



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΤΜΗΜΑ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ**  
**ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΚΟΥΤΣΙΛΙΕΡΗΣ ΜΙΧΑΗΛ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**Ρύθμιση της αντιγονοπαρουσίασης από τα μόρια τάξης I του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας, μέσω μεταβολών στην ενδοκυττάρια παραγωγή αντιγονικών επιτόπων**

**ΚΟΥΜΑΝΤΟΥ ΔΕΣΠΟΙΝΑ**  
**ΧΗΜΙΚΟΣ**

**ΑΘΗΝΑ**  
**ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2019**

## **ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

Ρύθμιση της αντιγονοπαρουσίασης από τα μόρια τάξης I του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας, μέσω μεταβολών στην ενδοκυττάρια παραγωγή αντιγονικών επιτόπων

## **ΚΟΥΜΑΝΤΟΥ ΔΕΣΠΟΙΝΑ**

### **ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:**

Φιλίππου Αναστάσιος, Αναπληρωτής Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

### **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ:**

Στρατικός Ευστράτιος, Ερευνητής Α', ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»

Φιλίππου Αναστάσιος, Αναπληρωτής Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

Κουτσιλιέρης Μιχαήλ, Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

### **ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:**

Στρατικός Ευστράτιος, Ερευνητής Α', ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»

Φιλίππου Αναστάσιος, Αναπληρωτής Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

Κουτσιλιέρης Μιχαήλ, Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

Μαυραγάνη Κλειώ, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

Χατζηγεωργίου Αντώνιος, Επίκουρος Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

Μαστέλλος Δημήτριος, Ερευνητής Α', ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»

Τσιτσιλώνη Ουρανία, Καθηγήτρια Τμήματος Βιολογίας, ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ: 17/10/2019



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα καρκινικά κύτταρα, προκειμένου να διαφύγουν της ανοσιακής επιτήρησης, τροποποιούν τη λειτουργία του μονοπατιού αντιγονοπαρουσίασης τάξης Ι οδηγώντας σε μη αποτελεσματική παρουσίαση αντιγονικών επιτόπων και ανθεκτικότητα στην ανοσοθεραπεία. Συνεπώς, η ρύθμιση της αντιγονοπαρουσίασης με σκοπό την παραγωγή νέων επιτόπων αποτελεί έναν πιθανό στόχο για την ενίσχυση της ανοσογονικότητας του όγκου. Η αμινοπεπτιδάση ERAP1 είναι ένα ένζυμο του ενδοπλασματικού δικτύου το οποίο καταλύει την υδρόλυση πεπτιδίων τα οποία προσδένονται στα μόρια ιστοσυμβατότητας τάξης Ι συμβάλλοντας έτσι στο σχηματισμό του ανοσοπεπτιδιώματος. Στην παρούσα διατριβή διερευνήσαμε την πιθανή μεταβολή του ανοσοπεπτιδιώματος ύστερα από χημική αναστολή της ERAP1 και προκειμένου να εξετάσουμε τη συγκεκριμένη υπόθεση, επιδράσαμε στην κυτταρική σειρά μεταστατικού κακοήθους μελανώματος A375 με την ένωση DG013A, έναν ισχυρό αναστολέα της ERAP1. Τα πεπτίδια τα οποία προσδένονται στα MHCΙ απομονώθηκαν με χρωματογραφία ανοσοσυγγένειας και οι αλληλουχίες τους προσδιορίστηκαν με υγρή χρωματογραφία και διπλή φασματομετρία μάζας. Η παρουσία του αναστολέα προκάλεσε ποιοτικές και ποσοτικές μεταβολές στο ανοσοπεπτιδιώμα των κυττάρων χωρίς όμως να μεταβάλλει τα επίπεδα έκφρασης των MHCΙ στην επιφάνεια των κυττάρων. Τα νέα πεπτίδια που παρουσιάστηκαν εμφανίζουν διαφορές στο μήκος και την αλληλουχία τους αλλά διατηρούν τα μοτίβα πρόσδεσης στα MHCΙ. Η αναστολή της ERAP1 είχε ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση μη βέλτιστων επιτόπων με πεπτίδια τα οποία αναμένεται να προσδένονται ισχυρά στα MHCΙ αποκαλύπτοντας πιθανή καταστρεπτική δράση της ERAP1 στη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά. Συνολικά, τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης αποτελούν ένδειξη ότι η χημική αναστολή της ERAP1 αποτελεί μία βιώσιμη προσέγγιση τροποποίησης του ανοσοπεπτιδιώματος με πιθανές εφαρμογές στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου.

**Θεματική περιοχή:** Μοριακή ανοσολογία

**Λέξεις κλειδιά:** Μελάνωμα, Ανοσοθεραπεία, Αντιγονοπαρουσίαση, ERAP1, Ανοσοπεπτιδιώμα

## ABSTRACT

Cancer cells, in order to evade immune surveillance, manipulate the function of various components of the class I antigen presentation pathway, resulting in reduced antigen presentation and thus resistance to immunotherapy. Therefore, manipulation of antigen presentation is a potential target to enhance tumor immunogenicity through the production of novel epitopes. ERAP1 is an enzyme that resides in the ER and catalyzes the hydrolysis of peptides that bind onto MHC I molecules, contributing to the formation of immunopeptidome. In this thesis we investigated the potential shift of the immunopeptidome upon chemical inhibition of ERAP1 and to test this hypothesis we treated A375 metastatic malignant melanoma cell line with DG013A, a potent ERAP1 inhibitor. To isolate the antigenic peptides, we used immunoprecipitation and to identify their sequences liquid chromatography and tandem mass spectrometry. The presence of the inhibitor induced qualitative and quantitative changes in cellular immunopeptidome, though without altering the MHC I expression levels on the cell surface. The novel peptides presented, differ in their length and sequence but they maintain their dominant binding motifs. ERAP1 inhibition resulted in substitution of a group of sub-optimal peptides with epitopes that are predicted to bind strongly onto MHC I molecules, revealing a potential destructive role of ERAP1 in this cell line. The results of this study hint that ERAP1 chemical inhibition is a viable approach to manipulate the immunopeptidome with potential applications in cancer immunotherapy.

**Subject area:** Molecular immunology

**Keywords:** Melanoma, Immunotherapy, Antigen presentation, ERAP1, Immunopeptidome

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	17
1.1	Ανθρώπινο ανοσοποιητικό σύστημα .....	17
1.1.1	Φυσική ανοσολογική απόκριση .....	17
1.1.2	Επίκτητη ανοσολογική απόκριση .....	18
1.2	Αντιγονοπαρουσίαση .....	22
1.2.1	Μονοπάτι αντιγονοπαρουσίασης τάξης I .....	23
1.2.2	Μονοπάτι αντιγονοπαρουσίασης τάξης II .....	27
1.2.3	Διασταυρούμενη αντιγονοπαρουσίαση .....	28
1.3	Οικογένεια αμινοπεπτιδασών M1 .....	30
1.3.1	Καταλυτικός μηχανισμός .....	31
1.3.2	Υποοικογένεια των ωκυτοκινασών .....	32
1.4	Η αμινοπεπτιδάση ERAP1 .....	34
1.4.1	Γενικά χαρακτηριστικά .....	34
1.4.2	Βιολογική δράση .....	36
1.4.3	Δομή της αμινοπεπτιδάσης ERAP1 .....	38
1.4.4	Ενζυμική λειτουργία .....	40
1.4.5	Σχέση της βιολογικής δράσης της ERAP1 με την παθογένεση ανθρωπίνων ασθενειών .....	44
1.4.6	Επίδραση της αμινοπεπτιδάσης ERAP1 στο ανοσοπεπτιδίωμα .....	47
1.5	Η αμινοπεπτιδάση ERAP2 .....	49
1.5.1	Γενικά χαρακτηριστικά .....	49
1.5.2	Βιολογική δράση .....	50
1.5.3	Δομή της αμινοπεπτιδάσης ERAP2 .....	51
1.5.4	Ενζυμική λειτουργία .....	53
1.5.5	Σχέση της βιολογικής δράσης της ERAP2 με την παθογένεση ανθρωπίνων ασθενειών .....	53
1.5.6	Επίδραση της αμινοπεπτιδάσης ERAP2 στο ανοσοπεπτιδίωμα .....	55
1.6	Το μονοπάτι αντιγονοπαρουσίασης τάξης I στον καρκίνο .....	56
1.6.1	Τα νεοαντιγόνα και η σημασία τους στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου .....	56
1.6.2	Ανοσοθεραπεία με αναστολείς ανοσολογικών σημείων ελέγχου .....	57

1.6.3	Απορρύθμιση της παρουσίασης και επεξεργασίας των αντιγονικών επιτόπων στον καρκίνο	58
1.7	Χημική αναστολή των αμινοπεπτιδασών ERAP1 και ERAP2	61
1.7.1	Η σημασία της αναστολής των αμινοπεπτιδασών ERAP1 και ERAP2	61
1.7.2	Ενώσεις με ανασταλτική δράση για τις αμινοπεπτιδάσες ERAP1 και ERAP2	61
2	ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	65
3	ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ	67
3.1	Καλλιέργειες ευκαρυωτικών κυττάρων	67
3.1.1	Κυτταρική σειρά High Five (B855-02, Life Technologies)	67
3.1.2	Κυτταρική σειρά HeLa-Kb (Ευγενική παραχώρηση των Δρ. Laurence J. Stern και Δρ. Kenneth Rock)	67
3.1.3	Κυτταρική σειρά A375 (ATCC, CRL-1619)	68
3.1.4	Κυτταρική σειρά υβριδώματος W6/32 (ATCC, HB-95)	68
3.2	Μέτρηση κυττάρων	69
3.3	Προετοιμασία κυττάρων για συντήρηση σε βαθιά ψύξη	70
3.3.1	Κύτταρα High Five	70
3.3.2	Κύτταρα θηλαστικών	70
3.4	Απόψυξη κυττάρων από υγρό άζωτο	71
3.5	Επιμόλυνση κυττάρων High Five για αναγέννηση βακιλοϊού (P2)	71
3.6	Επιμόλυνση κυττάρων High Five για παραγωγή των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών ERAP1 και ERAP2	72
3.7	Έκφραση και καθαρισμός των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών ERAP1 και ERAP2	72
3.8	Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)	75
3.9	Μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης ERAP1	76
3.10	In vitro πιλοδότηση της δραστηριότητας του αναστολέα DG013A	77
3.11	Κυτταρική δοκιμασία προσδιορισμού της τιμής EC50 του αναστολέα DG013A	78
3.11.1	Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων <i>E.coli</i> XL1-Blue για πολλαπλασιασμό πλασμιδιακού DNA	78
3.11.2	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA	79
3.11.3	Διαγνωστική πέψη και ανάλυση του πλασμιδιακού DNA	80
3.11.4	Διαμόλυνση κυττάρων HeLa-Kb με τους πλασμιδιακούς φορείς pTracer CMV2 13L και pTracer CMV2 8S	81
3.11.5	Επεξεργασία κυττάρων HeLa-Kb με τον αναστολέα DG013A	81
3.11.6	Κυτταρομετρία ροής	82

3.12	Επίδραση με ιντερφερόνη-γ στα κύτταρα A375.....	82
3.13	Ανίχνευση των αμινοπεπτιδασών ERAP1 και ERAP2 σε κύτταρα μελανώματος A375 83	
3.13.1	Λύση κυττάρων A375.....	83
3.13.2	Ποσοτικοποίηση ολικής πρωτεΐνης σε λύμα κυττάρων.....	84
3.13.3	Ανοσοαποτύπωση των πρωτεϊνών ERAP1 και ERAP2 σε λύμα κυττάρων A375.....	84
3.14	Προσδιορισμός πολυμορφισμών μονού νουκλεοτιδίου στο γονίδιο της αμινοπεπτιδάσης <i>ERAP1</i> .....	85
3.14.1	Απομόνωση γενομικού DNA .....	85
3.14.2	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	86
3.15	Επίδραση του αναστολέα DG013A σε κύτταρα A375.....	88
3.16	Ανίχνευση MHCΙ στην επιφάνεια των κυττάρων με κυτταρομετρία ροής .....	88
3.17	Δοκιμασία κυτταροτοξικότητας του αναστολέα DG013A.....	89
3.18	Έκφραση και απομόνωση του αντισώματος W6/32 .....	90
3.19	Πρόσδεση αντισώματος W6/32 σε στήλη ενεργοποιημένης σεφαρόζης με CN-Br .....	91
3.20	Απομόνωση ανοσοπεπτιδιώματος από κύτταρα A375.....	92
3.21	Καθαρισμός ανοσοπεπτιδιώματος με αναλώσιμες στήλες C18.....	93
3.22	Φασματομετρία μάζας.....	94
4	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	95
4.1	In vitro χαρακτηρισμός της ένωσης DG013A ως αναστολέα της αμινοπεπτιδάσης ERAP1 .....	95
4.2	Χαρακτηρισμός κυτταρικής σειράς μελανώματος A375.....	102
4.2.1	Εκτίμηση κυτταροτοξικότητας του αναστολέα στα κύτταρα A375 .....	102
4.2.2	Γονοτυπική ανάλυση των μορίων ιστοσυμβατότητας των κυττάρων A375 .....	102
4.2.3	Έκφραση των αμινοπεπτιδασών ERAP1 και ERAP2 στα κύτταρα A375.....	103
4.2.4	Επίδραση του αναστολέα DG013A στην έκφραση των MHCΙ .....	105
4.2.5	Προσδιορισμός γενετικών πολυμορφισμών στο γονίδιο της <i>ERAP1</i> .....	106
4.3	Ανάλυση του ανοσοπεπτιδιώματος κυττάρων A375.....	108
5	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	124
6	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	129
7	ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ- ΑΡΤΙΚΟΛΕΞΑ - ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ.....	140
8	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ – ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ.....	144





## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού υδρόλυσης του N-τελικού αμινοξέος ενός πεπτιδίου από την αμινοπεπτιδάση ERAP1 [57].	32
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 [58].	33
Σχήμα 4: Σχηματική αναπαράσταση των δομικών περιοχών των αμινοπεπτιδασών της υποοικογένειας των ωκυτοκινασών [58].	34
Σχήμα 5: Σχηματική αναπαράσταση των δύο κύριων μεταγράφων του γονιδίου της αμινοπεπτιδάσης ERAP1 [64].	35
Σχήμα 6: Ανοιχτή (PDB 3MDJ) και κλειστή (PDB 2YDO) διαμόρφωση της αμινοπεπτιδάσης ERAP1. Μπλε: δομική περιοχή I, πράσινο: δομική περιοχή II, πορτοκαλί: δομική περιοχή III, μωβ: δομική περιοχή IV. [85].	39
Σχήμα 7: Αλληλεπιδράσεις των αμινοξέων του καταλυτικού κέντρου της ERAP1 με τον αναστολέα αμινοπεπτιδασών μπεστατίνη (μπλε ράβδοι) [84].	40
Σχήμα 8: Προτεινόμενοι μηχανισμοί για την επεξεργασία των αντιγονικών επιτόπων από την αμινοπεπτιδάση ERAP1. Αριστερά: Η αμινοπεπτιδάση ERAP1 υδρολύει τους πρόδρομους αντιγονικούς επιτόπους στο διάλυμα. Οι ώριμοι επίτοποι φορτώνονται στα MHCI ενώ τα μικρότερα πεπτιδία δεν καταφέρνουν να παρουσιαστούν. Δεξιά: Οι πρόδρομοι αντιγονικοί επίτοποι προσδένονται μερικώς στα MHCI και στη συνέχεια δημιουργείται ένα σύμπλεγμα MHCI-πεπτιδίου-ERAP1. Όταν το πεπτιδίον αποκτήσει κατάλληλο μήκος η ERAP1 αποδεσμεύεται [89].	42
Σχήμα 9: Πολυμορφικές θέσεις στην αλληλουχία της αμινοπεπτιδάσης ERAP1. Στο σχήμα φαίνονται οι παραλλαγές των αμινοξέων στην κάθε θέση [102].	44
Σχήμα 10: Σχηματική αναπαράσταση των δύο κύριων μεταγράφων του γονιδίου της αμινοπεπτιδάσης ERAP2 [64].	50
Σχήμα 11: Αναπαράσταση της δομής της αμινοπεπτιδάσης ERAP2 η οποία προσομοιάζει την κλειστή διαμόρφωση της ERAP1 (δομική περιοχή I: μπλε, δομική περιοχή II: πράσινο, δομική περιοχή III: πορτοκαλί, δομική περιοχή IV: μωβ) [141].	52
Σχήμα 12: Χημικές δομές των αναστολέων των αμινοπεπτιδασών λευκινθειόλη, μπεστατίνη και αμαστατίνη [85].	62
Σχήμα 13: Παράγωγα του 3,4 δι-αμινο-βενζοϊκού οξέος τα οποία εμφανίζουν διαφορετική εξειδίκευση για τις αμινοπεπτιδάσες ERAP1 και ERAP2 [85].	63
Σχήμα 14: Στήλη NiNTA: Τα ιόντα Ni <sup>2+</sup> είναι δεσμευμένα ομοιοπολικά σε ρητίνη αгарόζης στα οποία δεσμεύεται η ετικέτα ιστιδινών της πρωτεΐνης. ( <a href="http://www.agr.kuleuven.ac.be/dp/logt/practicum2001/proef9.htm">http://www.agr.kuleuven.ac.be/dp/logt/practicum2001/proef9.htm</a> )	74
Σχήμα 15: Πλασμιδιακός φορέας pTracer-CMV2 ο οποίος φέρει στην αλληλουχία του μίνι-γονίδιο που κωδικοποιεί τον πρόδρομο επίτοπο LEQLESIIINFEKL.	79
Σχήμα 16: Χημική δομή του αναστολέα DG013A	95
Σχήμα 17: Καμπύλη τιτλοδότησης in vitro του αναστολέα DG013A με την αμινοπεπτιδάση ERAP1.	96
Σχήμα 18: Μείωση της έντασης φθορισμού σε κύτταρα HeLa παρουσία του αναστολέα DG013A.	98

Σχήμα 19: Διαγράμματα στικτογράμματος κυτταρικών πληθυσμών πειράματος ελέγχου. ....	99
Σχήμα 20: Μείωση της έντασης φθορισμού σε κύτταρα HeLa παρουσία του αναστολέα DG013A μετά από αποκλεισμό κυττάρων που δεν εκφράζουν GFP. ....	100
Σχήμα 21: Διαφορές στη μέση ένταση φθορισμού (A) και στον αριθμό των κυττάρων (B) για τους διάφορους χρόνους επώασης. ....	101
Σχήμα 22: Σύγκριση των τιμών EC50 και IC50 για τον αναστολέα DG013A. ....	101
Σχήμα 23: Δοκιμασία κυτταροτοξικότητας MTT του αναστολέα DG013A στα κύτταρα A375. ..	102
Σχήμα 24: Επίπεδα έκφρασης mRNA των ERAP1 και ERAP2 σε κύτταρα A375 (A). Επίπεδα έκφρασης πρωτεϊνών των ERAP1 και ERAP2 σε κύτταρα A375 (B). ....	105
Σχήμα 25: Επίπεδα έκφρασης των MHCΙ στην επιφάνεια των κυττάρων A375 μετά από επίδραση με τον αναστολέα DG013A. ....	106
Σχήμα 26: Σύγκριση σταθερών συσχέτισης Pearson μεταξύ των επαναλήψεων των πειραμάτων ελέγχου, αναστολέα και μεταξύ των διαφορετικών συνθηκών. ....	109
Σχήμα 27: Διαγράμματα διασποράς των εντάσεων των πεπτιδίων κάθε δείγματος. ....	109
Σχήμα 28: Διάγραμμα διασποράς των εντάσεων των πεπτιδίων που προσδιορίστηκαν σε κάθε συνθήκη. ....	110
Σχήμα 29: Διάγραμμα τύπου volcano το οποίο εμφανίζει τα στατιστικώς σημαντικά πεπτίδια μεταξύ των τριών επαναλήψεων. Τα στατιστικώς σημαντικά πεπτίδια τα οποία έχουν 4 φορές διαφορά στην ένταση τους χαρακτηρίζονται ως ειδικά για κάθε συνθήκη. ....	111
Σχήμα 30: Προβλεπόμενες τιμές χημικής συγγένειας των πεπτιδίων όπως αυτές υπολογίστηκαν από το λογισμικό NetMHCcons 1.1. Στο κόκκινο πλαίσιο φαίνονται τα πεπτίδια τα οποία αναμένεται να προσδένονται στα MHCΙ με τιμή μικρότερη του 1μM. ....	112
Σχήμα 31: Αριθμός των αντιγονικών πεπτιδίων που αντιστοιχούν στην κάθε συνθήκη. ....	113
Σχήμα 32: Κατανομή μήκους των πεπτιδίων των τριών συνθηκών. ....	114
Σχήμα 33: Κατανομή μήκους των πεπτιδίων των τριών συνθηκών με χημική συγγένεια μικρότερη του 1μM. ....	115
Σχήμα 34: Κατανομή 1 <sup>ου</sup> αμινοξέος όλων των πεπτιδίων σε κάθε συνθήκη (A). Κατανομή 1 <sup>ου</sup> αμινοξέος των πεπτιδίων με χημική συγγένεια <1μM σε κάθε συνθήκη (B). ....	116
Σχήμα 35: Διάγραμμα διασποράς των εντάσεων των πεπτιδίων που προσδιορίστηκαν σε κάθε συνθήκη. Με μαύρες κουκίδες φαίνονται τα πεπτίδια που φέρουν προλίνη στο N-τελικό άκρο P(1), στη θέση 2 P(2) ή προλίνη στη θέση 1 και ασπαρτικό οξύ στη θέση -1 D(-1)P(1). ....	117
Σχήμα 36: Προβλεπόμενες τιμές χημικής συγγένειας (A) και κατανομή μήκους (B) για τα πεπτίδια P(1), P(2) και D(-1)P(1). ....	118
Σχήμα 37: Ομαδοποίηση κατά Gibbs των πεπτιδίων μήκους 9 αμινοξέων. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τα λογισμικά GibbsCluster-2.0 Server και Seq2logo. ...	119
Σχήμα 38: Ομαδοποίηση κατά Gibbs των πεπτιδίων μήκους 10 αμινοξέων. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τα λογισμικά GibbsCluster-2.0 Server και Seq2logo. ...	120
Σχήμα 39: Διαγράμματα WebLogo για τα 11μερή πεπτίδια και στις τρεις συνθήκες. ....	121
Σχήμα 40: Κατανομή πεπτιδίων βάσει της ομαδοποίησης κατά Gibbs. ....	122

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Μηχανισμοί κυτταροτοξικότητας επαγόμενοι από κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα. Α: Έμμεση καταστροφή των κυττάρων-στόχων με έκκριση TNFα και IFN-γ. Β: Επαγωγή της απόπτωσης σε κύτταρα στόχους μέσω διέγερσης υποδοχέων του προσδέτη Fas. Γ: Άμεση καταστροφή των κυττάρων μέσω έκκρισης περφορίνης και θρυμματίνης Β [7].	20
Εικόνα 2: Μοριακές αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα κατά το σχηματισμό της ανοσολογικής σύναψης. Μετά από πρόσδεση του TCR με ένα πεπτιδικό αντιγόνο που παρουσιάζεται από τα MHC ακολουθεί μια χωροταξική δυναμική και ελεγχόμενη ανακατανομή πολλών μορίων εκτός του TCR όπως ιντεγκρίνες, συνυποδοχείς και σηματοδοτικά μόρια στην περιοχή της ανοσολογικής σύναψης [13].	21
Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση του μονοπατιού αντιγονοπαρουσίασης τάξης I όπου φαίνεται η επεξεργασία και η παρουσίαση ενδοκυτταρικών ιικών πρωτεϊνών και πρωτεϊνών εξωγενούς προέλευσης. Στο σχήμα φαίνεται επίσης η βιοσύνθεση των MHC I μέσα στο ΕΔ [38].	26
Εικόνα 4: Σχηματική απεικόνιση του μονοπατιού αντιγονοπαρουσίασης τάξης II. Τα μόρια MHC II αλληλεπιδρούν στο ΕΔ παρουσία της αλυσίδας Ii και μέσω του συστήματος Golgi μεταβαίνουν στο κυτταρικό διαμέρισμα MIIC. Εκεί προσδένουν πεπτιδικά αντιγόνα από ενδοσώματα και μεταφέρονται στην πλασματική μεμβράνη [40].	28
Εικόνα 5: Μονοπάτια επεξεργασίας αντιγονικών επιτόπων των MHC I κατά τη διασταυρούμενη αντιγονοπαρουσίαση. 1: Κλασικό μονοπάτι αντιγονοπαρουσίασης τάξης I. 2,3: Αντιγονοπαρουσίαση μέσω φαγοσωμάτων ή εξειδικευμένων ενδοσωμάτων. 4: Μονοπάτι μέσω κενοτοπίων ανεξάρτητο του πρωτεασώματος [49].	30
Εικόνα 6: Αναστολή ανοσολογικών σημείων ελέγχου. Αριστερά: Έκφραση του υποδοχέα CTLA-4 στους λεμφαδένες. Δεξιά: Έκφραση του υποδοχέα PD-1 σε περιφερικούς ιστούς. Στην εικόνα φαίνονται και τα εγκεκριμένα αντισώματα για τους CTLA-4, PD-1 και PD-L1 [167].	58
Εικόνα 7: Φάσμα απορρόφησης του πλασμιδίου pTracer-CMV2 13L.	97
Εικόνα 8: Ηλεκτροφόρημα πλασμιδιακού DNA σε πηκτή αгарόζης 1%.	97
Εικόνα 9: Ανοσοαποτύπωμα της αμινοπεπτιδάσης ERAP1 σε λύμα κυττάρων A375 με ή χωρίς προσθήκη ιντερφερόνης-γ.	104
Εικόνα 10: Ανοσοαποτύπωμα των αμινοπεπτιδασών ERAP1 και ERAP2 σε λύμα κυττάρων A375.	104
Εικόνα 11: Χρωματογραφήματα αλληλούχησης των εξωνίων 11, 12 και 15 του γονιδίου της ERAP1 με εκκινητές με κατεύθυνση 5'-3'.	107
Εικόνα 12: Χρωματογραφήματα αλληλούχησης των εξωνίων 11, 12 και 15 του γονιδίου της ERAP1 με εκκινητές με κατεύθυνση 3'-5'.	108

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Ποσότητες αντιδραστηρίων για παρασκευή πηκτών για ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE με το σύστημα OmniPage. ....	76
Πίνακας 2: Ποσότητες αντιδραστηρίων για την ενίσχυση των εξωνίων 11, 12 και 15 της ERAP1 χρησιμοποιώντας Ταq πολυμεράση.....	87
Πίνακας 3: Συνθήκες θερμικής κυκλοποίησης των εξωνίων 11, 12 και 15 της ERAP1.....	87
Πίνακας 4: Αλληλόμορφα MHC I τα οποία εκφράζονται από τα κύτταρα A375. Με <b>Bold</b> επισημαίνονται τα βασικά αμινοξέα αγκυροβόλησης ενώ με <i>Italic</i> τα δευτερεύοντα.....	103

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ – ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διατριβή έλαβε χώρα στο εργαστήριο χημείας πρωτεϊνών του Ινστιτούτου Πυρηνικών & Ραδιολογικών Επιστημών, Τεχνολογίας, Έρευνας & Ασφάλειας (Ι.Π.Ρ.Ε.Τ.Ε.Α.) του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος», υπό την κύρια επίβλεψη του Δρ. Στρατίκου Ευστράτιου, Ερευνητή Α'. Η εργασία εκπονήθηκε κατά την περίοδο 2015-2019 στα πλαίσια απόκτησης διδακτορικού διπλώματος από το Εργαστήριο Πειραματικής Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ και χρηματοδοτήθηκε από το μη κερδοσκοπικό οργανισμό Harry J Lloyd Charitable Trust.

Καταρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Δρ. Ευστράτιο Στρατίκο για τη δυνατότητα να πραγματοποιήσω στο εργαστήριο του τη διδακτορική μου διατριβή πάνω σε ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον θέμα, καθώς επίσης για όλες τις γνώσεις που αποκόμισα κατά τη συνεργασία μας αλλά και για τη συνεχή υποστήριξη του.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής: τον επιβλέποντα Αναπληρωτή καθηγητή Αναστάσιο Φιλίππου (Ιατρική Σχολή ΕΚΠΑ) και τον καθηγητή Μιχαήλ Κουτσιλιέρη για τη βοήθεια και την καθοδήγηση τους, όπως και τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής: την αναπληρώτρια καθηγήτρια Μαυραγάνη Κλειώ (Ιατρική Σχολή ΕΚΠΑ), τον επίκουρο καθηγητή Χατζηγεωργίου Αντώνιο (Ιατρική Σχολή ΕΚΠΑ), τον ερευνητή Α' Δημήτριο Μαστέλλο (Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος») και την καθηγήτρια Ουρανία Τσιτσιλώνη για τη συμβολή τους στην ολοκλήρωση της διατριβής.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους συνεργάτες που συνέβαλαν στην περάτωση της παρούσας εργασίας. Συγκεκριμένα θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συνεργάτες από το πανεπιστήμιο Technion του Ισραήλ, τον καθηγητή Arie Admon και τον Δρ. Eilon Barnea για την συνεργασία τους στο κομμάτι της φασματομετρίας μάζας. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τον αναπληρωτή καθηγητή Γεωργιάδη Δημήτριο και τη Δρ. Κοκκάλα Παρασκευή για τη σύνθεση του αναστολέα. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω από το Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. Δημόκριτος, τον Δρ. Παπακυριακού Αθανάσιο και τον Δρ. Πρατσίνη Χαράλαμπο για τις γνώσεις που μου παρείχαν κατά την εκπόνηση των πειραμάτων αυτής της διατριβής. Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στο εργαστήριο του Δρ. Lopez de Castro και ιδιαίτερα στον Δρ. Adrian Martin Esteban για την πολύτιμη βοήθεια τους και τις συμβουλές τους.

Κλείνοντας θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Χημείας Πρωτεϊνών με τα οποία συνεργάστηκα κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής. Συγκεκριμένα θα ήθελα να ήθελα να ευχαριστήσω τους Δρ. Αθανάσιο Σταμμόγιανο, Δρ. Αλέξανδρο Πετρόπουλο, κ. Μαυρίδη Γεώργιο, Δρ. Γκιάστα Πέτρο και κ. Τεμπονέρα Ιωάννη για την καθημερινή συνεργασία και την ουσιαστική βοήθεια που μου παρείχαν. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τη Δρ. Μπακάλη Αναστασία για τη συνεχή βοήθεια της, όλες τις γνώσεις που απέκτησα κατά τη συνεργασία μας καθώς και για την καθημερινή υποστήριξη της.

## **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**



# 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Ανθρώπινο ανοσοποιητικό σύστημα

Το περιβάλλον μας περιλαμβάνει μια πληθώρα παραγόντων οι οποίοι έχουν τη δυνατότητα να προκαλούν μολυσματικές ασθένειες και συλλογικά καλούνται παθογόνα [1]. Αν και η φύση τους ποικίλει, όλα μπορούν να χρησιμοποιήσουν τις ιδιότητες του κυττάρου-ξενιστή για να επιτύχουν τη μόλυνσή του, ενώ το χαρακτηριστικό εξελικτικό τους πλεονέκτημα είναι ότι υπόκεινται σε ταχείες μεταλλαγές. Πολλά είδη, μεταξύ τους και ο άνθρωπος, προκειμένου να επιβιώσουν, έχουν αναπτύξει μια πληθώρα αμυντικών μηχανισμών που σκοπό έχουν τόσο να αποτρέψουν όσο και να αντιμετωπίσουν μια μόλυνση. Το σύνολο αυτών των μηχανισμών αποτελεί το ανοσοποιητικό σύστημα το οποίο χρησιμοποιεί εξειδικευμένα κύτταρα και μόρια τα οποία δρουν συντονισμένα προκειμένου να προκαλέσουν μια αποτελεσματική απόκριση ενάντια στο παθογόνο που αντιμετωπίζουν. Το ανοσοποιητικό σύστημα χωρίζεται σε δύο διακριτές συνιστώσες, τη φυσική ανοσολογική απόκριση, οι μηχανισμοί της οποίας τίθενται άμεσα σε λειτουργία μετά τη μόλυνση και την επίκτητη ανοσολογική απόκριση η οποία είναι απόλυτα εξειδικευμένη για το παθογόνο που αντιμετωπίζει.

### 1.1.1 Φυσική ανοσολογική απόκριση

Η φυσική ανοσία αποτελεί την μη ειδική άμυνα των οργανισμών ενάντια στην εισβολή των παθογόνων μικροοργανισμών καθώς δεν είναι εξειδικευμένη για το είδος του παθογόνου που αντιμετωπίζει κάθε φορά. Η φυσική ανοσολογική απόκριση ενεργοποιείται άμεσα και περιλαμβάνει μια πληθώρα μηχανισμών οι οποίοι δεν απαντώνται μόνο στα σπονδυλωτά αλλά είναι διατηρημένοι σε ασπόνδυλα και φυτά ενώ η εξέλιξή τους συμπίπτει με το πρώτο σχηματισμό πολυκύτταρων οργανισμών [2]. Μια κατηγορία των μηχανισμών αυτών που αποτελούν και την πρώτη γραμμή άμυνας, είναι οι φυσικοί και χημικοί φραγμοί οι οποίοι αποτρέπουν την είσοδο των παθογόνων στον οργανισμό. Μερικοί από αυτούς τους φραγμούς είναι η εξωτερική κεράτινη στιβάδα του δέρματος, το όξινο pH του στομάχου, ο στεγανός κυτταρικός σύνδεσμος των επιθηλιακών κυττάρων, συστατικά της βλέννας (π.χ. ένζυμα και αντιμικροβιακά πεπτιδία) αλλά και η φυσική μικροχλωρίδα του οργανισμού η οποία εμποδίζει τον αποικισμό άλλων μικροβίων. Η δεύτερη γραμμή άμυνας λαμβάνει χώρα ενδοκυτταρικά μέσω σύντηξης των φαγοσωμάτων με λυσοσώματα (βακτήρια) ή αποικοδόμησης του δίκλωνου RNA το οποίο παράγεται κατά τον

πολλαπλασιασμό των ιών και δεν είναι φυσιολογικό συστατικό του κυττάρου. Τέλος, η φυσική ανοσολογική απόκριση επιστρατεύει ειδικές πρωτεΐνες διαλυτές στον ορό του αίματος (συμπλήρωμα) και φαγοκύτταρα όπως τα μακροφάγα, τα ουδετερόφιλα και τα δενδριτικά κύτταρα προκειμένου να εξαλείψει τη μόλυνση αλλά και να θέσει σε λειτουργία τις επίκτητες αποκρίσεις μέσω της αντιγονοπαρουσίασης [1]. Τα κύτταρα 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) και βρίσκονται τόσο στη μεμβράνη όσο και ενδοκυτταρικά (π.χ. Toll-like receptors ή TLRs) [3].

### **1.1.2 Επίκτητη ανοσολογική απόκριση**

Η επίκτητη ανοσολογική απόκριση διεκπεραιώνεται από ειδικά λευκά αιμοσφαίρια τα οποία ονομάζονται λεμφοκύτταρα και χωρίζονται σε δύο μεγάλες υποκατηγορίες, τα T και τα B λεμφοκύτταρα, τα οποία πραγματοποιούν αποκρίσεις που καλούνται κυτταρική και χυμική ανοσολογική απόκριση, αντίστοιχα [1]. Σε αντίθεση με τη φυσική ανοσία, η επίκτητη ανοσολογική απόκριση είναι απόλυτα εξειδικευμένη για το παθογόνο το οποίο αντιμετωπίζει. Ενώ η αναγνώριση των παθογόνων από τα κύτταρα της φυσικής ανοσίας βασίζεται στην ύπαρξη συντηρημένων μοτίβων, τα λεμφοκύτταρα μπορούν να ξεχωρίσουν μόρια με πολύ υψηλό βαθμό ομολογίας, όπως πρωτεΐνες που διαφέρουν σε ένα μόνο αμινοξύ ή οπτικά ισομερή. Προκειμένου να επιτευχθεί ο υψηλός βαθμός ποικιλομορφίας που απαιτείται για την αναγνώριση αντιγόνων, λαμβάνει χώρα γενετικός ανασυνδυασμός γονιδιακών περιοχών όπου κωδικοποιούνται οι μεταβλητές περιοχές των μορίων τις επίκτητης ανοσίας που συμμετέχουν στην αναγνώριση του τμήματος του παθογόνου μικροοργανισμού, το οποίο καλείται αντιγόνο. Οι επίκτητες αποκρίσεις εμφανίζουν την ιδιότητα της μνήμης για το αντιγόνο που αντιμετωπίζουν το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την άμεση ενεργοποίησή τους σε επόμενη έκθεση του οργανισμού στο παθογόνο. Πρόσφατα πειραματικά δεδομένα ωστόσο υποδεικνύουν ότι αντίστοιχοι μηχανισμοί ανοσολογικής μνήμης (innate/trained immunity) επιστρατεύονται και από κύτταρα της φυσικής ανοσίας (μακροφάγα, κύτταρα-φυσικοί φονείς) [4].

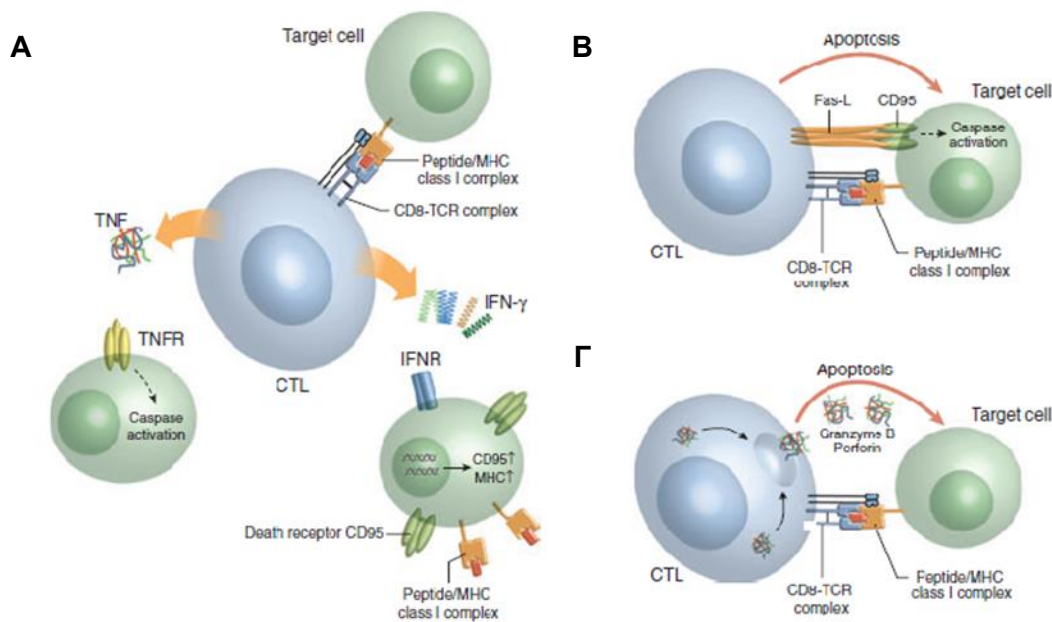
#### **1.1.2.1 Χυμική ανοσολογική απόκριση**

Η χυμική ανοσολογική απόκριση περιλαμβάνει τη δράση των Β-λεμφοκυττάρων, βασική λειτουργία των οποίων είναι η παραγωγή και η έκκριση εξειδικευμένων πρωτεϊνών που λέγονται ανοσοσφαιρίνες ή αντισώματα [5]. Τα αντισώματα έχουν την ικανότητα να προσδένονται ειδικά με το αντιγόνο και αφενός εμποδίζουν την πρόσδεση τους με τα κύτταρα-ξενιστές και αφετέρου τα καθιστούν στόχους προς εξάλειψη. Τα Β-λεμφοκύτταρα ενεργοποιούνται μετά από πρόσδεση του αντιγόνου σε ειδικούς υποδοχείς της πλασματικής τους μεμβράνης που ονομάζονται BCRs και έχει σαν αποτέλεσμα τη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό δραστικών κυττάρων όπως τα πλασματοκύτταρα τα οποία εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες αντισωμάτων. Β-λεμφοκύτταρα τα οποία λαμβάνουν κατάλληλα σήματα διαφοροποίησης έχουν τη δυνατότητα να μεταβούν στα βλαστικά κέντρα όπου και υποβάλλονται σε πολύπλοκες διαδικασίες όπως σωματικές υπερμεταλλάξεις και γενετικούς ανασυνδυασμούς που οδηγούν σε αλλαγή της τάξης τους (μετάπτωση τάξης). Αυτές οι αλλαγές έχουν αποτέλεσμα την παραγωγή Β-κυττάρων μνήμης και πλασματοκυττάρων με μεγάλο χρόνο ζωής (LLPCs) τα οποία και θα ενεργοποιηθούν άμεσα σε επόμενη έκθεση του οργανισμού στο ίδιο αντιγόνο. Στους μηχανισμούς της χυμικής ανοσολογικής απόκρισης βασίζεται η δράση πολλών αποτελεσματικών εμβολίων [6].

### 1.1.2.2 Κυτταρική ανοσολογική απόκριση

Με τον όρο επίκτητη κυτταρική ανοσολογική απόκριση αναφερόμαστε στους μηχανισμούς με τους οποίους τα Τ-λεμφοκύτταρα αντιμετωπίζουν παθογόνους μικροοργανισμούς. Τα Τ-λεμφοκύτταρα παράγονται στο μυελό των οστών και ωριμάζουν στο θύμο αδένα μετά από επαγωγή της έκφρασης του αντιγονικού υποδοχέα TCR. Ο TCR είναι ένας μεμβρανικός υποδοχέας που αναγνωρίζει το αντιγόνο όταν αυτό είναι δεσμευμένο σε μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας. Εκτός από τον TCR, τα Τ-λεμφοκύτταρα εκφράζουν ένα πλήθος συνυποδοχέων οι οποίοι συμβάλλουν στην αποτελεσματική ενεργοποίησή τους. Ανάλογα με τον συνυποδοχέα που εκφράζουν, τα Τ-λεμφοκύτταρα χωρίζονται σε βοηθητικά (CD4<sup>+</sup>) και κυτταροτοξικά (CD8<sup>+</sup>) τα οποία εμφανίζουν διακριτές λειτουργίες στην ανοσολογική απόκριση [7]. Τα βοηθητικά CD4<sup>+</sup> Τ-λεμφοκύτταρα αφού αναγνωρίσουν ένα αντιγόνο διαφοροποιούνται σε δραστικά (effector) τα οποία εκκρίνουν κυτταροκίνες όπως η ιντερφερόνη-γ (IFN-γ) και οι ιντερλευκίνες 4 και 10 (IL-4, IL-10) οι οποίες ενεργοποιούν τόσο την κυτταρική όσο και τη χυμική ανοσολογική απόκριση [8]. Εκτός από κύτταρα μνήμης τα βοηθητικά Τ-λεμφοκύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν σε ρυθμιστικά Τ-λεμφοκύτταρα τα οποία αποτρέπουν την ανεξέλεγκτη ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος [9]. Τα μη ενεργοποιημένα κυτταροτοξικά Τ-

λεμφοκύτταρα επιτηρούν τα κύτταρα του οργανισμού προκειμένου να ανιχνεύσουν και να εξαλείψουν πιθανές απειλές, όπως κύτταρα που έχουν μολυνθεί από ιό ή ενδοκυτταρικά παράσιτα αλλά και κύτταρα που έχουν υποστεί καρκινική εξαλλαγή. Το πρώτο στάδιο ενεργοποίησης των CD8+ T-λεμφοκυττάρων περιλαμβάνει τη διαφοροποίησή τους σε δραστικά, τα οποία στη συνέχεια έχουν τη δυνατότητα να αναγνωρίσουν το αντιγόνο και να εκδηλώσουν την κυτταροτοξική τους δράση μέσω τριών διακριτών μηχανισμών (Εικόνα 1). Το πρώτο μονοπάτι σηματοδοτείται από κυτταροκίνες όπως η IFN- $\gamma$  και ο TNF $\alpha$ . Ο TNF $\alpha$  προσδένεται στον υποδοχέα του σε γειτονικά κύτταρα και έτσι ενεργοποιείται ο καταρράκτης των κασπασών ενώ η IFN- $\gamma$  προάγει τη μεταγραφή γονιδίων του μονοπατιού αντιγονοπαρουσίασης των MHC I και του Fas. 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 κλασικού καταρράκτη των κασπασών. Ο δεύτερος μηχανισμός περιλαμβάνει έκκριση

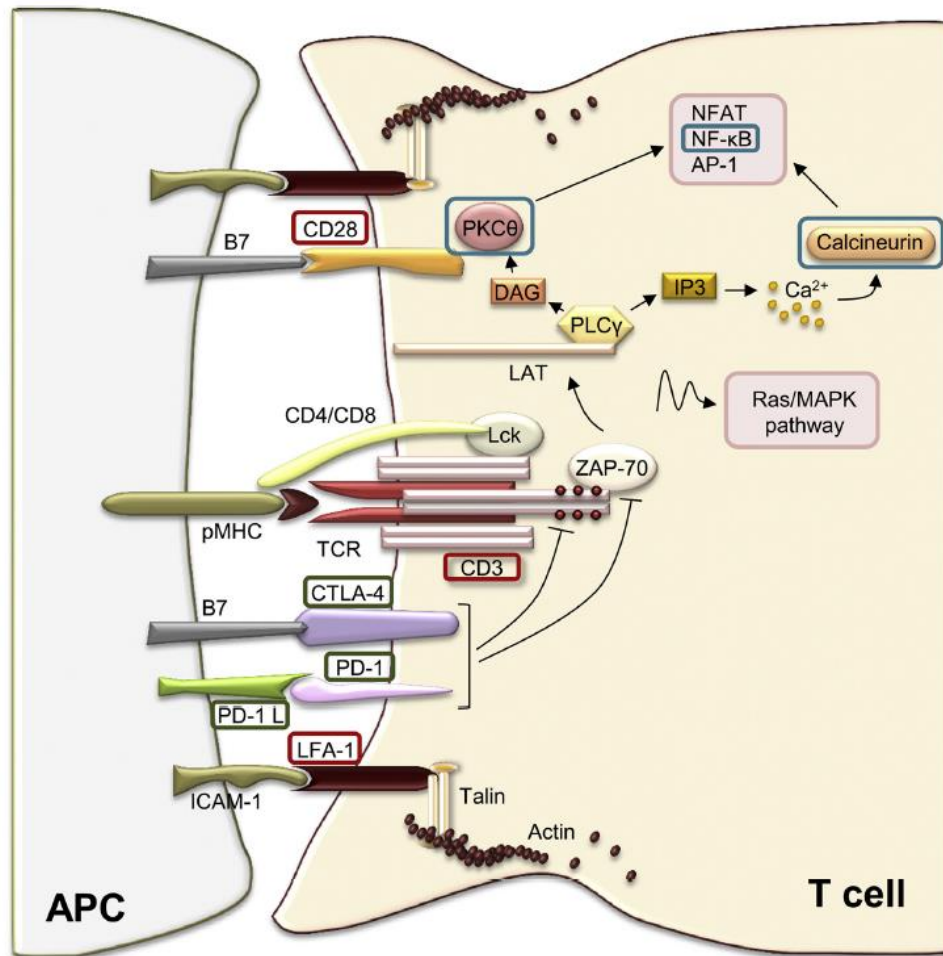


**Εικόνα 1: Μηχανισμοί κυτταροτοξικότητας επαγόμενοι από κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα. Α: Έμμεση καταστροφή των κυττάρων-στόχων με έκκριση TNF $\alpha$  και IFN- $\gamma$ . Β: Επαγωγή της απόπτωσης σε κύτταρα στόχους μέσω διέγερσης υποδοχέων του προσδέτη Fas. Γ: Άμεση καταστροφή των κυττάρων μέσω έκκρισης περφορίνης και θρυμματινής Β [7].**

περφορίνης και θρυμματινών τα οποία είναι πολύ τοξικά για τα κύτταρα και προκαλούν κυτταρικό θάνατο και μέσω κασπασών αλλά και άλλων μηχανισμών [7],[10].

### 1.1.2.3 Ανοσολογική σύναψη

Το σύνολο των μοριακών αλληλεπιδράσεων που συμβάλλουν στη ρύθμιση των ανοσολογικών αποκρίσεων και λαμβάνει χώρα στον εξωκυττάριο χώρο μεταξύ T-λεμφοκυττάρων και αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων, καλείται ανοσολογική σύναψη [11]. Η ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων εξαρτάται απόλυτα από το σωστό σχηματισμό της ανοσολογικής σύναψης καθώς εξασφαλίζει τη σωστή έκκριση των κυτταροκινών και των λυτικών κοκκίων που απαιτούνται για να καταστρέψουν το κύτταρο-στόχο προστατεύοντας τα υγιή [12]. Η ανοσολογική σύναψη εμφανίζει πολλές ομοιότητες με την κλασική νευρολογική σύναψη καθώς παρατηρείται ροή  $Ca^{2+}$ , πύλωση των T-λεμφοκυττάρων και τοπική σταθεροποίηση (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Μοριακές αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα κατά το σχηματισμό της ανοσολογικής σύναψης. Μετά από πρόσδεση του TCR με ένα πεπτιδικό αντιγόνο που παρουσιάζεται από τα MHC

ακολουθεί μια χωροταξική δυναμική και ελεγχόμενη ανακατανομή πολλών μορίων εκτός του TCR όπως ιντεγκρίνες, συνυποδοχείς και σηματοδοτικά μόρια στην περιοχή της ανοσολογικής σύναψης [13].

Στο σχηματισμό της ανοσολογικής σύναψης συμμετέχουν τουλάχιστον τρία είδη υποδοχέων οι οποίοι δρουν συνεργιστικά προκειμένου να επιτευχθεί η πλήρης και αποτελεσματική ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων [14]. Η πρώτη σύνδεση που λαμβάνει χώρα και επάγει το σχηματισμό της σύναψης είναι μεταξύ του αντιγονικού υποδοχέα των T-λεμφοκυττάρων TCR και του συμπλόκου πεπτιδίου-MHC, ενώ είναι η αλληλεπίδραση που προσδίδει την ειδικότητα στην απόκριση. Η ενεργοποίηση του TCR έχει ως αποτέλεσμα τη ρύθμιση μιας άλλης κατηγορίας μορίων τα οποία είναι υπεύθυνα για την εστιασμένη εντόπιση υποδοχέων και τη διατήρηση της εγγύτητας των κυττάρων. Το πιο καλά μελετημένο μόριο αυτής της κατηγορίας είναι η ιντεγκρίνη LFA-1 η οποία αφού αποκτήσει δραστική διαμόρφωση ανακατανέμεται στην ώριμη ανοσολογική σύναψη και οδηγεί στη σταθεροποίησή της [13]. Η αλληλεπίδραση του υποδοχέα TCR με τα μόρια ιστοσυμβατότητας δεν είναι αρκετά ισχυρή προκειμένου να εκκινήσει την ανοσολογική απόκριση και έτσι απαιτείται ένας αριθμός συνυποδοχέων οι οποίοι επάγουν τη διαδικασία. Οι πιο χαρακτηριστικοί επαγωγικοί συνυποδοχείς των T-λεμφοκυττάρων είναι οι CD4 και CD8 οι οποίοι αναγνωρίζουν μη πολυμορφικές περιοχές των MHC και εκφράζονται σε βοηθητικά και κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα αντίστοιχα. Εκτός από τους επαγωγικούς συνυποδοχείς, απαραίτητοι για την ελεγχόμενη λειτουργία της ανοσολογικής σύναψης είναι οι συνυποδοχείς ελέγχου ή ανασταλτικοί οι οποίοι χρησιμοποιούν αρνητικά μονοπάτια μεταγωγής σήματος προκειμένου να καταστείλουν την ανοσολογική απόκριση. Στους πιο καλά μελετημένους ανασταλτικούς συνυποδοχείς ανήκει ο CTLA-4 η έκφραση του οποίου επάγεται άμεσα μετά την ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων και ανταγωνίζεται τον CD28 συνυποδοχέα για πρόσδεση με τον CD80. Άλλος υποδοχέας που ανήκει σε αυτή την κατηγορία είναι ο PD-1 ο οποίος επιστρατεύεται στην ανοσολογική σύναψη με τρόπο ανάλογο με την ισχύ της πρόσδεσης του TCR με τα MHC. Μετά από σύνδεση του PD-1 με τους προσδέτες του PD-L1 και PD-L2, επάγεται η έκφραση της φωσφατάσης SHP2 η οποία αντιστρέφει τα αρχικά στάδια σηματοδότησης του TCR [14].

## 1.2 Αντιγονοπαρουσίαση

Όπως έχει αναφερθεί, για την ενεργοποίηση των κυττάρων της επίκτητης κυτταρικής ανοσολογικής απόκρισης, είναι απαραίτητη 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) και παρουσιάζονται στην επιφάνεια των κυττάρων. Η λειτουργία αυτή των κυττάρων ονομάζεται αντιγονοπαρουσίαση [15]. Τα μόρια MHC είναι διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες οι οποίες χωρίζονται σε δύο τάξεις (MHC I και MHC II) και στον ανθρώπινο οργανισμό κωδικοποιούνται από τρία γονίδια το καθένα, τα οποία βρίσκονται σε ένα σύμπλεγμα γονιδίων στο χρωμόσωμα 6. 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* και όλα εμφανίζουν υψηλά επίπεδα πολυμορφισμού. Πράγματι έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερα από 10000 αλληλόμορφα MHC I και MHC II ([hla.alleles.org](http://hla.alleles.org)) [16]. Τα νέα αλληλόμορφα προκύπτουν από σημειακές μεταλλάξεις και γονιδιακές μετατροπές. Αν και οι δύο τάξεις MHC έχουν κάποιες δομικές διαφορές, όλα τα μόρια του συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας αποτελούνται από δύο μη ομοιοπολικά συνδεδεμένες πολυπεπτιδικές αλυσίδες οι οποίες σχηματίζουν μια αύλακα πρόσδεσης πεπτιδίων. Οι πολυμορφικές θέσεις των μορίων ιστοσυμβατότητας εντοπίζονται στην κοιλότητα πρόσδεσης πεπτιδίων γεγονός που επιτρέπει την πρόσδεση πολλών διαφορετικών αντιγονικών επιτόπων. Οι δύο τάξεις μορίων ιστοσυμβατότητας παρουσιάζουν διαφορετική κατανομή στους ιστούς με τα MHC I να εκφράζονται σε όλα τα εμπύρνηνα κύτταρα ενώ τα MHC II συναντώνται στα ειδικά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα όπως τα μακροφάγα, τα Β-λεμφοκύτταρα και τα δενδριτικά κύτταρα. Λόγω του διακριτού ρόλου των δύο τάξεων MHC στην ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος, οι αντιγονικοί επιτόποι παράγονται από διαφορετικά πρωτεολυτικά μονοπάτια τα οποία περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω.

### **1.2.1 Μονοπάτι αντιγονοπαρουσίασης τάξης I**

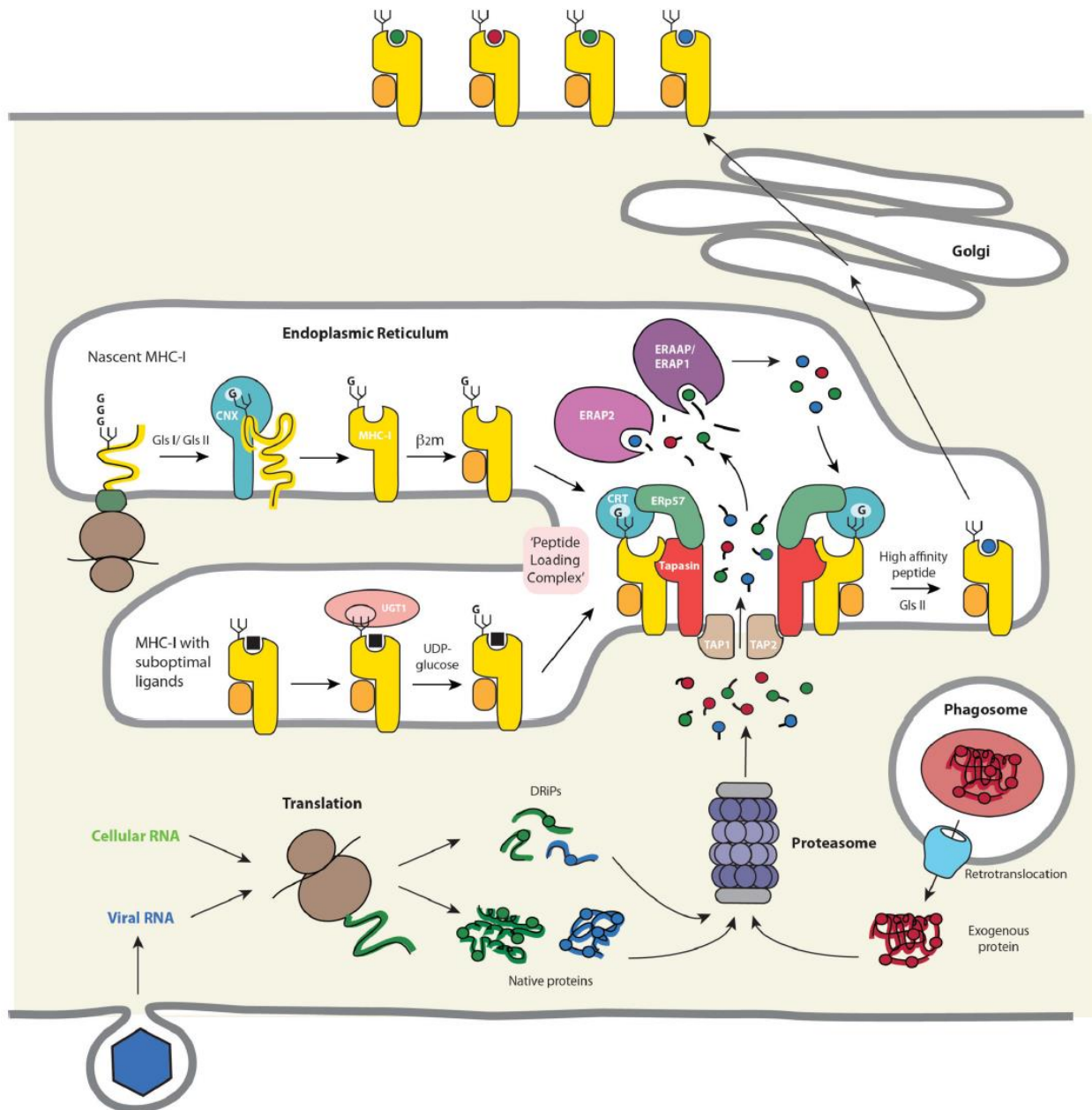
Τα μόρια ιστοσυμβατότητας τάξης I παρέχουν τη δυνατότητα στο ανοσοποιητικό σύστημα να διακρίνει το τρέχον πρωτεϊνικό περιεχόμενο του κυττάρου και να αντιδρά σε παθολογικές καταστάσεις οι οποίες το επηρεάζουν, όπως η παρουσία ιών και ενδοκυτταρικών παρασίτων αλλά και η καρκινογένεση [17]. Τα κύτταρα προκειμένου να υπαχθούν σε επιτήρηση από τα κυτταροτοξικά Τ-λεμφοκύτταρα χρησιμοποιούν ένα μονοπάτι πρωτεόλυσης των ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών το οποίο καλείται μονοπάτι αντιγονοπαρουσίασης τάξης I (Εικόνα 3). Εκτός από ενδοκυττάρια πρωτεΐνες που έχουν φτάσει στο πέρας της λειτουργικής τους ζωής, ένα ποσοστό

των αντιγονικών πεπτιδίων που παρουσιάζονται στην επιφάνεια των κυττάρων φαίνεται να προέρχεται από νεοσυντιθέμενες πολυπεπτιδικές αλυσίδες οι οποίες καλούνται μη-λειτουργικά ριβοσωμικά προϊόντα (DRiPs) και αποτελούνται από πρωτεΐνες οι οποίες λόγω σφαλμάτων κατά τη μετάφραση, δεν μπορούν να αποκτήσουν λειτουργική διαμόρφωση [18],[19]. Η πλειοψηφία των αντιγονικών επιτόπων που προσδένονται στα MHC I, προκύπτει από αποικοδόμηση μέσω του συστήματος ουβικιτίνης-πρωτεασώματος. Η ουβικιτίνη είναι μια πρωτεΐνη 76 αμινοξέων η οποία συνδέεται ομοιοπολικά με πρωτεΐνες-στόχους στα ευκαρυωτικά κύτταρα ως μεταμεταφραστική τροποποίηση. Σύνδεση τεσσάρων τουλάχιστον μονομερών ουβικιτίνης σε μια πρωτεΐνη έχει ως αποτέλεσμα τη στόχευσή της για αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα [20]. Η σύνδεση της ουβικιτίνης πραγματοποιείται με τη βοήθεια τριών ενζύμων (E1, E2 και E3) τα οποία προσδένουν και ενεργοποιούν την ουβικιτίνη, αναγνωρίζουν το υπόστρωμα και καταλύουν το σχηματισμό ισοπεπτιδικού δεσμού μεταξύ των μονομερών της ουβικιτίνης στο κατάλοιπο K48. Στο ανθρώπινο γονιδίωμα κωδικοποιούνται περισσότερα από 600 διαφορετικά ένζυμα E3 με διαφορετικές εκλεκτικότητες γεγονός το οποίο επιτρέπει τη σήμανση πληθώρας υποστρωμάτων [21]. Το 26S πρωτεάσωμα είναι ένα πρωτεολυτικό ενζυμικό σύμπλεγμα το οποίο αποτελείται από τον 20S καταλυτικό πυρήνα και δύο 19S υπομονάδες οι οποίες είναι υπεύθυνες τόσο για την ενεργοποίηση του πρωτεασώματος όσο και για την πρόσδεση και αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Ο καταλυτικός του πυρήνας αποτελείται από 14 διαφορετικές υπομονάδες οι οποίες σχηματίζουν 4 δακτυλίους ανά δύο ίδιους. Στους δύο εξωτερικούς δακτυλίους συναντώνται οι υπομονάδες  $\alpha$ 1- $\alpha$ 7 ενώ οι εσωτερικοί δακτύλιοι που περιλαμβάνουν τις υπομονάδες  $\beta$ 1- $\beta$ 7 είναι αυτοί οι οποίοι εμφανίζουν την καταλυτική δραστηριότητα του πρωτεασώματος. Τα καταλυτικά κέντρα που βρίσκονται στις υπομονάδες  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 και  $\beta$ 5 εμφανίζουν δραστηριότητες όμοιες με κασπάσης, θρυψίνης και χυμοθρυψίνης αντίστοιχα και υδρολύουν κατά προτίμηση μετά από υδρόφοβα και βασικά αμινοξέα τα οποία και αποτελούν κατάλοιπα αγκυροβόλησης των MHC I [22]. Παρόλο που είναι πιθανό πεπτίδια μετά από αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα να έχουν N-τελικό άκρο το οποίο να επιτρέπει την πρόσδεσή τους στα MHC I, πολλά από τα πεπτίδια που παράγονται από το πρωτεάσωμα έχουν εκτεταμένο N-τελικό άκρο κατά ένα ή περισσότερα αμινοξέα [23],[24]. Τη δράση του πρωτεασώματος φαίνεται να συμπληρώνουν δύο ενδοπεπτιδάσες, η τριπεπτιδυλοπεπτιδάση II (TPP II) και η ολιγοπεπτιδάση του θύμου (TOP), οι οποίες βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα και η αναστολή τους έχει δειχθεί ότι οδηγεί σε μείωση της παρουσίας ιικών και καρκινικών αντιγόνων [25],[26],[27]. Ένα μεγάλο ποσοστό των πεπτιδίων που προκύπτουν μετά από επεξεργασία στο πρωτεάσωμα αποικοδομούνται σε αμινοξέα από αμινοπεπτιδάσες του κυτταροπλάσματος όπως η PSA, η BH και η LAP. Αυτές οι αμινοπεπτιδάσες εκτός από καταστρεπτικό ρόλο για τα πεπτίδια φαίνεται ότι συμβάλλουν στην παραγωγή κάποιων



αντιγονικών επιτόπων με το να αφαιρούν αμινοξέα από τα N-εκτεταμένα πρόδρομα πεπτιδία που παράγει το πρωτεάσωμα [28],[29]. Προκειμένου τα αντιγονικά πεπτιδία να προσδεθούν στα MHC1 πρέπει να μεταφερθούν στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου όπου βρίσκονται οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες των μορίων ιστοσυμβατότητας που θα συγκροτήσουν το σύμπλοκο πεπτιδίου-MHC. Η μεταφορά των πεπτιδίων πραγματοποιείται από τον μεταφορέα που σχετίζεται με την αντιγονοπαρουσίαση (TAP) ο οποίος είναι ένας διαμεμβρανικός μεταφορέας τύπου ABC και συντίθεται από δύο υπομονάδες τις TAP1 και TAP2 οι οποίες εκτός από το διαμεμβρανικό τμήμα φέρουν μια περιοχή πρόσδεσης πεπτιδίου και δύο περιοχές πρόσδεσης νουκλεοτιδίων όπου και δεσμεύεται το ATP [30]. Ο μεταφορέας TAP παρουσιάζει εξειδίκευση για πεπτιδία μήκους 8-16 αμινοξέων ενώ επιλέγει να μεταφέρει πεπτιδία που φέρουν συγκεκριμένες πλευρικές αλυσίδες στην αλληλουχία τους [31]. Εκτός από μεταφορέας πρόδρομων αντιγονικών επιτόπων, ο TAP συμμετέχει στο σχηματισμό του συμπλέγματος φόρτωσης πεπτιδίων ή PLC (Peptide Loading Complex). Το PLC είναι ένα πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο που εντοπίζεται στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου και ρόλος του είναι να συντονίζει την είσοδο των πεπτιδίων στο ενδοπλασματικό δίκτυο με την πρόσδεσή τους στα MHC1 [32]. Στο σχηματισμό του PLC συμμετέχουν εκτός από τον μεταφορέα TAP, η πρωτεΐνη συνοδός ταπασίνη, και το ελεύθερο πεπτιδίου ετεροδιμερές μόριο MHC1 το οποίο προκειμένου να σταθεροποιηθεί αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες-συνοδούς καρλεκουλίνη και ERp57 [33]. Η ταπασίνη έχει τη δυνατότητα να αλληλεπιδρά με τον μεταφορέα TAP και με την ERp57 και ελέγχει το σχηματισμό του συμπλόκου MHC-πεπτιδίου [34]. Αν το σύμπλοκο που θα σχηματιστεί είναι σταθερό, απελευθερώνεται από τις πρωτεΐνες συνοδούς και μεταφέρεται στην κυτταρική μεμβράνη μέσω της συσκευής Golgi. Στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου, πραγματοποιείται ένα επιπλέον στάδιο επεξεργασίας των πεπτιδίων καθώς πολλά από αυτά έχουν μήκος μεγαλύτερο από 8-10 αμινοξέα, το οποίο είναι και το βέλτιστο για την κοιλότητα πρόσδεσης πεπτιδίων στα MHC1. Η τελική επεξεργασία των πρόδρομων επιτόπων επιτυγχάνεται με τη δράση δύο αμινοπεπτιδασών της ERAP1/A-LAP και της ERAP2/L-RAP οι οποίες έχουν τη δυνατότητα να παράγουν αλλά και να καταστρέφουν προσδέτες των MHC1 [35]. Η δυναμική του συστήματος αντιγονοπαρουσίασης τάξης I μπορεί να μεταβληθεί σε παθολογικές καταστάσεις με στόχο την ενίσχυση της αντιγονοπαρουσίασης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η επίδραση της IFN-γ στο σύστημα η οποία επάγει την έκφραση πολλών συστατικών του μονοπατιού αντιγονοπαρουσίασης τάξης I. Η έκθεση κυττάρων σε IFN-γ έχει ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση των καταλυτικών μονάδων του πρωτεασώματος, β1, β2 και β5 με τις αντίστοιχες ομόλογες υπομονάδες LMP-2, MECL-1 και LMP-7. Η νέα εκδοχή του πρωτεασώματος, που καλείται ανοσοπρωτεάσωμα, είναι πιο αποτελεσματική στην παραγωγή πρόδρομων αντιγονικών επιτόπων και εμφανίζει διαφορετική

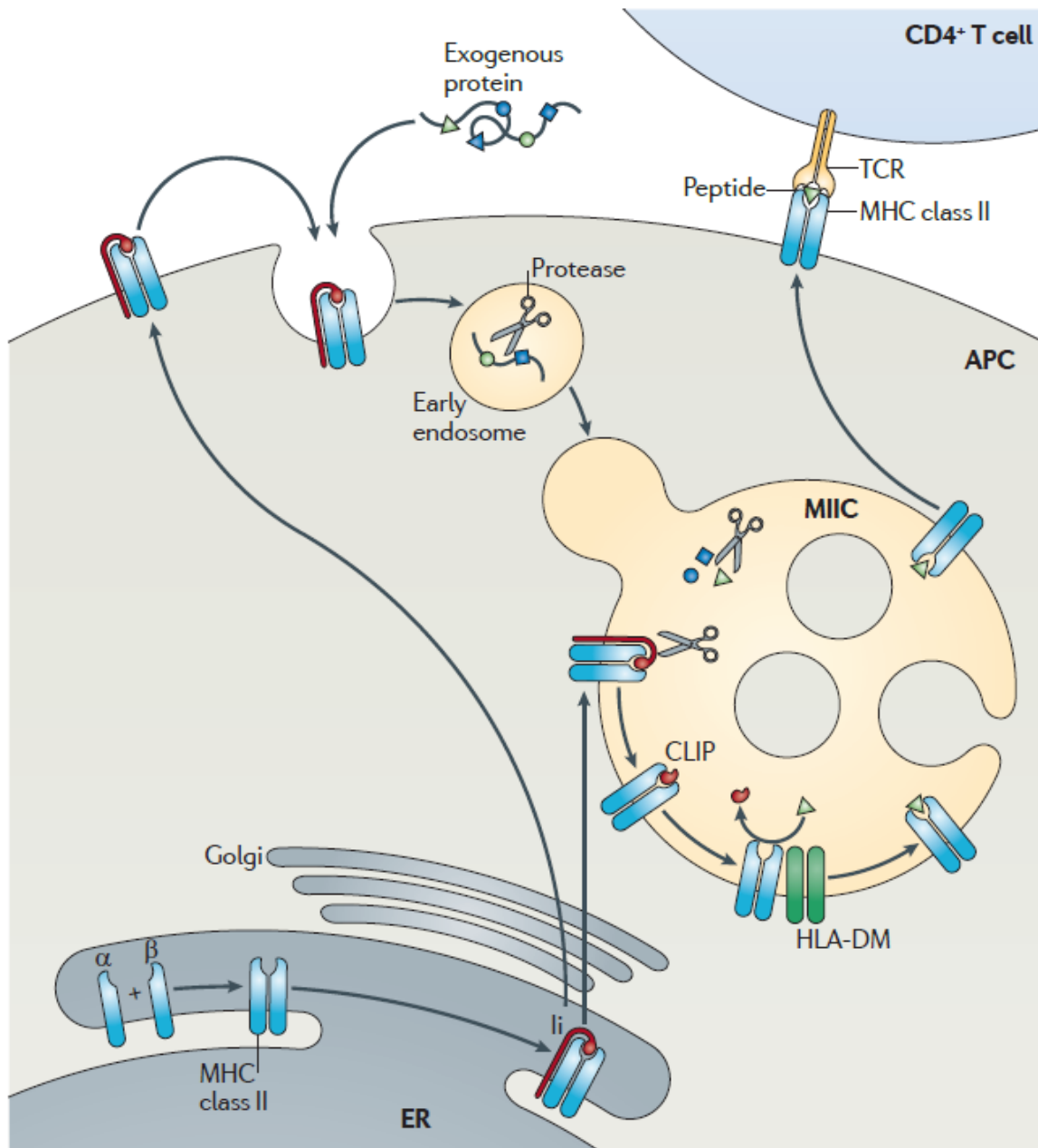
καταλυτική εξειδίκευση. Επιπλέον η IFN- $\gamma$  ενισχύει την αντιγονοπαρουσίαση με το να αυξάνει τα επίπεδα έκφρασης των μορίων MHC, του μεταφορέα TAP, των αμινοπεπτιδασών LAP, ERAP1 και ERAP2 αλλά και του ενεργοποιητή του πρωτεασώματος PA28 [36],[23],[28, 37].



**Εικόνα 3:** Σχηματική απεικόνιση του μονοπατιού αντιγονοπαρουσίασης τάξης I όπου φαίνεται η επεξεργασία και η παρουσίαση ενδοκυτταρικών ιικών πρωτεϊνών και πρωτεϊνών εξωγενούς προέλευσης. Στο σχήμα φαίνεται επίσης η βιοσύνθεση των MHC I μέσα στο ΕΔ [38].

### 1.2.2 Μονοπάτι αντιγονοπαρουσίασης τάξης II

Σε αντίθεση με τα MHC I που εκφράζονται σε όλα τα σωματικά κύτταρα, τα MHC II εκφράζονται μόνο σε ειδικευμένα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα όπως τα μακροφάγα, τα Β λεμφοκύτταρα και τα δενδριτικά κύτταρα. Η έκφρασή τους είναι δυνατή και σε επιθηλιακά κύτταρα κατόπιν διεγέρσεως από το ανοσοποιητικό σύστημα [39]. 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 (Εικόνα 4).



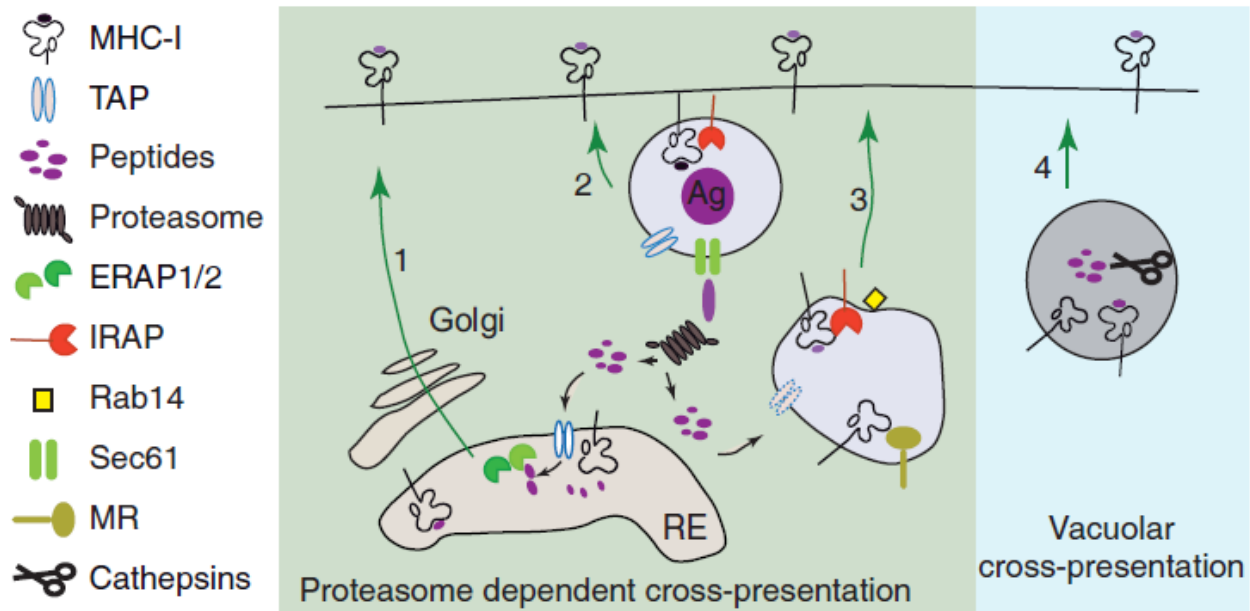
**Εικόνα 4: Σχηματική απεικόνιση του μονοπατιού αντιγονοπαρουσίασης τάξης II. Τα μόρια MHCII αλληλεπιδρούν στο ΕΔ παρουσία της αλυσίδας Ii και μέσω του συστήματος Golgi μεταβαίνουν στο κυτταρικό διαμέρισμα MHC. Εκεί προσδένουν πεπτιδικά αντιγόνα από ενδοσώματα και μεταφέρονται στην πλασματική μεμβράνη [40].**

Τα περισσότερα πεπτιδία που παρουσιάζονται από τα MHC II προέρχονται από πρωτεΐνες που έχουν υποστεί ενδοκυττάρωση και προκύπτουν από την αποικοδόμησή τους σε πρώιμα ενδοσώματα τα οποία συντήκονται με το MHC. Τα MHC II πριν μεταφερθούν στο MHC προσδένουν στην κοιλότητα πρόσδεσης πεπτιδίου μια ειδικευμένη πρωτεΐνη που ονομάζεται μη μεταβλητή αλυσίδα Ii. Ενώ είχε προταθεί ότι η αλυσίδα Ii προσδένεται στα MHC II ώστε αυτά να μη δεσμεύουν πεπτιδία του ΕΔ, παρουσία της αλυσίδας Ii διευκολύνεται η αλληλεπίδραση των αλυσίδων των MHCII στο ΕΔ και η μεταφορά τους μέσω του συστήματος Golgi [41]. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 4, η κυτταροπλασματική περιοχή της Ii, οδηγεί τα MHC II σε ενδοσώματα μέσω της πλασματικής μεμβράνης ή στη συσκευή Golgi προκειμένου να φτάσουν τελικά στο MHC. Στο MHC 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 πεπτιδίο. Η μεταφορά των MHC II στην πλασματική μεμβράνη, όπου παρουσιάζουν τα αντιγονικά πεπτιδία στα CD4<sup>+</sup> T-λεμφοκύτταρα, γίνεται μέσω κυστιδίων και ελέγχεται από πολλούς παράγοντες όπως η χοληστερόλη, το κυτοσολικό pH καθώς και η δράση κινασών και GTPασών [40]. Εκτός από αυτό το μονοπάτι κάποια αντιγονικά πεπτιδία που προσδένονται στα MHCII προκύπτουν από αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα και μεταφορά τους μέσω του TAP [42].

### **1.2.3 Διασταυρούμενη αντιγονοπαρουσίαση**

Τα δραστικά (effector) κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα όταν αναγνωρίσουν τον αντιγονικό επίτοπο για τον οποίο είναι εξειδικευμένα, καταστρέφουν το κύτταρο-στόχο. Για να αποφευχθούν παράπλευρες απώλειες υγιών κυττάρων, τα MHC I δεν παρουσιάζουν αντιγόνα τα οποία έχουν προκύψει από ενδοκυττάρωση ιικών και καρκινικών θραυσμάτων. Σε αντίθεση με τα δραστικά, τα μη ενεργοποιημένα (naïve) T-λεμφοκύτταρα πρέπει να ενεργοποιηθούν από τα εξειδικευμένα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα [43]. Εύλογα λοιπόν προκύπτει το ερώτημα πώς 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. Για να επιτευχθεί αυτή η διαδικασία, τα ειδικά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα έχουν αναπτύξει ένα μηχανισμό ώστε εξωκυτταρικά αντιγόνα να μπορούν να παρουσιάζονται από μόρια

τάξης I του MHC. Αυτή η λειτουργία των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων καλείται διασταυρούμενη αντιγονοπαρουσίαση [43]. Το αποτέλεσμα της διασταυρούμενης αντιγονοπαρουσίασης εξαρτάται από το είδος του αντιγονοπαρουσιαστικού κυττάρου όπου θα λάβει χώρα. In vivo πειράματα σε ποντίκια έχουν δείξει ότι τη λειτουργία της διασταυρούμενης αντιγονοπαρουσίασης εμφανίζουν κυρίως τα δενδριτικά κύτταρα (DCs) και ως επί το πλείστον αυτά που εκφράζουν τους δείκτες CD24, CD8a και CD103 [44-47]. 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 [48]. Η διασταυρούμενη αντιγονοπαρουσίαση απαιτεί την επεξεργασία και αποικοδόμηση των πρωτεϊνών που έχουν υποστεί ενδοκυττάρωση. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω δύο διακριτών ενδοκυττάρων πορειών, την κυτοσολική και την κενοτοπική. Η πορεία που πραγματοποιείται στο κυτταρόπλασμα περιλαμβάνει εξαγωγή των αντιγόνων σε αυτό, όπου τα αντιγόνα υδρολύονται από το πρωτεάσωμα. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 5, οι πρόδρομοι αντιγονικοί επιτόποι που προκύπτουν από τη δράση του πρωτεασώματος μπορούν είτε να μεταφερθούν στο ενδοπλασματικό δίκτυο και να εισέλθουν στο κλασικό μονοπάτι αντιγονοπαρουσίασης τάξης I (1), είτε να επαναμεταφερθούν σε φαγοσώματα ή εξειδικευμένα ενδοσώματα όπου η περαιτέρω επεξεργασία τους πραγματοποιείται από την αμινοπεπτιδάση IRAP/PLAP(2,3). Η πορεία μέσω κενοτόπιων αντίθετα, δεν απαιτεί την έξοδο των πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα και κατά συνέπεια είναι ανεξάρτητη του πρωτεασώματος και του TAP. Σε αυτή την περίπτωση, το πρωτεϊνικό περιεχόμενο των ενδοσωμάτων υδρολύεται από ένζυμα των λυσοσωμάτων, όπως η Καθεψίνη S και φορτώνονται απευθείας στα MHCI (Εικόνα 5, σημείο 4) [49].



Εικόνα 5: Μονοπάτια επεξεργασίας αντιγονικών επιτόπων των MHC-I κατά τη διασταυρούμενη αντιγονοπαρουσίαση. 1: Κλασικό μονοπάτι αντιγονοπαρουσίασης τάξης I. 2,3: Αντιγονοπαρουσίαση μέσω φαγοσωμάτων ή εξειδικευμένων ενδοσωμάτων. 4: Μονοπάτι μέσω κενωτοπίων ανεξάρτητο του πρωτεασώματος [49].

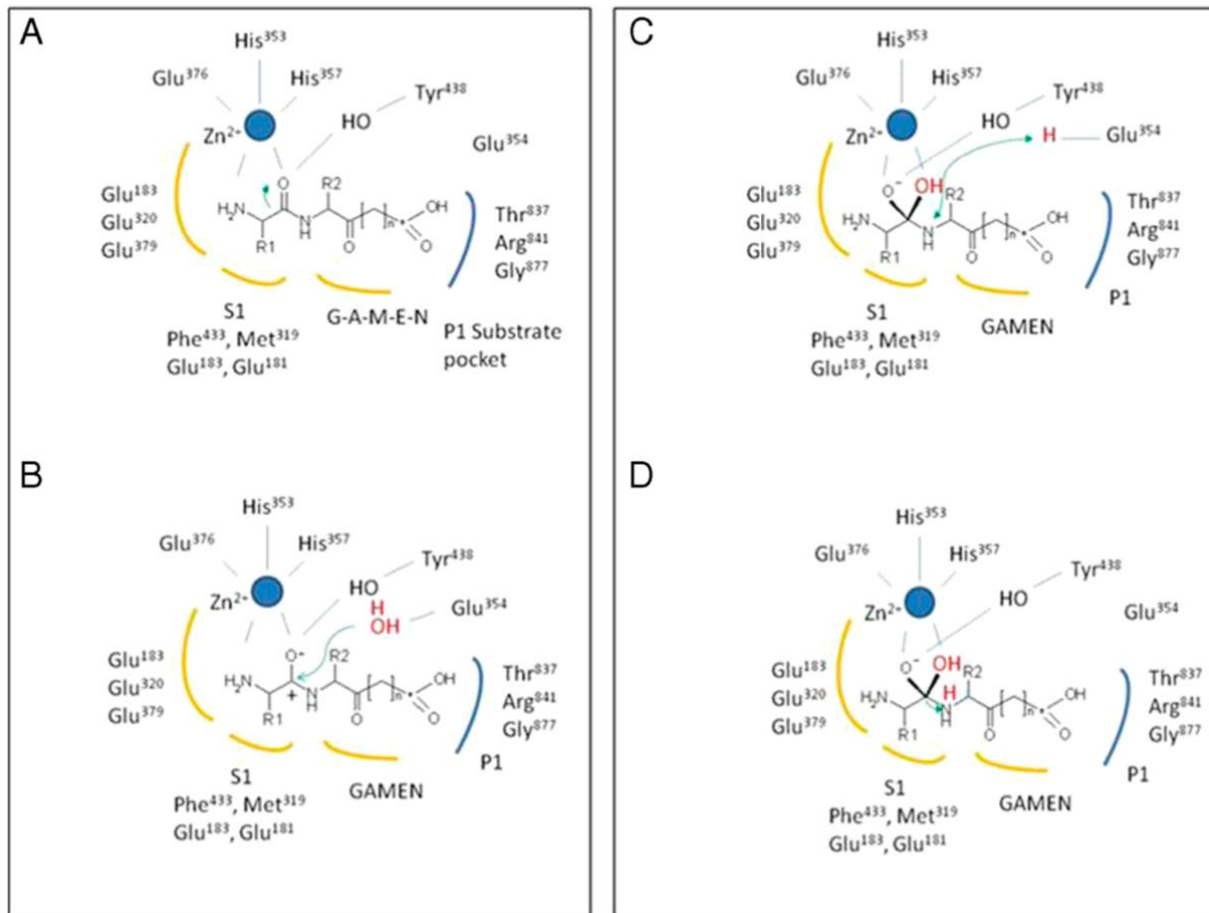
### 1.3 Οικογένεια αμινοπεπτιδασών M1

Τα ένζυμα με δραστικότητα αμινοπεπτιδάσης 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 διαμεμβρανικά. Τα ένζυμα αυτά είναι απαραίτητα για την ωρίμανση πρωτεϊνών και την αποικοδόμηση πεπτιδίων με ορμονική ή μη δράση [50]. 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 προσδέεται 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 [51]. Οι αμινοπεπτιδάσες αυτές φέρουν στο καταλυτικό τους κέντρο το χαρακτηριστικό μοτίβο πρόσδεσης  $Zn^{2+}$ , HEXXH(X)<sub>18</sub>E [52]. Από αυτά τα αμινοξέα οι δύο ιστιδίνες

και το γλουταμινικό οξύ, 19 κατάλοιπα μετά τη δεύτερη ιστιδίνη, συμμετέχουν στην πρόσδεση του  $Zn^{2+}$  [53],[54]. Επιπλέον οι αμινοπεπτιδάσες αυτής της οικογένειας έχουν στο μόριό τους σε σταθερή απόσταση από το μοτίβο πρόσδεσης  $Zn^{2+}$  το συντηρημένο μοτίβο εξωπεπτιδάσης GAMEN [52]. 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 [55],[56]. Οι αμινοπεπτιδάσες αυτής της οικογένειας έχουν πολλούς και σημαντικούς παθοφυσιολογικούς ρόλους στον ανθρώπινο οργανισμό. Συμμετέχουν στη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης καταβολίζοντας τα πεπτιδία του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης, ελέγχουν την αγγειογένεση και την ομαλή εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, ενώ συμβάλουν και 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 [52].

### 1.3.1 Καταλυτικός μηχανισμός

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 [52]. Στο Σχήμα 1 φαίνεται ο καταλυτικός μηχανισμός που έχει προταθεί για την αμινοπεπτιδάση ERAP1 [57]. Το N-τελικό άκρο του πεπτιδικού υποστρώματος αλληλεπιδρά με τον S1 θύλακα και το ιόν ψευδαργύρου το οποίο συντονίζει την αμινομάδα και την καρβοξυλομάδα του. Το υδροξύλιο της τυροσίνης 438 πολώνει το καρβονύλιο μέσω ενός δεσμού υδρογόνου (A). Το γλουταμινικό 354 αποσπά ένα πρωτόνιο από το μόριο νερού το οποίο πραγματοποιεί την πυρηνόφιλη προσβολή στον άνθρακα του καρβονυλίου (B). Το τετραεδρικό ενδιάμεσο που σχηματίζεται σταθεροποιείται αλληλεπιδρώντας με το ιόν ψευδαργύρου, την τυροσίνη 438 και το γλουταμινικό 354 (C). Το πρωτονιωμένο αμίδιο που προκύπτει αποτελεί μια καλή αποχορούσα ομάδα οδηγώντας στην αποικοδόμηση του N-τελικού αμινοξέος (D).



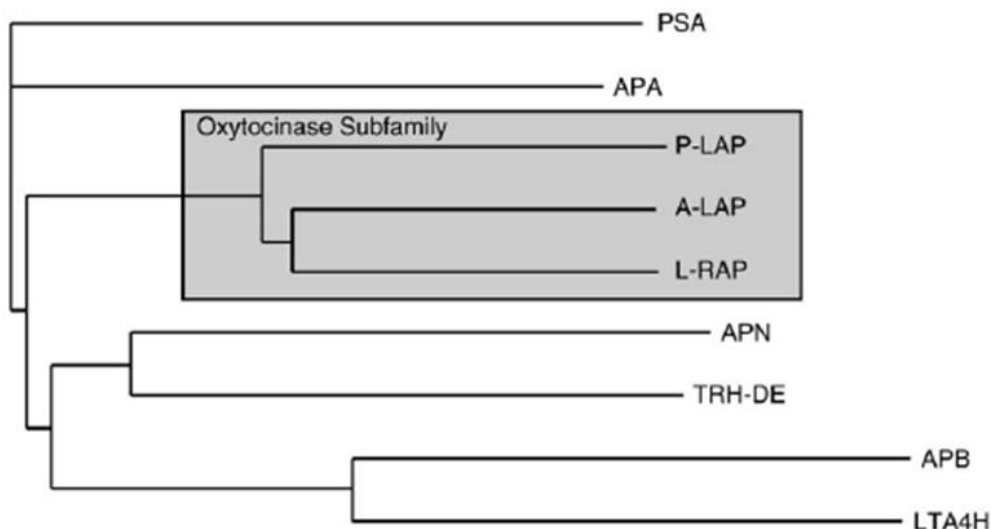
Σχήμα 1: Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού υδρόλυσης του N-τελικού αμινοξέος ενός πεπτιδίου από την αμινοπεπτιδάση ERAP1 [57].

### 1.3.2 Υποοικογένεια των ωκυτοκινασών

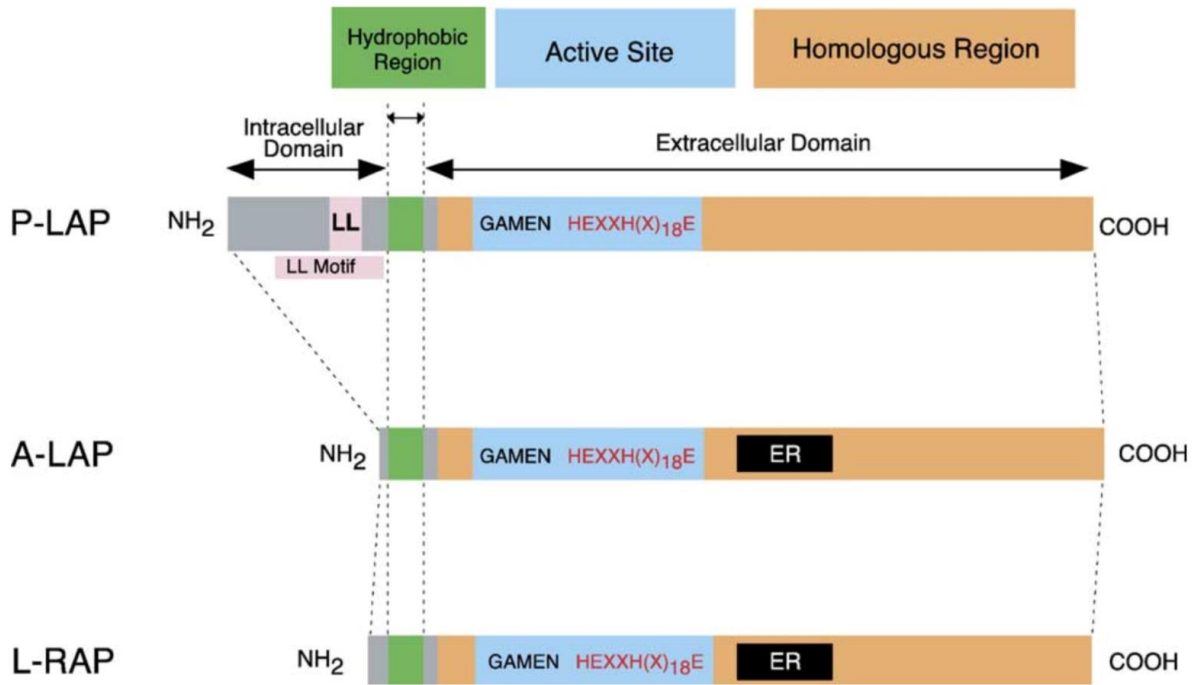
Μέχρι στιγμής, έχουν ταυτοποιηθεί 65 αμινοπεπτιδάσες που ανήκουν στην οικογένεια M1 σε όλα τα είδη και 14 από αυτές σε θηλαστικά (Σχήμα 2). Τρεις από αυτές, η IRAP, η ERAP1 και η ERAP2 εμφανίζουν υψηλά επίπεδα ομολογίας ειδικά στις περιοχές γύρω από τα μοτίβα πρόσδεσης  $Zn^{2+}$  (HEXXH(X)<sub>18</sub>E) και εξωπεπτιδάσης (GAMEN) (Σχήμα 3). Βάσει φυλογενετικής ανάλυσης αυτές οι αμινοπεπτιδάσες μπορούν να καταταγούν σε μια ξεχωριστή υποοικογένεια, η οποία ονομάζεται υποοικογένεια των ωκυτοκινασών. Η ονομασία αυτή δόθηκε λόγω της ικανότητας της IRAP να υδρολύει την ωκυτοκίνη [58]. Η ανθρώπινη αμινοπεπτιδάση IRAP είναι μία τύπου II μεμβρανοσυνδεδεμένη 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 [59]. Στον πλακούντα, μετά από πρωτεόλυση παράγεται η διαλυτή μορφή του ενζύμου. Η αμινοπεπτιδάση IRAP 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 ERAP1 και ERAP2 είναι διαλυτές πρωτεΐνες που βρίσκονται στο ΕΔ και εκφράζονται σε όλα τα κύτταρα του οργανισμού [60],[61]. Τα ανθρώπινα γονίδια για τις τρεις αυτές αμινοπεπτιδάσες έχουν παρόμοια οργάνωση και συναντώνται στο χρωμόσωμα 5q15. Τα μοτίβα HEXXH(X)<sub>18</sub>E και GAMEN κωδικοποιούνται από τα εξόνια 6 και 7 αντίστοιχα, ενώ σε αντίθεση με την IRAP, οι ERAP1 και ERAP2 κωδικοποιούν στο εξόνιο 11 για μια αλληλουχία για διατήρηση στο ΕΔ [58].



**Σχήμα 2:** 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 [58].

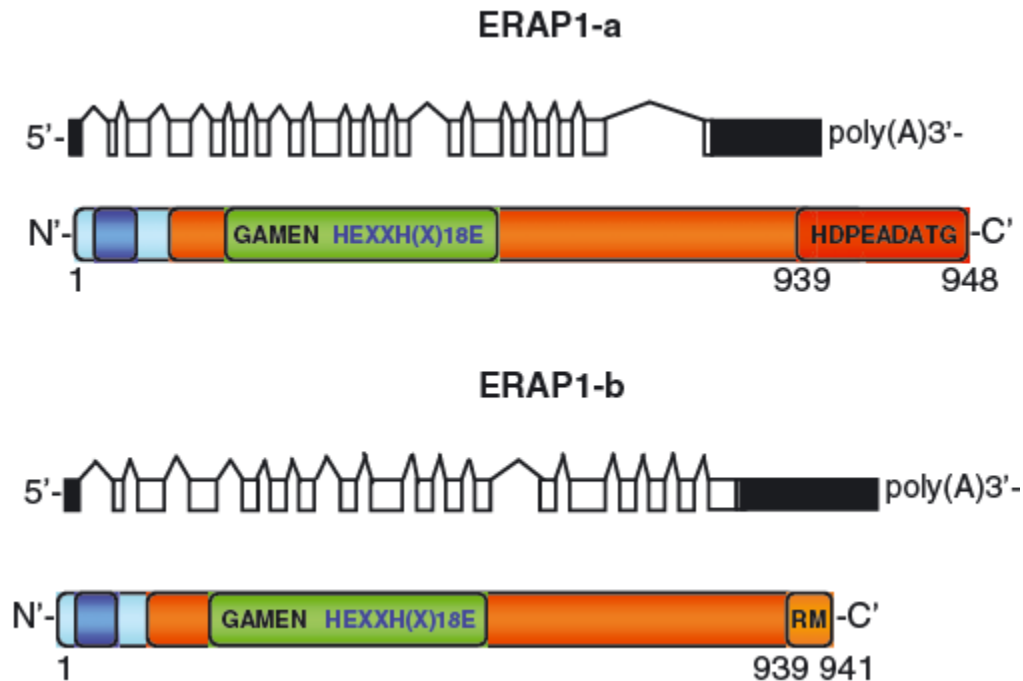


Σχήμα 3: Σχηματική αναπαράσταση των δομικών περιοχών των αμινοπεπτιδασών της υποοικογένειας των ωκυτοκινάσων [58].

## 1.4 Η αμινοπεπτιδάση ERAP1

### 1.4.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Η ανθρώπινη αμινοπεπτιδάση ERAP1 κωδικοποιείται από ένα γονίδιο το οποίο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 5q15 και αποτελείται συνολικά από 20 εξώνια [62]. Η πρωτεΐνη η οποία έχει μέγεθος περίπου 105 kDa, εκφράζεται καθολικά στον ανθρώπινο οργανισμό, ενώ τα επίπεδα της αυξάνονται παρουσία IFN- $\gamma$  [60]. Το mRNA της ERAP1 απαντάται σε δύο ισομορφές οι οποίες προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα και η διαφορά που εντοπίζεται στο τελευταίο εξώνιο (19 ή 20) οδηγεί σε μια μικρή αλλαγή της αλληλουχίας στο C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης. Οι δύο ισομορφές οι οποίες αναφέρονται ως ERAP1\_19E και ERAP1\_20E φέρεται να υπόκεινται σε διαφορετική ρύθμιση παρουσία IFN- $\gamma$  και ενδεχομένως να λειτουργούν σε διαφορετικές παθοφυσιολογικές καταστάσεις (Σχήμα 5) [63].



Σχήμα 4: Σχηματική αναπαράσταση των δύο κύριων μεταγράφων του γονιδίου της αμινοπεπτιδάσης ERAP1 [64].

Η αμινοπεπτιδάση ERAP1 ανακαλύφθηκε και χαρακτηρίστηκε ως ένα ένζυμο του ενδοπλασματικού δικτύου το 2002, από τις ομάδες των Goldberg, Rock και Shastri, σε μια προσπάθεια να προσδιοριστούν οι αμινοπεπτιδάσες που καταλύουν τα τελικά στάδια επεξεργασίας των αντιγονικών επιτόπων μέσα στο ενδοπλασματικό δίκτυο [60],[65]. Μετά από διαχωρισμό του αυλού και του μεμβρανικού τμήματος του αδρού ενδοπλασματικού δικτύου, διαπιστώθηκε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό δραστηριότητας έναντι σε μη φυσικά υποστρώματα αλλά και στον πρόδρομο επίτοπο ESIIINFEKL μετρήθηκε στο κλάσμα του αυλού [60]. Οι πρωτεΐνες του αυλού του ΕΔ ταυτοποιήθηκαν με φασματομετρία μάζας και μια από αυτές αντιστοιχούσε σε μια μεταλλοπεπτιδάση ψευδαργύρου που είχε ήδη χαρακτηριστεί και της είχαν αποδοθεί τα ονόματα A-LAP [66], PILS-AP (Puromycin-insensitive leucyl-specific Aminopeptidase) [67] και ARTS-1 (Aminopeptidase Regulator of TNFR1 Shedding) [68]. Παρόλο που η αμινοπεπτιδάση ERAP1 συνεντοπίζεται μαζί με πρωτεΐνες που φέρουν την αλληλουχία διατήρησης στο ΕΔ KDEL, η ίδια δε κωδικοποιεί για τη συγκεκριμένη αλληλουχία, ενώ έχει προταθεί ότι διατηρείται μέσα στο ΕΔ μέσω μιας αλληλουχίας του εξωνίου 10 [69]. Σε αυτή την αλληλουχία εντοπίζεται και η κυστεΐνη

487 η οποία αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη του ΕΔ ERp44 μέσω σχηματισμού ενός δισουλφιδικού δεσμού, ενώ έχει προταθεί ότι αυτή η αλληλεπίδραση συμβάλλει στη διατήρηση της ERAP1 στο ΕΔ [70].

## 1.4.2 Βιολογική δράση

### 1.4.2.1 Ρόλος της αμινοπεπτιδάσης ERAP1 στην αντιγονοπαρουσίαση

Η πιο καλά χαρακτηρισμένη βιολογική δράση της αμινοπεπτιδάσης ERAP1 είναι ο ρόλος της στην παραγωγή ώριμων αντιγονικών επιτόπων των μορίων MHC I. Προκειμένου να ελεγχθεί η συμβολή της ERAP1 στην παραγωγή αντιγονικών πεπτιδίων, οι Serwold et al., χρησιμοποίησαν την τεχνολογία του siRNA προκειμένου να εξετάσουν τις επιπτώσεις της μειωμένης έκφρασής της. Στα κύτταρα μυός που είχαν επεξεργαστεί με siRNA συμπληρωματικό για την ομόλογη αμινοπεπτιδάση ERAAP η έκφραση του ενζύμου είχε μειωθεί κατά 90% η οποία είχε σαν αποτέλεσμα τη μειωμένη έκφραση των μορίων ιστοσυμβατότητας MHC I K<sup>k</sup> και L<sup>d</sup> κατά 23% και 44% αντίστοιχα [71]. Έτσι, προτάθηκε ότι η ERAP1 εμπλέκεται στην παραγωγή των διαθέσιμων πεπτιδίων προς αντιγονοπαρουσίαση τα οποία κατόπιν πρόσδεσής τους, σταθεροποιούν τα μόρια ιστοσυμβατότητας στην πλασματική μεμβράνη. Αντίστοιχα πειράματα αποσιώπησης με siRNA σε κύτταρα HeLa, έδειξαν ότι ο επίτοπος της वालουμίνης SIINFEKL καθίστατο σχεδόν μη ανιχνεύσιμος, επιβεβαιώνοντας έτσι τη σημασία της ERAP1 στην παραγωγή ώριμων αντιγονικών επιτόπων [65]. 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 κυτταρικές σειρές και παρατήρησαν διαφορετική επίδραση στα επίπεδα έκφρασης των MHC I. Κατέληξαν λοιπόν στο συμπέρασμα ότι εκτός από την παραγωγή, η ERAP1 έχει τη δυνατότητα να καταστρέφει πιθανούς επιτόπους. Αντίθετα αποτελέσματα είχε η αποσιώπηση της 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. Βάσει αυτών των παρατηρήσεων, προτάθηκε ότι η ERAP1 κάτω από φυσιολογικές συνθήκες καταστρέφει πιθανούς αντιγονικούς επιτόπους, ενώ παρουσία κυτταροκινών που επάγουν την αντιγονοπαρουσίαση φαίνεται να παράγει βελτιστοποιημένα πεπτιδία για τα MHC I [65]. 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 [72]. Επίσης, η ERAP1 φαίνεται να αποτελεί καθοριστικό παράγοντα της ανοσοκυριαρχίας των αντιγονικών επιτόπων, δηλαδή της ικανότητάς τους να εκκινούν ανοσολογικές αποκρίσεις. 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 [73]. Τέλος, έχει προταθεί ότι η ERAP1, εκτός από την ανοσοκυριαρχία των επιτόπων επηρεάζει και τον αριθμό των δραστικών T-κυττάρων μνήμης έναντι των αντιγονικών πεπτιδίων που αναγνωρίζονται από τα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα [74].

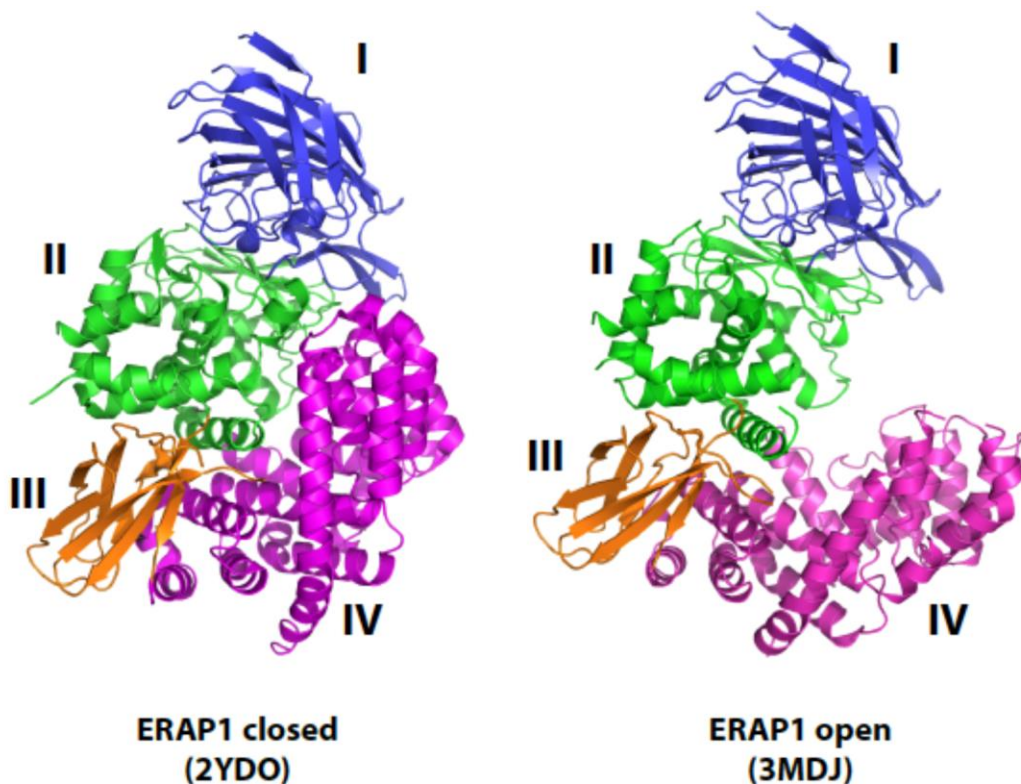
#### **1.4.2.2 Άλλες φυσιολογικές λειτουργίες της ERAP1**

Εκτός από τον βασικό ρόλο της στην επίκτητη ανοσολογική απόκριση, η ERAP1 εμπλέκεται και στη φυσική ανοσία. Οι Goto et al., έδειξαν ότι μακροφάγα αφού ενεργοποιηθούν με LPS και IFN- $\gamma$  εκκρίνουν ERAP1 με αποτέλεσμα την ενίσχυση της φαγοκυττάρωσης [75]. Επίσης διαπίστωσαν ότι για αυτή την ενεργοποίηση είναι απαραίτητη η καταλυτική δραστηριότητα του ενζύμου που πιθανώς οδηγεί στην παραγωγή βιοδραστικών πεπτιδίων τα οποία ενεργοποιούν τα μακροφάγα, καθώς παρατήρησαν ότι η φαγοκυττάρωση αυξάνεται και σε κύτταρα τα οποία καλλιιεργήθηκαν σε μέσο στο οποίο έχει πρωτίστως εκκριθεί και απομακρυνθεί η ERAP1 [75]. Επιπλέον, πειράματα αποσιώπησης της ERAP1 σε ποντίκια οδήγησε σε αυξημένα επίπεδα ενεργοποίησης φυσικών φονικών κυττάρων και φυσικών φονικών T κυττάρων σε ήπαρ και σπλήνα, τα οποία εμφάνιζαν ενισχυμένη ικανότητα έκκρισης κυτταροκινών και αυξημένη ικανότητα φαγοκυττάρωσης [76]. Τέλος, έχει προταθεί ότι η ERAP1 ρυθμίζει τη φλεγμονή μέσω παραγωγής των διαλυτών μορφών διαφόρων υποδοχέων κυτταροκινών όπως οι ιντερλευκίνες 1 και 6 και ο TNF [68, 77, 78]. Αρκετές παλαιότερες μελέτες έχουν συσχετίσει την ERAP1 με άλλες βιολογικές λειτουργίες οι οποίες δεν εμπλέκονται στην ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος. Η ERAP1 έχει τη δυνατότητα να υδρολύει βιοδραστικά πεπτίδια όπως η καλλιιδίνη και η αγγειοτενσίνη II και να παράγει τα ανενεργά παράγωγα βραδυκινίνη και αγγειοτενσίνη IV, συνεισφέροντας έτσι στη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης [79]. Πράγματι, όπως έδειξαν οι Hisatsune et al., η έλλειψη του παράγοντα ERp44 σε ποντίκια, που όπως αναφέρθηκε παραπάνω δεσμεύει την ERAP1 μέσω σχηματισμού δισουλφιδικών δεσμών και τη διατηρεί στο

ενδοπλασματικό δίκτυο, οδηγεί σε εμφάνιση υπότασης λόγω αποικοδόμησης της αγγειοτενσίνης II [70]. Επίσης, η ERAP1 φαίνεται να συμμετέχει στον έλεγχο της αγγειογένεσης μετά τη γέννηση, ρυθμίζοντας τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων [80]. 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) [81]. Τέλος, έχει προταθεί ότι η ERAP1 εμπλέκεται στη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων καθώς ενισχύει την ικανότητα προσκόλλησης των ενδοθηλιακών ιντεγκρινών [82].

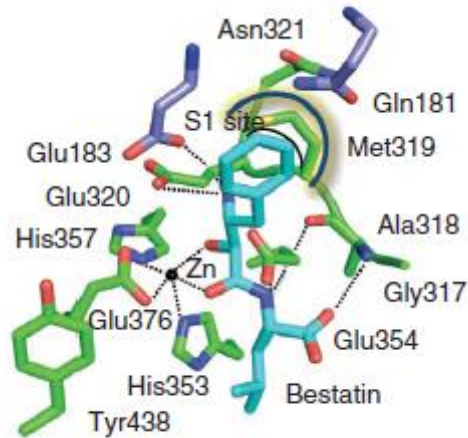
### 1.4.3 Δομή της αμινοπεπτιδάσης ERAP1

Όπως και άλλες αμινοπεπτιδάσες της M1 οικογένειας, έτσι και η αμινοπεπτιδάση ERAP1 αποτελείται από τέσσερις διακριτές δομικές περιοχές. Μέχρι στιγμής έχει κρυσταλλωθεί σε δύο διαμορφώσεις οι οποίες διαφέρουν ως προς τη σχετική θέση της τέταρτης δομικής περιοχής όπου βρίσκεται το C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης (Σχήμα 6) [57, 83, 84]. Στη μια διαμόρφωση η οποία ορίζεται ως η κλειστή, η δομική περιοχή IV αλληλεπιδρά με τις περιοχές I και II της πρωτεΐνης και καλύπτει το καταλυτικό κέντρο, ενώ στην ανοιχτή το C-τελικό άκρο απομακρύνεται και αφήνει εκτεθειμένο το καταλυτικό κέντρο στο διαλύτη. Η αλλαγή της διαμόρφωσης του ενζύμου προκαλεί αναπροσανατολισμό αμινοξικών καταλοίπων που συμμετέχουν στο σχηματισμό του καταλυτικού κέντρου. Η διαμόρφωση που αποκτά το ένζυμο έχει συνδεθεί με την ενεργότητά του με την ανοιχτή διαμόρφωση να χαρακτηρίζεται ως ανενεργή ενώ η κλειστή φαίνεται ότι συνδέεται με καταλυτικά δραστικό ένζυμο [84]. Στην κλειστή διαμόρφωση οι τέσσερις δομικές περιοχές σχηματίζουν μια κοιλότητα η οποία εκτείνεται μεταξύ των δομικών περιοχών II και IV και έχει μήκος 36Å. Η περιοχή I αποτελείται εξ' ολοκλήρου από β-πτυχωτές επιφάνειες και φαίνεται να αλληλεπιδρά με το N-τελικό άκρο του πεπτιδικού υποστρώματος. 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 μοτίβο πρόσδεσης ψευδαργύρου. Ο Zn<sup>2+</sup> 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 δραστηριότητας καθώς αντικατάσταση της τυροσίνης από φαινυλαλανίνη οδηγεί σε σημαντική μείωση της δραστηριότητας της ERAP1. Η δομική περιοχή III αποτελείται από β-πτυχωτές επιφάνειες και συνδέει την περιοχή II με την IV [84].



Σχήμα 5: Ανοιχτή (PDB 3MDJ) και κλειστή (PDB 2YDO) διαμόρφωση της αμινοπεπτιδάσης ERAP1. Μπλε: δομική περιοχή I, πράσινο: δομική περιοχή II, πορτοκαλί: δομική περιοχή III, μωβ: δομική περιοχή IV. [85].

Η τελευταία αποτελεί το C-τελικό άκρο του μορίου της ERAP1 και εκτείνεται μακριά από το καταλυτικό κέντρο σχηματίζοντας την εκτεταμένη κοιλότητα δέσμευσης υποστρώματος. Η συγκρυστάλλωση της ERAP1 με την μπεστατίνη, έναν γνωστό αναστολέα αμινοπεπτιδασών, προσφέρει μια προσομοίωση της δέσμευσης των πρώτων αμινοξέων ενός φυσικού υποστρώματος από την ERAP1 [84]. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 7, 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[84].



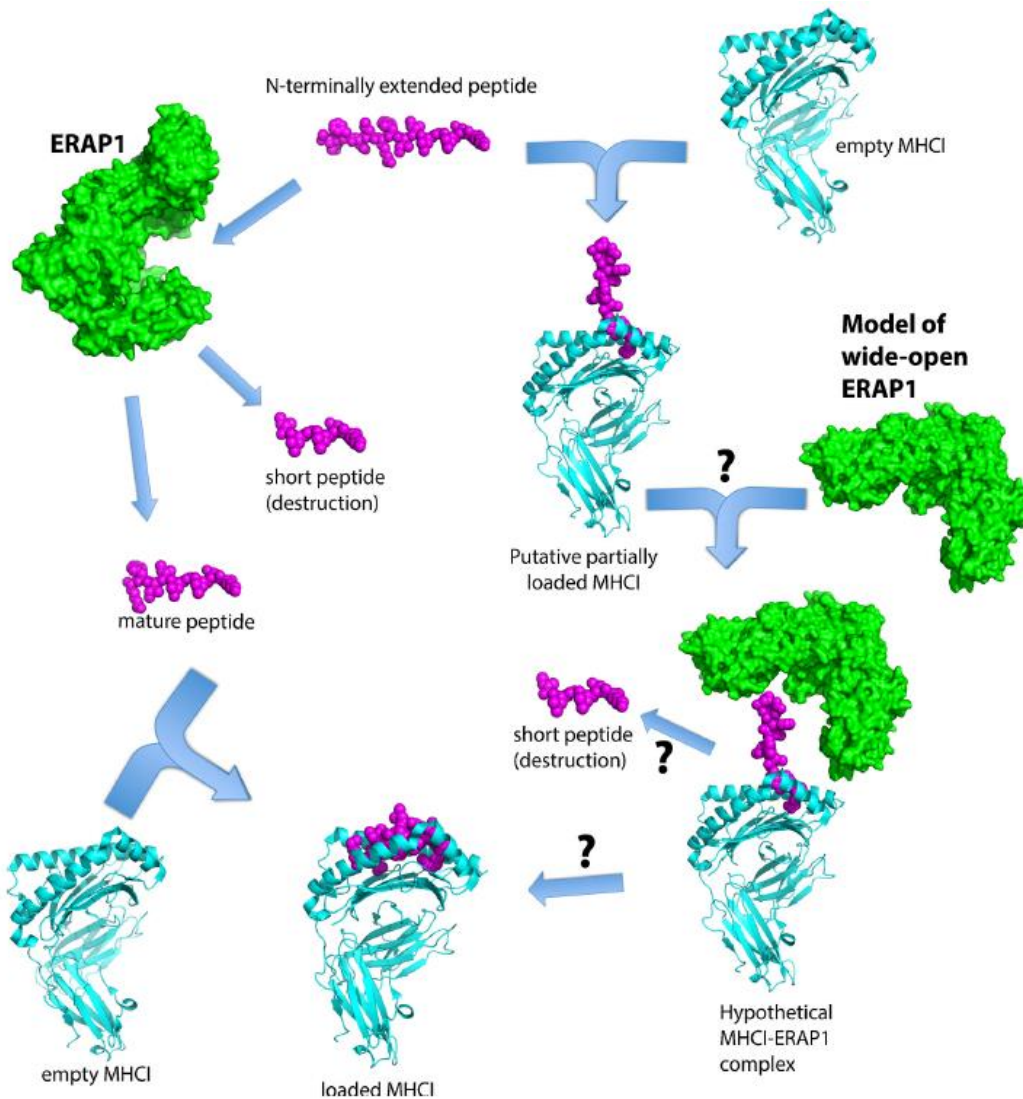
Σχήμα 6: Αλληλεπιδράσεις των αμινοξέων του καταλυτικού κέντρου της ERAP1 με τον αναστολέα αμινοπεπτιδασών μπεστατίνη (μπλε ράβδοι) [84].

#### 1.4.4 Ενζυμική λειτουργία

Όπως φαίνεται από το βιολογικό ρόλο της, η ERAP1 πρέπει να είναι ικανή να δεσμεύει και 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 πεπτίδιο είχε το μοτίβο X-P-Xn [35]. Την εξειδίκευση του ενζύμου ως προς το N-τελικό αμινοξύ των πεπτιδικών υποστρωμάτων, είχαν μελετήσει και οι Hattori et al. οι οποίοι βρήκαν ότι από τη σειρά μη φυσικών υποστρωμάτων του τύπου X-AMC, πιο αποτελεσματικά υδρολύεται η λευκίνη και η μεθειονίνη, ενώ μικρότερη δραστικότητα μετρήθηκε για την κυστεΐνη και τη φαινυλαλανίνη [66]. 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 [84]. Σημαντικό ρόλο στην εξειδίκευση του ενζύμου παίζει η γλουταμίνη 181 καθώς πειράματα σημαϊκής μεταλλαξιγένεσης που οδηγούν σε αντικατάστασή 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 δραστικότητα απέναντι σε συνθετικά και φυσικά υποστρώματα [86]. Ενώ λοιπόν η ERAP1 φαίνεται να έχει περιορισμένη εξειδίκευση για μη φυσικά υποστρώματα, στον οργανισμό καταλύει την αποικοδόμηση μεγάλου εύρους υποστρωμάτων. Είναι λοιπόν πιθανό, αλληλεπιδράσεις και άλλων αμινοξικών καταλοίπων, εκτός του N-τελικού αμινοξέος, με το ένζυμο, να συνεισφέρουν στην ταχύτητα υδρόλυσης του επιτόπου. Πράγματι, η αλληλουχία ενός πεπτιδίου είναι καθοριστική για τον καταβολισμό του, καθώς έχουν παρατηρηθεί μεγάλες διακυμάνσεις στην ταχύτητα υδρόλυσης πεπτιδίων τα οποία διαφέρουν ακόμα και κατά ένα αμινοξύ. Υδροφοβα και θετικά φορτισμένα αμινοξέα φαίνεται να αυξάνουν την ενζυμική δραστικότητα της ERAP1, κάτι που συνάδει με το γεγονός ότι η κοιλότητα πρόσδεσης του υποστρώματος απαρτίζεται από υδροφοβα και αρνητικά φορτισμένα αμινοξέα [87]. 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 πεπτιδία μήκους 10-14 αμινοξέων σε σχέση με εννιαμερή ή οκταμερή όπου η ταχύτητα ήταν είτε πολύ μικρή είτε μηδενική [65]. 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 πεπτιδία μήκους 9-16 αμινοξέων. Για να ελέγξουν κατά πόσο αυτή η προτίμηση οφείλεται στο μήκος και όχι στην αλληλουχία, χρησιμοποίησαν πεπτιδία διαφόρων μεγεθών με το επαναλαμβανόμενο μοτίβο QLES. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το πεπτιδίο με 13 αμινοξέα υδρολύεται πολύ πιο γρήγορα από το εννιαμερές και το πενταμερές [88]. Η ικανότητα αυτή της ERAP1 είναι συνδεδεμένη με τη βιολογική της λειτουργία καθώς καλείται να υδρολύσει πεπτιδία μεγέθους μέχρι και 16 αμινοξέα αλλά και να περιορίσει την καταλυτική της δραστικότητα για 9μερή πεπτιδία τα οποία είναι και βέλτιστοι προσδέτες των περισσότερων MHC. Βάσει αυτών των παρατηρήσεων έχουν προταθεί δύο μηχανισμοί οι οποίοι εξηγούν τον τρόπο επεξεργασίας των αντιγονικών επιτόπων από την ERAP1. Ο πρώτος μηχανισμός, ο οποίος ονομάζεται και μηχανισμός μοριακού κανόνα, προτείνει ότι το καρβοξυτελικό άκρο της ERAP1 περιέχει μια αλλοστερική θέση ενεργοποίησης του ενζύμου και έτσι, για να λάβει χώρα αποτελεσματική υδρόλυση πρέπει το υπόστρωμα να αλληλεπιδρά ταυτόχρονα τόσο με το καταλυτικό κέντρο όσο και με αυτή τη ρυθμιστική περιοχή [88]. Καθώς η κοιλότητα πρόσδεσης πεπτιδίων έχει συγκεκριμένο μήκος, αυτή η ταυτόχρονη αλληλεπίδραση καθίσταται όλο και πιο δύσκολη όσο μειώνεται το μήκος του πεπτιδικού υποστρώματος.



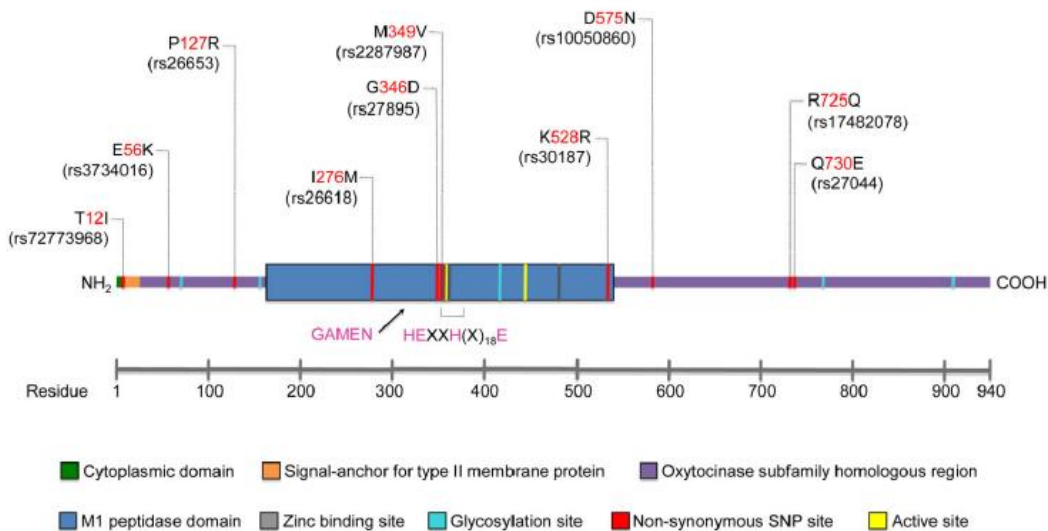
**Σχήμα 7:** Προτεινόμενοι μηχανισμοί για την επεξεργασία των αντιγονικών επιτόπων από την αμινοπεπτιδάση ERAP1. Αριστερά: Η αμινοπεπτιδάση ERAP1 υδρολύει τους πρόδρομους αντιγονικούς επιτόπους στο διάλυμα. Οι ώριμοι επίτοποι φορτώνονται στα MHC I ενώ τα μικρότερα πεπτίδια δεν καταφέρνουν να παρουσιαστούν. Δεξιά: Οι πρόδρομοι αντιγονικοί επίτοποι προσδένονται μερικώς στα MHC I και στη συνέχεια δημιουργείται ένα σύμπλεγμα MHC I-πεπτιδίου-ERAP1. Όταν το πεπτίδιο αποκτήσει κατάλληλο μήκος η ERAP1 αποδεσμεύεται [89].

Ο δεύτερος μηχανισμός προτείνει ότι ο καταβολισμός του πεπτιδίου πραγματοποιείται όταν αυτό είναι προσδεμένο στα MHC I με το εκτεταμένο N-τελικό του άκρο να παραμένει ελεύθερο [90, 91]. Σε αυτό το μοντέλο το MHC I δρα ως εκμαγείο για την υδρόλυση του πεπτιδίου περιορίζοντας έτσι σε μεγάλο βαθμό τη συνεισφορά της ERAP1 στην επιλογή των επιτόπων οι οποίοι εν τέλει θα παρουσιαστούν. Ενώ η ικανότητα υδρόλυσης πεπτιδίων στο διάλυμα από την ERAP1 έχει

αποδειχθεί, μέχρι στιγμής δεν υπάρχουν πειραματικά δεδομένα που να επιβεβαιώνουν την αλληλεπίδραση της ERAP1 με τα MHC [92].

#### 1.4.4.1 Πολυμορφικότητα και ενζυμική λειτουργία της ERAP1

Το γονίδιο της *ERAP1* περιέχει πολλές πολυμορφικές θέσεις οι οποίες επηρεάζουν τόσο την έκφραση του γονιδίου όσο και την αλληλουχία. Η ύπαρξη παρανοηματικών πολυμορφισμών μονού νουκλεοτίδιου (SNPs) οδηγεί στην έκφραση ενζύμων τα οποία διαφέρουν σε αρκετές θέσεις μεταξύ τους [93]. Παρόλο που οι περισσότεροι πολυμορφισμοί στο μόριο της ERAP1 δεν εντοπίζονται στην περιοχή του καταλυτικού κέντρου, φαίνεται ότι επηρεάζουν τόσο τη δραστηριότητα, όσο και την εξειδίκευση του ενζύμου (Σχήμα 9). Ο πολυμορφισμός rs30187 ο οποίος κωδικοποιεί για την αντικατάσταση της λυσίνης 528 από αργινίνη (K528R) έχει ως αποτέλεσμα χαμηλότερη ικανότητα υδρόλυσης πεπτιδίων *in vitro* αλλά και *in vivo* [94-97], ενώ επηρεάζει αρνητικά την παρουσίαση συγκεκριμένων αντιγονικών επιτόπων [97, 98]. Η θέση 528 βρίσκεται στην τρίτη δομική περιοχή της ERAP1 και παρά το γεγονός ότι δεν αλληλεπιδρά με το υπόστρωμα ενδεχομένως να επηρεάζει τη μετάβαση από την ανοιχτή στην καταλυτικά δραστηκή κλειστή διαμόρφωση του ενζύμου. Την καταλυτική δραστηριότητα της ERAP1 φαίνεται να επηρεάζουν και τα αμινοξέα που βρίσκονται στις θέσεις 575 και 725 [94, 99]. Συγκεκριμένα, έχει δειχθεί ότι η παρουσία ασπαραγίνης αντί ασπαρτικού οξέος στη θέση 575 (D575N) αυξάνει την ενζυμική δραστηριότητα *in vitro* [99] ενώ η αντικατάσταση R725Q οδηγεί σε μειωμένη καταλυτική ικανότητα [94]. Επίσης σε μια πρόσφατη μελέτη όπου μελετήθηκε η πολυμορφική θέση 276, φάνηκε ότι η παρουσία ισολευκίνης αντί μεθειονίνης οδηγεί σε υψηλότερη ταχύτητα υδρόλυσης ενός N-εκτεταμένου αντιγονικού επιτόπου [100]. Τέλος, η αντικατάσταση Q730E φαίνεται ότι επηρεάζει την εξειδίκευση του ενζύμου καθώς και την επιλογή πεπτιδίων βάσει μήκους [94, 101]. Η θέση 730 εντοπίζεται στη ρυθμιστική δομική περιοχή του ενζύμου και πιθανώς αλληλεπιδρά με το καρβοξυτελικό άκρο του ενζύμου.



**Σχήμα 8: Πολυμορφικές θέσεις στην αλληλουχία της αμινοπεπτιδάσης ERAP1. Στο σχήμα φαίνονται οι παραλλαγές των αμινοξέων στην κάθε θέση [102].**

#### 1.4.5 Σχέση της βιολογικής δράσης της ERAP1 με την παθογένεση ανθρωπίνων ασθενειών

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το γονίδιο που κωδικοποιεί την ERAP1 είναι ένα πολυμορφικό γονίδιο με πολλούς από αυτούς τους φυσικά απαντώμενους πολυμορφισμούς να έχουν συσχετιστεί με ασθένειες αυτοάνοσης ή μη αιτιολογίας. Επειδή τα σύμπλοκα των μορίων MHC I με τα αντιγονικά πεπτιδία αναγνωρίζονται τόσο από τα κυτταροτοξικά Τ-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 συμβάλλει στην αποτελεσματική ανοσολογική απόκριση έναντι σε ιικές και βακτηριακές μολύνσεις. Ποντίκια στα οποία έχει αποσιωπηθεί το γονίδιο της *ERAP1*, δεν παράγουν τον ανοσοκυρίαρχο επίτοπο HF10 του βακτηρίου *Toxoplasma gondii* και πεθαίνουν εξαιτίας γενικευμένης μόλυνσης [103], ενώ σε άλλη μελέτη έχει βρεθεί ότι εμφανίζουν διαφοροποιημένες αποκρίσεις CD8+ Τ-λεμφοκυττάρων έναντι στον ιό HCMV [104]. Έχει προταθεί επίσης ότι μεταλλάξεις διαφυγής του HIV από το ανοσοποιητικό σύστημα μπορεί να επηρεάζουν την

επεξεργασία των επιτόπων από την ERAP1 [105, 106]. Συγκεκριμένα, η αντικατάσταση της αλανίνης 146 από προλίνη στην πρωτεΐνη Gag του HIV έχει ως αποτέλεσμα τη μη αποτελεσματική παραγωγή ενός επιτόπου ειδικού για το HLA-B57 και μειωμένη απόκριση των κυτταροτοξικών Τ-λεμφοκυττάρων σε άτομα που εκφράζουν το συγκεκριμένο μόριο ιστοσυμβατότητας [106]. Τέλος, συγκεκριμένα αλληλόμορφα της αμινοπεπτιδάσης ERAP1 έχουν συσχετιστεί με αυξημένες πιθανότητες μετάστασης και μειωμένα ποσοστά επιβίωσης σε περιστατικά καρκίνου του τραχήλου της μήτρας λόγω μόλυνσης από τον ιό HPV [107].

Καθώς η αμινοπεπτιδάση ERAP1 έχει την ικανότητα να υδρολύει βιοδραστικά πεπτιδία που συμβάλλουν στη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης, πολυμορφισμοί στο γονίδιο της που επηρεάζουν τη λειτουργία της έχουν συσχετιστεί με αντίστοιχες παθολογικές καταστάσεις [79]. 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) με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης υπέρτασης [108]. Το αλληλόμορφο 528R εμφανίζει χαμηλότερη δραστικότητα σε σχέση με το 528K που οδηγεί σε χαμηλότερη αδρανοποίηση της αγγειοτενσίνης II και της καλλιδίνης [96].

Τα αυτοάνοσα νοσήματα αποτελούν μια ομάδα παθολογικών καταστάσεων οι οποίες παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία τόσο στο φαινότυπό τους όσο και στην αιτιολογία τους. Μελέτες συσχέτισης γονιδιώματος (Genome Wide Association Studies, GWAS), αποκάλυψαν ισχυρές συσχετίσεις γονιδίων με διάφορες ασθένειες χωρίς όμως να είναι γνωστός ο μηχανισμός της παθογένειας. Ένα από αυτά τα γονίδια είναι και αυτό της αμινοπεπτιδάσης ERAP1 το οποίο αποτελεί προστατευτικό ή επιβαρυντικό παράγοντα για διάφορες ασθένειες αναλόγως με τον απλότυπο που εμφανίζεται στο γονιδίωμα. Το πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η συσχέτιση της ERAP1 με την αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα η οποία είναι μια χρόνια φλεγμονώδης ρευματοπάθεια που προσβάλλει την ιερολαγόνιες αρθρώσεις και τα χαμηλότερα τμήματα της σπονδυλικής στήλης. Πάνω από το 90% των ασθενών με αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα εκφράζουν το αλληλόμορφο HLA-B\*27 ενώ αρκετές θέσεις πολυμορφισμών στο γονίδιο της *ERAP1* έχουν συσχετιστεί με την ασθένεια [94, 108-110]. Συνολικά, συνδυασμός πολυμορφισμών που εκφράζει ένζυμο με υψηλή ενεργότητα αποτελεί παράγοντα κινδύνου για τη συγκεκριμένη ασθένεια [111]. Αντίθετα, λιγότερο δραστικά αλληλόμορφα φαίνεται να έχουν προστατευτική δράση [111]. Σε αντίθεση με την αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα, μειωμένη ενζυμική δραστικότητα από την ERAP1 έχει συσχετιστεί με παράγοντα κινδύνου για εμφάνιση της νόσου του Behçet και της χοριοαμφιβληστροειδοπάθειας τύπου birdshot. Η μειωμένη ενζυμική δραστικότητα αφορά και στην έκφραση απλότυπων που εμφανίζουν μειωμένη ενεργότητα αλλά

και σε χαμηλά επίπεδα έκφρασης του ενζύμου, γεγονός που καταδεικνύει ότι η συνολική δραστηριότητα αμινοπεπτιδάσης στο ενδοπλασματικό δίκτυο εμπλέκεται στην παθογένεια των συγκεκριμένων ασθενειών [112-114]. Η αμινοπεπτιδάση ERAP1 φαίνεται να εμπλέκεται και στην εμφάνιση ψωρίασης. Η ψωρίαση είναι μια χρόνια αυτοάνοση ασθένεια του δέρματος η οποία χαρακτηρίζεται από αυξημένο πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση των κυττάρων της κεράτινης στοιβάδας του δέρματος και παρουσιάζει ισχυρό συσχετισμό με το αλληλόμορφο HLA-Cw6 [115]. Δύο μελέτες συσχέτισης γονιδιώματος [116, 117] αποκάλυψαν και ισχυρό συσχετισμό με το γονίδιο της *ERAP1* αλλά μόνο σε ασθενείς θετικούς για το HLA-Cw6, οι οποίοι μάλιστα εμφανίζουν την ασθένεια σε νεαρή ηλικία [118]. Επιπλέον η αμινοπεπτιδάση ERAP1 παίζει ρόλο και στην παθογένεια της σκλήρυνσης κατά πλάκας, του διαβήτη τύπου I και της νόσου του Crohn όπου και στις τρεις περιπτώσεις εμπλέκεται ο πολυμορφισμός rs30187 (K528R) [119-121]. Τέλος, μια πρόσφατη μελέτη σε ασθενείς με ατοπική δερματίτιδα αποκάλυψε συσχετισμό της εμφάνισης της ασθένειας με το αλληλόμορφο HLA-C\*05:01 και τον πολυμορφισμό rs26618T>C (I276M) στο γονίδιο της *ERAP1* [100].

Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε καρκινικές κυτταρικές σειρές έχουν δείξει ότι η έκφραση της ERAP1 αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την ανοσιακή διαφυγή κακοήθων νεοπλασιών. Μελέτες έχουν δείξει ότι η παρουσία της ERAP1 σε καρκινικές κυτταρικές σειρές μπορεί να ρυθμίζει κυτταροτοξικές αποκρίσεις μέσω φυσικών φονικών (NK) κυττάρων [122, 123]. Συγκεκριμένα, αναστολή της ERAP1 στην κυτταρική σειρά λεμφώματος T-κυττάρων RMA, οδήγησε σε απόρριψή της σε μοντέλο συγγενικών ποντικών μέσω της δράσης των NK κυττάρων [122]. Παρόμοια απόκριση παρατηρήθηκε και έναντι ανθρώπινης κυτταρικής σειράς μυελοβλαστώματος όπου αναστολή της ERAP1 είχε σαν αποτέλεσμα μειωμένη δέσμευση ανασταλτικών υποδοχέων των NK κυττάρων και αυξημένη λυτική δράση [123]. Επίσης η ERAP1 μπορεί να ρυθμίσει και αποκρίσεις των CD8<sup>+</sup> T-λεμφοκυττάρων έναντι σε κύτταρα που παρουσιάζουν καρκινικά αντιγονικά πεπτιδία [124, 125]. Ο ανοσοκυριάρχος επιτόπος μελανώματος MART-1<sub>26-35</sub> ενώ αναγνωρίζεται από τα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα και έχει τη δυνατότητα να εκκινεί ανοσολογικές αποκρίσεις, δεν παρουσιάζεται επιτυχώς από τα MHC I. Η αμινοπεπτιδάση ERAP1 φαίνεται ότι συμβάλλει στη μειωμένη αντιγονοπαρουσίαση του επιτόπου με το να υδρολύει το πεπτιδίο σε βαθμό που να μη το καθιστά κατάλληλο για πρόσδεση στο MHC I [125]. Αντίστοιχη περίπτωση αποτελεί και το καρκινικό αντιγόνο ορθοκολικού καρκίνου, GSW11. Αποσιώπηση της ERAP1 με siRNA αλλά και αναστολή της με έναν αναστολέα αμινοπεπτιδασών οδήγησαν σε αυξημένη παραγωγή του επιτόπου, ενώ in vivo πειράματα έδειξαν ενεργοποίηση των CD8<sup>+</sup> T-λεμφοκυττάρων έναντι του επιτόπου όταν η ανάλογη αμινοπεπτιδάση ERAAP

απουσίαζε [124]. Επιπλέον, η ύπαρξη του πολυμορφισμού rs28119 φαίνεται να επηρεάζει την έκφραση του γονιδίου της ERAP1 σε 16 τύπους καρκίνου ενισχύοντας την άποψη ότι συστατικά της επίκτητης ανοσολογικής απόκρισης επηρεάζουν το φαινότυπο ασθενών με καρκίνο [126]. Τέλος έχει παρατηρηθεί ότι η αποτελεσματικότητα ανοσοθεραπείας με παθητική μεταφορά T-κυττάρων εξαρτάται από τη δραστικότητα της ERAP1 μέσω εμπλοκής της στην αντιγονοπαρουσίαση τύπου I και στη διασταυρούμενη αντιγονοπαρουσίαση [127].

#### **1.4.6 Επίδραση της αμινοπεπτιδάσης ERAP1 στο ανοσοπεπτιδίωμα**

Με τον όρο ανοσοπεπτιδίωμα αναφερόμαστε στο σύνολο των αντιγονικών επιτόπων τα οποία δεσμεύονται και παρουσιάζονται από τα μόρια ιστοσυμβατότητας στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Καθώς η συγκεκριμένη διατριβή εστιάζει στη λειτουργία της αμινοπεπτιδάσης ERAP1 η οποία εμπλέκεται στην παραγωγή επιτόπων των μορίων MHC τάξης I, στη συνέχεια ο όρος ανοσοπεπτιδίωμα θα αφορά στους επιτόπους που παρουσιάζονται από τα MHCI. Λόγω του κομβικού ρόλου της αμινοπεπτιδάσης ERAP1 στην παραγωγή των αντιγονικών επιτόπων έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες πάνω στην επίδραση της ERAP1 στο ανοσοπεπτιδίωμα κυρίως όσον αφορά συγκεκριμένα μόρια ιστοσυμβατότητας τα οποία συσχετίζονται με αυτοάνοσα νοσήματα. Σε αυτές τις μελέτες έχουν χρησιμοποιηθεί κυρίως ανθρώπινες κυτταρικές σειρές που εκφράζουν διαφορετικά αλληλόμορφα ERAP1 τα οποία φέρουν αμινοξέα σε πολυμορφικές θέσεις που επηρεάζουν τη δραστικότητα και την εξειδίκευση του ενζύμου [111]. Τη φύση του ανοσοπεπτιδιώματος του HLA-B\*27 επηρεάζουν διάφοροι πολυμορφισμοί του γονιδίου της ERAP1 με διακριτό τρόπο ο καθένας. Το ανοσοπεπτιδίωμα κυττάρων τα οποία εκφράζουν ERAP1 η οποία φέρει πολυμορφισμούς οι οποίοι συνδέονται με αυξημένη ενζυμική δραστικότητα περιέχει περισσότερα θμερή πεπτιδία, υψηλότερα ποσοστά αμινοξέων στο N-τελικό άκρο τα οποία δεν αποτελούν καλά υποστρώματα για την ERAP1, ενώ φαίνεται ότι τα πεπτιδία προσδένονταν στα MHC πιο ισχυρά. Η παρουσία λιγότερο δραστικών απλοτύπων της ERAP1 επηρεάζει διπλά το μήκος των αντιγονικών πεπτιδίων καθώς η χαμηλότερη ενεργότητα οδηγεί στην παραγωγή μεγαλύτερων πεπτιδίων όμως η ύπαρξη γλουταμινικού οξέος στη θέση 730 προάγει την παραγωγή μικρότερων πεπτιδίων λόγω αλλαγής στην εξειδίκευση της ERAP1 [128-131]. Παρόμοια επίδραση έχει η παρουσία έντονα δραστικής ERAP1 και στο ανοσοπεπτιδίωμα του HLA-A\*29:02 καθώς η έκφραση των απλότυπων 2 και 3 επιφέρει αύξηση των θμερών πεπτιδίων σε σχέση με τα μεγαλύτερα, επηρεάζει τη φύση των αμινοξέων στις θέσεις P1 και P2 και σχετίζεται με καθολική αύξηση της χημικής συγγένειας των

πεπτιδίων [132] . Σε αυτό το σημείο αξίζει να αναφέρουμε ότι η ίδια τάση στη μεταβολή του ανοσοπεπτιδιώματος σχετίζεται με παθογένεια στην περίπτωση της αγκυλοποιητικής σπονδυλίτιδας, ενώ έχει προστατευτική δράση για την χοριοαμφιβληστροειδοπάθεια τύπου birdshot. Το ανοσοπεπτιδίωμα των μορίων HLA-B\*51 εμφανίζει κάποια ιδιαίτερα χαρακτηριστικά καθώς αποτελείται κυρίως από 8μερή ενώ μπορεί να χωριστεί σε δύο επιμέρους υποομάδες ανάλογα με το αμινοξύ αγκυροβόλησης (Ala/Pro) στη θέση 2 του HLA-B\*51 [133]. Η ύπαρξη ενζύμου ERAP1 με χαμηλή ενζυμική δραστηριότητα οδηγεί και σε αυτή την περίπτωση σε μείωση των βέλτιστων επιτόπων τα οποία στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι τα 8μερή, αύξηση των πεπτιδίων που περιέχουν αλανίνη στη θέση 2 με αντίστοιχη μείωση των πεπτιδίων που περιέχουν προλίνη και σε μια γενικότερη μείωση της χημικής συγγένειας των επιτόπων [133, 134]. Η συμβολή της αμινοπεπτιδάσης ERAP1 στο σχηματισμό του ανοσοπεπτιδιώματος του αλληλομόρφου HLA-B51:01 εξετάστηκε και σε μια πρόσφατη μελέτη σε κυτταρική σειρά λεμφοβλαστώματος όπου πραγματοποιήθηκε αποσιώπηση του γονιδίου της *ERAP1* με το σύστημα CRISPR/Cas9 [135]. Απουσία του ενζύμου, τα πεπτίδια που προσδένονταν από το HLA-B51:01 αποτελούνταν από μικρότερο ποσοστό 9μερών ενώ τα 8μερή καθώς και τα μεγαλύτερα πεπτίδια εμφανίστηκαν αυξημένα. Η συνολική χημική συγγένεια των πεπτιδίων που παρουσιάστηκαν απουσία ERAP1 είναι μικρότερη σε σχέση με αυτή των αγρίου τύπου κυρίως λόγω μείωσης της παρουσίας των πεπτιδίων που φέρουν προλίνη στη θέση 2 και αναμένεται να δένονται ισχυρά στο HLA-B51:01 [135]. Συνολικά από τις παραπάνω μελέτες προκύπτει μια περιορισμένη μεταβολή του συνολικού ανοσοπεπτιδιώματος με κύριες διαφορές στο μήκος των επιτόπων, τη φύση των N-τελικών αμινοξέων τους καθώς και στη γενικότερη συνάφειά τους για τα MHC οι οποίες φαίνεται να αποτελούν ένδειξη της συμμετοχής της ERAP1 στις ασθένειες με τις οποίες εμπλέκεται [111]. Η επίδραση της ERAP1 στο ανοσοπεπτιδίωμα του HLA-B27 διερευνήθηκε και από τους Barnea et al., οι οποίοι πραγματοποίησαν μια μεγάλης κλίμακας πρωτεομική ανάλυση σε διαγονιδιακούς αρουραίους που εκφράζουν το ανθρώπινο αλληλόμορφο HLA-B\*27 και διαπίστωσαν ότι απουσία ERAP1 επηρεάζεται μόνο ένα μέρος του ανοσοπεπτιδιώματος όπου και εκεί παρατηρούνται μεταβολές στο μήκος και την αλληλουχία των αντιγονικών επιτόπων. Μάλιστα, αυτή η περιορισμένη μεταβολή, εμφανίστηκε μόνο στα ομόζυγα ERAP1<sup>-/-</sup> πειραματόζωα, ενώ τα ετερόζυγα δεν παρουσίαζαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε σχέση με τα αγρίου τύπου [136]. Τέλος σε μία μελέτη σε knock-out πειραματόζωα για το ανάλογο ένζυμο ERAAP όπου πραγματοποιήθηκε ανάλυση του ανοσοπεπτιδιώματος δενδριτικών κυττάρων μυελού των οστών έδειξε ότι απουσία της ERAAP εμφανίζεται ένα καινούργιο ρεπερτόριο αντιγονικών επιτόπων το οποίο αποτελείται από μεγαλύτερου μήκους πεπτίδια με σημαντικές διαφορές στη σύνθεσή τους, ενώ εμφανίζονται και N-εκτεταμένοι επίτοποι [137]. Παρά

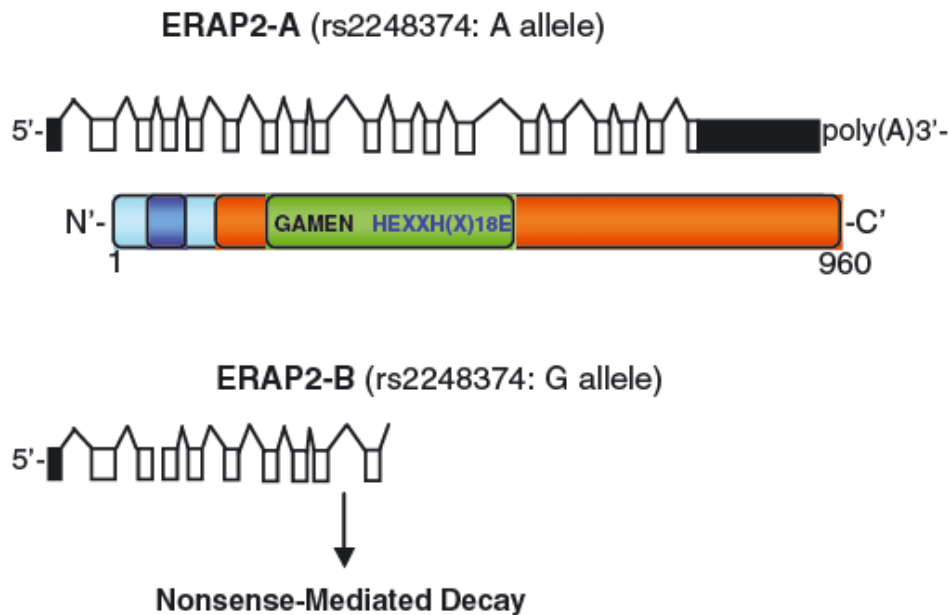


το γεγονός ότι οι νέοι αυτοί επίτοποι έχουν μοναδικά χαρακτηριστικά, αποτελούν ένα μικρό ποσοστό του συνολικού ανοσοπεπτιδιώματος το οποίο και έχει παραμείνει αναλλοίωτο [137].

## 1.5 Η αμινοπεπτιδάση ERAP2

### 1.5.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Η αμινοπεπτιδάση ERAP2 αποτελεί το πιο πρόσφατα χαρακτηρισμένο μέλος της υποοικογένειας των ωκυτοκινασών και αρχικά περιεγράφηκε ως αμινοπεπτιδάση αργινίνης προερχόμενη από λευκοκύτταρα (L-RAP) καθώς κλωνοποιήθηκε από βιβλιοθήκη cDNA λευκοκυττάρων [61]. Το γονίδιο της *ERAP2* βρίσκεται στο 5q15 χρωμόσωμα στο ανθρώπινο γονιδίωμα, αποτελείται συνολικά από 19 εξώνια και κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη 960 αμινοξέων η οποία παρουσιάζει υψηλά επίπεδα ομολογίας με τις άλλες δύο αμινοπεπτιδάσες της υποοικογένειας. Όπως και η ERAP1, έτσι και η αμινοπεπτιδάση ERAP2 εκφράζεται καθολικά στους ιστούς και τα επίπεδά της αυξάνονται μετά από επίδραση με IFN- $\gamma$  [61],[138]. Μέσα στα κύτταρα, η ERAP2 εντοπίζεται διαλυτή στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου αν και περιέχει στην αλληλουχία της περιοχή με υψηλά επίπεδα υδροφοβικότητας αντίστοιχη με αυτή του διαμεμβρανικού τμήματος της IRAP. Για τη διατήρηση στο ενδοπλασματικό δίκτυο φαίνεται ότι συμβάλλει μια δομική περιοχή αντίστοιχη με αυτή που βρίσκεται στην ERAP1 [69]. Η έκφραση της ERAP2 επηρεάζεται από ένα πολυμορφισμό μονού νουκλεοτιδίου (SNP), το αλληλόμορφο του οποίου που περιέχει G, δημιουργεί μια εναλλακτική θέση ματίσματος στο εξώνιο 10, με αποτέλεσμα την εμφάνιση πρώιμου κωδικονίου λήξης. Το ελλιπές mRNA που προκύπτει, καταστρέφεται μέσω ανοηματικά μεσολαβούμενης αποσύνθεσης και δεν παράγει κάποια ανιχνεύσιμη μορφή της πρωτεΐνης με αποτέλεσμα άνθρωποι ομόζυγοι για το συγκεκριμένο πολυμορφισμό να μην εκφράζουν ERAP2 (Σχήμα 10). Τα δύο αλληλόμορφα τον συγκεκριμένου πολυμορφισμού (rs2248374) απαντώνται με ίδια συχνότητα στον πληθυσμό λόγω ισόρροπης επιλογής με αποτέλεσμα περίπου το 25% των ανθρώπων να μην εκφράζουν τη συγκεκριμένη αμινοπεπτιδάση, ενώ το 50% παρουσιάζει μειωμένη έκφραση [139].



**Σχήμα 9:** Σχηματική αναπαράσταση των δύο κύριων μεταγράφων του γονιδίου της αμινοπεπτιδάσης ERAP2 [64].

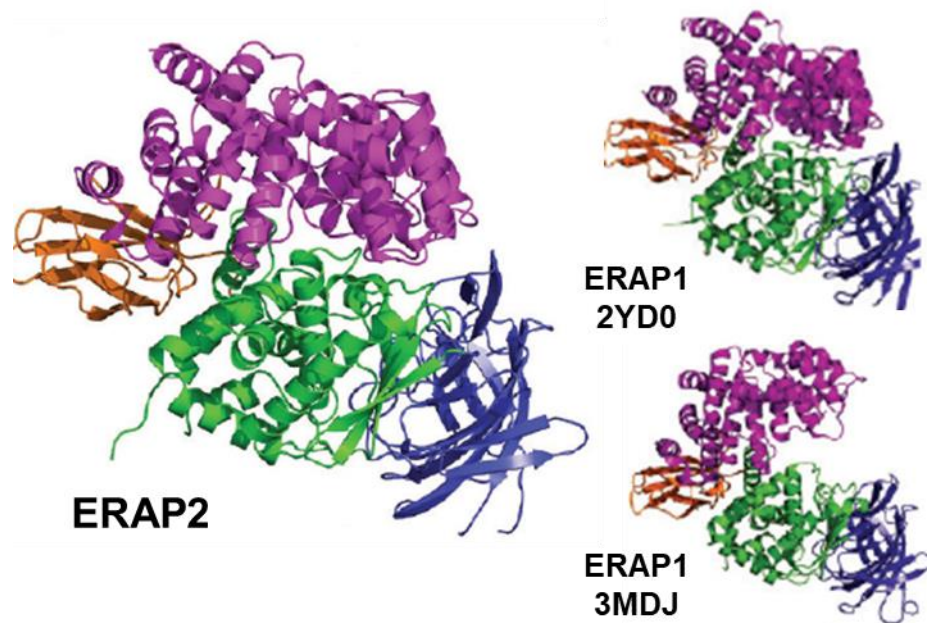
### 1.5.2 Βιολογική δράση

Ο υποκυτταρικός εντοπισμός της ERAP2 και τα υψηλά επίπεδα ομολογίας με την ομόλογη αμινοπεπτιδάση ERAP1, αποτέλεσαν ενδείξεις της εμπλοκής της ERAP2 στην παραγωγή ώριμων αντιγονικών επιτόπων για την πρόσδεση στα MHCI [61]. Η ERAP2 με τα σημερινά δεδομένα, θεωρείται ότι έχει ένα βοηθητικό ρόλο στην υδρόλυση των πρόδρομων πεπτιδίων στο ενδοπλασματικό δίκτυο καθώς δεν εκφράζεται σε ένα ποσοστό ανθρώπων και απουσιάζει τελείως σε τρωκτικά, γεγονός που έχει περιορίσει σε μεγάλο βαθμό τις μελέτες της βιολογικής της λειτουργίας [139]. Παρόλα αυτά, πειράματα έχουν δείξει ότι είναι απαραίτητη η καταλυτική δράση της ERAP2 για την παραγωγή συγκεκριμένων αντιγονικών επιτόπων. Το 2005 οι Saveanu et al., έδειξαν ότι για να παραχθεί αποτελεσματικά ο επίτοπος του HIV SLYNTATL, απαιτείται η υδρόλυση μιας αργινίνης η οποία πραγματοποιείται από την ERAP2, ενώ αποσιώπηση του ίδιου ενζύμου σε κύτταρα HeLa με siRNA οδήγησε σε μείωση της παρουσίας ενός επιτόπου του ανθρώπινου κυτταρομεγαλοϊού [140]. Οι σημαντικές διαφορές στην εξειδίκευση της ERAP2 σε σχέση με την ERAP1 ενδεχομένως καταδεικνύουν ένα διαφορετικό ρόλο στην αντιγονοπαρουσίαση, ο οποίος ενισχύει τη δράση της ERAP1 με το να υδρολύει μικρότερα

πεπτιδία που δρουν ανασταλτικά για αυτή αλλά και να την υποκαθιστά σε περίπτωση μειωμένης έκφρασης της ERAP1.

### 1.5.3 Δομή της αμινοπεπτιδάσης ERAP2

Η επίλυση της κρυσταλλικής δομής του μορίου της ERAP2 αποκάλυψε την ύπαρξη τεσσάρων διακριτών δομικών περιοχών, παρόμοιες με το μόριο της ERAP1, οι οποίες σχηματίζουν μια εσωτερική κοιλότητα όπου δεσμεύεται το πεπτιδίο και έτσι αποκτά πρόσβαση στο καταλυτικό κέντρο [141]. Η ERAP2 έχει κρυσταλλωθεί ελεύθερη αλλά και ως σύμπλοκο με τρεις αναστολείς που δεσμεύουν το καταλυτικό κέντρο και με δύο πεπτιδικά υποστρώματα [141],[142],[143],[144]. Σε όλες τις περιπτώσεις το μόριο της ERAP2 αποκτά μια διαμόρφωση η οποία προσομοιάζει στην κλειστή διαμόρφωση της ERAP1. Σε αυτή τη διαμόρφωση η αύλακα πρόσδεσης του πεπτιδίου δεν έχει πρόσβαση στον εξωτερικό διαλύτη κάτι το οποίο αποτελεί ένδειξη της ύπαρξης μιας άλλης πιο ανοιχτής διαμόρφωσης [145]. Η πρώτη δομική περιοχή στο N-τελικό άκρο της πρωτεΐνης αποκτά δευτεροταγή διαμόρφωση β-πτυχωτής επιφάνειας και ακολουθείται από τη δεύτερη δομική περιοχή η οποία είναι ομόλογη με τη θερμολυσίνη και περιέχει το καταλυτικό κέντρο. Το ιόν του ψευδαργύρου  $Zn^{2+}$  συντονίζεται από τις ιστιδίνες H370, H374 και από το γλουταμινικό οξύ E393. Το κατάλοιπο της τυροσίνης 455, το οποίο είναι ομόλογο με την Y438 στην ERAP1, σταθεροποιεί το τετραεδρικό ενδιάμεσο που σχηματίζεται κατά τον καταλυτικό κύκλο και συγκρίνοντας με τη δομή της ERAP1 βλέπουμε ότι βρίσκεται στη διαμόρφωση που συνδέεται με ενεργοποίηση του ενζύμου. Στη δεύτερη δομική περιοχή βρίσκεται και το μοτίβο εξωπεπτιδάσης GAMEN το οποίο αναγνωρίζει το N-τελικό άκρο του πεπτιδίου και το βοηθά να αποκτήσει κατάλληλη θέση για υδρόλυση του πεπτιδικού του δεσμού. Το GAMEN εντοπίζεται δίπλα στο καταλυτικό κέντρο και συμμετέχει στο σχηματισμό του S1 θύλακα μαζί με την προλίνη 333. Η τρίτη δομική περιοχή έχει δομή β-πτυχωτής επιφάνειας και αποτελεί ένα σύνδεσμο μεταξύ της δεύτερης και της τέταρτης δομικής περιοχής, η οποία αποτελείται από α-έλικες και καλύπτει το καταλυτικό κέντρο συμμετέχοντας στο σχηματισμό της κοιλότητας πρόσδεσης πεπτιδίων. Η εσωτερική κοιλότητα είναι αρκετά μεγάλη προκειμένου να μπορεί να προσδέσει ακόμα και μεγάλα υποστρώματα και έχει τη δυνατότητα να αναγνωρίζει μια μεγάλη ποικιλία υποστρωμάτων λόγω των πολλών πιθανών αλληλεπιδράσεων των πλευρικών της ομάδων με το πεπτιδίο.



**Σχήμα 10:** Αναπαράσταση της δομής της αμινοπεπτιδάσης ERAP2 η οποία προσομοιάζει την κλειστή διαμόρφωση της ERAP1 (δομική περιοχή I: μπλε, δομική περιοχή II: πράσινο, δομική περιοχή III: πορτοκαλί, δομική περιοχή IV: μωβ) [141].

Το συνολικό ηλεκτροστατικό δυναμικό της αύλακας διαφέρει από αυτό της ERAP1 καθώς περιέχει πιο πολλά θετικά φορτισμένα αμινοξέα και ευθύνεται εν μέρει για τη διαφορά εξειδίκευσης της ERAP2 [141]. Η ανάλυση των συμπλόκων της ERAP2 με τα πεπτιδικά υποστρώματα δεν έδειξε ισχυρές αλληλεπιδράσεις του C-τελικού άκρου του πεπτιδίου με την πρωτεΐνη καταδεικνύοντας έτσι ένα διαφορετικό μηχανισμό δράσης σε σχέση με την ERAP1 [143]. Στην κρυσταλλική δομή της ERAP1 με το φωσφινικό ψευδοπεπτιδίο DG025 προσδιορίστηκε και η διαμόρφωση ενός βρόχου ο οποίος κωδικοποιείται στο εξώνιο 10 και φαίνεται να συμβάλει στη διατήρηση των ERAP1 και ERAP2 στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Το συγκεκριμένο τμήμα των ενζύμων θεωρούνταν ότι ήταν μερικώς αποδιατεταγμένο καθώς σε καμιά από τις προηγούμενες κρυσταλλικές δομές δεν εμφάνιζε επαρκή ηλεκτρονιακή πυκνότητα. Ο βρόχος σταθεροποιείται μέσω ενός δισουλφιδικού δεσμού μεταξύ των κυστεϊνών 503 και 514 προσβάσιμου από το διαλύτη ο οποίος πιθανώς και να υπόκειται σε ρύθμιση βάσει της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του περιβάλλοντος, όπως συμβαίνει με την ομόλογη περιοχή της ERAP1 η οποία αλληλεπιδρά με την ERp44 μέσω δισουλφιδικών δεσμών [70]. Τέλος η μεθειονίνη 520, η οποία συμμετέχει στο σχηματισμό του βρόχου, φαίνεται να αλληλεπιδρά με μια υδρόφοβη περιοχή του γειτονικού

μορίου της ERAP2 κάτι που αποτελεί ένδειξη ότι η συγκεκριμένη δομή περιοχή μπορεί να εμπλέκεται σε πιθανό σχηματισμό ετεροδιμερούς συμπλόκου με την ERAP1 [143].

#### **1.5.4 Ενζυμική λειτουργία**

Παρά το υψηλό ποσοστό ομολογίας της ERAP2 με την ERAP1 (49%) φάνηκε από τα πρώτα *in vitro* πειράματα ότι εμφανίζει διαφορές στην ενζυμική λειτουργία καθώς καταβολίζει πεπτιδικά υποστρώματα όπως η καλλιδίνη και η αγγειοτενσίνη III, ενώ δεν εμφανίζει δραστικότητα έναντι στην ωκυτοκίνη, τη βασοπρεσίνη και την αγγειοτενσίνη II [61]. Η αμινοπεπτιδάση ERAP2 αναγνωρίζει και υδρολύει κατά προτίμηση βασικά αμινοξέα όπως η αργινίνη και η λυσίνη ενώ παρουσιάζει και μικρότερη καταλυτική ικανότητα έναντι σε υδρόφοβα αμινοξέα [61],[146]. Η διαφορά αυτή στην εξειδίκευση αποδίδεται στην ύπαρξη ενός ασπαρτικού οξέος το οποίο δεν είναι συντηρημένο στις ERAP1 και IRAP και συμμετέχει στο σχηματισμό του S1 θύλακα του ενζύμου [141]. Η εξειδίκευση της ERAP2 επηρεάζεται από την ύπαρξη του πολυμορφισμού rs2549782 ο οποίος οδηγεί στην υποκατάσταση της ασπαραγίνης 392 από λυσίνη (N392K). Ενώ και τα δύο αλληλόμορφα εμφανίζουν παρόμοια δραστικότητα έναντι σε θετικά φορτισμένα αμινοξέα, η παρουσία της ασπαραγίνης συνδέεται με αυξημένη ικανότητα υδρόλυσης υδρόφοβων αμινοξέων. Σύμφωνα με κρυσταλλογραφικά δεδομένα, η λυσίνη αποκτά μια διαφορετική διαμόρφωση σε σχέση με την ασπαραγίνη και έτσι αλληλεπιδρά με αμινοξέα που συμμετέχουν στην κατάλυση και στο σχηματισμό του S1 θύλακα [147]. Μια ακόμα σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο αμινοπεπτιδασών του ενδοπλασματικού δικτύου είναι η δραστικότητα τους έναντι σε πεπτίδια μεγάλου μήκους, καθώς η μέγιστη ενζυμική δραστικότητα της ERAP2 εμφανίζεται για πεπτίδια που αποτελούνται από 7 αμινοξέα ενώ μειώνεται για πεπτίδια μεγαλύτερου μήκους [143]. Τέλος ενώ φαίνεται ότι η εσωτερική αλληλουχία του πεπτιδίου επηρεάζει την ταχύτητα υδρόλυσης όπως και στην ERAP1, δεν υπάρχουν ενδείξεις για αλλοστερική περιοχή ενεργοποίησης στο C-τελικό άκρο καθώς η ταχύτητα υδρόλυσης ενός μικρού μη φυσικού υποστρώματος δεν αυξάνεται παρουσία ενός 8μερούς πεπτιδίου [143].

#### **1.5.5 Σχέση της βιολογικής δράσης της ERAP2 με την παθογένεση ανθρωπίνων ασθενειών**

Η ιδιαίτερη σημασία της ERAP2 στην αντιγονοπαρουσίαση ενισχύεται από το γεγονός ότι αποτελεί παράγοντα κινδύνου για αρκετές ασθένειες, οι περισσότερες αυτοάνοσης αιτιολογίας. Η ERAP2 έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση αγκυλοποιητικής σπονδυλίτιδας τόσο σε άτομα που δεν εκφράζουν το αλληλόμορφο HLA-B\*27 αλλά και σε ασθενείς θετικούς για το συγκεκριμένο HLA [148]. Η συσχέτιση του πολυμορφισμού rs2248374 έδειξε ότι η παρουσία του G αλληλομόρφου που όπως προαναφέρθηκε οδηγεί σε μειωμένη έκφραση, έχει προστατευτική δράση. Αυτό το φαινόμενο είναι ανάλογο με αυτό της ERAP1 υποδεικνύοντας ότι η δραστικότητα από αμινοπεπτιδάσες στο ενδοπλασματικό δίκτυο προάγει την εκδήλωση της ασθένειας. Ένας ακόμα πολυμορφισμός της ERAP2 ο rs10044354, ο οποίος οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης της πρωτεΐνης, έχει συνδεθεί με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της χοριοαμφιβληστροειδοπάθειας τύπου birdshot, μιας οφθαλμολογικής φλεγμονώδους ασθένειας η οποία εμφανίζεται σε άτομα που εκφράζουν το αλληλόμορφο HLA-A\*29:02 [149],[112]. Σε αυτή την περίπτωση η επίδραση της έκφρασης της ERAP2 έχει αντίθετη δράση σε σχέση με την αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα. Η ERAP2 φαίνεται να εμπλέκεται και στην εμφάνιση ψωρίασης όπου η αυξημένη έκφραση του ενζύμου αποτελεί παράγοντα κινδύνου [116, 117]. Μια μετα-ανάλυση για την ταυτοποίηση γενετικών τόπων που σχετίζονται με την εμφάνιση της νόσου Crohn έδειξε ότι ένα από τα πολλά γονίδια που σχετίζονται με το ανοσοποιητικό σύστημα είναι και αυτό της ERAP2 [150]. Η ERAP2 έχει την ικανότητα να υδρολύει πεπτιδικά όπως η καλλιδίνη και η αγγειοτενσίνη III και εν δυνάμει μπορεί να ρυθμίζει την αρτηριακή πίεση [61]. Μεγάλες πληθυσμιακές μελέτες αποκάλυψαν τη συσχέτιση τριών πολυμορφισμών της ERAP2 οι οποίοι οδηγούν σε μειωμένα επίπεδα mRNA με βασικά επίπεδα συστολικής πίεσης και την εμφάνιση υπέρτασης [151]. Σε αυτή τη λειτουργία της ERAP2 πιθανώς να οφείλεται και η εμπλοκή της στην εμφάνιση προεκλαμψίας φαινόμενο που έχει παρατηρηθεί σε πολλές πληθυσμιακές ομάδες. Η προεκλαμψία είναι μια παθολογική κατάσταση που παρουσιάζεται κατά την εγκυμοσύνη και χαρακτηρίζεται από υψηλή αρτηριακή πίεση, υποξία του πλακούντα, αυξημένα επίπεδα φλεγμονής σε σχέση με τη φυσιολογική εγκυμοσύνη και άλλα ιδιαίτερα ανοσολογικά χαρακτηριστικά [152]. Δύο πολυμορφισμοί οι οποίοι οδηγούν σε αντικατάσταση αμινοξέων στην αλληλουχία της πρωτεΐνης (K392N και L646Q) έχουν συσχετιστεί με εμφάνιση προεκλαμψίας σε αυστραλιανό και νορβηγικό πληθυσμό αντίστοιχα [153]. Η συσχέτιση του πρώτου πολυμορφισμού rs2549782 έχει εμφανιστεί και σε μελέτη η οποία διεξήχθη σε αφροαμερικανικό πληθυσμό [154]. Μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση πραγματοποιήθηκε σε ασθενείς από τη Χιλή στις οποίες δεν ανιχνευθήκαν οι παραπάνω συσχετίσεις των πολυμορφισμών του ERAP2 με την ασθένεια. Στο Χιλιανό πληθυσμό δεν εμφανίζεται ανισορροπία σύνδεσης μεταξύ των πολυμορφισμών rs2549782 και rs2248374 κάτι που επιτρέπει την παρουσία του δραστικότερου αλληλίου της ERAP2 σε υψηλά επίπεδα μέσα

στα κύτταρα. Παρά ταύτα, ο διπλά ομόζυγος γονότυπος που θα οδηγούσε σε υψηλά επίπεδα έκφρασης του ενζύμου ERAP2 392N δεν ανιχνεύθηκε σε μητέρες και έμβρυα και πιθανώς να σημαίνει ότι αυτός ο φαινότυπος δεν είναι ανοσολογικά ανεκτός [155].

### 1.5.6 Επίδραση της αμινοπεπτιδάσης ERAP2 στο ανοσοπεπτιδίωμα

Οι μελέτες που αφορούν στην επίδραση της αμινοπεπτιδάσης ERAP2 στο ανοσοπεπτιδίωμα κυττάρων επικεντρώνονται στα πεπτίδια που παρουσιάζονται από συγκεκριμένα HLA όπως το HLA-B\*27 και το HLA-A\*29:02 σε μια προσπάθεια κατανόησης των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στις αυτοάνοσες αποκρίσεις της αγκυλοποιητικής σπονδυλίτιδας και της χοριοαμφιβληστροειδοπάθειας τύπου birdshot αντίστοιχα. Όπως αναφέρθηκε και στο προηγούμενο υποκεφάλαιο, πολυμορφισμοί στο γονιδίωμα οι οποίοι οδηγούν σε αυξημένη έκφραση της αμινοπεπτιδάσης ERAP2 αποτελούν παράγοντα κινδύνου για τις ασθένειες αυτές [112, 148, 149]. Λόγω της εμπλοκής και της αμινοπεπτιδάσης ERAP1 στο ανοσοπεπτιδίωμα των συγκεκριμένων MHC, στις μελέτες που πραγματοποιήθηκαν λήφθηκε υπόψη ο απλότυπος της ERAP1 που εκφράζεται. Στην πρώτη μελέτη που αφορά στο ανοσοπεπτιδίωμα του HLA-B\*27, συγκρίθηκαν τρεις κυτταρικές σειρές που όλες εκφράζουν έντονα δραστικούς απλότυπους ERAP1 και οι δύο είναι αρνητικές για ERAP2 [156], ενώ στη δεύτερη συγκρίθηκε το ανοσοπεπτιδίωμα κυτταρικών σειρών που εκφράζουν ERAP2 αλλά έχουν διαφορετική δραστηριότητα ERAP1 [131]. Λαμβάνοντας υπόψη και τις δύο μελέτες μπορούμε να πούμε ότι η ERAP2 επηρεάζει το ανοσοπεπτιδίωμα του HLA-B\*27 καθώς καταστρέφει πιθανούς προσδέτες των MHC που φέρουν βασικά αμινοξέα στο N-τελικό άκρο ενώ παράλληλα οδηγεί σε αύξηση των 9μερών πεπτιδίων που έχουν βέλτιστο μήκος για το συγκεκριμένο αλληλόμορφο [131, 156]. Η αμινοπεπτιδάση ERAP2 συμβάλλει και στη διαμόρφωση του ανοσοπεπτιδιώματος του HLA-A29\*02 εμφανίζοντας όμως διαφορετικές μεταβολές [157]. Παρουσία ERAP2 τα πεπτίδια που παρουσιάζονται έχουν μεγαλύτερο μήκος ενώ η επίδραση στο N-τελικό άκρο δεν είναι τόσο έντονη καθώς τα πεπτίδια που παρουσιάζονται από το συγκεκριμένο HLA δεν είναι καλά υποστρώματα για την ERAP2. Αυτές οι διαφορές στη μεταβολή του ανοσοπεπτιδιώματος συνάδουν με τη διαφορά στη συσχέτιση της ERAP2 με τις παθολογικές καταστάσεις [157]. Τέλος, η συμβολή της ERAP2 έχει μελετηθεί και για το ανοσοπεπτιδίωμα του αλληλομόρφου HLA-B51 τόσο παρουσία όσο και απουσία ERAP1 [135]. Μετά από αποσιώπηση του γονιδίου της ERAP2, τα νέα πεπτίδια που παρουσιάστηκαν εμπεριείχαν περισσότερα 9μερή και μεγαλύτερα πεπτίδια, ενώ τα 8μερή είχαν μειωθεί. Επίσης ανιχνεύθηκαν κάποιες στατιστικώς σημαντικές μεταβολές

στην αλληλουχία των πεπτιδίων όσον αφορά το πρώτο αμινοξύ αλλά και το C-τελικό άκρο [135]. Παρόμοια φαινόμενα εμφανίστηκαν και σε κύτταρα στα οποία έλειπαν και οι δύο αμινοπεπτιδάσες αλλά εδώ όπως και στην περίπτωση που απουσίαζε μόνο η ERAP1 επηρεάστηκε και η συνολική χημική συγγένεια των πεπτιδίων για το HLA-B51 λόγω αύξησης των μη βέλτιστων πεπτιδίων που φέρουν αλανίνη στη θέση 2 [135]. Συνολικά, παρόλο που η ERAP2 δεν έχει συσχετιστεί με τη νόσο του Behcet, φαίνεται να συμβάλλει στη διαμόρφωση του ανοσοπεπτιδιώματος του HLA-B51 έχοντας συμπληρωματική δράση με αυτή της ERAP1 ενώ απουσία της δεύτερης φαίνεται να υποκαθιστά εν μέρει τη δράση της [135].

## **1.6 Το μονοπάτι αντιγονοπαρουσίασης τάξης I στον καρκίνο**

### **1.6.1 Τα νεοαντιγόνα και η σημασία τους στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου**

Όλο και περισσότερα πειραματικά δεδομένα έχουν αναδείξει την αντικαρκινική δράση του ανοσοποιητικού συστήματος, γεννώντας ένα αυξανόμενο ενδιαφέρον στην εφαρμογή θεραπειών που στοχεύουν στην ενεργοποίησή του ενάντια στα καρκινικά κύτταρα. Το γεγονός ότι η κυτταρική ανοσολογική απόκριση συμβάλλει στην εξάλειψη κυττάρων τα οποία έχουν υποστεί καρκινική εξαλλαγή παρατηρήθηκε αρχικά σε πειραματικά μοντέλα τα οποία ήταν επιρρεπή σε καρκινογένεση ύστερα από διαγραφή γονιδίων που εμπλέκονται στη φυσιολογική λειτουργία των T-λεμφοκυττάρων [158]. Επίσης, η παρατήρηση ότι ασθενείς με μελάνωμα οι οποίοι έλαβαν θεραπεία με ιντερλευκίνη-2 εμφάνισαν σημαντικό κλινικό όφελος, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η ανοσολογική απόκριση οφείλεται κυρίως στη δράση των T-λεμφοκυττάρων [158]. Τα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν επιτόπους οι οποίοι εμφανίζονται σε καρκινικά κύτταρα και καλούνται καρκινικά αντιγόνα. Τα καρκινικά αντιγόνα ανήκουν σε δύο κύριες κατηγορίες, τα αντιγόνα που σχετίζονται με τον όγκο (Tumor-associated antigens ή TAA) και τα αντιγόνα ειδικά για τον όγκο (Tumor-specific antigens ή TSA) ή αλλιώς νεοαντιγόνα [159]. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν αντιγόνα τα οποία υπερεκφράζονται στα καρκινικά κύτταρα σε σχέση με τα φυσιολογικά με αποτέλεσμα να μεταβάλλεται και η παρουσίασή τους από τα μόρια ιστοσυμβατότητας. Οι πρωτεΐνες οι οποίες ανήκουν σε αυτή την κατηγορία είναι συνήθως εμβρυικές ή εκφράζονται σε περιορισμένο αριθμό ιστών το οποίο έχει σαν συνέπεια την απουσία ανοχής από τα T-λεμφοκύτταρα. Χαρακτηριστικά παραδείγματα TAA αποτελούν το καρκινοεμβρυικό αντιγόνο (CEA) [159], το αντιγόνο που σχετίζεται με το μελάνωμα (MAGE) [160] και το NY-ESO-1 [161]. Στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν πεπτιδία τα οποία δεν

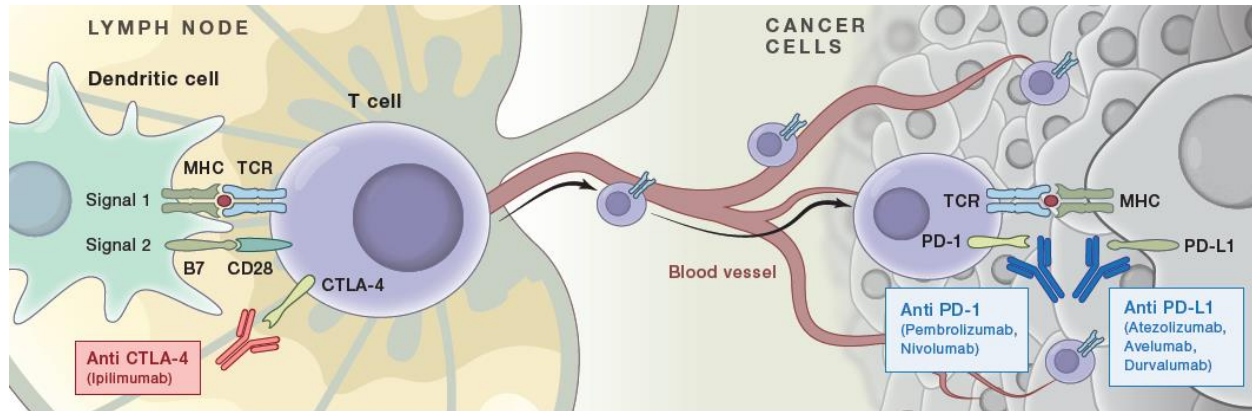


εκφράζονται φυσιολογικά από το ανθρώπινο γονιδίωμα και προκύπτουν από μεταλλάξεις στο DNA που σχετίζονται με την καρκινογένεση. Αυτές οι μεταλλάξεις προκαλούν διαφορές στην αλληλουχία των πρωτεϊνών που εκφράζουν τα καρκινικά κύτταρα ή ακόμα και στο ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο κατά τη μετάφραση, παράγοντας νέες πρωτεϊνικές αλληλουχίες [162]. Επίσης έχει προταθεί ότι νέες αλληλουχίες πεπτιδίων μπορεί να προκύψουν από μάτισμα πεπτιδίων κατά την αποικοδόμηση πρωτεϊνών στο πρωτεάσωμα αλλά και από μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις ειδικές για τα καρκινικά κύτταρα [163]. Συνεπώς ένας τύπος καρκίνου ο οποίος φέρει μεγάλο φορτίο μεταλλάξεων αναμένεται να παρουσιάζει μεγαλύτερο αριθμό νοεαντιγονικών επιτόπων και να εμφανίζει μεγαλύτερη ανοσογονικότητα [164].

### **1.6.2 Ανοσοθεραπεία με αναστολείς ανοσολογικών σημείων ελέγχου**

Από τις πιο σημαντικές ανακαλύψεις στον τομέα της ανοσοθεραπείας του καρκίνου πραγματοποιήθηκε με την ανάπτυξη μονοκλωνικών αντισωμάτων τα οποία στοχεύουν τους ανασταλτικούς υποδοχείς της ανοσολογικής σύναψης αλλά και τους προσδέτες τους. Οι αναστολείς ανοσολογικών σημείων ελέγχου (Immune checkpoint inhibitors) όπως είναι πιο ευρέως γνωστοί, προκαλούν ανοσολογικές αποκρίσεις μέσω παρεμβολής στους ανασταλτικούς μηχανισμούς των T-λεμφοκυττάρων [165]. Μέχρι στιγμής τα αντισώματα τα οποία έχουν εγκριθεί για χρήση στην κλινική πράξη στοχεύουν τους υποδοχείς CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4) και PD-1 (programmed cell death 1) και τον προσδέτη του PD-1, PD-L1 [166]. Ο υποδοχέας CTLA-4 εκφράζεται από τα T-λεμφοκύτταρα και ελέγχει την πρώιμη ενεργοποίησή τους στους λεμφαδένες με το να ανταγωνίζεται τον υποδοχέα ενεργοποίησης CD28. Στα μη ενεργοποιημένα (naïve) T-λεμφοκύτταρα ο CTLA-4 βρίσκεται σε ενδοκυτταρικά κυστίδια και μετατοπίζεται στη μεμβράνη ύστερα από ενεργοποίηση του TCR και αλληλεπίδραση του CD28 με τους προσδέτες του, τους οποίους έχει την ικανότητα να δεσμεύει με μεγαλύτερη συνάφεια [166]. Ο υποδοχέας PD-1 εκφράζεται σε ενεργοποιημένα T-λεμφοκύτταρα, B-λεμφοκύτταρα και φυσικά φονικά κύτταρα και φέρει μοτίβα αναστολής ανοσοϋποδοχέα που βασίζονται στην τυροσίνη (ITIM) και αλλαγής ανοσοϋποδοχέα βάσει τυροσίνης (ITSM). Η αλληλεπίδραση του PD-1 με τους προσδέτες του PD-L1 και PD-L2 έχει ως αποτέλεσμα την επιστράτευση περιοχών που φέρουν δραστικότητα φωσφατάσης οδηγώντας έτσι σε αναστολή του πολλαπλασιασμού των T-κυττάρων και της ανοσολογικής απόκρισης [166]. Η θεραπεία με αντισώματα που στοχεύουν το μηχανισμό PD-1/PD-L1 ενισχύουν τις υπάρχουσες αποκρίσεις

ενάντι στα καρκινικά κύτταρα και παρέχει στους ασθενείς ανοσολογικές αποκρίσεις μεγάλης διάρκειας [166].



**Εικόνα 6: Αναστολή ανοσολογικών σημείων ελέγχου. Αριστερά: Έκφραση του υποδοχέα CTLA-4 στους λεμφαδένες. Δεξιά: Έκφραση του υποδοχέα PD-1 σε περιφερικούς ιστούς. Στην εικόνα φαίνονται και τα εγκεκριμένα αντισώματα για τους CTLA-4, PD-1 και PD-L1 [167].**

Παρά τα εντυπωσιακά τους αποτελέσματα, η θεραπεία με τους αναστολείς ανοσολογικών σημείων ελέγχου έχει θεραπευτικό αποτέλεσμα σε ένα περιορισμένο ποσοστό ασθενών [168]. Η αποτελεσματικότητα των αναστολέων αυτών έχει συσχετιστεί με το φορτίο μεταλλαξιγενέσεων που φέρει ο κάθε ασθενής το οποίο συνδέεται άμεσα με την ύπαρξη νεοαντιγόνων [162, 169, 170]. Το μελάνωμα θεωρείται ότι είναι ένας τύπος κακοήθειας που φέρει υψηλό ποσοστό μεταλλάξεων και σχηματίζει συχνά νεοαντιγόνα γεγονός που εξηγεί τα θετικά αποτελέσματα της ανοσοθεραπείας σε ασθενείς με μελάνωμα [171].

### **1.6.3 Απορρύθμιση της παρουσίας και επεξεργασίας των αντιγονικών επιτόπων στον καρκίνο**

Τα CD8<sup>+</sup> κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα ευθύνονται σε ένα μεγάλο βαθμό για την εκδήλωση ανοσολογικών αποκρίσεων ενάντια σε καρκινικά κύτταρα. Με την εξέλιξη της καρκινογένεσης το μικροπεριβάλλον του όγκου εμφανίζει ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες καθώς εντοπίζονται σχετιζόμενοι με τον καρκίνο ινοβλάστες, M2 μακροφάγα αλλά και ρυθμιστικά T-λεμφοκύτταρα (Tregs), με αποτέλεσμα τη δυσλειτουργία και την εξάντληση των CD8<sup>+</sup> T-λεμφοκυττάρων [172]. Επιπλέον, τα ίδια τα καρκινικά κύτταρα προκειμένου να αποφύγουν την ανίχνευσή τους από τα

κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα εκμεταλλεύονται μηχανισμούς των κυττάρων οι οποίοι συνήθως έχουν ως αποτέλεσμα τη μείωση της παρουσίας των MHCΙ στην επιφάνεια των κυττάρων [173]. Αυτή η μείωση αλλά ακόμα και η απουσία των συμπλόκων MHCΙ-πεπτιδίου έχει παρατηρηθεί σε πολλά είδη καρκίνου και έχει συνδεθεί με εξέλιξη της ασθένειας, χαμηλά επίπεδα λεμφοκυττάρων που διηθούν τον όγκο και χαμηλότερα ποσοστά επιβίωσης. Οι αλλαγές που οδηγούν στη μείωση των pMHCΙ ενδέχεται να λαμβάνουν χώρα είτε σε γενετικό επίπεδο είτε σε ρυθμιστικό και να αφορούν στα γονίδια των *MHCΙ* αλλά και άλλων συστατικών του μονοπατιού αντιγονοπαρουσίασης τάξης I που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή και την παρουσίαση των αντιγονικών επιτόπων [173].

### **1.6.3.1 Απορρύθμιση της παρουσίασης των αντιγονικών επιτόπων**

Η παρουσίαση των αντιγονικών επιτόπων περιλαμβάνει τη μεταφορά τους στο ενδοπλασματικό δίκτυο από τον μεταφορέα TAP και μετέπειτα τη φόρτωσή τους στα MHCΙ. Σε αυτή τη διαδικασία όπως είδαμε στο υποκεφάλαιο 1.2.1 παίζει σημαντικό ρόλο το PLC καθώς και άλλες πρωτεΐνες-συνοδοί που εντοπίζονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και διασφαλίζουν τη σταθεροποίηση των MHCΙ πριν τη δέσμευση του πεπτιδίου. Μεταλλάξεις ή τροποποιήσεις στην έκφραση των συστατικών που συμμετέχουν σε αυτή τη διαδικασία έχουν σαν αποτέλεσμα τη μη αποτελεσματική αναδίπλωση και σταθεροποίηση των συμπλόκων pMHCΙ και κατ' επέκταση τη μείωση της αντιγονοπαρουσίασης [173]. Σε πολλά είδη καρκίνου έχει παρατηρηθεί απώλεια ή μείωση της παρουσίας του μεταφορέα TAP η οποία συσχετίζεται με χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης των MHCΙ. Η απώλεια της λειτουργίας του TAP επηρεάζει σημαντικά την ποσότητα των διαθέσιμων πεπτιδίων τα οποία έχουν κατάλληλα χαρακτηριστικά για πρόσδεση στα MHCΙ ενώ νεοαντιγόνα με πιθανότητες εμφάνισης ανοσογονικότητας καθίστανται μη διαθέσιμα μιας και παραμένουν στο κυτοσόλιο [174, 175]. Πρωτεΐνες-συνοδοί που εντοπίζονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και συμμετέχουν στην αντιγονοπαρουσίαση, όπως η καρλετικουλίνη και η καλνεξίνη παρουσιάζουν διαφορετικά μοτίβα έκφρασης σε καρκινικά κύτταρα ενώ και για την ταπασίνη έχει βρεθεί ότι υφίσταται αρνητική ρύθμιση σε διάφορους τύπους καρκίνου [173].

### **1.6.3.2 Απορρύθμιση της επεξεργασίας των αντιγονικών επιτόπων**

Η επεξεργασία των αντιγονικών επιτόπων περιλαμβάνει διάφορα στάδια τα οποία είναι απαραίτητα προκειμένου οι αντιγονικοί επίτοποι να αποκτήσουν κατάλληλα χαρακτηριστικά για πρόσδεση στα MHC I. Βλάβες στους μηχανισμούς επεξεργασίας των αντιγονικών πεπτιδίων οι οποίες προκύπτουν κατά την καρκινογένεση ενδέχεται να προκαλούν την αποσταθεροποίηση των συμπλόκων pMHC αλλά και τη μη αποτελεσματική επεξεργασία νεοαντιγονικών επιτόπων, προωθώντας έτσι την ανοσιακή διαφυγή του όγκου [173]. Τα δύο βασικότερα στάδια περιλαμβάνουν την αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα ή το ανοσοπρωτεάσωμα και την περαιτέρω υδρόλυση στο ενδοπλασματικό δίκτυο από τις αμινοπεπτιδάσες ERAP1 και ERAP2. Η μείωση ή ακόμα και η πλήρης έλλειψη των υπομονάδων του ανοσοπρωτεασώματος παρατηρείται συχνά σε πολλά είδη όγκων και σχετίζεται με την εμφάνιση μεταστάσεων αλλά και με επανεμφάνιση της νόσου [176, 177],[178]. Λόγω του ιδιαίτερου ρόλου της στην επεξεργασία των αντιγονικών επιτόπων, η αμινοπεπτιδάση ERAP1 στοχεύεται πολύ συχνά από καρκινικά κύτταρα τα οποία τροποποιούν τα επίπεδά της. Απορρύθμιση της έκφρασης της ERAP1 έχει παρατηρηθεί σε πολλά είδη κακοηθών νεοπλασιών όπως στο μελάνωμα, σε διάφορους αιματολογικούς καρκίνους, επίσης σε περιπτώσεις καρκίνου του μαστού, του τραχήλου της μήτρας, των νεφρών, των πνευμόνων κ.α. [179]. Σε αντίθεση με άλλα συστατικά του μονοπατιού αντιγονοπαρουσίασης τάξης I τα οποία είτε ενισχύονται είτε καταστέλλονται, η έκφραση της ERAP1 εμφανίζεται και μειωμένη αλλά και αυξημένη σε καρκινικές σειρές. Επίσης, σε πιο σπάνιες περιπτώσεις παρατηρείται πλήρης απώλεια της έκφρασης του ενζύμου [179],[180]. Μείωση και απώλεια της καταλυτικής δράσης της ERAP1 μπορεί να αποκλείσει την παραγωγή των ώριμων αντιγονικών επιτόπων ενώ αντίθετα αυξημένη έκφραση και κατ' επέκταση ικανότητα υδρόλυσης, ενδέχεται να καταστρέψει νεοαντιγονικούς επιτόπους δίνοντας μικρότερα προϊόντα, όπως στην περίπτωση των MART-1 (26-35) και GSW11 που αναφέρθηκαν παραπάνω [124, 125]. Η μειωμένη έκφραση της ERAP1 έχει συσχετιστεί με μειωμένο προσδόκιμο επιβίωσης σε ασθενείς με καρκίνο του τραχήλου και τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού, καθώς και με την εμφάνιση μεταστάσεων και τη διεισδυτικότητα του όγκου [180]. Οι πιθανές μεταβολές στην έκφραση και των δύο αμινοπεπτιδασών του ενδοπλασματικού δικτύου κατά την καρκινογένεση, μελετήθηκαν συγκρίνοντας τα επίπεδά τους σε καρκινικούς ιστούς ασθενών με αυτά στους αντίστοιχους υγιείς ιστούς [181],[182]. Οι μεταβολές στην έκφραση των δύο ένζυμων περιελάμβαναν χαμηλή έκφραση και των δύο ενζύμων, μειωμένη έκφραση του ενός ή και των δύο ενζύμων αλλά και αύξηση της έκφρασης και των δύο αμινοπεπτιδασών όταν απουσίαζαν από τους φυσιολογικούς ιστούς [181],[182]. Αντίστοιχες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί και σε καρκινικές κυτταρικές σειρές όπου και εκεί διαπιστώθηκε τροποποιημένη έκφραση των δύο αμινοπεπτιδασών [183-185].

## **1.7 Χημική αναστολή των αμινοπεπτιδασών ERAP1 και ERAP2**

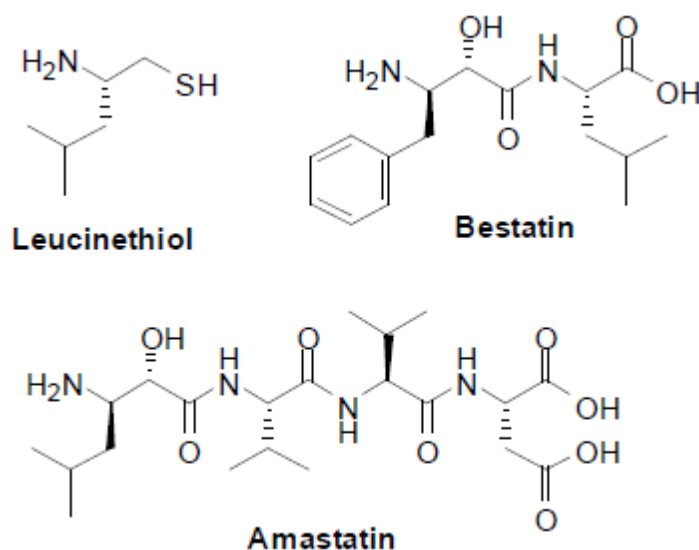
### **1.7.1 Η σημασία της αναστολής των αμινοπεπτιδασών ERAP1 και ERAP2**

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η δραστικότητα των αμινοπεπτιδασών του ενδοπλασματικού δικτύου δεν είναι σταθερή στον πληθυσμό και μάλιστα ενδέχεται να εμφανίζει μεγάλες διακυμάνσεις. Καταρχάς η ύπαρξη πολυμορφισμών στα γονίδια τους επηρεάζει είτε τα επίπεδα έκφρασής τους είτε την ενεργότητά τους, με αποτέλεσμα η συνολική δραστικότητα αμινοπεπτιδάσης στο ενδοπλασματικό δίκτυο να διαφέρει αρκετά στο γενικό πληθυσμό. Επίσης η ύπαρξη των πολυμορφισμών έχει συνδεθεί με πολλές ασθένειες αυτοάνοσης αιτιολογίας ενώ φαίνεται ότι η αυξημένη δραστικότητα έχει άλλοτε δυσμενή και άλλοτε προστατευτικό ρόλο. Επιπλέον η τροποποίηση των επιπέδων έκφρασης των ERAP1 και ERAP2 αποτελεί μηχανισμό ανοσιακής διαφυγής και για ιούς αλλά και για κακοήθεις νεοπλασίες. Όλα αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι οι αμινοπεπτιδάσες ERAP1 και ERAP2 αποτελούν πιθανούς φαρμακολογικούς στόχους για τη ρύθμιση των ανοσοαποκρίσεων [85].

### **1.7.2 Ενώσεις με ανασταλτική δράση για τις αμινοπεπτιδάσες ERAP1 και ERAP2**

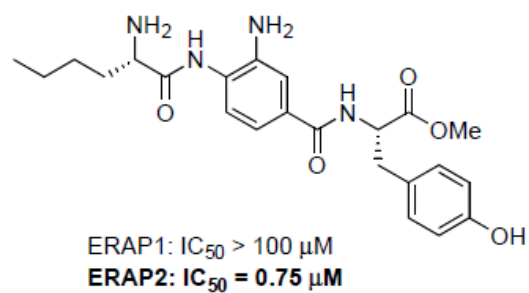
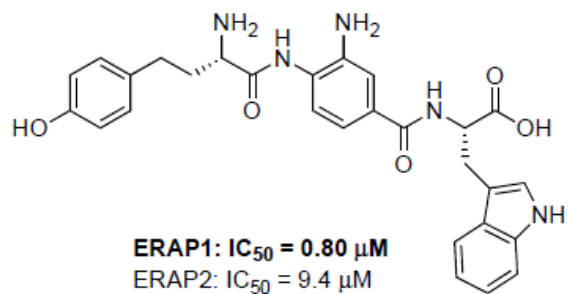
Καθώς οι αμινοπεπτιδάσες ERAP1 και ERAP2 περιέχουν ιόν ψευδαργύρου στο καταλυτικό τους κέντρο, ομάδες που ήταν γνωστό ότι συμπλέκουν τον Zn αποτέλεσαν τη βάση για την ανάπτυξη αναστολέων και γι' αυτά τα ένζυμα. Τέτοιες ομάδες αποτελούν ενώσεις που περιέχουν φώσφορο, η μπεστατίνη και τα ανάλογά της, υδροξαμικά οξέα, 2-αμινοθειόλες, βορονικά οξέα και παράγωγα της τετραλόνης [186-188]. Οι πρώτες ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ως αναστολείς για τις δύο αμινοπεπτιδάσες ήταν ήδη χαρακτηρισμένοι αναστολείς άλλων αμινοπεπτιδασών, όπως η μπεστατίνη, η αμαστατίνη και η λευκινοθειόλη, η χρήση των οποίων συνεισέφερε σημαντικά στη βασική έρευνα για τα δύο ένζυμα αλλά δεν έχει κάποιο φαρμακολογικό ενδιαφέρον λόγω της ασθενούς δράσης τους αλλά και της χαμηλής εξειδίκευσής τους [57, 72, 84, 122, 124, 189]. Η επίλυση της κρυσταλλικής δομής των δύο ενζύμων βοήθησε σημαντικά στον εκλογικευμένο σχεδιασμό αναστολέων αλλά και στην πραγματοποίηση μελετών συσχέτισης δομής και λειτουργίας. Οι πιο ισχυροί αναστολείς που έχουν ταυτοποιηθεί μέχρι στιγμής ανήκουν στην κατηγορία των φωσφινικών ψευδοπεπτιδίων με τον αναστολέα DG013A να αποτελεί τον πιο ισχυρό αναστολέα για την αμινοπεπτιδάση ERAP1 [142]. Ο αναστολέας DG013A μπορεί και

επηρεάζει την παρουσίαση συγκεκριμένων αντιγονικών επιτόπων σε κυτταρικές σειρές καθώς και να ρυθμίζει ανοσολογικές αποκρίσεις σε πειραματικά μοντέλα [142, 190, 191]. Συγκεκριμένα, ο DG013A αυξάνει τα επίπεδα του αλληλομόρφου HLA-B27 στην επιφάνεια κυττάρων HeLa καθώς και την παρουσίαση του επιτόπου CSW11 σε κύτταρα CT26 [142]. Επίσης η παρουσία του DG013A περιορίζει τη φαγοκυττάρωση που πραγματοποιείται από μακροφάγα καθώς και την ενεργοποίηση των NK κυττάρων παρουσία λιποπολυσακχαρίτη [191]. Τέλος, ο αναστολέας DG013A μπορεί να καταστείλλει τη δράση των Th17 T-λεμφοκυττάρων *in vitro* [190].



**Σχήμα 11:** Χημικές δομές των αναστολέων των αμινοπεπτιδάσεων λευκινθειόλη, μπεστατίνη και αμαστατίνη [85].

Η ιδιότητα του DG013A να αναστέλλει ισχυρά την ERAP1 αλλά και το γεγονός ότι υπάρχουν ενδείξεις ότι επηρεάζει την αντιγονοπαρουσίαση κατέστησαν τα φωσφινικά ανάλογα ενώσεις με φαρμακολογικό ενδιαφέρον γεγονός το οποίο έχει οδηγήσει σε περαιτέρω προσπάθειες βελτιστοποίησης κυρίως της εκλεκτικότητάς τους [192]. Μία άλλη ομάδα ενώσεων οι οποίοι εμφανίζουν μέτρια ισχύ αλλά φαίνεται να είναι πιο εκλεκτικοί, είναι τα 3,4-διαμινοβενζοϊκά παράγωγα. Οι πιο ισχυροί αναστολείς που ταυτοποιήθηκαν από αυτή την ομάδα για τις δύο αμινοπεπτιδάσες φαίνονται στο Σχήμα 13 [193, 194].



Σχήμα 12: Παράγωγα του 3,4 δι-αμινο-βενζοϊκού οξέος τα οποία εμφανίζουν διαφορετική εξειδίκευση για τις αμινοτεπτιδάσες ERAP1 και ERAP2 [85].

## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**



## 2 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Το ανθρώπινο ανοσοποιητικό σύστημα εμφανίζει μεγάλο βαθμό ετερογένειας μέσα στον πληθυσμό καθώς πολλά από τα γονίδια που σχετίζονται με την ανοσολογική απόκριση είναι έντονα πολυμορφικά. Αν και το χαρακτηριστικό αυτό είναι καθοριστικό για την επιβίωση του είδους, δυσχεραίνει σε μεγάλο βαθμό τη χρήση της ανοσοθεραπείας σε ευρεία κλίμακα. Επίσης η ετερογένεια των όγκων μεταξύ των ασθενών αλλά και η πολυκλωνικότητα των όγκων αποτελούν εμπόδιο για την εφαρμογή αποτελεσματικών ανοσοθεραπειών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν οι αναστολείς ανοσολογικών σημείων ελέγχου οι οποίοι φαίνεται ότι έχουν θεραπευτική αξία για περιορισμένο αριθμό ασθενών. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η αποτελεσματικότητα των αναστολέων ανοσολογικών σημείων ελέγχου συνδέεται με την ύπαρξη καρκινικών αντιγόνων, τα οποία παρουσιάζονται από τα MHC1 και έχουν τη δυνατότητα να προκαλούν κυτταροτοξικές ανοσολογικές αποκρίσεις. Παρά τις προσπάθειες να προσδιοριστούν κοινά ανοσοκυρίαρχοι επίτοποι μεταξύ των ασθενών κάτι τέτοιο δεν έχει επιτευχθεί καθώς φαίνεται ότι καταλυτικός παράγοντας για την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος είναι η παρουσία νέων επιτόπων για τους οποίους τα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα δεν έχουν αναπτύξει ανοχή. Οι αντιγονικοί επίτοποι των MHC1 παράγονται από ένα πολύπλοκο πρωτεολυτικό μονοπάτι το οποίο ξεκινά στο κυτταρόπλασμα μετά από αποικοδόμηση πρωτεϊνών από το πρωτεάσωμα και ολοκληρώνεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο από τις αμινοπεπτιδάσες ERAP1 και ERAP2. Η αμινοπεπτιδάση ERAP1 αποικοδομεί N-εκτεταμένους επιτόπους και παράγει ώριμα αντιγονικά πεπτίδια τα οποία έχουν κατάλληλο μήκος για πρόσδεση στα MHC1. Εκτός από την παραγωγή επιτόπων η ERAP1 έχει τη δυνατότητα να καταστρέφει πιθανούς επιτόπους παράγοντας πεπτίδια τα οποία δε φέρουν κατάλληλο αριθμό αμινοξέων για αποτελεσματική σύνδεση στα MHC1. Η γενετική αποσιώπηση της ERAP1 φαίνεται ότι επηρεάζει τόσο τη φύση και τον αριθμό των πεπτιδίων που παρουσιάζονται όσο και τα επίπεδα των κυτταροτοξικών αποκρίσεων και έτσι θεωρείται ότι το ένζυμο αποτελεί ρυθμιστή του ανοσοπεπτιδιώματος των κυττάρων. Επίσης σε πολλά είδη κακοήθων νεοπλασιών, κατά τη διάρκεια της κλωνικής επιλογής των καρκινικών κυττάρων, το μοτίβο έκφρασης της ERAP1 μεταβάλλεται ως ένα μέρος του μηχανισμού ανοσιακής διαφυγής του όγκου. Σκοπός αυτής της μελέτης είναι να εξετάσουμε κατά πόσο η χημική αναστολή της ERAP1 μπορεί να προκαλέσει σημαντικές μεταβολές στο ανοσοπεπτιδίωμα των καρκινικών κυττάρων. Για να εξετάσουμε τη συγκεκριμένη υπόθεση χρησιμοποιήσαμε έναν ισχυρό αναστολέα της ERAP1 ο οποίος επηρεάζει την παρουσίαση συγκεκριμένων αντιγονικών επιτόπων και ρυθμίζει ανοσολογικές αποκρίσεις σε

πρότυπα συστήματα και μελετήσαμε την επίδρασή του στο ανοσοπεπτιδίωμα της καρκινικής σειράς μεταστατικού κακοήθους μελανώματος A375. Η ρύθμιση του ανοσοπεπτιδιώματος μπορεί να έχει πιθανές εφαρμογές στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου, καθώς μεταβολές του ρεπερτορίου των αντιγονικών επιτόπων εξαιτίας της αναστολής της ERAP1 ενδέχεται να ενισχύσουν υπάρχουσες ή να προκαλέσουν καινούργιες ανοσολογικές αποκρίσεις.

## 3 ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

### 3.1 Καλλιέργειες ευκαρυωτικών κυττάρων

#### 3.1.1 Κυτταρική σειρά High Five (B855-02, Life Technologies)

- Απαγωγός κάθετης νηματικής ροής (BIOAIR)
- Επωαστικός κλίβανος με σύστημα ανάδευσης (LabTech)
- Θρεπτικό μέσο SF900II SFM (Gibco, 10902-096)
- Αποστειρωμένες πιπέτες μιας χρήσης (Greiner Bio One)
- Αποστειρωμένες φιάλες καλλιέργειας (VWR 125mL και 500mL)

Τα κύτταρα High Five καλλιεργούνται στους 27°C υπό ανάδευση (125 rpm) σε αιώρημα. Όταν τα κύτταρα έχουν συγκέντρωση  $2-4 \times 10^6$  αραιώνονται μέχρι τα  $3-5 \times 10^5$  κύτταρα/mL αφαιρώντας μέρος της καλλιέργειας και συμπληρώνοντας με θρεπτικό υλικό μέχρι τον επιθυμητό όγκο.

#### 3.1.2 Κυτταρική σειρά HeLa-Kb (Ευγενική παραχώρηση των Δρ. Laurence J. Stern και Δρ. Kenneth Rock)

- Απαγωγός κάθετης νηματικής ροής (BIOAIR)
- Επωαστικός κλίβανος (Smart Cell, Heal Force)
- Θρεπτικό μέσο RPMI 1640 (Gibco, 61870-010)
- Αποστειρωμένο διάλυμα PBS pH 7.4 (Gibco, 10010-015)
- Ορός εμβρύου βοοειδούς, FBS (Gibco, 10270)
- Αποστειρωμένο διάλυμα θρυψίνης/EDTA 0.05% (Biowest, L0615-500)
- Αποστειρωμένες πιπέτες μιας χρήσης (Greiner Bio One)
- Αποστειρωμένες πλάκες καλλιέργειας T75 (Nunc)

Τα κύτταρα HeLa-Kb καλλιεργούνται στους 37°C σε ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub> προσκολλημένα σε πλάκα. Όταν τα κύτταρα επικαλύψουν την επιφάνεια της πλάκας κατά 70-90%

ανακαλλιεργούνται σε αναλογία 1:8 έως 1:4. Το πλήρες θρεπτικό υλικό καλλιέργειας παρασκευάζεται με προσθήκη 10% FBS σε τελικό όγκο. Για την ανακαλλιέργεια αφαιρείται το θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα εκπλένονται με 5 ml PBS. Έπειτα αφαιρείται το PBS και προστίθενται 2 ml από το διάλυμα της θρυψίνης. Τα κύτταρα τοποθετούνται στους 37°C για περίπου 5 min μέχρι να αποκολληθούν. Η θρυψίνη απενεργοποιείται με προσθήκη 10 ml πλήρους θρεπτικού υλικού. Μέρος των κυττάρων μεταφέρεται σε καινούργια πλάκα που περιέχει φρέσκο θρεπτικό υλικό.

### **3.1.3 Κυτταρική σειρά A375 (ATCC, CRL-1619)**

- Απαγωγός κάθετης νηματικής ροής (BIOAIR)
- Επωαστικός κλίβανος (Smart Cell, Heal Force)
- Θρεπτικό μέσο DMEM (Gibco, 31966-021)
- Αποστειρωμένο διάλυμα PBS pH 7.4 (Gibco, 10010-015)
- Ορός εμβρύου βοοειδούς FBS (Gibco, 10270)
- Αποστειρωμένες πιπέτες μιας χρήσης (Greiner Bio One)
- Αποστειρωμένες πλάκες καλλιέργειας T75 (Nunc)
- Διάλυμα πενικιλίνης-στεπτομυκίνης 100x (Biowest, L0022-100)
- Αποστειρωμένο διάλυμα θρυψίνης/EDTA 0.05% (Biowest, L0930-100)

Τα κύτταρα A375 καλλιεργούνται στους 37°C σε ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub> προσκολλημένα σε πλάκα. Όταν τα κύτταρα επικαλύψουν την επιφάνεια της πλάκας κατά 70-90% ανακαλλιεργούνται σε αναλογία 1:10 έως 1:4. Το πλήρες θρεπτικό υλικό καλλιέργειας παρασκευάζεται με προσθήκη 10% FBS σε τελικό όγκο και διαλύματος αντιβιοτικών σε αραιώση 1:100. Για την ανακαλλιέργεια αφαιρείται το θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα εκπλένονται με 5 ml PBS. Αφαιρείται το PBS και προστίθενται 2 ml από το διάλυμα της θρυψίνης. Τα κύτταρα τοποθετούνται στους 37°C για περίπου 5 min μέχρι να αποκολληθούν όλα τα κύτταρα. Η θρυψίνη απενεργοποιείται με προσθήκη 10 ml πλήρους θρεπτικού υλικού. Μέρος των κυττάρων μεταφέρεται σε καινούργια πλάκα που περιέχει φρέσκο θρεπτικό υλικό.

### **3.1.4 Κυτταρική σειρά υβριδώματος W6/32 (ATCC, HB-95)**

- Απαγωγός κάθετης νηματικής ροής (BIOAIR)
- Επωαστικός κλίβανος (Smart Cell, Heal Force)
- Θρεπτικό μέσο DMEM (Gibco, 31966-021)
- Ορός εμβρύου βοοειδούς (Gibco, 10270)
- Αποστειρωμένες πιπέτες μιας χρήσης (Greiner Bio One)
- Αποστειρωμένες πλάκες καλλιέργειας T75 (Nunc)
- Διάλυμα πενικιλίνης-στεπτομυκίνης 100x (Biowest, L0022-100)

Τα κύτταρα W6/32 καλλιεργούνται στους 37°C σε ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub> σε αιώρημα. Όταν τα κύτταρα έχουν συγκέντρωση 1×10<sup>6</sup> αραιώνονται μέχρι τα 1-2.5×10<sup>5</sup> κύτταρα/mL. Το πλήρες θρεπτικό υλικό καλλιέργειας παρασκευάζεται με προσθήκη 10% FBS σε τελικό όγκο και διαλύματος αντιβιοτικών σε αραιώση 1:100.

### 3.2 Μέτρηση κυττάρων

- Οπτικό μικροσκόπιο (Zeiss)
- Αιματοκυτταρόμετρο (Zeiss)
- Ειδική καλυπτρίδα (Zeiss)
- Χρωστική trypan blue (Gibco, 15250-061)

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

### 3.3 Προετοιμασία κυττάρων για συντήρηση σε βαθιά ψύξη

#### 3.3.1 Κύτταρα High Five

- Απαγωγός κάθετης νηματικής ροής (BIOAIR)
- Φυγόκεντρος 5430 R (Eppendorf)
- Αποστειρωμένες φιάλες 500 mL (VWR)
- Φίλτρα οπών 0,22 μm (Greiner Bio One)
- Κρυσταλλοειδή (Greiner Bio One)
- Κρυσταλλοειδικό μέσο: 45% θρεπτικό υλικό από το υπερκείμενο των κυττάρων, 45% SF900II SFM, 10% DMSO

Τα κύτταρα καλλιεργούνται μέχρι να φτάσουν σε συγκέντρωση  $1-2 \times 10^6$  κύτταρα/mL δηλαδή στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης. Η καλλιέργεια φυγοκεντρείται στα 1250 rpm για 5 min. Λαμβάνεται μέρος από το υπερκείμενο για την παρασκευή του κρυσταλλοειδικού μέσου, το οποίο φιλτράρεται υπό ασηπτικές συνθήκες και τοποθετείται σε πάγο. Τα κύτταρα αναδιασπείρονται σε κατάλληλο όγκο κρυσταλλοειδικού μέσου ώστε να έχουν συγκέντρωση  $10^7$  κύτταρα/mL. Οι αμπούλες με τα κύτταρα (1 mL) τοποθετούνται για 24 h στους  $-80^{\circ}\text{C}$  και στη συνέχεια σε υγρό άζωτο.

#### 3.3.2 Κύτταρα θηλαστικών

- Απαγωγός κάθετης νηματικής ροής (BIOAIR)
- Φυγόκεντρος 5430 R (Eppendorf)
- Αποστειρωμένες πλάκες T75 (Nunc)
- Φίλτρα οπών 0,22 μm (Greiner Bio One)
- Κρυσταλλοειδή (Greiner Bio One)
- Κρυσταλλοειδικό μέσο: 60% θρεπτικό υλικό ευκαρυωτικών κυττάρων, 30% FBS, 10% DMSO
- Αποστειρωμένο διάλυμα θρυψίνης/EDTA 0.05% (Biowest, L0930-100)

Παρασκευάζεται το κρυοπροστατευτικό μέσο, φιλτράρεται υπό ασηπτικές συνθήκες και τοποθετείται σε πάγο. Τα κύτταρα καλλιεργούνται μέχρι να καλύψουν την πλάκα σε ποσοστό 70-90% (A375, HeLa-Kb) ή να φτάσουν σε συγκέντρωση  $1 \times 10^6$  κύτταρα/mL (W6/32). Τα κύτταρα αποκολλούνται από την πλάκα όπως και στην ανακαλλιέργεια και στη συνέχεια φυγοκεντρώνονται στα 500 g για 10 min. Τα κύτταρα αναδιασπείρονται σε 3 ml κρυοπροστατευτικού μέσου και μεταφέρονται σε κρυοφιαλίδια (1 mL/αμπούλα) τα οποία τοποθετούνται για 24 h στους  $-80^{\circ}\text{C}$  και στη συνέχεια σε υγρό άζωτο.

### 3.4 Απόψυξη κυττάρων από υγρό άζωτο

- Απαγωγός κάθετης νηματικής ροής (BIOAIR)
- Επωαστικός κλίβανος (Heal Force)
- Πλήρες θρεπτικό υλικό
- Αποστειρωμένες πιπέτες μιας χρήσης (Greiner Bio One)
- Αποστειρωμένες πλάκες T75 (Greiner Bio One)/ Αποστειρωμένες φιάλες 125 mL (VWR)
- Φυγόκεντρος 5430 R (Eppendorf)

Το πλήρες θρεπτικό μέσο της κάθε κυτταρικής σειράς προθερμαίνεται σε θερμοκρασία δωματίου. Η αμπούλα με τα κύτταρα τοποθετείται σε υδρόλουτρο ( $\sim 37^{\circ}\text{C}$ ) μέχρι να υγροποιηθούν τα κύτταρα και τοποθετείται στον απαγωγό. Τα κύτταρα μεταφέρονται σε σωλήνα τύπου falcon των 50 mL ο οποίος περιέχει 10 mL θρεπτικού μέσου. Τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται για 5 min στα 500 g προκειμένου να απομακρυνθεί το DMSO που περιέχει το κρυοπροστατευτικό μέσο και στη συνέχεια επαναδιασπείρονται σε κατάλληλο όγκο πλήρους θρεπτικού υλικού. Τα κύτταρα επωάζονται σε κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας και ατμόσφαιρας.

### 3.5 Επιμόλυνση κυττάρων High Five για αναγέννηση βακιλοϊού (P2)

- Απαγωγός κάθετης νηματικής ροής (BIOAIR)
- Επωαστικός κλίβανος με σύστημα ανάδευσης (LabTech)
- Φυγόκεντρος 5430 R (Eppendorf)

- Θρεπτικό μέσο SF900II SFM (Invitrogen)
- Αποστειρωμένες φιάλες 500 mL (VWR)
- Φίλτρα οπών 0,22  $\mu\text{m}$  (Greiner Bio One)

Οι ανασυνδυσασμένες πρωτεΐνες ERAP1 και ERAP2 εκφράζονται σε κύτταρα εντόμου με φορέα έκφρασης βακιλοϊό. Για την αναγέννηση του ιού προστίθεται σε καλλιέργεια κυττάρων High Five συγκέντρωσης  $10^6$  κύτταρα/mL βακιλοϊός (P1), ο οποίος φυλάσσεται σε βαθιά ψύξη, σε αναλογία 1:50. Η καλλιέργεια επωάζεται στους  $27^\circ\text{C}$  υπό ανάδευση (125 rpm). Ο βακιλοϊός συλλέγεται όταν τα περισσότερα κύτταρα εμφανίζουν σημάδια επιμόλυνσης (3-4 ημέρες μετά), είναι δηλαδή διογκωμένα, αλλά δεν υπάρχουν πολλά νεκρά καθώς οι τοξίνες που απελευθερώνουν είναι επιβλαβείς για τα κύτταρα. Για τη συλλογή του βακιλοϊού, η καλλιέργεια μεταφέρεται σε σωλήνα τύπου falcon των 50 mL και φυγοκεντρείται για 10min στα 1250 rpm. Το υπερκείμενο φιλτράρεται και αποθηκεύεται στους  $4^\circ\text{C}$ .

### **3.6 Επιμόλυνση κυττάρων High Five για παραγωγή των ανασυνδυσασμένων πρωτεϊνών ERAP1 και ERAP2**

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

Σε καλλιέργεια κυττάρων High Five των 50 ml τα οποία έχουν συγκέντρωση περίπου  $1 \times 10^6$  κύτταρα/mL, προστίθεται βακιλοϊός (P2) σε αναλογία 1:20. Η αναλογία αυτή επιλέχθηκε βάσει προηγούμενων δοκιμασιών παραγωγής πρωτεΐνης. Τα κύτταρα με το βακιλοϊό επωάζονται για 72 h στους  $27^\circ\text{C}$  υπό ανάδευση (125 rpm).

### **3.7 Έκφραση και καθαρισμός των ανασυνδυσασμένων πρωτεϊνών ERAP1 και ERAP2**

- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου 500 mM pH 8.0



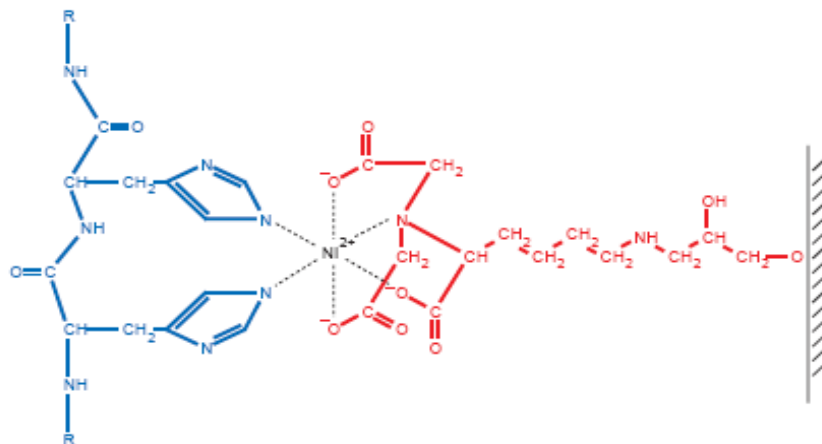
- NaCl<sub>(s)</sub> (Applichem)
- Διάλυμα NaCl 2 M
- Διάλυμα ιμιδαζολίου 2 M pH 8.0 (Applichem)
- Διαλύματα διαβαθμισμένης συγκέντρωσης ιμιδαζολίου: 50 mM φωσφορικά pH 8.0, 300 mM NaCl και 10, 20, 30, 150, 300 mM ιμιδαζόλιο
- Διάλυμα HEPES 1 M pH 7.0 (Applichem)
- Στήλη συγγενείας ιόντων Ni<sup>2+</sup>-Ni-NTA (Qiagen)
- Μεμβράνες διαπίδυσης 13000 MWCO (Sigma-Aldrich)
- Αναστολέας πρωτεασών PMSF 250 mM (Applichem)
- Φυγόκεντρος 5430 R (Eppendorf)
- Μαγνητικός αναδευτήρας (LabTech)

### **Αρχή της μεθόδου**

Οι ανθρώπινες ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες ERAP1 και ERAP2 απομονώνονται και καθαρίζονται από το υπερκείμενο καλλιέργειας κυττάρων High Five, καθώς στο N-τελικό άκρο του γονιδίου τους περιέχουν αλληλουχία που σηματοδοτεί την έκκρισή τους. Επίσης στο τέλος (C-τελικό άκρο) του γονιδίου 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 Σχήμα 14. Η έκλουση των πρωτεϊνών από τη στήλη χημικής συγγενείας Ni<sup>2+</sup>-NiNTA σε καθαρή μορφή πραγματοποιείται ύστερα από έκπλυση με διαλύματα αυξανόμενης συγκέντρωσης ιμιδαζολίου το οποίο ανταγωνίζεται τις ιστιδίνες της ετικέτας.

### **Πειραματική πορεία**

Λαμβάνεται δείγμα από την καλλιέργεια High Five 72 ώρες μετά την επιμόλυνση προκειμένου να ελεγχθεί η έκβασή της. Αν τα κύτταρα παρουσιάζουν έντονα σημάδια επιμόλυνσης από βακίλλο ή καλλιέργεια μεταφέρεται σε σωλήνα τύπου falcon των 50 mL και φυγοκεντρείται για 15 min στα 4500 rpm στους 4°C. Συλλέγεται το υπερκείμενο και επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρηση για 30 min στις ίδιες συνθήκες. Στο υπερκείμενο προστίθεται ο αναστολέας σερινοπρωτεασών PMSF σε



**Σχήμα 13: Στήλη NiNTA: Τα ιόντα Ni<sup>2+</sup> είναι δεσμευμένα ομοιοπολικά σε ρητίνη αραρόζης στα οποία δεσμεύεται η ετικέτα ιστιδινών της πρωτεΐνης.**

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

τελική συγκέντρωση 0.1 mM και κατόπι υποβάλλεται σε 4 διαπιδύσεις (τρεις ανά 2 h και η τελευταία όλη τη νύχτα) σε ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM φωσφορικά pH 8.0, 100 mM NaCl. Μετά τις διαπιδύσεις το διάλυμα της πρωτεΐνης προσαρμόζεται σε σύνθεση 50 mM φωσφορικού νατρίου pH 8.0, 300 mM NaCl, 10 mM ιμιδαζόλιο και αφού αναδευτεί ελαφρά φυγοκεντρείται στα 4500 rpm για 15 min στους 4°C. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε σωλήνα τύπου falcon των 50 mL ο οποίος περιέχει 0.5 mL υλικού στήλης Ni<sup>2+</sup>Ni-NTA εξισορροπημένου με το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα με την πρωτεΐνη. Η δέσμευση της πρωτεΐνης στη στήλη λαμβάνει χώρα για 2 h στους 4°C υπό ανάδευση. Στη συνέχεια παραλαμβάνεται η στήλη με φυγοκέντρηση στα 200 g για 5 min στους 4°C και η πρωτεΐνη καθαρίζεται και εκλούεται με διαλύματα ιμιδαζολίου συγκεντρώσεων 10, 20, 30, 150 και 300 mM. Η καθαρότητα της πρωτεΐνης ελέγχεται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 10% υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE), ενώ μετράται και η δραστικότητα των κλάσμων ως προς L-AMC (βλ. επόμενες παραγράφους). Τα καθαρά και δραστικά κλάσματα ενώνονται και υποβάλλονται σε διαπίδυση με ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM HEPES pH 7.0, 100 mM NaCl όλη τη νύχτα στους 4°C. Στο τελικό διάλυμα της πρωτεΐνης προστίθεται 10% γλυκερόλη και 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.

### 3.8 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)

- Συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης OmniPage
- Θερμαντική πλάκα (Labnet)
- Ακρυλαμίδιο 30% (Applichem)
- Διάλυμα Tris-HCl 1,5 M pH 8.8
- Διάλυμα Tris-HCl 1 M pH 6.8
- SDS 10%
- APS 10% (εκκινητής πολυμερισμού)
- TEMED (καταλύτης πολυμερισμού)
- Ισοπροπανόλη (Sigma-Aldrich)
- Πρότυπο διάλυμα πρωτεϊνών γνωστών μοριακών βαρών (NEB, P7704)
- Χρωστική φόρτωσης δειγμάτων
- Διάλυμα ηλεκτροφόρησης Tris-Γλυκίνης
- Διάλυμα χρώσης Coomassie blue (1 L): 1 g coomassie blue, 480 mL μεθανόλη, 100 mL οξικό οξύ, 420 mL dH<sub>2</sub>O
- Διάλυμα αποχρωματισμού (1 L): 450 mL μεθανόλη, 450 mL dH<sub>2</sub>O, 100 mL οξικό οξύ

Αντιδραστήριο	Πηκτή διαχωρισμού 10%	Πηκτή διαχωρισμού 12%	Πηκτή επικάθισης
dH <sub>2</sub> O	2 ml	1.65 ml	1.7 ml
Ακρυλαμίδιο 30%	1.65 ml	2 ml	415 μl
Tris-HCl 1.5M pH 8.8	1.25 ml	1.25 ml	-
Tris-HCl 1M pH 6.8	-	-	315 μl
SDS 10%	50 μl	50 μl	25 μl
APS 10%	200 μl	200 μl	100 μl

TEMED	4 μl	4 μl	5 μl
-------	------	------	------

**Πίνακας 1: Ποσότητες αντιδραστηρίων για παρασκευή πηκτών για ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE με το σύστημα OmniPage.**

Για την παρασκευή της πηκτής διαχωρισμού και επικάθησης ακολουθείται το πρωτόκολλο της OmniPage για πηκτή πάχους 1 mm. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων φαίνονται στον παραπάνω πίνακα. Ο πολυμερισμός λαμβάνει χώρα για περίπου 30 min. Στα δείγματα της ηλεκτροφόρησης προστίθεται χρωστική φόρτωσης δειγμάτων σε αναλογία 1:5 και ακολουθεί θερμική αποδιάταξη στους 95°C για 5 min. Κατά την ηλεκτροφόρηση εφαρμόζεται αρχικά διαφορά δυναμικού στα 90V και όταν τα δείγματα εισέλθουν στην πηκτή διαχωρισμού αυξάνεται στα 120 V. Η ηλεκτροφόρηση διακόπτεται όταν η χρωστική εξέλθει από την πηκτή. Η πηκτή μεταφέρεται σε δοχείο που περιέχει περίπου 50 mL διαλύματος Coomassie blue και ανακινείται για περίπου 30 min. 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 dH<sub>2</sub>O.

### **3.9 Μέτρηση της ενζυμικής δραστικότητας της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης ERAP1**

- Φθορίζον υπόστρωμα: L- λευκίνο-7-αμινο-4-μεθυλοκουμαρίνη (L-AMC) διάλυμα 50mM σε DMSO, (Sigma-Aldrich, L2145)
- Ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM HEPES pH 7.0, 100 mM NaCl
- Μικροπλάκες 96 πηγαδιών για φθορισμομετρία (Greiner Bio-one, 655076)
- Φθορισμόμετρο Spark 10M (Tecan)

#### **Αρχή της μεθόδου**

Η δραστικότητα της αμινοπεπτιδάσης ERAP1 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 460 nm ο οποίος ανιχνεύεται μετά από διέγερση στα 380 nm.

### **Πειραματική πορεία**

Για την μέτρηση της δραστηριότητας της ERAP1 ως προς L-AMC αραιώνουμε με ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM HEPES pH 7.0, 100 mM NaCl το L-AMC σε τελική συγκέντρωση 100 μM. Σε 150 μL από το διάλυμα του υποστρώματος προσθέτουμε 10 μL από το διάλυμα της πρωτεΐνης. Η πλάκα μεταφέρεται άμεσα στο όργανο που ανιχνεύει τον φθορισμό και μετράται η κλίση της ευθείας “σήμα ανά δευτερόλεπτο”. Η ειδική δραστηριότητα του ενζύμου ως προς L-AMC ορίζεται ως τα moles AMC που παράγονται από ένα mol ενζύμου το δευτερόλεπτο.

### **3.10 In vitro τιτλοδότηση της δραστηριότητας του αναστολέα DG013A**

- Φθορίζον υπόστρωμα: L- λευκίνο-7-αμινο-4-μεθυλοκουμαρίνη (L-AMC) διάλυμα 50 mM σε DMSO, (Sigma-Aldrich, L2145)
- Αναστολέας DG013A ως υδατικό διάλυμα
- Ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM HEPES pH 7.0, 100 mM NaCl, 0.002% Tween-20
- Μικροπλάκες 96 πηγαδιών για φθορισμομετρία (Greiner Bio-one, 655076)
- Φθορισμόμετρο Spark 10M (Tecan)

### **Αρχή της μεθόδου**

Η αλληλεπίδραση του αναστολέα DG013A με την αμινοπεπτιδάση ERAP1 μειώνει την ικανότητα υδρόλυσης του L-AMC από το ένζυμο. Με μέτρηση της δραστηριότητας της ERAP1 παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων του DG013A μπορεί να προσδιοριστεί η τιμή IC50 του αναστολέα για το συγκεκριμένο ένζυμο.

### **Πειραματική πορεία**

Οι αντιδράσεις λαμβάνουν χώρα σε τελικές συγκεντρώσεις του αναστολέα 0, 0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3 μM. Ο αναστολέας αραιώνεται σε ρυθμιστικό διάλυμα σε συγκεντρώσεις δεκαπλάσιες από τις τελικές και 15 μl μεταφέρονται στην πλάκα. Σε αυτά προστίθενται 135 μl

ρυθμιστικού διαλύματος το οποίο περιέχει το ένζυμο και το υπόστρωμα. Σε κάθε αντίδραση η ERAP1 έχει τελική συγκέντρωση 10 nM και το L-AMC 50 μM. Η τιμή του IC50 προσδιορίζεται με τη βοήθεια του λογισμικού GraphPad Prism.

### **3.11 Κυτταρική δοκιμασία προσδιορισμού της τιμής EC50 του αναστολέα DG013A**

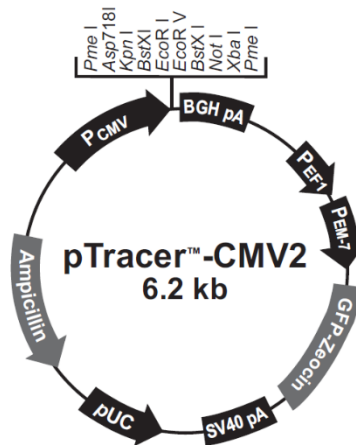
#### **Αρχή της μεθόδου**

Τα κύτταρα HeLa-Kb έχουν υποστεί τροποποίηση ώστε να εκφράζουν σταθερά το μόριο ιστοσυμβατότητας μύος H2-Kb το οποίο προσδένει και παρουσιάζει στην επιφάνεια των κυττάρων των επίτοπο της ωοαλβουμίνης SIINFEEKL. Για την παραγωγή του ώριμου επιτόπου στο ενδοπλασματικό δίκτυο είναι απαραίτητη η υδρόλυση του πρόδρομου πεπτιδίου από την αμινοπεπτιδάση ERAP1. Ο πλασμιδιακός φορέας pTracer-CMV2-13L στοχεύει στο ενδοπλασματικό δίκτυο ένα mini-γονίδιο το οποίο εκφράζει το πρόδρομο πεππίδιο του επιτόπου LEQLESIIINFEEKL. Παρουσία δραστικού ενζύμου το πεππίδιο υδρολύεται, δεσμεύεται στα H2-Kb μόρια ιστοσυμβατότητας και παρουσιάζεται στην επιφάνεια των κυττάρων. Αναστολή της ERAP1 οδηγεί σε μείωση των επιπέδων του συμπλόκου τα οποία προσδιορίζονται με κυτταρομετρία ροής.

#### **3.11.1 Μετασχηματισμός επιδεικτικών κυττάρων *E.coli* XL1-Blue για πολλαπλασιασμό πλασμιδιακού DNA**

- Επιδεικτικά κύτταρα *E.coli* XL1-Blue
- Πλασμίδια: pTracer CMV2 13L, pTracer CMV2 8S (Ευγενική προσφορά των Δρ. Laurence J. Stern και Δρ. Kenneth Rock)
- Αποστειρωμένο θρεπτικό μέσο LB
- Αποστειρωμένο θρεπτικό μέσο LB-άγαρ
- Αποστειρωμένο διάλυμα CaCl<sub>2</sub> 0.1 M
- Αμπικικιλίνη 100 mg/mL (Applichem)
- Αποστειρωμένες κωνικές φιάλες 500 ml
- Επωαστικός κλίβανος με σύστημα ανάδευσης (LabTech)
- Θερμαντική πλάκα (Labnet)

- Αποστειρωμένα τρυβλία Petri διαμέτρου 10 cm (Greiner Bio One)



**Σχήμα 14:** Πλασμιδιακός φορέας pTracer-CMV2 ο οποίος φέρει στην αλληλουχία του μίνι-γονίδιο που κωδικοποιεί τον πρόδρομο επίτοπο LEQLESIIINFEKL.

Αμπούλα με 50  $\mu\text{L}$  επιδεικτικά κύτταρα *E.coli* XL1-Blue αποψύχεται σε πάγο και κατόπιν προστίθενται 200  $\mu\text{l}$   $\text{CaCl}_2$  0.1M. 125  $\mu\text{l}$  από το διάλυμα των βακτηρίων μεταφέρονται σε αποστειρωμένο σωληνάκι τύπου Eppendorf το οποίο περιέχει 2 ng πλασμιδιακού DNA. Τα κύτταρα αφήνονται για 30 min σε πάγο, επωάζονται για 45 sec στους  $42^\circ\text{C}$  και στη συνέχεια μεταφέρονται αμέσως σε πάγο για τουλάχιστον 2 min. 100  $\mu\text{L}$  από τα βακτηριακά κύτταρα απλώνονται σε τρυβλία LB-άγαρ τα οποία περιέχουν 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  αμπικικιλίνη. Οι καλλιέργειες επωάζονται στους  $37^\circ\text{C}$  για όλη τη νύχτα. Αργότερα την ίδια μέρα, επιλέγονται μονές αποικίες και μεταφέρονται σε αποστειρωμένες κωνικές φιάλες που περιέχουν 100 ml LB-αμπικικιλίνη (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) Οι καλλιέργειες επωάζονται στους  $37^\circ\text{C}$  για όλη τη νύχτα.

### 3.11.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

- Kit απομόνωσης πλασμιδιακού DNA, Qiagen Plasmid MidiKit (Qiagen, 12143)
- Ισοπροπανόλη (Sigma-Aldrich, 33539)
- Αιθανόλη 70% (Merck, 1.00983.1011)
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-EDTA pH 8.0 (TE)

- Ψυχρόμενη Φυγόκεντρος 5430R (Eppendorf)

Οι καλλιέργειες των βακτηρίων μεταφέρονται σε σωλήνες τύπου falcon των 50 ml και φυγοκεντρώνται για 20 min στα 2000 g, στους 4°C. Το πλασμιδιακό DNA απομονώνεται από τα βακτήρια με τη χρήση του Qiagen Plasmid MidiKit ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η μέτρηση της συγκέντρωσης του DNA πραγματοποιήθηκε με λήψη φάσματος για δίκλωνο DNA σε φασματοφωτόμετρο τύπου Nanodrop. Το πλασμιδιακό DNA φυλάσσεται προσωρινά στους 4°C και για μακροχρόνια συντήρηση στους -20°C.

### 3.11.3 Διαγνωστική πέψη και ανάλυση του πλασμιδιακού DNA

- Πλασμιδιακό DNA pTracer CMV2 13L και pTracer CMV2 8S
- Περιοριστική ενδονουκλεάση AgeI (NEB, R0552S)
- Ρυθμιστικό διάλυμα κατάλληλο για την AgeI (NEB, παρέχεται μαζί με το ένζυμο)
- Περιοριστική ενδονουκλεάση BglII (NEB, R0144S)
- Ρυθμιστικό διάλυμα κατάλληλο για την BglII (NEB, παρέχεται μαζί με το ένζυμο)
- Θερμαντική πλάκα (Labnet International)
- Αγαρόζη (Fisher Scientific, BP160-100)
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-οξικό οξύ-EDTA (TAE)
- Διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου 10 mg/ml
- Χρωστική OrangeG 10X
- Πρότυπο μοριακών βαρών DNA 1kb (NEB)
- Συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης OmniPage

Προκειμένου να διαπιστωθεί ότι δεν υπάρχει κάποια αλλοίωση στο πλασμιδιακό DNA πραγματοποιήθηκε διαγνωστική πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Για το πλασμιδιακό φορέα pTracer CMV2 επιλέχθηκαν τα ένζυμα AgeI και BglII. Το συγκεκριμένο πλασμίδιο φέρει στην αλληλουχία του μια θέση αναγνώρισης για την AgeI (A<sup>▼</sup>CCGG<sup>▲</sup>T) στη θέση 1387/1391 και δύο θέσεις αναγνώρισης για την BglII (A<sup>▼</sup>GATC<sup>▲</sup>T) στις θέσεις 12/16 και 1875/1879) οπότε και αναμένουμε μια ζώνη στα 6.2 kb και δύο ζώνες μεγέθους 1850bp και 4000bp αντίστοιχα. Η κάθε αντίδραση περιέχει 500ng DNA, 2 μl ρυθμιστικό διάλυμα κατάλληλο για το κάθε ένζυμο, αποστειρωμένο νερό μέχρι να έχουμε τελικό όγκο 20 μl και 0.5 μl από την κάθε περιοριστική ενδονουκλεάση. Οι αντιδράσεις επωάζονται για μία ώρα στους 37°C. Μέρος των αντιδράσεων



καθώς και 500 ng από το πλασμιδιακό DNA αναλύονται σε πηκτή αγαρόζης 1% παρουσία 1 µg/ml βρωμιούχου αιθιδίου.

#### **3.11.4 Διαμόλυνση κυττάρων HeLa-Kb με τους πλασμιδιακούς φορείς pTracer CMV2 13L και pTracer CMV2 8S**

- Κύτταρα HeLa-Kb
- Θρεπτικό μέσο RPMI 1640 (Gibco,61870-010), 10% FBS
- Θρεπτικό μέσο Opti-MEM (Gibco, 31985-062)
- Λιποφεκταμίνη 2000 (11668-019, Thermo Fisher Scientific)
- Πλάκες 48 πηγαδιών για κυτταροκαλλιέργειες (Greiner Bio-One)
- Απαγωγός κάθετης νηματικής ροής (BIOAIR)
- Επωαστικός κλίβανος (Heal Force)

Σε πλάκες 48 πηγαδιών μεταφέρονται προς καλλιέργεια 20.000 κύτταρα HeLa-Kb σε ολικό όγκο θρεπτικού μέσου 200 µl. Τα κύτταρα επωάζονται στους 37°C σε ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub> για 24 h. Μετά από 24 h οπότε και τα κύτταρα έχουν φτάσει σε κάλυψη επιφάνεια περίπου 90% αντικαθίσταται το θρεπτικό μέσο με φρέσκο και πραγματοποιείται διαμόλυνση των κυττάρων με πλασμιδιακό DNA. Η διαμόλυνση πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Thermo Fisher Scientific Fisher Scientific. Σε δύο σωληνάκια τα οποία περιέχουν 12.5 µl θρεπτικού μέσου Opti-MEM το καθένα, αραιώνονται 250 ng από το πλασμιδιακό DNA και 1 µl λιποφεκταμίνης 2000. Το DNA και η λιποφεκταμίνη αναμιγνύονται και επωάζονται για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να σχηματιστούν τα συμπλοκα DNA-λιποφεκταμίνης. 25 µl από το μείγμα προστίθενται στο RPMI και τα κύτταρα επωάζονται με το αντιδραστήριο διαμόλυνσης για 5 h.

#### **3.11.5 Επεξεργασία κυττάρων HeLa-Kb με τον αναστολέα DG013A**

- Πλήρες θρεπτικό μέσο RPMI 1640
- Αναστολέας DG013A ως υδατικό διάλυμα
- Επωαστικός κλίβανος (Heal Force)

Με το πέρας των 5 ωρών, αφαιρείται το RPMI το οποίο περιέχει το αντιδραστήριο διαμόλυνσης και αντικαθίσταται από φρέσκο. Στο θρεπτικό μέσο προστίθεται ο αναστολέας της ERAP1 σε τελικές συγκεντρώσεις 0, 0.1, 0.3, 1 και 3  $\mu\text{M}$ . Τα κύτταρα επωάζονται στους 37°C σε ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub> για 36 h.

### 3.11.6 Κυτταρομετρία ροής

- Αποστειρωμένο διάλυμα PBS pH 7.4 (Gibco, 10010-015)
- Διάλυμα 10mM EDTA pH 8.0/PBS
- Σωλήνες ειδικό για FACS, 5 ml (Falcon, 352054)
- Ρυθμιστικό διάλυμα FACS, 1% BSA, 0.02% NaN<sub>3</sub>/PBS
- Anti-Mouse SIINFEKL/H-2Kb PerCP-eFluor 710 (46-5743-82, Affymetrix)
- Ψυχόμενη Φυγόκεντρος 5430R (Eppendorf)
- Κυτταρομετρητής ροής FACSCalibur

Με το πέρας των 36 ωρών, αφαιρείται το θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα εκπλένονται δύο φορές με διάλυμα PBS και ακολούθως μεταφέρονται 200  $\mu\text{l}$  διαλύματος EDTA 10mM/PBS σε κάθε πηγάδι. Τα κύτταρα αποκολλώνται και μεταφέρονται σε πάγο, σε σωλήνα ειδικό για FACS το οποίο περιέχει 2 ml διαλύματος FACS. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 1250 rpm για 5 min στους 4°C και πλύση των κυττάρων με 1 ml διαλύματος FACS. Το ίζημα των κυττάρων επαναδιασπείρεται σε 2 ml αντισώματος Anti-Mouse SIINFEKL/H-2Kb PerCP-eFluor 710 αραιωμένο 1:2 σε διάλυμα FACS. Τα κύτταρα επωάζονται με το αντίσωμα για 30 min στους 4°C απουσία φωτός. Κατόπι, τα κύτταρα εκπλένονται με 2 ml διαλύματος FACS και επαναδιασπείρονται σε 200  $\mu\text{l}$  από το ίδιο διάλυμα. Τα κύτταρα αναλύονται σε κυτταρομετρητή ροής FACSCalibur σε περιβάλλον λογισμικού CellQuestPro.

### 3.12 Επίδραση με ιντερφερόνη- $\gamma$ στα κύτταρα A375

- Απαγωγός κάθετης νηματικής ροής (BIOAIR)
- Επωαστικός κλίβανος (Smart Cell, Heal Force)

- Πλήρες θρεπτικό μέσο DMEM (Gibco,31966-021)
- Αποστειρωμένες πλάκες καλλιέργειας T75 (Nunc)
- Ιντερφερόνη-γ (Gibco, PHC40310)

Στο θρεπτικό υλικό κυττάρων A375 τα οποία έχουν ανακαλλιεργηθεί την προηγούμενη μέρα, προστίθεται ιντερφερόνη-γ σε τελική συγκέντρωση 20 ng/ml. Τα κύτταρα επωάζονται στους 37°C σε ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub> για 24 h.

### **3.13 Ανίχνευση των αμινοπεπτιδασών ERAP1 και ERAP2 σε κύτταρα μελανώματος A375**

#### **3.13.1 Λύση κυττάρων A375**

- Κύτταρα A375
- Διάλυμα PBS (Gibco, 10010-015)
- Εργαλεία απόξεσης κυττάρων (Greiner Bio-One)
- Διάλυμα λύσης RIPA: Tris-HCl pH 8.0 50 mM, NaCl 150 mM, 1% Triton X-100, 0.25% δεοξυ-χολικό νάτριο, 0.1% SDS
- Αναστολείς πρωτεασών Complete (Roche, 12326400)
- Διάλυμα EDTA 0.5 M pH 8.0
- Φυγόκεντρος 5430 R, Eppendorf
- Φυγόκεντρος Heraeus Fresco17, Thermo Fisher Scientific

Σε πλάκα T75 καλλιεργούνται τα ανθρώπινα κύτταρα μελανώματος A375. Όταν τα κύτταρα επικαλύψουν την πλάκα περίπου κατά 90% αφαιρείται το θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα εκπλένονται δύο φορές με PBS. Στη συνέχεια προστίθενται 5 ml PBS και τα κύτταρα αποκολλώνται από την πλάκα με τη βοήθεια ειδικού εργαλείου για απόξεση των κυττάρων. Τα κύτταρα (~10<sup>7</sup>) φυγοκεντρούνται για 10 min στα 1250 rpm στους 4°C και επαναδιασπείρονται σε 100μl διαλύματος λύσης RIPA στο οποίο έχει προστεθεί 1 mM EDTA pH 8.0 και αναστολείς πρωτεασών Complete. Τα κύτταρα αφήνονται στο διάλυμα λύσης για 1 ώρα υπό ανάδευση στους 4°C και στη συνέχεια φυγοκεντρούνται για 30 min στα 12500 rpm στους 4°C. Παραλαμβάνεται το υπερκείμενο και φυλάσσεται στους -80°C.

### 3.13.2 Ποσοτικοποίηση ολικής πρωτεΐνης σε λύμα κυττάρων

- BCA Protein Kit Assay (Thermo Fisher Scientific, 23250)
- Μικροπλάκες 96 πηγαδιών για απορρόφηση (Greiner Bio-One, 655101)
- Φθορισμόμετρο Spark 10M, Tecan

#### Αρχή της μεθόδου

Σε βασικό διάλυμα παρουσία πρωτεϊνών, λαμβάνει χώρα αναγωγή του  $\text{Cu}^{2+}$  σε  $\text{Cu}^{1+}$ . Η αναγωγή αυτή παρουσία [2,2'-δικινολινο]-4,4'-δικαρβοξυλικού οξέος (BCA) οδηγεί σε σχηματισμό ιώδους χρώματος. Μετρώντας την απορρόφηση στα 562 nm μπορούμε να ποσοτικοποιήσουμε την ολική πρωτεΐνη σύμφωνα με το νόμο Lambert-Beer. Στην αναγωγή του χαλκού συνεισφέρουν κυρίως οι πλευρικές ομάδες της C της Y και της W αλλά και ο πεπτιδικός δεσμός.

#### Πειραματική πορεία

Η μέτρηση της ολικής πρωτεΐνης στο λύμα κυττάρων A375 πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Thermo Fisher Scientific Fisher Scientific. Συνοπτικά, 10 μl δείγματος αναμιγνύονται με 200 μl από το μείγμα των αντιδραστηρίων A και B. Τα δείγματα επωάζονται για 30 min στους 37°C και στη συνέχεια μετρείται η απορρόφηση στα 562 nm. Η συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης προσδιορίζεται μέσω πρότυπης καμπύλης BSA.

### 3.13.3 Ανοσοαποτύπωση των πρωτεϊνών ERAP1 και ERAP2 σε λύμα κυττάρων A375

- Λύμα κυττάρων A375
- Ανασυνδυασμένα ένζυμα ERAP1 και ERAP2
- Έγχρωμο πρότυπο διάλυμα πρωτεϊνών (NEB, P7712)
- Σύστημα μεταφοράς Omni-Page
- Μεμβράνη PVDF (Thermo Fisher Scientific, 88520)
- Διάλυμα μεταφοράς
- Διάλυμα TBS-Tween pH 8.0
- Σκόνη αποβουτυρωμένου γάλακτος

- Human AP PILS/ARTS1 polyclonal goat IgG (R&D Systems, AF2334)
- Human AP LRAP/ERAP2 polyclonal goat IgG (R&D Systems, AF3830)
- Anti-goat IgG-HRP (R&D Systems, HAF017)
- Αντιδραστήρια ενισχυμένης χημειοφωταύγειας ECL (Thermo Fisher Scientific, 32209)
- Las 4000 (Fujifilm)

Αναλύονται με SDS-PAGE σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 10%, 10 ng ανασυνδιασμένης ERAP1 και ERAP2 καθώς και 100 µg ολικής πρωτεΐνης από το λύμα των κυττάρων. Στη συνέχεια οι πρωτεΐνες μεταφέρονται από την πηκτή σε μεμβράνη PVDF όπου θα πραγματοποιηθεί η ανοσοαποτύπωση. Η μεταφορά λαμβάνει χώρα στα 25 V στους 4°C όλη τη νύχτα. Την επόμενη μέρα αφαιρείται η μεμβράνη από τη συσκευή μεταφοράς και τοποθετείται σε διάλυμα 5% σκόνη γάλακτος διαλυμένη σε TBS.T (διάλυμα αποκλεισμού). Η μεμβράνη επωάζεται στο διάλυμα αποκλεισμού για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να αποκλειστούν οι μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης του αντισώματος. Στη συνέχεια αφαιρείται το διάλυμα αποκλεισμού και η μεμβράνη επωάζεται για τουλάχιστον μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με το πρωτογενές αντίσωμα. Η τελική συγκέντρωση του αντισώματος είναι 0.2 µg/ml. Κατόπιν, η μεμβράνη εκπλένεται με διάλυμα TBS.T και προστίθεται το δευτερογενές αντίσωμα αραιωμένο 1:1000 σε διάλυμα αποκλεισμού. Η μεμβράνη επωάζεται για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια εκπλένεται δύο φορές με TBS.T για 15 min. Στη μεμβράνη προστίθεται το μείγμα αντιδραστηρίων ενισχυμένης χημειοφωταύγειας το οποίο αποτελεί υπόστρωμα της υπεροξειδάσης η οποία είναι συζευγμένη στο δευτερογενές αντίσωμα. Η μέτρηση της χημειοφωταύγειας πραγματοποιείται με τη βοήθεια του λογισμικού Las4000 και η επεξεργασία της εικόνας με το AIDA Image analyzer.

### **3.14 Προσδιορισμός πολυμορφισμών μονού νουκλεοτιδίου στο γονίδιο της αμινοπεπτιδάσης *ERAP1***

#### **3.14.1 Απομόνωση γενομικού DNA**

- Κύτταρα A375
- Διάλυμα λύσης (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.5% SDS)
- Πρωτεϊνάση K (Sigma-Aldrich, P2308)
- RNAση A (Thermo Fisher Scientific, EN0531)
- Φαινόλη (Appllichem, A1153,0100)

- Χλωροφόρμιο (Applichem, A3633,0500)
- CH<sub>3</sub>COONa 3 M pH 5.2
- Απόλυτη αιθανόλη (Emsure, 1.00983.1011)
- Φασματοφωτόμετρο Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific)

10<sup>6</sup> κύτταρα A375 επωάζονται όλη τη νύχτα στους 37°C σε 500 μl διαλύματος λύσης το οποίο περιέχει 0.1 mg/ml πρωτεΐνάσης K και 0.1 mg/ml RNάσης A. Το γενομικό DNA καθαρίζεται με τρεις εκχυλίσεις με 500 μl μείγματος διαλυτών φαινόλη-χλωροφόρμιο 1:1 και δύο εκχυλίσεις με 500 μl χλωροφόρμιο. Η κατακρήμνιση του DNA πραγματοποιείται με προσθήκη 50 μl CH<sub>3</sub>COONa (1/10 του συνολικού όγκου) και 1 ml απόλυτης αιθανόλης (διπλάσιο του όγκου). Το ίζημα εκπλένεται με 70% αιθανόλη και επαναδιαλύεται σε νερό. Η ποσοτικοποίηση του DNA γίνεται με μέτρηση της απορρόφησης στα 260 nm.

### 3.14.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

- Γενομικό DNA κυττάρων A375
- Ευθείς και ανάστροφοι εκκινητές (διάλυμα 100 μM)
- Μείγμα dNTPs 10 mM
- Ταq DNA πολυμεράση (NEB, M0273)
- Ρυθμιστικό διάλυμα Ταq DNA πολυμεράσης 10x (προμηθεύεται μαζί με την Ταq DNA πολυμεράση)
- Αποστειρωμένο ddH<sub>2</sub>O
- Θερμικός κυκλοποιητής Tpersonal, Biometra

Για την ενίσχυση των εξωνίων 11, 12 και 15 της ERAP1 χρησιμοποιήθηκαν αντίστοιχα τα παρακάτω ζεύγη εκκινητών: 5'-AAATGGGTGATGTGTCTGCC-3' και 5'-TCAAAGCAAGGTTCCATCC-3', 5'-CATGATAGGTGATTTAATAACTGCTTG-3' και 5'-TTTTCACATTCTCCTTGAATTAAC-3', 5'-TACTGGTCCCTGTTTCCCTG-3' και 5'-AAACAGAAAAGATGCCCTTAC-3'. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων και οι συνθήκες της PCR φαίνονται στους παρακάτω πίνακες.

Αντιδραστήριο	Ποσότητα
DNA	50 ng
Ταq ρυθμιστικό διάλυμα 10x	5 $\mu$ l
dNTPs 10mM	1 $\mu$ l
Εκκινητής 5'-3' 100 $\mu$ M	2.5 $\mu$ l
Εκκινητής 3'-5' 100 $\mu$ M	2.5 $\mu$ l
Ταq DNA πολυμεράση	1 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	Μέχρι 50 $\mu$ l

Πίνακας 2: Ποσότητες αντιδραστηρίων για την ενίσχυση των εξωνίων 11, 12 και 15 της ERAP1 χρησιμοποιώντας Ταq πολυμεράση

	Θερμοκρασία (°C)	Χρονική διάρκεια
Αρχική αποδιάταξη	95	5 min
Αποδιάταξη	95	30 sec
Υβριδοποίηση	55	45 sec
Επιμήκυνση	72	90 sec
Τελική επιμήκυνση	72	10 min
Ψύξη	4	30 min

Πίνακας 3: Συνθήκες θερμικής κυκλοποίησης των εξωνίων 11, 12 και 15 της ERAP1

Τα προϊόντα ενίσχυσης της PCR απομονώνονται από πηκτή αγαρόζης με εφαρμογή διαφοράς δυναμικού και καθαρίζονται με εκχύλιση με μείγμα διαλυτών φαινόλη και χλωροφόρμιο. Το DNA καταβυθίζεται με CH<sub>3</sub>COONa (1/10 του συνολικού όγκου) και απόλυτη αιθανόλη (διπλάσιο του όγκου). Η αλληλούχηση του DNA πραγματοποιείται με τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν και για την ενίσχυσή του.

### 3.15 Επίδραση του αναστολέα DG013A σε κύτταρα A375

- Απαγωγός κάθετης νηματικής ροής (BIOAIR)
- Επωαστικός κλίβανος (Smart Cell, Heal Force)
- Πλήρες θρεπτικό μέσο DMEM (Gibco, 31966-021)
- Αποστειρωμένες πλάκες καλλιέργειας T175 (Nunc)
- Πλάκες 12 πηγαδιών για κυτταροκαλλιέργειες (Greiner Bio One)
- Αναστολέας DG013A ως υδατικό διάλυμα

Στο θρεπτικό υλικό κυττάρων A375, προστίθεται αναστολέας DG013A σε τελική συγκέντρωση 1 μΜ. Το θρεπτικό μέσο με τον αναστολέα ανανεώνεται κάθε δύο ημέρες. Συνολικά τα κύτταρα επωάζονται στους 37°C σε ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub> για έξι ημέρες. Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε μεγάλη κλίμακα για απομόνωση ανοσοπεπτιδιώματος ή επιστρώνονται σε πλάκα 12 πηγαδιών για ανάλυση με κυτταρομετρία ροής.

### 3.16 Ανίχνευση MHCΙ στην επιφάνεια των κυττάρων με κυτταρομετρία ροής

- Κύτταρα A375
- Αποστειρωμένο διάλυμα PBS pH 7.4 (Gibco, 10010-015)
- Διάλυμα 10 mM EDTA pH 8.0/PBS
- Σωλήνες ειδικό για FACS, 5 ml (Falcon, 352054)
- Ρυθμιστικό διάλυμα FACS, 1% BSA, 0.02% NaN<sub>3</sub>/PBS
- Mouse anti-human HLA ABC:FITC (Bio-rad, MCA81F)
- Ψυχόμενη Φυγόκεντρος 5430R (Eppendorf)
- Κυτταρομετρητής ροής FACSCalibur



Κύτταρα A375 ( $\sim 1 \times 10^6$ ) εκπλένονται δύο φορές με διάλυμα PBS και ακολούθως προστίθενται σε αυτά 500 μl διαλύματος EDTA 10 mM/PBS. Τα κύτταρα αποκολλώνται και μεταφέρονται σε πάγο, σε σωλήνα ειδικό για FACS το οποίο περιέχει 2 ml διαλύματος FACS. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 1250 rpm για 5 min στους 4°C και πλύση των κυττάρων με 1 ml διαλύματος FACS. Το ίζημα των κυττάρων επαναδιασπείρεται σε 2 ml αντισώματος Mouse anti-human HLA ABC:FITC και επώάζεται για 30 min στους 4°C απουσία φωτός. Κατόπι, τα κύτταρα εκπλένονται με 2 ml διαλύματος FACS και επαναδιασπείρονται σε 300 μl από το ίδιο διάλυμα. Τα κύτταρα αναλύονται σε κυτταρομετρητή ροής FACSCalibur σε περιβάλλον λογισμικού CellQuestPro.

### 3.17 Δοκιμασία κυτταροτοξικότητας του αναστολέα DG013A

- Κύτταρα A375
- Πλήρες θρεπτικό μέσο DMEM (Gibco, 31966-021)
- Βρωμίδιο του 3-(4,5-διμεθυλ-θιαζολ-2-ΥΙ)-2,5-διφαινυλο-τετραζολίου (MTT) (Appllichem, A2231)
- Πλάκες κυτταροκαλλιιεργειών 96 πηγαδιών (Greiner Bio One)
- Αναστολέας DG013A ως υδατικό διάλυμα
- Διμέθυλο-σουλφοξειδίο
- Απαγωγός κάθετης νηματικής ροής (BIOAIR)
- Επωαστικός κλίβανος (Smart Cell, Heal Force)
- Φθορισμόμετρο Spark 10M (Tecan)

#### Αρχή της μεθόδου

Οι NAD(P)H οξειδοαναγωγάσες έχουν την ικανότητα να ανάγουν το τετραζόλιο (κίτρινο) στο μη διαλυτό σε υδατικό διάλυμα φορμαζάνιο (μωβ). Η αντίδραση αυτή αποτελεί ένδειξη της μεταβολικής δραστηριότητας των κυττάρων καθώς βασίζεται στη ροή του NAD(P)H. Παρουσία κυτταροτοξικών παραγόντων μειώνεται η βιωσιμότητα των κυττάρων και κατ' επέκταση η ικανότητα σχηματισμού του φορμαζανίου.

#### Πειραματική πορεία

Σε μικροπλάκα 96 πηγαδιών ειδική για κυτταροκαλλιέργειες επιστρώνονται 5000 κύτταρα A375 και επωάζονται στους 37°C για 24 h ώστε να προσκολληθούν τα κύτταρα στην πλάκα. Αφαιρείται το θρεπτικό υλικό και προστίθενται 100 μl φρέσκου το οποίο περιέχει αναστολέα DG013A σε τελικές συγκεντρώσεις 0, 0.1, 0.3, 1, 3, 10 και 30 μM. Τα κύτταρα επωάζονται με τον αναστολέα για 48 h και στη συνέχεια προστίθενται 100 μg αντιδραστηρίου MTT σε κάθε πηγάδι. Η επώαση με το MTT λαμβάνει χώρα για 4 h στους 37°C. Στη συνέχεια, αφαιρείται το θρεπτικό υλικό που περιέχει το MTT και προστίθενται 100 μl DMSO σε κάθε πηγάδι έτσι ώστε να διαλυτοποιηθούν οι κρύσταλλοι του φορμαζάνιου. Ακολουθεί μέτρηση της τιμής της απορρόφησης στα 490 nm με αναφορά στα 620 nm.

### 3.18 Έκφραση και απομόνωση του αντισώματος W6/32

- Κυτταρική σειρά υβριδώματος W6/32
- Θρεπτικό υλικό DMEM (Gibco,31966-021)
- Πλάκες κυτταροκαλλιέργειών T175 (Nunc)
- Συσκευή φιλτραρίσματος (Sigma-Aldrich, CLS431097)
- Διάλυμα PBS (Gibco, 10010-015)
- Μembrάνη διαπίδυσης MWCO: 30000Da (Sigma-Aldrich)
- Στήλη σεφαρόζης Protein G (17-0618-01, GE Healthcare)
- Διάλυμα έκλουσης: Κιτρικό οξύ 0.1 M pH 3.0
- Διάλυμα εξουδετέρωσης: Tris-HCl 1 M pH 9.0
- Ψυχόμενη φυγόκεντρος 5430R, Eppendorf
- Φασματοφωτόμετρο Nanodrop2000 (Thermo Fisher Scientific)

Το αντίσωμα W6/32 μπορεί να δεσμεύσει τα ανθρώπινα κλασικά μόρια ιστοσυμβατότητας τάξης I (HLA-ABC) καθώς αναγνωρίζει μια μη πολυμορφική αλληλουχία στη βαριά αλυσίδα των μορίων ιστοσυμβατότητας. Κύτταρα του υβριδώματος που εκφράζουν το W6/32 καλλιεργούνται μέχρι να φτάσουν συγκέντρωση  $10^6$  κύτταρα/ml. Αφαιρείται το πλήρες θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα επαναδιασπείρονται σε ίσο όγκο θρεπτικού μέσου το οποίο δεν περιέχει FBS και αντιβιοτικά. Τα κύτταρα επωάζονται στους 37°C για 5 ημέρες. Στη συνέχεια συλλέγεται το θρεπτικό υλικό, φυγοκεντρείται στα 4500 rpm για 30 min στους 4°C και το υπερκείμενο φιλτράρεται σε συσκευή

φιλτραρίσματος μεγέθους πόρων 0.2  $\mu\text{m}$  και υποβάλλεται σε διαπιδύσεις για 48 h σε διάλυμα PBS. Η στήλη της πρωτεΐνης G (2 ml) εκπλένεται με 20 όγκους στήλης νερό milliQ και στη συνέχεια εξισορροπείται PBS. Το διάλυμα της πρωτεΐνης διέρχεται από τη στήλη οπότε και δεσμεύεται το αντίσωμα στην πρωτεΐνη G. Ακολουθεί πλύση της σεφαρόζης με 20 όγκους στήλης PBS και έκλουση του αντισώματος με 10 όγκους στήλης διαλύματος έκλουσης το οποίο συλλέγεται σε κλάσματα του 1 ml. Καθώς το όξινο pH του διαλύματος έκλουσης είναι επιβλαβές για το αντίσωμα, τα σωληνάκια στα οποία συλλέγεται περιέχουν 300  $\mu\text{l}$  διαλύματος εξουδετέρωσης. Ο καθαρισμός του αντισώματος W6/32 ελέγχεται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 12% και τα κλάσματα τα οποία περιέχουν το αντίσωμα υποβάλλονται σε διαπίδυση σε διάλυμα PBS όλη τη νύχτα στους 4°C. Η συγκέντρωση του αντισώματος υπολογίζεται με μέτρηση της απορρόφησης στα 280 nm βάσει του νόμου Lambert-Beer ( $\epsilon_{0 \text{ IgG}}$ : 1.36). Το αντίσωμα φυλάσσεται στους -80°C.

### **3.19 Πρόσδεση αντισώματος W6/32 σε στήλη ενεργοποιημένης σεφαρόζης με CN-Br**

- Αντίσωμα W6/32 σε PBS
- Στήλη ενεργοποιημένης σεφαρόζης με CN-Br (GE-Healthcare, 17-0430-01)
- Μembrάνη διαπίδυσης MWCO: 13000Da (Sigma-Aldrich)
- Διάλυμα σύζευξης:  $\text{HNaCO}_3$  0.1 M, NaCl 0.5 M pH 8.3
- Διάλυμα ενυδάτωσης: HCl 1 mM
- Διάλυμα αποκλεισμού: Tris-HCl 0.1 M pH 8.0
- Διάλυμα χαμηλού pH:  $\text{CH}_3\text{COONa}$  0.1 M, NaCl 0.5 M pH 4.0
- Διάλυμα υψηλού pH: Tris-HCl 0.1 M, NaCl 0.5 M pH 8.0
- Διάλυμα 20 mM Tris-HCl pH 7.5, NaCl 150 mM

Το αντίσωμα W6/32 πριν δεσμευτεί στη στήλη υποβάλλεται σε διαπίδυση όλη τη νύχτα σε διάλυμα σύζευξης. Σε κάθε ml στήλης προσδένονται 2 mg αντισώματος W6/32. Την επόμενη μέρα ζυγίζεται στερεή στήλη ενεργοποιημένης σεφαρόζης με CN-Br και ενυδατώνεται σε 50 ml HCl 1 mM για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου. Για 1 mg ενυδατωμένης σεφαρόζης ζυγίζονται 0.285 g στερεής. Η στήλη πλένεται με διάλυμα ενυδάτωσης και στη συνέχεια δύο φορές με διάλυμα

σύζευξης. Η στήλη μεταφέρεται σε σωλήνα τύπου falcon των 50 ml όπου και προστίθεται το αντίσωμα W6/32. Η σύζευξη λαμβάνει χώρα στους 4°C υπό ανάδευση όλη τη νύχτα. Η στήλη εκπλένεται με διάλυμα σύζευξης και κατόπιν, τρεις φορές με 50 ml διαλύματος αποκλεισμού. Η στήλη μεταφέρεται σε σωλήνα τύπου falcon των 50 ml, ο οποίος περιέχει 25 ml από το διάλυμα αποκλεισμού. Ο αποκλεισμός των ελευθέρων περιοχών της στήλης πραγματοποιείται για τρεις ώρες σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση. Στη συνέχεια η στήλη εκπλένεται με διάλυμα αποκλεισμού και με τρεις κύκλους διαλυμάτων χαμηλού και υψηλού pH. Τέλος, η στήλη εξισορροπείται με ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM Tris-HCl pH 7.5, NaCl 150 mM και φυλάσσεται στους 4°C μέχρι την απομόνωση των MHC. Για την παρασκευή προσθήλης ενεργοποιημένης σεφαρόζης με CN-Bg ακολουθείται η ίδια διαδικασία χωρίς το στάδιο της πρόσδεσης του αντισώματος.

### 3.20 Απομόνωση ανοσοπεπτιδιώματος από κύτταρα A375

- Κύτταρα A375
- Αναστολείς πρωτεασών Complete (Roche, 12326400)
- Διάλυμα EDTA 0.5 M pH 8.0
- Διάλυμα λύσης: 20 mM Tris-HCl pH 7.5, NaCl 150 mM, 0.5% Igepal, 0.25% δεοξυ-χολικό νάτριο
- Διάλυμα 20 mM Tris-HCl pH 7.5, NaCl 150 mM
- Διάλυμα I: 20 mM Tris-HCl pH 8.0, NaCl 150 mM
- Διάλυμα II: 20 mM Tris-HCl pH 8.0, NaCl 400 mM
- Διάλυμα III: 20 mM Tris-HCl pH 8.0
- Διάλυμα έκλουσης: 1% TFA
- Σωλήνες ειδικοί για υπερφυγόκεντρο (Beckman-Coulter)
- Υπερφυγόκεντρος Optima L-90K (Beckman-Coulter)
- Κεφαλή υπερφυγοκέντρου 50.2 Ti (Beckman-Coulter)

Κύτταρα A375 ( $5 \times 10^8$ ) αποψύχονται σε πάγο και λύνονται με 20 ml διαλύματος λύσης το οποίο περιέχει 1 mM EDTA pH 8.0 και αναστολείς πρωτεασών Complete (μία ταμπλέτα για 10 ml διαλύματος). Τα κύτταρα λύνονται για 1 h υπό ανάδευση στους 4°C και στη συνέχεια

φυγοκεντρώνονται στα 2500 rpm για 15 min στους 4°C. Παραλαμβάνεται το υπερκείμενο το οποίο καθαρίζεται περαιτέρω με υπερφυγοκέντρηση στα 100.000 g για 1 h στους 4°C. Το λύμα των κυττάρων διέρχεται από προστήλη σεφαρόζης ενεργοποιημένης με CN-Br προκειμένου να απομακρυνθούν μη ειδικοί προσδέτες της στήλης. Στη συνέχεια μεταβαίνει απευθείας σε στήλη στην οποία έχει προσδεθεί το αντίσωμα W6/32 οπότε και δεσμεύονται τα MHCi στη στήλη. Για να αυξήσουμε το ποσοστό των MHCi που θα δεσμευτούν επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία δέσμευσης άλλες δύο φορές χωρίς τη χρήση της προστήλης. Ακολουθεί έκπλυση της σεφαρόζης με 20 όγκους στήλης διαλύματος I, 20 όγκους στήλης διαλύματος II, ακολούθως 20 όγκους στήλης διαλύματος I και τέλος με 40 όγκους στήλης διαλύματος III. Οι παραπάνω διαδικασίες λαμβάνουν χώρα στους 4°C. Η στήλη μεταφέρεται σε θερμοκρασία δωματίου και προστίθενται σε αυτή 5ml διαλύματος έκλουσης το οποίο συλλέγεται σε κλάσματα του 1 ml. Με την προσθήκη του TFA παραλαμβάνουμε μείγμα πετιδίων και MHC. Η πορεία της απομόνωσης ελέγχεται με ανοσοαποτύπωση κατά Western έναντι της αλυσίδας της β2-μικροσφαιρίνης των MHC.

### 3.21 Καθαρισμός ανοσοπεπτιδιώματος με αναλώσιμες στήλες C18

- Αναλώσιμες στήλες C18 (Pierce: 89870, Thermo Fisher Scientific)
- Διάλυμα ενεργοποίησης: 50% AcN
- Διάλυμα εξισορρόπησης: 5% AcN, 0.1% φορμικό οξύ
- Διάλυμα έκλουσης πεπτιδίων: 30% AcN, 0.1% φορμικό οξύ
- Διάλυμα έκλουσης πρωτεϊνών: 80% AcN, 0.1% φορμικό οξύ
- SpeedVac SVC100 (Savant)
- Φυγόκεντρος Spectrafuge 24D (Labnet)
- Λυοφιλοποιητής BenchTop Pro (SP Scientific)

Τα τρία πρώτα κλάσματα της έκλουσης συμπυκνώνονται περίπου 6 φορές μέχρι τελικού όγκου 500 ml. Οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται από τα πεπτίδια με δέσμευση σε στήλες ανάστροφης φάσης C18 και διαχωρισμό με διαλύματα διαφορετικής περιεκτικότητας σε ακετονιτρίλιο. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες της Thermo Fisher Scientific. Τα κλάσματα που περιέχουν τα πεπτίδια ψύχονται στους -80°C και ξηραίνονται σε συσκευή λυοφιλίωσης όλη τη νύχτα πριν αποσταλούν για αλληλούχηση.

### 3.22 Φασματομετρία μάζας

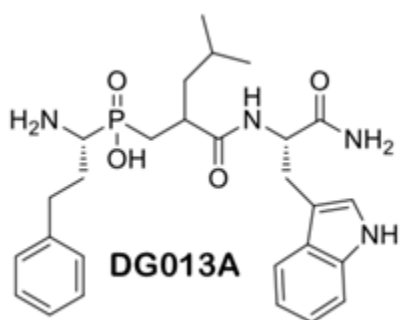
- Φασματομετρητής μάζας Q-Exactive-Plus (Thermo Fisher Scientific)

Τα πεπτίδια διαχωρίστηκαν σε βαθμίδα ακετονιτριλίου 7-40% παρουσία 0.1% φορμικού οξέος για 180 min σε τριχοειδή στήλη C18. Μάζες με λόγο μάζας φορτίου 300-1800 με διαχωριστική ικανότητα 70000 οδηγήθηκαν σε περαιτέρω θραυσματοποίηση. Τα φάσματα MS/MS λήφθηκαν από λόγο μάζας φορτίου 200 με διαχωριστική ικανότητα 17500. Οι αλληλουχίες των πεπτιδίων προσδιορίστηκαν με χρήση του λογισμικού Max-Quant (1.5.0.25) με τη μηχανή αναζήτησης Andromeda και τη βάση δεδομένων human UniProt/Swiss-Prot.

## 4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

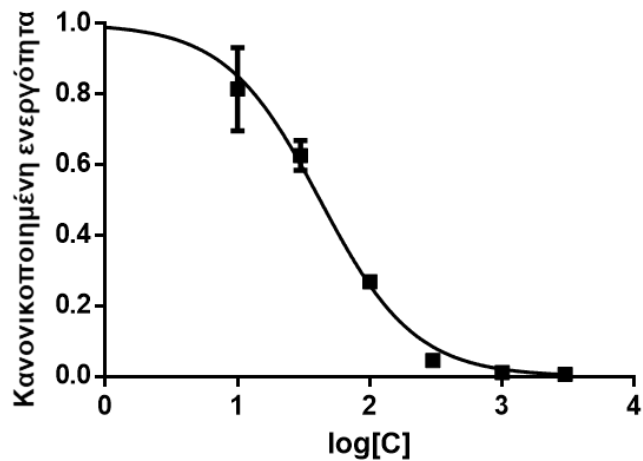
### 4.1 *In vitro* χαρακτηρισμός της ένωσης DG013A ως αναστολέα της αμινοπεπτιδάσης ERAP1

Η χημική ένωση DG013A είναι φωσφινικό τριπεπτιδίο και δρα ως ανταγωνιστικός αναστολέας της αμινοπεπτιδάσης ERAP1 καθώς υιοθετεί μορφή αναλόγου μεταβατικής κατάστασης κατόπιν σύζευξης με το ιόν ψευδαργύρου. Η επιλογή των πλευρικών ομάδων του τριπεπτιδίου είναι αποτέλεσμα εκλογικευμένου σχεδιασμού βασιέ δομικών αναλύσεων και *in vitro* δοκιμασιών και έχει σαν στόχο την αύξηση την εκλεκτικότητας ως προς τη συγκεκριμένη αμινοπεπτιδάση [142].



Σχήμα 15: Χημική δομή του αναστολέα DG013A

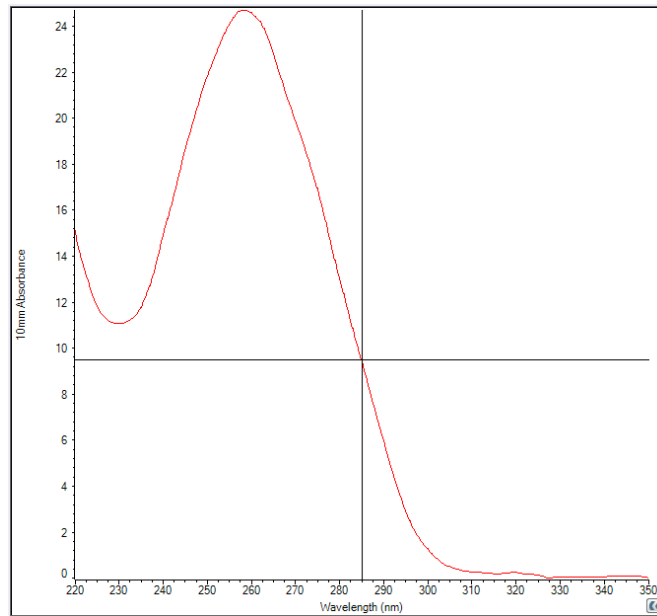
Ως πλευρική ομάδα η οποία θα αλληλεπιδράσει με τον S1 θύλακα επιλέχθηκε η ομοφαινυλαλανίνη, με τον S1' η λευκίνη και με τον S2' η θρυπτοφάνη. Για να επιβεβαιωθεί η ικανότητα αναστολής της συγκεκριμένης ένωσης, προσδιορίστηκε η τιμή IC<sub>50</sub> ελέγχοντας την ικανότητα υδρόλυσης ενός μικρού μη φυσικού υποστρώματος από την ERAP1 παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων αναστολέα. Η τιμή υπολογίστηκε στα 43.5 ± 2.5 nM και συνάδει με προηγούμενες δημοσιευμένες μελέτες [142].



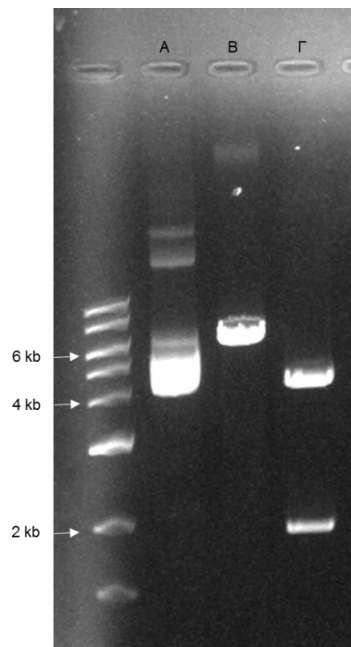
Σχήμα 16: Καμπύλη τιτλοδότησης *in vitro* του αναστολέα DG013A με την αμινοπεπτιδάση ERAP1.

Προκειμένου να εκτιμηθεί η απόδοση του αναστολέα σε ένα κυτταρικό σύστημα και να προσδιοριστεί μια επαρκής συγκέντρωση αναστολέα η οποία θα χρησιμοποιηθεί σε παρακάτω πειράματα, παρακολουθήθηκε η παρουσίαση του επιτόπου SIINFEKL ο οποίος παράγεται από το πρόδρομο αντιγονικό πεπτίδιο μετά από υδρόλυση από την ERAP1. Τα κύτταρα HeLa που χρησιμοποιούνται στη συγκεκριμένη δοκιμασία, είναι σταθερά επιμολυσμένα με το γονίδιο του μορίου ιστοσυμβατότητας μύος *H2-Kb* [65]. Το πρόδρομο πεπτίδιο μήκους 13 αμινοξέων LEQLESIIINFEKL εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο μετά από επιμόλυνση των κυττάρων με πλασμιδιακό φορέα που φέρει στην αλληλουχία του το μίνι-γονίδιο που εκφράζει τον πρόδρομο επίτοπο. Ο φορέας στον οποίο έχει κλωνοποιηθεί το μίνι-γονίδιο είναι ο pTracer CMV2 (6200 bp). Αρχικά, πολλαπλασιάστηκε το πλασμίδιο προκειμένου να υπάρχει επαρκής ποσότητα DNA για την επιμόλυνση. Ο πολλαπλασιασμός του DNA πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα *E.coli* XL1-Blue παρουσία αμπικιλίνης. Το πλασμιδιακό DNA απομονώθηκε και καθαρίστηκε από 100 ml υγρής καλλιέργειας βακτηρίων με τη βοήθεια του kit της Qiagen Plasmid Midi Kit. Η συγκέντρωση του DNA προσδιορίστηκε με μέτρηση της απορρόφησης στα 260 nm (Εικόνα 7). Για να επιβεβαιώσουμε ότι η πλασμιδιακή κατασκευή έμεινε αναλλοίωτη μετά τον πολλαπλασιασμό, πραγματοποιήθηκε διαγνωστική πέψη του DNA με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες AgeI και BglII. Η AgeI αποικοδομεί το συγκεκριμένο φορέα σε μία θέση, ενώ η BglII στις θέσεις 12 και 1875 δίνοντας δύο θραύσματα μεγέθους 1850 και 4000 βάσεων. Το DNA αναλύθηκε σε πηκτή αγαρόζης 1% και όπως φαίνεται στην Εικόνα 8, οι ζώνες εμφανίζονται στα αναμενόμενα μοριακά βάρη.





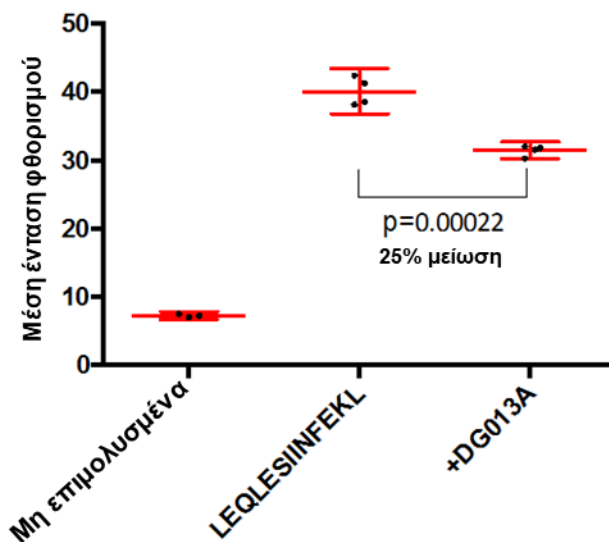
**Εικόνα 7: Φάσμα απορρόφησης του πλασμιδίου pTracer-CMV2 13L.**



A: pTracer CMV2 500 ng  
 B: pTracer CMV2 + Agel  
 Γ: pTracer CMV2 + BglII

**Εικόνα 8: Ηλεκτροφόρηση πλασμιδιακού DNA σε πηκτή αгарόζης 1%.**

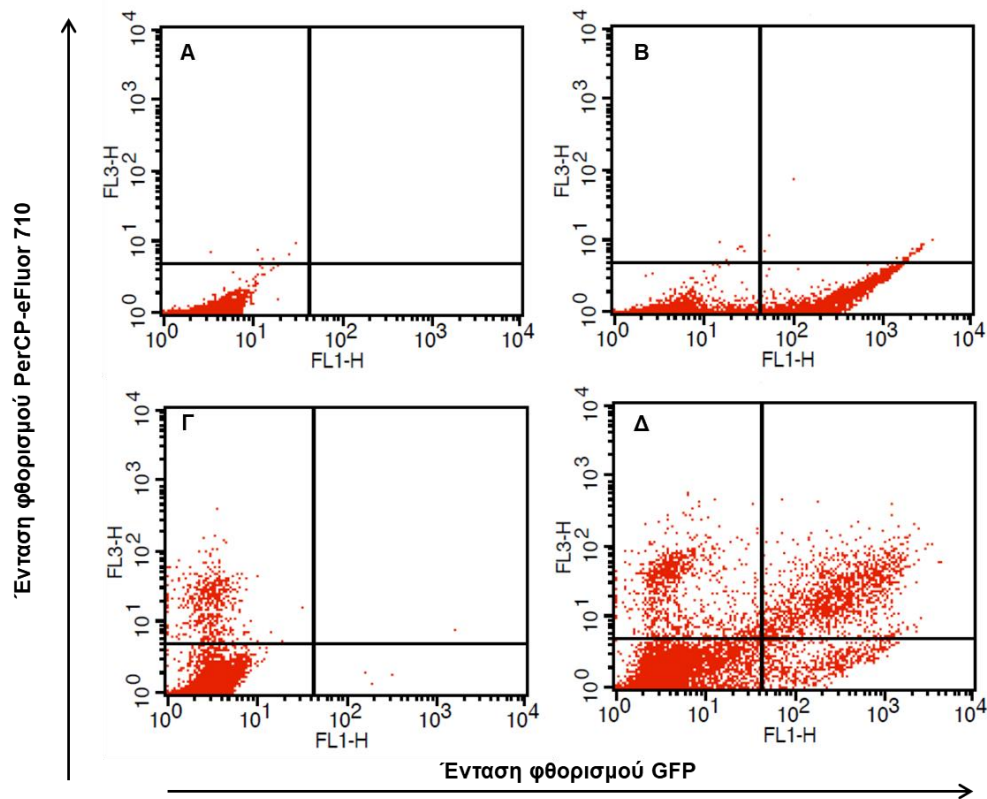
Κατά την επιμόλυνση των κυττάρων HeLa-Kb με το πλασμιδιακό DNA χρησιμοποιήθηκε λιποφεκταμίνη 2000 η οποία είναι ένα κατιονικό λιπίδιο και έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά ηλεκτροστατικά με το αρνητικά φορτισμένο DNA και κατ' αυτό τον τρόπο να εισέρχεται δια μέσου της κυτταρικής μεμβράνης. Ο αναστολέας των αμινοπεπτιδασών DG013A ο οποίος έχει χρησιμοποιηθεί και στα πειράματα ανάλυσης ανοσοπεπτιδιώματος, είναι γνωστό ότι εισέρχεται μέσα στα κύτταρα και έχει επίδραση ανάλογη με αυτή της γενετικής αποσιώπησης της ERAP1 [142]. Αρχικά θέλαμε να επιβεβαιώσουμε ότι ο αναστολέας εμφανίζει αντίστοιχο αποτέλεσμα και στη συγκεκριμένη κυτταρική δοκιμασία. Κύτταρα HeLa-Kb τα οποία επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο που φέρει τον πρόδρομο επίτοπο καλλιεργήθηκαν παρουσία και απουσία του αναστολέα της ERAP1. Μετά από 24h τα κύτταρα αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής. Το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε για τη χρώση των κυττάρων αναγνωρίζει το σύμπλοκο Kb-SIINFEKL [195] το οποίο είναι συζευγμένο με φθορίζουσα ομάδα PerCP e-710 fluor. Το χρωμοφόρο που χρησιμοποιείται δεν πρέπει να εκπέμπει στο πράσινο χρώμα διότι το πλασμίδιο φέρει γονίδιο που εκφράζει GFP.



Σχήμα 17: Μείωση της έντασης φθορισμού σε κύτταρα HeLa παρουσία του αναστολέα DG013A.

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 18, υπάρχει μείωση της έντασης φθορισμού παρουσία του DG013A, όμως δεν είναι αρκετά μεγάλη προκειμένου να προσδιορίζεται με ακρίβεια η τιμή EC50. Η συγκεκριμένη τιμή είναι αντίστοιχη της τιμής IC50 για κυτταρικές δοκιμασίες και δίνει τη συγκέντρωση του αναστολέα που προκαλεί το 50% της μέγιστης απόκρισης. Επειδή το

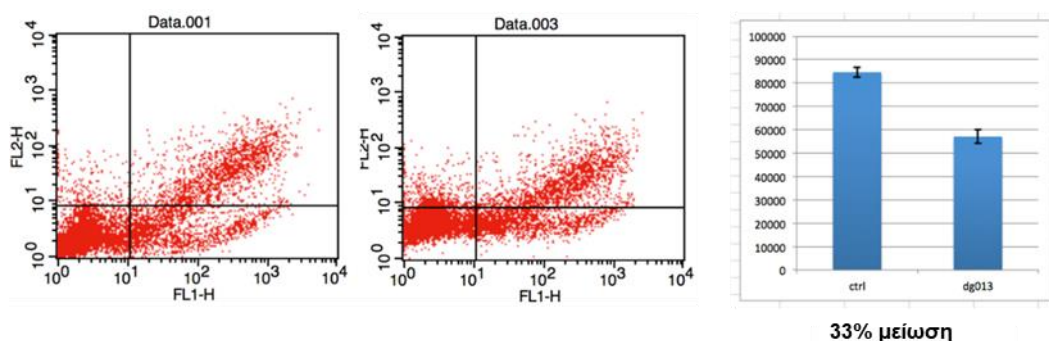
αποτέλεσμα της συγκεκριμένης δοκιμασίας επηρεάζεται άμεσα από το ποσοστό των κυττάρων τα οποία έχουν επιμολυνθεί επιτυχώς με το πλασμίδιο, πραγματοποιήθηκε αντίστοιχο πείραμα μετρώντας την ένταση φθορισμού του χρωμοφόρου μόνο σε κύτταρα που φθορίζουν στο πράσινο χρώμα. Προκειμένου να οριστούν οι τιμές του φθορισμού που θα θεωρούνται θετικές πραγματοποιήθηκε πείραμα ελέγχου στο οποίο μετρήθηκε η ένταση φθορισμού σε δύο μήκη κύματος.



Σχήμα 18: Διαγράμματα στικτογράμματος κυτταρικών πληθυσμών πειράματος ελέγχου.

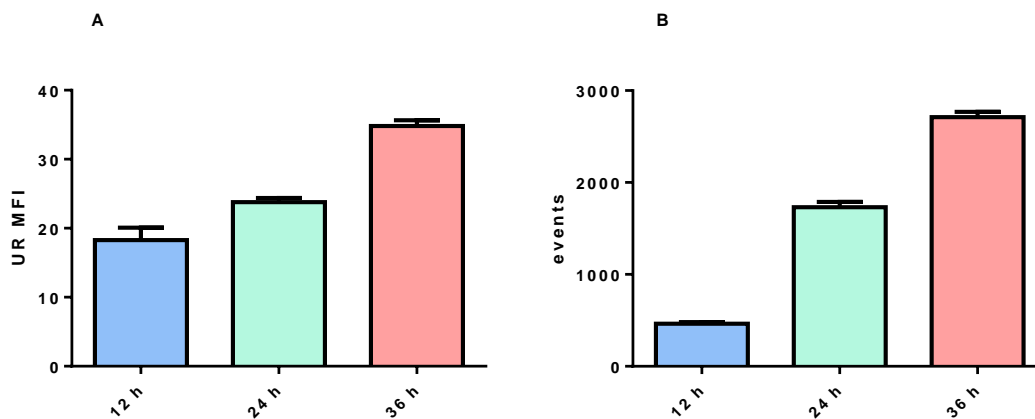
Τα κύτταρα HeLa-Kb που αναλύθηκαν σε αυτό το πείραμα χωρίστηκαν σε τέσσερα δείγματα. Στο πρώτο δείγμα τα κύτταρα δεν επιμολύνθηκαν με τον πλασμιδιακό φορέα ούτε επισημάνθηκαν με το αντίσωμα που αναγνωρίζει το σύμπλοκο H-2Kb – SIINFEKL (Σχήμα 19A, UL: 0.08%, UR: 0.00%, LL: 99.92%, LR: 0.00%). Το δεύτερο δείγμα αποτελείται από κύτταρα τα οποία επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο χωρίς να έχει πραγματοποιηθεί χρώση με το Anti-Mouse SIINFEKL/H-2Kb PerCP-eFluor 710 (Σχήμα 19B, UL: 0.08%, UR: 0.47%, LL: 76.90%, LR: 22.54%), ενώ το τρίτο επισημάνθηκε με το αντίσωμα χωρίς όμως να έχει επιμολυνθεί με το

pTracer CMV2 13L (Σχήμα 19Γ, UL: 5.72%, UR: 0.01%, LL: 94,24%, LR: 0.03%). Στο τέταρτο δείγμα, τα κύτταρα είναι επιμολυσμένα με τον πλασμιδιακό φορέα που φέρει το μίνι-γονίδιο και έχουν επισημανθεί και με το αντίσωμα Anti-Mouse SIINFEKL/H-2Kb PerCP-eFluor 710 (Σχήμα 19Δ, UL: 11.91%, UR: 17.61%, LL: 63.60%, LR: 6.89%). Με αυτές τις μετρήσεις επιτύχαμε να καθορίσουμε το μη ειδικό σήμα των κυττάρων στα μήκη κύματος που πραγματοποιούνται οι μετρήσεις και έτσι να αυξηθεί το σήμα σε σχέση με το θόρυβο. Κατόπιν αυτής της ανάλυσης η τιμή της έντασης φθορισμού που λαμβάνεται υπόψη, είναι αυτή που αντιστοιχεί στην πάνω και δεξιά περιοχή του διαγράμματος στικτογράμματος. Πράγματι, επανάληψη του πειράματος υπό αυτές τις συνθήκες οδηγεί σε μεγαλύτερη μείωση σήματος παρουσία του DG013A.



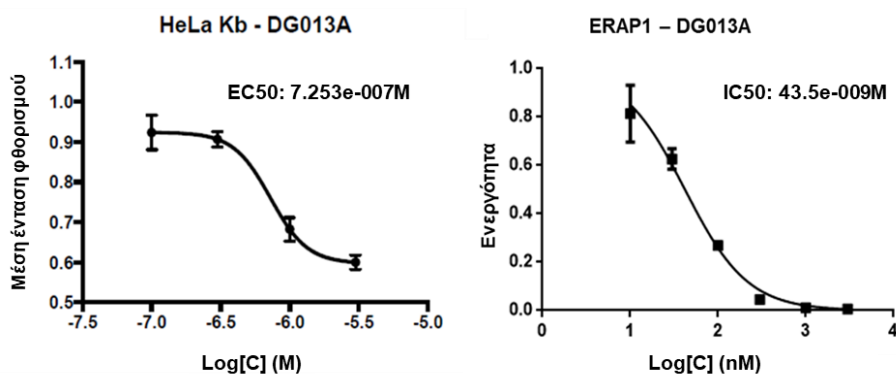
**Σχήμα 19: Μείωση της έντασης φθορισμού σε κύτταρα HeLa παρουσία του αναστολέα DG013A μετά από αποκλεισμό κυττάρων που δεν εκφράζουν GFP.**

Για περαιτέρω βελτιστοποίηση των μετρήσεων, θέλαμε να διαπιστώσουμε κατά πόσο ο χρόνος μεταξύ της επιμόλυνσης και της ανάλυσης με κυτταρομετρία ροής επηρεάζει το σήμα της έντασης φθορισμού. Για να το επιτύχουμε αυτό πραγματοποιήσαμε επιμόλυνση με το πλασμίδιο 12, 24 και 36 ώρες πριν τη χρώση των κυττάρων. Στην ανάλυση που ακολούθησε μετρήθηκαν 10000 κύτταρα. Αρχικά εξετάστηκε ο αριθμός των κυττάρων ή συμβάντων (events), όπως αναφέρονται στην κυτταρομετρία ροής, τα οποία είχαν θετική τιμή έντασης φθορισμού στο πράσινο χρώμα όπως αυτή έχει οριστεί στο πείραμα ελέγχου. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 20B ο αριθμός των κυττάρων που εκφράζουν GFP, των κυττάρων δηλαδή που έχουν επιμολυνθεί με το πλασμίδιο να αυξάνεται σχεδόν 6 φορές όταν αυξάνουμε το χρόνο επώασης από τις 12h στις 36h μετά την επιμόλυνση. Αντίστοιχα παρατηρείται αύξηση και στην τιμή της μέσης έντασης φθορισμού των κυττάρων που ανιχνεύονται στο άνω δεξί τμήμα του διαγράμματος.



Σχήμα 20: Διαφορές στη μέση ένταση φθορισμού (A) και στον αριθμό των κυττάρων (B) για τους διάφορους χρόνους επώασης.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε πείραμα τιτλοδότησης του αναστολέα DG013A για να προσδιοριστεί η τιμή EC<sub>50</sub> στη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά. Τα κύτταρα επώαστηκαν με συγκεντρώσεις αναστολέα από 0.1 έως και 3 μM για 36 h. Η τιμή EC<sub>50</sub> του DG013A βάσει της συγκεκριμένης κυτταρικής δοκιμασίας υπολογίστηκε περίπου στα 730 nM, μία τάξη μεγέθους παραπάνω από την τιμή που υπολογίστηκε στην *in vitro* δοκιμασία αποικοδόμησης του L-AMC.

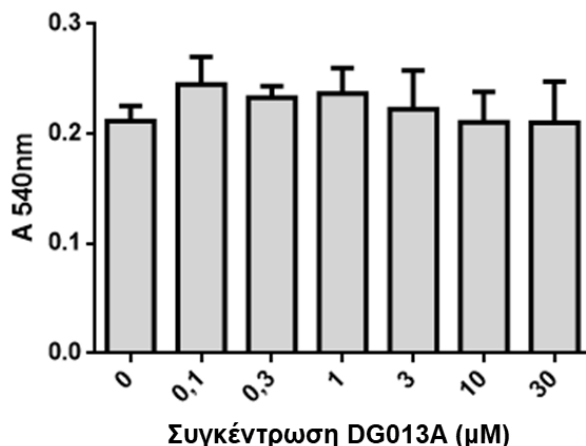


Σχήμα 21: Σύγκριση των τιμών EC<sub>50</sub> και IC<sub>50</sub> για τον αναστολέα DG013A.

## 4.2 Χαρακτηρισμός κυτταρικής σειράς μελανώματος A375

### 4.2.1 Εκτίμηση κυτταροτοξικότητας του αναστολέα στα κύτταρα A375

Για τη μελέτη της επίδρασης αναστολέων της αμινοπεπτιδάσης ERAP1 στο ανοσοπεπτιδίωμα, επιλέξαμε την κυτταρική σειρά μεταστατικού μελανώματος A375 (ATCC: CRL-1619). Επειδή μία χημική ένωση ενδέχεται να αλληλεπιδρά και με άλλα συστατικά του κυττάρου και να εμφανίζει φαινόμενα κυτταροτοξικότητας ελέγξαμε τη βιωσιμότητα της συγκεκριμένης κυτταρικής σειράς παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων του αναστολέα DG013A για 48h. Η επίδραση του αναστολέα στη βιωσιμότητα των κυττάρων εκτιμήθηκε με τη δοκιμασία MTT η αρχή της οποίας περιγράφηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο. Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 23, ο αναστολέας DG013A δε φαίνεται να επηρεάζει τη βιωσιμότητα των κυττάρων A375 ακόμα και σε υψηλές συγκεντρώσεις.



Σχήμα 22: Δοκιμασία κυτταροτοξικότητας MTT του αναστολέα DG013A στα κύτταρα A375.

### 4.2.2 Γονοτυπική ανάλυση των μορίων ιστοσυμβατότητας των κυττάρων A375

Για την ερμηνεία και τον έλεγχο των αποτελεσμάτων ανάλυσης του ανοσοπεπτιδίου είναι απαραίτητο να γνωρίζουμε τα μόρια ιστοσυμβατότητας τάξης I που εκφράζουν τα συγκεκριμένα κύτταρα καθώς διαφορετικά αλληλόμορφα MHC I ενδέχεται να δεσμεύουν διαφορετικά πεπτιδία. Η γονοτυπική ανάλυση της κυτταρικής σειράς A375 πραγματοποιήθηκε από την εταιρεία Center

for Human Genetics and Laboratory Diagnostics, Dr. Klein, Dr. Rost and Colleagues, Ambulatory Healthcare Center, 82152 Martinsried-Germany. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης έδειξαν ότι τα κύτταρα A375 εκφράζουν 6 αλληλόμορφα των MHCI τα οποία φαίνονται στον παρακάτω πίνακα. Από τη βάση δεδομένων SYFPEITHI (<http://www.syfpeithi.de/>) [196] προσδιορίστηκαν τα αμινοξέα αγκυροβόλησης για το καθένα από τα αλληλόμορφα.

HLA alleles	Residue position								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
HLA-A*01:01:01G		<i>T,S</i>	<b>D,E</b>				<i>L</i>		<b>Y</b>
HLA-A*02:01:01G		<b>L,M</b>				<i>V</i>			<b>V,L</b>
HLA-B*44:03:01G		<b>E</b>							<b>Y,F</b>
HLA-B*57:01:01G		<b>A,T,S</b>							<b>F,W,Y</b>
HLA-C*06:02:01G					<i>I,L,F,M</i>	<i>V,I,L</i>			<b>L,I,V,Y</b>
HLA-C*16:01:01		<b>A,T,S</b>							<b>L,I,V,F,Y,W</b>

Πίνακας 4: Αλληλόμορφα MHCI τα οποία εκφράζονται από τα κύτταρα A375. Με **Bold** επισημαίνονται τα βασικά αμινοξέα αγκυροβόλησης ενώ με *Italic* τα δευτερεύοντα.

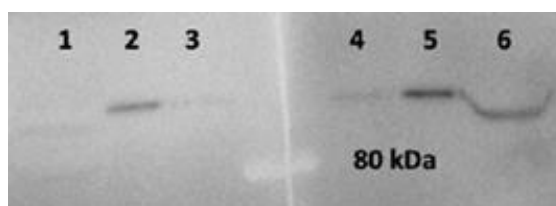
#### 4.2.3 Έκφραση των αμινοπεπτιδάσων ERAP1 και ERAP2 στα κύτταρα A375

Πολλές καρκινικές σειρές εμφανίζουν μη φυσιολογικά επίπεδα έκφρασης πολλών συστατικών του μονοπατιού αντιγονοπαρουσίασης προκειμένου να διαφύγουν της επιτήρησης από το ανοσοποιητικό σύστημα [173]. Ανάμεσα σε αυτά ανήκουν και οι αμινοπεπτιδάσες του ενδοπλασματικού δικτύου ERAP1 και ERAP2. Αρχικά εξετάσαμε την έκφραση της ERAP1 στα κύτταρα A375 με ανοσοαποτύπωση τύπου Western, προκειμένου να διαπιστώσουμε αν η κυτταρική σειρά αυτή αποτελεί ένα κατάλληλο σύστημα για τη μελέτη της αναστολής της.



**Εικόνα 9:** Ανοσοαποτύπωμα της αμινοπεπτιδάσης ERAP1 σε λύμα κυττάρων A375 με ή χωρίς προσθήκη ΙΝΤΕΡΦΕΡΟΝΗΣ- $\gamma$ .

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 9, η αμινοπεπτιδάση ERAP1 ανιχνεύεται σε λύμα κυττάρων A375 και η έκφρασή της αυξάνεται παρουσία ιντερφερόνης- $\gamma$  όπως έχει ήδη καταγραφεί στη βιβλιογραφία [60]. Αφού επιβεβαιώθηκε η παρουσία της ERAP1 πραγματοποιήθηκε σύγκριση με τα επίπεδα έκφρασης της ομόλογης αμινοπεπτιδάσης ERAP2 καθώς ο DG013A αναστέλλει εξίσου ισχυρά και αυτή την αμινοπεπτιδάση.

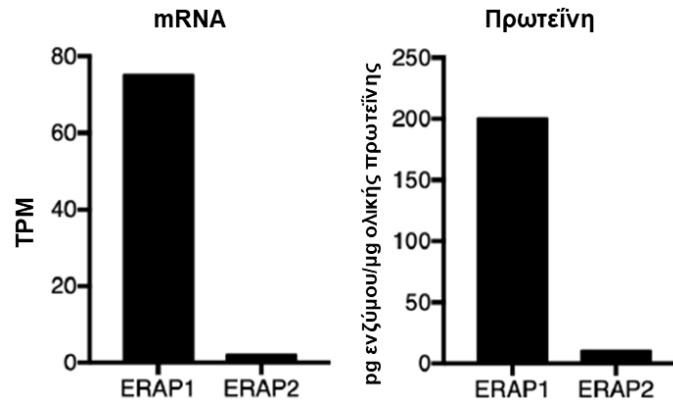


1: 100 $\mu$ g ολικής πρωτεΐνης από λύμα κυττάρων A375, anti-ERAP2  
 2: 3 $\mu$ g ανασυνδιασμένης ERAP2  
 3: 1 $\mu$ g ανασυνδιασμένης ERAP2  
 4: 10 $\mu$ g ανασυνδιασμένης ERAP1  
 5: 30 $\mu$ g ανασυνδιασμένης ERAP1  
 6: 100 $\mu$ g ολικής πρωτεΐνης από λύμα κυττάρων A375, anti-ERAP1

**Εικόνα 10:** Ανοσοαποτύπωμα των αμινοπεπτιδασών ERAP1 και ERAP2 σε λύμα κυττάρων A375.

Σύμφωνα με τη βάση δεδομένων EMBL expression Atlas, η κυτταρική σειρά A375 εκφράζει 72 TPM (transcripts per kilobase million) για την ERAP1 και 2 TPM για την ERAP2. Τα δεδομένα αυτά έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western καθώς φαίνεται ότι η έκφραση της ERAP2 σε πρωτεϊνικό επίπεδο είναι τουλάχιστον 10 φορές χαμηλότερη (Εικόνα 10, Σχήμα 24). Λαμβάνοντας υπόψη τα δεδομένα αυτά μπορούμε να θεωρήσουμε ότι η δραστικότητα αμινοπεπτιδάσης στο ενδοπλασματικό δίκτυο προέρχεται κυρίως από την ERAP1 στη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά.

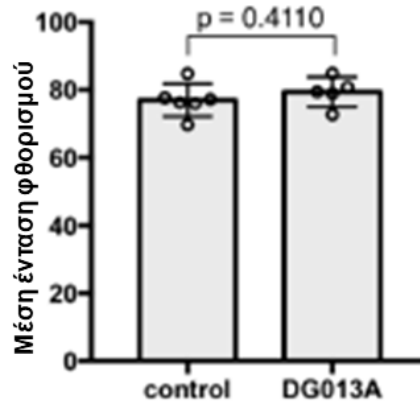




Σχήμα 23: Επίπεδα έκφρασης mRNA των ERAP1 και ERAP2 σε κύτταρα A375 (A). Επίπεδα έκφρασης πρωτεϊνών των ERAP1 και ERAP2 σε κύτταρα A375 (B).

#### 4.2.4 Επίδραση του αναστολέα DG013A στην έκφραση των MHC I

Στη συνέχεια θέλαμε να εξετάσουμε αν η επεξεργασία των κυττάρων A375 με τον αναστολέα της ERAP1 DG013A, επιφέρει μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης των μορίων ιστοσυμβατότητας που παρουσιάζονται στην κυτταρική μεμβράνη. Στο θρεπτικό υλικό κυττάρων A375, προστέθηκε ο αναστολέας DG013A σε συγκέντρωση 1  $\mu$ M για 6 ημέρες, συνθήκες κάτω από τις οποίες θα πραγματοποιηθεί και το πείραμα ανάλυσης ανοσοπεπτιδιώματος. Περίπου  $5 \times 10^5$  κύτταρα επώαστηκαν με το αντίσωμα W6/32, το οποίο αναγνωρίζει όλα τα κλασικά μόρια ιστοσυμβατότητας τάξης I όταν αυτά είναι σωστά αναδιπλωμένα, συζευγμένο με τη φθορίζουσα χρωστική FITC. Τα επίπεδα έκφρασης των MHC I στην επιφάνεια των κυττάρων αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής. Όπως φαίνεται στο γράφημα του Σχήματος 25, η παρουσία του αναστολέα στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας, δεν είναι ικανή να επηρεάσει την συνολική παρουσία των μορίων ιστοσυμβατότητας στην επιφάνεια των κυττάρων. Αν και σε παλαιότερες μελέτες έχει προταθεί ότι η μείωση της έκφρασης της ERAP1 επηρεάζει τα επίπεδα των MHC I στην επιφάνεια των κυττάρων στο συγκεκριμένο πειραματικό μοντέλο η αναστολή της ERAP1 δεν εμφανίζει αυτή τη συμπεριφορά. Το συγκεκριμένο αποτέλεσμα έχει παρατηρηθεί και σε άλλες καρκινικές κυτταρικές σειρές όπου μετά από γενετική αποσιώπηση της ERAP1 με shRNA, τα επίπεδα των MHC παρέμεναν αμετάβλητα [123].

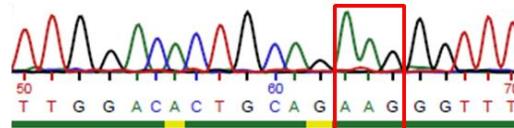


Σχήμα 24: Επίπεδα έκφρασης των ΜΗCI στην επιφάνεια των κυττάρων A375 μετά από επίδραση με τον αναστολέα DG013A.

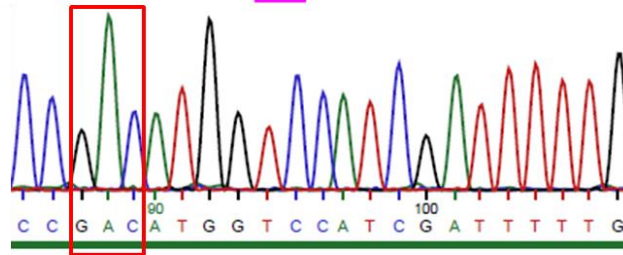
#### 4.2.5 Προσδιορισμός γενετικών πολυμορφισμών στο γονίδιο της *ERAP1*

Η αμινοπεπτιδάση ERAP1 φέρει στο μόριο της πολυμορφικές θέσεις η φύση των οποίων επηρεάζει τη δραστηριότητά της. Για να εκτιμήσουμε την ενεργότητα του ενζύμου που εκφράζει η κυτταρική σειρά A375 προσδιορίσαμε την αλληλουχία των εξωνίων 11, 12 και 15. Στα εξώνια αυτά εμπεριέχονται τέσσερις πολυμορφισμοί μονού νουκλεοτιδίου οι οποίοι έχει δειχθεί ότι εμφανίζουν λειτουργικές διαφορές και έχουν συσχετισθεί με παθολογικές καταστάσεις [95, 179, 197]. Τα αμινοξέα στις πολυμορφικές θέσεις της ERAP1 όπως αυτά προσδιορίστηκαν από την αλληλούχηση των εξωνίων είναι λυσίνη στη θέση 528 (528K), ασπαρτικό οξύ στην 575 (575D), αργινίνη στην 725 (725R) και γλουταμίνη στη θέση 730 (730Q). Τα αποτελέσματα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι τα κύτταρα A375 εκφράζουν ένα έντονα δραστικό αλληλόμορφο του ενζύμου καθώς η παρουσία λυσίνης στη θέση 528 και γλουταμίνης στην 730 έχουν συνδεθεί με εμφάνιση αυξημένης καταλυτικής ενεργότητας από την ERAP1 [94, 95, 198].

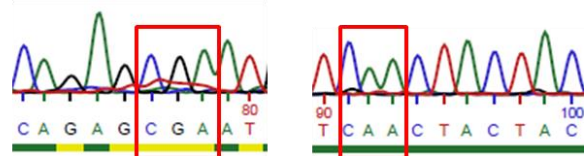
```
> exon11_FW
CMMAGGCMG50MTTGGMTMGGAGGGGTGGATGTGAAAACCATGATGAACACTTGGACACTGCAG
AAG60GGTTTTCCCTAATAACCATCACAGTGAGGGGGAGGAATGTACACATGAAGCAAGAGCA
```



> exon12\_FW  
 GAAAATGAATAMCAATGAACAATCCACCTCTCCTTTATTTTAGGTACCTGTGGCATGTTC  
 CATTGACATTCATCACCAGCAAATCCGACATGGTCCATCGATTTTTGCTAAAAACAAAAA

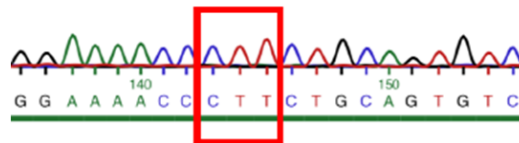


> exon15\_FW  
 ARCAWYGACTTCTMTMGGCTGCTAAGGGACCTCATTGATAAGCAGACATGGACAGACGAG  
 GGCTCAGTCTCAGAGCGAATGCTGCGGAGTCAACTACTACTCCTCGCCTGTGTGCACAAC

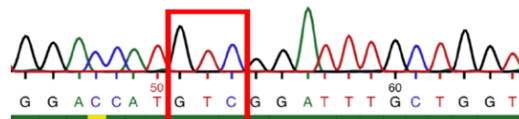


Εικόνα 11: Χρωματογραφήματα αλληλούχησης των εξωνίων 11, 12 και 15 του γονιδίου της ERAP1 με εκκινήτες με κατεύθυνση 5'-3'.

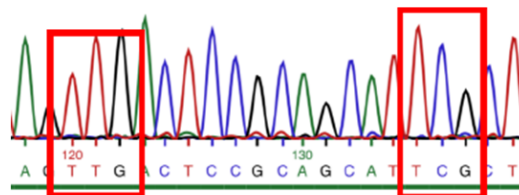
> exon11\_REV  
 AGACSGARTTACCTAGACAMAAACAAATTTTACTCTAGGAGCATTACCCAGTGTCCGGGGCG  
 CCGTCAGAGCCCTTCATGTAGTGCTCTTGCTTCATGTGTACATTCCTCCCCCTCACTGTGAT  
 GGTTATTAGGGGAAAACCCTTCTGCAGTGTCCAAGTGTTCATCATGGTTTTACATCCACCC



> exon12\_REV  
 AAATCTCAATAATTACCTGTTTTTGTTTTTTAGCAAAAATCGATGGACCATGTCGGATTGG



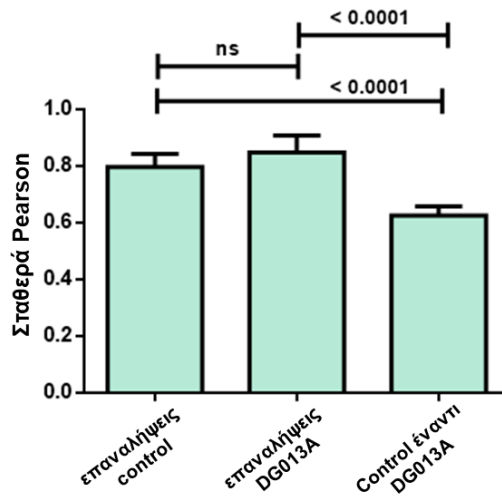
> exon14\_REV  
 AWATGGTWTTTAGTAAGGACTGACCTCAAGTTTCCATTGGATTCCCTTCCACTTTCTGAAATA  
 GCCTTCTGCCCTCTGTACGCACGGCTGATAGTTGTGCACACAGGCGAGGAGTAGTAGTTGAC  
 TCCGCAGCATTCGCTCTGAGACTGAGCCCTCGTCTGTCCATGTCTGCTTATCAATGAGGTCC



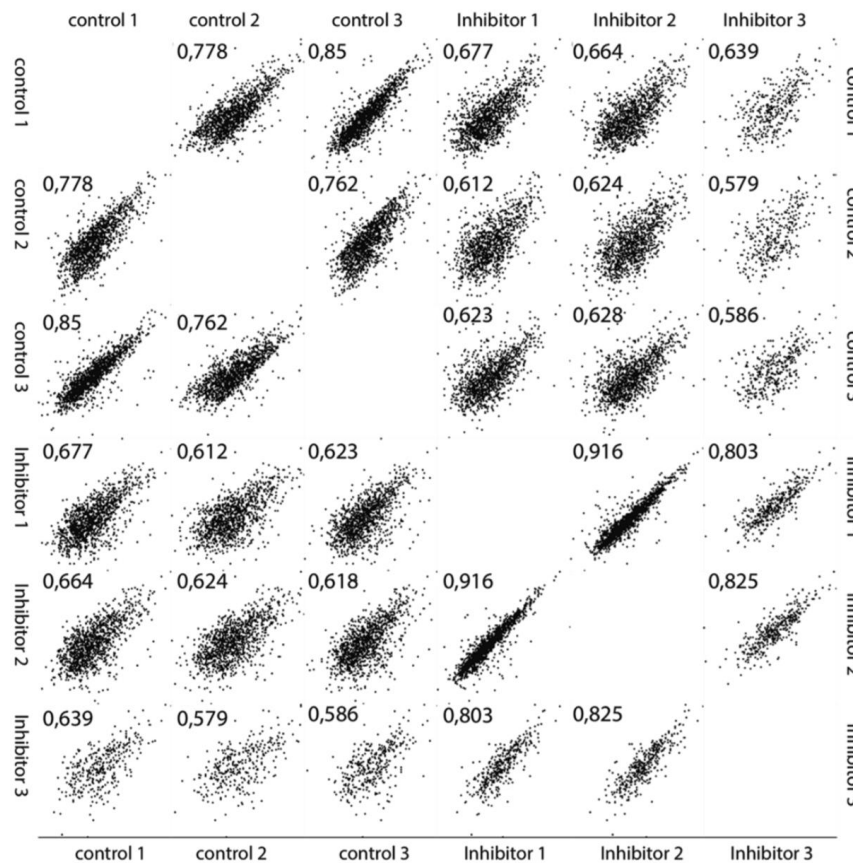
Εικόνα 12: Χρωματογραφήματα αλληλούχησης των εξωνίων 11, 12 και 15 του γονιδίου της ERAP1 με εκκινητές με κατεύθυνση 3'-5'.

### 4.3 Ανάλυση του ανοσοπεπτιδιώματος κυττάρων A375

Βάσει του χαρακτηρισμού της κυτταρικής σειράς A375 που προηγήθηκε, φαίνεται ότι η συγκεκριμένη σειρά μελανώματος αποτελεί ένα καλό μοντέλο για τη μελέτη της επίδρασης της χημικής αναστολής της ERAP1 στο ανοσοπεπτιδίωμα των κυττάρων. Τα κύτταρα μελανώματος A375 καλλιεργήθηκαν σε μεγάλη κλίμακα παρουσία του αναστολέα DG013A ενώ πραγματοποιήθηκε και πείραμα ελέγχου. Για να αυξήσουμε τις πιθανότητες πληρέστερης αναστολής του ενζύμου, καλλιεργήσαμε τα κύτταρα για 6 ημέρες παρουσία αναστολέα πριν τη συλλογή τους. Γνωρίζοντας ότι το  $EC_{50}$  του DG013A είναι περίπου 700 nM επιδράσαμε στα κύτταρα με 1  $\mu$ M αναστολέα, συγκέντρωση η οποία αναμένεται να αναστείλει ένα σημαντικό ποσοστό του ενζύμου. Τα σύμπλοκα MHC-πεπτιδίου απομονώθηκαν από λύμα κυττάρων A375 με χρωματογραφία ανοσοσυγγένειας χρησιμοποιώντας το αντίσωμα W6/32 και οι αλληλουχίες τους προσδιορίστηκαν με υγρή χρωματογραφία και φασματομετρία μάζας σε σειρά χρησιμοποιώντας το λογισμικό Maxquant, ενώ για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν τρεις βιολογικές επαναλήψεις. Η φασματομετρική ανάλυση του ανοσοπεπτιδιώματος πραγματοποιήθηκε από τους Δρ. Arie Admon και Δρ. Eilon Barnea στο πανεπιστήμιο Technion στο Ισραήλ. Η επαναληψιμότητα μεταξύ των όμοιων δειγμάτων ήταν υψηλή καθώς το 90% των πεπτιδίων ταυτοποιήθηκαν σε τουλάχιστον δύο από τις τρεις επαναλήψεις. Συγκρίνοντας την τιμή της έντασης που προσδιορίστηκε για κάθε πεπτίδιο, προέκυψε μεγαλύτερη συσχέτιση μεταξύ των βιολογικών επαναλήψεων σε σχέση με τη σύγκριση δειγμάτων ελέγχου με δείγματα αναστολέα. Ως δείκτης συσχέτισης χρησιμοποιήθηκε η σταθερά Pearson η οποία προσδιορίστηκε με τη βοήθεια του λογισμικού Perseus 1.6.0.7. Η σταθερά Pearson λαμβάνει τιμές από 0 έως 1 και προσδιορίζει το βαθμό συσχέτισης δύο μεταβλητών. Τιμή της σταθεράς Pearson ίση με 1 σημαίνει ότι οι δύο μεταβλητές παρουσιάζουν τέλεια θετική συσχέτιση μεταξύ τους ενώ όταν λαμβάνει τιμή 0 οι δύο μεταβλητές δεν εμφανίζουν καμία συσχέτιση. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 26, οι βιολογικές επαναλήψεις των ίδιων συνθηκών εμφανίζουν μεγαλύτερο βαθμό συσχέτισης μεταξύ τους σε σχέση με τη σύγκριση πειραμάτων διαφορετικών συνθηκών. Αυτή η στατιστικώς σημαντική διαφορά στις τιμές της σταθεράς Pearson σημαίνει ότι τα πεπτίδια στις δύο συνθήκες εμφανίζουν διαφορές είτε σε επίπεδο αλληλουχίας είτε σε επίπεδο έντασης.

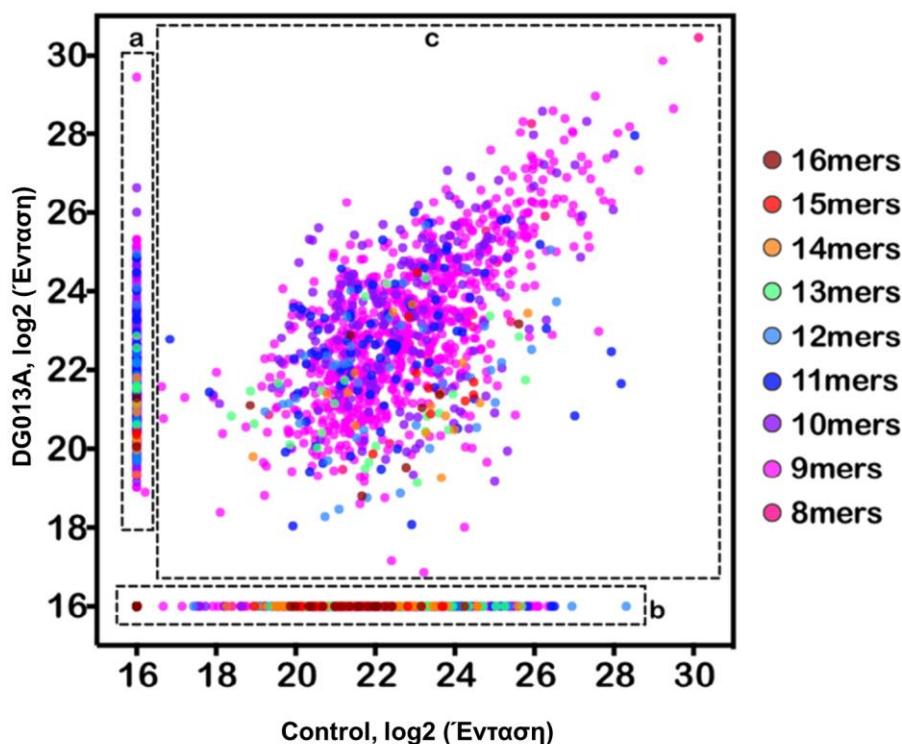


Σχήμα 25: Σύγκριση σταθερών συσχέτισης Pearson μεταξύ των επαναλήψεων των πειραμάτων ελέγχου, αναστολέα και μεταξύ των διαφορετικών συνθηκών.



Σχήμα 26: Διαγράμματα διασποράς των εντάσεων των πεπτιδίων κάθε δείγματος.

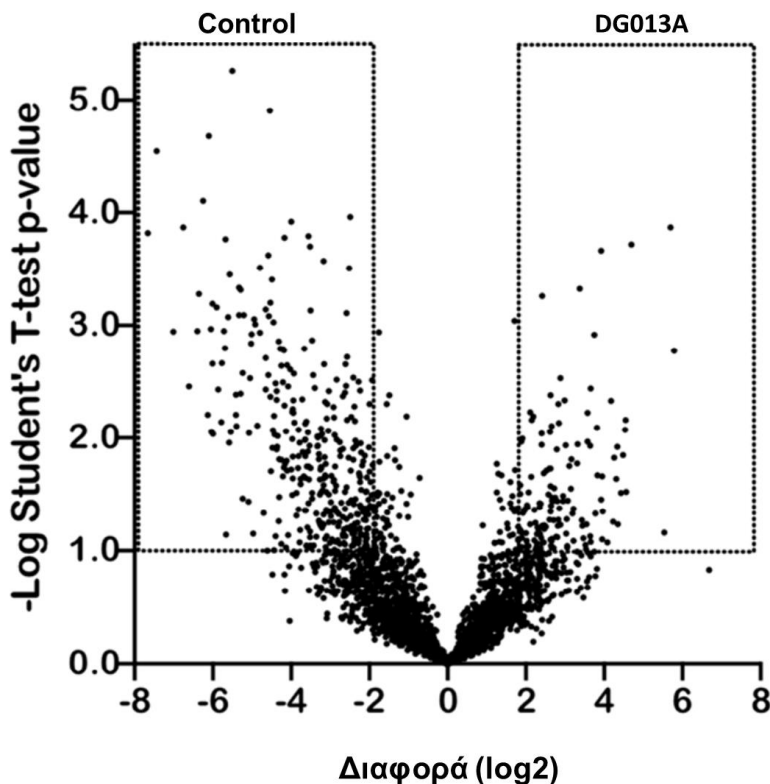
Στη συνέχεια, συγκρίναμε τις αλληλουχίες των πεπτιδίων που βρέθηκαν στις δύο συνθήκες και διαπιστώσαμε ότι τόσο τα δείγματα ελέγχου όσο και του αναστολέα περιέχουν πεπτίδια μοναδικά για την κάθε συνθήκη. Στο Σχήμα 28 φαίνεται η διασπορά των εντάσεων όλων των πεπτιδίων όπου τα μοναδικά πεπτίδια για τα δείγματα αναστολέα και ελέγχου τοποθετούνται στις περιοχές a και b αντίστοιχα. Στην περιοχή c του γραφήματος φαίνονται τα πεπτίδια που ταυτοποιήθηκαν και στις δύο συνθήκες τα οποία όμως φαίνεται να παρουσιάζουν διαφορές στις εντάσεις τους παρουσία αναστολέα καθώς αποκλίνουν από τη γραμμικότητα.



Σχήμα 27: Διάγραμμα διασποράς των εντάσεων των πεπτιδίων που προσδιορίστηκαν σε κάθε συνθήκη.

Προκειμένου να διερευνήσουμε αυτό το φαινόμενο και να προσδιορίσουμε ποια πεπτίδια εμφανίζουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στην έκφραση τους κατόπιν προσθήκης του αναστολέα, κατασκευάσαμε με τη βοήθεια του λογισμικού Perseus διάγραμμα τύπου volcano. Στα διαγράμματα αυτού του τύπου (Σχήμα 29) στον κάθετο άξονα περιλαμβάνονται οι τιμές  $p$  όπως αυτές προκύπτουν από τη στατιστική ανάλυση student's T-test των τιμών της έντασης των πεπτιδίων και στον οριζόντιο άξονα η διαφορά της έντασης σε κλίμακα  $\log_2$ . Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα αυτής της ανάλυσης καθορίσαμε ως πεπτίδια ελέγχου και πεπτίδια ειδικά για το

δείγμα του αναστολέα, πεπτίδια που είτε εμφανίζονται αποκλειστικά, είτε που η έκφρασή τους τετραπλασιάζεται στην κάθε συνθήκη. Πεπτίδια που βρέθηκαν και στις δύο συνθήκες και εμφανίζουν μικρότερη διαφορά στις εντάσεις ανίχνευσης θεωρούνται κοινά.

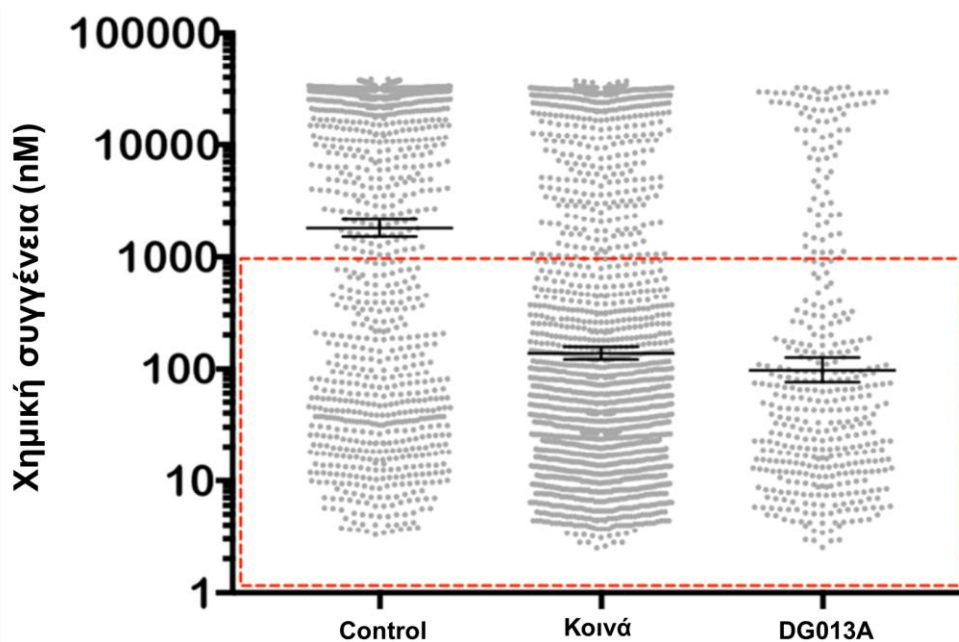


Σχήμα 28: Διάγραμμα τύπου volcano το οποίο εμφανίζει τα στατιστικώς σημαντικά πεπτίδια μεταξύ των τριών επαναλήψεων. Τα στατιστικώς σημαντικά πεπτίδια τα οποία έχουν 4 φορές διαφορά στην ένταση τους χαρακτηρίζονται ως ειδικά για κάθε συνθήκη.

Μετά από αυτόν το διαχωρισμό, 1589 πεπτίδια βρέθηκαν να είναι κοινά, 1198 είναι ειδικά για το δείγμα ελέγχου και 417 εκφράζονται παρουσία του αναστολέα. Καθώς υπάρχει συσχέτιση της ανοσογονικότητας των αντιγονικών επιτόπων με τη χημική συγγένεια για το HLA στο οποίο δεσμεύονται, προσδιορίστηκαν για κάθε πεπτίδιο τιμές χημικής συγγένειας για κάθε αλληλόμορφο HLA που εκφράζουν τα κύτταρα A375. Οι θεωρητικές τιμές χημικής συγγένειας υπολογίστηκαν με χρήση της πλατφόρμας NetMHCcons 1.1 [199]. Η πλατφόρμα αυτή συνδυάζει στοιχεία από τρεις μεθόδους οι οποίες προβλέπουν τη συνάφεια πρόσδεσης πεπτιδίων στα MHC. Η πρώτη μέθοδος είναι η πλατφόρμα NetMHC η οποία έχει τη δυνατότητα να προβλέπει τιμές συγγένειας πρόσδεσης μόνο για τα αλληλόμορφα των MHC για τα οποία υπάρχουν πολλά πειραματικά



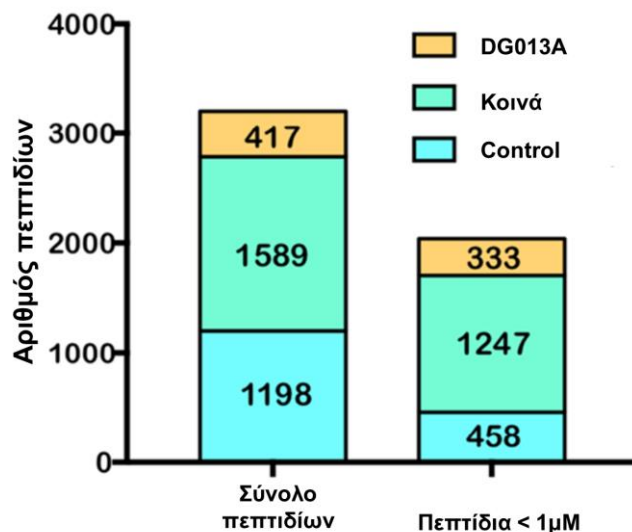
δεδομένα. Αντίθετα οι άλλες δύο μέθοδοι (NetMHCpan και PickPocket) μπορούν να υπολογίζουν τιμές συγγένειας και για MHC για τα οποία υπάρχουν περιορισμένα ή και καθόλου πειραματικά δεδομένα. Η χρήση της πλατφόρμας NetMHCcons επιτρέπει την ακριβέστερη πρόβλεψη για οποιοδήποτε μόριο MHC [199]. Από τις έξι τιμές που αντιστοιχούν σε κάθε πεπτίδιο, επιλέχθηκε η μικρότερη καθώς θεωρούμε ότι τα πεπτίδια θα προσδένονται στα μόρια ιστοσυμβατότητας για τα οποία εμφανίζουν τη μεγαλύτερη συγγένεια. Παρατηρώντας την κατανομή της προβλεπόμενης χημικής συγγένειας των πεπτιδίων (Σχήμα 30) βλέπουμε ότι ο αναστολέας επηρεάζει τη συνολική ικανότητα πρόσδεσης των πεπτιδίων καθώς ο γεωμετρικός μέσος των πεπτιδίων που εμφανίζονται μετά από επίδραση με DG013A είναι 97 nM, των κοινών 138 nM, ενώ των πεπτιδίων ελέγχου έχει τιμή 1808 nM. Φαίνεται λοιπόν ότι μια ομάδα πεπτιδίων τα οποία ταυτοποιήθηκαν στα δείγματα ελέγχου και προβλέπεται να έχουν χαμηλή χημική συγγένεια για τα MHC I, μετά από επίδραση με τον αναστολέα αντικαθίστανται από βελτιστοποιημένα πεπτίδια τα οποία πιθανώς να καταστρέφονται παρουσία δραστικής ERAP1.



Σχήμα 29: Προβλεπόμενες τιμές χημικής συγγένειας των πεπτιδίων όπως αυτές υπολογίστηκαν από το λογισμικό NetMHCcons 1.1. Στο κόκκινο πλαίσιο φαίνονται τα πεπτίδια τα οποία αναμένεται να προσδένονται στα MHC I με τιμή μικρότερη του 1μM.



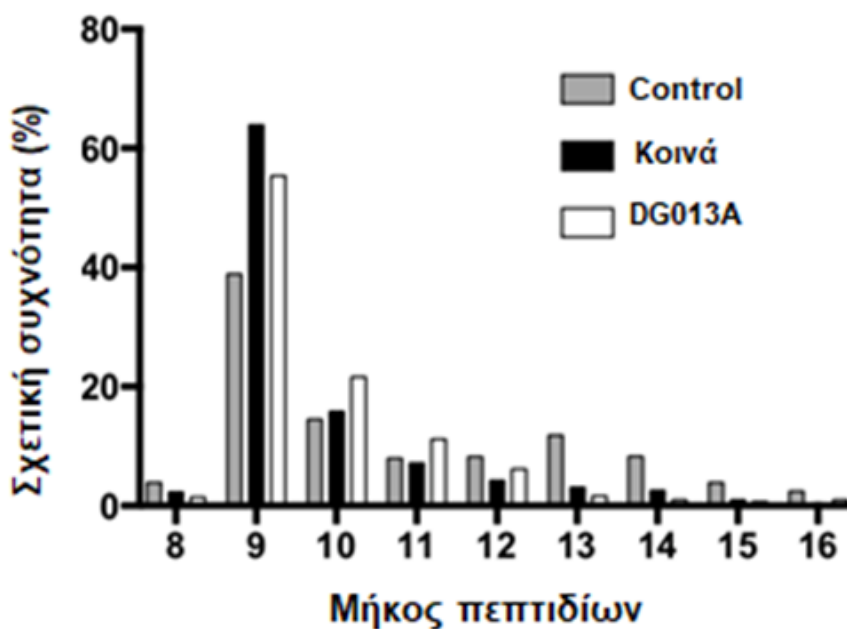
Βάσει προηγούμενων μελετών, το 90% των επιτόπων έχουν τιμές χημικής συγγένειας μικρότερες του 1  $\mu\text{M}$  (Σχήμα 30, κόκκινο πλαίσιο) και έτσι χρησιμοποιήσαμε τη συγκεκριμένη τιμή ως φίλτρο προκειμένου να διαχωρίσουμε τα πεπτίδια τα οποία έχουν αυξημένες πιθανότητες να προσδένονται στα MHC I και να εμφανίζουν ανοσογονικότητα [200]. Με την προσθήκη αυτών των περιορισμών προέκυψαν συνολικά 2038 πεπτίδια από τα οποία 1247 είναι κοινά, 458 ειδικά για τα δείγματα ελέγχου και 333 ειδικά για τα δείγματα του αναστολέα.



Σχήμα 30: Αριθμός των αντιγονικών πεπτιδίων που αντιστοιχούν στην κάθε συνθήκη.

Χρησιμοποιώντας τη βάση δεδομένων της Cancer Cell Line Encyclopedia διερευνήσαμε την ύπαρξη πεπτιδίων τα οποία φέρουν στην αλληλουχία του γνωστές κωδικοποιούσες μεταλλάξεις οι οποίες σχετίζονται με τον καρκίνο [201]. Η αντιπαράθεση των δεδομένων από τον φασματογράφο μάζας με τη βάση δεδομένων πραγματοποιήθηκε από τον Δρ. Αθανάσιο Παπακυριακού. Από τις 3204 διαφορετικές πεπτιδικές αλληλουχίες που ανιχνεύτηκαν, μόνο μία φέρει γνωστή κωδικοποιούσα μετάλλαξη για τα κύτταρα A375 η οποία αντιστοιχεί στον αντιγονικό επίτοπο της ιστόνης 3H2A GLLPNIQAV. Η συγκεκριμένη ιστόνη στα A375 φέρει τη σημειακή μετάλλαξη V108L που αντιστοιχεί στο δεύτερο αμινοξύ του πεπτιδίου. Το συγκεκριμένο νεοαντιγόνο προβλέπεται να αποτελεί ισχυρό προσδέτη του HLA-A02:01 καθώς η τιμή συγγένειας υπολογίστηκε στα 8.9 nM για το αλληλόμορφο αυτό. Το μοναδικό αυτό νεοαντιγόνο εντοπίστηκε και στις δύο συνθήκες ανεξαρτήτως της παρουσίας του αναστολέα, συνεπώς η παραγωγή του από την πρόδρομη αλληλουχία δεν απαιτεί κατάλυση από την ERAP1.

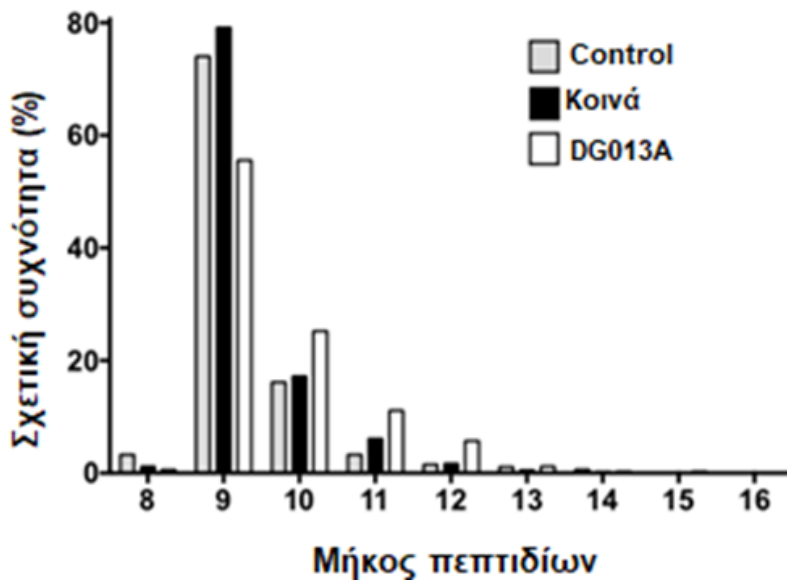
Ένα από τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά των πεπτιδίων προκειμένου να προσδεθούν στα MHCΙ είναι το μήκος τους. Οι αντιγονικοί επίτοποι των MHCΙ αποτελούνται ως επί το πλείστο από πεπτίδια 8-11 αμινοξέων, ενώ βέλτιστο μήκος πρόσδεσης είναι τα 9 αμινοξέα. Αυτό το χαρακτηριστικό έχει άμεση σύνδεση με τη βιολογική δράση της ERAP1, η οποία εμφανίζει σημαντικά μειωμένη δραστηριότητα για 9μερή υποστρώματα. Λόγω αυτής της ιδιότητας, θέλαμε να διαπιστώσουμε αν η αναστολή της ERAP1 επηρεάζει το μήκος των επιτόπων τα οποία προσδέονται στα MHC. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 32, και στις τρεις ομάδες πεπτιδίων η πλειοψηφία των επιτόπων έχει μήκος 9 αμινοξέα το οποίο είναι αναμενόμενο βάσει της προτίμησης των MHCΙ. Συγκρίνοντας όλα τα πεπτίδια τα οποία ταυτοποιήθηκαν βλέπουμε ότι εμφανίζονται υψηλότερα ποσοστά 9μερών, 10μερών και 11μερών πεπτιδίων παρουσία DG013A σε σχέση με τα πεπτίδια ελέγχου ενώ παρατηρούμε ότι με την προσθήκη του αναστολέα εξαφανίζονται πολλά μεγαλύτερα πεπτίδια. Τα πεπτίδια αυτά ανήκουν στην ομάδα των πεπτιδίων τα οποία έχουν χαμηλή προβλεπόμενη συγγένεια για τα MHCΙ και παρουσία του αναστολέα αντικαθίστανται από βελτιστοποιημένα πεπτίδια.



Σχήμα 31: Κατανομή μήκους των πεπτιδίων των τριών συνθηκών.

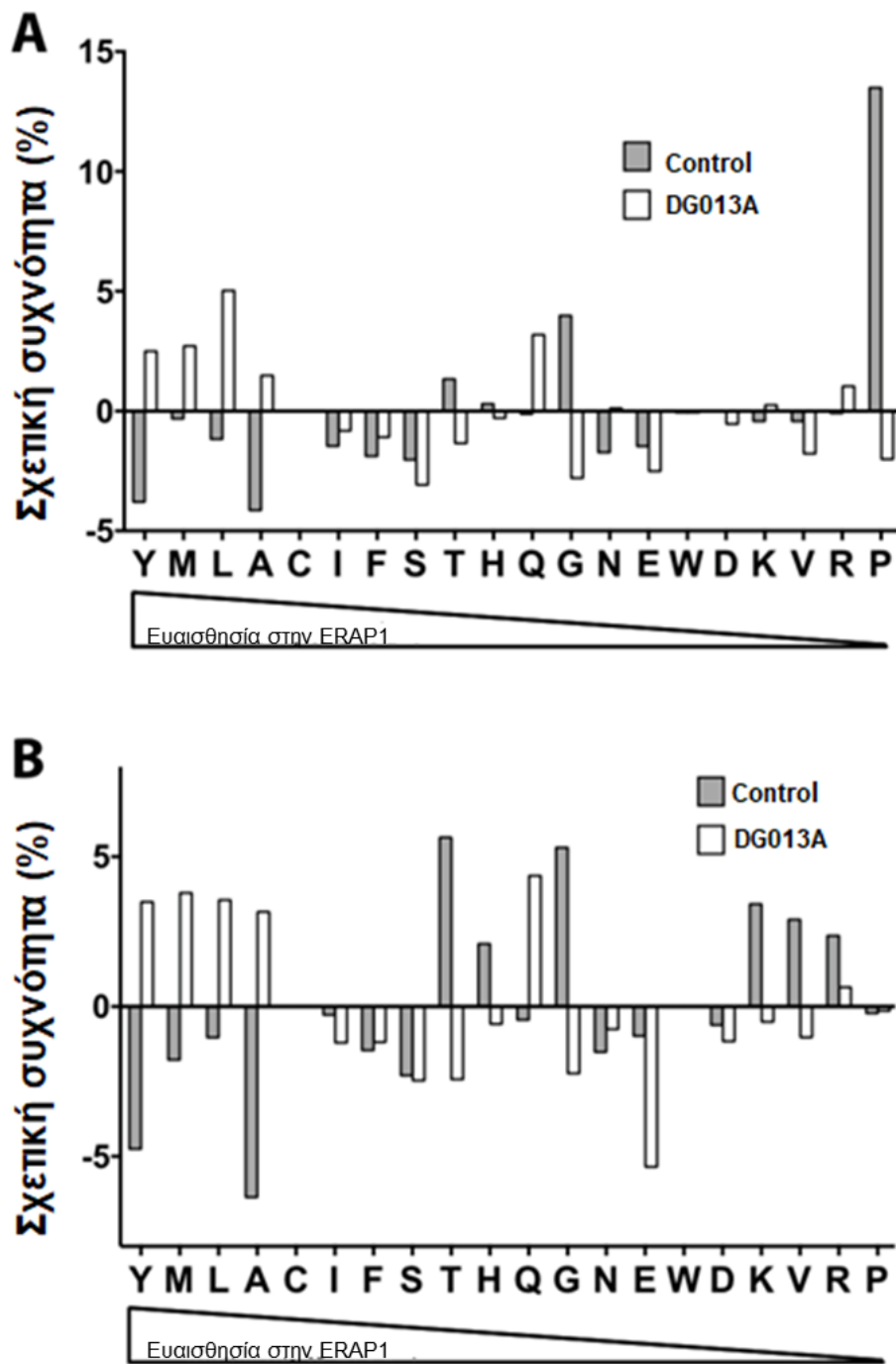
Η ίδια ανάλυση πραγματοποιήθηκε και για τα πεπτίδια τα οποία αναμένεται να προσδέονται ισχυρά στα MHCΙ και όπως φαίνεται στο Σχήμα 33, παρουσία αναστολέα το ποσοστό των 9μερών πεπτιδίων μειώνεται από 74% (πεπτίδια δείγματος ελέγχου) σε 55%. Αντίθετα αυξάνεται το

ποσοστό των μεγαλύτερων πεπτιδίων (10-12 αμινοξέα) κάτι το οποίο συνάδει με αναστολή της ERAP1. Τα κοινά πεπτίδια που ταυτοποιήθηκαν ακολουθούν κατανομή παρόμοια με τα πεπτίδια ελέγχου.



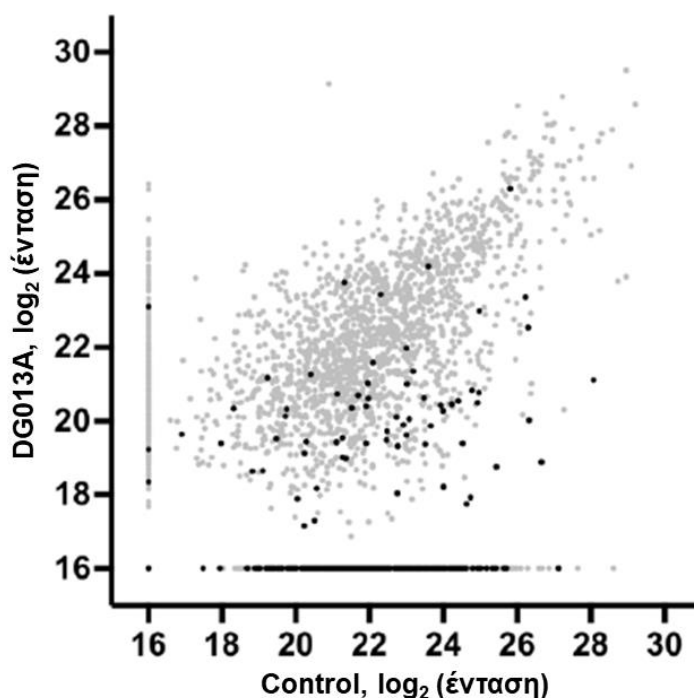
Σχήμα 32: Κατανομή μήκους των πεπτιδίων των τριών συνθηκών με χημική συγγένεια μικρότερη του 1μM.

Εκτός από το μήκος των πρόδρομων επιτόπων, η δραστηριότητα της ERAP1 επηρεάζεται και από τη φύση των αμινοξέων τόσο στο N-τελικό άκρο όσο και στην εσωτερική αλληλουχία των πεπτιδίων [87, 202]. Για το λόγο αυτό διερευνήσαμε την επίδραση του αναστολέα σε αυτά τα δύο χαρακτηριστικά. Τα αμινοξέα στο N-τελικό άκρο των πεπτιδίων που προσδιορίστηκαν, παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία καθώς ανιχνεύθηκαν σχεδόν όλα τα αμινοξέα, σε ποικίλα βέβαια ποσοστά, τα οποία κυμαίνονται από λιγότερο του 1 μέχρι και 22%. Παρά την ευρεία αυτή κατανομή, παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των πεπτιδίων ελέγχου και αναστολέα καθώς η σχετική συχνότητα πεπτιδίων που έχουν ως πρώτο αμινοξύ καλά υποστρώματα για την ERAP1, όπως η τυροσίνη, η μεθειονίνη, η λευκίνη και η αλανίνη, σε σχέση με τα κοινά, είναι αυξημένη παρουσία του DG013A. Αντίθετα, μείωση της συχνότητας εμφάνισης παρατηρείται σε αμινοξέα για τα οποία η αμινοπεπτιδάση ERAP1 παρουσιάζει χαμηλότερη δραστηριότητα (Σχήμα 34A). Το φαινόμενο αυτό καθίσταται πιο έντονο όταν πραγματοποιούμε την ίδια ανάλυση στα πεπτίδια με μεγάλη συγγένεια για τα MHCI (Σχήμα 34B).

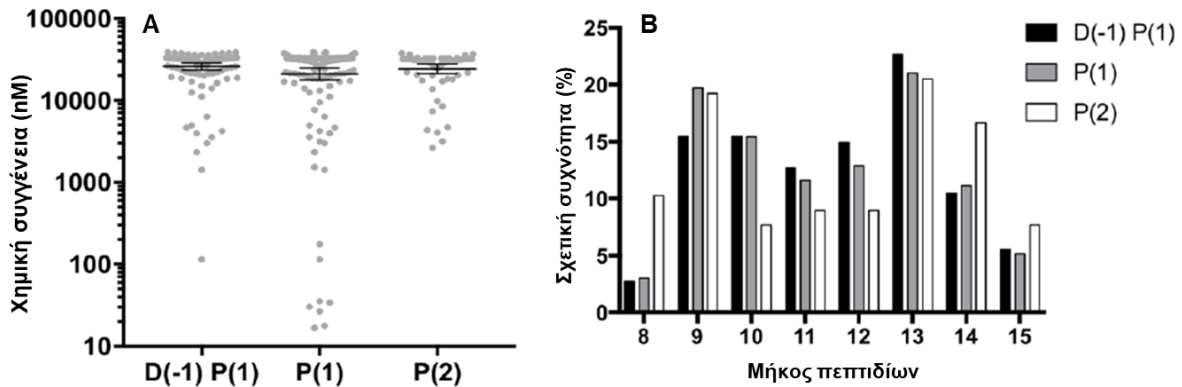


Σχήμα 33: Κατανομή 1<sup>ου</sup> αμινοξέος όλων των πεπτιδίων σε κάθε συνθήκη (A). Κατανομή 1<sup>ου</sup> αμινοξέος των πεπτιδίων με χημική συγγένεια <math><1\mu\text{M}</math> σε κάθε συνθήκη (B).

Μια ακόμα σημαντική διαφορά μεταξύ των πεπτιδίων ελέγχου και αυτών που παράγονται παρουσία αναστολέα, είναι η απώλεια των πεπτιδίων τα οποία φέρουν προλίνη στο N-τελικό άκρο. Αυτά τα πεπτίδια έχουν υψηλές προβλεπόμενες τιμές χημικής συγγένειας και ως εκ τούτου δεν εμφανίζονται στην κατανομή των ισχυρά προσδεδμένων πεπτιδίων. Καθώς η αμινοπεπτιδάση ERAP1 δεν μπορεί να καταλύσει την υδρόλυση του πεπτιδικού δεσμού όταν το πεπτίδιο περιέχει προλίνη στις θέσεις 1 και 2 διερευνήσαμε και την παρουσία πεπτιδίων με προλίνη στη θέση 2, καθώς και σε πόσα από τα πεπτίδια που περιέχουν προλίνη στη θέση 1 προηγείτο ασπαρτικό οξύ στην αλληλουχία της πρωτεΐνης. Ο δεσμός Asp-Pro μπορεί να υποστεί αυτοκατάλυση παρουσία όξινου περιβάλλοντος το οποίο υπάρχει κατά τη διεξαγωγή της απομόνωσης των πεπτιδίων, οπότε υπάρχει το ενδεχόμενο ένα τμήμα των πεπτιδίων αυτών να είχαν κανονικά στο N-τελικό τους άκρο ασπαρτικό οξύ [203]. Όπως παρατηρούμε στο Σχήμα 35, τα πεπτίδια που φέρουν αυτά τα χαρακτηριστικά βρίσκονται ως επί το πλείστον στα πεπτίδια ελέγχου, όλα προβλέπεται ότι έχουν μικρή χημική συγγένεια για τα MHC I και φαίνεται να ποικίλουν στον αριθμό των αμινοξέων που φέρουν (Σχήμα 36).



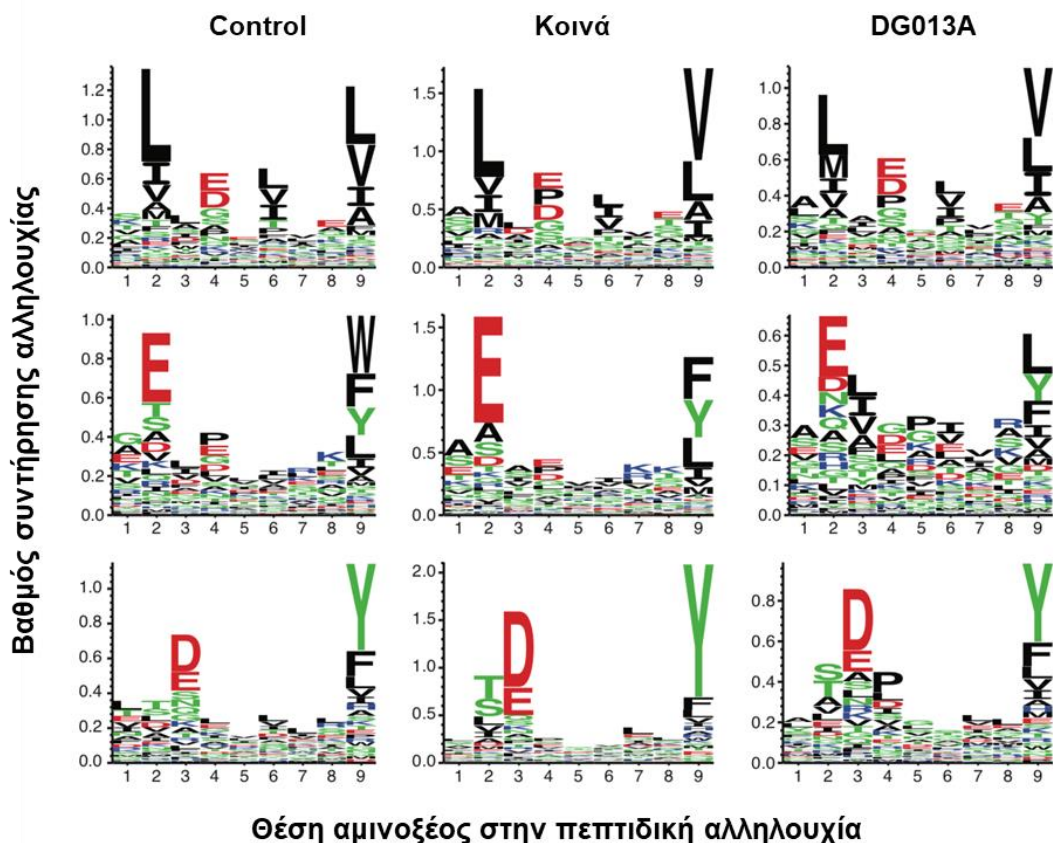
**Σχήμα 34:** Διάγραμμα διασποράς των εντάσεων των πεπτιδίων που προσδιορίστηκαν σε κάθε συνθήκη. Με μαύρες κουκίδες φαίνονται τα πεπτίδια που φέρουν προλίνη στο N-τελικό άκρο P(1), στη θέση 2 P(2) ή προλίνη στη θέση 1 και ασπαρτικό οξύ στη θέση -1 D(-1)P(1).



Σχήμα 35: Προβλεπόμενες τιμές χημικής συγγένειας (A) και κατανομή μήκους (B) για τα πεπτίδια P(1), P(2) και D(-1)P(1).

Παρουσία δραστικής ERAP1 τα πεπτίδια που φέρουν προλίνη σε αυτές τις θέσεις διαφεύγουν της αποικοδόμησης και εν δυνάμει συσσωρεύονται. Όταν η ERAP1 έχει ανασταλεί, βελτιστοποιημένα πεπτίδια για πρόσδεση στα MHC1 τα οποία πλέον δεν καταστρέφονται, παρουσιάζονται και αντικαθιστούν τα χαμηλής συγγένειας πεπτίδια που φέρουν αμινοξικά κατάλοιπα προλίνης. Για να διερευνήσουμε την πιθανότητα επίδρασης του αναστολέα στην εσωτερική αλληλουχία των πεπτιδίων που παρουσιάζονται, πραγματοποιήσαμε ανάλυση ομαδοποίησης κατά Gibbs για τα 9μερή πεπτίδια σε κάθε μια από τις συνθήκες. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη βοήθεια του αλγόριθμου GibbsCluster 2.0 ο οποίος έχει τη δυνατότητα να ομαδοποιεί και να στοιχίζει αλληλουχίες πεπτιδίων. Στο πρόγραμμα εισάγονται αλληλουχίες πεπτιδίων το οποίο παρέχει το βέλτιστο αριθμό ομάδων πεπτιδίων μαζί με τα μοτίβα των αλληλουχιών τους [204]. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται με τη βοήθεια του λογισμικού Seq2Logo [205]. Στο Σχήμα 37 φαίνονται οι κυριότερες ομάδες που προέκυψαν από την ανάλυση. Όπως είναι αναμενόμενο στις ομάδες που προκύπτουν, τα αμινοξέα αγκυροβόλησης για τα μόρια ιστοσυμβατότητας εμφανίζονται με μεγάλη συχνότητα στις αντίστοιχες θέσεις. Η πρώτη κύρια ομάδα περιέχει πεπτίδια που στη θέση 2 περιέχουν αρνητικά φορτισμένα και υδρόφιλα αμινοξέα και στη θέση 9 υδρόφοβα τα οποία θεωρητικά δεσμεύονται στα HLA-B44:03, HLA-B57:01 και HLA-C16:01. Η δεύτερη ομάδα που δημιουργήθηκε αποτελείται από πεπτίδια τα οποία έχουν και στη θέση 2 και στο C-τελικό άκρο υδρόφοβα αμινοξέα και αναμένεται να παρουσιάζονται από το HLA-A02:01 και δευτερευόντως από τα HLA-B57:01 και HLA-C16:01. Η τρίτη ομάδα αποτελείται από πεπτίδια με αρνητικά φορτισμένα αμινοξέα στη 3 θέση και υδρόφοβα στην 9, τα οποία πιθανώς να αντιστοιχούν σε πεπτίδια που δεσμεύονται στο HLA-A01:01. Το HLA-C06:02 αλληλεπιδρά με

πεπτιδία τα οποία έχουν υδρόφοβα αμινοξέα στο C-τελικό άκρο οπότε τα πεπτιδία που δεσμεύονται σε αυτό, ενδεχομένως εμπεριέχονται σε κάποια από τις άλλες ομάδες.

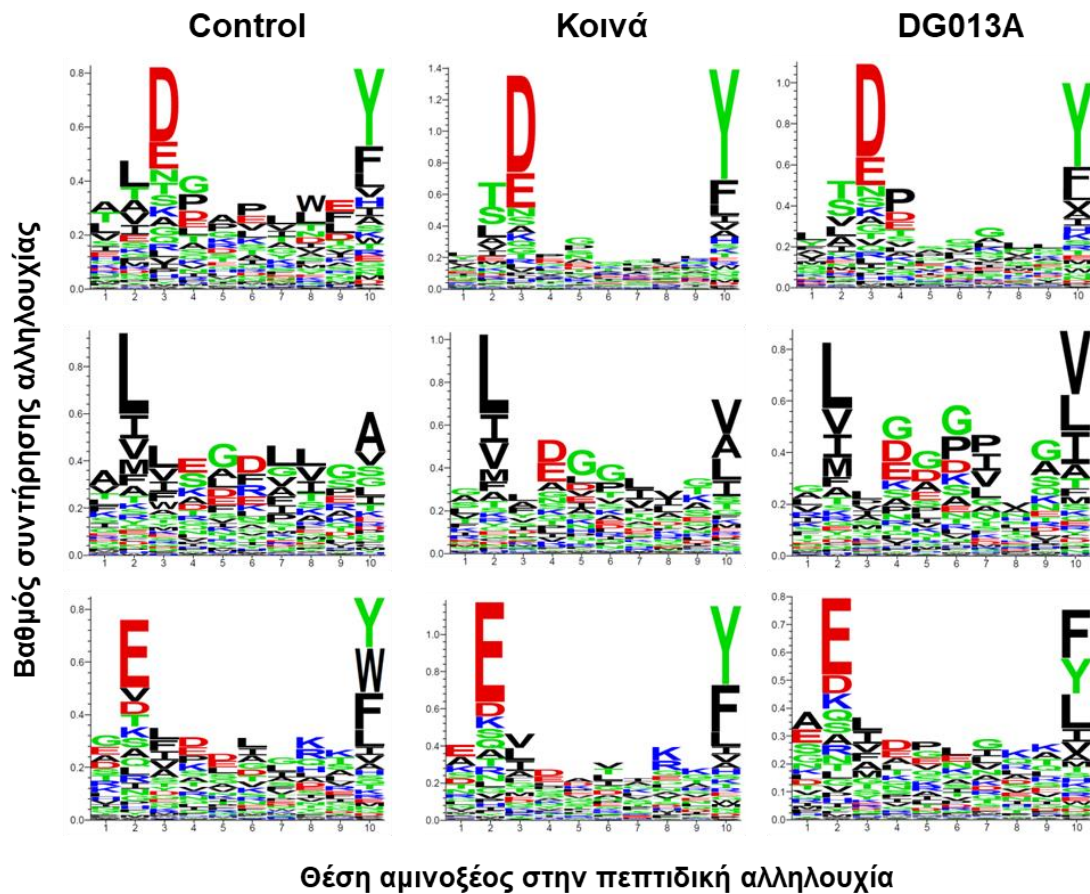


**Σχήμα 36:** Ομαδοποίηση κατά Gibbs των πεπτιδίων μήκους 9 αμινοξέων. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τα λογισμικά GibbsCluster-2.0 Server και Seq2logo.

Μεταξύ των τριών συνθηκών παρατηρήθηκαν μικρές μόνο διαφορές κυρίως με την προσθήκη αναστολέα όπου και εμφανίζεται μια αυξημένη ετερογένεια στην εσωτερική αλληλουχία των επιτόπων. Παρόλο που υπάρχει διαφορά στα πεπτιδία που παρουσιάζονται, τα μοτίβα πρόσδεσης στα MHC I δε μεταβάλλονται κάτι το οποίο σημαίνει ότι η τελική επιλογή των αντιγονικών πεπτιδίων γίνεται βάσει των προτιμήσεων των MHC I. Παρόμοια ανάλυση πραγματοποιήθηκε και για τα 10μερή τα οποία είναι αμέσως επόμενα σε πλήθος και έτσι μας επιτρέπει να πραγματοποιήσουμε τη συγκεκριμένη ομαδοποίηση. Και από την ανάλυση των πεπτιδίων με 10 αμινοξέα προέκυψαν οι ίδιες ομάδες (Σχήμα 38) πεπτιδίων με τα 9μερή, ενώ και σε αυτή την περίπτωση ο αναστολέας DG013A δεν φαίνεται να αλλάζει τα μοτίβα της αλληλουχίας των πεπτιδίων που παρουσιάζονται. Για τα πεπτιδία με 11 αμινοξέα στην αλληλουχία τους δεν



πραγματοποιήθηκε ομαδοποίηση κατά Gibbs λόγω περιορισμένου αριθμού πεπτιδίων στα δείγματα. Για την ανάλυση της εσωτερικής αλληλουχίας των 11μερών χρησιμοποιήσαμε το λογισμικό WebLogo (<https://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>) και τα αποτελέσματα της φαίνονται στο Σχήμα 39.

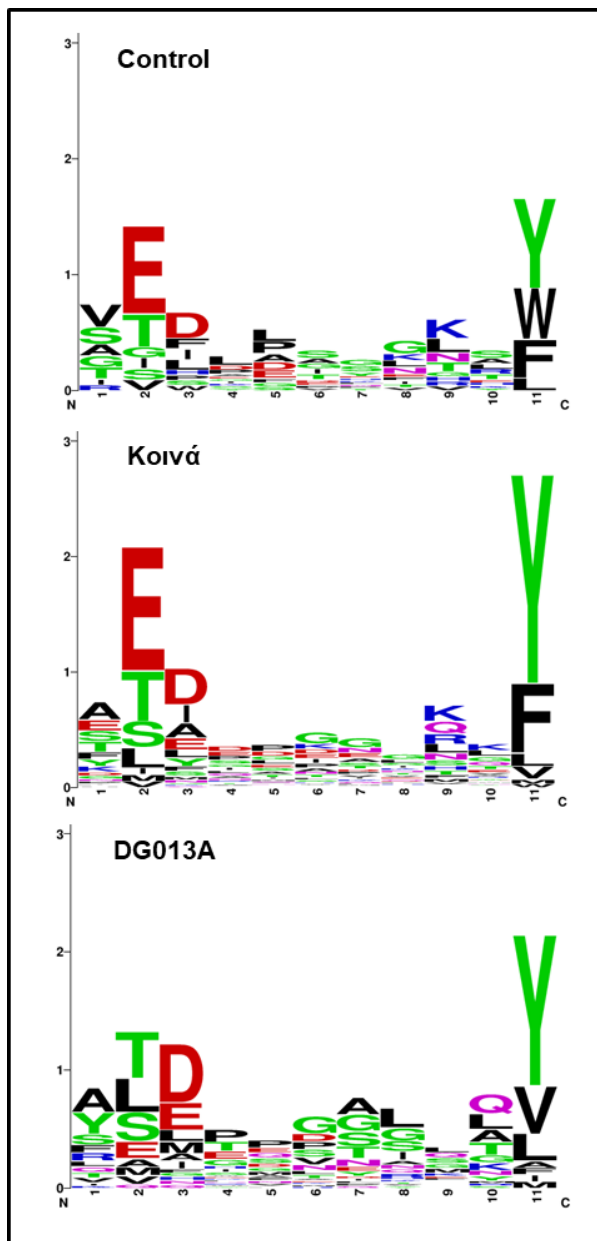


**Σχήμα 37:** Ομαδοποίηση κατά Gibbs των πεπτιδίων μήκους 10 αμινοξέων. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τα λογισμικά GibbsCluster-2.0 Server και Seq2logo.

Στα διαγράμματα αυτού του τύπου, το σχετικό μέγεθος των γραμμών μεταφράζεται στη συχνότητα εμφάνισης του αμινοξέος στην αλληλουχία του πεπτιδίου. Παρόλο που δεν κατέστη δυνατή η ομαδοποίηση των πεπτιδίων, τα αμινοξέα αγκυροβόλησης εμφανίζονται με μεγαλύτερη συχνότητα και στις τρεις ομάδες πεπτιδίων. Παρά το γεγονός ότι τα πεπτίδια με 10 και 11 αμινοξέα δεν έχουν το βέλτιστο μήκος για πρόσδεση, τα κατάλοιπα αγκυροβόλησης εμφανίζονται στις αναμενόμενες θέσεις κάτι το οποίο σημαίνει ότι τα πεπτίδια υιοθετούν διαμόρφωση η οποία σχηματίζει βρόχο στο εσωτερικό τους. Παρατηρώντας τα διαγράμματα Weblogo για τα 11μερή,

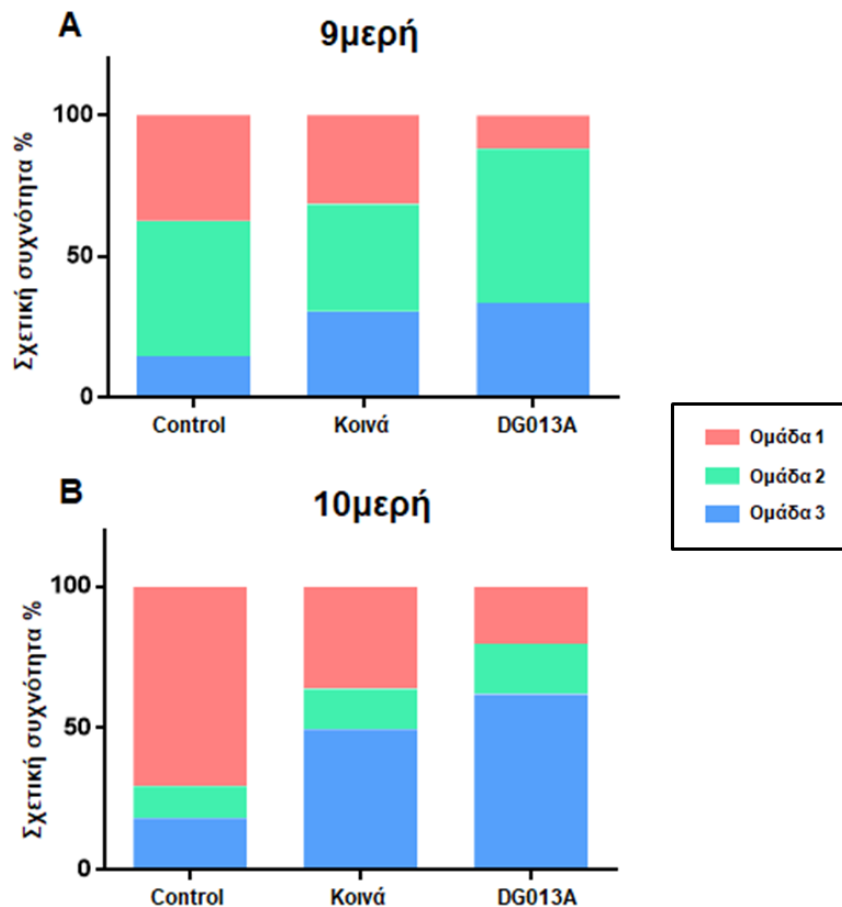


βλέπουμε ότι στο σύνολο των πεπτιδίων του αναστολέα μειώνεται σημαντικά η συχνότητα εμφάνισης του γλουταμινικού οξέος (E) από τη θέση 2 και της φαινυλαλανίνης (F) στο καρβοξυτελικό άκρο. Τα πεπτίδια που φέρουν αυτά τα αμινοξέα αναμένεται να προσδένονται στο HLA-B44:03 και η μειωμένη εμφάνισή τους στο δείγμα του αναστολέα οδηγεί στο συμπέρασμα ότι πιθανώς απαιτούν την καταλυτική δραστικότητα της ERAP1 για να παραχθούν.



Σχήμα 38: Διαγράμματα WebLogo για τα 11μερή πεπτίδια και στις τρεις συνθήκες.

Στη συνέχεια υπολογίστηκαν τα ποσοστά των πεπτιδίων που ανήκουν στην κάθε ομάδα για τα 9μερή και 10μερή. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 40, τα πεπτίδια τα οποία ανήκουν στην ομάδα 1, η οποία αποτελείται και από πεπτίδια τα οποία έχουν δηλαδή γλουταμινικό οξύ στη θέση 2, εμφανίζονται με μικρότερα ποσοστά παρουσία DG013A με το φαινόμενο να είναι ιδιαίτερα έντονο στα πεπτίδια με 10 αμινοξέα, μήκος το οποίο είναι βέλτιστο για το αλληλόμορφο HLA-B44:03 σύμφωνα με τη βάση δεδομένων IEDB (Immune Epitope Database). Τα πεπτίδια αυτά φαίνεται να αντικαθίστανται κυρίως από πεπτίδια που ανήκουν στην τρίτη ομάδα η οποία αποτελείται από επιτόπους του HLA-A01:01 και φαίνεται να εμφανίζουν ευαισθησία στην υδρόλυση από την ERAP1. Τα πεπτίδια της δεύτερης ομάδα δεν παρουσιάζουν ιδιαίτερες μεταβολές μεταξύ των δειγμάτων, ενώ όμως αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό πεπτιδίων στα 9μερή για όλα τα δείγματα, μειώνονται σημαντικά στα 10μερή.



Σχήμα 39: Κατανομή πεπτιδίων βάσει της ομαδοποίησης κατά Gibbs.

Φαίνεται λοιπόν, ότι παρόλο που η τελική επιλογή των επιτόπων που παρουσιάζονται βασίζεται στις προτιμήσεις των μορίων ιστοσυμβατότητας, ενδέχεται τα ξεχωριστά ανοσοπεπτιδιώματα για το κάθε αλληλόμορφο να εξαρτώνται σε διαφορετικό βαθμό από την καταλυτική δραστικότητα της ERAP1 και έτσι να μεταβάλλεται η σχετική συχνότητα εμφάνισής τους στην κυτταρική μεμβράνη.

## 5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Από τις πρώτες κιάλας μελέτες που ακολούθησαν την ανακάλυψη της αμινοπεπτιδάσης ERAP1 φάνηκε η σημαντική συμβολή της στην παραγωγή αντιγονικών πεπτιδίων τα οποία προσδένονται στα MHC I [206]. Η ERAP1 έχει τη δυνατότητα να επεξεργάζεται πρώιμα αντιγονικά πεπτίδια παράγοντας ώριμους αντιγονικούς επιτόπους κατάλληλους για πρόσδεση στα μόρια ιστοσυμβατότητας, αλλά και να καταστρέφει πιθανούς προσδέτες των MHC [65]. Η ομόλογη αμινοπεπτιδάση ERAP2 έχει συμπληρωματική δράση στην παραγωγή αντιγονικών πεπτιδίων αλλά μέχρι στιγμής θεωρείται ότι έχει δευτερεύοντα και συμπληρωματικό ρόλο στην αντιγονοπαρουσίαση [140, 145]. Η γενετική αποσιώπηση της ERAP1 επηρεάζει σημαντικά τη φύση των πεπτιδίων που παρουσιάζονται γεγονός που έχει αντίκτυπο στην ανοσοκυριαρχία των επιτόπων αλλά και στην απόκριση των κυτταροτοξικών Τ-λεμφοκυττάρων [72-74]. Επίσης, έχει προταθεί ότι η έκφραση της ERAP1 επηρεάζει όχι μόνο το ανοσοπεπτιδίωμα, αλλά και τα επίπεδα των μορίων ιστοσυμβατότητας τάξης I στην κυτταρική μεμβράνη χωρίς όμως να αποτελεί ένα επαναλαμβανόμενο φαινόμενο [123, 134, 136, 137]. Πράγματι, σε μελέτη αποσιώπησης της ERAP1 με shRNA σε καρκινικές κυτταρικές σειρές, τα επίπεδα έκφρασης των MHC I δεν παρουσίαζαν έντονες διαφορές ενώ σε κάποιες περιπτώσεις παρέμεναν πρακτικά αμετάβλητα [123]. Αυτά τα αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι η επίδραση της ERAP1 στα MHC I εξαρτάται από το εκάστοτε σύστημα μελέτης καθώς και από το είδος των αλληλομόρφων που εκφράζονται. Στο σύστημα που εξετάστηκε στην παρούσα μελέτη, η αναστολή της ERAP1 με ένα συνθετικό μόριο μικρού μοριακού βάρους, δε φάνηκε να επηρεάζει την παρουσία των MHC I που βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων. Αυτή η παρατήρηση οδηγεί στο συμπέρασμα ότι είτε η ERAP1 που εκφράζεται στα κύτταρα A375, δεν επηρεάζει το συνολικό αριθμό των πεπτιδίων στο ενδοπλασματικό δίκτυο, είτε ότι η ποσότητα των πεπτιδίων δεν αποτελεί καθοριστικό παράγοντα των επιπέδων των MHC που παρουσιάζονται στην κυτταρική μεμβράνη. Καθώς η μείωση των επιπέδων των μορίων ιστοσυμβατότητας τάξης I αποτελεί έναν κοινό μηχανισμό ανοσιακής διαφυγής των καρκινικών κυττάρων από τα CD8<sup>+</sup> Τ-λεμφοκύτταρα [173], το γεγονός ότι η αναστολή της ERAP1 δεν μειώνει την αντιγονοπαρουσίαση στο συγκεκριμένο σύστημα τουλάχιστον, καθιστά δυνατή τη χρήση αυτής της προσέγγισης προκειμένου να ενεργοποιηθούν τα CD8<sup>+</sup> Τ-λεμφοκύτταρα έναντι σε καρκινικά κύτταρα. Όπως έχει παρατηρηθεί και σε άλλες μελέτες ανάλυσης του ανοσοπεπτιδιώματος έτσι και εδώ δεν ανιχνεύθηκε πλήρης μεταβολή του ρεπερτορίου των αντιγονικών πεπτιδίων που παρουσιάζονται από τα MHC I. Συγκεκριμένα, όταν εξετάσαμε το σύνολο των πεπτιδίων που ταυτοποιήθηκαν, τα μισά πεπτίδια δε φάνηκε να

επηρεάζονται από την παρουσία του αναστολέα γεγονός που σημαίνει ότι τα συγκεκριμένα πεπτιδία δεν απαιτούν υδρόλυση από την ERAP1 και εισέρχονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο με αλληλουχία που τους επιτρέπει την πρόσδεση στα μόρια ιστοσυμβατότητας. Η αντικατάσταση των πεπτιδίων που παρουσιάζονται είναι ακόμα πιο περιορισμένη όταν εξετάζουμε τα πεπτιδία με υψηλή χημική συγγένεια για τα MHCI καθώς ένα ποσοστό 67% παραμένει αμετάβλητο. Παρόλ' αυτά, ακόμα και αυτές οι περιορισμένες μεταβολές στο ανοσοπεπτιδίωμα, ενδέχεται να μπορούν να προκαλούν ανοσολογικές αποκρίσεις. Έχει δειχθεί ότι αποσιώπηση της ERAP1 προκαλεί μεταβολές στην ανοσοκυριαρχία ιικών επιτόπων, επίσης οδηγεί στην παρουσίαση νέων επιτόπων οι οποίοι μπορούν και εκκινούν ανοσολογικές αποκρίσεις [72-74]. Παράλληλα μειώνεται έτσι και η πιθανότητα υπερενεργοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος που θα είχε σαν αποτέλεσμα αυτοάνοσων αποκρίσεων.

Η αμινοπεπτιδάση ERAP1 φέρεται να έχει διττό ρόλο στην παραγωγή του ανοσοπεπτιδίου καθώς έχει προταθεί ότι μπορεί να παράγει αλλά και να καταστρέφει αντιγονικούς επιτόπους [65]. Η αναστολή της ERAP1 στην κυτταρική σειρά μελανώματος A375 συνάδει με την καταστρεπτική δράση του ενζύμου αφού πολλά από τα καινούργια πεπτιδία που απομονώθηκαν έχουν υψηλή χημική συγγένεια για τα MHCI. Πράγματι, τα πεπτιδία που εισέρχονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, συναντούν ένα έντονα δραστικό ένζυμο καθώς τα αμινοξέα που φέρει το συγκεκριμένο αλληλόμορφο της ERAP1 στις πολυμορφικές θέσεις που εξετάστηκαν, έχουν συνδεθεί με αυξημένη ενζυμική δραστηριότητα. Η καταστροφή πολλών βέλτιστων πεπτιδίων ενδεχομένως να επιτρέπει την παρουσίαση πολλών μη βελτιστοποιημένων επιτόπων σύμφωνα πάντα με τις προβλεπόμενες τιμές από την πλατφόρμα NetMHC. Η δράση αυτή της ERAP1 έχει παρατηρηθεί στις περιπτώσεις των ανοσογονικών επιτόπων MART-1 και GSW11 [124, 125]. Συγκεκριμένα έχει διαπιστωθεί ότι η ERAP1 οδηγεί στην καταστροφή του ανοσογονικού επιτόπου MART-1 σε κύτταρα μελανώματος και ότι η δραστηριότητα της οδηγεί σε ανοσιακή διαφυγή των καρκινικών κυττάρων [125]. Επίσης το καρκινικό αντιγόνο CSW11 το οποίο εκκινεί ανοσολογικές αποκρίσεις δεν παρουσιάζεται παρουσία ενζυμικής δραστηριότητας από την αμινοπεπτιδάση ERAP1 [124]. Αν και αυτή η συμπεριφορά μπορεί να αφορά μόνο στα συγκεκριμένα κύτταρα, υποστηρίζει τη θέση ότι η ERAP1 μπορεί να προάγει την ανοσιακή διαφυγή. Άλλωστε, όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή η αναστολή της ERAP1 προκαλεί καταστροφή καρκινικών κυττάρων μέσω της δράσης φυσικών φονικών κυττάρων η οποία οδήγησε σε απόρριψη όγκων από πειραματόζωα [122, 123].

Η επίδραση της ERAP1 στο ανοσοπεπτιδίωμα συγκεκριμένων HLA έχει μελετηθεί συγκρίνοντας το ανοσοπεπτιδίωμα ανθρώπινων κυτταρικών σειρών τα οποία εκφράζουν διαφορετικά

αλληλόμορφα του ενζύμου αυτού, τα οποία διαφέρουν ως προς την ενζυμική δραστικότητα αλλά και την εκλεκτικότητα [130, 131, 134]. Επίσης σε μια πρόσφατη μελέτη διερευνήθηκε η επίδραση της ERAP1 στο ανοσοπεπτιδίωμα του HLA-B51 μέσω αποσιώπησης του γονιδίου με την τεχνολογία CRISPR/Cas9 [135]. Τα αποτελέσματα αυτών των μελετών προτείνουν ότι επηρεάζεται ένα τμήμα του ανοσοπεπτιδίου ενώ η μείωση της ενζυμικής δραστικότητας οδηγεί σε μεταβολές που συνάδουν με μειωμένη δράση ενός ενζύμου που παράγει βελτιστοποιημένους αντιγονικούς επιτόπους. Παρόμοια αποτελέσματα παρουσιάστηκαν και σε δύο μελέτες όπου χρησιμοποιήθηκαν διαγονιδιακά πειραματόζωα στα οποία έχει αποσιωπηθεί το γονίδιο της *ERAP1* [136, 137]. Αν και η σύγκριση των αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας με τις είδη δημοσιευμένες μελέτες παρουσιάζει παρόμοια αποτελέσματα τα οποία συνάδουν με αναστολή της ERAP1 πρέπει να ληφθούν υπόψη κάποιες σημαντικές διαφορές μεταξύ των εκάστοτε προσεγγίσεων. Αρχικά στην παρούσα διατριβή, μελετήθηκε η επίδραση της αναστολής της ERAP1 στο συνολικό ανοσοπεπτιδίωμα της καρκινικής σειράς A375. Συνεπώς αναμένεται τα αποτελέσματα να είναι διαφορετικά σε σχέση με μελέτες που εστιάζουν σε ένα συγκεκριμένο HLA, καθώς ενδέχεται η ERAP1 να μην επηρεάζει στον ίδιο βαθμό τα πεπτίδια που προσδένονται στο κάθε αλληλόμορφο. Επίσης σημαντικές διαφορές παρουσιάζει η μόνιμη γενετική αποσιώπηση σε σχέση με την παροδική χημική αναστολή ενός ενζύμου. Η επεξεργασία και παρουσίαση των αντιγονικών επιτόπων είναι μια δυναμική διαδικασία η κινητική της οποίας ενδέχεται να εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Έτσι λοιπόν, δε θεωρείται πιθανό η βραχυπρόθεσμη αναστολή ενός ενζύμου με ένα συνθετικό μόριο να προκαλέσει όμοια επίδραση με αυτή της γενετικής αποσιώπησης του. Άλλη διαφορά που αξίζει να σημειωθεί είναι οι γενετικές διαφορές μεταξύ του ανθρώπινου οργανισμού και των πειραματικών μοντέλων οι οποίες είναι ιδιαίτερα συχνές σε συστατικά του ανοσοποιητικού συστήματος. Επίσης, πρέπει να λάβουμε υπόψη μας ότι μια χημική ένωση η οποία εισέρχεται μέσα στα κύτταρα πιθανώς έχει και άλλους στόχους πέραν του επιθυμητού, φαινόμενο το οποίο ενδέχεται να επηρεάζει το πρωτέωμα του κυττάρου το οποίο αντανakλάται με τη σειρά του στο ανοσοπεπτιδίωμα.

Παρόλο που τα αποτελέσματα που περιγράφονται στην παρούσα διατριβή αποτελούν ένδειξη ότι η αναστολή της ERAP1 μπορεί να μεταβάλλει το ρεπερτόριο των αντιγονικών επιτόπων που παρουσιάζονται από τα MHC in vivo, η ανοσογονικότητα των νέων επιτόπων που παρουσιάζονται δεν έχει ελεγχθεί και απαιτείται περαιτέρω αξιολόγηση. Επιπλέον, πρέπει να σημειωθεί ότι η φαρμακολογική αξία του αναστολέα DG013A είναι περιορισμένη κυρίως λόγω της περιορισμένης εκλεκτικότητας του [142]. Συγκεκριμένα, η χημική ένωση αυτή, έχει την ικανότητα να αναστέλλει την ομόλογη αμινοπεπτιδάση ERAP2 συμμετέχει και αυτή στην

αντιγονοπαρουσίαση. Στην κυτταρική σειρά A375 η ERAP2 έχει πολλή χαμηλή έκφραση και έτσι μπορούμε να θεωρήσουμε ότι τα φαινόμενα που παρατηρούνται οφείλονται σε αναστολή της ERAP1. Εκτός από την ERAP2, ο αναστολέας DG013A μειώνει και τη δραστικότητα της αμινοπεπτιδάσης IRAP η οποία εκτός από την εμπλοκή της στην παραγωγή των αντιγονικών επιτόπων στα ενδοσώματα, έχει πολλές διαφορετικές βιολογικές λειτουργίες κάτι το οποίο ισχύει και για την ERAP1. Καταρχάς η αμινοπεπτιδάση ERAP1 έχει προταθεί ότι εμπλέκεται στην ανακύκλωση υποδοχέων κυτταροκινών [68, 77, 78] αλλά και στην ενεργοποίηση των μακροφάγων [75], έτσι είναι πιθανό η αναστολή της να επηρεάσει και αυτές τις λειτουργίες. Επίσης έχει δειχθεί ότι η ERAP1 μπορεί να υδρολύει βιοδραστικά πεπτίδια του συστήματος ρενίνης αγγειοτενσίνης και έτσι η αναστολή της ενδέχεται να οδηγήσει σε εμφάνιση υπέρτασης [79]. Ακόμα, είναι πιθανό η αλλαγή που θα προκληθεί στο ανοσοπεπτιδίωμα των καρκινικών κυττάρων να έχει ως αποτέλεσμα τη μη αποτελεσματική επεξεργασία κάποιων καρκινικών αντιγόνων μειώνοντας έτσι τα σήματα ενεργοποίησης προς το ανοσοποιητικό σύστημα. Παρά το γεγονός ότι η αναστολή της ERAP1 μπορεί να τροποποιήσει το ανοσοπεπτιδίωμα των καρκινικών κυττάρων συστημική χορήγηση ενός αναστολέα της ενδέχεται να επηρεάσει και υγιή κύτταρα προκαλώντας έτσι αυτοάνοσες ανοσολογικές αποκρίσεις. Παρόλο που μια τέτοια περίπτωση δεν μπορεί να αποκλειστεί υπάρχουν ενδείξεις ότι η αναστολή της ERAP1 μπορεί να είναι ανεκτή από τον ανθρώπινο οργανισμό. Συγκεκριμένα, έχει δειχθεί ότι η μόλυνση με τον HCMV οδηγεί σε μείωση της έκφρασης της ERAP1 μέσω ενός microRNA κάτι που αποτελεί μηχανισμό ανοσιακής διαφυγής του ιού [104]. Αν και η μόλυνση από HCMV είναι αρκετά κοινή στον πληθυσμό δεν υπάρχει σύνδεση της μόλυνσης από τον ιό με την εμφάνιση αυτοάνοσων αποκρίσεων. Επιπλέον, παρόλο που αντίστοιχες παρενέργειες έχουν παρατηρηθεί παρουσία των αναστολέων ανοσολογικών σημείων ελέγχου για τους ασθενείς, εξακολουθούν να έχουν σημαντικό κλινικό όφελος.

Συνοψίζοντας, σε αυτή τη διατριβή περιεγράφηκε η επίδραση ενός ισχυρού αναστολέα της ERAP1 στο ανοσοπεπτιδίωμα της κυτταρικής σειράς μεταστατικού κακοήθους μελανώματος A375. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης των πεπτιδίων έδειξαν ότι η παρουσία του αναστολέα DG013A επηρεάζει περίπου το 1/2 του συνόλου των πεπτιδίων που παρουσιάζονται και το 1/3 των πεπτιδίων τα οποία αναμένεται να προσδένονται ισχυρά στα μόρια ιστοσυμβατότητας ενώ τα νέα πεπτίδια που παρουσιάζονται έχουν συνολικά υψηλή χημική συγγένεια για τα MHC I. Αν και το συγκεκριμένο σύστημα εμφανίζει διαφορές σε σχέση με αυτά στη βιβλιογραφία καθώς είναι η πρώτη μελέτη στην οποία χρησιμοποιείται ένας χημικός αναστολέας της ERAP1, τα αποτελέσματα μας φαίνεται να αντιστοιχούν σε αναστολή της. Η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά

εκφράζει ένα έντονα δραστικό ένζυμο το οποίο φαίνεται να καταλύει την καταστροφή πολλών πιθανών επιτόπων, δράση την οποία πιθανώς εκμεταλλεύονται τα καρκινικά κύτταρα προκειμένου να διαφύγουν την ανοσολογικής επιτήρησης. Αν και στη συγκεκριμένη περίπτωση η δράση του ενζύμου ενδέχεται να αποτελεί εξελικτικό πλεονέκτημα για την ανάπτυξη του καρκίνου, καθιστά την ERAP1 έναν πιθανό φαρμακολογικό στόχο για ενίσχυση της ανοσογονικότητας με πιθανές εφαρμογές στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου.



## 6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. <Alberts.-Molecular.Biology.Of.The.Cell.5th.Ed.pdf>.
2. Koenderman, L., W. Buurman, and M.R. Daha, *The innate immune response*. Immunol Lett, 2014. **162**(2 Pt B): p. 95-102.
3. Janeway, C.A., Jr. and R. Medzhitov, *Innate immune recognition*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 197-216.
4. Netea, M.G., et al., *Innate and Adaptive Immune Memory: an Evolutionary Continuum in the Host's Response to Pathogens*. Cell Host Microbe, 2019. **25**(1): p. 13-26.
5. Sebina, I. and M. Pepper, *Humoral immune responses to infection: common mechanisms and unique strategies to combat pathogen immune evasion tactics*. Curr Opin Immunol, 2018. **51**: p. 46-54.
6. Amanna, I.J., N.E. Carlson, and M.K. Slifka, *Duration of humoral immunity to common viral and vaccine antigens*. N Engl J Med, 2007. **357**(19): p. 1903-15.
7. Andersen, M.H., et al., *Cytotoxic T cells*. J Invest Dermatol, 2006. **126**(1): p. 32-41.
8. Murphy, K.M. and S.L. Reiner, *The lineage decisions of helper T cells*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(12): p. 933-44.
9. Beissert, S., A. Schwarz, and T. Schwarz, *Regulatory T cells*. J Invest Dermatol, 2006. **126**(1): p. 15-24.
10. Russell, J.H. and T.J. Ley, *Lymphocyte-mediated cytotoxicity*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 323-70.
11. Bayliss, R.J. and V. Piguet, *Masters of manipulation: Viral modulation of the immunological synapse*. Cell Microbiol, 2018. **20**(10): p. e12944.
12. Dustin, M.L. and K. Choudhuri, *Signaling and Polarized Communication Across the T Cell Immunological Synapse*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2016. **32**: p. 303-325.
13. Finetti, F. and C.T. Baldari, *The immunological synapse as a pharmacological target*. Pharmacol Res, 2018. **134**: p. 118-133.
14. Dustin, M.L., *The immunological synapse*. Cancer Immunol Res, 2014. **2**(11): p. 1023-33.
15. <Janeway's Immunobiology (8th ed, 2012)(1).pdf>.
16. Robinson, J., et al., *The IPD and IMGT/HLA database: allele variant databases*. Nucleic Acids Res, 2015. **43**(Database issue): p. D423-31.
17. Yewdell, J.W. and J.R. Bennink, *Cut and trim: generating MHC class I peptide ligands*. Curr Opin Immunol, 2001. **13**(1): p. 13-8.
18. Schubert, U., et al., *Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes*. Nature, 2000. **404**(6779): p. 770-4.
19. Reits, E.A., et al., *The major substrates for TAP in vivo are derived from newly synthesized proteins*. Nature, 2000. **404**(6779): p. 774-8.
20. Finley, D., *Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome*. Annu Rev Biochem, 2009. **78**: p. 477-513.
21. Deshaies, R.J. and C.A. Joazeiro, *RING domain E3 ubiquitin ligases*. Annu Rev Biochem, 2009. **78**: p. 399-434.
22. Sijts, E.J. and P.M. Kloetzel, *The role of the proteasome in the generation of MHC class I ligands and immune responses*. Cell Mol Life Sci, 2011. **68**(9): p. 1491-502.
23. Cascio, P., et al., *26S proteasomes and immunoproteasomes produce mainly N-extended versions of an antigenic peptide*. EMBO J, 2001. **20**(10): p. 2357-66.
24. Luckey, C.J., et al., *Proteasomes can either generate or destroy MHC class I epitopes: evidence for nonproteasomal epitope generation in the cytosol*. J Immunol, 1998. **161**(1): p. 112-21.

25. Kessler, J.H., et al., *Antigen processing by nardilysin and thimet oligopeptidase generates cytotoxic T cell epitopes*. Nat Immunol, 2011. **12**(1): p. 45-53.
26. Seifert, U., et al., *An essential role for tripeptidyl peptidase in the generation of an MHC class I epitope*. Nat Immunol, 2003. **4**(4): p. 375-9.
27. Reits, E., et al., *A major role for TPPII in trimming proteasomal degradation products for MHC class I antigen presentation*. Immunity, 2004. **20**(4): p. 495-506.
28. Beninga, J., K.L. Rock, and A.L. Goldberg, *Interferon- $\gamma$  Can Stimulate Post-proteasomal Trimming of the N Terminus of an Antigenic Peptide by Inducing Leucine Aminopeptidase*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(30): p. 18734-18742.
29. Stoltze, L., et al., *Two new proteases in the MHC class I processing pathway*. Nat Immunol, 2000. **1**(5): p. 413-8.
30. Parcej, D. and R. Tampe, *ABC proteins in antigen translocation and viral inhibition*. Nat Chem Biol, 2010. **6**(8): p. 572-80.
31. Uebel, S. and R. Tampe, *Specificity of the proteasome and the TAP transporter*. Curr Opin Immunol, 1999. **11**(2): p. 203-8.
32. Scholz, C. and R. Tampe, *The peptide-loading complex--antigen translocation and MHC class I loading*. Biol Chem, 2009. **390**(8): p. 783-94.
33. Brees, A., et al., *Structure of the human MHC-I peptide-loading complex*. Nature, 2017. **551**(7681): p. 525-528.
34. Zarling, A.L., et al., *Tapasin is a facilitator, not an editor, of class I MHC peptide binding*. J Immunol, 2003. **171**(10): p. 5287-95.
35. Serwold, T., S. Gaw, and N. Shastri, *ER aminopeptidases generate a unique pool of peptides for MHC class I molecules*. Nat Immunol, 2001. **2**(7): p. 644-51.
36. Toes, R.E., et al., *Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products*. J Exp Med, 2001. **194**(1): p. 1-12.
37. Kloetzel, P.-M. and F. Ossendorp, *Proteasome and peptidase function in MHC-class-I-mediated antigen presentation*. Current Opinion in Immunology, 2004. **16**(1): p. 76-81.
38. Blum, J.S., P.A. Wearsch, and P. Cresswell, *Pathways of antigen processing*. Annu Rev Immunol, 2013. **31**: p. 443-73.
39. Rock, K.L., E. Reits, and J. Neefjes, *Present Yourself! By MHC Class I and MHC Class II Molecules*. Trends Immunol, 2016. **37**(11): p. 724-737.
40. Neefjes, J., et al., *Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(12): p. 823-36.
41. Landsverk, O.J., O. Bakke, and T.F. Gregers, *MHC II and the endocytic pathway: regulation by invariant chain*. Scand J Immunol, 2009. **70**(3): p. 184-93.
42. Tewari, M.K., et al., *A cytosolic pathway for MHC class II-restricted antigen processing that is proteasome and TAP dependent*. Nat Immunol, 2005. **6**(3): p. 287-94.
43. Kurts, C., B.W. Robinson, and P.A. Knolle, *Cross-priming in health and disease*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(6): p. 403-14.
44. Bedoui, S., et al., *Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103+ dendritic cells*. Nat Immunol, 2009. **10**(5): p. 488-95.
45. Heath, W.R. and F.R. Carbone, *Dendritic cell subsets in primary and secondary T cell responses at body surfaces*. Nat Immunol, 2009. **10**(12): p. 1237-44.
46. Shortman, K. and S.H. Naik, *Steady-state and inflammatory dendritic-cell development*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(1): p. 19-30.
47. del Rio, M.L., et al., *CD103- and CD103+ bronchial lymph node dendritic cells are specialized in presenting and cross-presenting innocuous antigen to CD4+ and CD8+ T cells*. J Immunol, 2007. **178**(11): p. 6861-6.
48. Joffre, O.P., et al., *Cross-presentation by dendritic cells*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(8): p. 557-69.

49. Adiko, A.C., et al., *Intracellular Transport Routes for MHC I and Their Relevance for Antigen Cross-Presentation*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 335.
50. Taylor, A., *Aminopeptidases: structure and function*. FASEB J, 1993. **7**(2): p. 290-8.
51. Thunnissen, M.M., P. Nordlund, and J.Z. Haeggstrom, *Crystal structure of human leukotriene A(4) hydrolase, a bifunctional enzyme in inflammation*. Nat Struct Biol, 2001. **8**(2): p. 131-5.
52. Tsujimoto, M., et al., *Biochemical and enzymatic properties of the M1 family of aminopeptidases involved in the regulation of blood pressure*. Heart Fail Rev, 2008. **13**(3): p. 285-91.
53. Wang, J. and M.D. Cooper, *Histidine residue in the zinc-binding motif of aminopeptidase A is critical for enzymatic activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(4): p. 1222-6.
54. Vazeux, G., et al., *Identification of glutamate residues essential for catalytic activity and zinc coordination in aminopeptidase A*. J Biol Chem, 1996. **271**(15): p. 9069-74.
55. Vazeux, G., et al., *A glutamate residue contributes to the exopeptidase specificity in aminopeptidase A*. Biochem J, 1998. **334 ( Pt 2)**: p. 407-13.
56. Luciani, N., 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, 1998. **37**(2): p. 686-92.
57. Kochan, G., et al., *Crystal structures of the endoplasmic reticulum aminopeptidase-1 (ERAP1) reveal the molecular basis for N-terminal peptide trimming*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(19): p. 7745-50.
58. Tsujimoto, M. and A. Hattori, *The oxytocinase subfamily of M1 aminopeptidases*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1751**(1): p. 9-18.
59. Rogi, T., et al., *Human Placental Leucine Aminopeptidase/Oxytocinase*. Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(1): p. 56-61.
60. Saric, T., et al., *An IFN-gamma-induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides*. Nat Immunol, 2002. **3**(12): p. 1169-76.
61. Tanioka, T., et al., *Human leukocyte-derived arginine aminopeptidase. The third member of the oxytocinase subfamily of aminopeptidases*. J Biol Chem, 2003. **278**(34): p. 32275-83.
62. Hattori, A., et al., *Genomic organization of the human adipocyte-derived leucine aminopeptidase gene and its relationship to the placental leucine aminopeptidase/oxytocinase gene*. J Biochem, 2001. **130**(2): p. 235-41.
63. Aoki, K., et al., *The gene expression of two endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 isoforms is regulated by distinct posttranscriptional mechanisms*. Biochem Biophys Res Commun, 2018. **503**(4): p. 3180-3185.
64. Fruci, D., et al., *Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 function and its pathogenic role in regulating innate and adaptive immunity in cancer and major histocompatibility complex class I-associated autoimmune diseases*. Tissue Antigens, 2014. **84**(2): p. 177-86.
65. York, I.A., et al., *The ER aminopeptidase ERAP1 enhances or limits antigen presentation by trimming epitopes to 8-9 residues*. Nat Immunol, 2002. **3**(12): p. 1177-84.
66. Hattori, A., et al., *Molecular cloning of adipocyte-derived leucine aminopeptidase highly related to placental leucine aminopeptidase/oxytocinase*. J Biochem, 1999. **125**(5): p. 931-8.
67. Schomburg, L., et al., *Molecular characterization of a puromycin-insensitive leucyl-specific aminopeptidase, PILS-AP*. Eur J Biochem, 2000. **267**(11): p. 3198-207.
68. Cui, X., et al., *Identification of ARTS-1 as a novel TNFR1-binding protein that promotes TNFR1 ectodomain shedding*. J Clin Invest, 2002. **110**(4): p. 515-26.

69. Hattori, A., Y. Goto, and M. Tsujimoto, *Exon 10 coding sequence is important for endoplasmic reticulum retention of endoplasmic reticulum aminopeptidase 1*. Biol Pharm Bull, 2012. **35**(4): p. 601-5.
70. Hisatsune, C., et al., *ERp44 Exerts Redox-Dependent Control of Blood Pressure at the ER*. Mol Cell, 2015. **58**(6): p. 1015-27.
71. Serwold, T., et al., *ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum*. Nature, 2002. **419**(6906): p. 480-3.
72. Hammer, G.E., et al., *In the absence of aminopeptidase ERAAP, MHC class I molecules present many unstable and highly immunogenic peptides*. Nat Immunol, 2007. **8**(1): p. 101-8.
73. York, I.A., 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 U S A, 2006. **103**(24): p. 9202-7.
74. Rastall, D.P., et al., *ERAP1 functions override the intrinsic selection of specific antigens as immunodominant peptides, thereby altering the potency of antigen-specific cytolytic and effector memory T-cell responses*. Int Immunol, 2014. **26**(12): p. 685-95.
75. Goto, Y., et al., *Secretion of endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 is involved in the activation of macrophages induced by lipopolysaccharide and interferon-gamma*. J Biol Chem, 2011. **286**(24): p. 21906-14.
76. Aldhamen, Y.A., et al., *Endoplasmic reticulum aminopeptidase-1 functions regulate key aspects of the innate immune response*. PLoS One, 2013. **8**(7): p. e69539.
77. Cui, X., 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, 2003. **171**(12): p. 6814-9.
78. Cui, X., et al., *An aminopeptidase, ARTS-1, is required for interleukin-6 receptor shedding*. J Biol Chem, 2003. **278**(31): p. 28677-85.
79. Hattori, A., et al., *Characterization of recombinant human adipocyte-derived leucine aminopeptidase expressed in Chinese hamster ovary cells*. J Biochem, 2000. **128**(5): p. 755-62.
80. Miyashita, H., et al., *A mouse orthologue of puromycin-insensitive leucyl-specific aminopeptidase is expressed in endothelial cells and plays an important role in angiogenesis*. Blood, 2002. **99**(9): p. 3241-9.
81. Yamazaki, T., et al., *Puromycin-insensitive leucyl-specific aminopeptidase (PILSAP) binds and catalyzes PDK1, allowing VEGF-stimulated activation of S6K for endothelial cell proliferation and angiogenesis*. Blood, 2004. **104**(8): p. 2345-52.
82. Akada, T., et al., *Puromycin insensitive leucyl-specific aminopeptidase (PILSAP) is involved in the activation of endothelial integrins*. J Cell Physiol, 2002. **193**(2): p. 253-62.
83. Giastas, P., et al., *High-Resolution Crystal Structure of Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 1 with Bound Phosphinic Transition-State Analogue Inhibitor*. ACS Med Chem Lett, 2019. **10**(5): p. 708-713.
84. Nguyen, T.T., et al., *Structural basis for antigenic peptide precursor processing by the endoplasmic reticulum aminopeptidase ERAP1*. Nat Struct Mol Biol, 2011. **18**(5): p. 604-13.
85. Georgiadis, D., et al., *Inhibitors of ER aminopeptidase 1 and 2: from design to clinical application*. Curr Med Chem, 2018.
86. Goto, Y., et al., *Glutamine-181 is crucial in the enzymatic activity and substrate specificity of human endoplasmic-reticulum aminopeptidase-1*. Biochem J, 2008. **416**(1): p. 109-16.
87. Evnouchidou, I., et al., *The internal sequence of the peptide-substrate determines its N-terminus trimming by ERAP1*. PLoS One, 2008. **3**(11): p. e3658.

88. Chang, S.C., 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, 2005. **102**(47): p. 17107-12.
89. Mpakali, A., et al., *Molecular pathways for antigenic peptide generation by ER aminopeptidase 1*. Mol Immunol, 2018.
90. Falk, K., O. Rotzschke, and H.G. Rammensee, *Cellular peptide composition governed by major histocompatibility complex class I molecules*. Nature, 1990. **348**(6298): p. 248-51.
91. Paz, P., et al., *Discrete proteolytic intermediates in the MHC class I antigen processing pathway and MHC I-dependent peptide trimming in the ER*. Immunity, 1999. **11**(2): p. 241-51.
92. Evnouchidou, I. and P. van Endert, *Peptide trimming by endoplasmic reticulum aminopeptidases: Role of MHC class I binding and ERAP dimerization*. Hum Immunol, 2019. **80**(5): p. 290-295.
93. Ombrello, M.J., D.L. Kastner, and E.F. Remmers, *Endoplasmic reticulum-associated amino-peptidase 1 and rheumatic disease: genetics*. Curr Opin Rheumatol, 2015. **27**(4): p. 349-56.
94. Evans, D.M., 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, 2011. **43**(8): p. 761-7.
95. Evnouchidou, I., et al., *Cutting Edge: Coding single nucleotide polymorphisms of endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 can affect antigenic peptide generation in vitro by influencing basic enzymatic properties of the enzyme*. J Immunol, 2011. **186**(4): p. 1909-13.
96. Goto, Y., et al., *Reduced activity of the hypertension-associated Lys528Arg mutant of human adipocyte-derived leucine aminopeptidase (A-LAP)/ER-aminopeptidase-1*. FEBS Lett, 2006. **580**(7): p. 1833-8.
97. Reeves, E., et al., *Naturally occurring ERAP1 haplotypes encode functionally distinct alleles with fine substrate specificity*. J Immunol, 2013. **191**(1): p. 35-43.
98. Chen, L., et al., *Critical role of endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 in determining the length and sequence of peptides bound and presented by HLA-B27*. Arthritis Rheumatol, 2014. **66**(2): p. 284-94.
99. Martin-Esteban, A., et al., *Combined effects of ankylosing spondylitis-associated ERAP1 polymorphisms outside the catalytic and peptide-binding sites on the processing of natural HLA-B27 ligands*. J Biol Chem, 2014. **289**(7): p. 3978-90.
100. Niepieklo-Miniewska, W., et al., *Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 polymorphism Ile276Met is associated with atopic dermatitis and affects the generation of an HLA-C associated antigenic epitope in vitro*. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2019. **33**(5): p. 906-911.
101. Stamogiannos, A., et al., *Effects of polymorphic variation on the mechanism of Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 1*. Mol Immunol, 2015. **67**(2 Pt B): p. 426-35.
102. Tran, T.M. and R.A. Colbert, *Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 and rheumatic disease: functional variation*. Curr Opin Rheumatol, 2015. **27**(4): p. 357-63.
103. Blanchard, N., et al., *Immunodominant, protective response to the parasite Toxoplasma gondii requires antigen processing in the endoplasmic reticulum*. Nat Immunol, 2008. **9**(8): p. 937-44.
104. Kim, S., et al., *Human cytomegalovirus microRNA miR-US4-1 inhibits CD8(+) T cell responses by targeting the aminopeptidase ERAP1*. Nat Immunol, 2011. **12**(10): p. 984-91.

105. Cagliani, R., et al., *Genetic diversity at endoplasmic reticulum aminopeptidases is maintained by balancing selection and is associated with natural resistance to HIV-1 infection*. Hum Mol Genet, 2010. **19**(23): p. 4705-14.
106. Tenzer, S., et al., *Antigen processing influences HIV-specific cytotoxic T lymphocyte immunodominance*. Nat Immunol, 2009. **10**(6): p. 636-46.
107. Mehta, A.M., et al., *Single nucleotide polymorphisms in antigen processing machinery component ERAP1 significantly associate with clinical outcome in cervical carcinoma*. Genes Chromosomes Cancer, 2009. **48**(5): p. 410-8.
108. Cortes, A., et al., *Identification of multiple risk variants for ankylosing spondylitis through high-density genotyping of immune-related loci*. Nature Genetics, 2013. **45**(7): p. 730-738.
109. Harvey, D., et al., *Investigating the genetic association between ERAP1 and ankylosing spondylitis*. Hum Mol Genet, 2009. **18**(21): p. 4204-12.
110. Wellcome Trust Case Control, C., et al., *Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants*. Nat Genet, 2007. **39**(11): p. 1329-37.
111. Lopez de Castro, J.A., *How ERAP1 and ERAP2 Shape the Peptidomes of Disease-Associated MHC-I Proteins*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 2463.
112. Kuiper, J.J.W., et al., *Functionally distinct ERAP1 and ERAP2 are a hallmark of HLA-A29-(Birdshot) Uveitis*. Hum Mol Genet, 2018. **27**(24): p. 4333-4343.
113. Kirino, Y., et al., *Genome-wide association analysis identifies new susceptibility loci for Behcet's disease and epistasis between HLA-B\*51 and ERAP1*. Nat Genet, 2013. **45**(2): p. 202-7.
114. Ombrello, M.J., et al., *Genetic architecture distinguishes systemic juvenile idiopathic arthritis from other forms of juvenile idiopathic arthritis: clinical and therapeutic implications*. Ann Rheum Dis, 2017. **76**(5): p. 906-913.
115. Gudjonsson, J.E., et al., *Distinct clinical differences between HLA-Cw\*0602 positive and negative psoriasis patients--an analysis of 1019 HLA-C- and HLA-B-typed patients*. J Invest Dermatol, 2006. **126**(4): p. 740-5.
116. Genetic Analysis of Psoriasis, C., et al., *A genome-wide association study identifies new psoriasis susceptibility loci and an interaction between HLA-C and ERAP1*. Nat Genet, 2010. **42**(11): p. 985-90.
117. Tsoi, L.C., et al., *Identification of 15 new psoriasis susceptibility loci highlights the role of innate immunity*. Nat Genet, 2012. **44**(12): p. 1341-8.
118. Lysell, J., et al., *Genetic association with ERAP1 in psoriasis is confined to disease onset after puberty and not dependent on HLA-C\*06*. J Invest Dermatol, 2013. **133**(2): p. 411-7.
119. Fung, E.Y., et al., *Analysis of 17 autoimmune disease-associated variants in type 1 diabetes identifies 6q23/TNFAIP3 as a susceptibility locus*. Genes Immun, 2009. **10**(2): p. 188-91.
120. Guerini, F.R., et al., *A functional variant in ERAP1 predisposes to multiple sclerosis*. PLoS One, 2012. **7**(1): p. e29931.
121. Hampe, J., et al., *A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1*. Nat Genet, 2007. **39**(2): p. 207-11.
122. Cifaldi, L., et al., *Natural killer cells efficiently reject lymphoma silenced for the endoplasmic reticulum aminopeptidase associated with antigen processing*. Cancer Res, 2011. **71**(5): p. 1597-606.
123. Cifaldi, L., et al., *ERAP1 regulates natural killer cell function by controlling the engagement of inhibitory receptors*. Cancer Res, 2015. **75**(5): p. 824-34.
124. James, E., et al., *Induction of protective antitumor immunity through attenuation of ERAAP function*. J Immunol, 2013. **190**(11): p. 5839-46.

125. Keller, M., et al., *The proteasome immunosubunits, PA28 and ER-aminopeptidase 1 protect melanoma cells from efficient MART-126-35 -specific T-cell recognition.* Eur J Immunol, 2015. **45**(12): p. 3257-68.
126. Lim, Y.W., et al., *Germline genetic polymorphisms influence tumor gene expression and immune cell infiltration.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2018. **115**(50): p. E11701-E11710.
127. Schmidt, K., et al., *ERAP1-Dependent Antigen Cross-Presentation Determines Efficacy of Adoptive T-cell Therapy in Mice.* Cancer Res, 2018. **78**(12): p. 3243-3254.
128. Garcia-Medel, N., et al., *Functional interaction of the ankylosing spondylitis-associated endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 polymorphism and HLA-B27 in vivo.* Mol Cell Proteomics, 2012. **11**(11): p. 1416-29.
129. Sanz-Bravo, A., et al., *Ranking the Contribution of Ankylosing Spondylitis-associated Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 1 (ERAP1) Polymorphisms to Shaping the HLA-B\*27 Peptidome.* Mol Cell Proteomics, 2018. **17**(7): p. 1308-1323.
130. Sanz-Bravo, A., et al., *Dominant role of the ERAP1 polymorphism R528K in shaping the HLA-B27 Peptidome through differential processing determined by multiple peptide residues.* Arthritis Rheumatol, 2015. **67**(3): p. 692-701.
131. Martin-Esteban, A., et al., *Separate effects of the ankylosing spondylitis associated ERAP1 and ERAP2 aminopeptidases determine the influence of their combined phenotype on the HLA-B\*27 peptidome.* J Autoimmun, 2017. **79**: p. 28-38.
132. Alvarez-Navarro, C., et al., *Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 1 (ERAP1) Polymorphism Relevant to Inflammatory Disease Shapes the Peptidome of the Birdshot Chorioretinopathy-Associated HLA-A\*29:02 Antigen.* Mol Cell Proteomics, 2015. **14**(7): p. 1770-80.
133. Guasp, P., et al., *The Peptidome of Behcet's Disease-Associated HLA-B\*51:01 Includes Two Subpeptidomes Differentially Shaped by Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 1.* Arthritis Rheumatol, 2016. **68**(2): p. 505-15.
134. Guasp, P., et al., *The Behcet's disease-associated variant of the aminopeptidase ERAP1 shapes a low-affinity HLA-B\*51 peptidome by differential subpeptidome processing.* J Biol Chem, 2017. **292**(23): p. 9680-9689.
135. Guasp, P., et al., *Redundancy and Complementarity between ERAP1 and ERAP2 Revealed by their Effects on the Behcet's Disease-Associated HLA-B\*51 Peptidome.* Mol Cell Proteomics, 2019.
136. Barnea, E., et al., *The Human Leukocyte Antigen (HLA)-B27 Peptidome in Vivo, in Spondyloarthritis-susceptible HLA-B27 Transgenic Rats and the Effect of Erap1 Deletion.* Mol Cell Proteomics, 2017. **16**(4): p. 642-662.
137. Nagarajan, N.A., et al., *ERAAP Shapes the Peptidome Associated with Classical and Nonclassical MHC Class I Molecules.* J Immunol, 2016. **197**(4): p. 1035-43.
138. Tanioka, T., et al., *Regulation of the human leukocyte-derived arginine aminopeptidase/endoplasmic reticulum-aminopeptidase 2 gene by interferon-gamma.* FEBS J, 2005. **272**(4): p. 916-28.
139. Andres, A.M., et al., *Balancing selection maintains a form of ERAP2 that undergoes nonsense-mediated decay and affects antigen presentation.* PLoS Genet, 2010. **6**(10): p. e1001157.
140. Saveanu, L., et al., *Concerted peptide trimming by human ERAP1 and ERAP2 aminopeptidase complexes in the endoplasmic reticulum.* Nat Immunol, 2005. **6**(7): p. 689-97.
141. Birtley, J.R., et al., *The crystal structure of human endoplasmic reticulum aminopeptidase 2 reveals the atomic basis for distinct roles in antigen processing.* Biochemistry, 2012. **51**(1): p. 286-95.

142. Zervoudi, E., et al., *Rationally designed inhibitor targeting antigen-trimming aminopeptidases enhances antigen presentation and cytotoxic T-cell responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(49): p. 19890-5.
143. Mpakali, A., et al., *Structural Basis for Antigenic Peptide Recognition and Processing by Endoplasmic Reticulum (ER) Aminopeptidase 2*. J Biol Chem, 2015. **290**(43): p. 26021-32.
144. Mpakali, A., et al., *Crystal Structures of ERAP2 Complexed with Inhibitors Reveal Pharmacophore Requirements for Optimizing Inhibitor Potency*. ACS Med Chem Lett, 2017. **8**(3): p. 333-337.
145. de Castro, J.A.L. and E. Stratikos, *Intracellular antigen processing by ERAP2: Molecular mechanism and roles in health and disease*. Hum Immunol, 2018.
146. Zervoudi, E., et al., *Probing the S1 specificity pocket of the aminopeptidases that generate antigenic peptides*. Biochem J, 2011. **435**(2): p. 411-20.
147. Evnouchidou, I., et al., *A common single nucleotide polymorphism in endoplasmic reticulum aminopeptidase 2 induces a specificity switch that leads to altered antigen processing*. J Immunol, 2012. **189**(5): p. 2383-92.
148. Robinson, P.C., et al., *ERAP2 is associated with ankylosing spondylitis in HLA-B27-positive and HLA-B27-negative patients*. Ann Rheum Dis, 2015. **74**(8): p. 1627-9.
149. Kuiper, J.J., et al., *A genome-wide association study identifies a functional ERAP2 haplotype associated with birdshot chorioretinopathy*. Hum Mol Genet, 2014. **23**(22): p. 6081-7.
150. Franke, A., et al., *Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci*. Nat Genet, 2010. **42**(12): p. 1118-25.
151. Zee, R.Y.L., et al., *Gene Variation of Endoplasmic Reticulum Aminopeptidases 1 and 2, and Risk of Blood Pressure Progression and Incident Hypertension among 17,255 Initially Healthy Women*. Int J Genomics, 2018. **2018**: p. 2308585.
152. Ilekis, J.V., U.M. Reddy, and J.M. Roberts, *Preeclampsia--a pressing problem: an executive summary of a National Institute of Child Health and Human Development workshop*. Reprod Sci, 2007. **14**(6): p. 508-23.
153. Johnson, M.P., et al., *The ERAP2 gene is associated with preeclampsia in Australian and Norwegian populations*. Hum Genet, 2009. **126**(5): p. 655-66.
154. Hill, L.D., et al., *Fetal ERAP2 variation is associated with preeclampsia in African Americans in a case-control study*. BMC Med Genet, 2011. **12**: p. 64.
155. Vanhille, D.L., et al., *A Novel ERAP2 Haplotype Structure in a Chilean Population: Implications for ERAP2 Protein Expression and Preeclampsia Risk*. Mol Genet Genomic Med, 2013. **1**(2): p. 98-107.
156. Martin-Esteban, A., et al., *Functional Interaction of the Ankylosing Spondylitis-Associated Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 2 With the HLA-B\*27 Peptidome in Human Cells*. Arthritis Rheumatol, 2016. **68**(10): p. 2466-75.
157. Sanz-Bravo, A., et al., *Allele-specific Alterations in the Peptidome Underlie the Joint Association of HLA-A\*29:02 and Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 2 (ERAP2) with Birdshot Chorioretinopathy*. Mol Cell Proteomics, 2018. **17**(8): p. 1564-1577.
158. Shankaran, V., et al., *IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity*. Nature, 2001. **410**(6832): p. 1107-11.
159. Pan, R.Y., et al., *Recent Development and Clinical Application of Cancer Vaccine: Targeting Neoantigens*. J Immunol Res, 2018. **2018**: p. 4325874.
160. Chomez, P., et al., *An overview of the MAGE gene family with the identification of all human members of the family*. Cancer Res, 2001. **61**(14): p. 5544-51.
161. Gnjjatic, S., et al., *NY-ESO-1: review of an immunogenic tumor antigen*. Adv Cancer Res, 2006. **95**: p. 1-30.



162. Yarchoan, M., A. Hopkins, and E.M. Jaffee, *Tumor Mutational Burden and Response Rate to PD-1 Inhibition*. N Engl J Med, 2017. **377**(25): p. 2500-2501.
163. Coulie, P.G., et al., *Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy*. Nat Rev Cancer, 2014. **14**(2): p. 135-46.
164. Bobisse, S., et al., *Neoantigen-based cancer immunotherapy*. Ann Transl Med, 2016. **4**(14): p. 262.
165. Topalian, S.L., C.G. Drake, and D.M. Pardoll, *Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy*. Cancer Cell, 2015. **27**(4): p. 450-61.
166. Pardoll, D.M., *The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(4): p. 252-64.
167. Abril-Rodriguez, G. and A. Ribas, *SnapShot: Immune Checkpoint Inhibitors*. Cancer Cell, 2017. **31**(6): p. 848-848 e1.
168. Thallinger, C., et al., *Review of cancer treatment with immune checkpoint inhibitors : Current concepts, expectations, limitations and pitfalls*. Wien Klin Wochenschr, 2018. **130**(3-4): p. 85-91.
169. Van Allen, E.M., et al., *Genomic correlates of response to CTLA-4 blockade in metastatic melanoma*. Science, 2015. **350**(6257): p. 207-211.
170. Rizvi, N.A., et al., *Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer*. Science, 2015. **348**(6230): p. 124-8.
171. Schumacher, T.N. and R.D. Schreiber, *Neoantigens in cancer immunotherapy*. Science, 2015. **348**(6230): p. 69-74.
172. Farhood, B., M. Najafi, and K. Mortezaee, *CD8(+) cytotoxic T lymphocytes in cancer immunotherapy: A review*. J Cell Physiol, 2019. **234**(6): p. 8509-8521.
173. Reeves, E. and E. James, *Antigen processing and immune regulation in the response to tumours*. Immunology, 2017. **150**(1): p. 16-24.
174. Cromme, F.V., et al., *Loss of transporter protein, encoded by the TAP-1 gene, is highly correlated with loss of HLA expression in cervical carcinomas*. J Exp Med, 1994. **179**(1): p. 335-40.
175. Kaklamanis, L., et al., *Loss of major histocompatibility complex-encoded transporter associated with antigen presentation (TAP) in colorectal cancer*. Am J Pathol, 1994. **145**(3): p. 505-9.
176. Mehta, A.M., et al., *Genetic variation of antigen processing machinery components and association with cervical carcinoma*. Genes Chromosomes Cancer, 2007. **46**(6): p. 577-86.
177. Tripathi, S.C., et al., *Immunoproteasome deficiency is a feature of non-small cell lung cancer with a mesenchymal phenotype and is associated with a poor outcome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(11): p. E1555-64.
178. Leone, P., et al., *MHC class I antigen processing and presenting machinery: organization, function, and defects in tumor cells*. J Natl Cancer Inst, 2013. **105**(16): p. 1172-87.
179. Stratikos, E., et al., *A role for naturally occurring alleles of endoplasmic reticulum aminopeptidases in tumor immunity and cancer pre-disposition*. Front Oncol, 2014. **4**: p. 363.
180. Compagnone, M., L. Cifaldi, and D. Fruci, *Regulation of ERAP1 and ERAP2 genes and their disfunction in human cancer*. Hum Immunol, 2019. **80**(5): p. 318-324.
181. Fruci, D., et al., *Altered expression of endoplasmic reticulum aminopeptidases ERAP1 and ERAP2 in transformed non-lymphoid human tissues*. J Cell Physiol, 2008. **216**(3): p. 742-9.
182. Stoehr, C.G., et al., *Comparative expression profiling for human endoplasmic reticulum-resident aminopeptidases 1 and 2 in normal kidney versus distinct renal cell carcinoma subtypes*. Int J Clin Exp Pathol, 2013. **6**(6): p. 998-1008.

183. Fruci, D., 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, 2006. **176**(8): p. 4869-79.
184. Kamphausen, E., et al., *Distinct molecular mechanisms leading to deficient expression of ER-resident aminopeptidases in melanoma*. Cancer Immunol Immunother, 2010. **59**(8): p. 1273-84.
185. Thuring, C., et al., *HLA class I is most tightly linked to levels of tapasin compared with other antigen-processing proteins in glioblastoma*. Br J Cancer, 2015. **113**(11): p. 1640.
186. Mucha, A., et al., *Metallo-aminopeptidase inhibitors*. Biochimie, 2010. **92**(11): p. 1509-29.
187. Peng, G., et al., *Insight into the remarkable affinity and selectivity of the aminobenzosuberone scaffold for the M1 aminopeptidases family based on structure analysis*. Proteins, 2017. **85**(8): p. 1413-1421.
188. Deprez-Poulain, R., et al., *Structure-activity relationships and blood distribution of antiplasmodial aminopeptidase-1 inhibitors*. J Med Chem, 2012. **55**(24): p. 10909-17.
189. Sui, L., A. Gandhi, and H.C. Guo, *Crystal structure of a polypeptide's C-terminus in complex with the regulatory domain of ER aminopeptidase 1*. Mol Immunol, 2016. **80**: p. 41-49.
190. Aldhamen, Y.A., et al., *Autoimmune disease-associated variants of extracellular endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 induce altered innate immune responses by human immune cells*. J Innate Immun, 2015. **7**(3): p. 275-89.
191. Chen, L., et al., *Silencing or inhibition of endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 (ERAP1) suppresses free heavy chain expression and Th17 responses in ankylosing spondylitis*. Ann Rheum Dis, 2016. **75**(5): p. 916-23.
192. Kokkala, P., et al., *Optimization and Structure-Activity Relationships of Phosphinic Pseudotriptide Inhibitors of Aminopeptidases That Generate Antigenic Peptides*. J Med Chem, 2016. **59**(19): p. 9107-9123.
193. Papakyriakou, A., et al., *Novel selective inhibitors of aminopeptidases that generate antigenic peptides*. Bioorg Med Chem Lett, 2013. **23**(17): p. 4832-6.
194. Papakyriakou, A., et al., *3,4-diaminobenzoic acid derivatives as inhibitors of the oxytocinase subfamily of M1 aminopeptidases with immune-regulating properties*. J Med Chem, 2015. **58**(3): p. 1524-43.
195. Porgador, A., et al., *Localization, quantitation, and in situ detection of specific peptide-MHC class I complexes using a monoclonal antibody*. Immunity, 1997. **6**(6): p. 715-26.
196. Schuler, M.M., M.D. Nastke, and S. Stevanovikc, *SYFPEITHI: database for searching and T-cell epitope prediction*. Methods Mol Biol, 2007. **409**: p. 75-93.
197. Lopez de Castro, J.A., et al., *Molecular and pathogenic effects of endoplasmic reticulum aminopeptidases ERAP1 and ERAP2 in MHC-I-associated inflammatory disorders: Towards a unifying view*. Mol Immunol, 2016. **77**: p. 193-204.
198. Reeves, E., et al., *Functionally distinct ERAP1 allotype combinations distinguish individuals with Ankylosing Spondylitis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(49): p. 17594-9.
199. Karosiene, E., et al., *NetMHCcons: a consensus method for the major histocompatibility complex class I predictions*. Immunogenetics, 2012. **64**(3): p. 177-86.
200. Assarsson, E., et al., *A quantitative analysis of the variables affecting the repertoire of T cell specificities recognized after vaccinia virus infection*. J Immunol, 2007. **178**(12): p. 7890-901.
201. Cancer Cell Line Encyclopedia, C. and C. Genomics of Drug Sensitivity in Cancer, *Pharmacogenomic agreement between two cancer cell line data sets*. Nature, 2015. **528**(7580): p. 84-7.

202. Hearn, A., I.A. York, and K.L. Rock, *The specificity of trimming of MHC class I-presented peptides in the endoplasmic reticulum*. J Immunol, 2009. **183**(9): p. 5526-36.
203. Landon, *Cleavage at aspartyl-prolyl bonds*. Methods Enzymol, 1977. **47**: p. 145-9.
204. Andreatta, M., B. Alvarez, and M. Nielsen, *GibbsCluster: unsupervised clustering and alignment of peptide sequences*. Nucleic Acids Res, 2017. **45**(W1): p. W458-W463.
205. Thomsen, M.C. and M. Nielsen, *Seq2Logo: a method for construction and visualization of amino acid binding motifs and sequence profiles including sequence weighting, pseudo counts and two-sided representation of amino acid enrichment and depletion*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(Web Server issue): p. W281-7.
206. Evnouchidou, I., A. Papakyriakou, and E. Stratikos, *A new role for Zn(II) aminopeptidases: antigenic peptide generation and destruction*. Curr Pharm Des, 2009. **15**(31): p. 3656-70.

## 7 ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ- ΑΡΤΙΚΟΛΕΞΑ - ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

AcN	Acetonitrile
ALAP	Adipocyte-derived Leucine Aminopeptidase
AP	Aminopeptidase
ARTS-1	Aminopeptidase regulator of TNFR1 shedding
ATP	Adenosine Triphosphate
BCA	Bicinchoninic acid
BH	Bleomycin hydrolase
Cas9	CRISPR-associated protein 9
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	Complementary DNA
CEA	Carcinoembryonic Antigen
CRISPR	Clustered Regular Interspaced Short Palindromic Repeats
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated Antigen-4
DCs	Dendritic cells
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DRiPs	Difective Ribosomal Products
EC50	Half maximal Effective Concentration
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
ER	Endoplasmic Reticulum
ERAAP	Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase associated with Antigen Processing
ERAP1	Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 1
ERAP2	Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 2
ERp57	Endoplasmic Reticulum p57
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FBS	Fetal Bovine Serum
GFP	Green Fluorescent Protein

GWAS	Genome Wide Association Studies
HCMV	Human Cytomegalovirus
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HLA	Human Leucocyte Antigen
HPV	Human Papillomavirus
HRP	Horseradish Peroxidase
IC50	Half maximal Inhibitory Concentration
IEDB	Immune Epitope Data Base
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL-10	Interleucine-10
IL-4	Interleucine-4
IRAP	Insulin Regulated Aminopeptidase
ITIM	Tyrosine-based Inhibitory Motif
ITSM	Tyrosine-based Switch Motif
L-AMC	Leucine-7-Amido-4-Methylcoumarin
LAP	Leucine Aminopeptidase
LB	Lysogeny Broth
LC	Liquid Chromatography
LFA-1	Lymphocyte Function-associated Antigen 1
LLPCs	Long-Lived Plasma Cells
LMP-2	Low molecular mass polypeptide-2
LMP-7	Low molecular mass polypeptide-7
LPS	Lipopolysaccharides
LRAP	Leucocyte-derived Arginine Aminopeptidase
MAGE	Melanoma Antigen Gene
MECL-1	Multicatalytic Endopeptidase Complex-Like 1
MFI	Mean Fluorescence Intensity
MHC	Major Histocompatibility Complex
MIIC	MHC class II Compartment

mRNA	Message RNA
MS	Mass spectrometry
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
MWCO	Molecular Weight Cut Off
NADH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NK	Natural Killer
NTA	Nitrilotriacetic Acid
NY-ESO-1	New York Esophageal squamous cell carcinoma
PA28	Proteasome Activator 28
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PD-1	Programmed Death-1
PD-L1	Programmed Death Ligand-1
PD-L2	Programmed Death Ligand-2
PILSAP	Puromycin Insensitive Leucine Aminopeptidase
PLAP	Placental Leucine Aminopeptidase
PLC	Peptide Loading Complex
PMSF	Phenylmethylsulfonyl Fluoride
PRRs	Patern Recognition Receptors
PSA	Prostate Specific Antigen
PVDF	Polyvinylidene Fluoride
RPM	Rotations Per Minute
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SHP2	Src Homology Phosphatase 2
shRNA	Short hairpin RNA
siRNA	Silencing RNA
SNP	Single Nucleotide Polymorphism

TAA	Tumor Associated Antigen
TAP	Transporter associated with Antigen Processing
TBS.T	Tris Buffered Saline. Tween
TCR	T Cell Receptor
TFA	Trifluoroacetic Acid
TLRs	Toll-like Receptors
TNFR1	Tumor Necrosis Factor Receptor 1
TNF $\alpha$	Tumor Necrosis Factor $\alpha$
TOP	Thimet Oligopeptidase
TPM	Transcripts per kilobase Million
TPP II	Tripeptidyl-peptidase 2
TSA	Tumor Specific Antigen
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
ΕΔ	Ενδοπλασματικό Δίκτυο

## 8 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ – ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ

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



