας των 6h αφαιρείται το διάλυμα επιμόλυνσης και προστίθενται 2mL θρεπτικού μέσου SF900II SFM που περιέχει 50μg/mL γενταμικίνη. Η πλάκα ανακινείται ελαφρά, τυλίγεται με διάφανη μεμβράνη και τοποθετείται σε επωαστικό κλίβανο στους 27°C. Μετά από 48h ελέγχονται τα κύτταρα για σημάδια επιμόλυνσης και αν έχουν πολλαπλασιαστεί μεταφέρονται σε πλάκες T25. Ο βακιλοϊός συλλέγεται όταν είναι εμφανή τα σημάδια της επιμόλυνσης (τα κύτταρα έχουν λυθεί, επιπλέον, έχουν αλλοιωμένο σχήμα και είναι κοκκιώδη εσωτερικά) συνήθως μετά από 5-6 μέρες. Για τη συλλογή του βακιλοϊού το θρεπτικό μέσο μεταφέρεται σε σωλήνα τύπου falcon και φυγοκεντρείται στα 4500 rpm για 15min στους 4°C προκειμένου να καταβυθιστούν τα λυμένα κύτταρα. Το υπερκείμενο φιλτράρεται και φυλάσσεται στους 4°C.

2.11 Επιμόλυνση κυττάρων Sf9 για παραγωγή βακιλοϊού (P1)

- Απαγωγός κάθετης νηματικής ροής (BIOAIR)
- Επωαστικός κλίβανος (Heal Force)
- Φυγόκεντρος Universal 320R, Hettich Zentrifugen
- Θρεπτικό μέσο SF900II SFM (Invitrogen)
- Αποστειρωμένες πλάκες T75 (Greiner Bio One)
- Φίλτρα οπών 0,22 μm (Greiner Bio One)

Σε πλάκα T75 που αναπτύσσεται καλλιέργεια κυττάρων Sf9, όταν καλυφθεί κατά 60-70%, αφαιρείται το θρεπτικό μέσο και προστίθεται 0,5mL φρέσκου θρεπτικού μέσου και 0,5mL βακιλοϊού P0. Η καλλιέργεια επωάζεται για μια

ώρα στους 27°C. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα η πλάκα αναδεύεται ελαφρά ώστε το διάλυμα επιμόλυνσης να καλύψει όλη την επιφάνεια. Στη συνέχεια αφαιρείται το διάλυμα επιμόλυνσης και προστίθενται 20mL φρέσκου θρεπτικού μέσου. Ο βακίλλοιός συλλέγεται όπως περιγράφηκε παραπάνω, όταν τα σημάδια επιμόλυνσης είναι εμφανή (5-6 ημέρες μετά). Για μακροχρόνια συντήρηση ο βακίλλοιός φυλάσσεται στους -80°C.

2.12 Επιμόλυνση κυττάρων Hi5 για παραγωγή βακίλλοιού (P2)

- Απαγωγός κάθετης νηματικής ροής (BIOAIR)
- Επωαστικός κλίβανος με σύστημα ανάδευσης (LabTech)
- Φυγόκεντρος Universal 320R, Hettich Zentrifugen
- Θρεπτικό μέσο SF900II SFM (Invitrogen)
- Αποστειρωμένες φιάλες 500mL (VWR)
- Φίλτρα οπών 0,22 μm (Greiner Bio One)

Σε 50 mL καλλιέργεια κυττάρων Hi5 συγκέντρωσης 10^6 κύτταρα/mL προστίθεται βακίλλοιός (P1) σε αναλογία 1:50. Η καλλιέργεια επωάζεται στους 27°C υπό ανάδευση (125 rpm). Ο βακίλλοιός συλλέγεται όταν τα περισσότερα κύτταρα εμφανίζουν σημάδια επιμόλυνσης (5-6 ημέρες μετά), είναι δηλαδή διογκωμένα, αλλά δεν υπάρχουν πολλά νεκρά καθώς οι τοξίνες που απελευθερώνουν είναι επιβλαβείς για τα κύτταρα. Για τη συλλογή του βακίλλοιού, η καλλιέργεια μεταφέρεται σε σωλήνα τύπου falcon των 50mL και φυγοκεντρείται για 10min στα 1250 rpm. Το υπερκείμενο φιλτράρεται και αποθηκεύεται στους 4°C.

2.13 Επιμόλυνση κυττάρων Hi5 για παραγωγή ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης

- Απαγωγός κάθετης νηματικής ροής (BIOAIR)
- Επωαστικός κλίβανος με σύστημα ανάδευσης (LabTech)
- Αποστειρωμένες φιάλες 500mL (VWR)

Σε 50mL καλλιέργεια κυττάρων Hi5 τα οποία έχουν συγκέντρωση περίπου 1×10^6 κύτταρα/mL προστίθεται βακιλοϊός σε αναλογία 1:20. Η αναλογία αυτή επιλέγεται με βάση προηγούμενες δοκιμασίες παραγωγής πρωτεΐνης. Τα κύτταρα με το βακιλοϊό επωάζονται για 96h στους 27°C υπό ανάδευση (125 rpm).

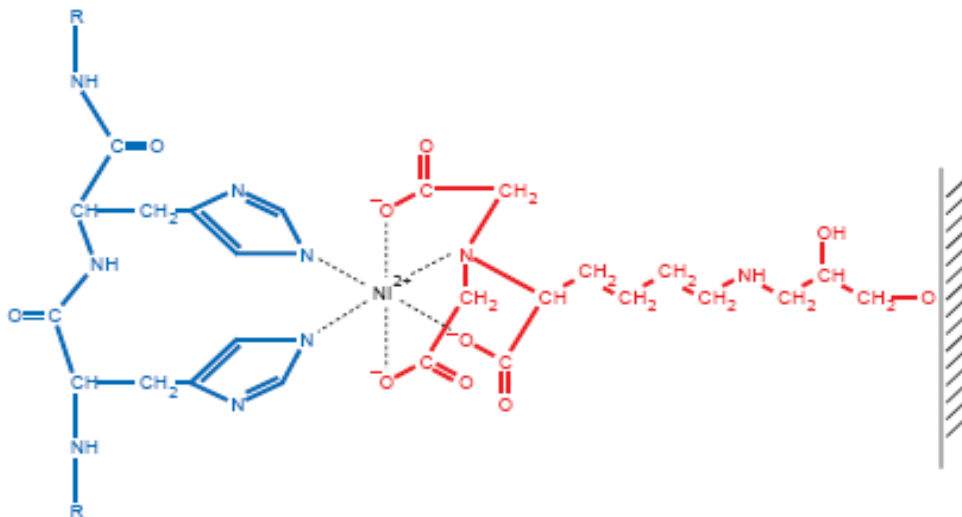
2.14 Έκφραση και καθαρισμός ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών από κύτταρα Hi5

- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου 500mM pH 8,0
- NaCl στερεό (Applichem)
- Διάλυμα NaCl 2M
- Διάλυμα ιμιδαζολίου 2M pH 8,0 (Applichem)
- Διαλύματα διαβαθμισμένης συγκέντρωσης ιμιδαζολίου: 50mM NaP pH 8,0, 300mM NaCl και 1,3,5,10,20,40,150,300mM ιμιδαζόλιο
- Ρυθμιστικό διάλυμα HEPES 1M pH 7.0 (Applichem)
- Στήλη συγγενείας ιόντων Ni²⁺NiNTA (Qiagen)
- Μembrάνες διαπίδυσης 12000 MWCO (Fisherbrand)
- Αναστολέας πρωτεασών PMSF 250mM

- Φυγόκεντρος Universal 320R, Hettich Zentrifugen
- Μαγνητικός αναδευτήρας (LabTech)

Αρχή της μεθόδου

Η ανθρώπινη ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη ERAP1 εκφράζεται σε κύτταρα εντόμων της σειράς Hi5 ειδικά για την παραγωγή πρωτεΐνης, με φορέα βακιλοϊό. Η πρωτεΐνη απομονώνεται και καθαρίζεται από το υπερκείμενο της καλλιέργειας καθώς στο N-τελικό άκρο του γονιδίου της περιέχει αλληλουχία που σηματοδοτεί την έκκριση της. Επίσης στο τέλος (C-τελικό άκρο) του γονιδίου της ERAP1 κωδικοποιείται μια ετικέτα έξι ιστιδινών (6His-tag). Οι ιστιδίνες στην πλευρική τους ομάδα έχουν έναν ιμιδαζολικό δακτύλιο ο οποίος προσδένεται εκλεκτικά σε δισθενή ιόντα νικελίου όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα. Έκλυση της στήλης χημικής συγγένειας Ni²⁺/NiNTA με διαλύματα αυξανόμενης συγκέντρωσης ιμιδαζολίου έχει ως αποτέλεσμα την αποδέσμευση της πρωτεΐνης από τη στήλη σε καθαρή μορφή.



Σχήμα 8: Στη στήλη NiNTA το Ni²⁺ είναι δεσμευμένο ομοιοπολικά σε ρητίνη αγαρόζης.

Η ουρά ιστιδινών της πρωτεΐνης δεσμεύεται από το Ni²⁺ και στη συνέχεια, με τη σταδιακή προσθήκη αυξανόμενων συγκεντρώσεων ιμιδαζολίου που ανταγωνίζεται τις ομάδες ιστιδίνης, η πρωτεΐνη ελευθερώνεται από τη στήλη

(<http://www.agr.kuleuven.ac.be/dp/logt/practicum2001/proef9.htm>)

Πειραματική πορεία

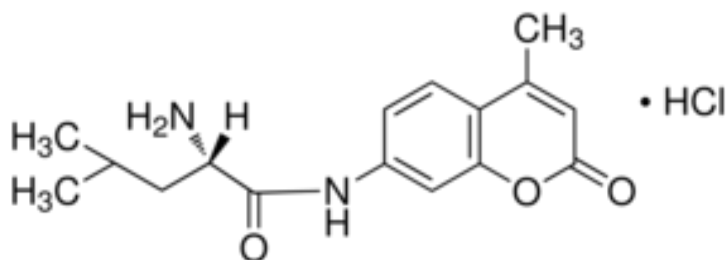
Λαμβάνεται δείγμα από την καλλιέργεια Hi5 96 ώρες μετά την επιμόλυνση προκειμένου να ελεγχθεί η έκβαση της επιμόλυνσης. Αν τα κύτταρα παρουσιάζουν έντονα σημάδια επιμόλυνσης από βακιλοΐο (είναι τα περισσότερα διογκωμένα ενώ υπάρχουν και κάποια νεκρά), η καλλιέργεια μεταφέρεται σε σωλήνα τύπου falcon των 50mL και φυγοκεντρείται για 15min στα 4500 rpm στους 4°C. Συλλέγεται το υπερκείμενο και επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρηση για 45min στις ίδιες συνθήκες. Το υπερκείμενο, αφού προστεθεί PMSF σε τελική συγκέντρωση 0,1mM, υποβάλλεται σε 4 διαπιδύσεις (τρεις ανά 2h και η τελευταία overnight) με ρυθμιστικό διάλυμα 10mM NaP pH 8,0, 100mM NaCl. Μετά τις διαπιδύσεις το διάλυμα της πρωτεΐνης προσαρμόζεται σε σύνθεση 50mM φωσφορικού νατρίου pH 8.0, 300mM NaCl 1mM ιμιδαζόλιο και αφού αναδευτεί ελαφρά φυγοκεντρείται στα 4500rpm για 15min στους 4°C. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε σωλήνα τύπου falcon των 50 mL ο οποίος περιέχει 0,5mL υλικού πλήρωσης στήλης Ni²⁺NiNTA εξισορροπημένης με το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα με την πρωτεΐνη. Το διάλυμα της πρωτεΐνης με τη στήλη αναδευτεί για 2h στους 4°C ώστε να προσδεθεί η πρωτεΐνη στη στήλη. Στη συνέχεια παραλαμβάνεται η στήλη με φυγοκέντρηση στα 500g για 5min στους 4°C. Η πρωτεΐνη εκλούεται περνώντας από τη στήλη σταδιακά διαλύματα ιμιδαζολίου συγκεντρώσεων 3,5,10,20,40,150 και 300mM ιμιδαζολίου. Η καθαρότητα της πρωτεΐνης ελέγχεται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE), ενώ μετράται και η δραστικότητα των κλασμάτων ως προς L-AMC (βλ. επόμενες παραγράφους). Τα καθαρά και δραστικά κλάσματα ενώνονται και υποβάλλονται σε διαπίδυση με ρυθμιστικό διάλυμα 10mM HEPES pH 7,0, 100mM NaCl overnight στους 4°C. Στο τελικό διάλυμα της πρωτεΐνης προστίθεται γλυκερόλη 10% και αφού χωριστεί σε πολλά κλάσματα φυλάσσεται στους -80°C. Η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών γίνεται με SDS-PAGE, χρησιμοποιώντας διάλυμα πρωτεΐνης γνωστής συγκέντρωσης. Για την ποσοτικοποίηση των διαφόρων προτύπων και του άγνωστου δείγματος χρησιμοποιείται το πρόγραμμα ImageJ.

2.15 Μέτρηση ενζυμικής δραστηριότητας των ανασυνδυσασμένων πρωτεϊνών ERAP1

- Φθορίζον υπόστρωμα: L- λευκίνο-7-αμινο-4-μεθυλοκουμαρίνη (L-AMC) 50mM (Sigma)
- Ρυθμιστικό διάλυμα 50mM HEPES pH 7,0, 100mM NaCl
- Μικροπλάκες 96 πηγαδιών για φθορισμομετρία (Sigma)
- Φθορισμόμετρο Quantamaster™ 4 (Photon Technology International)

Αρχή της μεθόδου

Η δραστηριότητα των ανασυνδυσασμένων πρωτεϊνών ελέγχεται σύμφωνα με την ικανότητα υδρόλυσης ενός μικρού, μη φυσικού, φθορίζοντος υποστρώματος κατάλληλο για την ERAP1, του L-AMC. Με αποικοδόμηση του ψευδοπεπτιδικού δεσμού από την ERAP1 το προϊόν εκπέμπει φθορισμό στα 460nm ο οποίος ανιχνεύεται μετά από διέγερση στα 380nm.



Σχήμα 9: L- λευκίνο-7-αμινο-4-μεθυλοκουμαρίνη (L-AMC)

(<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/61888?lang=en®ion=GR>)

Πειραματική πορεία

Για την μέτρηση της δραστηριότητας της ERAP1 ως προς L-AMC αραιώνουμε με ρυθμιστικό διάλυμα 50mM HEPES pH 7,0, 100mM NaCl το L-AMC σε τελική συγκέντρωση 100μM. Σε κάθε πηγαδάκι μεταφέρουμε 150μL από το διάλυμα του υποστρώματος και προσθέτουμε 10μL από το ενζυμικό παρασκεύασμα. Η πλάκα μεταφέρεται άμεσα στο όργανο που ανιχνεύει τον φθορισμό και μετράται η κλίση της ευθείας “σήμα ανά δευτερόλεπτο”. Αν θέλουμε να υπολογίσουμε την ειδική δραστηριότητα του ενζύμου ως προς L-AMC, δηλαδή πόσα moles AMC παράγονται από ένα mole ενζύμου το δευτερόλεπτο, κατασκευάζουμε πρότυπη καμπύλη με μέτρηση του σήματος σε διάφορες συγκεντρώσεις AMC στις ίδιες συνθήκες.

2.16 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)

- Συσκευή ηλεκτροφόρησης
- Θερμαντική πλάκα (Labnet)
- Ακρυλαμίδιο 30% (Applichem)
- Διάλυμα Tris-HCl 1,5M pH 8.8
- Διάλυμα Tris-HCl 1M pH 6.8
- SDS 10%
- APS 10% (εκκινητής πολυμερισμού)
- TEMED (καταλύτης πολυμερισμού)
- Ισοπροπανόλη (Sigma-Aldrich)
- Πρότυπο διάλυμα πρωτεϊνών (Neb)
- Διάλυμα φόρτωσης δειγμάτων

- Διάλυμα ηλεκτροφόρησης

Αφού τοποθετηθούν τα τζάμια πάχους 1mm στη συσκευή της ηλεκτροφόρησης παρασκευάζεται η πηκτή διαχωρισμού ως εξής: Σε σωλήνα τύπου falcon των 15mL προστίθενται 2mL απιονισμένου H₂O (dH₂O), 1,65mL ακρυλαμιδίου, 1,25mL Tris-HCl 1.5M pH 8,8 και 50μL SDS 10% και αναδεύονται ισχυρά (vortex). Στη συνέχεια προστίθενται 200μL εκκινητή πολυμερισμού APS 10% και 4μL καταλύτη TEMED. Αφού αναδευτεί ισχυρά το μίγμα μεταφέρεται αμέσως μέσα στα τζάμια, προστίθεται 1mL ισοπροπανόλης και αφήνεται να πολυμεριστεί για 30min. Στη συνέχεια για την πηκτή επικάθησης αναμιγνύονται 1,7mL dH₂O, 415μL ακρυλαμιδίου, 315μL Tris-HCl 1M pH 6,8, 25μL SDS 10% και αναδεύονται ισχυρά. Έπειτα προστίθενται 100μL APS 10% και 5μL TEMED, αναδεύεται το μίγμα και μεταφέρεται στη συσκευή αφού πρώτα έχει αφαιρεθεί η ισοπροπανόλη. Αμέσως τοποθετούνται τα ειδικά χτενάκια και η πηκτή αφήνεται να πολυμεριστεί για 30min. Στα δείγματα της ηλεκτροφόρησης προστίθεται διάλυμα φόρτωσης δειγμάτων σε αναλογία 1:5 και τοποθετούνται στους 95°C για 5min προκειμένου να αποδιαταχθούν. Κατά την ηλεκτροφόρηση εφαρμόζεται αρχικά διαφορά δυναμικού στα 90V και όταν τα δείγματα εισέλθουν στην πηκτή διαχωρισμού αυξάνεται στα 110V. Η ηλεκτροφόρηση διακόπτεται όταν η χρωστική εξέλθει από την πηκτή.

2.17 Εμφάνιση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου με χρώση αργύρου

- Υπερκαθαρό H₂O (milliQ)
- Διάλυμα σταθεροποίησης (100mL): 52mL αιθανόλη 96%, 12mL οξικό οξύ, 38mL H₂O milliQ, 50μL φορμαλδεΐδη 37% v/v
- Διάλυμα έκπλυσης (50mL): 26mL αιθανόλη 96%, 24mL H₂O milliQ

- Διάλυμα ευαισθητοποίησης (50mL): 50mL H₂O milliQ, 8,3μL Na₂S₂O₃ 3M
- Διάλυμα χρώσης (50mL): 50mL H₂O milliQ, 0,1g AgNO₃ (s), 25μL φορμαλδεΰδη 37%
- Διάλυμα ανάπτυξης (100mL): 100mL H₂O milliQ, 3,2g Na₂CO₃, 50μL φορμαλδεΰδη 37%, 5μL Na₂S₂O₃ 3M

Αφαιρείται η πηκτή από τα τζάμια και μεταφέρεται σε δοχείο που περιέχει 50mL H₂O milliQ και ανακινείται για 30min. Απορρίπτεται το H₂O και αντικαθίσταται με 50mL διαλύματος σταθεροποίησης στο οποίο παραμένει η πηκτή για τουλάχιστον 10min. Στη συνέχεια αντικαθίσταται το διάλυμα σταθεροποίησης με διάλυμα έκπλυσης. Μετά από 5min απορρίπτεται, προστίθεται το διάλυμα ευαισθητοποίησης και ανακινείται για 2min. Αφού αφαιρεθεί το διάλυμα ευαισθητοποίησης η πηκτή εκπλένεται 3 φορές με H₂O milliQ για 1min. Έπειτα η πηκτή τοποθετείται σε διάλυμα χρώσης (4°C) και ανακινείται για 20min. Στη συνέχεια εκπλένεται 2 φορές με H₂O milliQ για 1 min και προστίθενται 50mL διαλύματος ανάπτυξης για 1min. Το διάλυμα ανάπτυξης αντικαθίσταται από 50mL φρέσκου και ανακινείται μέχρι να εμφανιστούν οι ζώνες των πρωτεϊνών αλλά όχι περισσότερο από 10min γιατί μπορεί οι ζώνες να κορεστούν. Για διακοπή της ανάπτυξης απορρίπτεται το διάλυμα ανάπτυξης και αντικαθίσταται με 50mL διαλύματος σταθεροποίησης, το οποίο ανακινείται για τουλάχιστον 10min. Τέλος η πηκτή εκπλένεται με H₂O milliQ. Τα διαλύματα ευαισθητοποίησης, χρώσης και ανάπτυξης παρασκευάζονται πριν τη χρήση.

2.18 Εμφάνιση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου με χρώση coomassie blue

- Διάλυμα coomassie blue (1L): 1g coomassie blue, 480mL μεθανόλη, 100mL οξικό οξύ, 420mL dH₂O
- Διάλυμα αποχρωματισμού (1L): 450mL μεθανόλη, 450mL dH₂O, 100mL οξικό οξύ

Αφαιρείται η πηκτή από τα τζάμια και μεταφέρεται σε δοχείο που περιέχει περίπου 50mL διαλύματος coomassie blue και ανακινείται για περίπου 20min. Απορρίπτεται το διάλυμα χρώσης και αντικαθίσταται με διάλυμα αποχρωματισμού το οποίο ανανεώνεται ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Όταν οι ζώνες των πρωτεϊνών είναι ευδιάκριτες η πηκτή μεταφέρεται σε dH₂O.

2.19 Αναγέννηση στήλης συγγενείας ιόντων Ni²⁺NiNTA

- Διάλυμα EDTA 0,1M
- Διάλυμα NiSO₄ 0,1M
- Αιθανόλη 20%

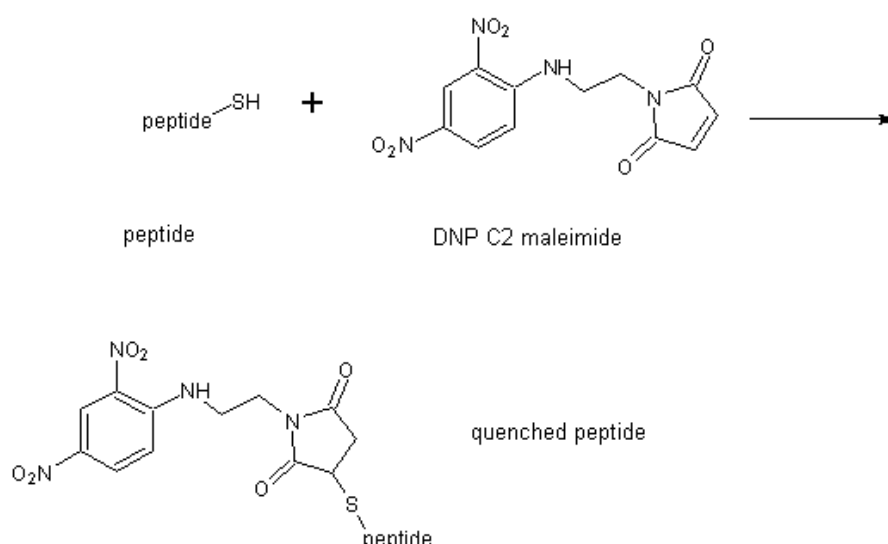
Το NiNTA πλένεται με 20 όγκους στήλης H₂O. Στη συνέχεια πλένεται με 2-3 όγκους στήλης διαλύματος EDTA 0.1M το οποίο θα απομακρύνει το Ni²⁺ από τη στήλη και ξανά με 20 όγκους H₂O, ώστε να απομακρυνθεί όλο το EDTA. Ακολουθεί πλύση με 2-3 όγκους στήλης διαλύματος NiSO₄ 0.1M και πάλι πλύση με 20 όγκους H₂O ώστε να απομακρυνθεί το Ni²⁺ που δεν έχει δεσμευτεί στη στήλη. Το Ni²⁺NiNTA αποθηκεύεται στους 4°C σε 20% αιθανόλη.

2.20 Επισήμανση του πεπτιδίου WRVYEKCALK με δινιτροφαινόλη

- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου 10mM pH 8,0
- Διάλυμα DTT 1M (Applichem)
- Πεπτίδιο WRVYEKCAKL 5mM (Genscript)
- DNP C2 μαλεϊμίδιο 50mM (Anaspec)

Αρχή της μεθόδου

Για την επισήμανση του πεπτιδίου με δινιτροφαινόλη (DNP) χρησιμοποιείται ως αντιδραστήριο επισήμανσης το DNP C2 μαλεϊμίδιο. Η αντίδραση του μαλεϊμιδίου με τη θειολική ομάδα της κυστεΐνης του πεπτιδίου είναι μια κλασική πυρηνόφιλη προσβολή. Το DTT χρησιμοποιείται ως αναγωγικό, για να διασπάσει τους δισουλφιδικούς δεσμούς που μπορεί να έχουν σχηματιστεί ανάμεσα στις κυστεΐνες των μορίων του πεπτιδίου. Χρησιμοποιείται περίσσεια μαλεϊμιδίου ώστε να αντιδράσουν όλες οι θειολικές ομάδες, τόσο του πεπτιδίου όσο και του DTT.



Σχήμα 10: Αντίδραση επισήμανσης του πεπτιδίου με το DNP C2 μαλεϊμίδιο [53]

Πειραματική πορεία

Παρασκευάζεται διάλυμα 200μM του πεπτιδίου (80μL από 5mM stock) σε συνολικό όγκο 1680μL ρυθμιστικού διαλύματος NaP. Στη συνέχεια, παρασκευάζεται φρέσκο διάλυμα DTT 10mM, από το οποίο προστίθενται 80μL στο διάλυμα του πεπτιδίου, ώστε η τελική συγκέντρωση του στο διάλυμα να είναι 400μM. Το διάλυμα αφήνεται για επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15min. Μετά, προστίθενται 160μL DNP C2 μαλεϊμιδίου 50mM, ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 4mM. Το διάλυμα επώαζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 1h. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης γίνεται ισχυρή ανάδευση του μίγματος (vortex) ανά 10min περίπου. Με το πέρας της αντίδρασης, το διάλυμα φυλάσσεται στους -20°C.

2.21 Καθαρισμός του επισημασμένου πεπτιδίου WRVYEKC*ALK

- HPLC (Millipore)
- Συσκευή υπερήχων (Elma)
- Ημιπαρασκευαστική στήλη C18 (YMC-Pack ODS-A) (Merck)
- Προστήλη (Merck)
- Τριφθοροξικό οξύ (TFA) (Applichen)
- Ακετονιτρίλιο (AcN) καθαρότητας HPLC (Sigma)

Το επισημασμένο πεπτίδιο καθαρίστηκε με HPLC ανάστροφης φάσης με ημιπαρασκευαστική στήλη C18. Οι δύο διαλύτες που θα χρησιμοποιηθούν για την έκλουση του πεπτιδίου απαερώνονται σε συσκευή υπερήχων για 10min. Η στήλη εξισορροπήθηκε με διάλυμα 0.05% TFA πριν την ένεση του δείγματος. Η έκλουση έγινε με γραμμική βαθμίδωση υπό ροή 2mL/min από 0,05% TFA σε 0,05% TFA, 50% AcN ενώ παρακολουθούταν η απορρόφηση στα 280nm (απορρόφηση θρυπτοφάνης) ή στα 340nm (απορρόφηση DNP

C2 μαλεϊμιδίου). Αρχικά, αναλύθηκαν 2 δείγματα όγκου 10μL το καθένα τα οποία αραιώθηκαν με 1mL 0,05% TFA. Το πρώτο δείγμα αναλύθηκε παρακολουθώντας την απορρόφηση στα 280nm και το δεύτερο παρακολουθώντας την απορρόφηση στα 340nm. Οι κοινές κορυφές των δύο χρωματογραφημάτων συλλέγονται και λυοφιλιώνονται.

2.22 Μέτρηση δραστηριότητας της ERAP1 για το πεπτίδιο WRVYEKC*ALK με ανίχνευση φθορισμού

- Ρυθμιστικό διάλυμα 50mM HEPES pH 7,0, 100mM NaCl
- Φθορισμόμετρο Quantamaster™ 4 (Photon Technology International)
- Μικροπλάκες 96 πηγαδιών για φθορισμομετρία (Sigma)

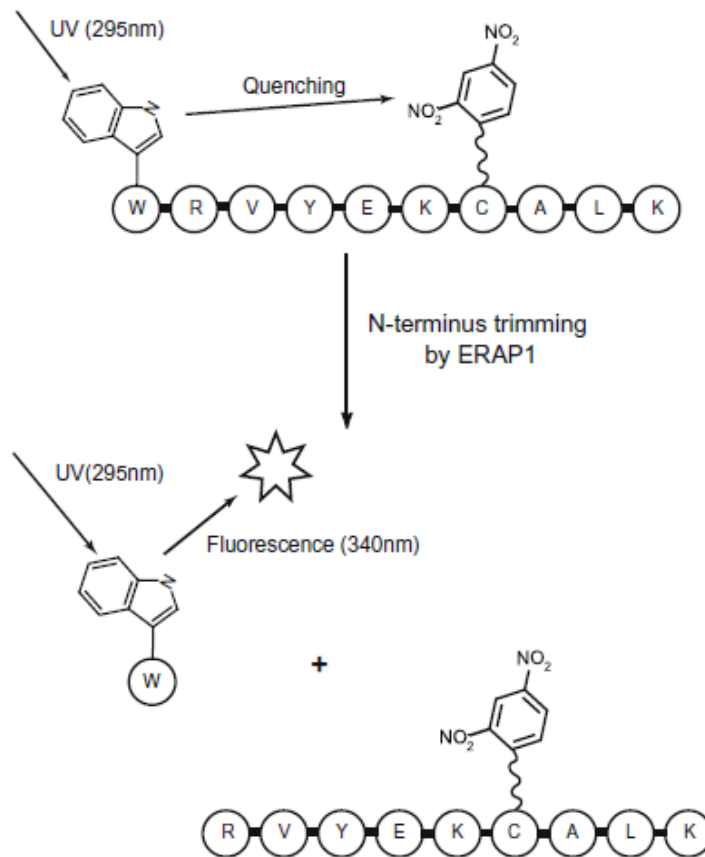
Αρχή της μεθόδου

Ο φθορισμός που εκπέμπει η θρυπτοφάνη του N-τελικού άκρου του επισημασμένου πεπτιδίου αποσβένει, λόγω της DNP ομάδας που είναι συνδεδεμένη στο κατάλοιπο της κυστεΐνης, 6 αμινοξικά κατάλοιπα μακριά. Η δινιτροφαινόλη απορροφά ακτινοβολία μήκους κύματος 340nm, ίδια με αυτή που εκπέμπει η θρυπτοφάνη. Αποικοδόμηση της θρυπτοφάνης λόγω της υδρολυτικής δράσης της ERAP1 έχει σαν αποτέλεσμα την ενίσχυση του φθορισμού στο διάλυμα στα 350nm μετά από διέγερση στα 295nm.

Πειραματική πορεία

Για την μέτρηση της δραστηριότητας της ERAP1 ως προς το φθορίζον πεπτίδιο, αραιώνουμε το φθορίζον πεπτίδιο σε τελική συγκέντρωση 2μM σε ρυθμιστικό διάλυμα 50mM HEPES pH 7,0, 100mM NaCl. Σε κάθε πηγαδάκι

μεταφέρουμε 150μL από το διάλυμα του υποστρώματος και στη συνέχεια προσθέτουμε ένζυμο σε τελική συγκέντρωση 20nM. Η πλάκα μεταφέρεται άμεσα στο όργανο που ανιχνεύει τον φθορισμό και λαμβάνεται η κλίση της ευθείας “σήμα ανά δευτερόλεπτο”.



Σχήμα 11: Αρχή μεθόδου για τη μέτρηση δραστηριότητας της ERAP1 με το φθορίζον πεπτιδίο WRVYEKC*ALK [53]

2.23 Καθαρισμός του πεπτιδίου LSIINFEKL

- HPLC (Millipore)
- Συσκευή υπερήχων (Elma)
- Ημιπαρασκευαστική στήλη C18 (YMC-Pack ODS-A)
- Προστήλη
- Τριφθοροξικό οξύ (TFA) (Applichem)
- Ακετονιτρίλιο (AcN) καθαρότητας HPLC (Sigma-Aldrich)
- Πεπτίδιο LSIINFEKL 4mg/mL καθαρότητας crude

Το πεπτίδιο LSIINFEKL καθαρίζεται με HPLC ανάστροφης φάσης σε ημιπαρασκευαστική στήλη C18. Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται για την έκλουση του πεπτιδίου από τη στήλη είναι: 0,05%TFA, 5% AcN (διαλύτης A) και 0,05% TFA, 50% AcN (διαλύτης B) οι οποίοι έχουν απαερωθεί για 10min σε υπερήχους. Η έκλουση έγινε με γραμμική βαθμίδα υπό ροή 2mL/min από 80% διαλύτη A και 20% διαλύτη B σε 20% διαλύτη A και 80% διαλύτη B. Η στήλη εξισορροπείται στις αρχικές συνθήκες. Δείγμα 2μL από το πεπτίδιο αραιώθηκε σε 200μL διαλύτη A και αναλύεται ενώ παρακολουθείται η απορρόφηση στα 220nm (απορρόφηση πεπτιδικού δεσμού). Συλλέγεται η κορυφή που εκλούεται στα 23.7min. Το κλάσμα λυοφιλιώνεται και διαλύεται σε H₂O. Η ποσοτικοποίηση του πεπτιδίου γίνεται με βάση την τιμή της απορρόφησης στα 214nm. Η συγκέντρωση του πεπτιδίου υπολογίζεται από τον νόμο Lambert-Beer $A = \epsilon \cdot c \cdot l$ όπου $\epsilon_{214nm} = 13053 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ για το συγκεκριμένο πεπτίδιο.

2.24 Αντιδράσεις ERAP1 με πεπτιδικά υποστρώματα

- Ρυθμιστικό διάλυμα 50mM HEPES pH 7,0, 100mM NaCl
- Τριφθοροξικό οξύ (TFA) (Applichem)

Για την πραγματοποίηση αντιδράσεων με την ERAP1 είτε στην αγρίου τύπου μορφή είτε σε αυτή με σημειακές μεταλλάξεις, αραιώνεται σε ρυθμιστικό διάλυμα μέρος από το πεπτιδίο μέχρι μια τελική συγκέντρωση συνήθως 20-50μM. Προστίθεται ποσότητα ενζύμου ανάλογα με το υπόστρωμα από 20-200nM. Ο όγκος της αντίδρασης είναι συνήθως 50-150μL. Οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται σε υδρόλουτρο ρυθμισμένο στους 37°C. Για τερματισμό των αντιδράσεων προστίθενται σε μίγμα της αντίδρασης 200μL TFA 0,2%. Το δείγμα μεταφέρεται άμεσα στους -20°C.

2.25 Ανάλυση αντιδράσεων με HPLC ανάστροφης φάσης

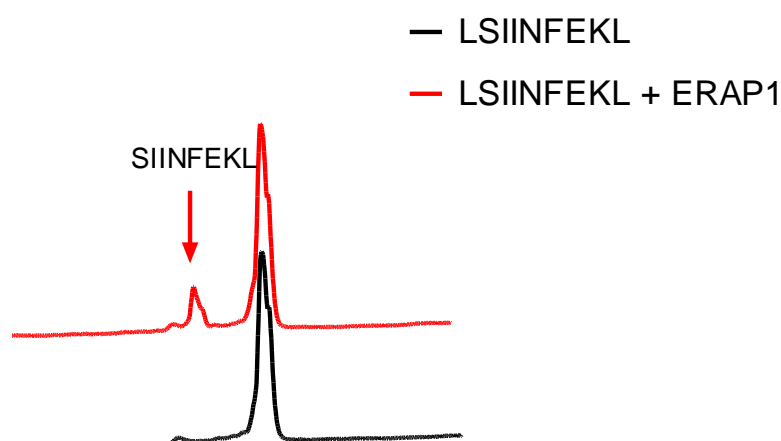
- HPLC (Millipore)
- Στήλη C18 (Merck)
- Ακετονιτρίλιο (AcN) καθαρότητας HPLC (Sigma-Aldrich)
- Τριφθοροξικό οξύ (TFA) (Applichem)

Αρχή της μεθόδου

Το προϊόν της αντίδρασης ενός πεπτιδίου με την ERAP1 προσδένεται λιγότερο ισχυρά σε στήλη C18 σε σχέση με το αρχικό υπόστρωμα λόγω μικρότερης υδροφοβικότητας. Με γραμμική μείωση της πολικότητας του διαλύτη κατά την έκλουση μπορεί να επιτευχθεί ικανοποιητικός διαχωρισμός του προϊόντος από το υπόστρωμα που έχει παραμείνει αναλλοίωτο. Λαμβάνοντας τιμή για το εμβαδό των κορυφών υπολογίζεται το ποσοστό του αρχικού υποστρώματος που δεν αποικοδομήθηκε και τελικά η ειδική δραστικότητα του ενζύμου για το εκάστοτε υπόστρωμα.

Πειραματική πορεία

Η στήλη C18 πλένεται με νερό και στη συνέχεια εξισορροπείται στις αρχικές συνθήκες όπου το μίγμα των διαλυτών έχει υψηλή πολικότητα (0-5% AcN). Ενίεται δείγμα της αντίδρασης στη στήλη και εκκινείται η έκλουση με γραμμική μείωση της πολικότητας των διαλυτών υπό ροή 2mL/min. Η διάρκεια της βαθμίδας είναι 12,10min. Λαμβάνεται το χρωματογράφημα το οποίο προκύπτει με παρακολούθηση της απορρόφησης στα 220 nm όπου και απορροφά ο πεπτιδικός δεσμός. Μετρείται το εμβαδό των κορυφών από το οποίο υπολογίζεται η ειδική δραστικότητα. Πριν την ανάλυση των αντιδράσεων αναλύεται και δείγμα από το αρχικό υπόστρωμα στις ίδιες συνθήκες έτσι ώστε να γνωρίζουμε το χρόνο έκλουσης του πεπτιδίου σε κάθε ξεχωριστή ανάλυση.



Σχήμα 12: Τυπικό χρωματογράφημα του πεπτιδίου LSIINFEKL μετά από επώαση με την ERAP1, όπου και εμφανίζεται μια κορυφή σε μικρότερο χρόνο έκλουσης σε σχέση με το αρχικό υπόστρωμα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

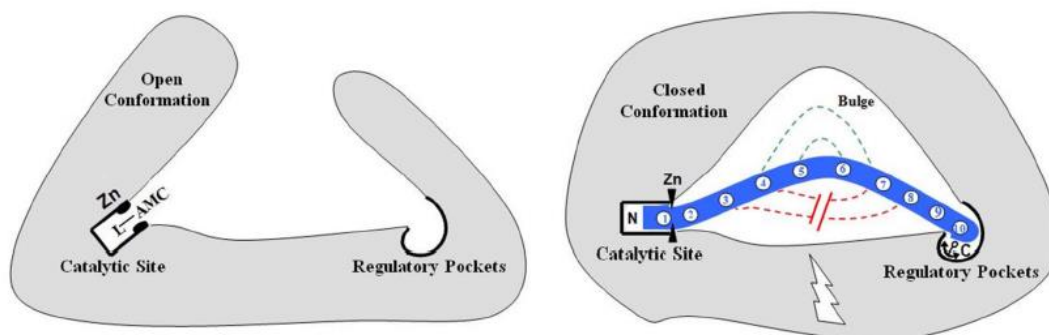
ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΜΙΝΟΠΕΠΤΙΔΑΣΗΣ ERAP1 R841A

3.1 Υπόθεση και στόχοι της μελέτης

Η αμινοπεπτιδάση ERAP1 προκειμένου να εκπληρώσει τον ιδιαίτερο ρόλο της στην αντιγονοπαρουσίαση έχει κάποια μοναδικά χαρακτηριστικά σε σχέση με άλλες αμινοπεπτιδάσες. Πειράματα έχουν δείξει ότι παρουσιάζει μεγάλη συγγένεια για υποστρώματα μεγαλύτερα των 9 αμινοξέων κάτι που την ξεχωρίζει ανάμεσα στα άλλα μέλη της οικογένειας M1 των αμινοπεπτιδασών, αλλά και από κυτοσολικές αμινοπεπτιδάσες όπως η αμινοπεπτιδάση λευκίνης (LAP). Επιπρόσθετες παρατηρήσεις που έδειχναν ότι η ERAP1 προτιμά υδρόφοβα αμινοξέα στο C-τελικό άκρο των υποστρωμάτων της αλλά και ότι μικρά πεπτίδια με αυτά τα χαρακτηριστικά τα οποία, ενώ θα έπρεπε να προκαλούν μερική αναστολή ενεργοποιούσαν το ένζυμο, οδήγησαν στο να προταθεί ένα μοντέλο για τον μηχανισμό δράσης της, το οποίο ονομάστηκε μηχανισμός του “μοριακού κανόνα” [50].

Ο συγκεκριμένος μηχανισμός προτείνει ότι για να εμφανίσει η ERAP1 υψηλή δραστηριότητα πρέπει να προσδέσει ισχυρά το C-τελικό άκρο του πεπτιδίου, κάτι που θα ενεργοποιήσει αλλοστερικά το ενεργό κέντρο. Για να συμβεί αυτή η ταυτόχρονη ενεργοποίηση πρέπει το υπόστρωμα να έχει ένα ελάχιστο μήκος 9-10 αμινοξέων έτσι ώστε να ταιριάζει στο θύλακα εξειδίκευσης του ενζύμου [50]. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 9, μικρά υποστρώματα δεν αλληλεπιδρούν με τη C-τελική περιοχή της ERAP1. Αντίθετα, ένα πεπτίδιο μεγάλου μήκους προσδέεται στην ρυθμιστική περιοχή της ERAP1 και έτσι ενεργοποιείται αλλοστερικά το ένζυμο. Αυτή η υπόθεση για το μήκος του υποστρώματος ενισχύθηκε από κρυσταλλογραφικά δεδομένα μιας ομάδας που κατάφερε να κρυσταλλώσει την C-τελική περιοχή του ενζύμου, τη φερόμενη ως ρυθμιστική, συνδεδεμένη με ένα ολιγοπεπτίδιο ιστιδινών. Πράγματι ο ψευδάργυρος απέχει από τη ρυθμιστική περιοχή 29Å, μήκος που

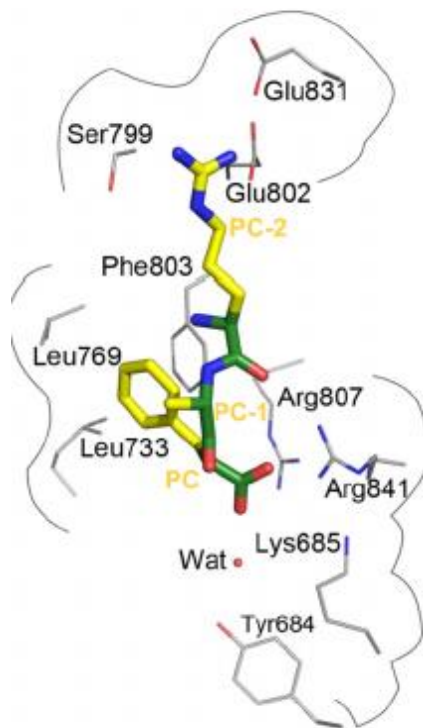
αντιστοιχεί σε πεπτιδίο με 9-10 αμινοξέα. Μια ανοιχτή κοιλότητα 30Å στη μέση του θύλακα επιτρέπει την αναδίπλωση μεγαλύτερων υποστρωμάτων [52].



Εικόνα 9: Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού του “μοριακού κανόνα”. Μικρά υποστρώματα, όπως το L-AMC, δεν προσδένονται στη ρυθμιστική περιοχή και δεν ενεργοποιούν αλλοστερικά το ένζυμο. Αντίθετα, πεπτιδία κατάλληλου μήκους αλληλεπιδρούν και με τις δύο περιοχές προσδίδοντας στο ERAP1 υψηλή δραστηριότητα [52]

Ένα από τα αμινοξέα της ρυθμιστικής περιοχής του ERAP1 που φαίνεται να αλληλεπιδρά με το C-τελικό άκρο του υποστρώματος είναι η αργινίνη στη θέση 841 (841R). Συγκεκριμένα προτείνεται ότι, καθώς αποτελεί συντηρημένο κατάλοιπο και στις ERAP2 και IRAP, δεν θα αλληλεπιδρά με πλευρικές ομάδες αμινοξέων για τα οποία έχουν διαφορετική προτίμηση οι τρεις αμινοπεπτιδάσες, αλλά πιθανώς με πιο σταθερές ομάδες του υποστρώματος. Μετά από μοντελοποίηση του τριπεπτιδίου RAF βασισμένη στην κρυσταλλική δομή φαίνεται ότι η 841R αλληλεπιδρά με το καρβοξύλιο στο C-τελικό άκρο του πεπτιδίου και με το καρβονύλιο του πεπτιδικού δεσμού δυο θέσεις πριν το C-τελικό άκρο [52].

Έχοντας υπόψη τα παραπάνω, αποφασίσαμε να μελετήσουμε εκτενέστερα την πιθανή συνεισφορά της 841R στην ειδική δραστηριότητα καθώς και στην επιλογή μήκους της ERAP1. Για να το πετύχουμε αυτό, εκφράσαμε ανασυνδυασμένη ERAP1 στην οποία η αργινίνη στη θέση 841 έχει αντικατασταθεί από αλανίνη (R841A). Στη συνέχεια συγκρίναμε την ειδική δραστηριότητα του ενζύμου που φέρει τη σημειακή μεταλλαγή με αυτή του αγρίου τύπου του ενζύμου χρησιμοποιώντας φθορισμομετρία και HPLC.

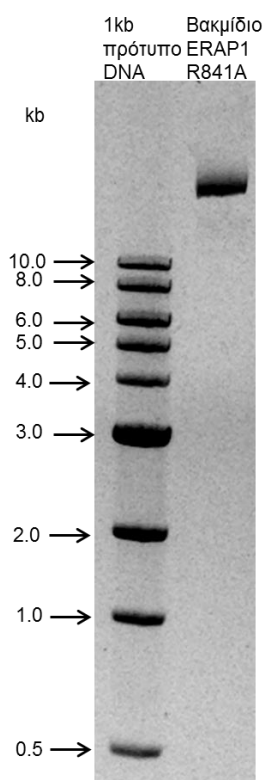


Εικόνα 10: Σχηματική αναπαράσταση του θύλακα ειδικότητας της ρυθμιστικής περιοχής της ERAP1 γύρω από το τριπεπτίδιο RAF όπου φαίνεται και η θέση της 841R σε αυτόν [52]

3.2 Αποτελέσματα

3.2.1 Μετασχηματισμός του πλασμιδίου pDEST8 ERAP1 R841A σε *E.coli* DH10Bac και απομόνωση βακμιδιακού DNA

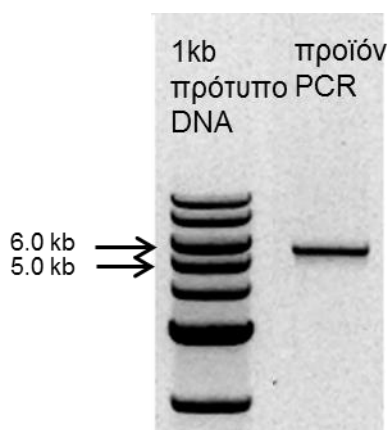
Σε 50μL επιδεκτικών κυττάρων *E.coli* DH10Bac μετασχηματίστηκαν 20ng πλασμιδιακού DNA στο οποίο έχει κλωνοποιηθεί το γονίδιο της ERAP1. Η σημειακή μετάλλαξη στη θέση 841 ώστε η αργινίνη να αντικατασταθεί από αλανίνη πραγματοποιήθηκε από τη Δρ. Ευνουχίδου με χρήση του QuickChange Site-Directed Mutagenesis kit της Stratagene. Μετά τον μετασχηματισμό επιλέχθηκαν δύο αποικίες με λευκό φαινότυπο και από αυτές απομονώθηκε το βακμιδιακό DNA. Η απομόνωση επιβεβαιώθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1%. Όπως φαίνεται στην εικόνα 11 εμφανίζεται ζώνη DNA μεγάλου μοριακού βάρους.



Εικόνα 11: Χαρακτηριστική εικόνα βακμιδιακού DNA σε πηκτή αγαρόζης 1% όπου εμφανίζεται μια χαρακτηριστική ζώνη σε μεγάλο μοριακό βάρος

3.2.2 Επιβεβαίωση του ανασυνδυασμού με PCR

Στο βακμιδιακό DNA που απομονώθηκε πραγματοποιήθηκε διαγνωστική PCR προκειμένου να επιβεβαιωθεί ο ανασυνδυασμός του επιθυμητού γονιδίου. Το προϊόν της PCR αναλύεται σε πηκτή αγαρόζης 1%, στην οποία εμφανίζεται ζώνη λίγο πάνω από τα 5kb (~2300 bp από το pDest8 + 3000 bp το μέγεθος του γονιδίου της ERAP1), όπως φαίνεται και στην εικόνα 12.



Εικόνα 12: Χαρακτηριστική εικόνα προϊόντος διαγνωστικής PCR για την επιβεβαίωση του ανασυνδυασμού σε πηκτή αγαρόζης 1%

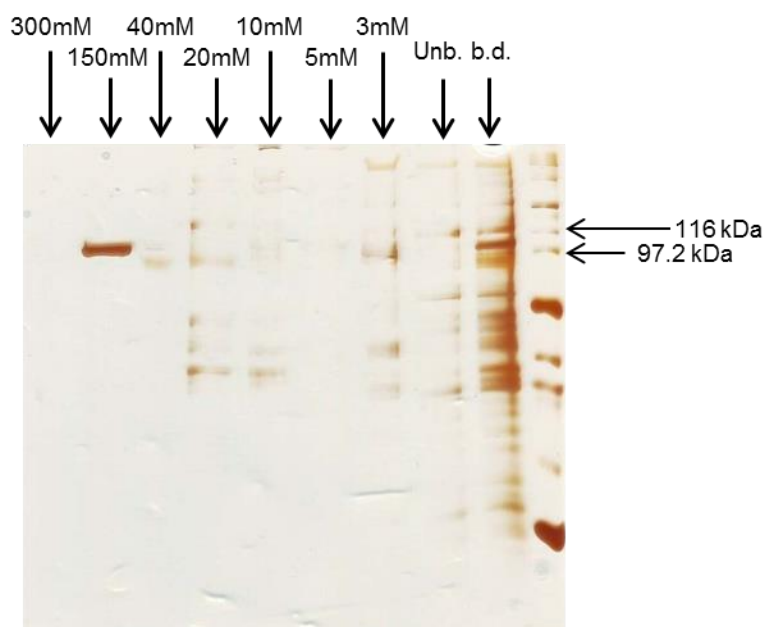
3.2.3 Παραγωγή βακιλοϊού από κύτταρα εντόμου

Στη συνέχεια, αφού επιβεβαιώθηκε ο ανασυνδυασμός του επιθυμητού γονιδίου, το βακμιδιακό DNA μετασχηματίστηκε σε κύτταρα εντόμου της σειράς Sf9, ώστε να πολλαπλασιαστεί ο ιός. Αφού ο ιός πολλαπλασιάστηκε εκ νέου σε κύτταρα της ίδιας σειράς (P1), αναγεννήθηκε και σε κύτταρα της Hi5 (P2) στα οποία θα γίνει η επιμόλυνση για την παραγωγή της πρωτεΐνης.

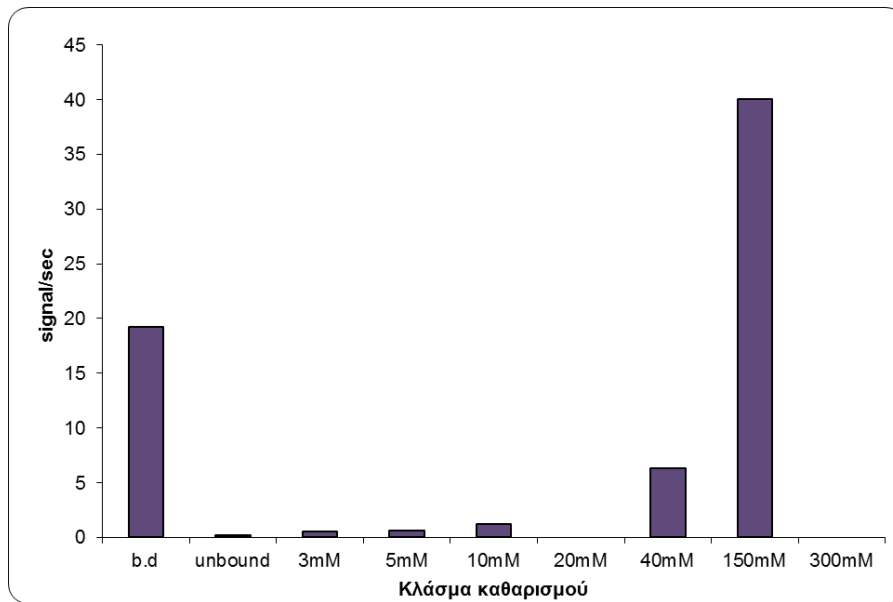
Παράλληλα σε κύτταρα Hi5 αναγεννήθηκε και ο βακίλοϊός που φέρει το γονίδιο της ERAP1 στην αγρίου τύπου μορφή.

3.2.4 Έκφραση και καθαρισμός των ανθρώπινων ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών ERAP1 WT και ERAP1 R841A

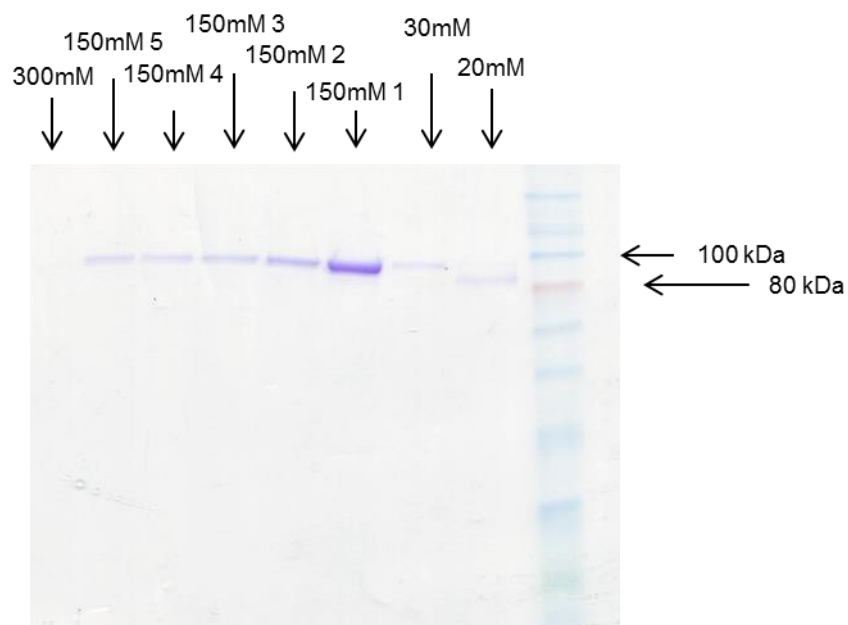
Σε κύτταρα της σειράς Hi5 πραγματοποιήθηκε επιμόλυνση με βακίλοϊούς (P2) για έκφραση των πρωτεϊνών ERAP1 WT και R841A. Ο καθαρισμός των ενζύμων επετεύχθη με χρωματογραφία χημικής συγγένειας σε στήλη NiNTA. Η καθαρότητα των πρωτεϊνών επιβεβαιώθηκε με SDS-PAGE όπως φαίνεται στις εικόνες 13 και 14, ενώ η δραστικότητα τους από την ικανότητα υδρόλυσης του L-AMC (Σχήματα 14 και 15). Στο κλάσμα όπου μετράται δραστικότητα, αναμένεται και ζώνη μεταξύ 100 και 110 kDa.



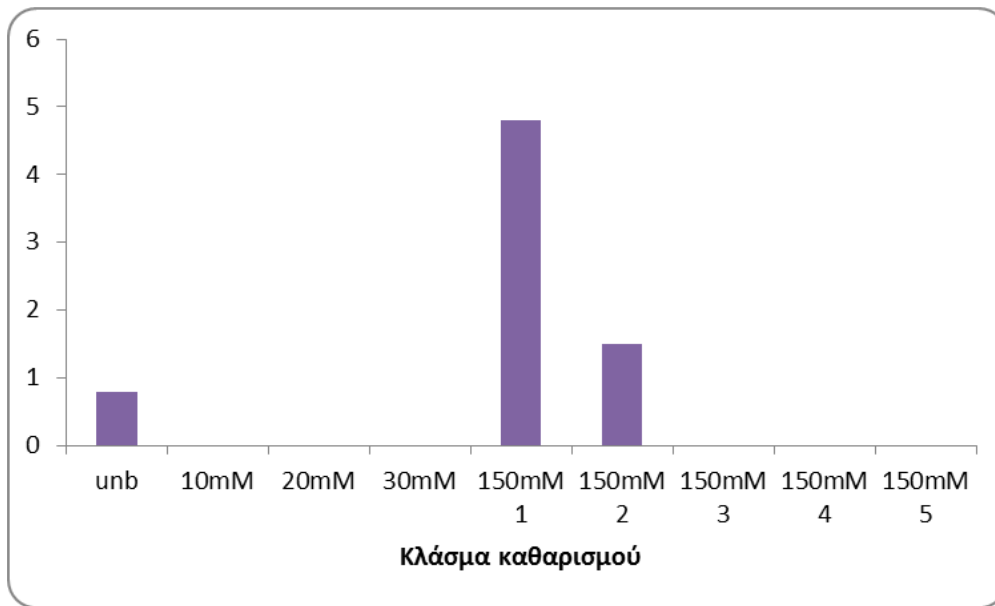
Εικόνα 13: Έλεγχος των διαφόρων σταδίων καθαρισμού της πρωτεΐνης ERAP1 WT με SDS-PAGE, όπου αναμένεται ζώνη στα 100-110 kDa. Η πρωτεΐνη εκλούεται καθαρή από τη στήλη συγγενείας σε συγκέντρωση 150mM ιμιδαζόλιο



Σχήμα 13: Δραστηκότητα των κλασμάτων από τα στάδια του καθαρισμού της ERAP1 WT ως προς την υδρόλυση του L-AMC



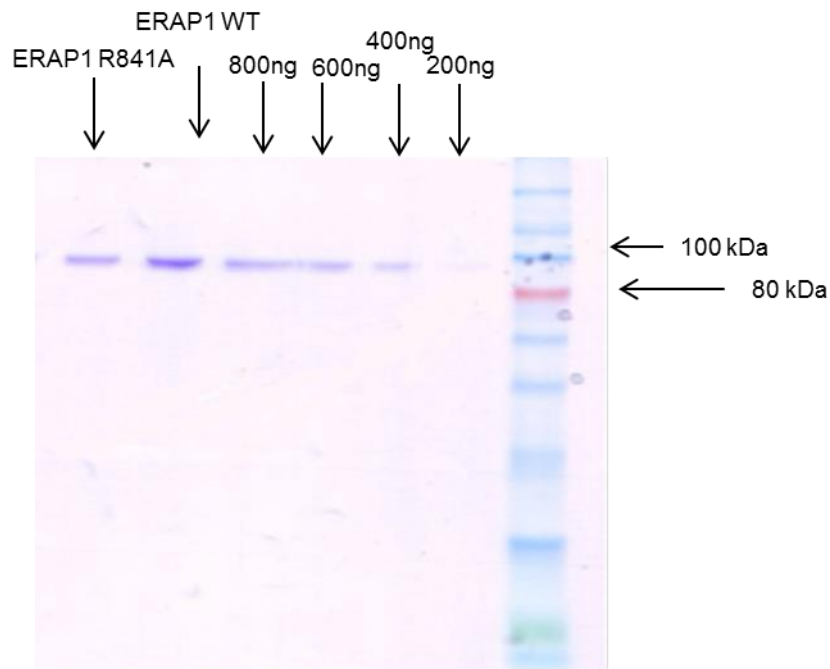
Εικόνα 14: Έλεγχος των σταδίων καθαρισμού της πρωτεΐνης ERAP1 R841A με SDS-PAGE. Η πρωτεΐνη εκλούεται καθαρή από τη στήλη συγγενείας σε συγκέντρωση 150mM ιμιδαζόλιο



Σχήμα 14: Δραστηριότητα των κλασμάτων από τα στάδια του καθαρισμού της ERAP1 R841A ως προς την υδρόλυση του L-AMC

3.2.5 Ποσοτικοποίηση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών ERAP1 WT και R841A

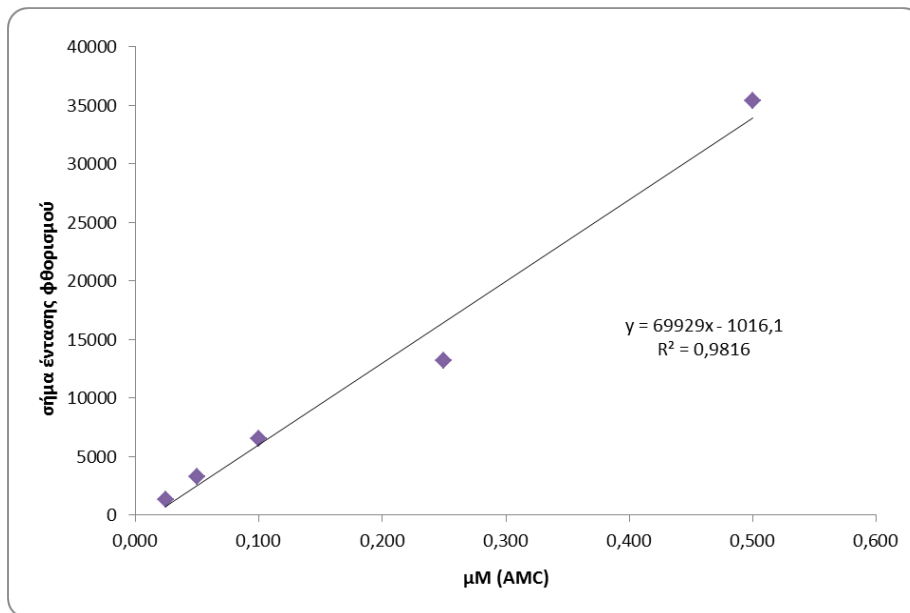
Προκειμένου να εκτιμήσουμε την ποσότητα των ενζύμων ύστερα από την παραγωγή και τον καθαρισμό τους, και να υπολογίσουμε τη συγκέντρωσή τους, χρησιμοποιούμε SDS-PAGE. Στην πηκτική “φορτώνονται” διάφορες ποσότητες από ένα πρότυπο διάλυμα της πρωτεΐνης ERAP1 γνωστής συγκέντρωσης και με τη βοήθεια του προγράμματος ImageJ κατασκευάζουμε πρότυπη καμπύλη. Από την εξίσωση της ευθείας που προκύπτει υπολογίζουμε την ποσότητα των πρωτεϊνών που φορτώσαμε στην πηκτική και στη συνέχεια τη συγκέντρωσή τους.



Εικόνα 15: Ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών ERAP1 WT και R841A με SDS-PAGE. Στην πηκτή φορτώνονται γνωστές ποσότητες από πρότυπο διάλυμα ERAP1 γνωστής συγκέντρωσης και μια ποσότητα από τα προς ποσοτικοποίηση ένζυμα

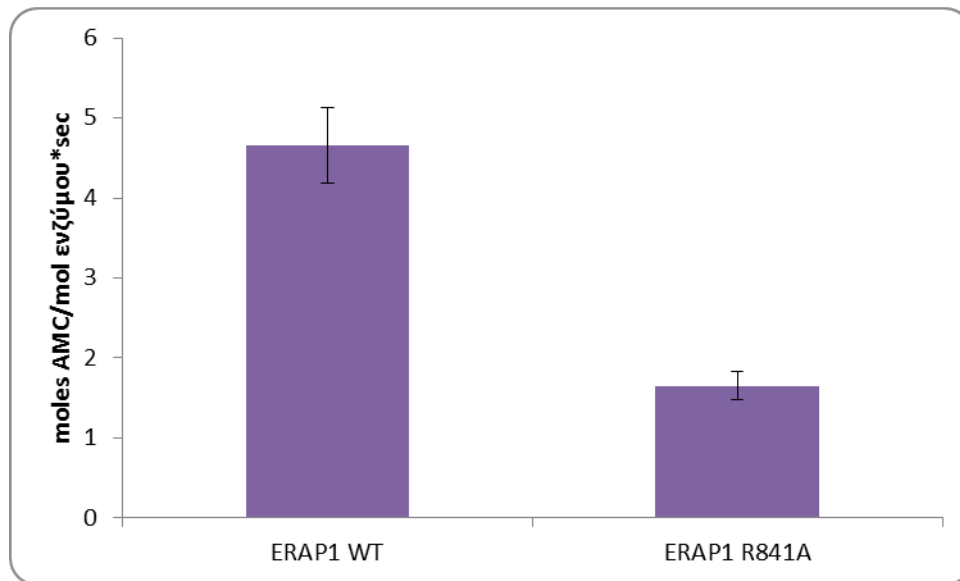
3.2.6 Ειδική δραστηριότητα των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών ERAP1 WT και R841A ως προς την υδρόλυση του L-AMC

Στη συνέχεια θέλαμε να ελέγξουμε πιθανή διαφορά στην ταχύτητα υδρόλυσης του L-AMC από τα δύο ένζυμα. Μετρήθηκε το σήμα φθορισμού του AMC σε διάφορες συγκεντρώσεις και κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη του σχήματος 15.



Σχήμα 15: Πρότυπη καμπύλη της έντασης φθορισμού ως προς την συγκέντρωση του AMC

Κάτω από τις ίδιες συνθήκες μετρήθηκε και το σήμα φθορισμού που δίνει καθένα από τα ένζυμα και υπολογίστηκαν τα moles AMC που παράγονται ανά mole ενζύμου το δευτερόλεπτο.



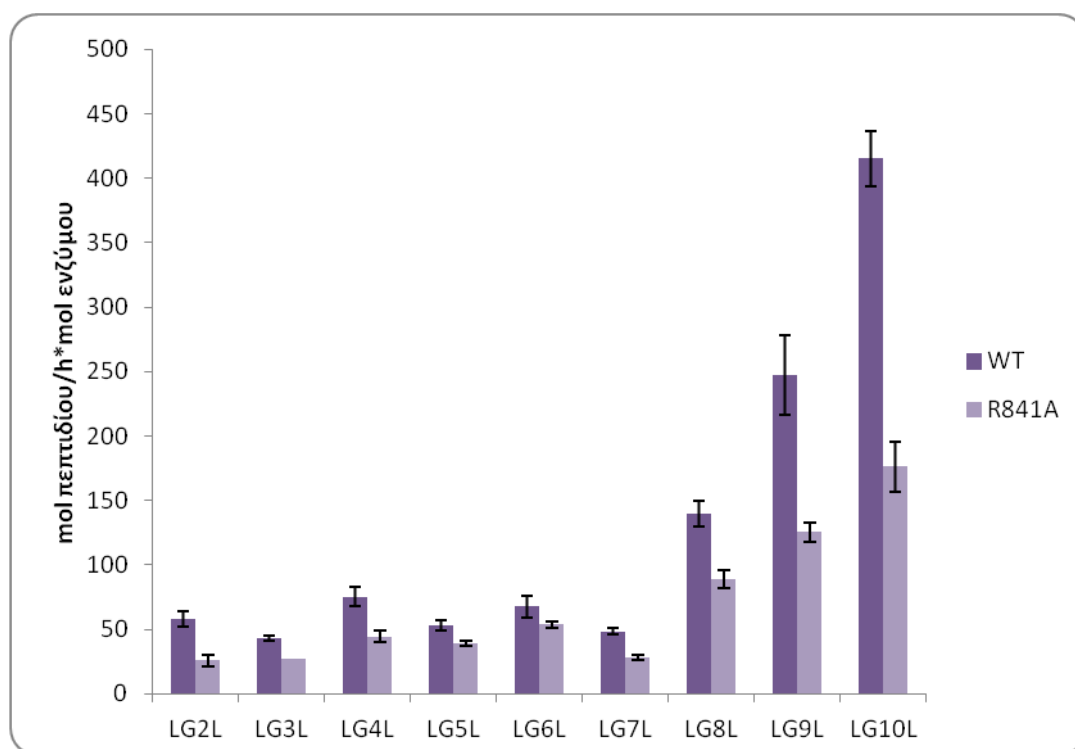
Σχήμα 16: Ειδική δραστηριότητα των δύο ενζύμων ως προς την υδρόλυση του L-AMC

Παρατηρούμε ότι το ERAP1 το οποίο φέρει τη σημειακή μετάλλαξη στη θέση 841 εμφανίζει χαμηλότερη δραστηριότητα ως προς L-AMC σε σχέση με το αγρίου τύπου ένζυμο, σε ποσοστό που ανέρχεται στο 35,5%.

3.2.7 Μελέτη των ενζύμων ERAP1 WT και R841A ως προς την επιλογή μήκους των υποστρωμάτων τους

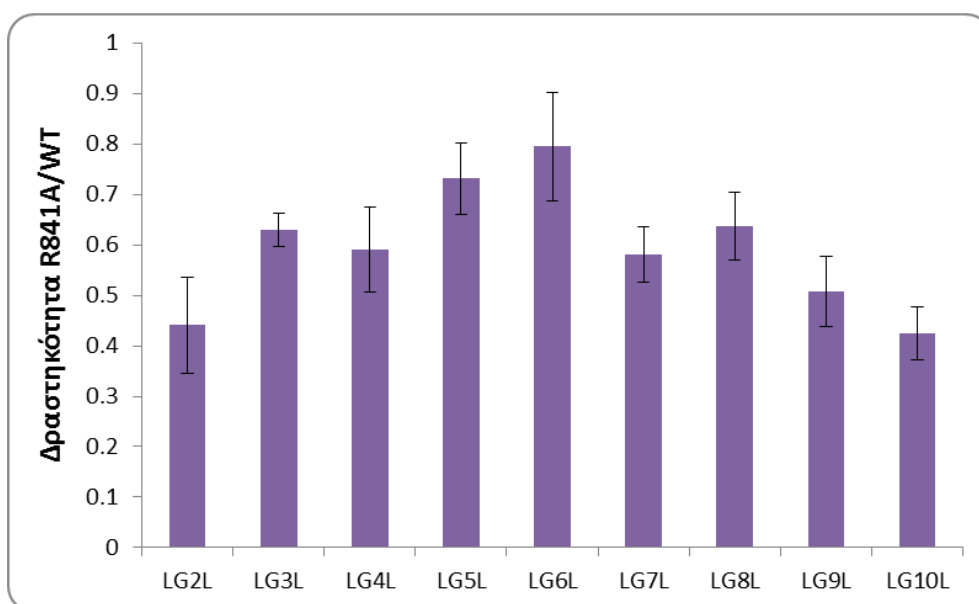
Στη συνέχεια μελετήθηκε το κατά πόσο η αργινίνη στη θέση 841 συμβάλει στην χαρακτηριστική επιλογή μήκους υποστρωμάτων που εμφανίζει η ERAP1 σε σχέση με άλλες αμινοπεπτιδάσες. Για να επιτευχθεί αυτό συγκρίναμε την ταχύτητα υδρόλυσης των δύο ενζύμων ως προς μια σειρά πολυγλυκινικών πεπτιδίων, διαφορετικού μήκους το καθένα, τα οποία στο N και στο C-τελικό άκρο φέρουν μια λευκίνη (LGnL, n=2-10) προκειμένου να καταστούν κατάλληλα υποστρώματα για την ERAP1. Για τη μελέτη αυτή χρησιμοποιούνται τα συγκεκριμένα πεπτίδια γιατί απουσία πλευρικών

ομάδων στις γλυκίνες, μας δίδεται η δυνατότητα να λάβουμε συμπεράσματα μόνο για την προτίμηση του υποστρώματος ως προς το μήκος. Όπως έχουμε δει, η ταχύτητα υδρόλυσης του N-τελικού άκρου του πεπτιδίου επηρεάζεται σημαντικά από τις πλευρικές ομάδες των εσωτερικών αμινοξέων. Τα προϊόντα των αντιδράσεων των δύο ενζύμων αναλύθηκαν με HPLC ανάστροφης φάσης και η ταχύτητα υπολογίστηκε μετά από προσαρμογή των δεδομένων σε κατάλληλο μοντέλο για την αλλοίωση υποστρώματος από ένα ένζυμο με τη βοήθεια του προγράμματος GraphPad Prism 5. Από τα δεδομένα που λάβαμε υπολογίστηκε, όπως φαίνεται στο σχήμα 18 η ειδική δραστηριότητα των ενζύμων για καθένα από τα υποστρώματα.



Σχήμα 17: Ειδική δραστηριότητα των ERAP1 WT και ERAP1 R841A ως προς τη σειρά πολυγλυκινικών πεπτιδίων LGnL (n=2-10)

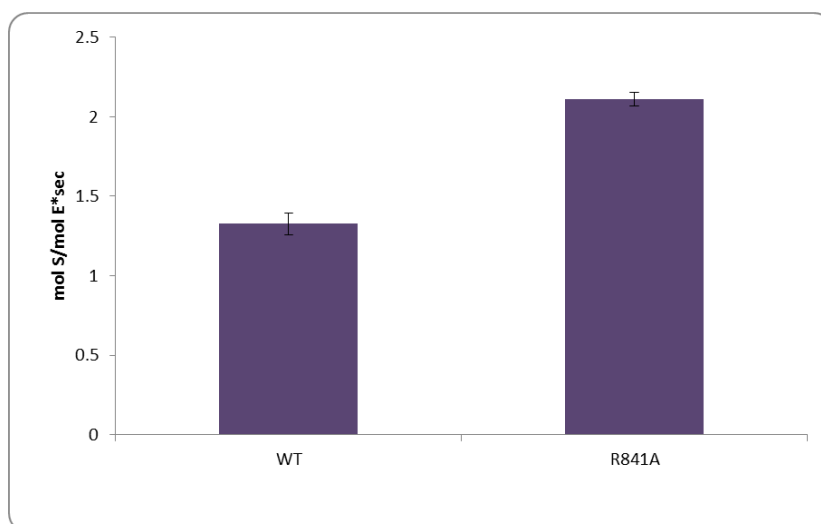
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, δεν παρατηρείται κάποια έντονη μεταβολή στην επιλογή μήκους των υποστρωμάτων καθώς και τα δύο ένζυμα εμφανίζουν μεγαλύτερη ειδική δραστηριότητα για τα μεγάλα υποστρώματα σε σχέση με τα μικρά. Με σύγκριση της ειδικής δραστηριότητας των δύο ενζύμων μεταξύ τους για καθένα από τα πεπτίδια φαίνεται ότι η ERAP1 R841A έχει χαμηλότερη ειδική δραστηριότητα απ' ό,τι το αγρίου τύπου ERAP1. Κανονικοποιώντας ως προς την δραστηριότητα της ERAP1 R841A για κάθε πεπτίδιο παρατηρήθηκε ότι το μοτίβο αλλάζει καθώς φαίνεται μια ελαφριά προτίμηση για πεπτίδια με ενδιάμεσο μήκος, σε σχέση με την ERAP1 WT, η οποία προτίμηση όμως χάνεται για τα πιο μικρά πεπτίδια.



Σχήμα 18: Κανονικοποίηση των ειδικών δραστηριοτήτων των δύο ενζύμων για τα πολυγλυκινικά πεπτίδια, ως προς την ERAP1 R841A

3.2.8 Μελέτη της παραγωγής του επιτόπου της ωαλβουμίνης SIINFEKL από τις αμινοπεπτιδάσες ERAP1 WT και ERAP1 R841A

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της ικανότητας των ERAP1 WT και ERAP1 R841A για παραγωγή του επιτόπου της ωαλβουμίνης SIINFEKL, ο οποίος παρουσιάζεται από τα μόρια ιστοσυμβατότητας H2-K^b, από τον εκτεταμένο πρόδρομο LSIINFEKL. Έγινε επεξεργασία των προϊόντων των αντιδράσεων με HPLC ανάστροφης φάσης και τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν όπως και στις αντιδράσεις με τη σειρά των πολυγλυκινικών πεπτιδίων.



Σχήμα 19: Ειδική δραστικότητα των ERAP1 WT και ERAP1 R841A ως προς το πεπτίδιο LSIINFEKL

Όπως φαίνεται από το γράφημα του σχήματος 20, σε αντίθεση με τα προηγούμενα αποτελέσματα, το ERAP1 με τη σημειακή μετάλλαξη εμφανίζει υψηλότερη ειδική δραστικότητα για το LSIINFEKL σε σχέση με το ένζυμο αγρίου τύπου.

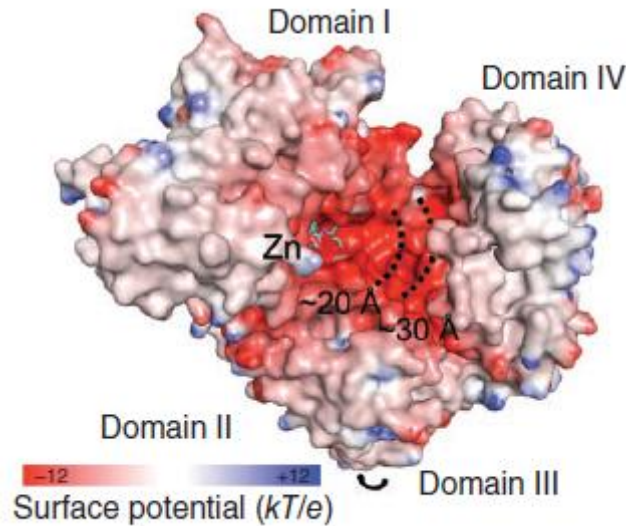
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΜΙΝΟΠΕΠΤΙΔΑΣΗΣ ERAP1

D406A/D435A/D439A

4.1 Υπόθεση και στόχοι της μελέτης

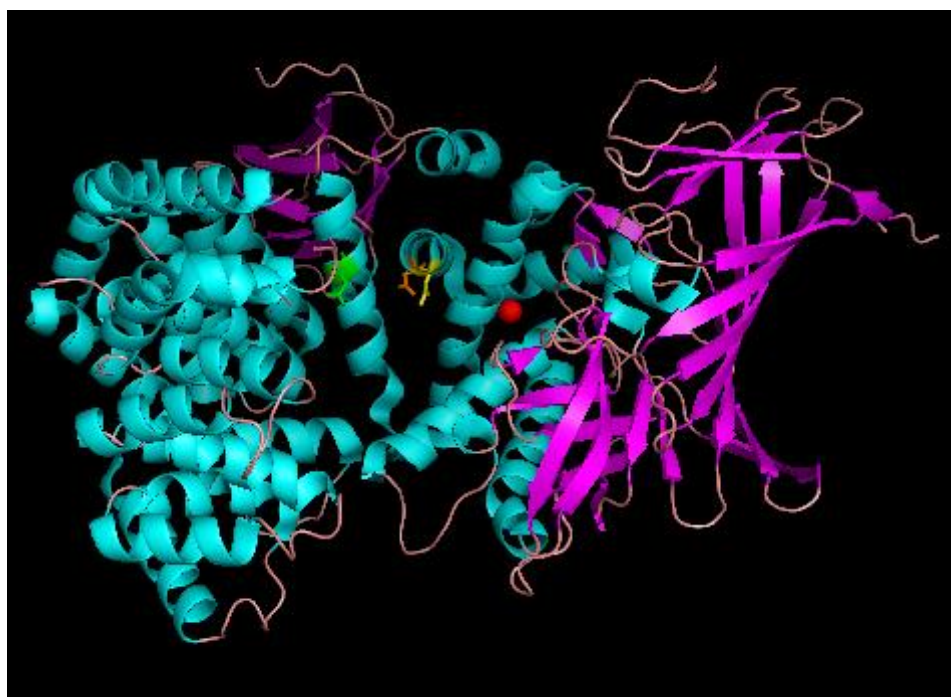
Τα πρόδρομα αντιγονικά πεπτίδια τα οποία μεταφέρονται στο ΕΔ εμφανίζουν μεγάλη ποικιλία όσον αφορά την εσωτερική τους αλληλουχία. Το σύνολο αυτό των εκτεταμένων στο Ν-τελικό άκρο επιτόπων αποτελεί πιθανά υποστρώματα για την ERAP1. Προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση της εσωτερικής αλληλουχίας των υποστρωμάτων στην ταχύτητα υδρόλυσης του Ν-τελικού αμινοξέος, μελετήθηκαν συστηματικά *in vitro* αντιδράσεις της ERAP1 με συνθετικά υποστρώματα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ERAP1 παρουσιάζει ισχυρές προτιμήσεις για συγκεκριμένα αμινοξέα σε αρκετές από τις εσωτερικές θέσεις του πεπτιδίου. Συγκεκριμένα τα αμινοξέα που αυξάνουν την ταχύτητα υδρόλυσης του αμινοξέος στο Ν-τελικό άκρο του υποστρώματος από την ERAP1 είναι είτε υδρόφοβα είτε θετικά φορτισμένα [49]. Η επίλυση της κρυσταλλικής δομής της ERAP1 αποκαλύπτει τον σχηματισμό μιας κοιλότητας, η οποία διαμορφώνεται από υδρόφοβα και αρνητικά φορτισμένα αμινοξέα [44]. Οι πλευρικές ομάδες αυτών των αμινοξέων καθορίζουν και τον τύπο των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ του ενζύμου και του υποστρώματος. Καθώς δεν έχει επιτευχθεί συνκρυστάλλωση της ERAP1 με κάποιο υπόστρωμα η ταυτοποίηση των αμινοξέων που συνεισφέρουν στην αναγνώριση και την πρόσδεση του πεπτιδίου δεν έχει καταστεί δυνατή.



Εικόνα 16: Η δομή της ERAP1 με αναπαράσταση επιφάνειας. Με κόκκινο επισημαίνονται οι περιοχές με αρνητικό ηλεκτροστατικό δυναμικό ενώ με μπλε φαίνονται οι θετικά φορτισμένες περιοχές του ενζύμου [44]

Στο αρνητικό ηλεκτροστατικό δυναμικό της εσωτερικής κοιλότητας της ERAP1 συνεισφέρουν μεταξύ άλλων και τρία ασπαρτικά οξέα τα οποία βρίσκονται στις θέσεις 406, 435 και 439. Οι πλευρικές ομάδες των συγκεκριμένων ασπαρτικών οξέων σχηματίζουν μια συστοιχία η οποία εκτείνεται μέσα στο θύλακα πρόσδεσης του υποστρώματος. Είναι λοιπόν πιθανό τα συγκεκριμένα αμινοξικά κατάλοιπα να συμβάλλουν στην εξειδίκευση του ενζύμου ως προς υποστρώματα με θετικά φορτισμένα αμινοξέα στην αλληλουχία τους, αλλά και να επηρεάζουν τη συγγένεια του ενζύμου με τα υποστρώματα του.

Έχοντας υπόψη τα παραπάνω, αποφασίσαμε να μελετήσουμε εκτενέστερα την πιθανή συνεισφορά αυτών των ασπαρτικών οξέων στην ειδική δραστικότητα της ERAP1. Για να το πετύχουμε αυτό, εκφράσαμε ανασυνδυασμένη ERAP1 στην οποία τα ασπαρτικά στις θέσεις 406, 435 και 439 έχει αντικατασταθεί από αλανίνη (D406A/D435A/D439A). Στη συνέχεια συγκρίναμε την ειδική δραστικότητα του ενζύμου που φέρει τις σημειακές μεταλλάξεις με αυτή του αγρίου τύπου του ενζύμου χρησιμοποιώντας φθορισμομετρία και HPLC.



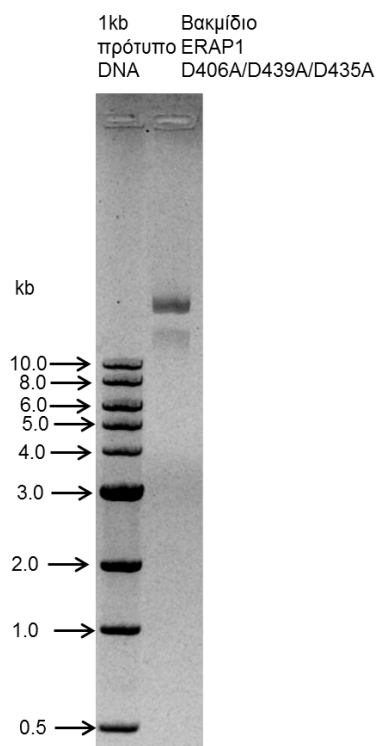
Εικόνα 17: Δομή της ERAP1 στην ανοιχτή διαμόρφωση σε αναπαράσταση cartoon. Ο ψευδάργυρος αναπαριστάται σαν κόκκινη σφαίρα, ενώ τα τρία ασπαρτικά που σχηματίζουν τη συστοιχία παρουσιάζονται σαν ράβδοι. Με πράσινο αναπαριστάται το ασπαρτικό 406 με κίτρινο το 435 και με πορτοκαλί το 439

4.2 Αποτελέσματα

4.2.1 Μετασχηματισμός του πλασμιδίου pDEST8 ERAP1 D406A/D435A/D439A σε *E.coli* DH10Bac και απομόνωση βακμιδιακού DNA

Σε 50μL επιδεκτικών κυττάρων *E.coli* DH10Bac μετασχηματίστηκαν 20ng πλασμιδιακού DNA στο οποίο έχει κλωνοποιηθεί το γονίδιο της ERAP1. Οι σημειακές μεταλλάξεις στις θέσεις 406,435 και 439 ώστε τα ασπαρτικά οξέα να αντικατασταθούν από αλανίνες πραγματοποιήθηκαν από τη Δρ.

Ευνουχίδου με χρήση του QuickChange Site-Directed Mutagenesis kit της Stratagene. Μετά τον μετασχηματισμό επιλέχθηκαν δύο αποικίες με λευκό φαινότυπο και από αυτές απομονώθηκε το βακμιδιακό DNA. Η απομόνωση επιβεβαιώθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% όπου αναμένεται η ύπαρξη ζώνης μεγάλου μοριακού βάρους.

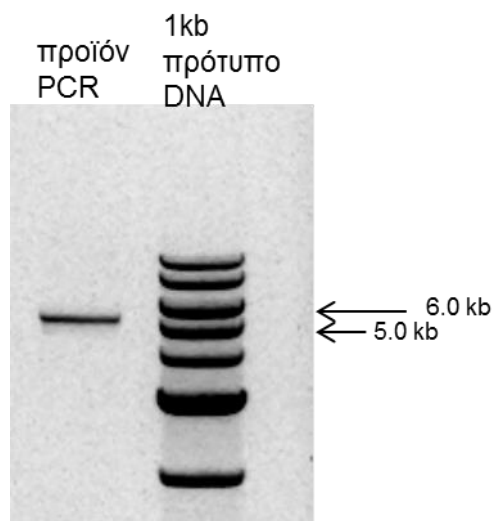


Εικόνα 18: Χαρακτηριστική εικόνα βακμιδιακού DNA σε πηκτή αγαρόζης 1% όπου εμφανίζεται μια χαρακτηριστική ζώνη σε μεγάλο μοριακό βάρος

4.2.2 Επιβεβαίωση του ανασυνδυασμού με PCR

Στο βακμιδιακό DNA που απομονώθηκε πραγματοποιήθηκε διαγνωστική PCR προκειμένου να επιβεβαιωθεί ο ανασυνδυασμός του επιθυμητού γονιδίου. Το προϊόν της PCR αναλύεται σε πηκτή αγαρόζης 1%, όπου

αναμένεται ζώνη λίγο παραπάνω από τα 5kb (~2300 bp από το pDest8 + 3000 bp το μέγεθος του γονιδίου της ERAP1).



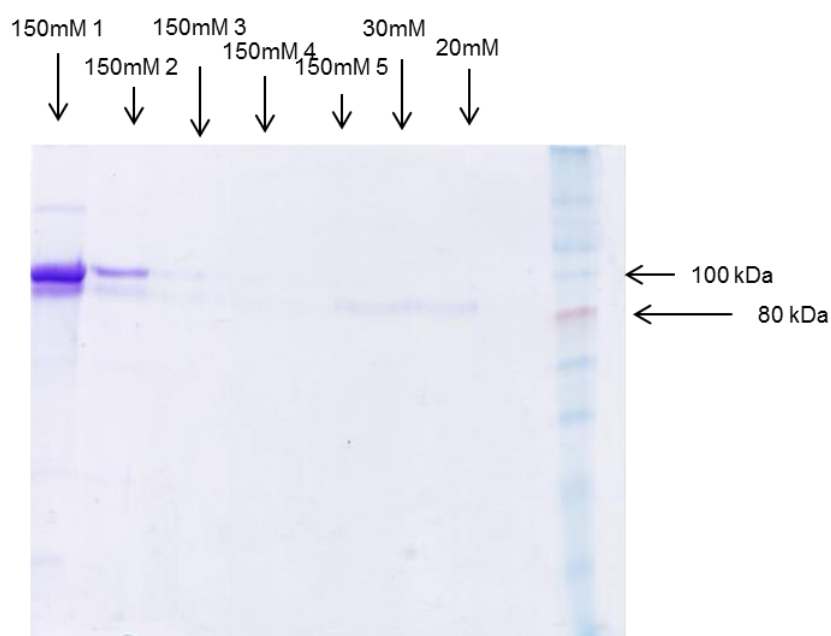
Εικόνα 19: Χαρακτηριστική εικόνα προϊόντος διαγνωστικής PCR για την επιβεβαίωση του ανασυνδυασμού σε πηκτή αγαρόζης 1%

4.2.3 Παραγωγή βακιλοϊού από κύτταρα εντόμου

Στη συνέχεια, αφού επιβεβαιώθηκε ο ανασυνδυασμός του επιθυμητού γονιδίου, το βακμιδιακό DNA μετασχηματίστηκε σε κύτταρα εντόμου της σειράς Sf9, ώστε να εκφραστεί ο ιός. Αφού ο ιός πολλαπλασιάστηκε εκ νέου σε κύτταρα της ίδιας σειράς (P1), αναγεννήθηκε και σε κύτταρα της Hi5 (P2) στα οποία θα γίνει η επιμόλυνση για την παραγωγή της πρωτεΐνης.

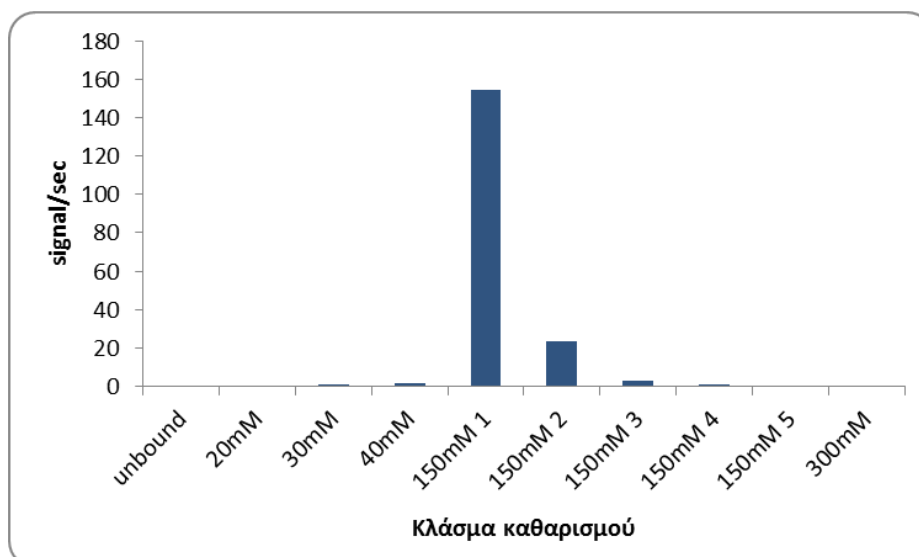
4.2.4 Έκφραση και καθαρισμός της ανθρώπινης ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης ERAP1 D406A/D435A/D439A

Σε κύτταρα της σειράς Hi5 πραγματοποιήθηκε επιμόλυνση με το βακίλοϊό (P2) που φέρει το γονίδιο της ERAP1 D406A/D435A/D439A. Ο καθαρισμός του ενζύμου επετεύχθη με χρωματογραφία χημικής συγγένειας σε στήλη NiNTA. Η καθαρότητα της πρωτεΐνης επιβεβαιώθηκε με SDS-PAGE ενώ η δραστηκότητα τους με την ικανότητα υδρόλυσης του L-AMC. Στο κλάσμα όπου μετριέται δραστηκότητα, αναμένεται και ζώνη μεταξύ 100 και 110 kDa.



Εικόνα 20: Έλεγχος των διαφόρων σταδίων καθαρισμού της πρωτεΐνης ERAP1 D406A/D435A/D439A με SDS-PAGE, όπου αναμένεται ζώνη στα 100-110 kDa. Η πρωτεΐνη εκλύεται από τη στήλη συγγενείας σε συγκέντρωση 150mM ιμιδαζόλιο

Η πρωτεΐνη κρίθηκε ότι ήταν ικανοποιητικής καθαρότητας για τις ενζυμικές δοκιμασίες που θα ακολουθούσαν.

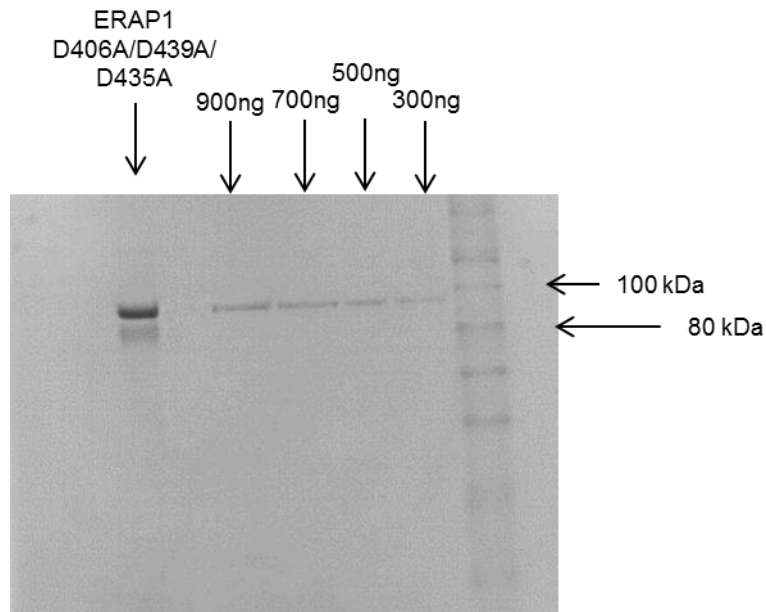


Σχήμα 20: Δραστηκότητα των κλασμάτων από τα στάδια του καθαρισμού της ERAP1 D406A/D435A/D439A ως προς την υδρόλυση του L-AMC

Η έκφραση και ο καθαρισμός της ERAP1 αγρίου τύπου που χρησιμοποιήθηκε στις ενζυμικές δοκιμασίες έχει περιγραφεί στο προηγούμενο κεφάλαιο.

4.2.5 Ποσοτικοποίηση της ανασυνδυσμένης πρωτεΐνης ERAP1 D406A/D435A/D439A

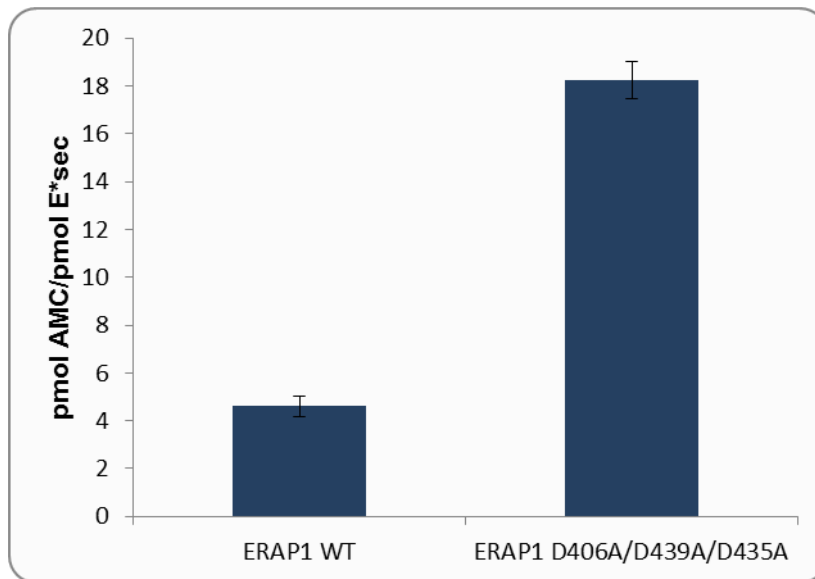
Θέλοντας να εκτιμήσουμε την ποσότητα του ενζύμου, ύστερα από την παραγωγή και τον καθαρισμό του, και να υπολογίσουμε τη συγκέντρωσή του, χρησιμοποιούμε SDS-PAGE. Στην πηκτή φορτώνονται διάφορες ποσότητες από ένα πρότυπο διάλυμα της πρωτεΐνης γνωστής συγκέντρωσης και με τη βοήθεια του προγράμματος ImageJ κατασκευάζουμε πρότυπη καμπύλη. Από την εξίσωση της ευθείας που προκύπτει υπολογίζουμε την ποσότητα της πρωτεΐνης που φορτώσαμε στην πηκτή και στη συνέχεια τη συγκέντρωσή της.



Εικόνα 21: Ποσοτικοποίηση πρωτεΐνης με SDS-PAGE. Στην πηκτή φορτώνονται γνωστές ποσότητες από πρότυπο διάλυμα ERAP1 γνωστής συγκέντρωσης και μια ποσότητα από το προς ποσοτικοποίηση ένζυμο

4.2.6 Ειδική δραστηριότητα των ανθρώπινων ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών ERAP1 WT και ERAP1 D406A/D435A/D439A ως προς την υδρόλυση του L-AMC

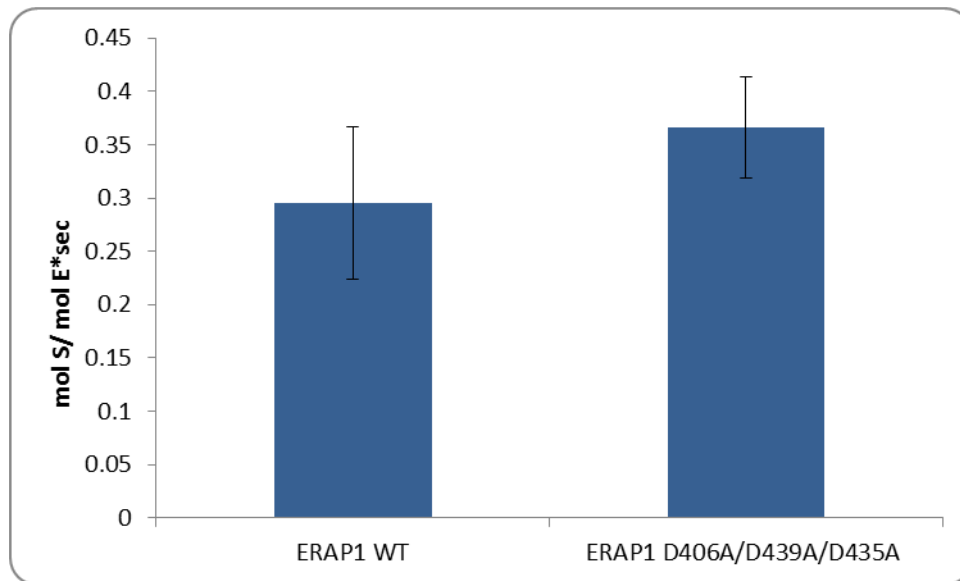
Αφού υπολογίστηκε η συγκέντρωση της πρωτεΐνης υπολογίστηκε η ειδική δραστηριότητα της ERAP1 D406A/D439A/D435A και συγκρίθηκε με την ειδική δραστηριότητα της ERAP1 αγρίου τύπου. Χρησιμοποιήθηκε η πρότυπη καμπύλη της έντασης φθορισμού ως προς τη συγκέντρωση του AMC που είχε μετρηθεί και περιγράφηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο.



Σχήμα 21: Ειδική δραστηριότητα των δύο ενζύμων ως προς την υδρόλυση του L-AMC

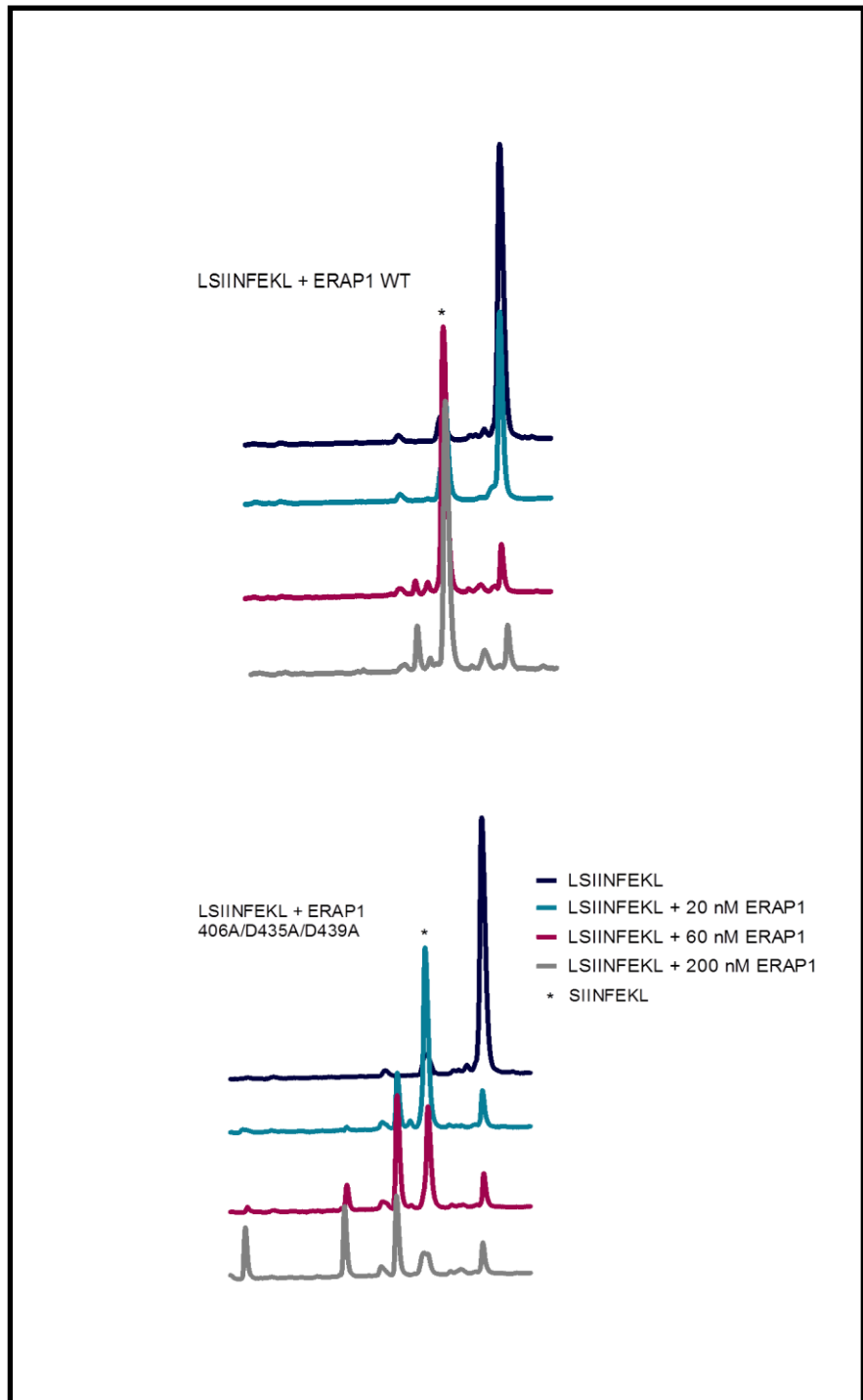
4.2.7 Μελέτη της παραγωγής του επιτόπου της वालουμίνης SIINFEKL από τις αμινοπεπτιδάσες ERAP1 WT και ERAP1 D406A/D435A/D439A

Στη συνέχεια εξετάσαμε πιθανές διαφορές των δύο ενζύμων στην ικανότητα παραγωγής του επιτόπου της वालουμίνης SIINFEKL. Οι αντιδράσεις αναλύθηκαν με HPLC ανάστροφης φάσης και υπολογίστηκε η ειδική δραστηριότητα των δύο ενζύμων για την καταστροφή του πρόδρομου πεπτιδίου LSIINFEKL.



Σχήμα 22: Ειδική δραστηριότητα των ERAP1 WT και ERAP1 D406A/D435A/D439A ως προς την καταστροφή του πεπτιδίου LSIINFEKL

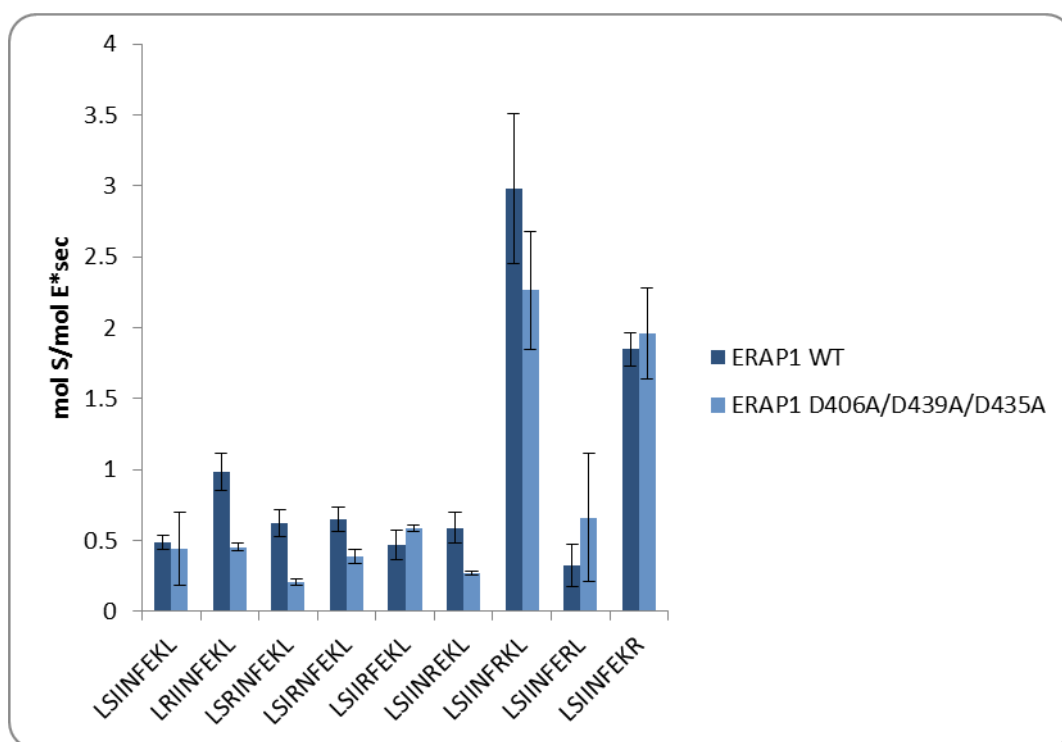
Ενώ δεν φαίνονται στατιστικώς σημαντικές διαφορές στην ειδική δραστηριότητα των δύο ενζύμων, εξετάζοντας τα χρωματογραφήματα διαπιστώθηκε ότι ενώ στις αντιδράσεις του ERAP1 WT με το LSIINFEKL συσσωρευόταν ο επίτοπος, το ένζυμο με τις σημειακές μεταλλάξεις αποικοδομούσε το πεπτίδιο περαιτέρω. Όπως φαίνεται και στο σχήμα 23, μόνο όταν η ERAP1 WT βρίσκεται σε συγκέντρωση 200nM στην αντίδραση αρχίζει να καταστρέφεται το πεπτίδιο SIINFEKL. Αντίθετα το μεταλλαγμένο ένζυμο υδρολύει τον επίτοπο σε δέκα φορές χαμηλότερη τελική συγκέντρωση. Σε 200nM ERAP1 D406A/D435A/D439A το SIINFEKL έχει καταστραφεί τελείως, ενώ έχουν παραχθεί και ακόμα μικρότερα προϊόντα.



Σχήμα 23: Χρωματογραφήματα των αντιδράσεων των δύο ενζύμων με το πεπτικό LSIINFEKL

4.2.8 Σάρωση αργινίνης στη σειρά πεπτιδίων LSIINFEKL

Γνωρίζοντας ότι η ERAP1 εμφανίζει μεγάλη χημική συγγένεια για υποστρώματα τα οποία έχουν θετικά φορτισμένα αμινοξέα στο εσωτερικό της αλληλουχίας τους, θελήσαμε να μελετήσουμε τον πιθανό ρόλο των συγκεκριμένων ασπαρτικών οξέων στην εξειδίκευση ως προς θετικά φορτισμένα αμινοξέα. Για να επιτευχθεί αυτό, συγκρίναμε τις αντιδράσεις της ERAP1 αγρίου τύπου με αυτή που φέρει την τριπλή μετάλλαξη, όταν αυτές αντέδρασαν με τη σειρά πεπτιδίων LSIINFEKL τα οποία έχουν το καθένα σε διαφορετική θέση μια αργινίνη. Με ανάλυση των αντιδράσεων με HPLC ανάστροφης φάσης υπολογίστηκε η ειδική δραστηριότητα των δύο ενζύμων για κάθε πεπτίδιο.

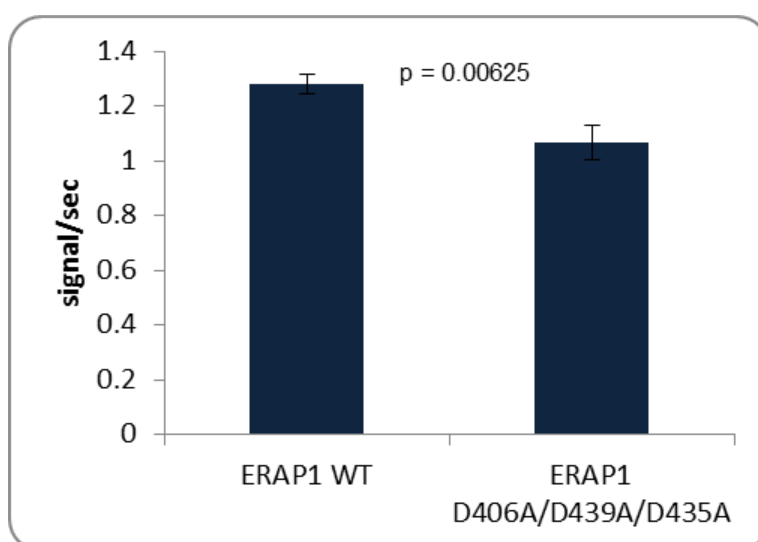


Σχήμα 24: Ειδική δραστηριότητα των ERAP1 WT και ERAP1 D406A/D435A/D439A ως προς την καταστροφή των πεπτιδίων της σειράς LSIINFEKL

Όπως φαίνεται από το διάγραμμα, η επίδραση στην ειδική δραστηριότητα εξαρτάται από τη θέση στην οποία βρίσκεται κάθε φορά η αργινίνη. Για τα πεπτίδια LRIINFEKL, LSRINFEKL και LSIINREKL παρατηρούμε μια στατιστικώς σημαντική μείωση στην ειδική δραστηριότητα για την ERAP1 D406A/D435A/D439A. Αντίθετα σε άλλες θέσεις δεν φαίνεται να επηρεάζεται η ειδική δραστηριότητα, ειδικά όσο η αργινίνη απομακρυνόταν από το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου.

4.2.9 Μελέτη της αντίδρασης των ERAP1 WT και D406A/D435A/D439A με το πεπτίδιο WRVYEKC*ALK

Θέλοντας να επιβεβαιώσουμε ότι η ERAP1 D406A/D435A/D439A εμφανίζει χαμηλότερη δραστηριότητα για πεπτίδια που έχουν θετικά φορτισμένα αμινοξέα στις θέσεις προς το N-τελικό άκρο, χρησιμοποιήσαμε τη φθορισμομετρική μέθοδο για να υπολογίσουμε την δραστηριότητα των δύο ενζύμων ως προς το επισημασμένο πεπτίδιο WRVYEC*ALK

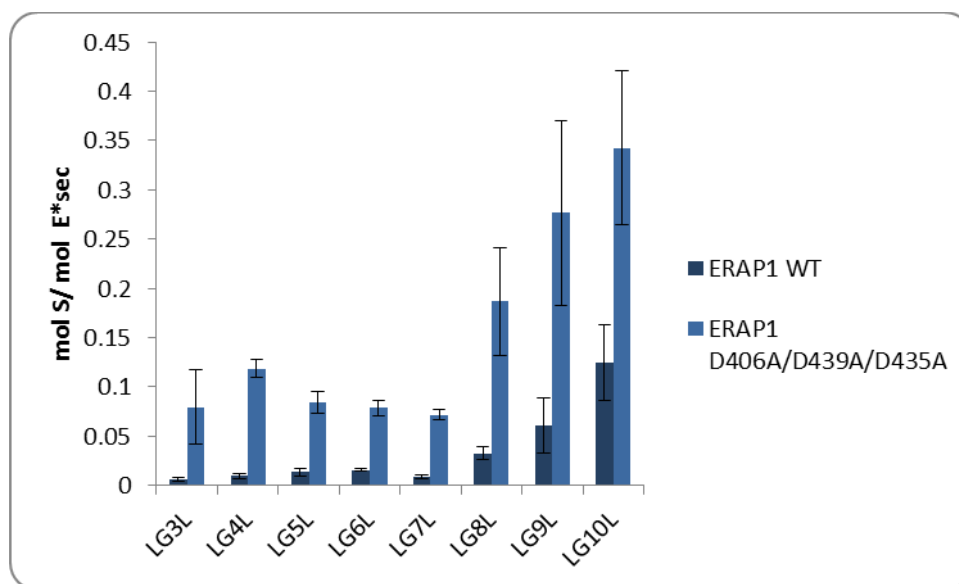


Σχήμα 25: Δραστηριότητα των ERAP1 WT και ERAP1 D406A/D435A/D439A ως προς το πεπτίδιο WRVYEKC*ALK

Και εδώ φαίνεται μια πολύ μικρή μείωση στη δραστικότητα της ERAP1 με την τριπλή μετάλλαξη, η οποία όμως είναι στατιστικώς σημαντική (p value= 0.006).

4.2.10 Μελέτη των ενζύμων ERAP1 WT και D406A/D435A/D439A ως προς την επιλογή μήκους των υποστρωμάτων τους

Ενώ αρχικά στη συγκεκριμένη μελέτη δεν είχε γίνει υπόθεση ότι μπορεί αυτά τα τρία ασπαρτικά οξέα να παίζουν ρόλο στη επιλογή μήκους, οι παρατηρήσεις κατά τις αντιδράσεις του μεταλλαγμένου ενζύμου με το πεπτίδιο LSIINFEKL μας ώθησαν στο να μελετήσουμε τις αντιδράσεις του ενζύμου με τη σειρά πολυγλυκινικών πεπτιδίων LGnL n=3-10.



Σχήμα 26: Ειδική δραστικότητα των ERAP1 WT και ERAP1 D406A/D435A/D439A ως προς τη σειρά πολυγλυκινικών πεπτιδίων LGnL, n=3-10

Από τις ειδικές δραστηριότητες των δύο ενζύμων είναι φανερό ότι υπάρχει μια αύξηση στη δραστηριότητα του ERAP1 D406A/D435A/D439A για αυτά τα πεπτίδια σε σχέση με το αγρίου τύπου ένζυμο. Παρόλα αυτά, δεν φαίνεται να επηρεάζουν την επιλογή μήκους υποστρώματος, καθώς οι ειδικές δραστηριότητες ακολουθούν το κλασσικό μοτίβο της ERAP1 για αυτά τα πεπτίδια.

Στην προσπάθεια μας να κατανοήσουμε καλύτερα τον ρόλο των τριών ασπαρτικών στην δραστηριότητα και την εξειδίκευση της ERAP1 παρασκευάστηκαν βακίλλοι που φέρουν τα γονίδια των πρωτεϊνών ERAP1 D406A και ERAP1 D406A/D439A. Το ένζυμο που φέρει τη διπλή μετάλλαξη δεν ήταν δυνατόν να απομονωθεί καθώς μετά τη διαδικασία του καθαρισμού έχανε τη δραστηριότητα της. Η ERAP1 D406A απομονώθηκε από κύτταρα Hi5 και αυτή την περίοδο διεξάγονται τα πειράματα της παραπάνω μελέτης για να διαπιστωθεί η επίδραση αυτού του αμινοξέος και μόνο στην καταλυτική δραστηριότητα της ERAP1.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η αμινοπεπτιδάση ERAP1 λόγω του κομβικού της ρόλου στην αντιγονοπαρουσίαση έχει εξελιχθεί έτσι ώστε να καταβολίζει αποτελεσματικά πεπτίδια μεγάλου μήκους. Η ERAP1 παράγει επιτόπους για τα MHC I οι οποίοι έχουν μήκος 8-10 αμινοξέα, αλλά και σε αρκετές περιπτώσεις υδρολύει περαιτέρω τους επιτόπους καταστρέφοντας τους, συμβάλλοντας έτσι στη ρύθμιση της κυτταροτοξικότητας. Έχει προταθεί ότι τα πεπτίδια αυτά πιθανώς να αναγνωρίζονται από μια ρυθμιστική περιοχή του ενζύμου η οποία αποτελείται από υδρόφοβα και θετικά φορτισμένα αμινοξέα και βρίσκεται στο καρβόξυ-τελικό άκρο του μορίου. Επίσης η ERAP1 εμφανίζει εξειδίκευση ως προς την αλληλουχία του πρόδρομου αντιγονικού πεπτιδίου προκειμένου να επιλέξει από το ευρύ φάσμα πιθανών επιτόπων που μεταφέρονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Από την κρυσταλλική δομή του ενζύμου παρατηρήθηκε ότι η κοιλότητα πρόσδεσης πεπτιδίου έχει έντονα αρνητικό ηλεκτροστατικό δυναμικό κάτι που συνάδει με την προτίμηση του ενζύμου για πεπτίδια με θετικά φορτισμένα κατάλοιπα. Όπως περιγράφηκε παραπάνω, πραγματοποιήθηκε μια μελέτη προκειμένου να διερευνηθεί ο πιθανός ρόλος της αργινίνης 841 στην εξειδίκευση της ERAP1 ως προς μεγάλα υποστρώματα και μιας συστάδας τριών ασπαρτικών οξέων (406D, 435D, 439D) στην προτίμηση του ενζύμου για υποστρώματα με θετικά φορτισμένα αμινοξέα.

Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα της μελέτης, φαίνεται ότι η αργινίνη στη θέση 841 δεν επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την επιλογή υποστρωμάτων από την ERAP1 βάσει μήκους. Όπως φαίνεται στο σχήμα 18 παρόλο που το ένζυμο που φέρει τη σημειακή μετάλλαξη εμφανίζει μειωμένη ειδική δραστηριότητα σε σχέση με το αγρίου τύπου ένζυμο, εξακολουθεί να είναι εκλεκτικό για πεπτίδια με μεγαλύτερο μήκος. Οι μειωμένες δραστηριότητες που παρατηρούνται για τα πολυγλυκινικά πεπτίδια έρχονται σε συμφωνία με τη διαφορά των δύο ενζύμων για την υδρόλυση του L-AMC. Η ERAP1 R841A

εμφανίζει περίπου τρεις φορές χαμηλότερη δραστικότητα για το L-AMC σε σχέση με την ERAP1 WT κάτι το οποίο δεν ήταν αναμενόμενο καθώς το L-AMC είναι μικρό υπόστρωμα και δεν εκτείνεται τόσο βαθιά στην κοιλότητα δέσμευσης υποστρώματος. Παρατηρούμε λοιπόν ότι η ERAP1 R841A εμφανίζει μειωμένη δραστικότητα όταν αντιδρά με μη φυσικά υποστρώματα καθώς το L-AMC είναι ένα μη φυσικό υπόστρωμα το οποίο είναι κατάλληλο για τη μέτρηση της ενζυμικής δραστικότητας με χρήση φθορισμομετρίας, αλλά και τα πολυγλυκινικά πεπτίδια είναι σχεδιασμένα για μελέτη συγκεκριμένης φύσεως και δεν αποτελούν πιθανά υποστρώματα για την ERAP1 σε φυσιολογικές συνθήκες. Αυτή η μείωση στη δραστικότητα πιθανώς να οφείλεται σε μια μικρή αποσταθεροποίηση του μορίου του ενζύμου καθώς μπορεί να επηρεάζεται η διαμόρφωση της κοιλότητας πρόσδεσης υποστρώματος.

Αντίθετα αποτελέσματα παρατηρούμε όταν το ένζυμο που φέρει τη σημειακή μετάλλαξη αντιδρά με ένα πρόδρομο επίτοπο, όπως φαίνεται και στο σχήμα 19, όπου η ERAP1 R841A υδρολύει πιο αποτελεσματικά τον πρόδρομο επίτοπο LSIINFEKL σε σχέση με το αγρίου τύπου ένζυμο. Μια πιθανή εξήγηση είναι η σταθεροποίηση λόγω έλλειψης απωστικών αλληλεπιδράσεων οι οποίες ενδεχομένως να αναπτύσσονται μεταξύ της αργινίνης της ERAP1 και της λυσίνης του πεπτιδίου.

Στο άρθρο τους, οι Gandhi et al., προτείνουν ότι η αργινίνη στη θέση 841 αλληλεπιδρά με σταθερές περιοχές του πεπτιδικού υποστρώματος όπως το C-τελικό άκρο του. Αυτή τους την υπόθεση ενισχύει το γεγονός ότι η συγκεκριμένη αργινίνη είναι συντηρημένη και στις ERAP2 και IRAP. Βάσει των αποτελεσμάτων μας, αυτή η υπόθεση δεν φαίνεται να είναι απόλυτα αληθής. Η συνκρυστάλλωση που πραγματοποίησαν δεν είναι με φυσικό υπόστρωμα αλλά με την ετικέτα ιστιδινών ενός άλλου μορίου ERAP1 ενώ τα αποτελέσματα για την 841R προκύπτουν κυρίως από *in silico* μοντελοποίηση. Η ακριβής ερμηνεία του ρόλου της συγκεκριμένης αργινίνης είναι δύσκολη καθώς φαίνεται να εξαρτάται από την αλληλουχία του επιτόπου. Επίσης το φαινόμενο της επιλογής μήκους μπορεί να είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης περισσοτέρων του ενός αμινοξέων με το υπόστρωμα.

Η σάρωση αργινίνης που πραγματοποιήθηκε για τον πρόδρομο επίτοπο LSIINFEKL έδειξε ότι τα ασπαρτικά οξέα στις θέσεις 406, 435 και 439, πράγματι επηρεάζουν την εξειδίκευση του ενζύμου ανάλογα όμως με τη θέση στην οποία βρίσκεται το θετικά φορτισμένο αμινοξύ. Συγκεκριμένα, πιο έντονη μείωση παρατηρήθηκε, όταν η αργινίνη ήταν στις θέσεις 2, 3, 4 και 6. Αντίστοιχα η υδρόλυση του φθορισμογενούς πεπτιδίου WRVYEC*ALK που περιέχει δύο θετικά φορτισμένα αμινοξέα, έδειξε μια μικρή μείωση της δραστηριότητας για την ERAP1 D406A/D439A/D435A κάτι το οποίο έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των πειραμάτων σάρωσης αργινίνης. Παρόλα αυτά, η μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας δεν είναι τέτοια ώστε να μπορούμε να αποδώσουμε τη δέσμευση του υποστρώματος στη συστάδα των ασπαρτικών. Τα συγκεκριμένα αμινοξέα δεν είναι τα μόνα στα οποία οφείλεται το αρνητικό ηλεκτροστατικό δυναμικό της κοιλότητας πρόσδεσης του υποστρώματος. Υπάρχουν και άλλα αμινοξέα, οι πλευρικές ομάδες των οποίων εκτείνονται μέσα στο θύλακα πρόσδεσης του υποστρώματος και μπορεί να συμβάλλουν στην αναγνώριση του πεπτιδίου. Κάποια από αυτά τα αμινοξικά κατάλοιπα τα οποία αποτελούν πιθανούς στόχους μελέτης είναι τα γλουταμινικά οξέα στις θέσεις 383, 409 και 679, καθώς και τα ασπαρτικά οξέα στις θέσεις 346, 398 και 434.

Κατά την διεξαγωγή των παραπάνω πειραμάτων παρατηρήθηκε ότι η ERAP1 με την τριπλή μετάλλαξη παρουσίασε αλλαγές στην παραγωγή του επιτόπου SIINFEKL καθώς προχωρούσε στην περαιτέρω υδρόλυση και καταστροφή του. Καθώς αυτό το εύρημα αποτελούσε ένδειξη εμπλοκής των συγκεκριμένων καταλοίπων στην επιλογή υποστρώματος βάσει μήκους, αποφασίστηκε να μελετηθεί εκτενέστερα αυτό το φαινόμενο. Για να επιτευχθεί αυτό αναλύθηκαν οι αντιδράσεις του ενζύμου ERAP1 WT και ERAP1 D406A/D439A/D435A με τη σειρά πολυγλυκινικών πεπτιδίων LGnL, n=3-10. Το μεταλλαγμένο ένζυμο παρουσιάζει μεγαλύτερη δραστηριότητα από το αγρίου τύπου για όλα τα πεπτίδια της σειράς με εντονότερο το φαινόμενο για το πενταμερές και το εξαμερές ενώ ακολουθεί το εννιαμερές. Είναι λοιπόν πιθανό τα συγκεκριμένα ασπαρτικά να εμποδίζουν την υδρόλυση κάποιων επιτόπων προς μικρότερα προϊόντα ανάλογα πάντα με την εσωτερική τους αλληλουχία. Μια πιθανή εξήγηση αυτού του φαινομένου είναι ότι τα

ασπαρτικά οξέα δεσμεύουν το υπόστρωμα με τέτοιο τρόπο ώστε το N-τελικό άκρο του πεπτιδίου να μην δεσμεύεται στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω πειράματα προτείνουμε ότι τα ασπαρτικά οξέα στις θέσεις 406, 435 και 439 πιθανώς να εμπλέκονται σε ένα μηχανισμό ελέγχου της καταστροφής των επιτόπων εμποδίζοντας την, παρά σ' έναν μηχανισμό παραγωγής αντιγονικών πεπτιδίων.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ-ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ-ΑΡΤΙΚΟΛΕΞΑ

Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους

PRRs	Pattern Recognition Receptors	Υποδοχείς αναγνώρισης μοτίβων
TLRs	Toll Like Receptors	Υποδοχείς τύπου Toll
RLRs	Retinoic acid – inducible gene I Like Receptors	Υποδοχείς τύπου γονιδίου I επαγόμενου από ρετινοϊκό οξύ
NLRs	Nucleotide – binding oligomerization domain Like Receptors	Υποδοχείς τύπου τομέα ολιγομερισμού μέσω πρόσδεσης νουκλεοτιδίου
LPS	Lipopolysaccharide	Λιποπολυσακχαρίτης
TCR	T- cell Receptor	Υποδοχέας T- λεμφοκυττάρων
MHC II	Major Histocompatibility Complex II	Μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξης II
MHC I	Major Histocompatibility Complex I	Μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξης I
HLA	Human Leucocyte Antigen	Ανθρώπινο Λευκοκυτταρικό Αντιγόνο
LAP	Leucine Aminopeptidase	Αμινοπεπτιδάση λευκίνης
TPP - II	Tripeptidyl Peptidase II	Τριπεπτιδυλο-πεπτιδάση II
TOP	Thimet Oligopeptidase	Ολιγοπεπτιδάση του θύμου

TAP	Transporter associated with Antigen Presentation	Μεταφορέας που σχετίζεται με την αντιγονοπαρουσίαση
ER	Endoplasmic Reticulum	Ενδοπλασματικό Δίκτυο
ERAP1	Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 1	Αμινοπεπτιδάση Ενδοπλασματικού Δικτύου 1
ERAP2	Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 2	Αμινοπεπτιδάση Ενδοπλασματικού Δικτύου 2
INF- γ	Interferon- γ	Ιντερφερόνη- γ
TNF α	Tumor Necrosis Factor α	Παράγοντας Νέκρωσης Όγκων α
MIIC	MHC class II Compartment	Διαμέρισμα MHC II
P-LAP	Placental – Leucine Aminopeptidase	Αμινοπεπτιδάση Λευκίνης προερχόμενη από τον Πλακούντα
A-LAP	Adipocyte derived – Leucine Aminopeptidase	Αμινοπεπτιδάση Λευκίνη προερχόμενη από Λιποκύτταρα
L-RAP	Leucocyte derived – Arginine Aminopeptidase	Αμινοπεπτιδάση Αργινίνης προερχόμενη από Λευκοκύτταρα
L-AMC	Leucine - 7-amido-4-methyl coumarin	Λευκίνο-7-αμιδο-4-μεθυλο-κουμαρίνη
PILS-AP	Puromycin Insensitive Leucyl Specific Aminopeptidase	Αμινοπεπτιδάση Λευκίνης Ανθεκτική στην Πουρομυκίνη
ARTS-1	Aminopeptidase Regulator of TNFR1	Αμινοπεπτιδάση Ρυθμιστική

	Shedding	της Ανακύκλωσης του TNFR1
TNFR1	Tumor Necrosis Factor Receptor 1	Υποδοχέας του Παράγοντα Νέκρωσης Όγκων 1
IL-1	Interleukin-1	Ιντερλευκίνη-1
IL-6	Interleukin-6	Ιντερλευκίνη-6
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor	Αγγειακός Ενδοθηλιακός Αυξητικός Παράγοντας
SNP	Single Nucleotide Polymorphisms	Πολυμορφισμός Μονού Νουκλεοτιδίου
GWAS	Genome – Wide Association Studies	Μελέτες συσχέτισμού του γονιδιώματος
C-AMC	Cysteine - 7-amido-4-methyl coumarin	Κυστεΐνο-7-αμιδο-4-μεθυλο-κουμαρίνη
M-AMC	Methionine - 7-amido-4-methyl coumarin	Μεθειονινο-7-αμιδο-4-μεθυλο-κουμαρίνη
F-AMC	Phenilalanine - 7-amido-4-methyl coumarin	Φαινυλαλανινο-7-αμιδο-4-μεθυλο-κουμαρίνη
EtOH	Ethanol	Αιθανόλη
DMSO	Dimethyl Sulfoxide	Διμέθυλοσουλφοξειδίο
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside	5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδολυλο-β-D-γαλακτοπυρανοζίτης

IPTG	Isopropyl β -D-1 thiogalactopyranoside	Ισοπρόπυλο- β -D-1 θειογαλακτοπυρανοζίτης
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid	Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate	Δωδεκυλο θειικό νάτριο
PCR	Polymerase Chain Reaction	Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl) piperazin-1-yl] ethane sulfonic acid	2-[4-(2-υδροξυαιθυλο)- πιπεταζινο-1-υλο]-αιθανο- σουλφονικό οξύ
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride	Φαινυλο-μεθυλο- σουλφονυλο-φθόριο
SDS- PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis	Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό απόδιατακτικές συνθήκες
APS	Ammonium Persulfate	Δι-θειικό αμμώνιο
TEMED	Tetramethylethylenediamin	Τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη
DTT	Dithiothreitol	Διθειοτριπόλη
DNP	Di-nitryl-phenyl	Δι-νιτρο-φαινυλο
AcN	Acetonitrile	Ακετονιτρίλιο
TFA	Trifluoroacetic Acid	Τριφθοροξικό οξύ
IRAP	Insulin Regulated Aminopeptidase	Αμινοπεπτιδάση Ρυθμιζόμενη από την Ινσουλίνη
WT	Wild Type	Αγρίου Τύπου

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

Συντομογραφίες αμινοξέων

Αλανίνη	Ala	A	Μεθειονίνη	Met	M
Κυστεΐνη	Cys	C	Ασπαραγίνη	Asn	N
Ασπαρτικό οξύ	Asp	D	Προλίνη	Pro	P
Γλουταμινικό οξύ	Glu	E	Γλουταμίνη	Gln	Q
Φαινυλαλανίνη	Phe	F	Αργινίνη	Arg	R
Γλυκίνη	Gly	G	Σερίνη	Ser	S
Ιστιδίνη	His	H	Θρεονίνη	Thr	T
Ισολευκίνη	Ile	I	Βαλίνη	Val	V
Λυσίνη	Lys	K	Θρυπτοφάνη	Trp	W
Λευκίνη	Leu	L	Τυροσίνη	Tyr	Y

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. M.H. Andersen et al., Cytotoxic T cells, *J Invest Dermatol*, vol. 126, no. 1, 2006, pp. 32-41.
2. T. Kawai and S. Akira, The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition, *Int Immunol*, vol. 21, no. 4, 2009, pp. 317-37.
3. C.A. Janeway and R. Medzhitov, Innate immune recognition, *Annu Rev Immunol*, vol. 20, 2002, pp. 197-216.
4. M.W. Hornef et al., Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptive immune responses, *Nat Immunol*, vol. 3, no. 11, 2002, pp. 1033-40.
5. D.C. Parker, T cell-dependent B cell activation, *Annu Rev Immunol*, vol. 11, 1993, pp. 331-60.
6. F. Nimmerjahn and J.V. Ravetch, Fcγ receptors as regulators of immune responses, *Nat Rev Immunol*, vol. 8, no. 1, 2008, pp. 34-47.
7. S. Burgdorf et al., Distinct pathways of antigen uptake and intracellular routing in CD4 and CD8 T cell activation, *Science*, vol. 316, no. 5824, 2007, pp. 612-6.
8. H. Yamane and W.E. Paul, Early signaling events that underlie fate decisions of naive CD4(+) T cells toward distinct T-helper cell subsets, *Immunol Rev*, vol. 252, no. 1, 2013, pp. 12-23.
9. J. Neefjes et al., Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation, *Nat Rev Immunol*, vol. 11, no. 12, 2011, pp. 823-36.
10. A. Fierabracci et al., The putative role of endoplasmic reticulum aminopeptidases in autoimmunity: insights from genomic-wide association studies, *Autoimmun Rev*, vol. 12, no. 2, 2012, pp. 281-8.
11. C. Kurts, B.W. Robinson and P.A. Knolle, Cross-priming in health and disease, *Nat Rev Immunol*, vol. 10, no. 6, 2010, pp. 403-14.
12. A. Taylor, Aminopeptidases: structure and function, *FASEB J*, vol. 7, no. 2, 1993, pp. 290-8.
13. M.M. Thunnissen, P. Nordlund and J.Z. Haeggstrom, Crystal structure of human leukotriene A(4) hydrolase, a bifunctional enzyme in inflammation, *Nat Struct Biol*, vol. 8, no. 2, 2001, pp. 131-5.
14. M. Tsujimoto et al., Biochemical and enzymatic properties of the M1 family of aminopeptidases involved in the regulation of blood pressure, *Heart Fail Rev*, vol. 13, no. 3, 2008, pp. 285-91.
15. J. Wang and M.D. Cooper, Histidine residue in the zinc-binding motif of aminopeptidase A is critical for enzymatic activity, *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 90, no. 4, 1993, pp. 1222-6.

16. G. Vazeux et al., Identification of glutamate residues essential for catalytic activity and zinc coordination in aminopeptidase A, *J Biol Chem*, vol. 271, no. 15, 1996, pp. 9069-74.
17. G. Vazeux et al., A glutamate residue contributes to the exopeptidase specificity in aminopeptidase A, *Biochem J*, vol. 334, 1998, pp. 407-13.
18. N. Luciani et al., Characterization of Glu350 as a critical residue involved in the N-terminal amine binding site of aminopeptidase N (EC 3.4.11.2): insights into its mechanism of action, *Biochemistry*, vol. 37, no. 2, 1998, pp. 686-92.
19. G. Vazeux et al., A tyrosine residue essential for catalytic activity in aminopeptidase A, *Biochem J*, vol. 327, 1997, pp. 883-9.
20. M. Tsujimoto, and A. Hattori, The oxytocinase subfamily of M1 aminopeptidases, *Biochim Biophys Acta*, vol. 1751, no. 1, 2005, pp. 9-18.
21. T. Rogi et al., Human placental leucine aminopeptidase/oxytocinase. A new member of type II membrane-spanning zinc metallopeptidase family, vol. 271, no. 1, 1996, pp. 56-61.
22. T. Saric et al., An IFN-gamma-induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides, *Nat Immunol*, vol. 3, no. 12, 2002, pp. 1169-76.
23. T. Tanioka et al., Human leukocyte-derived arginine aminopeptidase. The third member of the oxytocinase subfamily of aminopeptidases, *J Biol Chem*, vol. 278, no. 34, 2003, pp. 32275-83.
24. I.A. York et al., The ER aminopeptidase ERAP1 enhances or limits antigen presentation by trimming epitopes to 8-9 residues, *Nat Immunol*, vol. 3, no. 12, 2002, pp. 1177-84.
25. A. Hattori et al., Molecular cloning of adipocyte-derived leucine aminopeptidase highly related to placental leucine aminopeptidase/oxytocinase, *J Biochem*, vol. 125, no. 5, 1999, pp. 931-8.
26. L. Schomburg et al., Molecular characterization of a puromycin-insensitive leucyl-specific aminopeptidase, PILS-AP, *Eur J Biochem*, vol. 267, no. 11, 2000, pp. 3198-207.
27. X. Cui et al., Identification of ARTS-1 as a novel TNFR1-binding protein that promotes TNFR1 ectodomain shedding, *J Clin Invest*, vol. 110, no. 4, 2002, pp. 515-26.
28. T. Serwold et al., ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum, *Nature*, vol. 419, no. 6906, 2002, pp. 480-3.
29. G.E. Hammer et al., In the absence of aminopeptidase ERAAP, MHC class I molecules present many unstable and highly immunogenic peptides, *Nat Immunol*, vol. 8, no. 1, 2007, pp. 101-8.
30. I.A. York et al., Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 (ERAP1) trims MHC class I-presented peptides in vivo and plays an important

- role in immunodominance, *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 103, no. 24, 2006, pp. 9202-7.
31. X. Cui et al., Shedding of the type II IL-1 decoy receptor requires a multifunctional aminopeptidase, aminopeptidase regulator of TNF receptor type 1 shedding, *J Immunol*, vol. 171, no. 12, 2003, pp. 6814-9.
 32. X. Cui et al., An aminopeptidase, ARTS-1, is required for interleukin-6 receptor shedding, *J Biol Chem*, vol. 278, no. 31, 2003, pp. 28677-85.
 33. Y. Goto et al., Secretion of endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 is involved in the activation of macrophages induced by lipopolysaccharide and interferon-gamma, *J Biol Chem*, vol. 286, no. 24, 2011, pp. 21906-14.
 34. A. Hattori et al., Characterization of recombinant human adipocyte-derived leucine aminopeptidase expressed in Chinese hamster ovary cells, *J Biochem*, vol. 128, no. 5, 2000, pp. 755-62.
 35. M. Abe and Y. Sato, Puromycin insensitive leucyl-specific aminopeptidase (PILSAP) is required for the development of vascular as well as hematopoietic system in embryoid bodies, *Genes Cells*, vol. 11, no. 7, 2006, pp. 719-29.
 36. H. Miyashita et al., A mouse orthologue of puromycin-insensitive leucyl-specific aminopeptidase is expressed in endothelial cells and plays an important role in angiogenesis, *Blood*, vol. 99, no. 9, 2002, pp. 3241-9.
 37. N. Yamamoto et al., Identification of 33 polymorphisms in the adipocyte-derived leucine aminopeptidase (ALAP) gene and possible association with hypertension, *Hum Mutat*, vol. 19, no. 3, 2002, pp. 251-7.
 38. N. Blanchard et al., Immunodominant, protective response to the parasite *Toxoplasma gondii* requires antigen processing in the endoplasmic reticulum, *Nat Immunol*, vol. 9, no. 8, 2008, pp. 937-44.
 39. R. Draenert et al., Immune selection for altered antigen processing leads to cytotoxic T lymphocyte escape in chronic HIV-1 infection, *J Exp Med*, vol. 199, no. 7, 2004, pp. 905-15.
 40. D.M. Evans et al., Interaction between ERAP1 and HLA-B27 in ankylosing spondylitis implicates peptide handling in the mechanism for HLA-B27 in disease susceptibility, *Nat Genet*, vol. 43, no. 8, 2011, pp. 761-7.
 41. E.Y. Fung et al., Analysis of 17 autoimmune disease-associated variants in type 1 diabetes identifies 6q23/TNFAIP3 as a susceptibility locus, *Genes Immun*, vol. 10, no. 2, 2009, pp. 188-91.
 42. F.R. Guerini et al., A functional variant in ERAP1 predisposes to multiple sclerosis, *PLoS one*, vol. 7, no. 1, 2012, pp. e29931.

43. A. Strange et al., A genome-wide association study identifies new psoriasis susceptibility loci and an interaction between HLA-C and ERAP1, *Nat Genet*, vol. 42, no. 11, 2010, pp. 985-90.
44. T.T. Nguyen et al., Structural basis for antigenic peptide precursor processing by the endoplasmic reticulum aminopeptidase ERAP1, *Nat Struct Mol Biol*, vol. 18, no. 5, 2011, pp. 604-13.
45. D. Fruci et al., Expression of endoplasmic reticulum aminopeptidases in EBV-B cell lines from healthy donors and in leukemia/lymphoma, carcinoma, and melanoma cell lines, *J Immunol*, vol. 176, no. 8, 2006, pp. 4869-79.
46. L. Cifaldi et al., Natural killer cells efficiently reject lymphoma silenced for the endoplasmic reticulum aminopeptidase associated with antigen processing, *Cancer Res*, vol. 71, no. 5, 2011, pp. 1597-606.
47. G. Kochan 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*, vol. 108, no. 19, 2011, pp. 7745-50.
48. Y. Goto et al., Glutamine-181 is crucial in the enzymatic activity and substrate specificity of human endoplasmic-reticulum aminopeptidase-1, *Biochem J*, vol. 416, no. 1, 2008, pp. 109-16.
49. I. Evnouchidou et al., The internal sequence of the peptide-substrate determines its N-terminus trimming by ERAP1, *PloS one*, vol. 3, no. 11, 2008, pp. e3658.
50. S.C. Chang et 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*, vol. 102, no. 47, 2005, pp. 17107-12.
51. N. Blanchard et al., Endoplasmic reticulum aminopeptidase associated with antigen processing defines the composition and structure of MHC class I peptide repertoire in normal and virus-infected cells, *J Immunol*, vol. 184, no. 6, 2010, pp. 3033-42.
52. A. Gandhi et al., Structural insights into the molecular ruler mechanism of the endoplasmic reticulum aminopeptidase ERAP1, *Sci Rep*, vol. 1, 2011, pp. 186.
53. I. Evnouchidou, M.J. Berardi and E. Stratikos, A continuous fluorogenic assay for the measurement of the activity of endoplasmic reticulum aminopeptidase 1: competition kinetics as a tool for enzyme specificity investigation, *Anal Biochem*, vol. 395, no. 1, 2009, pp. 33-40.