



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΚΗΣ

Διδακτορική διατριβή

**Βιοχημικές και βιοφυσικές μελέτες πρωτεϊνικών μορίων που
σχετίζονται με το ανοσοποιητικό σύστημα**

Γεώργιος Ι. Μαυρίδης

Επιβλέπων Καθηγητής:

Μιχαήλ Καρπούζας, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α.

ΑΘΗΝΑ

2021

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΚΗΣ

Διδακτορική Διατριβή

**Βιοχημικές και βιοφυσικές μελέτες πρωτεϊνικών μορίων που
σχετίζονται με το ανοσοποιητικό σύστημα**

**“Biochemical and biophysical studies of protein molecules
related to the immune system”**

Γεώργιος Ι. Μαυρίδης

Μέλη Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Μιχαήλ Καρπούζας, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Ευστράτιος Στρατικός, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

Κωνσταντίνος Μπεθάνης, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

Μέλη Εξεταστικής Επιτροπής:

Αθανάσιος Παπακυριακού, Ερευνητής ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος

Ελένη Ντούνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΓΠΑ

Νικόλαος Λάμπρου, Καθηγητής ΓΠΑ

Εμμανουήλ Φλεμετάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

Βιοχημικές και βιοφυσικές μελέτες πρωτεϊνικών μορίων που σχετίζονται με το ανοσοποιητικό σύστημα

Τμήμα Βιοτεχνολογίας

Εργαστήριο Φυσικής

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το μείζον σύμπλοκο ιστοσυμβατότητας τάξης 1 (MHC I) αποτελεί ένα διαμεμβρανικό ετεροδιμερές πρωτεϊνικό σύμπλοκο, το οποίο εκφράζεται σε όλα τα εμπύρνηνα κύτταρα και παρουσιάζει αντιγονικά πεπτίδια (συνήθως μήκους 8-10 αμινοξέων) στα CD8⁺ T-κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα διαδραματίζοντας κομβικό ρόλο στην επίκτητη ανοσολογική απόκριση. Αμινοτελικά εκτεταμένοι πρόδρομοι αντιγονικοί επίτοποι εισέρχονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER), όπου υφίστανται επεξεργασία από την αμινοπεπτιδάση 1 του ενδοπλασματικού δικτύου (ERAP1) ώστε να μετατραπούν σε ώριμους επιτόπους και ύστερα να δεσμευτούν στα μόρια MHC I. Η ERAP1 καθορίζει την παραγωγή αντιγονικών πεπτιδίων, παίζει κομβικό ρόλο στη ρύθμιση της επίκτητης ανοσολογικής απόκρισης και αποτελεί ελκυστικό αναδυόμενο στόχο για την ανοσοθεραπεία του καρκίνου και τη ρύθμιση της αυτοανοσίας. Ωστόσο τα κριτήρια επιλογής βάσει των οποίων η ERAP1 επεξεργάζεται αποτελεσματικά ένα τεράστιο αριθμό πρόδρομων αντιγονικών πεπτιδίων δεν είναι πλήρως κατανοητά. Πρόσφατες μελέτες έχουν προτείνει ότι η ERAP1 μπορεί να καταβολίσει αντιγονικά πεπτίδια τόσο όταν τα τελευταία βρίσκονται ελεύθερα στο διάλυμα όσο και όταν είναι προσδεμένα στα μόρια MHC I. Αν και οι δύο αυτοί μηχανισμοί έχουν βασικές διαφορές στο πως επιλέγουν πεπτίδια, δεν είναι ξεκάθαρο ακόμα ποιος μηχανισμός είναι κυρίαρχος. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή προσεγγίστηκε το ανωτέρω ερώτημα ως εξής: α) πραγματοποιήθηκε σχηματισμός *in vitro* συμπλόκων MHC I με επιλεγμένα πεπτίδια διαφορετικού μεγέθους, β) μελετήθηκε η θερμοδυναμική και κινητική σταθερότητα των συμπλόκων με βιοφυσικές και βιοχημικές μεθόδους και γ) μελετήθηκε ενζυμικά η δράση της ERAP1 ως προς τον καταβολισμό πεπτιδίων ελεύθερων στο διάλυμα και στα προσχηματισμένα σύμπλοκα MHC I. Σε όλες τις περιπτώσεις, διαπιστώθηκε ότι υπόστρωμα του ενζύμου αποτελούν τα πεπτίδια που βρίσκονται ελεύθερα στο διάλυμα. Αντίθετα, τα πεπτίδια που βρίσκονται

δεσμευμένα στα σύμπλοκα MHC I είτε προστατεύονται πλήρως από την ενζυμική δράση είτε ο φαινομενικός καταβολισμός τους οφείλεται σε ταχεία αποδέσμευση από το σύμπλοκο και ακολούθως καταβολισμό στο διάλυμα. Εν κατακλείδι, τα αποτελέσματα αυτά ξεκάθαρα στηρίζουν τον μηχανισμό κατά τον οποίο η ERAP1 καταβολίζει πεπτίδια που είναι ελεύθερα στο διάλυμα και ως αποτέλεσμα η επιλογή αντιγονικών πεπτιδίων βασίζεται στην απ' ευθείας αλληλεπίδραση του ενζύμου με ελεύθερα πεπτίδια πριν τη δέσμευση στα MHC I.

Επιστημονική περιοχή: Βιοχημεία Πρωτεϊνών

Λέξεις κλειδιά: Ανοσοποιητικό σύστημα, αμινοπεπτιδάσες, μείζον σύμπλοκο ιστοσυμβατότητας, αντιγονοπαρουσίαση, ένζυμο

Biochemical and biophysical studies of protein molecules related to the immune system

Department of Biotechnology

Physics Laboratory

ABSTRACT

Major histocompatibility complex class I (MHC I) is a transmembrane heterodimeric protein complex, which is expressed in every nucleated cell and presents antigenic peptides (usually 8-10 residues in length) to CD8⁺ T-cytotoxic lymphocytes, thus playing important roles in adaptive immune responses. N-terminally extended antigenic peptide precursors enter the endoplasmic reticulum (ER), where they are proteolytically processed by endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 (ERAP1) and subsequently bind onto MHC I protein molecules. ERAP1 helps to define antigenic peptide production, indirectly regulates adaptive immune responses and therefore constitutes an attractive pharmacological target for cancer immunotherapy and the treatment of autoimmunity. However, the exact mechanism that allows ERAP1 to efficiently process a vast variety of antigenic peptide precursors is not fully understood. Recent studies have suggested that ERAP1 can catabolize antigenic peptides both when they are free in solution and when they are bound onto MHC I complexes. Those 2 mechanisms are fundamentally different in terms of how peptides are selected and it remains unclear which mechanism is dominant. This question was addressed in the present thesis as follows: a) formation of MHC I complexes was performed *in vitro* with selected peptides of different sizes, b) the thermodynamic and kinetic stability of the complexes was studied by using biochemical and biophysical methods and c) ERAP1 enzymatic activity was assessed towards the catabolism of peptides free in solution and bound onto preformed MHC I complexes. In every case studied the enzyme was highly effective in catabolizing free peptides in solution. On the contrary, peptides which are bound onto MHC I complexes are either fully protected from enzyme activity or their apparent catabolism occurs due to rapid dissociation from the complex and subsequent trimming in solution. In conclusion, the results presented in this thesis suggest that solution trimming is

the main mechanism by which ERAP1 generates antigenic peptides. Consequently, the selection of antigenic peptides depends on direct interactions between the enzyme and peptide substrates prior to binding onto MHC I.

Scientific area: Protein biochemistry

Key words: Immune system, aminopeptidases, major histocompatibility complex, antigen presentation, enzyme

Σκοπός

Η αμινοπεπτιδάση 1 του ενδοπλασματικού δικτύου (ERAP1) επεξεργάζεται αμινοτελικά εκτεταμένους πρόδρομους αντιγονικούς επιτόπους, ούτως ώστε οι ώριμοι επιτόποι να δεσμευτούν από τα μόρια του μείζονος συμπλόκου ιστοσυμβατότητας τάξης I (MHC I) και να παρουσιαστούν στα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα. Δυο πιθανά μοντέλα έχουν προταθεί ως προς τον τρόπο παραγωγής των ώριμων αντιγονικών επιτόπων από την ERAP1. Ο πρώτος μηχανισμός υποθέτει ότι το ένζυμο επεξεργάζεται τα πρόδρομα αντιγονικά πεπτίδια στο διάλυμα και βασίζεται στις μοναδικές του ιδιότητες ώστε να τα βελτιστοποιήσει πριν την πρόσδεση στο MHC I. Μετά τη δέσμευση στο σύμπλοκο τα πεπτίδια προστατεύονται από περεταίρω καταβολισμό. Ο δεύτερος μηχανισμός υποστηρίζει ότι τα αμινοτελικά εκτεταμένα πρόδρομα αντιγονικά πεπτίδια προσδένονται αρχικά στο MHC I και το ένζυμο τα επεξεργάζεται ενώ βρίσκονται ήδη δεσμευμένα στο σύμπλοκο. Ο σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής συνίσταται στη διερεύνηση του μηχανισμού ενζυμικής λειτουργίας της ERAP1, ώστε να διαπιστωθεί ποια από τις 2 υποθέσεις ανταποκρίνεται στην πραγματικότητα. Αν ευσταθεί ο πρώτος μηχανισμός, σημαίνει ότι το ελεύθερο πεπτίδιο αποτελεί το υπόστρωμα του ενζύμου και δεν υφίσταται αλληλεπίδραση με το MHC I. Επομένως, η παραγωγή ή η καταστροφή ώριμων αντιγονικών επιτόπων εξαρτάται αποκλειστικά από τις ιδιότητες της ERAP1. Ωστόσο, εάν επαληθεύεται ο

δεύτερος μηχανισμός, τότε υπόστρωμα του ενζύμου αποτελεί το σύμπλοκο MHC I με το μερικώς δεσμευμένο πεπτιδίο και η ενζυμική κινητική μεταβάλλεται. Σε αυτή την περίπτωση, η εκλεκτικότητα ως προς τη δημιουργία ώριμων αντιγονικών επιτόπων μετατοπίζεται μερικώς από την ERAP1 στο MHC I. Προκειμένου να διαπιστωθεί ποιος μηχανισμός ισχύει, θα εφαρμοστεί η ακόλουθη μεθοδολογία: Θα σχηματιστούν *in vitro* σύμπλοκα MHC I με τα αλληλόμορφα HLA-A*02:01 και HLA-B*08:01 και αμινοτελικά εκτεταμένα πεπτιδία. Στη συνέχεια, θα πραγματοποιηθεί παρακολούθηση της δυνατότητας της ERAP1 να καταβολίσει τα ανωτέρω πεπτιδία είτε ελεύθερα στο διάλυμα είτε ευρισκόμενα σε σύμπλοκο με τα αλληλόμορφα MHC I χρησιμοποιώντας βιοφυσικές και βιοχημικές μεθόδους. Η σύγκριση της δυνατότητας και της ταχύτητας καταβολισμού καθώς και των πεπτιδίων-προϊόντων που παράγονται θα συμβάλλει στη διερεύνηση του μηχανισμού που ισχύει *in vivo*. Επίσης, θα επιχειρηθεί να σχηματιστεί το τριμερές σύμπλοκο ERAP1-πεπτιδίο-MHC I, το οποίο αποτελεί στιγμιότυπο της ενζυμικής αντίδρασης *in vivo* σε περίπτωση που ισχύει ο δεύτερος μηχανισμός. Ο σχηματισμός ή μη του ανωτέρω συμπλόκου θα ελέγξει αν υφίσταται άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ του MHC I και της ERAP1, ώστε να διαπιστωθεί αν το ένζυμο πράγματι δύναται να έχει πρόσβαση στο αμινοτελικό άκρο του μερικώς δεσμευμένου πεπτιδίου. Για το σκοπό αυτό, θα χρησιμοποιηθούν μη υδρολυόμενα πεπτιδικά ανάλογα που φέρουν τη φωσφινική ομάδα στο αμινοτελικό τους άκρο και λειτουργούν ως αναστολείς της ERAP1. Αντιστοίχως, το καρβοξυτελικό άκρο του πεπτιδίου θα ακινητοποιηθεί στο MHC I μέσω σχηματισμού δισουλφιδικού δεσμού. Εν κατακλείδι, η συνολική προσέγγιση θα διαφωτίσει μια σημαντική πτυχή του μηχανισμού δράσης της ERAP1, η οποία αποτελεί καθοριστικό παράγοντα στα πλαίσια της στρατηγικής της φαρμακευτικής στόχευσης του ενζύμου.

Περιεχόμενα

Κεφάλαιο 1^ο: Εισαγωγή

- 1.1. Συνοπτική περιγραφή της δομής και της λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος - Σελίδα 14
- 1.2. Δυνητικές είσοδοι παθογόνων και αρχικοί αντιμικροβιακοί φραγμοί - Σελίδα 15
- 1.3. Μηχανισμοί έμφυτης ανοσίας - Σελίδα 15
- 1.4. Επίκτητη ανοσολογική απόκριση - Σελίδα 17
 - 1.4.1. Λειτουργία Β-λεμφοκυττάρων - Σελίδα 17
 - 1.4.2. Κατηγορίες Τ-λεμφοκυττάρων και η λειτουργία τους - Σελίδα 19
- 1.5. Δομή και λειτουργία του μείζονος συμπλόκου ιστοσυμβατότητας - Σελίδα 20
- 1.6. Πολυμορφισμοί των αλληλομόρφων HLA και συσχέτιση με ασθένειες - Σελίδα 25
- 1.7. Πολυμορφισμοί των αλληλομόρφων HLA και συσχέτιση με φαρμακευτικές παρενέργειες - Σελίδα 27
- 1.8. Οι κατηγορίες των μη-κλασσικών MHC I και οι λειτουργίες τους - Σελίδα 28
- 1.9. Η βιοχημική διαδικασία της δημιουργίας αντιγονικών πεπτιδίων και της αντιγονοπαρουσίασης - Σελίδα 31
 - 1.9.1. Προέλευση των αντιγονικών πεπτιδίων - Σελίδα 31
 - 1.9.2. Αποδόμηση των πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα και παραγωγή πεπτιδίων - Σελίδα 32
 - 1.9.3. Μεταφορά παραγόμενων πεπτιδίων στο ενδοπλασματικό δίκτυο - Σελίδα 33
 - 1.9.4. Συγκρότηση του συμπλόκου βαριάς αλυσίδας HLA I-β₂ μικροσφαιρίνης-αντιγονικού πεπτιδίου - Σελίδα 34
 - 1.9.5. Τελικός σταθμός ποιοτικού ελέγχου πεπτιδίων: η πρωτεΐνη TAPBPR - Σελίδα 36
 - 1.9.6. Βιοχημικό μονοπάτι αντιγονοπαρουσίασης στα μόρια MHC II - Σελίδα 38
- 1.10. Δομή και λειτουργία των ενζύμων ERAP1, ERAP2 και IRAP - Σελίδα 38

- 1.10.1. Δομή του ενζύμου ERAP1 - Περιγραφή του ενεργού κέντρου - Σελίδα 39
- 1.10.2. Λειτουργία και ιδιότητες της ERAP1 (επιλογή υποστρώματος, συμβολή στην αντιγονοπαρουσίαση και ρόλος των πολυμορφισμών στην αλλαγή δραστικότητας) - Σελίδα 41
- 1.10.3. Καθοριστική συμβολή της ERAAP στην αντιγονοπαρουσίαση - Σελίδα 43
- 1.10.4. Δομή και λειτουργία του ενζύμου ERAP2 - Σελίδα 44
- 1.10.5. Λειτουργία της IRAP και διαφορές συγκριτικά με την ERAP1 - Σελίδα 45
- 1.11. Πολυμορφισμοί των ενζύμων ERAP1 και ERAP2 και συσχέτιση με ασθένειες - Σελίδα 47
 - 1.11.1. Οι πολυμορφισμοί που συσχετίζονται με την εμφάνιση παθήσεων επιφέρουν αλλαγές στη δραστικότητα της ERAP1 ή στα επίπεδα έκφρασης - Σελίδα 47
 - 1.11.2. Πολυμορφισμοί της ERAP2 που επηρεάζουν τη δραστικότητα του ενζύμου ή τα επίπεδα έκφρασης - Σελίδα 50
- 1.12. Η συμβολή των αμινοπεπτιδασών ERAAP, ERAP1 και ERAP2 στην προδιάθεση για καρκίνο - Σελίδα 52
 - 1.12.1. Διαφυγή των καρκινικών κυττάρων από το ανοσοποιητικό σύστημα - Σελίδα 52
 - 1.12.2. Τα επίπεδα έκφρασης της έκφρασης της ERAAP επηρεάζουν την ανάπτυξη όγκων καρκινώματος του παχέος εντέρου στα ποντίκια - Σελίδα 52
 - 1.12.3. Τα επίπεδα έκφρασης ή/και δραστικότητας των ενζύμων ERAP1 και ERAP2 διαφέρουν μεταξύ υγιών ιστών και ορισμένων τύπων καρκίνου - Σελίδα 53

1.13. Πιθανοί βιοχημικοί μηχανισμοί παραγωγής αντιγονικών επιτόπων από την ERAP1 - Σελίδα 56

1.13.1. Βιοχημικές ενδείξεις που υποστηρίζουν τον καθένα από τους 2 πιθανούς μηχανισμούς - Σελίδα 57

1.13.2. Κρυσταλλογραφικά δεδομένα και προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής που υποστηρίζουν τον καθένα από τους 2 πιθανούς μηχανισμούς - Σελίδα 58

Κεφάλαιο 2^ο : Υλικά και μέθοδοι

2.1. Παρασκευή τρυβλίων Petri με στερεό θρεπτικό υλικό LB άγαρ - Σελίδα 60

2.2. Παρασκευή θρεπτικού υλικού υγρής βακτηριακής καλλιέργειας (LB) - Σελίδα 60

2.3. Παρασκευή θρεπτικού μέσου για ανάκαμψη των βακτηρίων μετά το μετασχηματισμό (SOC medium) - Σελίδα 60

2.4. Προετοιμασία δεκτικών προς μετασχηματισμό βακτηρίων *E.coli* στέλεχος BL21 DE3 και XL-1 Blue - Σελίδα 61

2.5. Διαδικασία μετασχηματισμού - Σελίδα 61

2.6. Έκφραση των πρωτεϊνών β₂ μικροσφαιρίνη και βαριάς αλυσίδας HLA-B*08:01 ως κυτταρικών εγκλείστων (inclusion bodies) - Σελίδα 62

2.7. Έκφραση της πρωτεϊνικής υπομονάδας HLA A*02:01 βαριά αλυσίδα ως κυτταρικών εγκλείστων (inclusion bodies) - Σελίδα 62

2.8. Διάρρηξη βακτηρίων, απομόνωση κυτταρικών εγκλείστων και διαλυτοποίηση των πρωτεϊνικών υπομονάδων - Σελίδα 63

2.9. Σχηματισμός *in vitro* (refolding) των συμπλόκων HLA B*08:01-b₂m-πεπτίδιο και HLA A*02:01-b₂m-πεπτίδιο - Σελίδα 65

2.10. Χρωματογραφία μοριακής διήθησης για την απομόνωση του πρωτεϊνικού συμπλόκου - Σελίδα 66

- 2.11. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από E.coli στέλεχος XL1-Blue - Σελίδα 67
- 2.12. Πέψη του πλασμιδιακού φορέα που φέρει το γονίδιο της βαριάς αλυσίδας του HLA B*08 με περιοριστικές ενδονουκλεάσες - Σελίδα 67
- 2.13. Ηλεκτροφόρηση πλασμιδιακού DNA σε πηκτή αγαρόζης - Σελίδα 68
- 2.14. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου παρουσία δωδεκανοθειικού νατρίου (SDS-PAGE) - Σελίδα 68
- 2.15. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου απουσία αποδιατακτικών και αναγωγικών παραγόντων (Native PAGE) - Σελίδα 70
- 2.16. Προσδιορισμός της θερμοδυναμικής σταθερότητας των πρωτεϊνικών συμπλόκων HLA μέσω θερμικής μετουσίωσης (differential scanning fluorimetry-DSF) - Σελίδα 70
- 2.17. Προσδιορισμός της θερμοδυναμικής σταθερότητας των πρωτεϊνικών συμπλόκων HLA με κυκλικό διχρωισμό - Σελίδα 71
- 2.18. Προσδιορισμός της κινητικής σταθερότητας των πρωτεϊνικών συμπλόκων HLA - Σελίδα 71
- 2.19. Χρωματογραφία ανάστροφης φάσης για τον έλεγχο καθαρότητας των πεπτιδίων LSILLKHKKAAL και ARAALRSRYWAI - Σελίδα 72
- 2.20. Έκφραση και καθαρισμός των αμινοπεπτιδασών του ενδοπλασματικού δικτύου 1 και 2 (ERAP1 + ERAP2) - Σελίδα 72
- 2.21. Προσδιορισμός κινητικής σταθερότητας των συμπλόκων B*08 με τα 12μερή πεπτίδια, σε ανταγωνισμό με 9μερές πεπτίδιο υψηλής συγγένειας - Σελίδα 74
- 2.22. Μέτρηση ενζυμικής δραστηριότητας των αμινοπεπτιδασών ERAP1 και ERAP2 - Σελίδα 75
- 2.23. Φασματομετρία μάζας MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization- Time of Flight Mass Spectrometry) για τη διερεύνηση του

καταβολισμού των πεπτιδίων από τις αμινοπεπτιδάσες ERAP1, ERAP2 και LAP - Σελίδα 75

2.24. Κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση - Σελίδα 76

2.25. Βάσεις δεδομένων για την επιλογή των πεπτιδίων - Σελίδα 77

Κεφάλαιο 3^ο: Αποτελέσματα

3.1. Σχηματισμός *in vitro* των πρωτεϊνικών συμπλόκων HLA-A*02 με τα πεπτίδια GLIEKNIEL, FVLELEPEWTVK και FLNKDLEVDGHFVTM - Σελίδα 79

3.1.1. Σχηματισμός συμπλόκου HLA-A*02 με το πεπτίδιο GLIEKNIEL – Σελίδα 80

3.1.2. Σχηματισμός συμπλόκου HLA-A*02 με το πεπτίδιο FVLELEPEWTVK - Σελίδα 81

3.1.3. Σχηματισμός συμπλόκου HLA-A*02 με το πεπτίδιο FLNKDLEVDGHFVTM – Σελίδα 82

3.2. Βιοφυσικός προσδιορισμός της θερμοδυναμικής και κινητικής σταθερότητας των συμπλόκων HLA-A*02 με τα πεπτίδια GLIEKNIEL, FVLELEPEWTVK και FLNKDLEVDGHFVTM – Σελίδα 84

3.2.1. Προσδιορισμός της θερμοδυναμικής σταθερότητας μέσω θερμικής μετουσίωσης παρουσία της υδρόφοβης χρωστικής Sypro Orange – Σελίδα 85

3.2.2. Προσδιορισμός της κινητικής σταθερότητας παρουσία της υδρόφοβης χρωστικής Sypro Orange - Σελίδα 86

3.2.3. Προσδιορισμός χρόνου ημιζωής του συμπλόκου HLA A*02-FVLELEPEWTVK κατόπιν επώασης με το 9μερές πεπτίδιο υψηλής συγγένειας GLIEKNIEL - Σελίδα 87

3.3. Παρακολούθηση του καταβολισμού των πεπτιδίων FVLELEPEWTVK και FLNKDLEVDGHFVTM από την αμινοπεπτιδάση ERAP1 κατόπιν επώασης

στους 37 °C. Τα πεπτίδια ανιχνεύονται με φασματομετρία μάζας MALDI – TOF
– Σελίδα 87

3.4. Σχηματισμός *in vitro* των πρωτεϊνικών συμπλόκων HLA-B*08 με τα πεπτίδια ELRSRYWAI, ALRSRYWAI, LSILLKHKKAAL και ARAALRSRYWAI -
Σελίδα 90

3.4.1. Σχηματισμός συμπλόκου HLA-B*08 με το πεπτίδιο ALRSRYWAI
- Σελίδα 91

3.4.2. Σχηματισμός συμπλόκου HLA-B*08 με το πεπτίδιο ELRSRYWAI
- Σελίδα 92

3.4.3. Σχηματισμός συμπλόκου HLA-B*08 με το πεπτίδιο
ARAALRSRYWAI - Σελίδα 93

3.4.4. Σχηματισμός συμπλόκου HLA-B*08 με το πεπτίδιο
LSILLKHKKAAL - Σελίδα 94

3.4.5. Ηλεκτροφόρηση απουσία αναγωγικών και αποδιατακτικών
παραγόντων των 4 διαφορετικών συμπλόκων HLA-B*08 - Σελίδα 95

3.5. Βιοφυσικός προσδιορισμός της θερμοδυναμικής και κινητικής
σταθερότητας των συμπλόκων HLA-B*08 με τα πεπτίδια ALRSRYWAI,
ELRSRYWAI, ARAALRSRYWAI και LSILLKHKKAAL - Σελίδα 95

3.5.1. Προσδιορισμός της θερμοδυναμικής σταθερότητας μέσω
θερμικής μετουσίωσης παρουσία της υδρόφοβης χρωστικής Sypro
Orange - Σελίδα 97

3.5.2. Προσδιορισμός της θερμοδυναμικής σταθερότητας μέσω
κυκλικού διχρωσισμού - Σελίδα 98

3.5.3. Προσδιορισμός κινητικής σταθερότητας παρουσία της υδρόφοβης
χρωστικής Sypro Orange - Σελίδα 99

3.5.4. Προσδιορισμός χρόνου ημιζωής των συμπλόκων HLA B*08-
LSILLKHKKAAL και HLA B*08-ARAALRSRYWAI κατόπιν επώασης με
το 9μερές πεπτίδιο υψηλής συγγένειας ALRSRYWAI - Σελίδα 100

3.6. Παρακολούθηση του καταβολισμού των 12μερών πεπτιδίων LSILLKHKKAAL και ARAALRSRYWAI από τις αμινοπεπτιδάσες ERAP1, ERAP2 και LAP, κατόπιν επώασης στους 37 °C. Τα πεπτίδια ανιχνεύονται με φασματομετρία μάζας MALDI-TOF - Σελίδα 101

3.6.1. Επώαση του πεπτιδίου LSILLKHKKAAL και του συμπλόκου HLA B08-LSILLKHKKAAL με τις αμινοπεπτιδάσες ERAP1 και ERAP2 - Σελίδα 101

3.6.2. Επώαση του πεπτιδίου ARAALRSRYWAI και του συμπλόκου HLA B*08-ARAALRSRYWAI με την αμινοπεπτιδάση ERAP1 - Σελίδα 103

3.6.3. Επώαση του πεπτιδίου ARAALRSRYWAI και του συμπλόκου HLA B*08-ARAALRSRYWAI με τις αμινοπεπτιδάσες ERAP2 και LAP - Σελίδα 106

3.7. Παρακολούθηση του καταβολισμού του πεπτιδίου ARAALRSRYWAI όταν βρίσκεται σε σύμπλοκο με το HLA-B*08, από τις αμινοπεπτιδάσες ERAP1 και ERAP2. Η αντίδραση παρακολουθείται με Native PAGE - Σελίδα 110

3.8. Πραγματοποίηση σημειακής μετάλλαξης (E76C) στη βαριά αλυσίδα του HLA-B*08 και σχηματισμός *in vitro* των συμπλόκων HLA-B*08 E76C-ALRSRYWCI και HLA-B*08 E76C-ARAALRSRYWCI. Βιοφυσικός προσδιορισμός της θερμοδυναμικής σταθερότητας των ανωτέρω συμπλόκων. - Σελίδα 114

3.8.1. Σχηματισμός συμπλόκου HLA-B*08 E76C-ARAALRSRYWCI - Σελίδα 115

3.8.2. Προσδιορισμός της θερμοδυναμικής σταθερότητας των συμπλόκων HLA-B*08 E76C-ALRSRYWCI και HLA-B*08 E76C-ARAALRSRYWCI - Σελίδα 116

3.8.3. Προσδιορισμός κινητικής σταθερότητας του συμπλόκου HLA-B*08 E76C-ARAALRSRYWCI - Σελίδα 117

3.8.4. Επώαση του συμπλόκου HLA-B*08 E76C-ARAALRSRYWCI με την αμινοπεπτιδάση ERAP1 και υποβολή των δειγμάτων σε Native PAGE - Σελίδα 118

3.9. Έλεγχος σχηματισμού του τριμερούς συμπλόκου HLA B*08- φωσφινικό ψευδοπεπτίδιο-ERAP1 – Σελίδα 119

3.9.1. Σχηματισμός *in vitro* του πρωτεϊνικού συμπλόκου HLA-B*08 με το φωσφινικό ψευδοπεπτίδιο DG078 - Σελίδα 120

3.9.2. Βιοφυσικός προσδιορισμός θερμοδυναμικής και κινητικής σταθερότητας του συμπλόκου HLA-B*08 με το ψευδοπεπτίδιο DG078 – Σελίδα 121

3.9.3. Προσδιορισμός της σταθεράς αναστολής του DG078 έναντι της δραστηριότητας των αμινοπεπτιδασών ERAP1, ERAP2 και LAP - Σελίδα 122

3.9.4. Native PAGE του συμπλόκου B*08-DG078 παρουσία της αμινοπεπτιδάσης ERAP1 ή της ERAP2 για τον έλεγχο σχηματισμού τριμερούς συμπλόκου - Σελίδα 122

3.9.5. Προσδιορισμός της σταθεράς αναστολής του συμπλόκου B*08-DG078 έναντι της δραστηριότητας των αμινοπεπτιδασών ERAP1 και LAP - Σελίδα 123

3.10. Έλεγχος σχηματισμού του τριμερούς συμπλόκου HLA B*08 E76C- φωσφινικό ψευδοπεπτίδιο-ERAP1 - Σελίδα 125

3.10.1. Σχηματισμός *in vitro* του πρωτεϊνικού συμπλόκου HLA-B*08 E76C με το φωσφινικό ψευδοπεπτίδιο DG080 - Σελίδα 126

3.10.2. Προσδιορισμός της σταθεράς αναστολής του DG080 έναντι της δραστηριότητας της αμινοπεπτιδάσης ERAP1 και βιοφυσικός προσδιορισμός της θερμοδυναμικής σταθερότητας του συμπλόκου HLA B*08 E76C-DG080 - Σελίδα 127

3.10.3. Διερεύνηση του πιθανού σχηματισμού του τριμερούς συμπλόκου ERAP1-DG080-HLA B*08 E76C - Σελίδα 128

3.11. Παρακολούθηση του καταβολισμού των πεπτιδίων FLNKDLEVDGHHFVTM και LSILLKHKKAAL όταν βρίσκονται δεσμευμένα στα σύμπλοκα HLA A*02 και HLA B*08 w.t. αντιστοίχως, από την αμινοπεπτιδάση ERAP1 παρουσία της συνοδού πρωτεΐνης TAPBPR ή του διμερούς ταπασίνης/δισουλφιδικής ισομεράσης ERp57 - Σελίδα 129

Κεφάλαιο 4^ο: Συμπεράσματα-Συζήτηση - Σελίδα 131

Βιβλιογραφία - Σελίδα 137

Ευχαριστίες - Σελίδα 153

Παράρτημα - Σελίδα 154

Κεφάλαιο 1^ο: Εισαγωγή

1.1. Συνοπτική περιγραφή της δομής και της λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος

Ο οργανισμός αντιμετωπίζει καθημερινά ένα ευρύ φάσμα παθογόνων μικροοργανισμών (βακτήρια, μύκητες, ιοί, πρωτόζωα) και των βλαβερών βιομορίων που ορισμένα παράγουν (π.χ. τοξίνες). Ο οργανισμός προστατεύεται από τις μολύνσεις και τις λοιμώξεις μέσω του ανοσοποιητικού συστήματος, το οποίο επιτελεί τις λειτουργίες της αναγνώρισης των παθογόνων, του περιορισμού και ει δυνατόν της εξάλειψης της μόλυνσης, της ρύθμισης της ανοσολογικής απόκρισης και της ανοσολογικής μνήμης. Το ανοσοποιητικό σύστημα στηρίζεται στη δράση των λευκών αιμοσφαιρίων ή λευκοκυττάρων. Όλα τα είδη λευκοκυττάρων προέρχονται από πολυδύναμα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα στο μυελό των οστών. Τα βλαστοκύτταρα διαφοροποιούνται σε ένα κοινό μυελοειδή πρόγονο, ο οποίος στη συνέχεια διαφοροποιείται στα κύτταρα που συμμετέχουν στην έμφυτη και επίκτητη ανοσολογική απόκριση: δενδριτικά κύτταρα, μακροφάγα, πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα, ιστιοκύτταρα, φυσικά κύτταρα φονείς, T-λεμφοκύτταρα και B-λεμφοκύτταρα. Τα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα περιλαμβάνουν 3 διακριτές κατηγορίες κυττάρων: ουδετερόφιλα, ηωσινόφυλλα και βασεόφιλα. Τα λευκοκύτταρα εντοπίζονται σε μεγάλους αριθμούς στα λεμφοειδή όργανα, τα οποία αποτελούνται από οργανωμένα συσσωματώματα λευκοκυττάρων εντός ενός πλαισίου μη λεμφοειδών κυττάρων. Ο μυελός των οστών αποτελεί ένα από τα δύο κεντρικά λεμφοειδή όργανα, μαζί με το θύμο αδένα. Αφού ωριμάσουν είτε στο μυελό των οστών είτε στο θύμο αδένα, τα λευκοκύτταρα μεταναστεύουν για να προστατεύσουν τους περιφερειακούς ιστούς. Εισέρχονται στο κυκλοφορικό και το λεμφικό σύστημα ενώ άλλα διατηρούνται στα περιφερειακά λεμφοειδή όργανα, δηλαδή τους λεμφαδένες και το σπλήνα. Λευκοκύτταρα βρίσκονται επίσης στους επιθηλιακούς ιστούς που αποτελούν το βλεννογόνο της αναπνευστικής, γαστρεντερικής και της αναπαραγωγικής οδού (1).

1.2. Δυνητικές εισοδοί παθογόνων και αρχικοί αντιμικροβιακοί φραγμοί

Αρχικά, ένας παθογόνος μικροοργανισμός πρέπει να διαπεράσει την πρώτη γραμμή άμυνας ώστε να εισέλθει στον οργανισμό. Δυνητικές εισόδους αποτελούν το δέρμα, η γαστρεντερική, η αναπνευστική και αναπαραγωγική οδός. Ωστόσο, όλες προστατεύονται από μηχανικούς, χημικούς και μικροβιολογικούς φραγμούς. Το δέρμα αποτελεί έναν πολύ ισχυρό φραγμό όταν δεν έχει διαρραγεί (π.χ. πληγή, έγκαυμα). Τα επιθηλιακά κύτταρα του δέρματος είναι στενά συνδεδεμένα μεταξύ τους, ενώ η εξωτερική ξηρή στιβάδα νεκρών κυττάρων εμποδίζει αποτελεσματικά την είσοδο. Ακόμη, τα επιθηλιακά κύτταρα εκκρίνουν τρεις κατηγορίες αντιμικροβιακών πεπτιδίων: τις δεφενσίνες, τις καθελισιδίνες και τις ιστατίνες. Ο στόμαχος διαθέτει επιπλέον χαμηλό pH και ένζυμα όπως η πεψίνη, που καθιστούν το περιβάλλον αφιλόξενο για τον πολλαπλασιασμό των παθογόνων. Τα επιθήλια του βλεννογόνου της αναπνευστικής οδού εκκρίνουν επίσης βλέννα με υψηλό ιξώδες, στην οποία εγκλωβίζονται οι μικροοργανισμοί και απομακρύνονται με την κίνηση των επιθηλιακών βλεφαρίδων. Η βλέννα περιέχει αρκετές γλυκοπρωτεΐνες με αντιμικροβιακή δράση, τις βλεννίνες. Τα ένζυμα λυσοζύμη και φωσφολιπάση A₂, τα οποία διασπούν το κυτταρικό τοίχωμα βακτηρίων, εκκρίνονται στο σίελο και στα δάκρυα. Τέλος, η φυσιολογική μικροχλωρίδα που αποτελείται από τους συμβιωτικούς μικροοργανισμούς του ξενιστή, ανταγωνίζεται τα παθογόνα στην εύρεση επιφάνειας προσκόλλησης και στην πρόσληψη θρεπτικών στοιχείων (2, 3).

1.3. Μηχανισμοί έμφυτης ανοσίας

Στην περίπτωση που ένα παθογόνο καταφέρει να διαπεράσει τους φραγμούς των επιθηλίων και τις αρχικές αντιμικροβιακές άμυνες ώστε να εισέλθει στον οργανισμό, τότε αντιμετωπίζει τους μηχανισμούς της έμφυτης ανοσίας. Ο πρώτος μηχανισμός που ενεργοποιείται άμεσα είναι το σύστημα του συμπληρώματος. Το συμπλήρωμα αποτελείται από τουλάχιστον 30 διαφορετικές διαλυτές πρωτεΐνες, οι οποίες παράγονται κυρίως στο ήπαρ και εντοπίζονται στο πλάσμα του αίματος (4, 5). Πρωτεΐνες του συμπληρώματος προσδένονται σε συγκεκριμένες συντηρημένες δομές υδατανθράκων στο κυτταρικό τοίχωμα παθογόνων όπως κατάλοιπα μαννόζης, φουκόζης, N-

ακετυλογλυκοζαμίνης και λιποπολυσακχαρίτες. Ύστερα ενεργοποιούν βιοχημικά μονοπάτια που οδηγούν στην προσέλκυση φαγοκυττάρων, στην πρόκληση φλεγμονής και στη δημιουργία πόρων στην κυτταρική μεμβράνη των παθογόνων με συνεπακόλουθη την κυτταρική τους λύση. Ακόμη, η δράση του συμπληρώματος οδηγεί στην οψωνίωση, δηλαδή την πρόσδεση των πρωτεϊνών στο παθογόνο ώστε να αναγνωριστεί από υποδοχείς των φαγοκυττάρων, να εισέλθει στο κυτταρόπλασμα τους και να καταστραφεί (6). Ωστόσο, αν το παθογόνο ξεκινήσει να πολλαπλασιάζεται, στις περισσότερες περιπτώσεις αναγνωρίζεται άμεσα από τα ίδια τα φαγοκύτταρα. Στα φαγοκύτταρα ανήκουν τρεις κατηγορίες λευκοκυττάρων που συμμετέχουν στην έμφυτη ανοσία: τα μακροφάγα, τα πολυμορφοπύρηνα λευκοκύτταρα και τα δενδριτικά κύτταρα. Τα μακροφάγα και τα πολυμορφοπύρηνα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην έμφυτη ανοσία, καθώς αναγνωρίζουν και καταστρέφουν πολλά παθογόνα χωρίς τη συμμετοχή της επίκτητης ανοσίας (7). Διαθέτουν πληθώρα υποδοχέων στην κυτταρική μεμβράνη (υποδοχείς μαννόζης, υποδοχείς τριπεπτιδίου φορμυλομεθειονίνης-λευκίνης-φαινυλαλανίνης, Toll-like υποδοχείς, NOD-like υποδοχείς) οι οποίοι αναγνωρίζουν συντηρημένα βιομόρια (pathogen associated molecular patterns) κοινά σε πολλά παθογόνα (8). Ύστερα το παθογόνο εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα των φαγοκυττάρων με τις διαδικασίες της φαγοκυττάρωσης, της μακροπυνοκύτωσης και της ενδοκύτωσης με τη διαμεσολάβηση υποδοχέων. Το παθογόνο βρίσκεται ενσωματωμένο σε κυστίδιο, το οποίο συγχωνεύεται με λυσόσωμα σχηματίζοντας το φαγολυσίσωμα. Το φαγολυσίσωμα καταστρέφει τα παθογόνα μέσω οξειδωσης (pH 3.5-4), δράσης πρωτεασών, λιπασών και νουκλεασών. Επίσης, επιστρατεύονται δραστικές μορφές οξυγόνου (υπεροξειδίου του υδρογόνου, ρίζα υδροξυλίου, ανιόν υπεροξειδίου O_2^-), μονοξειδίου του αζώτου και η πρωτεΐνη γαλακτοφερρίνη (9). Η παρουσία παθογόνων διεγείρει τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα στην παραγωγή κυτοκινών (ογκονεκρωτικός παράγοντας-α, ιντερλευκίνες, αντιικές ιντερφερόνες) και χημειοκινών οι οποίες επάγουν τη φλεγμονή. Τα χαρακτηριστικά της φλεγμονής συνίστανται σε αύξηση της θερμοκρασίας, της ροής του αίματος και διαστολής των αγγείων. Η παραγωγή κυτοκινών ενεργοποιεί μια σειρά βιοχημικών μονοπατιών που συμβάλλουν καθοριστικά στην καταπολέμηση της μόλυνσης. Επάγεται η προσέλκυση περισσότερων ουδετερόφιλων, μακροφάγων και

ανώριμων δενδριτικών κυττάρων από το πλάσμα του αίματος στον προσβεβλημένο ιστό, ώστε να αυξηθεί η καταστροφή των εισβαλλόντων παθογόνων. Τα κύτταρα του ήπατος διεγείρονται προς την έκφραση πρωτεϊνών οξειάς φάσης (C-αντιδρώσα πρωτεΐνη, λεκτίνες που δεσμεύουν μαννόζη), οι οποίες αναγνωρίζουν χαρακτηριστικά βιομόρια των παθογόνων και διευκολύνουν την οψωνίωσή τους και την ενεργοποίηση του συμπληρώματος. Τα φυσικά κύτταρα φονείς ενεργοποιούνται ως απόκριση στις ιντερφερόνες αυξάνοντας την δραστηριότητά τους κατά 20-100 φορές. Καταστρέφουν κύτταρα προσβεβλημένα από ιούς και ορισμένα ενδοκυτταρικά παράσιτα, περιορίζοντας τις ιικές μολύνσεις πριν την έναρξη της επίκτητης ανοσολογικής απόκρισης (10). Τέλος, επάγεται η πήξη του αίματος στο σημείο, ώστε να περιοριστεί η μόλυνση.

1.4. Επίκτητη ανοσολογική απόκριση

1.4.1. Λειτουργία Β-λεμφοκυττάρων

Η έμφυτη ανοσία ενεργοποιείται άμεσα και υπερασπίζεται αρχικά τον οργανισμό από τη μόλυνση, όμως δρα αποτελεσματικά μόνο εναντίον παθογόνων που φέρουν συγκεκριμένα συντηρημένα χαρακτηριστικά ενώ η επίκτητη ανοσία καλείται να αναγνωρίσει ένα τεράστιο εύρος διαφορετικών αντιγόνων προερχόμενων από παθογόνους μικροοργανισμούς. Η επίκτητη ανοσολογική απόκριση βασίζεται σε δύο κύριες κατηγορίες λεμφοκυττάρων, τα T- και Β-λεμφοκύτταρα. Ο διαμεμβρανικός υποδοχέας των Β-λεμφοκυττάρων δεσμεύει απευθείας αντιγόνα από το εξωκυτταρικό περιβάλλον ή την επιφάνεια του παθογόνου με αποτέλεσμα τα Β-λεμφοκύτταρα να διαφοροποιούνται σε πλασματοκύτταρα. Τα πλασματοκύτταρα παράγουν αντισώματα, τα οποία αποτελούν την εκκρινόμενη μορφή του υποδοχέα Β-λεμφοκυττάρων και διαθέτουν πανομοιότυπη εξειδίκευση ως προς το αντιγόνο που αναγνωρίζουν. Τα αντισώματα η ανοσοσφαιρίνες αποτελούνται από 4 πολυπεπτιδικές αλυσίδες συνολικού μοριακού βάρους 150 kDa, εκ των οποίων 2 πανομοιότυπες βαριές (50 kDa) και 2 πανομοιότυπες ελαφριές μοριακού βάρους 25 kDa. Κάθε πολυπεπτιδική αλυσίδα διαθέτει μια μεταβλητή περιοχή στο αμινοτελικό της άκρο, η οποία συμβάλλει στη διαμόρφωση των 2 πανομοιότυπων σημείων πρόσδεσης του αντιγονικού καθοριστή, του τμήματος

του αντιγόνου που αναγνωρίζει το αντίσωμα (11, 12). Το αντίσωμα προσδένεται εκλεκτικά σε συγκεκριμένο αντιγόνο και προστατεύει τα κύτταρα του ξενιστή μέσω των ακόλουθων διεργασιών: την αναγνώριση και καταστροφή του παθογόνου από τα φαγοκύτταρα μέσω οψωνίωσης, την ενεργοποίηση των πρωτεϊνών του συμπληρώματος και την εξουδετέρωση του παθογόνου μέσω του αποκλεισμού της εισόδου στα κύτταρα του ξενιστή (1). Τα γονίδια που κωδικοποιούν τις μεταβλητές περιοχές των αντισωμάτων κληρονομούνται ως τμήματα γονιδίων, που το καθένα κωδικοποιεί τμήμα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας (13). Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των Β-λεμφοκυττάρων στο μυελό των οστών, αυτά τα τμήματα DNA συνενώνονται μέσω σωματικού ανασυνδυασμού κωδικοποιώντας μια πλήρη μεταβλητή περιοχή. Δύναται με αυτή τη διαδικασία να δημιουργηθεί ένα τεράστιο εύρος αντισωμάτων με διαφορετική αλληλουχία αμινοξέων και επομένως εξειδίκευση, ο συνολικός αριθμός των οποίων εκτιμάται ότι στον άνθρωπο ανέρχεται τουλάχιστον σε 10^{11} (14). Τα Β-λεμφοκύτταρα συμμετέχουν επίσης στη λειτουργία της ανοσολογικής μνήμης. Β-λεμφοκύτταρα μνήμης εντοπίζονται στο σπλήνα και τους λεμφαδένες καθώς και στο κυκλοφορικό σύστημα, ενώ εκφράζουν συνυποδοχείς στην κυτταροπλασματική μεμβράνη που τα ξεχωρίζουν από αδιαφοροποίητα Β-λεμφοκύτταρα και πλασματοκύτταρα. Τα περισσότερα πλασματοκύτταρα έχουν χρονική διάρκεια ζωής 2-4 ημέρες και ύστερα υφίστανται απόπτωση. Β-λεμφοκύτταρα τα οποία έχουν επιβιώσει και υποστεί διαφοροποίηση κατόπιν έκθεσης σε αντιγόνο μετατρέπονται σε κύτταρα μνήμης. Ακόμη, μετακινούνται από τα περιφερειακά λεμφοειδή όργανα ως προ-πλασματοκύτταρα και ύστερα μετατρέπονται σε μακρόβια κύτταρα παραγωγής αντισωμάτων. Σε επόμενες μολύνσεις από το ίδιο παθογόνο, αυξάνεται τόσο η συγγένεια των αντισωμάτων για συγκεκριμένο αντιγόνο όσο και η συγκέντρωσή τους, ως αποτέλεσμα της ανοσοποίησης (15).

1.4.2. Κατηγορίες T-λεμφοκυττάρων και η λειτουργία τους

Τα T-λεμφοκύτταρα διακρίνονται σε 3 μεγάλες κατηγορίες: τα κυτταροτοξικά, τα βοηθητικά και τα ρυθμιστικά. Τα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα δρουν εναντίον κυττάρων προσβεβλημένων από ιούς και υποχρεωτικώς ενδοκυτταρικά παράσιτα, όπως ορισμένα βακτήρια (21, 22). Δύνανται να εξοντώσουν κύτταρα σε όλους τους ιστούς συμπεριλαμβανομένου του εγκεφάλου, καθώς μελέτες *in vitro* έδειξαν ότι τα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα μπορούν να εξοντώσουν όλους τους τύπους κυττάρων του κεντρικού νευρικού συστήματος (23). Τα βοηθητικά T-λεμφοκύτταρα περιλαμβάνουν τουλάχιστον 4 διαφορετικούς τύπους κυττάρων (T_{H1}, T_{H2}, T_{H17} και T_{FH}), τα οποία επιτελούν τις ακόλουθες λειτουργίες: ενεργοποιούν μακροφάγα προσβεβλημένα από παθογόνα, διεγείρουν τα B-λεμφοκύτταρα προς παραγωγή αντισωμάτων και ενισχύουν την απόκριση των ουδετερόφιλων και των ηωσινόφιλων. Τα ρυθμιστικά T-λεμφοκύτταρα συμμετέχουν στον περιορισμό της ανοσολογικής απόκρισης και συμμετέχουν στη ρύθμιση της αυτο-ανοσίας (16). Ακόμη, επαναφέρουν την ομοιόσταση, ύστερα από την επιτυχή καταπολέμηση μιας μόλυνσης. Η ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων ώστε να συμμετέχουν σε μια επίκτητη ανοσολογική απόκριση, απαιτεί την αναγνώριση ενός αντιγόνου (17). Σε αντίθεση με τα B-λεμφοκύτταρα, οι υποδοχείς των T-λεμφοκυττάρων δεν αναγνωρίζουν αντιγόνα στο εξωκυτταρικό περιβάλλον ή στην επιφάνεια των παθογόνων. Ο υποδοχέας των T-λεμφοκυττάρων αναγνωρίζει αντιγονικά πεπτίδια, μόνο όταν τα τελευταία βρίσκονται προσδεμένα σε ένα διαμεμβρανικό πρωτεϊνικό σύμπλοκο στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των κυττάρων-στόχων. Το προαναφερθέν σύμπλοκο ονομάζεται μείζον σύμπλοκο ιστοσυμβατότητας. Ο υποδοχέας των T-λεμφοκυττάρων (T-cell receptor) αποτελείται από δυο διαφορετικές διαμεμβρανικές πολυπεπτιδικές αλυσίδες (την α και τη β), οι οποίες ενώνονται μεταξύ τους με δισουλφιδικό δεσμό. Κάθε πολυπεπτιδική αλυσίδα αποτελείται από μια μεταβλητή αμινοτελική και μια σταθερή καρβοξυτελική περιοχή, ενώ οι μεταβλητές περιοχές συγκροτούν τη θέση πρόσδεσης του αντιγόνου. Κάθε T-λεμφοκύτταρο εκτιμάται ότι φέρει κατά προσέγγιση 30.000 υποδοχείς στην κυτταροπλασματική του μεμβράνη (18). Ο ανασυνδυασμός και η αναδιάταξη των γονιδίων που κωδικοποιούν τις πολυπεπτιδικές αλυσίδες του υποδοχέα T-λεμφοκυττάρων πραγματοποιείται

στο θυρεοειδή αδένα, ενώ ο βιοχημικός μηχανισμός είναι παρόμοιος με αυτόν της δημιουργίας των υποδοχέων των Β-λεμφοκυττάρων (1). Ενώ ο Τ-υποδοχέας είναι κοινός σε όλους τους τύπους Τ-λεμφοκυττάρων, μια σημαντική διαφορά μεταξύ των διαφορετικών τύπων Τ-λεμφοκυττάρων ως προς την αναγνώριση των κυττάρων-στόχων, έγκειται στην έκφραση δυο συνυποδοχέων. Τα κυτταροτοξικά Τ-λεμφοκύτταρα εκφράζουν το συνυποδοχέα CD8, ενώ τα βοηθητικά και τα ρυθμιστικά Τ-λεμφοκύτταρα εκφράζουν το συνυποδοχέα CD4. Οι συγκεκριμένοι διαμεμβρανικοί συνυποδοχείς (ανάλογα με τον τύπο Τ-λεμφοκυττάρου) προσδένονται στο μείζον σύμπλοκο ιστοσυμβατότητας κατά την αναγνώριση του αντιγονικού πεπτιδίου από τον υποδοχέα των Τ-λεμφοκυττάρων, αλλά σε διαφορετική περιοχή από αυτήν που βρίσκεται δεσμευμένο το πεπτίδιο (19).

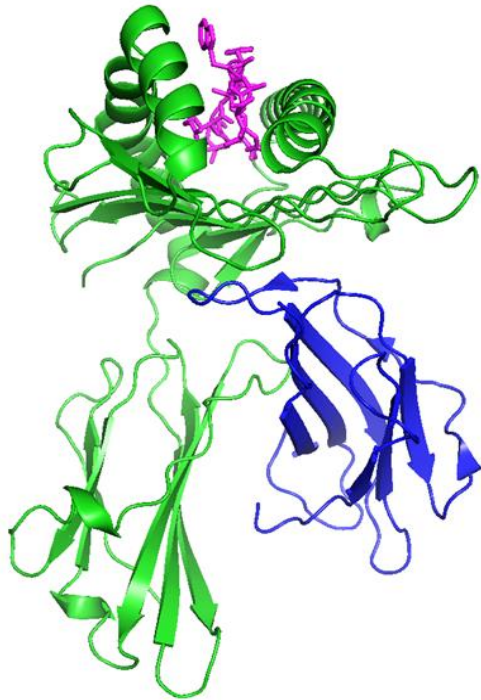
1.5. Δομή και λειτουργία του μείζονος συμπλόκου ιστοσυμβατότητας

Το μείζον σύμπλοκο ιστοσυμβατότητας (major histocompatibility complex, MHC) ή HLA (Human Leukocyte Antigen) διακρίνεται σε δυο κατηγορίες: το MHC I και το MHC II. Το MHC I εκφράζεται σε όλα τα εμπύρνηνα κύτταρα (πλην ερυθρών αιμοσφαιρίων) και αναγνωρίζεται από τα CD8⁺ κυτταροτοξικά Τ-λεμφοκύτταρα. Αντίθετα, το MHC II εκφράζεται μόνο στα δενδριτικά κύτταρα, τα μακροφάγα και τα Β-λεμφοκύτταρα, όπου και αναγνωρίζεται από τις κατηγορίες των βοηθητικών και των ρυθμιστικών Τ-λεμφοκυττάρων που εκφράζουν το συνυποδοχέα CD4 (20). Το μείζον σύμπλοκο ιστοσυμβατότητας II αποτελείται από 2 διαμεμβρανικές γλυκοζυλιωμένες πολυπεπτιδικές αλυσίδες, την α (34 kDa) και τη β (29 kDa), οι οποίες δεν συνδέονται ομοιοπολικά. Κάθε αλυσίδα διαθέτει 2 τομείς, εκ των οποίων οι τομείς α₁ και β₁ σχηματίζουν την αύλακα πρόσδεσης του αντιγονικού πεπτιδίου (20). Τα αντιγονικά πεπτίδια που δεσμεύονται στο MHC τάξης II έχουν μήκος τουλάχιστον 13 αμινοξέων ενώ δύνανται να προσδεθούν και αρκετά μεγαλύτερα. Υπάρχουν 3 ζεύγη MHC II γονιδίων που κωδικοποιούν την α- και β-αλυσίδα, τα οποία ονομάζονται HLA-DR, HLA-DP και HLA-DQ. Με εξαίρεση την α αλυσίδα του HLA-DR, όλες οι άλλες πολυπεπτιδικές αλυσίδες είναι πολυμορφικές (24).



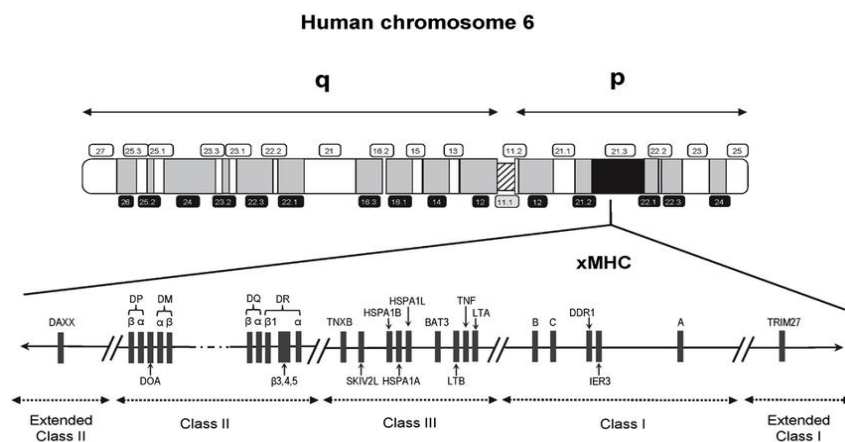
Εικόνα 1: Δομή του αλληλομόρφου HLA-DR15 του μείζονος συμπλόκου ιστοσυμβατότητας II (κωδικός PDB: 6CPO). Διακρίνονται η α αλυσίδα (πράσινο) και η β αλυσίδα (μπλε) που σχηματίζουν από κοινού την αύλακα πρόσδεσης του υποστρώματος, όπου προσδένεται το αντιγονικό πεπτιδίο RFYKTLRAEQASQ (μωβ).

Το μείζον σύμπλοκο ιστοσυμβατότητας τάξης I αποτελεί ένα διαμεμβρανικό ετεροδιμερές πρωτεϊνικό σύμπλοκο. Η βαριά πολυπεπτιδική αλυσίδα είναι πολυμορφική και έχει μοριακό βάρος 43 kDa, ενώ σε γονιδιακό επίπεδο αποτελείται από 8 εξώνια και 7 εσώνια. Η ελαφριά αλυσίδα ονομάζεται β_2 μικροσφαιρίνη, έχει μοριακό βάρος 12 kDa, είναι μη πολυμορφική και συνδέεται μη ομοιοπολικά με τη βαριά αλυσίδα (24). Η βαριά α -αλυσίδα αποτελείται από τρεις πρωτεϊνικούς τομείς: α_1 , α_2 και α_3 , εκ των οποίων μόνο ο τελευταίος διαπερνά τη μεμβράνη. Οι τομείς α_1 και α_2 σχηματίζουν την αύλακα πρόσδεσης του αντιγονικού πεπτιδίου. Η δευτεροταγής δομή της αύλακας πρόσδεσης αποτελείται από 2 α -έλικες, ευρισκόμενες πάνω από 8 αντιπαράλληλα β -φύλλα (24). Η αύλακα πρόσδεσης περιβάλλεται στα δύο άκρα από αρωματικά αμινοξέα, τα οποία περιορίζουν το μήκος των πεπτιδίων που μπορούν να προσδεθούν στα 8-10 αμινοξέα (25). Τα αμινοξέα του πεπτιδίου που είναι απαραίτητα για την πρόσδεση στο MHC ονομάζονται κατάλοιπα αγκυροβόλησης και συνήθως στα μόρια ιστοσυμβατότητας I πρόκειται για το 2^ο και το τελευταίο αμινοξύ, μετρώντας από το αμινοτελικό άκρο (6). Υπάρχουν 3 κατηγορίες γονιδίων της α -αλυσίδας στο ανθρώπινο γονιδίωμα, τα HLA-A, HLA-B και HLA-C.

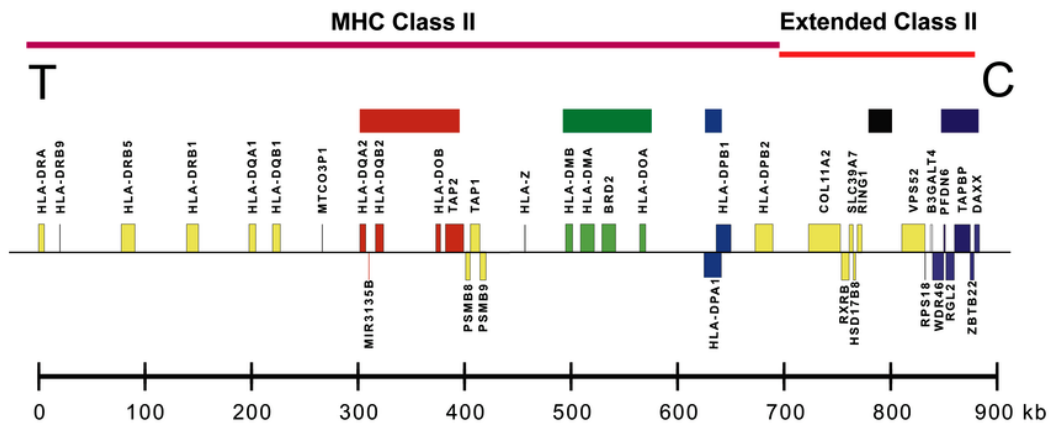


Εικόνα 2: Δομή του αλληλομόρφου HLA-B*08:01 του μείζονος συμπλόκου ιστοσυμβατότητας I (κωδικός PDB: 5WMQ). Διακρίνεται η πολυμορφική βαριά αλυσίδα (πράσινο) και η β_2 μικροσφαιρίνη (μπλε). Το αντιγονικό πεπτιδίο ELRSRYWAI (μωβ) βρίσκεται εντός της αύλακας πρόσδεσης που σχηματίζεται από τους τομείς α_1 και α_2 .

Τα γονίδια που κωδικοποιούν το MHC εντοπίζονται στο χρωμόσωμα 6 στους ανθρώπους και περιλαμβάνουν περισσότερα από $4 \cdot 10^6$ ζεύγη βάσεων. (1).

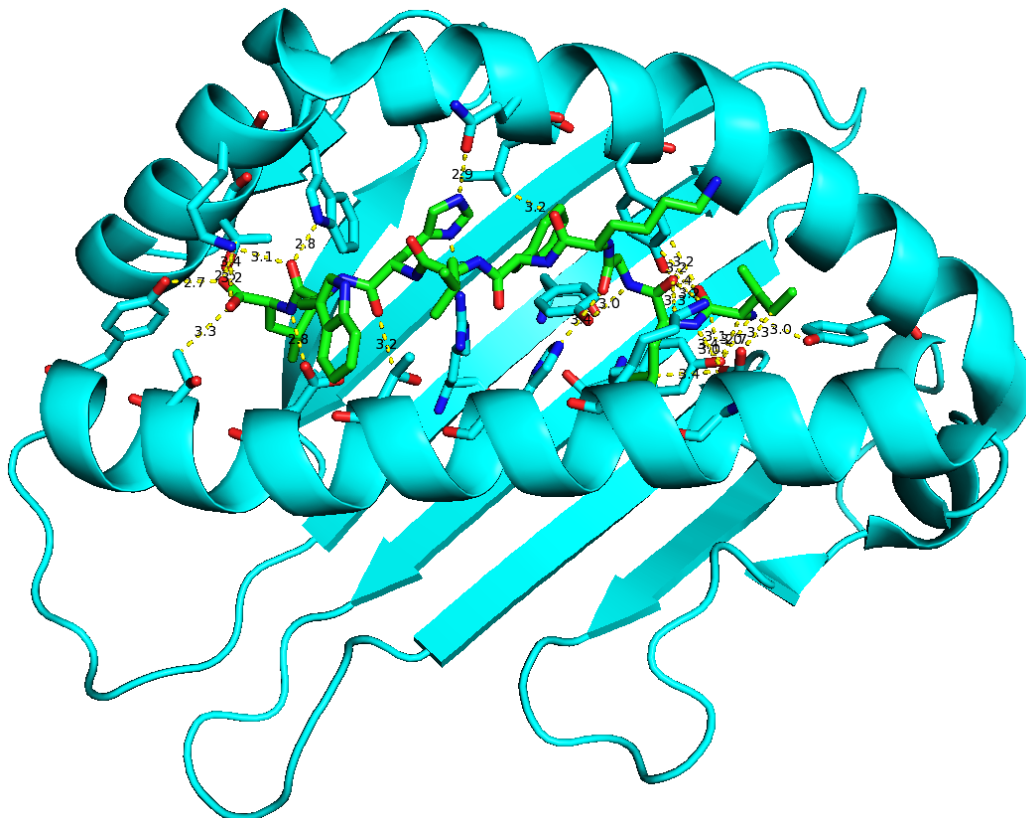


Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση του χρωμοσώματος 6. Στην περιοχή 6p21 εντοπίζονται τα γονίδια MHC (7,6 Mb). Τα γονίδια MHC III παρεμβάλλονται μεταξύ των γονιδίων του MHC I και II. Πρόκειται για πρωτεΐνες που δεν εμπλέκονται στην πρόσδεση αντιγονικών πεπτιδίων. Ορισμένες από αυτές εμπλέκονται στη μεταγωγή σημάτων, όπως ο ογκοεκρωτικός παράγοντας (TNF) και οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ (HSP).



Εικόνα 4: Λεπτομερέστερη σχηματική αναπαράσταση των γονιδίων MHC II.

Πρόκειται για συνεπικρατή γονίδια, επομένως κάθε άνθρωπος φέρει 3 έως 6 διαφορετικά αλληλόμορφα. Τα μόρια ιστοσυμβατότητας αποτελούν την πιο πολυμορφική πρωτεΐνη, καθώς έχουν εντοπιστεί πάνω από 10.000 αλληλόμορφα (24). Οι μοναδιαίοι νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (single nucleotide polymorphisms, SNP) εντοπίζονται κυρίως στην αύλακα πρόσδεσης του πεπτιδίου (24). Ως αποτέλεσμα, οι κοιλότητες που διαμορφώνονται διαφέρουν και τα MHC I δύνανται θεωρητικά να παρουσιάσουν ένα σύνολο πεπτιδίων που ανέρχεται σε $6 \cdot 20^{6-7}$ (24).



1.6. Πολυμορφισμοί των αλληλομόρφων HLA και συσχέτιση με ασθένειες

Η συσχέτιση των πολυμορφισμών των μορίων ιστοσυμβατότητας I με αυτοάνοσες παθήσεις έχει διαπιστωθεί και μελετάται εδώ και 5 δεκαετίες (33). Μεταξύ αυτών ανήκουν η αγκυλωτική σπονδυλίτιδα, η ασθένεια Behçet, η χοριο-αμφιβληστροπάθεια Birdshot και η ψωρίαση. Το αλληλόμορφο HLA-B*27 παρουσιάζει πολύ ισχυρή συσχέτιση με την αγκυλωτική σπονδυλίτιδα και άλλες συγγενείς φλεγμονώδεις παθήσεις των αρθρώσεων (33). Το συγκεκριμένο αλληλόμορφο εντοπίζεται έως και στο 90 % των ασθενών στην πλειονότητα των εθνοτικών ομάδων. Οι πιο συνηθισμένοι πολυμορφισμοί που σχετίζονται με την ασθένεια είναι: HLA-B*27:05 (Καυκάσιοι), HLA-B*27:04 (Κινέζοι) και HLA-B*27:02 (Μεσογειακοί πληθυσμοί) (33). Άμεσες αποδείξεις για το ρόλο που διαδραματίζει στην εμφάνιση της ασθένειας έχουν προέλθει και από διαγονιδιακά ποντίκια (34). Η προαναφερθείσα ισχυρή γενετική προδιάθεση σχετίζεται με ορισμένα ασυνήθιστα χαρακτηριστικά του HLA-B*27 (33). Αρχικά, έχει παρατηρηθεί ο σχηματισμός ομοδιμερών της βαριάς αλυσίδας *in vitro* απουσία της β₂ μικροσφαιρίνης (34). Μελέτες έδειξαν ότι ο σχηματισμός ομοδιμερών μέσω δισουλφιδικού δεσμού οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην ασύζευκτη κυστεΐνη στη θέση 67, η οποία εντοπίζεται στη Β-κοιλότητα της αύλακας πρόσδεσης του πεπτιδίου (34, 35). Η κυστεΐνη 67 δεν είναι συντηρημένη και απαντάται σε μικρό αριθμό αλληλομόρφων MHC I, μεταξύ των οποίων τα B-14, B-15, B-38, B-39 και B-73 (35). Ωστόσο, στο HLA-B*27 σχηματίζονται επίσης ομοδιμερή μέσω δισουλφιδικού δεσμού μεταξύ της κυστεΐνης 67 και της συντηρημένης κυστεΐνης 164 (35). Υψηλό ποσοστό HLA-B*27 με ελαττωματική τριτοταγή δομή παρατηρείται επίσης *in vivo* σε κύτταρα που διαθέτουν λειτουργικό πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο συγκρότησης μορίων ιστοσυμβατότητας (34). Επιπλέον, το HLA-B*27 δρα μερικώς ανεξάρτητα από την ταπασίνη κατά τη διάρκεια πρόσδεσης πεπτιδίων στο ενδοπλασματικό δίκτυο, με αποτέλεσμα την πρόσδεση πεπτιδίων χαμηλής συγγένειας και το σχηματισμό ασταθών συμπλόκων που επάγουν ανοσολογική απόκριση (35). Προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής *in silico* έδειξαν πράγματι ότι ειδικά το αλληλόμορφο HLA-B*27:05 παρουσιάζει μεγάλη ευελιξία στην αύλακα πρόσδεσης του υποστρώματος, με αποτέλεσμα τη μερική αποδέσμευση του πεπτιδίου (37). Ακόμη, η παρουσία της κυστεΐνης 67 μειώνει σημαντικά την

ταχύτητα συγκρότησης του ετεροδιμερούς συμπλόκου HLA-B*27 στο ενδοπλασματικό δίκτυο, καθιστώντας τη βαριά αλυσίδα πιο ευάλωτη στο σχηματισμό ομοδιμερών (34, 35). Υψηλός βαθμός αποσύνδεσης της β₂ μικροσφαιρίνης παρατηρείται και στο συγκροτημένο ετεροδιμερές σύμπλοκο HLA-B*27:05 στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των κυττάρων (36). Πειραματικά δεδομένα συγκλίνουν στο γεγονός ότι η β₂ μικροσφαιρίνη παγιδεύεται και συσσωρεύεται στους αρθρικούς θύλακες, όπου δεσμεύεται στο κολλαγόνο και σχηματίζονται αμυλοειδείς εναποθέσεις, οι οποίες προκαλούν καταστροφή ιστών (36). Εν κατακλείδι, η εμφάνιση της αγκυλωτικής σπονδυλίτιδας παρουσία του αλληλομόρφου HLA-B*27 οφείλεται στην ελαττωματική παρουσίαση πεπτιδίων, την ελαττωματική αναδίπλωση και μειωμένη ταχύτητα σχηματισμού στο ενδοπλασματικό δίκτυο, στο σχηματισμό ομοδιμερών βαριάς αλυσίδας μέσω δισουλφιδικού δεσμού και στην αποδέσμευση της β₂ μικροσφαιρίνης (33).

Η ασθένεια Behçet αποτελεί μια φλεγμονώδη αυτοάνοση διαταραχή, η οποία χαρακτηρίζεται από έλκη και φλεγμονές στους οφθαλμούς, στη γαστρεντερική οδό, στις αρθρώσεις και στο δέρμα (38). Είναι αρκετά συνηθισμένη στις χώρες της Ανατολικής Μεσογείου, και ειδικά στην Τουρκία (38, 39). Το αλληλόμορφο HLA-B*51 αποτελεί παράγοντα αυξημένης γενετικής προδιάθεσης για την εμφάνιση της ασθένειας, ωστόσο η συμβολή του παραμένει αδιευκρίνιστη ως ένα βαθμό (38, 39). Ωστόσο, καθένα από τα αμινοξέα στις θέσεις 67, 97, 116 και 152 επηρεάζουν σημαντικά και ανεξάρτητα μεταξύ τους τον κίνδυνο εμφάνισης της πάθησης (39). Η χοριο-αμφιβληστροπάθεια Birdshot αποτελεί μια σχετικά σπάνια αυτοάνοση πάθηση που τυπικά επηρεάζει άτομα Ευρωπαϊκής καταγωγής, μέσης ηλικίας και άνω. Εξελίσσεται ως σοβαρή προοδευτική οφθαλμική φλεγμονή που οδηγεί σε εκτεταμένη ατροφία του αμφιβληστροειδούς και πιθανώς τύφλωση (81). Υπάρχει ισχυρή γενετική συσχέτιση με το αλληλόμορφο HLA-A*29 και ειδικότερα με τους απλότυπους HLA-A*29:01 και HLA-A*29:02 (81). Έχει διαπιστωθεί ότι το 85-95 % των ασθενών φέρει το αλληλόμορφο HLA-A*29, του οποίου όμως η συχνότητα στον Ευρωπαϊκό πληθυσμό κυμαίνεται στο 7-9 % (81). Τέλος, περισσότεροι από το 60 % των ασθενών με ψωρίαση φέρουν το αλληλόμορφο HLA-C*06:02, με τους ομοζυγώτες να διατρέχουν 5 φορές πιο αυξημένο κίνδυνο για την εμφάνιση της ασθένειας (104).

1.7. Πολυμορφισμοί των αλληλομόρφων HLA και συσχέτιση με φαρμακευτικές παρενέργειες

Σε πιο πρόσφατες μελέτες ανακαλύφθηκε ότι πολυμορφισμοί των μορίων ιστοσυμβατότητας σχετίζονται με ορισμένες φαρμακευτικές παρενέργειες (adverse drug reactions). Η παρουσία των αλληλομόρφων HLA-B*5701 του MHC I, HLA-DR7 και HLA-DQ3 του MHC II συσχετίζεται ισχυρά με αντίδραση υπερευαισθησίας στο abacavir, έναν αναστολέα της αντίστροφης μεταγραφάσης του HIV-1 (26). Πρόκειται για σοβαρό κλινικό σύνδρομο που εμφανίζεται κατά μέσο όρο στο 5 % των ασθενών που λαμβάνουν το abacavir (26). Η εμφάνιση του συνδρόμου Steven-Johnson/τοξική επιδερμική νεκρόλυση κατόπιν χορήγησης του αντισπασμωδικού φαρμάκου carbamazepine, βρέθηκε ότι σχετίζεται με την ύπαρξη του αλληλομόρφου HLA-B*15:02 σε πληθυσμό Κινέζων Χαν (27). Επίσης, έρευνα σε πληθυσμό Ιαπώνων έδειξε ότι ισχυρές παρενέργειες από τη χορήγηση του carbamazepine σχετίζονται και με το αλληλόμορφο HLA-A*31:01 (28). Η εμφάνιση σοβαρών αλλεργιών και αντίδρασης υπερευαισθησίας κατόπιν χορήγησης του αναστολέα της αντίστροφης μεταγραφάσης του HIV-1 nevirapine συνδέεται στατιστικώς σημαντικά με το αλληλόμορφο HLA-B*14:01 σε πληθυσμό ασθενών εκ Σαρδηνίας (29). Ακόμη, το σύνδρομο Steven-Johnson και η αντίδραση υπερευαισθησίας ως φαρμακευτικές παρενέργειες ύστερα από λήψη του αντιβιοτικού dapson, έδειξαν ισχυρή συσχέτιση με την παρουσία του αλληλομόρφου HLA-B*13:01 (30). Το ίδιο σύνδρομο, προκαλούμενο κατόπιν χορήγησης του αναστολέα της καρβονικής ανυδράσης methazolamide, συσχετίζεται με την παρουσία του αλληλομόρφου B*59:01 σε Κορεάτες και Ιάπωνες (30). Έχουν προταθεί 3 υποθέσεις για το ρόλο που διαδραματίζουν τα αλληλόμορφα HLA στις φαρμακευτικές παρενέργειες: Αρχικά, το μοντέλο των απτενίων προβλέπει ότι η φαρμακευτική ένωση προσδένεται ομοιοπολικά σε μια ενδογενή πρωτεΐνη και εμφανίζεται στα μόρια ιστοσυμβατότητας προσδεμένη στο αντιγονικό πεπτιδίο (31). Το σύμπλοκο φαρμάκου-πεπτιδίου αναγνωρίζεται ως ξένο και επάγει ανοσολογική απόκριση (31). Το μοντέλο της φαρμακολογικής αλληλεπίδρασης εικάζει ότι το φάρμακο προσδένεται μη ομοιοπολικά απευθείας στον υποδοχέα των T-λεμφοκυττάρων (31). Τέλος, το μοντέλο του αλλοιωμένου ανοσοπεπτιδιώματος υποθέτει ότι το φάρμακο

αλληλεπίδρα άμεσα και μη ομοιοπολικά με τα μόρια ιστοσυμβατότητας (31). Η αλληλεπίδραση οδηγεί στην παρουσίαση ενός διαφορετικού συνόλου πεπτιδίων, τα οποία ενώ ανήκουν σε υγιή κύτταρα του οργανισμού, αναγνωρίζονται ως ξένα και ενεργοποιούν τα κυτταροτοξικά Τ-λεμφοκύτταρα (31). Πράγματι, η τελευταία υπόθεση επαληθεύτηκε αρχικά στην περίπτωση του abacavir και του αλληλομόρφου B*57:01, μέσω *in silico* μοριακής μοντελοποίησης και μοριακού ελλιμενισμού (31). Αργότερα επαληθεύτηκε μέσω της επίλυσης της κρυσταλλικής δομής (κωδικοί PDB: 3VRJ, 3VRI, 3UPR) του αλληλομόρφου HLA-B*57:01 με 9μερές και 10μερή πεπτιδία παρουσία της ένωσης abacavir (32). Το abacavir προσδέεται στην F-κοιλότητα στη βάση της αύλακας πρόσδεσης του πεπτιδίου, όπου συνήθως μια καρβοξυτελική τρυπτοφάνη λειτουργεί ως κατάλοιπο αγκυροβόλησης των πεπτιδίων στο συγκεκριμένο αλληλόμορφο (32). Καθοριστικά αμινοξέα για τη συγκεκριμένη αλληλεπίδραση αποδεικνύονται η σερίνη 116 και το ασπαρτικό οξύ 114 (32). Το abacavir προσδέεται με μεγάλη εξειδίκευση στο HLA-B*57:01, σχηματίζοντας πολλούς δεσμούς van der Waals και τουλάχιστον 5 δεσμούς υδρογόνου, αλλοιώνοντας το σχήμα και τη βιοχημεία της αύλακας πρόσδεσης (32). Τέλος, πολυμορφισμοί των MHC II συσχετίζονται επίσης με την εμφάνιση αυτοάνοσων παθήσεων, για ορισμένες εκ των οποίων έχει διαπιστωθεί και ο μοριακός μηχανισμός που προκαλεί τη νόσο (130). Παραδείγματα αποτελούν: η συσχέτιση των αλληλομόρφων HLA-DR15 και HLA-DR4 με τη σκλήρυνση κατά πλάκας, των αλληλομόρφων HLA-DQ2 και HLA-DQ8 με την εμφάνιση διαβήτη τύπου 1 και του αλληλομόρφου HLA-DQ8 με το κοιλιακό άλγος (Coeliac disease) που επηρεάζει κυρίως το *min* έντερο (130).

1.8. Οι κατηγορίες των μη-κλασσικών MHC I και οι λειτουργίες τους

Διακρίνονται 3 κατηγορίες μη-κλασσικών MHC I ή MHC τάξης Ib: πρόκειται για τα μόρια ιστοσυμβατότητας HLA-E, HLA-G και HLA-F που εντοπίζονται στον κοντό βραχίονα του χρωμοσώματος 6 (128). Σε αντίθεση με τα κλασσικά MHC I (HLA-A, HLA-B και HLA C), χαρακτηρίζονται από μικρό βαθμό γενετικής ποικιλομορφίας, διαφορετική δομική οργάνωση και λειτουργικό προφίλ (128). Οι 3 κατηγορίες μη-κλασσικών μορίων HLA σχηματίζουν σύμπλοκα με τη β₂ μικροσφαιρίνη, όμως μόνο για τα HLA-G και HLA-E έχει εξακριβωθεί η παρουσίαση αντιγονικών πεπτιδίων στα Τ-λεμφοκύτταρα (128). Η κατηγορία

HLA-G περιλαμβάνει 46 αλληλόμορφα αλλά μόνο 7 ισομορφές πρωτεϊνών, εκ των οποίων οι 4 είναι μεμβρανοσύνδετες και οι υπόλοιπες εκκρίνονται λόγω έλλειψης του εξωνίου 5 που κωδικοποιεί το διαμεμβρανικό τομέα (128). Επιπροσθέτως, τα μόρια ιστοσυμβατότητας HLA-G σχηματίζουν λειτουργικά ομοδιμερή ή ομοτετραμερή, τα οποία μάλιστα προσδένονται με μεγαλύτερη συγγένεια στους υποδοχείς των HLA-G συγκριτικά με τα μονομερή (128). Σε υγιή άτομα, η μεταγραφή των αλληλομόρφων HLA-G λαμβάνει χώρα στους περισσότερους τύπους κυττάρων, όμως η έκφραση της πρωτεΐνης περιορίζεται σε συγκεκριμένους ιστούς όπως η τροφοβλάστη, το επιθήλιο του θύμου αδένος, τα κύτταρα του κερατοειδούς χιτώνα και τα πρόδρομα ερυθροκύτταρα (128). Στους εμβρυικούς ιστούς, η έκφραση εντοπίζεται σε όλα τα όργανα που εμπλέκονται στην ερυθροποίηση. Τα μόρια HLA-G που εκφράζονται στην τροφοβλάστη καταστέλλουν αποτελεσματικά τις τοπικές ανοσολογικές αποκρίσεις στον πλακούντα, συμβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο στον μηχανισμό αναγνώρισης του εμβρύου ως ενδογενούς ιστού (128). Τα μόρια HLA-G παρουσιάζουν ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες και σε άλλες περιπτώσεις. Διαθέτουν τη δυνατότητα να προσδένονται στους υποδοχείς LILRB1 (leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B member 1) και KIR2DL4 (killer cell immunoglobulin-like receptor, long cytoplasmic tail 4), οι οποίοι εκφράζονται στα φυσικά κύτταρα-φονείς, στα T-λεμφοκύτταρα και στα B-λεμφοκύτταρα (129). Η πρόσδεση των HLA-G στους ανωτέρω υποδοχείς προστατεύει τα καρκινικά κύτταρα από την κυτταροτοξική δραστηριότητα των φυσικών κυττάρων-φονέων και των CD8⁺ T-λεμφοκυττάρων, καθώς επάγει ακόμη και την απόπτωση των τελευταίων (129). Πράγματι, η έκφραση HLA-G έχει διαπιστωθεί σε ποικίλους τύπους καρκίνου: του μαστού, των ωοθηκών, των νεφρών, των πνευμόνων, του παχέος εντέρου και τη λευχαιμία (128). Επιπλέον, υψηλά επίπεδα των διαλυτών ισομορφών HLA-G έχουν ανιχνευθεί στον ορό μελανώματος, γλοιώματος, καρκίνου ωοθηκών και μαστού, ενώ έχουν επίσης συσχετιστεί με προχωρημένο στάδιο της ασθένειας και αυξημένο φορτίο όγκων (128). Η υπερέκφραση των μορίων HLA-G στους όγκους πιθανώς οφείλεται σε φλεγμονώδεις πρωτεΐνες που απελευθερώνονται στο μικροπεριβάλλον τους, όπως οι ιντερλευκίνες 6, 8 και 10, ο ογκοεκκρωτικός παράγοντας α και ο αυξητικός παράγοντας όγκων β (129). Τέλος, τα HLA-G επηρεάζουν αρνητικά την ωρίμανση και την ενεργοποίηση των δενδριτικών

κυττάρων (129).

Στην κατηγορία HLA-E περιλαμβάνονται 4 αλληλόμορφα. Τα αλληλόμορφα HLA-E εκφράζονται στην επιφάνεια των κυττάρων τροφοβλάστης, σε περιπτώσεις μεταμόσχευσης, ιικών μολύνσεων, φλεγμονών και αυτοάνοσων παθήσεων (128). Η έκφραση της πρωτεΐνης περιορίζεται κυρίως στα T-λεμφοκύτταρα, στα μακροφάγα, στα B-λεμφοκύτταρα και σε χαμηλά επίπεδα στα κύτταρα ενδοθηλίου (128). Η αυξημένη έκφραση HLA-E στα ενδοθηλιακά κύτταρα συσχετίζεται με αυξημένη προστασία ενάντια στα φυσικά κύτταρα-φονείς και έχει παρατηρηθεί σε καλλιέργειες κυττάρων μελανώματος (128). Τα μόρια HLA-E δεσμεύονται στους υποδοχείς KLRC1 και KLRC2 (killer-cell lectin-like receptor subfamily C) των φυσικών κυττάρων-φονέων, των T-λεμφοκυττάρων και των μακροφάγων (128). Τα αλληλόμορφα HLA-E αλληλεπιδρούν με τον υποδοχέα των T-λεμφοκυττάρων, σε αντίθεση με τις άλλες 2 κατηγορίες μη-κλασικών HLA (128). Η ανωτέρω αλληλεπίδραση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε ορισμένες ιικές μολύνσεις, ενώ μπορεί να διεγείρει την παραγωγή CD8⁺ ρυθμιστικών T-λεμφοκυττάρων (128). Αυξημένη έκφραση HLA-E έχει διαπιστωθεί σε διάφορους τύπους καρκίνου: λέμφωμα, γλοίωμα και μελάνωμα (128).

Τα μη-κλασικά μόρια ιστοσυμβατότητας HLA-F ανήκουν στη λιγότερο μελετημένη κατηγορία. Εκφράζονται σε όλους τους ιστούς που περιέχουν B-λεμφοκύτταρα και στους εμβρυικούς ιστούς (128). Στους τελευταίους, η ύπαρξη των HLA-F συσχετίζεται με την προστασία του εμβρύου από το ανοσοποιητικό σύστημα της μητέρας, ομοίως με τα αλληλόμορφα HLA-G και HLA-E (128). Αντισώματα εξειδικευμένα για τα μόρια HLA-F εντοπίζονται σε αυξημένα επίπεδα στον ορό πασχόντων από καρκίνο του οισοφάγου και του πνεύμονα (non-small cell lung cancer) (128). Εν κατακλείδι, βάσει των ανωτέρω παρατηρήσεων έχει προταθεί ότι τα μόρια HLA-E και HLA-G θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν ως καρκινικοί βιοδείκτες (128).

1.9. Η βιοχημική διαδικασία της δημιουργίας αντιγονικών πεπτιδίων και της αντιγονοπαρουσίασης

1.9.1. Προέλευση των αντιγονικών πεπτιδίων

Οι πρωτεΐνες που συντίθενται εντός του κυττάρου, είτε από τα ριβοσώματα του ίδιου του κυττάρου (ενδογενείς ή ιικές) είτε από υποχρεωτικώς ενδοκυτταρικά παράσιτα (π.χ. μυκοβακτήρια), αποτελούν την πηγή των αντιγονικών πεπτιδίων που παρουσιάζονται από τα μόρια ιστοσυμβατότητας I και II (24). Ωστόσο στα MHC II που εντοπίζονται μόνο στα αντιγονοπαρουσιάζοντα κύτταρα, τα αντιγονικά πεπτίδια μπορεί να προέρχονται και από πρωτεΐνες εξωκυτταρικών παθογόνων κατόπιν ενδοκύτωσης (24). Το σύνολο των πεπτιδίων που παρουσιάζεται από ένα κύτταρο αποτελεί το ανοσοπεπτιδίωμά του. Στα υγιή κύτταρα, το ανοσοπεπτιδίωμα που προκύπτει από τις εκφραζόμενες πρωτεΐνες δεν επάγει ανοσολογική απόκριση (24). Όμως σε ορισμένες περιπτώσεις, τα αντιγονικά πεπτίδια που συμπεριλαμβάνονται στο ανοσοπεπτιδίωμα αναγνωρίζονται ως μη-ενδογενή από τα T-λεμφοκύτταρα και επάγεται η καταστροφή των μη φυσιολογικών κυττάρων (24). Στις περιπτώσεις αυτές συγκαταλέγονται κύτταρα που εκφράζουν μεταλλαγμένες πρωτεϊνικές αλληλουχίες (π.χ. καρκινικά), κύτταρα που έχουν προσβληθεί από ιό και εκφράζουν ιικές πρωτεΐνες, κύτταρα στα οποία πολλαπλασιάζονται ενδοκυτταρικά βακτήρια και κύτταρα ιστών με διαφορετικό γονιδίωμα (περίπτωση μεταμόσχευσης) (24). Τέλος, πρέπει να αναφερθεί η διαδικασία της διασταυρούμενης αντιγονοπαρουσίασης, μέσω της οποίας τα αντιγονοπαρουσιάζοντα κύτταρα (κυρίως τα δενδριτικά) δύνανται να προσλάβουν εξωγενή αντιγόνα από άλλα κύτταρα προσβεβλημένα από ιούς ή καρκινικά κύτταρα στο μικροπεριβάλλον τους κατόπιν φαγοκύτωσης ή διαμεσολαβούμενης ενδοκύτωσης μέσω υποδοχέων (24). Τα αντιγόνα παρουσιάζονται από μόρια ιστοσυμβατότητας I, έτσι ώστε τα δενδριτικά κύτταρα να διεγείρουν τα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα (24).

1.9.2. Αποδόμηση των πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα και παραγωγή πεπτιδίων

Το βιοχημικό μονοπάτι της αντιγονοπαρουσίασης διαφέρει μεταξύ των 2 τάξεων μορίων ιστοσυμβατότητας. Όσον αφορά στα MHC I, ο αρχικός σταθμός της δημιουργίας της πλειονότητας των αντιγονικών πεπτιδίων βρίσκεται στο πρωτεάσωμα, το οποίο αποτελεί ένα σύνθετο πολυενζυμικό σύμπλοκο καταβολισμού πρωτεϊνών και εντοπίζεται στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα (40, 41). Οι πρωτεΐνες που αποδομούνται προέρχονται είτε από ελαττωματικά προϊόντα ριβοσωμάτων (defective ribosomal products, DRiPs) είτε από πρωτεΐνες που ολοκλήρωσαν το λειτουργικό τους ρόλο στο κύτταρο (retirees) (40). Μελέτες δείχνουν ότι τα ελαττωματικά προϊόντα ριβοσωμάτων ίσως αποτελούν την κύρια πηγή ενδογενών πεπτιδίων και πεπτιδίων από ιικές πρωτεΐνες (45). Μικρό ποσοστό του ανοσοπεπτιδιώματος προέρχεται από τον καταβολισμό πρωτεϊνών από ορισμένες πεπτιδάσες στο κυτταρόπλασμα ή εντός οργανιδίων (π.χ. λυσόσωμα), οι οποίες δρουν ανεξάρτητα από το πρωτεάσωμα και τελικώς δημιουργούν ώριμους αντιγονικούς επιτόπους (41). Μεταξύ αυτών των πεπτιδασών ανήκουν οι κασπάσες 5 και 10, η καθεψίνη S, η τριπεπτιδυλική πεπτιδάση II και το ένζυμο αποδόμησης της ινσουλίνης (41). Όλες οι πρωτεΐνες που προορίζονται για καταβολισμό από το πρωτεάσωμα σηματοδοτούνται μέσω της ομοιοπολικής σύνδεσής τους με ουβικιτίνη (40). Η διαδικασία σήμανσης με ουβικιτίνη πραγματοποιείται ως εξής: Το ένζυμο E1 (η κατηγορία περιλαμβάνει 1 ή λίγα ένζυμα στα κύτταρα θηλαστικών) ενεργοποιεί την ουβικιτίνη παρουσία ATP. Ύστερα η ουβικιτίνη σχηματίζει σύμπλοκο με ένα ένζυμο της κατηγορίας E2 (η κατηγορία περιλαμβάνει αρκετές δεκάδες ένζυμα στα κύτταρα θηλαστικών). Τα ένζυμα κατηγορίας E3, η οποία περιλαμβάνει αρκετές εκατοντάδες στα κύτταρα θηλαστικών, καθορίζουν ποιες πρωτεΐνες θα σημανθούν για αποδόμηση. Το ένζυμο E3 καταλύει τη μεταφορά της ουβικιτίνης από το ένζυμο E2 στην πρωτεΐνη. Η αντίδραση επαναλαμβάνεται και καταλήγει σε πολύ-ουβικιτίνωση της πρωτεΐνης. Οι πρωτεΐνες που φέρουν αλυσίδα πολύ-ουβικιτίνης αναγνωρίζονται από το ρυθμιστικό σύμπλοκο 19S του πρωτεασώματος (Advanced information on the Nobel Prize in Chemistry, 6 October 2004). Η αδυναμία ουβικιτίνωσης εμποδίζει και αλλοιώνει σημαντικά τη δημιουργία αντιγονικών πεπτιδίων, όπως έδειξε μελέτη με χρήση αναστολέα

ενζύμου που συμμετέχει καθοριστικά στην προσθήκη ουβικιτίνης (40). Πριν η πρωτεΐνη ξεκινήσει να καταβολίζεται από τη δράση του πρωτεασώματος, πρέπει να αφαιρεθεί η ουβικιτίνη από τα κατάλληλα ένζυμα, μεταξύ των οποίων και η εξειδικευμένη για την ουβικιτίνη πρωτεάση Usp14 (42). Αναστολή της τελευταίας επηρέασε αρνητικά σε μεγάλο βαθμό την αντιγονοπαρουσίαση, ειδικά σε πεπτιδία που προέρχονται από ελαττωματικά προϊόντα ριβοσωμάτων (42). Το πρωτεάσωμα μπορεί ακόμη να καταβολίζει πρωτεΐνες και να ενώνει αλληλουχίες πεπτιδίων, δημιουργώντας αντιγονικά πεπτιδία που δεν αντιστοιχούν στην αλληλουχία της πρωτεΐνης (44). Το καταλυόμενο από το πρωτεάσωμα μάτισμα πεπτιδίων, ενώ αρχικά θεωρούνταν ότι συνέβαινε σπάνια, σε ορισμένες κυτταρικές σειρές βρέθηκε να αντιπροσωπεύει το 21-32 % του ανοσοπεπτιδιώματος (44). Ο καθοριστικός ρόλος του πρωτεασώματος αποδεικνύεται επίσης από το γεγονός ότι η αναστολή του επιβραδύνει το ρυθμό βιοσύνθεσης των περισσότερων κυτταρικών πρωτεϊνών και της πλειονότητας των αντιγονικών πεπτιδίων (43).

1.9.3. Μεταφορά παραγόμενων πεπτιδίων στο ενδοπλασματικό δίκτυο

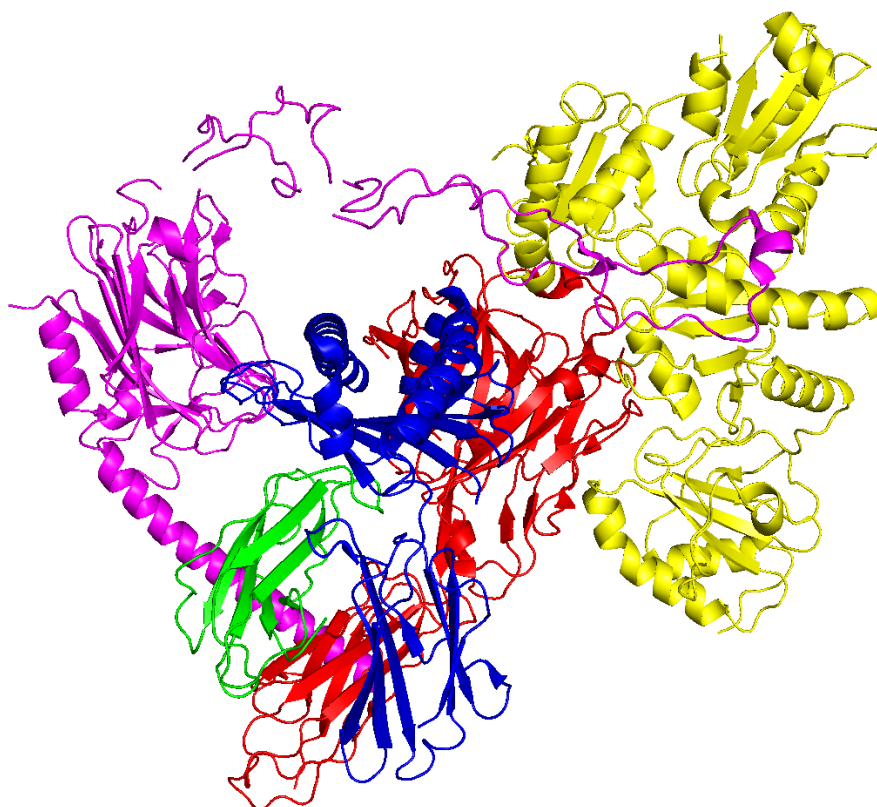
Το πρωτεάσωμα παρουσιάζει ιδιαίτερη εξειδίκευση στην παραγωγή πεπτιδίων μήκους 3-18 αμινοξέων κατά τον καταβολισμό των πρωτεϊνών (46), αν και σε ορισμένες περιπτώσεις φθάνουν και το μήκος των 25 αμινοξέων (47). Η δράση του πρωτεασώματος καθορίζει το τελικό καρβοξυτελικό άκρο των πρόδρομων αντιγονικών επιτόπων που θα δεσμευτούν τελικά από τα μόρια ιστοσυμβατότητας, ενώ το αμινοτελικό τους άκρο παραμένει εκτεταμένο (48, 49). Η πλειονότητα των πεπτιδίων που παράγεται καταστρέφεται εντός δευτερολέπτων από αμινοπεπτιδάσες του κυτταροπλάσματος, οι οποίες δε σχετίζονται άμεσα με την αντιγονοπαρουσίαση και παρουσιάζουν μικρό βαθμό εξειδίκευσης (π.χ. τριπεπτιδυλική πεπτιδάση II, αμινοπεπτιδάση λευκίνης) (46). Όσα πεπτιδία αποφεύγουν την αποδόμηση μεταφέρονται από το κυτταρόπλασμα στο ενδοπλασματικό δίκτυο μέσω της πρωτεΐνης-μεταφορέα που σχετίζεται με την επεξεργασία αντιγονικών πεπτιδίων (transport associated with antigen processing, TAP) (50). Η TAP είναι ένα ετεροδιμερές σύμπλοκο αποτελούμενο από 2 ημι-μεταφορείς, τις πρωτεϊνικές υπομονάδες TAP1 και TAP2 (50). Οι τελευταίες ανήκουν στην οικογένεια των ABC (ATP-binding cassette) μεταφορέων. Διαθέτουν ένα υδρόφοβο διαμεμβρανικό τομέα από την

πλευρά του ενδοπλασματικού δικτύου και έναν κυτταροπλασματικό τομέα δέσμευσης νουκλεοτιδίων (50). Η TAP σχηματίζει έναν διαμεμβρανικό πόρο, του οποίου το άνοιγμα και το κλείσιμο εξαρτάται από τη δέσμευση και την υδρόλυση του ATP, αντιστοίχως (50). Τα πεπτίδια που μεταφέρονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο διαμέσου της TAP έχουν μήκος μεταξύ 8 έως 16 αμινοξέων (49, 51). Η TAP καθίσταται συχνά στόχος αναστολής από ιικές πρωτεΐνες λόγω του κομβικού ρόλου της στην αντιγονοπαρουσίαση, ειδικά από ιούς που προκαλούν χρόνιες μολύνσεις όπως οι ερπητοϊοί και οι ροοϊοί (51, 52). Παραδείγματα αποτελούν η πρωτεΐνη ICP47 από τον ιό Herpes simplex 1, η US6 από τον ανθρώπινο κυτταρομεγαλοϊό (HCMV) και η BNLF2a από τον ιό Epstein-Barr (51). Οι αμινοτελικά εκτεταμένοι πρόδρομοι αντιγονικοί επίτοποι υφίστανται επεξεργασία από τις αμινοπεπτιδάσες του ενδοπλασματικού δικτύου 1 και 2 (ERAP1 και ERAP2), προτού προσδεθούν στα μόρια ιστοσυμβατότητας (25).

1.9.4. Συγκρότηση του συμπλόκου βαριάς αλυσίδας HLA I-β₂ μικροσφαιρίνης-αντιγονικού πεπτιδίου

Η διαδικασία σχηματισμού των μορίων ιστοσυμβατότητας I πραγματοποιείται στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Η έκφραση της βαριάς αλυσίδας ακολουθείται από προσθήκη του ολιγοσκαχαρίτη Glc₁Man₉GlcNac₂ σε συντηρημένη θέση (53). Η συνοδός πρωτεΐνη καλνεξίνη αναγνωρίζει τον ολιγοσκαχαρίτη και προσδέεται στην ασταθή βαριά αλυσίδα, ώστε να εξασφαλίσει τη σωστή αναδίπλωσή της και το σχηματισμό συμπλόκου με τη β₂ μικροσφαιρίνη (54). Η καλνεξίνη αποτελεί μια πρωτεΐνη της οικογένειας των λεκτινών με μοριακό βάρος 65 kDa (53). Παράλληλα, η δισουλφιδική ισομεράση ERp57 καταλύει το σχηματισμό των σωστών ενδομοριακών δισουλφιδικών δεσμών (53). Όταν σχηματιστεί το σύμπλοκο βαριάς αλυσίδας-β₂ μικροσφαιρίνης, τότε η καλνεξίνη αποδεσμεύεται και το ετεροδιμερές μόριο ιστοσυμβατότητας αλληλεπιδρά με τη συνοδό-πρωτεΐνη καλρετικουλίνη (λεκτίνη μοριακού βάρους 45 kDa, παρουσιάζει υψηλή ομολογία με την καλνεξίνη) (53). Η καλρετικουλίνη διευκολύνει τη σύνδεση του ασταθούς-λόγω έλλειψης πεπτιδίου-ετεροδιμερούς με το πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο φόρτωσης πεπτιδίων (Peptide Loading Complex, PLC) (55). Το PLC αποτελείται από το ετεροδιμερές σύμπλοκο βαριάς αλυσίδας MHC I-β_{2m}, της ERp57, της TAP και των συνοδών πρωτεϊνών ταπασίνης και

καλρετικουλίνης (55). Η ταπασίνη έχει μοριακό βάρος 48 kDa και αποτελείται από ένα μεγάλο αμινοτελικό τομέα που εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο (κατάλοιπα 1-392), ένα μοναδικό διαμεμβρανικό τομέα που αλληλεπιδρά με την TAP (αμινοξέα 393-417) και μια μικρή καρβοξυτελική αλληλουχία (αμινοξέα 418-428) συγκράτησης στο ενδοπλασματικό δίκτυο (53). Η ταπασίνη σχηματίζει δισουλφιδικό δεσμό με την ERp57 μέσω των κυστεινών 95 και 57, αντιστοίχως (56). Το ετεροδιμερές ταπασίνης-ERp57 σταθεροποιεί τα μόρια ιστοσυμβατότητας στο PLC, διατηρώντας τα σε κατάλληλη στερεοδιαμόρφωση για την πρόσδεση πεπτιδίου (55). Η ταπασίνη λειτουργεί ως ο πρώτος σταθμός ποιοτικού ελέγχου πεπτιδίων, καθώς διαχωρίζει τα χαμηλής και υψηλής συγγένειας πεπτίδια (54).



Εικόνα 7: Σχηματική αναπαράσταση της δευτεροταγούς δομής του συμπλόκου φόρτωσης πεπτιδίων (PLC). Διακρίνονται η β_2 μικροσφαιρίνη (πράσινο), η βαριά αλυσίδα HLA I (μπλε), η καλρετικουλίνη (μωβ), η ταπασίνη (κόκκινο) και η δισουλφιδική ισομεράση ERp57 (κίτρινο). Η δομή επιλύθηκε με τη μέθοδο κρυο-ηλεκτρονικής μικροσκοπίας. Κωδικός PDB: 6ENY

Η επιλογή υψηλής συγγένειας πεπτιδίων κατά την αξιολόγηση είναι καθοριστική για το σχηματισμό σταθερών συμπλόκων MHC I με μεγάλο χρόνο ημιζωής, ώστε να επιτευχθεί αποτελεσματική ανοσολογική απόκριση (54). Όταν προσδεθεί πεπτίδιο υψηλής συγγένειας, αφαιρείται η αρχική γλυκόζη από τη γλυκάνη $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNac}_2$, το σταθερό μόριο ιστοσυμβατότητας αποδεσμεύεται από το PLC, εγκαταλείπει το ενδοπλασματικό δίκτυο και μεταφέρεται διαμέσου του συμπλέγματος Golgi στην κυτταροπλασματική μεμβράνη (54).

1.9.5. Τελικός σταθμός ποιοτικού ελέγχου πεπτιδίων: η πρωτεΐνη TAPBPR

Στο σύμπλεγμα Golgi υφίσταται ένας δεύτερος και τελικός σταθμός ποιοτικού ελέγχου πεπτιδίων, σε περίπτωση που το μόριο ιστοσυμβατότητας φέρει πεπτίδιο χαμηλής ή μεσαίας συγγένειας (54). Ο έλεγχος διενεργείται από την πρωτεΐνη TAPBPR (TAP-binding protein-related), μια πρωτεΐνη που εμφανίζει 20 % δομική ομολογία με την ταπασίνη (54). Όμως, αντίθετα από την ταπασίνη, η TAPBPR δε φέρει μοτίβο συγκράτησης στο ενδοπλασματικό δίκτυο, δε συμμετέχει στο PLC και είναι ανεξάρτητη από την ERp57 (54, 57). Η TAPBPR διατηρεί το μόριο ιστοσυμβατότητας σε δεκτική στερεοδιαμόρφωση για την πρόσληψη πεπτιδίων και καταλύει τον ποιοτικό έλεγχο και την εναλλαγή πεπτιδίων (58). Η πρόσδεση πεπτιδίου υψηλής συγγένειας οδηγεί σε αποδέσμευση της TAPBPR και τη μεταφορά του μορίου ιστοσυμβατότητας στην κυτταροπλασματική μεμβράνη (54, 58). Όμως, στην περίπτωση που το πεπτίδιο χαμηλής συγγένειας δεν μπορεί να αντικατασταθεί λόγω έλλειψης κατάλληλου πεπτιδίου (το σύμπλεγμα Golgi περιέχει πολύ λιγότερα πεπτίδια συγκριτικά με το ER), τότε η TAPBPR προωθεί την αλληλεπίδραση του ενζύμου UDP-γλυκόζη:γλυκοπρωτεΐνη γλυκοζυλοτρανσφεράση 1 (UGGT1) με το MHC I (54, 57). Η τελευταία γλυκοζυλιώνει εκ νέου το ελεύθερο πεπτιδίου μόριο ιστοσυμβατότητας, ώστε να ανακυκλωθεί και να επιστρέψει στο ενδοπλασματικό δίκτυο (54, 57).

Η TAPBPR έχει μοριακό βάρος 50.2 kDa. Ο σύνθετος αμινοτελικός τομέας (κατάλοιπα 1-281) αποτελείται από 19 β-πτυχωτές επιφάνειες και πτυχές που προσομοιάζουν σε ανοσοσφαιρίνη (τύπος V), ενώ ο

καρβοξυτελικός τομέας (κατάλοιπα 282-377) παρουσιάζει τυπική δομή ανοσοσφαιρίνης IgC (38, 115). Ο αμινοτελικός τομέας διαθέτει μια μεγάλη κοίλη επιφάνεια που περιβάλλει την α2-1 ελικοειδή περιοχή της βαριάς αλυσίδας του MHC I. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ του αμινοτελικού τομέα της TAPBPR και της α2-1 περιοχής του MHC I κυριαρχούνται από δεσμούς van der Waals, όμως σχηματίζεται και μικρός αριθμός σημαντικών δεσμών υδρογόνου (57). Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό του αμινοτελικού τομέα της TAPBPR αποτελεί μια εκτεταμένη λούπα, η οποία εισέρχεται στην αύλακα πρόσδεσης του υποστρώματος του MHC I και σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με τα κατάλοιπα T143 και K146. Σημαντικοί δεσμοί υδρογόνου σχηματίζονται επίσης μεταξύ των καταλοίπων: Q275^{TAPBPR} και A135^{MHC I}, E105^{TAPBPR} και Y84^{MHC I} (57). Ο καρβοξυτελικός τομέας της TAPBPR αλληλεπιδρά με τον α3 τομέα της βαριάς αλυσίδας του MHC I και με τη β2 μικροσφαιρίνη (57, 134). Η TAPBPR ενισχύει τη δέσμευση και την αποδέσμευση πεπτιδίων στο αλληλόμορφο HLA-A*02 *in vitro* (135). Επίσης, ενισχύει την επιλογή πεπτιδίων υψηλής συγγένειας για το ίδιο αλληλόμορφο (135). Η απαλοιφή του γονιδίου της TAPBPR σε κύτταρα HeLa αλλάζει το ανοσοπεπτιδίωμα, προκαλώντας την εμφάνιση περισσότερων συμπλόκων MHC I με μειωμένη σταθερότητα και μη κανονικά κατάλοιπα αγκυροβόλησης (135). Αντίθετα, τα κύτταρα που εκφράζουν την TAPBPR παρουσιάζουν μικρότερο εύρος ανοσοπεπτιδιώματος αλλά περισσότερα σύμπλοκα MHC I με πεπτιδία υψηλής συγγένειας, λόγω του ποιοτικού ελέγχου που διενεργεί η TAPBPR (135).

Τέλος, η TAPBPR παρουσιάζει ισχυρή προτίμηση για τα αλληλόμορφα HLA της κατηγορίας A, έναντι των αλληλομόρφων των κατηγοριών B και C (136). Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε μεταξύ 97 διαφορετικών αλληλομόρφων HLA και των 3 κατηγοριών διαπιστώθηκε ότι η TAPBPR προσδένεται ισχυρότερα κατά σειρά στα αλληλόμορφα A*68:02, A*23:01, A*69:01 και A*02:01 (136). Επίσης, η πρόσδεση ήταν περισσότερο από 8 φορές ισχυρότερη συγκριτικά με τους ισχυρότερους προσδέτες των κατηγοριών B και C (B*73:01 και C*01:02) (136). Η διαφορά οφείλεται στη δομή της F κοιλότητας της αύλακας πρόσδεσης του υποστρώματος στο MHC I, καθώς η πρόσδεση της TAPBPR διευκολύνεται από αλληλόμορφα των οποίων η F κοιλότητα παρουσιάζει εκλεκτικότητα για υδρόφοβα αμινοξέα ενώ κρίσιμο ρόλο διαδραματίζουν τα κατάλοιπα H114 και Y116 του MHC I (136).

1.9.6. Βιοχημικό μονοπάτι αντιγονοπαρουσίασης στα μόρια MHC II

Στα μόρια ιστοσυμβατότητας II, τα αντιγονικά πεπτιδία προέρχονται κυρίως από πρωτεΐνες που προέρχονται από το μονοπάτι της ενδοκύτωσης (46, 49). Καθώς αρκετά είδη βακτηρίων αναπαράγονται εντός των ενδοκυτταρικών κυστιδίων των μακροφάγων, οι πρωτεΐνες που παράγουν δεν είναι προσβάσιμες στο πρωτεάσωμα αλλά αποδομούνται από πρωτεάσες των κυστιδίων (49). Τα μόρια ιστοσυμβατότητας II συντίθενται και συγκροτούνται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, όπου και σχηματίζουν τριμερές σύμπλοκο με την MHC II-σχετιζόμενη σταθερή αλυσίδα (Ii) (49). Η τελευταία εμποδίζει την πρόσδεση πεπτιδίων στο ενδοπλασματικό δίκτυο και μεταφέρει το μόριο ιστοσυμβατότητας σε ένα ενδοσωμικό διαμέρισμα (MHC II compartment, MIIC) μέσω του κυτταροπλασματικού της μοτίβου διλευκίνης (24). Κατόπιν η αλυσίδα Ii αποδομείται από τις καθεψίνες L και S (24, 49). Ωστόσο, ένα μικρό τμήμα της πρωτεΐνης, το οποίο ονομάζεται CLIP (class II-associated invariant chain peptide) παραμένει στην αύλακα πρόσδεσης του πεπτιδίου (49). Η απομάκρυνση του CLIP ώστε να προσδεθεί πεπτιδίο υψηλής συγγένειας πραγματοποιείται από τη συνοδό πρωτεΐνη HLA-DM (24, 49). Τέλος, το σύμπλοκο MHC II μεταφέρεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη για αναγνώριση από τα CD4⁺ T-λεμφοκύτταρα (24, 49).

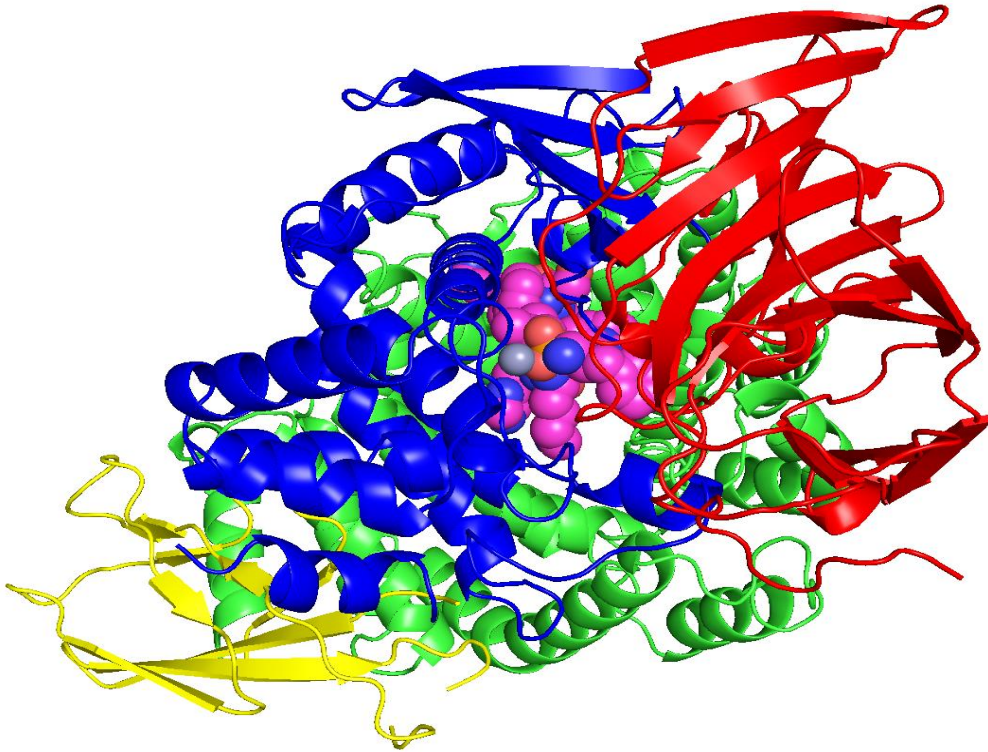
1.10. Δομή και λειτουργία των ενζύμων ERAP1, ERAP2 και IRAP

Τα κυριότερα ένζυμα που εμπλέκονται στην επεξεργασία ενδογενών και διασταυρωτά παρουσιαζόμενων (cross-presented) επιτόπων των MHC I ανήκουν στην υποοικογένεια της οξυτοκινάσης, της M1 οικογένειας των αμινοπεπτιδάσων (59). Τα μέλη της παρουσιάζουν ομολογία 50 % κατά προσέγγιση (59). Η ανωτέρω οικογένεια στο ανθρώπινο γονιδίωμα κωδικοποιείται από ένα τμήμα 200 kb στη χρωμοσωμική περιοχή 5q15 (59). Περιλαμβάνει 3 αμινοπεπτιδάσες συνολικά, οι οποίες επάγονται από τη γ-ιντερφερόνη: η ERAP1 (endoplasmic reticulum aminopeptidase 1) και η ERAP2 (endoplasmic reticulum aminopeptidase 2) εντοπίζονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, ενώ η ρυθμιζόμενη από την ινσουλίνη αμινοπεπτιδάση IRAP (insulin regulated aminopeptidase), γνωστή και ως πλακούντιος αμινοπεπτιδάση λευκίνης (P-LAP, placental leucine aminopeptidase),

εντοπίζεται σε κυτταροπλασματικά κυστίδια (59). Στα ποντίκια, η αντίστοιχη ομόλογη πρωτεΐνη της ERAP1 ονομάζεται ERAAP (endoplasmic reticulum aminopeptidase associated with antigen processing) (59). Όλα αυτά τα ένζυμα φέρουν ένα ιόν ψευδαργύρου στο ενεργό τους κέντρο (59).

1.10.1. Δομή του ενζύμου ERAP1-Περιγραφή του ενεργού κέντρου

Η ERAP1 αποτελείται από 4 διακριτούς τομείς (60). Στον τομέα II (κατάλοιπα 255-527) βρίσκεται το καταλυτικό κέντρο και τα μοτίβα GAMEN (κατάλοιπα 317-321) και HExxHx₁₈E (41). Η δευτεροταγής δομή του τομέα I (κατάλοιπα 1-254) αποτελείται εξ ολοκλήρου από β-sandwich και καλύπτει το ενεργό κέντρο, σχηματίζοντας θέση πρόσδεσης για το αμινοτελικό άκρο του πεπτιδίου-υποστρώματος (60). Ο τομέας III (κατάλοιπα 528-613) έχει επίσης δομή β-sandwich και βρίσκεται μεταξύ των τομέων IV και II. Ο τομέας IV (κατάλοιπα 614-941) αποτελείται από 16 α-έλικες ποικίλου μεγέθους, συγκεντρωμένες έτσι ώστε να σχηματίζουν μια κοίλη επιφάνεια στραμμένη προς το ενεργό κέντρο (60). Μια βαθιά κοιλότητα σχηματίζεται μεταξύ των τομέων II και IV, η οποία δύναται να παρέχει πρόσβαση στο ενεργό κέντρο ακόμη και στα μεγαλύτερα πεπτιδία-υποστρώματα του ενζύμου (60). Η κοιλότητα εκτείνεται έως και 36 Å από το ενεργό κέντρο μέχρι το εσωτερικό του τομέα IV (60). Το ενεργό κέντρο της ERAP1 διαμορφώνεται στη συμβολή 5 στοιχείων δευτεροταγούς δομής: της α-έλικας H₂ και της εφαπτόμενης αντιπαράλληλης έλικας H₅ του HExxHx₁₈E μοτίβου, τη λούπα GAMEN, τη λούπα του τομέα I και την α-έλικα H₅ που είναι εφαπτόμενη στο σημείο επαφής των τομέων II και IV. Το υδροξύλιο της πλευρικής αλυσίδας της Tyr438 είναι καθοριστικό για την κατάλυση, καθώς η μετάλλαξη σε φαινυλαλανίνη μειώνει την ενζυμική δραστηριότητα κατά 190 φορές (60).



Εικόνα 8: Σχηματική αναπαράσταση της δομής του ενζύμου ERAP1 με 10μερές φωσφινικό πεπτιδίο (κωδικός PDB: 6RQX). Διακρίνονται ο τομέας I (κόκκινο), ο τομέας II (μπλε), ο τομέας III (κίτρινο) και ο τομέας IV (πράσινο). Το ιόν ψευδαργύρου απεικονίζεται ως γκρι σφαίρα και βρίσκεται σε απόσταση 2 Angstrom από τη φωσφινική ομάδα του πεπτιδίου (μωβ σφαίρες για τα άτομα άνθρακα).

Στα καταλυτικά αμινοξέα του ενεργού κέντρου, τα οποία είναι συντηρημένα μεταξύ των M1 μεταλλοπεπτιδασών, περιλαμβάνονται: το Glu376, η His357 και η His353 που αλληλεπιδρούν με το ιόν ψευδαργύρου, το Glu320, το Glu183 και το Glu354 (60). Τα κατάλοιπα Glu320 και Glu183 βρίσκονται σε απόσταση σχηματισμού δεσμών υδρογόνου (2.7 και 2.6 Angstrom αντιστοίχως) με την αμινομάδα του πεπτιδίου-υποστρώματος (84). Το Glu354 ενεργοποιεί ένα μόριο νερού, το οποίο εν συνεχεία πραγματοποιεί μια πυρηνόφιλη επίθεση στο άτομο άνθρακα του καρβονυλίου του δεσμού που διασπάται, πυροδοτώντας με αυτό τον τρόπο τον καταλυτικό μηχανισμό (132).

1.10.2. Λειτουργία και ιδιότητες της ERAP1 (επιλογή υποστρώματος, συμβολή στην αντιγονοπαρουσίαση και ρόλος των πολυμορφισμών στην αλλαγή δραστηριότητας)

Η ERAP1 επεξεργάζεται αποτελεσματικώς πεπτίδια μήκους 9-16 αμινοξέων, ενώ παρουσιάζει μειωμένη ή καθόλου δραστηριότητα σε πεπτίδια μικρότερα των 8 και μεγαλύτερα των 18 αμινοξέων (61). Η προαναφερθείσα ιδιότητα του ενζύμου συμπίπτει με το ρόλο του στη δημιουργία ώριμων αντιγονικών επιτόπων για πρόσδεση στο MHC I (61). Επίσης, η ιδιότητα αυτή διαφοροποιεί την ERAP1 από άλλα μέλη της M1 οικογένειας των αμινοπεπτιδασών όπως η A4 υδρολάση και η αμινοπεπτιδάση B, καθώς και από την κυτταροπλασματική αμινοπεπτιδάση λευκίνης (LAP), οι οποίες προτιμούν πεπτίδια μικρότερα των 5 αμινοξέων (61). Μελέτες *in vitro* έδειξαν ότι το προτιμητέο αμινοξύ στο αμινοτελικό άκρο είναι η λευκίνη, ενώ τα αμινοξέα αλανίνη, μεθειονίνη και φαινυλαλανίνη επίσης καταβολίζονται αρκετά γρήγορα από την ERAP1 (62). Αντίθετα, τα φορτισμένα αμινοξέα στο αμινοτελικό άκρο υφίστανται αργή επεξεργασία (62, 63). Η προλίνη στη δεύτερη θέση από το αμινοτελικό άκρο του πεπτιδίου καθιστά αδύνατη τη δράση του ενζύμου (63). Τα αποτελέσματα αυτά εξηγούνται από τη διαμόρφωση της κοιλότητας S1 του ενεργού κέντρου του ενζύμου, όπου εισέρχεται η πλευρική αλυσίδα του αμινοτελικού αμινοξέος του πεπτιδίου (60). Πρόκειται για μια υδρόφοβη κοιλότητα που σχηματίζεται από τα αμινοξέα Ser316, Met319, Gln181 και Glu183 (41). Κρυσταλλικές δομές της ERAP1 απουσία αναστολέα (2XDT) αλλά και συγκρυστάλλωσης με τον αναστολέα bestatin (3MDJ) αποδεικνύουν μια μεγάλη αλλαγή στερεοδιαμόρφωσης που σχετίζεται με το άνοιγμα της περιοχής πρόσδεσης του υποστρώματος και της αναδιοργάνωσης του ενεργού κέντρου για την κατάλυση (60). Μελέτες κινητικής και δραστηριότητας του ενζύμου *in vitro* υποστηρίζουν την ύπαρξη ενός ρυθμιστικού κέντρου διαφορετικού από το καταλυτικό κέντρο και η αλληλεπίδραση μεταξύ τους εξαρτάται από το μήκος του υποστρώματος (60). Πράγματι, μια πρόσφατη δομή της ERAP1 με ένα 15μερές πεπτίδιο, το οποίο έφερε μια φωσφινική ομάδα στο αμινοτελικό άκρο ώστε να δρα ως ανάλογο μεταβατικής κατάστασης αποκάλυψε τη θέση του ρυθμιστικού κέντρου (103). Στην ανωτέρω δομή, το αμινοτελικό άκρο του πεπτιδίου αλληλεπιδρά με το ιόν ψευδαργύρου, ενώ η καρβοξυτελική περιοχή εντοπίζεται σε μια θέση

εκτός του καταλυτικού κέντρου κοντά στη βάση του τομέα IV (103). Το καρβοξυτελικό αμινοξύ του πεπτιδίου σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου και γέφυρες άλατος με τα κατάλοιπα Tyr684, Lys685 και Arg807 (103). Η αμίδωση του καρβοξυτελικού άκρου του πεπτιδίου LLRIQRGPGRAVVTI υποτριπλασίασε την ταχύτητα καταβολισμού του *in vitro* (103). Επίσης, τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα Tyr684Phe και Lys685Ala εμφάνισαν μειωμένη ταχύτητα καταβολισμού του προαναφερθέντος πεπτιδίου συγκριτικά με το αλληλόμορφο αγρίου τύπου, με τη μεγαλύτερη μείωση να προκαλείται από τη μετάλλαξη Lys685Ala (103). Η εναλλαγή της στερεοδιαμόρφωσης (κλειστή/ανοιχτή) ρυθμίζεται επίσης από το πεπτίδιο που καταλαμβάνει το ρυθμιστικό κέντρο (60). Η δυνατότητα υδρόλυσης του υποστρώματος L-leucine-7-amido-4-methyl coumarin (L-AMC) από την ERAP1 αυξάνεται *in vitro* παρουσία μικρών πεπτιδίων, τα οποία πιθανώς προσδένονται στο ρυθμιστικό κέντρο (61). Οι ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις του τομέα IV με τον τομέα II είναι σημαντικές για την κατάλυση. Σημειακές μεταλλάξεις στον τομέα IV (K828Q/E831Q και K828Q/E831Q/K798Q/K863Q) μείωσαν την δραστικότητα της ERAP1 κατά 1 τάξη μεγέθους όσον αφορά στο υπόστρωμα L-AMC και κατά 4 φορές με υπόστρωμα 10μερές πεπτίδιο, παρά το γεγονός ότι βρίσκονται μακριά από το καταλυτικό κέντρο (69). Επίσης, οι ανωτέρω μεταλλάξεις οδήγησαν σε αύξηση της σταθεράς αναστολής (IC_{50}) κατά 10-20 φορές για συγκεκριμένο αναστολέα (DG013A), ενώ και η σταθερά αποδέσμευσης επιταχύνθηκε κατά 20 φορές (69). Η ERAP1 διαθέτει μια μοναδική ιδιότητα μεταξύ των αμινοπεπτιδασών, καθώς η προτίμηση υποστρώματος εξαρτάται εν μέρει και από το καρβοξυτελικό αμινοξύ του πεπτιδίου (61). Το ένζυμο παρουσιάζει ισχυρή προτίμηση για πεπτίδια που φέρουν υδρόφοβο αμινοξύ στο καρβοξυτελικό άκρο, ενώ επεξεργάζεται πολύ πιο αργά τα πεπτίδια με φορτισμένο καρβοξυτελικό άκρο (61, 103). Επιπλέον, η αλληλουχία των αμινοξέων στο εσωτερικό του πεπτιδίου διαδραματίζει εξίσου σημαντικό ρόλο στην ταχύτητα καταβολισμού του πεπτιδίου από την ERAP1, ειδικότερα στις θέσεις 2, 5 και 7 του πεπτιδίου από το αμινοτελικό άκρο όπου διαπιστώθηκε προτίμηση σε υδρόφοβα και θετικά φορτισμένα αμινοξέα (62). Αντίθετα, η ύπαρξη γλουταμικού οξέος σε οποιαδήποτε από τις παραπάνω θέσεις επηρεάζει αρνητικά τη δράση του ενζύμου (62). Η ποσότητα των συμπλόκων MHC I που παρουσιάζονται για ανοσοεπιτήρηση καθορίζεται εν μέρει από τα

αμινοξέα που βρίσκονται στην αλληλουχία πριν το αμινοτελικό άκρο των ώριμων επιτόπων και τη δυνατότητα της ERAP1 να τα καταβολίσει (62). Η ERAP1 διαδραματίζει κομβικό ρόλο στην επεξεργασία των αμινοτελικά εκτεταμένων αντιγονικών επιτόπων και ενισχύει την αντιγονοπαρουσίαση *in vivo* (70). Συχνά, το ένζυμο διακόπτει τον καταβολισμό, ανεξάρτητα από το αμινοτελικό άκρο, όταν δημιουργηθεί ο ώριμος αντιγονικός επίτοπος, λειτουργώντας ως μοριακός χάρακας (63). Ωστόσο, σε άλλες περιπτώσεις η ERAP1 καταστρέφει τους αντιγονικούς επιτόπους, καταβολίζοντας τα πεπτίδια σε πολύ μικρά μήκη για πρόσδεση στο MHC I (64). Σε κάθε περίπτωση, ο ρόλος της ERAP1 είναι άρρηκτα συνδεδεμένος με την επεξεργασία πρόδρομων αντιγονικών επιτόπων στο ενδοπλασματικό δίκτυο (64). Παρεμπόδιση της μετάφρασης του γονιδίου της ERAP1 σε κύτταρα HeLa αυξάνει το συνολικό αριθμό μορίων ιστοσυμβατότητας στην κυτταροπλασματική μεμβράνη (64). Όμως ύστερα από χορήγηση ιντερφερόνης-γ στην ίδια κυτταρική σειρά, ο αριθμός MHC-I παρέμεινε αναλλοίωτος ή μειώθηκε (64). Η ενίσχυση ή ο περιορισμός της αντιγονοπαρουσίασης από την ERAP1 ποικίλλει μεταξύ διαφορετικών κυττάρων και εξαρτάται από τα αλληλόμορφα MHC I, τους επιτόπους που μελετώνται και άλλους παράγοντες (64).

1.10.3. Καθοριστική συμβολή της ERAAP στην αντιγονοπαρουσίαση

Η καθοριστική συμβολή του αντίστοιχου ομολόγου του μυός, ERAAP, στην επεξεργασία αντιγονικών επιτόπων αποδεικνύεται από μελέτες *in vivo*. Το πρωτόζωο *Toxoplasma gondii* αναπτύσσεται και προκαλεί οξεία μόλυνση 5-10 φορές ταχύτερα σε μακροφάγα και σπληνοκύτταρα διαγονιδιακών ποντικών, που δεν εκφράζουν το γονίδιο της ERAAP (65). Επίσης, απαλοιφή της ERAAP οδηγεί σε μειωμένη έκφραση και των 5 αλληλομόρφων MHC I (H-2K^b, H-2D^b, H-2K^d, H-2D^d και H-2L^d) στα σπληνοκύτταρα διαγονιδιακών ποντικών συγκριτικά με τα αγρίου τύπου, ενώ και όσα μόρια ιστοσυμβατότητας εκφράζονται δεν φέρουν πεπτίδια υψηλής συγγένειας και είναι πιο ασταθή (66). Επίσης, το σύνολο των πεπτιδίων που παρουσιάζεται στα MHC I των αντιγονοπαρουσιαζόντων κυττάρων είναι μειωμένο και διαφορετικό, ενώ επηρεάζεται αρνητικά και η ανοσολογική απόκριση των CD8⁺ T-κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων (66). Ακόμη, τα κύτταρα που δεν εκφράζουν την ERAAP

παρουσιάζουν αυξημένη ανοσογονικότητα στα ποντίκια αγρίου τύπου: το 43 % των CD8⁺ T-κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων παρήγαγαν ιντερφερόνη- γ ως απόκριση σε αντιγονοπαρουσιάζοντα κύτταρα που δεν εκφράζουν ERAAP, ενώ μόλις το 1.5 % παρήγαγε ιντερφερόνη- γ ως απόκριση στα αντιγονοπαρουσιάζοντα κύτταρα αγρίου τύπου (67). Μελέτες δείχνουν ακόμη ότι η ERAAP εμπλέκεται και στη φυσική ανοσία και στην ενεργοποίηση των φυσικών κυττάρων-φονέων στα ποντίκια. Η έλλειψη της ERAAP, κατόπιν έκθεσης σε ορισμένα φλεγμονώδη ερεθίσματα, οδηγεί σε αυξημένη έκφραση αρκετών χημειοκινών, κυτοκινών (όπως η ιντερλευκίνη-6, η ιντερλευκίνη 12 και ο ογκονεκρωτικός παράγοντας α) και υποδοχέων αναγνώρισης παθογόνων (68). Επιπλέον, ενισχύονται τα επίπεδα φαγοκύτωσης σε δενδριτικά κύτταρα και μακροφάγα που δεν εκφράζουν ERAAP (68).

1.10.4. Δομή και λειτουργία του ενζύμου ERAP2

Η ERAP2 αποτελείται επίσης από 4 τομείς. Ο αμινοτελικός τομέας I (κατάλοιπα 54-271) παρουσιάζει μια δομή β -sandwich και ο τομέας II (κατάλοιπα 272-546) περιέχει το HExxHx₁₈E μοτίβο πρόσδεσης του ψευδαργύρου και το μοτίβο GAMEN (κατάλοιπα 334-338) (98). Ο τομέας III (κατάλοιπα 547-647) διαθέτει δομή β -sandwich και δρα ως σύνδεσμος μεταξύ των τομέων II και IV (98). Ο τομέας IV (κατάλοιπα 648-960) αποτελείται εξ ολοκλήρου από α -έλικες και αλληλεπιδρά στενά με τον τομέα II καλύπτοντας το ενεργό κέντρο, όπου βρίσκεται ο ψευδάργυρος (98). Το ιόν ψευδαργύρου αλληλεπιδρά με τα αμινοξέα His370, His374 και Glu393 (98). Η Tyr455 (όπως η αντίστοιχη Tyr438 στην ERAP1) είναι συντηρημένη στις M1 αμινοπεπτιδάσες και συμμετέχει στη σταθεροποίηση του τετραεδρικού ενδιάμεσου κατά την κατάλυση (98). Η κοιλότητα S1 διαμορφώνεται από τα αμινοξέα Gly334, Ala335, Pro333, Phe450, Glu200, Asp198 και Glu337, ενώ καλύπτεται από τα κατάλοιπα Glu177, Pro201 και Gln447 (98). Ο πολυμορφισμός Asn392Lys, επιφέρει αλλαγές στη δραστηριότητα του ενζύμου, όπως θα αναλυθεί παρακάτω. Η παρούσα δομή (κωδικός PDB:2XDT) αποκαλύπτει ότι η Asn392 βρίσκεται πολύ κοντά στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου και πιο συγκεκριμένα στα αμινοξέα Glu200, Glu337 και Glu393, ενώ αλληλεπιδρά και με την Tyr262 (98). Η δομή της ERAP2 έχει επίσης επιλυθεί με 2 προσδέτες, το πεπτιδίο RGPGRFVVTI και

ένα φωσφινικό ψευδοπεπτιδίο που λειτουργεί ως αναστολέας (102). Η σύγκριση των δομών αποκάλυψε ότι κατόπιν πρόσδεσης του αναστολέα ή του πεπτιδίου πραγματοποιούνται 2 κύριες δομικές αναδιαμορφώσεις: αλλαγή προσανατολισμού της πλευρικής αλυσίδας της Tyr455 και μια πλευρική μετατόπιση των αμινοξέων 444-454, όπου περιλαμβάνεται και η Phe450 που συμβάλλει στη διαμόρφωση της κοιλότητας S1 (102). Η ERAP2 διαφέρει από την ERAP1 στην εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα. Παρουσιάζει εξειδίκευση για τα θετικά φορτισμένα αμινοξέα στο αμινοτελικό άκρο των πεπτιδίων (100). Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης έδειξαν ότι σχηματίζει ετεροδιμερή (σε ποσοστό $\leq 30\%$) με την ERAP1 *in vivo* (100). Το ετεροδιμερές παρουσίασε αυξημένη αποτελεσματικότητα στην επεξεργασία πρόδρομων αντιγονικών επιτόπων *in vitro* συγκριτικά με το κάθε ένζυμο ξεχωριστά (101). Η ERAP2 δεν παρουσιάζει προτίμηση για υδρόφοβο αμινοξύ στο καρβοξυτελικό άκρο (61). Επίσης, η ERAP2 εμφανίζει τη μεγαλύτερη δραστηριότητα για πεπτιδία μήκους 7 αμινοξέων, ενώ από τα 10μερή πεπτιδία και άνω η δραστηριότητα μειώνεται πάνω από 80% (102). Ακόμη, η δραστηριότητα της ERAP2 έναντι του υποστρώματος L-Arginine-7-amido-4-methylcoumarin hydrochloride (R-AMC) μειώθηκε παρουσία του επιτόπου SIINFEKL, ενώ στην περίπτωση της ERAP1 η δραστηριότητα ως προς το L-AMC σχεδόν τριπλασιάστηκε (102). Η ERAP1 αποτελεί το κυρίαρχα εμπλεκόμενο ένζυμο στην επεξεργασία των πρόδρομων αντιγονικών επιτόπων, ωστόσο η συνεργασία της ERAP2 απαιτείται σε πολύπλοκα ή πιο επιμήκη πεπτιδία που περιλαμβάνουν και θετικά φορτισμένα αμινοξέα (100). Συμπερασματικά, η ERAP2 ενδεχομένως λειτουργεί συμπληρωματικά στη δράση της ERAP1 (102), ενώ ίσως διαδραματίζει τον κυρίαρχο ρόλο σε ιστούς με χαμηλή έκφραση ERAP1 (100).

1.10.5. Λειτουργία της IRAP και διαφορές συγκριτικά με την ERAP1

Η IRAP παρουσιάζει 50% ομολογία με τις αμινοξικές αλληλουχίες των ERAP1 και ERAP2. Το ένζυμο αλλάζει στερεοδιαμόρφωση από ανοιχτή σε κλειστή κατόπιν πρόσδεσης αναστολέα (113). Στην κλειστή στερεοδιαμόρφωση, ο τομέας IV μετατοπίζεται και αντιπαράθεται στους τομείς I και II (113). Ως αποτέλεσμα, η εσωτερική κοιλότητα αποκόπτεται πλήρως από τον εξωτερικό διαλύτη (113). Ωστόσο, η IRAP διαφέρει από τις ERAP1 και ERAP2 ως προς

το γεγονός ότι πρόκειται για διαμεμβρανική πρωτεΐνη (109). Αρχικά, εντοπίζεται μαζί με τον μεταφορέα γλυκόζης GLUT4 σε ενδοκυτταρικά κυστίδια των λιποκυττάρων και των μυικών κυττάρων, αλλά το 50 % του ενζύμου μετατοπίζεται γρήγορα στην κυτταροπλασματική μεμβράνη ως απόκριση στην ινσουλίνη και στη μεταγωγή σήματος μέσω του υποδοχέα της ανοσογλοβουλίνης E (110). Επίσης, η IRAP εντοπίζεται μαζί με το 25 % των μορίων ιστοσυμβατότητας I σε μυελοειδή δένδριτικά κύτταρα τόσο στα ποντίκια όσο και στον άνθρωπο, ενώ η έκφρασή της αυξάνεται σημαντικά στα φαγοσώματα των δένδριτικών κυττάρων κατόπιν ενδοκύτωσης κυττάρων ζυμομύκητα (110). Η IRAP δε συμμετέχει στο βιοχημικό μονοπάτι αντιγονοπαρουσίασης των MHC I στο ενδοπλασματικό δίκτυο, όμως διαδραματίζει κομβικό ρόλο στη διασταυρούμενη αντιγονοπαρουσίαση: η απουσία της σε διαγονιδιακά ποντίκια οδήγησε στη μείωση της διασταυρούμενης αντιγονοπαρουσίασης του αντιγονικού επιτόπου SIINFEKL από 50 έως 70 % (110). Αξιοσημείωτες διαφορές μεταξύ των ενζύμων IRAP και ERAP1 σημειώνονται επίσης ως προς τη δραστικότητα και την προτίμηση υποστρώματος. Η ειδική δραστικότητα της IRAP και της ERAP1 έναντι του υποστρώματος L-AMC ανέρχεται σε $233 \pm 14 \cdot 10^3$ και $3.1 \pm 0.6 \cdot 10^3$ mol AMC/(mol ενζύμου*min), αντιστοίχως (109). Τα 2 ένζυμα παρουσιάζουν μέγιστη καταλυτική δραστικότητα σε pH 7 *in vitro*, όμως η IRAP διατηρεί 70 % της δραστικότητας της σε pH 6 έναντι 30 % της ERAP1 (109). Η προαναφερθείσα ιδιότητα της IRAP εξηγείται από τον εντοπισμό και τη δράση του ενζύμου εντός όξινων κυστιδίων (110). Ακόμη, η IRAP επεξεργάζεται πρόδρομα αντιγονικά πεπτιδία και είτε δημιουργεί ώριμους επιτόπους είτε συνεχίζει τον καταβολισμό σε μικρότερα προϊόντα, αλλά με διαφορετικό τρόπο από την ERAP1 (109). Επιπλέον, τα πεπτιδία μήκους 6-8 αμινοξέων καταβολίζονται γρηγορότερα από την IRAP, ενώ και η παρουσία του επιτόπου SIINFEKL μειώνει την δραστικότητα έναντι του L-AMC σε αντίθεση με την ERAP1 της οποίας η δραστικότητα τριπλασιάζεται (112). Η IRAP παρουσιάζει προτίμηση τόσο για υδρόφοβα όσο και για θετικά φορτισμένα αμινοξέα στο αμινοτελικό άκρο των πεπτιδίων (112). Δυο πολυμορφισμοί της IRAP σχετίζονται με γενετική προδιάθεση για την εμφάνιση ψωρίασης και αγκυλωτικής σπονδυλίτιδας: ο rs61752351-1166M και ο rs2303118-A609T (112). Ο απλότυπος A609T εμφανίζει υποδιπλάσια ειδική δραστικότητα ως

προς το L-AMC συγκριτικά με το αλληλόμορφο αγρίου τύπου (93). Τέλος, η IRAP συμβάλλει στη ρύθμιση των επιπέδων των πεπτιδικών ορμονών βασοπρεσίνη (CYFGRPCNG) και οξυτοκίνη (CYIGLPCNQ) στο πλάσμα του αίματος και στον εγκέφαλο (11). Οι ανωτέρω πεπτιδικές ορμόνες σχηματίζουν ενδομοριακό δισουλφιδικό δεσμό, ενώ η IRAP καταλύει την υδρόλυση του πεπτιδικού δεσμού της κυστεΐνης με την τυροσίνη απενεργοποιώντας τες (111). Η ανωτέρω αντίδραση *in vitro* δεν καταλύεται από άλλη αμινοπεπτιδάση (111).

1.11. Πολυμορφισμοί των ενζύμων ERAP1 και ERAP2 και συσχέτιση με ασθένειες

Η ERAP1 αποτελεί ένα πολυμορφικό ένζυμο και ορισμένοι αλλότυποι του παρουσιάζουν συσχέτιση με ασθένειες, οι οποίες συσχετίζονται ταυτόχρονα με αλληλόμορφα MHC I και II (71). Μεταξύ αυτών ανήκουν οι ακόλουθες φλεγμονώδεις παθήσεις αυτοάνοσης αιτιολογίας: η αγκυλωτική σπονδυλίτιδα, η ασθένεια Behçet, η ψωρίαση, ο διαβήτης τύπου 1, η χοριο-αμφιβληστροειδοπάθεια Birdshot και η σκλήρυνση κατά πλάκας (71).

1.11.1. Οι πολυμορφισμοί που συσχετίζονται με την εμφάνιση παθήσεων επιφέρουν αλλαγές στη δραστηριότητα της ERAP1 ή στα επίπεδα έκφρασης

Όπως έχει προαναφερθεί, η αγκυλωτική σπονδυλίτιδα επιβεβαιωμένα συσχετίζεται με το αλληλόμορφο HLA-B*27, με το 95 % των ασθενών να φέρουν το συγκεκριμένο αλληλόμορφο (72). Ωστόσο, μόνο ένα μικρό ποσοστό (1-5 %) των ανθρώπων που εκφράζουν το αλληλόμορφο αναπτύσσουν την ασθένεια, ενώ και η συσχέτιση της ERAP1 με την εμφάνιση της ασθένειας περιορίζεται μόνο στους φέροντες το HLA-B*27 (73). Πράγματι, έχει διαπιστωθεί ισχυρή γενετική προδιάθεση μεταξύ των ακόλουθων 5 πολυμορφισμών της ERAP1 και της αγκυλωτικής σπονδυλίτιδας: rs30187-Lys528Arg, rs27044-Gln730Glu, rs2287987-Met349Val, rs10050860-Asp575Asn και rs17482078-Arg725Gln (74). Οι ανωτέρω πολυμορφισμοί επιφέρουν αλλαγές στη δραστηριότητα του ενζύμου. Το αλληλόμορφο Lys528Arg παρουσιάζει 4 φορές μειωμένη δυνατότητα υδρόλυσης του L-AMC ενώ το αλληλόμορφο Gln730Glu εμφανίζει κατά 25 % αυξημένη δραστηριότητα (75).

Επίσης, η ενίσχυση της δυνατότητας υδρόλυσης του L-AMC παρουσία του πεπτιδίου SIINFELK διαφέρει μεταξύ των αλληλομόρφων: 2.2 φορές για το αγρίου τύπου, 4 φορές για το Lys528Arg και 1.6 φορές για το Gln730Glu (75). Ο καταβολισμός άλλων πεπτιδίων *in vitro* έδειξε ότι η σταθερά εξειδίκευσης (k_{cat}) και η σταθερά Michaelis επηρεάζονται στα αλληλόμορφα Gln730Glu και Lys528Arg (75). Ο καταβολισμός παρεκκλίνει προς ένα μοντέλο αναστολής από υπόστρωμα, το οποίο εξαρτάται από το αλληλόμορφο και το πεπτίδιο συγχρόνως (75). Χρησιμοποιώντας ως αναφορά το αλληλόμορφο 528Lys/730Glu, οι πολυμορφισμοί 528Lys/730Gln και 528Arg/730Glu εμφανίζουν 50 % μειωμένη δραστικότητα ως προς το L-AMC, ενώ το αλληλόμορφο 528Arg/730Gln παρουσιάζει 70 % λιγότερη δραστικότητα (80). Ακόμη, τα αλληλόμορφα Arg725Gln και Lys528Arg παρουσιάζουν κατά 40 % μειωμένη δραστικότητα έναντι του πεπτιδίου WRVYEKCALK (55). Τέλος, τα αλληλόμορφα Met349Val/Lys528Arg, Arg725Gln/Gln730Glu και Lys528Arg/Arg725Gln παρουσιάζουν μειωμένη δυνατότητα δημιουργίας του πεπτιδίου SIINFELH από τον πρόδρομο AIVMKSIINFELH κατά 60 % και 70 % αντιστοίχως, συγκριτικά με το αγρίου τύπου (72). Η παρουσία συγκεκριμένου αλληλομόρφου της ERAP1, το οποίο σχετίζεται με αυξημένη επικινδυνότητα για την εμφάνιση της αγκυλωτικής σπονδυλίτιδας, επάγει μειωμένη παρουσίαση ενδογενών και προερχόμενων από παθογόνα επιτόπων από το HLA-B*27 *in vivo*, συγκριτικά με άλλο αλληλόμορφο χαμηλής επικινδυνότητας (79). Αυτό συμβαίνει διότι εμφανίζει αυξημένη καταλυτική δραστικότητα καταστρέφοντας αποτελεσματικότερα τους επιτόπους που προορίζονται για το μόριο ιστοσυμβατότητας HLA-B*27 (79). Τα δεδομένα συνηγορούν ότι ένας μηχανισμός που περιλαμβάνει ελαττωματική ή μειωμένη επεξεργασία πρόδρομων αντιγονικών επιτόπων, σε συνδυασμό με τις ιδιότητες του HLA-B*27, συντελούν από κοινού σε αλλοιωμένη αντιγονοπαρουσίαση (74). Ως αποτέλεσμα, υποστηρίζεται ότι η αναστολή της ERAP1 ίσως είναι αποτελεσματική για την αντιμετώπιση της αγκυλωτικής σπονδυλίτιδας, τουλάχιστον στους φέροντες το αλληλόμορφο HLA-B*27 (74). Η συσχέτιση των πολυμορφισμών Lys528Arg και rs27524 (εσώνιο) της ERAP1 με την ψωρίαση έχει επιβεβαιωθεί σε ασθενείς που φέρουν το αλληλόμορφο HLA-C*06:02, το οποίο αποτελεί γενετική προδιάθεση για την εμφάνιση της ασθένειας (76). Οι πολυμορφισμοί Asp575Asn και Arg725Gln συσχετίζονται με την εμφάνιση της

ασθένειας Behçet σε συνδυασμό με το αλληλόμορφο HLA-B*51 (77). Η συσχέτιση πολυμορφισμών της ERAP1 με τη χοριο-αμφιβληστροειδοπάθεια Birdshot μελετήθηκε σε κυτταρικές σειρές ομόζυγες για το αλληλόμορφο HLA-A*29:02, που αποτελεί ισχυρό παράγοντα γενετικής προδιάθεσης (78). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι πολυμορφισμοί με τη μεγαλύτερη δραστικότητα δημιουργούν περισσότερους επιτόπους μήκους 9 αμινοξέων, οι οποίοι φέρουν περισσότερα αρωματικά και υδρόφοβα αμινοξέα (78). Οι πολυμορφισμοί στις θέσεις 528 και 730 επηρεάζουν ακόμη και μηχανισμούς της έμφυτης ανοσίας, όπως διαπιστώθηκε σε μελέτη *in vivo* (82). Μονοπύρνα κύτταρα περιφερειακού αίματος (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) παράγαγαν αξιοσημείωτα αυξημένα επίπεδα κυτοκινών και χημειοκινών με δόσοεξαρτώμενο τρόπο, κατόπιν εξοκυτταρικής χορήγησης ERAP1 (82). Όμως, το αλληλόμορφο 528Arg/730Gln προκάλεσε την έκφραση σημαντικά υψηλότερων επιπέδων ιντερλευκίνης-1β, ιντερλευκίνης-6 και ογκοκρωτικού παράγοντα α εν συγκρίσει με τα αλληλόμορφα 528Lys/730Glu και 528Arg/730Glu (82). Επίσης, το αλληλόμορφο 528Lys/730Gln δεν οδήγησε στην έκφραση ανιχνεύσιμων επιπέδων των ανωτέρω κυτοκινών, αποτέλεσμα το οποίο συμπίπτει με τον προστατευτικό του ρόλο σε αυτοάνοσες παθήσεις όπως έχει αποτυπωθεί από γονιδιακές μελέτες (82). Το μοτίβο διαφορετικής επιρροής των ανωτέρω πολυμορφισμών επαληθεύτηκε και στην ενεργοποίηση των φυσικών κυττάρων-φονέων και των δενδριτικών κυττάρων (82). Οι πολυμορφισμοί rs26653-R127P και rs3734016-E56K συσχετίζονται με τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας που προκαλείται από στελέχη του ιού των ανθρώπινων κονδυλωμάτων (97). Η ετεροζυγωτία για τον πολυμορφισμό στη θέση 127 παρουσίασε ισχυρή συσχέτιση με φυσιολογικά επίπεδα έκφρασης ERAP1 ενώ η ομοζυγωτία του δευτερεύοντος αλληλομόρφου συσχετίστηκε ισχυρά με μειωμένη επιβίωση (97). Η ετεροζυγωτία για τον πολυμορφισμό E56K συσχετίστηκε με μειωμένη επιβίωση συγκριτικά με την ομοζυγωτία του κύριου αλληλομόρφου (97).

1.11.2. Πολυμορφισμοί της ERAP2 που επηρεάζουν τη δραστικότητα του ενζύμου ή τα επίπεδα έκφρασης

Πολυμορφισμοί της ERAP2 επίσης συσχετίζονται με ασθένειες, ωστόσο οι πολυμορφισμοί που επηρεάζουν την αλληλουχία αμινοξέων είναι περιορισμένοι συγκριτικά με την ERAP1 (99). Στις ασθένειες αυτές συγκαταλέγονται η χοριο-αμφιβληστροειδοπάθεια Birdshot, η ψωρίαση, η αγκυλωτική σπονδυλίτιδα, η υπέρταση, η προεκλαμψία και η νόσος του Chron (99). Ο πολυμορφισμός rs10044354 (εσώνιο, C>T) παρατηρήθηκε ότι συσχετίζεται με την εμφάνιση της χοριο-αμφιβληστροειδοπάθειας Birdshot (92). Συγκεκριμένα, Β-λεμφοκύτταρα ομόζυγα για τον πολυμορφισμό rs10044354T που σχετίζεται με αυξημένη προδιάθεση για την ασθένεια, εμφάνιζαν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης ERAP2 (92). Αντίθετα, Β-λεμφοκύτταρα ομόζυγα για τον προστατευτικό πολυμορφισμό rs10044354C χαρακτηρίζονταν από μειωμένη ή μηδενική έκφραση ERAP2 (92). Τα ανωτέρω δεδομένα και το γεγονός ότι η ERAP2 εξειδικεύεται σε διαφορετικά υποστρώματα από την ERAP1, οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η ERAP2 συμβάλλει ξεχωριστά στην εμφάνιση της ασθένειας διαφοροποιώντας ή καταστρέφοντας τους επιτόπους που προσδένονται στο αλληλόμορφο HLA-A*29 (92).

Ο πολυμορφισμός rs2549782-Lys392Asn διαπιστώθηκε ότι συσχετίζεται με ανθεκτικότητα έναντι στη μόλυνση από τον HIV-1 σε μελέτη οροαρνητικών ατόμων που υφίσταντο χρόνια έκθεση στον ιό (93). Ειδικότερα, η ομοζυγωτία για την κωδικοποίηση λυσίνης εμφάνισε την υψηλότερη προστασία έναντι του ιού (93). Σε άλλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε Νορβηγικούς και Αυστραλιανούς πληθυσμούς, διαπιστώθηκε ότι ο πολυμορφισμός Lys392Asn συσχετίζεται και με την προεκλαμψία (94). Όσον αφορά στους Αυστραλιανούς πληθυσμούς, συσχέτιση με την προεκλαμψία παρουσίασε και ο σπανιότερος πολυμορφισμός rs17408150-Leu669Gln (94). Επίσης, 3 πολυμορφισμοί της ERAP2 συνδέονται με την εμφάνιση αγκυλωτικής σπονδυλίτιδας: ο πολυμορφισμός Lys392Asn, ο πολυμορφισμός rs2248374 (εσώνιο A>G) όπου διαπιστώθηκε ότι το προστατευτικό αλληλόμορφο G προκαλούσε πλήρη απώλεια του mRNA του ενζύμου και ο πολυμορφισμός rs2910686 (εσώνιο T>C) που συσχετίζεται με την ασθένεια σε άτομα που δε φέρουν το μόριο ιστοσυμβατότητας HLA-B*27 (95). Ο πολυμορφισμός 2248374G της ERAP2

αλλοιώνει μια θέση δότη ματίσματος (νουκλεοτιδική περιοχή κοντά στο 5' άκρο ενός εσωνίου) που οδηγεί σε μη απομάκρυνση του εσωνίου 10 από τις ριβονουκλεοπρωτεΐνες κατά την ωρίμανση του mRNA (108). Ως αποτέλεσμα, προκύπτει λανθασμένο πλαίσιο ανάγνωσης που οδηγεί σε πρόωρη αποδόμηση του μη-νοηματικού mRNA ή στη σύνθεση μιας μη λειτουργικής πολυπεπτιδικής αλυσίδας (534 αμινοξέα) λόγω πρόωρου τερματισμού της μετάφρασης (108). Ο πολυμορφισμός στη θέση 392 της ERAP2 επιφέρει σημαντικές αλλαγές στη δραστικότητα του ενζύμου (96). Το αλληλόμορφο 392Lys παρουσιάζει μικρότερη ικανότητα υδρόλυσης του υποστρώματος R-AMC. Ειδικότερα, η συγγένεια του αλληλομόρφου 392Asn ως προς το ανωτέρω υπόστρωμα ήταν υπερδιπλάσια ($K_M = 30 \pm 9 \mu M$) συγκριτικά με το αλληλόμορφο 392Lys ($K_M = 17 \pm 5 \mu M$). Ωστόσο, η καταλυτική σταθερά επηρεάστηκε σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό ($k_{cat} = 104 \pm 9 \cdot 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$ για το αλληλόμορφο 392Asn έναντι $5.8 \pm 0.4 \cdot 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$ για το αλληλόμορφο 392Lys). Επιπλέον, το αλληλόμορφο 392Asn αποδείχθηκε αποτελεσματικό στον καταβολισμό της λευκίνης από το πρόδρομο πεπτιδίο LSRHHAFSFR, ώστε να δημιουργηθεί ο αντιγονικός επίτοπος SRHHAFSFR (96). Ο ανωτέρω επίτοπος προέρχεται από την πρωτεΐνη αγκρικήνη, που είναι απαραίτητη για τη δημιουργία των χόνδρων και τη λειτουργία των συνδέσμων και παρουσιάζεται από το HLA-B*27 (96). Η ταχύτητα δημιουργίας του επιτόπου ($\text{pmol/s} \cdot \text{nmol}$ ενζύμου) ήταν 37 φορές μεγαλύτερη για το αλληλόμορφο 392Asn (96). Εν κατακλείδι, ο απλότυπος 392Asn, δύναται να δράσει συμπληρωματικά, ως ένα βαθμό, με την ERAP1 στην επεξεργασία πεπτιδίων με υδρόφοβο αμινοτελικό άκρο (96). Συνοψίζοντας, πολυμορφισμοί των ERAP1 και ERAP2 παρουσιάζουν σημαντική συσχέτιση με την εμφάνιση αυτοάνοσων παθήσεων, συμβάλλοντας είτε στην εξέλιξη της νόσου είτε δρώντας προστατευτικά. Όταν οι πολυμορφισμοί εντοπίζονται σε εξώνια επιφέρουν αλλαγές στην καταλυτική δραστικότητα του ενζύμου τόσο ως προς τη δυνατότητα υδρόλυσης των μικρών υποστρωμάτων L-AMC και R-AMC *in vitro* όσο και ως προς τη δυνατότητα δημιουργίας ώριμων αντιγονικών επιτόπων. Όταν εντοπίζονται σε εσώνια επιφέρουν αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης, μέσω αποδόμησης του mRNA ή πρόωρης λήξης της μετάφρασης.

1.12. Η συμβολή των αμινοπεπτιδασών ERAAP, ERAP1 και ERAP2 στην προδιάθεση για καρκίνο

1.12.1. Διαφυγή των καρκινικών κυττάρων από το ανοσοποιητικό σύστημα

Το ανοσοποιητικό σύστημα διαδραματίζει διπλό ρόλο στον καρκίνο. Από τη μια πλευρά καταστέλλει την ανάπτυξη όγκων εξαλείφοντας τα καρκινικά κύτταρα, ενώ από την άλλη πλευρά προωθεί την ανάπτυξη όγκων μέσω της χρόνιας φλεγμονής και επιλογής ανθεκτικών κυττάρων (83). Η δυναμική διαδικασία που ενσωματώνει τις δυο προαναφερθείσες αντίθετες λειτουργίες ονομάζεται «ανοσοεπεξεργασία καρκίνου» και διακρίνεται σε 3 φάσεις: εξάλειψη, ισορροπία και αποφυγή (83). Στη φάση εξάλειψης, τα κύτταρα της έμφυτης και της επίκτητης ανοσίας συνεργάζονται ώστε να εντοπίσουν και να καταστρέψουν νεοεμφανιζόμενα καρκινικά κύτταρα προτού τα τελευταία μετατραπούν σε κλινικά εμφανείς όγκους (83). Αν ένας καρκινικός τύπος κυττάρου δεν εξαλειφθεί, τότε μπορεί να εισέλθει στη φάση ισορροπίας και να παραμείνει σε κατάσταση λειτουργικής αναστολής, υπό τον έλεγχο των μηχανισμών της επίκτητης ανοσίας (83). Στη φάση ισορροπίας, το ανοσοποιητικό σύστημα ελέγχει την ανάπτυξη αλλά δεν καταστρέφει τον όγκο (83). Τα καρκινικά κύτταρα που αποκτούν περισσότερες μεταλλάξεις δύνανται: α) να καταστούν αόρατα στο ανοσοποιητικό σύστημα ως κύτταρα όγκων με αλλοιωμένη αντιγονοπαρουσίαση, β) να αναπτύξουν ανθεκτικότητα έναντι των μηχανισμών ανοσίας και γ) να επάγουν ένα ανοσοκατασταλτικό καθεστώς εντός του μικροπεριβάλλοντος του όγκου, ακολούθως να εισέλθουν στη φάση αποφυγής και να αναπτύξουν ορατούς όγκους (83). Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού που εμπλέκονται κυρίως στην καταπολέμηση των καρκινικών κυττάρων είναι τα φυσικά-κύτταρα φονείς, τα CD4⁺ και τα CD8⁺ T-λεμφοκύτταρα (83).

1.12.2. Τα επίπεδα έκφρασης της έκφρασης της ERAAP επηρεάζουν την ανάπτυξη όγκων καρκινώματος του παχέος εντέρου στα ποντίκια

Όπως έχει αναφερθεί, η αλλοιωμένη αντιγονοπαρουσίαση μπορεί να οδηγήσει σε ανοσολογική απόκριση ενάντια σε φυσιολογικά κύτταρα προκαλώντας ή διατηρώντας αυτοάνοσες παθήσεις, όμως μπορεί να οδηγήσει και σε ανοσοαποφυγή των καρκινικών κυττάρων. Η μείωση της έκφρασης της ERAAP

σε κύτταρα RMA λεμφώματος ποντικού επήγε την απόρριψη του όγκου και συνεπακόλουθα αύξησε την επιβίωση σε συγγενετικά ποντίκια, μέσω ενεργοποίησης της δράσης των φυσικών κυττάρων-φονέων και των T-λεμφοκυττάρων (84). Η επιρροή των επιπέδων έκφρασης της ERAAP μελετήθηκε και στην κυτταρική σειρά καρκινώματος του παχέος εντέρου CT26 (85). Η επίκτητη ανοσολογική απόκριση έναντι της μεταμόσχευσης της κυτταρικής σειράς CT26 απαιτεί την αναγνώριση του επιτόπου GGPEFYCASW από τα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα (85). Όμως, διαπιστώθηκε ότι ο ανωτέρω επίτοπος καταστρέφεται σε μεγάλο βαθμό από την ERAAP (66). Πράγματι, η καταστολή της έκφρασης της ERAAP στην κυτταρική σειρά CT26 οδήγησε σε αυξημένα επίπεδα παρουσίασης του ανωτέρω επιτόπου. Συνεπακόλουθα, επήλθε αναστολή της ανάπτυξης όγκου στο 50 % των ποντικών και το χρονικό διάστημα επιβίωσης αυξήθηκε κατά μέσο όρο στις 64.5 μέρες από 20 (85).

1.12.3. Τα επίπεδα έκφρασης ή/και δραστικότητας των ενζύμων ERAP1 και ERAP2 διαφέρουν μεταξύ υγιών ιστών και ορισμένων τύπων καρκίνου

Σε μελέτη 52 διαφορετικών λεμφοειδών κυτταρικών σειρών (συμπεριλαμβανομένων του μελανώματος και της λευχαιμίας) διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα έκφρασης και δραστικότητας των ενζύμων ERAP1 και ERAP2 παρουσίαζαν μεγάλες διακυμάνσεις (86). Η έκφραση ήταν ανάλογη της δραστικότητας στις περισσότερες κυτταρικές σειρές και το επίπεδο έκφρασης της ERAP1 παρουσίαζε σημαντικά υψηλή συσχέτιση με τον αριθμό των σταθερών μορίων ιστοσυμβατότητας I (86). Β-λεμφοκύτταρα προερχόμενα από διαφορετικούς υγιείς δότες, τα οποία μολύνθηκαν με τον ιό Epstein-Barr, εξέφραζαν παρόμοια υψηλά επίπεδα ERAP1 αλλά είτε χαμηλά είτε υψηλά επίπεδα ERAP2 (86). Η έκφραση περισσότερων σταθερών μορίων MHC I συνέπιπτε με την ταυτόχρονα αυξημένη έκφραση και των 2 αμινοπεπτιδάσων (86). Σε άλλη μελέτη, ετερογενή επίπεδα mRNA διαπιστώθηκαν και για τις 2 αμινοπεπτιδάσες σε 28 διαφορετικές κυτταρικές σειρές μελανώματος που εξετάστηκαν, συγκριτικά με υγιή μελανοκύτταρα (87). 16 κυτταρικές σειρές παρουσίασαν χαμηλά επίπεδα ERAP1, 9 κυτταρικές σειρές εμφάνισαν μεσαία επίπεδα και μόνο 2 κυτταρικές σειρές παρουσίασαν υψηλά επίπεδα (87). Αντιθέτως, όσον αφορά στο γονίδιο της ERAP2, 24/28 κυτταρικές σειρές

παρουσίασαν υψηλότερα επίπεδα μεταγραφής (87). Μόνο 2 κυτταρικές σειρές (Buf1280 και Buf501) παρουσίασαν χαμηλότερα επίπεδα και άλλες 2 (Buf1286, Buf1195) ίδια επίπεδα μεταγραφής γονιδίου της ERAP2 συγκριτικά με τα υγιή μελανοκύτταρα (87). Ακόμη, τα επίπεδα έκφρασης ERAP1, ERAP2 και HLA I εξετάστηκαν σε 39 διαφορετικές κυτταρικές σειρές προερχόμενες από 24 μη-λεμφοειδείς υγιείς ιστούς και τους αντίστοιχους καρκινικούς (88). Στους υγιείς ιστούς υπήρχε ταυτόχρονη έκφραση των 2 αμινοπεπτιδασών στο 64 % (25/39) των περιπτώσεων, ενώ ταυτόχρονη έκφραση ERAP1, ERAP2 και HLA I διαπιστώθηκε στο 23 % (9/39) των περιπτώσεων και αφορούσε επιθηλιακούς ιστούς (88). Στους αντίστοιχους όγκους, η ERAP1 και η ERAP2 εκφράζονταν σε ποσοστά 21 % και 33 % αντιστοίχως. Επίσης, δεν ανιχνεύθηκε έκφραση ERAP1 σε όλες τις κυτταρικές σειρές όγκων μαστού, νεφρών, ωοθηκών, πνευμόνων και εγκεφάλου, ενώ ERAP2 δεν ανιχνεύθηκε σε όλες τις κυτταρικές σειρές όγκων στομάχου, ωοθηκών και νεφρών (88). Συνοπτικά, ο φαινότυπος στο 86 % των όγκων περιλάμβανε απώλεια της έκφρασης τουλάχιστον ενός εκ των 2 αμινοπεπτιδασών (88). Σε άλλη μελέτη, τα επίπεδα ERAP1 και ERAP2 εξετάστηκαν σε 300 υγιείς νεφρικούς ιστούς και σε 334 ιστούς νεφρικού καρκινώματος (89). Διαπιστώθηκαν ετερογενή επίπεδα έκφρασης και των 2 αμινοπεπτιδασών μεταξύ των διαφορετικών περιοχών των υγιών νεφρικών ιστών (89). Στους όγκους νεφρικού ιστού, διαπιστώθηκε μοτίβο υψηλότερης έκφρασης της ERAP1 (κατά 22.8 %) αλλά μειωμένης έκφρασης της ERAP2 (απώλεια έκφρασης στο 43.8 % των περιπτώσεων) συγκριτικά με το υγιές νεφρικό επιθήλιο (89). Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε 101 πάσχοντες από καρκίνο του τραχήλου της μήτρας παρατηρήθηκε έκφραση σε 85 περιπτώσεις, ωστόσο η απώλεια της έκφρασης του ενζύμου παρουσίασε ισχυρή συσχέτιση με μειωμένη επιβίωση (90). Επιπλέον, τα επίπεδα έκφρασης της ERAP1 εξετάστηκαν σε 50 ιστούς οισοφαγικού καρκινώματος (91). Διαπιστώθηκε πλήρης απώλεια ή μείωση της έκφρασης του ενζύμου στο 20 % και στο 28 % αντιστοίχως, η οποία συσχετίστηκε σε μεγάλο βαθμό με το βάθος εισβολής των όγκων (91). Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε 24 διαφορετικούς τύπους καρκίνου, διαπιστώθηκε ότι ο πολυμορφισμός rs2927608 (εσώνιο G>A) παρουσίαζε το μεγαλύτερο βαθμό επιρροής στα επίπεδα έκφρασης της ERAP2 (105). Ο απλότυπος rs2927608G οδηγεί σε χαμηλά επίπεδα έκφρασης ERAP2. Το μέγεθος αποτελέσματος (beta value)

κυμαινόταν από 0.98 στο δερματικό μελάνωμα έως 1.02 στο καρκίνωμα πνευμονικών πλακωδών κυττάρων (105). Στην ίδια μελέτη, τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης ERAP2 συσχετίστηκαν σημαντικά με αυξημένη πιθανότητα επιβίωσης σε ασθενείς με καρκίνο του επιθηλίου της ουροδόχου κύστης, οι οποίοι συμμετείχαν στη 2^η φάση κλινικών δοκιμών ανοσοθεραπείας με αναστολέα (atezolizumab) της πρωτεΐνης PD-L1 (programmed death-ligand) (105). Σε άλλη μελέτη, παρατηρήθηκε ότι η έκφραση της ERAP2 ήταν αυξημένη σε καλλιέργειες κυττάρων καρκινώματος στοματικής κοιλότητας συγκριτικά με υγιή κύτταρα (106). Η αυξημένη έκφραση της ERAP2 παρουσίασε ισχυρή συσχέτιση με μειωμένη πιθανότητα επιβίωσης ασθενών και μεγαλύτερο βάθος όγκου. Επίσης, η αποσιώπηση του γονιδίου της ERAP2 στην κυτταρική σειρά SCC4 μείωσε την ικανότητα μετανάστευσης και εισβολής των καρκινικών κυττάρων κατά 17 % και 52 % αντιστοίχως, όμως μείωσε ελάχιστα τη βιωσιμότητά τους (106). Η διείσδυση των CD8⁺ κυτταροτοξικών Τ-λεμφοκυττάρων (T-cell infiltration, TIL) στους όγκους καρκινώματος του φάρυγγα (oropharyngeal squamous cell carcinoma, OPSCC), ο οποίος προκαλείται από τον ιό των ανθρώπινων κονδυλωμάτων (HPV), διαπιστώθηκε ότι σχετίζεται με ταχύτερη πρόγνωση και βελτιωμένη κλινική έκβαση (107). Η λειτουργία της ERAP1 σχετίζεται με την ικανότητα διείσδυσης των Τ-λεμφοκυττάρων, καθώς βρέθηκε ότι η δυνατότητα της ERAP1 να παράγει τον αντιγονικό επίτοπο LLMGTLGIV (προέρχεται από την ογκοπρωτεΐνη E7 του HPV) ήταν μειωμένη σε όγκους με χαμηλό βαθμό TIL (107). Οι πολυμορφισμοί Pro127 και Glu730 παρατηρήθηκαν στις περισσότερες περιπτώσεις σε δείγμα 25 πασχόντων από OPSCC, ανεξάρτητα από το βαθμό TIL (107). Συγκεκριμένα, ο πολυμορφισμός Glu730 εντοπίστηκε σε 9 από τους 10 TIL^{high}, σε 6 από τους 7 TIL^{moderate} και σε 7 από τους 8 TIL^{low} ασθενείς. Ο πολυμορφισμός Pro127 και οι 2 πολυμορφισμοί συγχρόνως (Pro127 και Glu730) βρέθηκαν σε 8 από τους 10 TIL^{high}, σε 2 από τους 7 TIL^{moderate} και σε 4 από τους 8 TIL^{low} ασθενείς (107). Τέλος, οι συνδυασμοί πολυμορφισμών που σχετίζονταν αποκλειστικά με TIL^{low} όγκους είχαν σημαντικά μειωμένη δυνατότητα καταβολισμού του αμινοτελικού αμινοξέος από το πρόδρομο αντιγονικό πεπτίδιο X-SIINFEHL, συγκριτικά με τους πολυμορφισμούς που σχετίζονταν με TIL^{high} ή TIL^{moderate} όγκους (50 % και 55 % αντιστοίχως (107). Εν κατακλείδι, η ποικιλότητα των πολυμορφισμών της ERAP1 και της ERAP2

ενδεχομένως επηρεάζει τη δριμύτητα των αρχικών κυτταροτοξικών αποκρίσεων εναντίον των καρκινικών κυττάρων και συμβάλλει στις πιθανότητες των τελευταίων να αποκτήσουν γενετικές προσαρμογές που θα τους επιτρέψουν να αποφύγουν το ανοσοποιητικό σύστημα (83). Επομένως, άτομα που φέρουν συγκεκριμένους πολυμορφισμούς της ERAP1 ή/και της ERAP2 σε συνδυασμό με ορισμένα αλληλόμορφα MHC I, ίσως είναι πιο επιδεκτικά στην καρκινογένεση (83). Ως αποτέλεσμα, οι 2 αμινοπεπτιδάσες καθίστανται σημαντικοί φαρμακολογικοί στόχοι, ώστε μέσω της αναστολής τους να ενισχυθούν οι ανοσολογικές αποκρίσεις σε θεμελιωμένους καρκίνους (83). Πρόσφατα, διαπιστώθηκε ότι η αναστολή της ERAP1 στην κυτταρική σειρά μελανώματος A375 προκάλεσε σημαντικές αλλαγές στο ανοσοπεπτιδίωμα, χωρίς να μειώνονται τα επίπεδα MHC I στην κυτταροπλασματική μεμβράνη ή να παρεμποδίζεται η αντιγονοπαρουσίαση (131).

1.13. Πιθανοί βιοχημικοί μηχανισμοί παραγωγής αντιγονικών επιτόπων από την ERAP1

Η θεμελιώδης συμβολή της ERAP1 στην παραγωγή αντιγονικών επιτόπων έχει τεκμηριωθεί στη βιβλιογραφία, όμως το φυσιολογικό υπόστρωμα καταβολισμού παραμένει αμφιλεγόμενο (114). Έχουν προταθεί 2 πιθανοί μηχανισμοί επεξεργασίας των πρόδρομων αντιγονικών πεπτιδίων: Στην πρώτη περίπτωση, το πρόδρομο πεπτίδιο δημιουργείται μέσω πρωτεόλυσης και ύστερα το ένζυμο επεξεργάζεται το πεπτίδιο στο διάλυμα χρησιμοποιώντας τις μοναδικές του ιδιότητες ώστε να βελτιστοποιήσει τον επίτοπο για το MHC I (114). Ο δεύτερος μηχανισμός πιθανολογεί ότι το πρόδρομο αντιγονικό πεπτίδιο υφίσταται επεξεργασία ενώ βρίσκεται παράλληλα προσδεμένο στο MHC I, ενώ το αμινοτελικό άκρο του προεξέχει ως ένα βαθμό ούτως ώστε να είναι εφικτή η επεξεργασία του από την ERAP1 (114). Ο ανταγωνισμός μεταξύ του καταβολισμού από την ERAP1 και της σταθερής πρόσδεσης του πεπτιδίου στο MHC I, όπου προστατεύεται πλέον από το ένζυμο, αποτελεί την κινητήρια δύναμη βελτιστοποίησης του επιτόπου και στις 2 περιπτώσεις (114).

1.13.1. Βιοχημικές ενδείξεις που υποστηρίζουν τον καθένα από τους 2 πιθανούς μηχανισμούς

Η δυνατότητα της ERAP1 και του αντίστοιχου ομολόγου της ERAAP να παράγουν αντιγονικούς επιτόπους επεξεργαζόμενες τα πρόδρομα πεπτιδία στο διάλυμα, έχει αποδειχθεί από αρκετές μελέτες (61, 62, 109, 115, 116). Ωστόσο, η ERAP1 παρουσιάζει 50 φορές μικρότερη ταχύτητα καταβολισμού συγκριτικά με το κυτταροπλασματικό ένζυμο αμινοπεπτιδάση λευκίνης (80). Μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν άμεσες βιοχημικές ενδείξεις ότι η ERAP1 αλληλεπιδρά με το MHC I, αλλά ορισμένες μελέτες υποστηρίζουν πως ο καταβολισμός του πεπτιδίου ενώ βρίσκεται δεσμευμένο στο μόριο ιστοσυμβατότητας είναι εφικτός (114). Αρχικά, διαπιστώθηκε ότι η ERAAP παρήγαγε *in vivo* τον αντιγονικό επίτοπο QLSPFPFDL (QL9) από το πρόδρομο πεπτιδίο IVMQLK(QL9) μόνο παρουσία του αλληλομόρφου MHC I H-2L^d (117). Αντιθέτως, σε κύτταρα που το H-2L^d δεν εκφραζόταν, η ERAAP κατέστρεφε τον επίτοπο (117). Σε άλλη μελέτη που υποστηρίζει επίσης το δεύτερο μηχανισμό, το αλληλόμορφο H-2K^b εκφράστηκε ως τριμερές σε μια ενιαία πολυπεπτιδική αλυσίδα (single chain trimer, SCT). Στο ανωτέρω μόριο ιστοσυμβατότητας εισήχθη η σημειακή μετάλλαξη Tyr84Cys ώστε να σχηματιστεί δισουλφιδικός δεσμός μεταξύ της βαριάς αλυσίδας και μιας δεύτερης κυστεΐνης στην αλληλουχία που συνδέει το πεπτιδίο με τη β₂ μικροσφαιρίνη (127). Ως αποτέλεσμα, το καρβοξυτελικό άκρο του πεπτιδίου σταθεροποιείται στην αύλακα πρόσδεσης του MHC I (127). Βρέθηκε ότι η ERAP1 κατέλυε αποτελεσματικά την αφαίρεση της λυσίνης από το πεπτιδίο KSIINFEDL *in vivo* δημιουργώντας τον ώριμο επίτοπο μόνο παρουσία του μορίου ιστοσυμβατότητας H-2K^b, ενώ το πεπτιδίο βρισκόταν ομοιοπολικά δεσμευμένο μέσω δισουλφιδικού δεσμού με το MHC I (127). Απουσία έκφρασης του H-2K^b, η ERAP1 κατέστρεφε τον επίτοπο καταβόλιζοντας τον σε μικρότερα μήκη (127). Το τεχνητό διμερές (ενωμένο με φερμουάρ λευκίνης) ERAP1/ERAP2 χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση του καταβολισμού *in vitro* μεταξύ πρόδρομων αντιγονικών πεπτιδίων ελεύθερων στο διάλυμα αλλά και σε σύμπλοκο με το μόριο ιστοσυμβατότητας HLA-B*08 (118). Όταν το πρόδρομο αντιγονικό πεπτιδίο (RA)₃ALRSRYWAI βρισκόταν ελεύθερο στο διάλυμα καταβόλιστηκε σε πλήθος μικρότερων πεπτιδίων, μήκους έως και 4 αμινοξέων

(118). Αντιθέτως, ο καταβολισμός από το διμερές ERAP1/ERAP2 ύστερα από 10 ώρες επώασης οδήγησε στη συσσώρευση του 9μερούς ALRSRYWAI, όταν το πρόδρομο πεπτίδιο βρισκόταν σε σύμπλοκο με το HLA-B*08 (118). Το ίδιο μοτίβο καταβολισμού επαναλήφθηκε και με το σύμπλοκο HLA-B*08-(RA)₃AAKKKYKL, όπου συσσωρεύτηκε το 8μερές AAKKKYKL ύστερα από επώαση με το ένζυμο και δεν ανιχνεύτηκαν μικρότερα πεπτίδια (118). Στην ίδια μελέτη, εισήχθη η σημειακή μετάλλαξη Glu76Cys στο μόριο ιστοσυμβατότητας HLA-B*08, ώστε να σχηματιστεί δισουλφιδικός δεσμός με το πεπτίδιο (RA)₃AAKKKYCL (118). Η επώαση του ανωτέρω συμπλόκου με το διμερές ERAP1/ERAP2 οδήγησε στη συσσώρευση του 8μερούς AAKKKYCL (118). Αντιθέτως, όταν το πεπτίδιο (RA)₃AAKKKYCL βρισκόταν ελεύθερο στο διάλυμα, η υδρόλυση από το διμερές ERAP1/ERAP2 προχώρησε έως και το μήκος των 4 αμινοξέων (118). Σε άλλη μελέτη, διαπιστώθηκε ότι η ERAP1 δημιουργούσε πλήθος πεπτιδίων διαφορετικού μήκους *in vitro* (4-13 αμινοξέων) καταβολίζοντας το 14μερές πεπτίδιο (RA)₃AAKKKYCL, όταν το τελευταίο βρισκόταν ελεύθερο στο διάλυμα (119). Όμως, η επώαση του συμπλόκου HLA-B*08 Glu76Cys-(RA)₃AAKKKYCL με ERAP1 δεν οδήγησε στην ανίχνευση μικρότερων πεπτιδίων, υποδεικνύοντας στερεοχημική παρεμπόδιση κατά την πρόσβαση του ενζύμου στο αμινοτελικό άκρο του πεπτιδίου (119). Πράγματι, όταν το 20μερές πεπτίδιο (RA)₆AAKKKYCL βρισκόταν σε σύμπλοκο με το HLA-B*08 Glu76Cys και επωάστηκε με ERAP1, η αντίδραση δεν προχώρησε πέραν του 14μερούς πεπτιδίου (119). Αντιθέτως, η ERAP1 παρήγαγε πλήθος πεπτιδίων διαφορετικού μήκους (5, 7, 9, 11 και 13 αμινοξέων) όταν το υπόστρωμα (RA)₆AAKKKYCL βρισκόταν ελεύθερο στο διάλυμα (119). Αξιοσημείωτο ωστόσο ήταν το γεγονός ότι η συγκέντρωση του ενζύμου που χρησιμοποιήθηκε στις επωάσεις των πεπτιδίων σε σύμπλοκο με τα μόρια ιστοσυμβατότητας ήταν 85 φορές μεγαλύτερη (34 μg) συγκριτικά με τη συγκέντρωση του ενζύμου κατά την επώαση πεπτιδίων ελεύθερων στο διάλυμα (119).

1.13.2. Κρυσταλλογραφικά δεδομένα και προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής που υποστηρίζουν τον καθένα από τους 2 πιθανούς μηχανισμούς

Μέχρι σήμερα, οι κρυσταλλικές δομές της ERAP1 συγκλίνουν περισσότερο προς το βιοχημικό μονοπάτι επεξεργασίας των πεπτιδίων στο διάλυμα (114). Οι υπάρχουσες δομές δείχνουν ότι το ενεργό κέντρο του ενζύμου δεν μπορεί να προσεγγίσει το αμινοτελικό αμινοξύ του δεσμευμένου πεπτιδίου στο μόριο ιστοσυμβατότητας ώστε να επιτευχθεί η κατάλυση (114). Ακόμη και στην ανοιχτή διαμόρφωση του ενζύμου, το πεπτίδιο πρέπει να αποτελείται από τουλάχιστον 16 αμινοξέα (114). Ωστόσο, προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής *in silico* έδειξαν ότι η ERAP1 ενδεχομένως να δύναται να υιοθετήσει μια ακόμη πιο ανοιχτή διαμόρφωση, καθιστώντας πιθανότερο τον παροδικό σχηματισμό ενός τριμερούς συμπλόκου MHC I-πεπτίδιο-ERAP1 (114, 120). Άλλωστε, υφίστανται ορισμένες δομές μορίων ιστοσυμβατότητας I με αντιγονικούς επιτόπους που ξεπερνούν το σύνηθες μήκος των 9 αμινοξέων. Παραδείγματα αποτελούν: α) το σύμπλοκο του HLA-A*02:01 με το 12μερές πεπτίδιο FVLELEPEWTVK από πρωτεΐνη που ανήκει στην οικογένεια της ουβικιτίνης του *Toxoplasma gondii* (121), β) το σύμπλοκο του HLA-A*02:01 με τον 15μερή επίτοπο FLNKDLEVDGHFVMT από την πρωτεΐνη Rab-9a, η οποία σχετίζεται με την οικογένεια Ras και προέρχεται από τον ιό Epstein-Barr (122), γ) το σύμπλοκο του HLA-B*35:08 με 13μερές πεπτίδιο LPEPLPQGQLTAY από την πρωτεΐνη ZEBRA του ιού Epstein-Barr (123) και δ) το σύμπλοκο του 14μερούς επιτόπου LPAVVGLSPGEQEY, ο οποίος προέρχεται από εναλλακτικό πλαίσιο ανάγνωσης της ανθρώπινης κασπάσης 8, με το αλληλόμορφο B*35:01 (124). Τα εκτεταμένα πεπτίδια υιοθετούν μια ιδιαίτερη διαμόρφωση εντός της αύλακας πρόσδεσης του MHC I. Το αμινοτελικό και το καρβοξυτελικό τους άκρο βρίσκονται δεσμευμένα στις κοιλότητες A και F αντιστοίχως, ενώ τα αμινοξέα που βρίσκονται στο μέσον της αλληλουχίας προεξέχουν. Ενδιαφέρουσες εξαιρέσεις αποτελούν οι δομές του HLA-B*57:01 (106) και του HLA-B*58:01 (126) με τον αντιγονικό επίτοπο TSTLQEIQGW του ιού HIV, στις οποίες προεξέχει το αμινοτελικό άκρο. Τέλος, προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής *in silico* έδειξαν ότι σε περίπτωση πεπτιδίου μειωμένης συγγένειας, οι ασθενέστερες αλληλεπιδράσεις μεταξύ του αμινοτελικού άκρου του πεπτιδίου και της A-κοιλότητας της αύλακας πρόσδεσης του MHC I οδηγούν σε μερική αποδιάταξη (127). Ως αποτέλεσμα, το αμινοτελικό άκρο μπορεί να εκτεθεί και να καταστεί ευάλωτο σε καταβολισμό από την ERAP1 (127).

Κεφάλαιο 2^ο: Υλικά και μέθοδοι

2.1. Παρασκευή τρυβλίων Petri με στερεό θρεπτικό υλικό LB άγαρ:

Αντιδραστήρια:

- 1) Τρυπτόνη Biochemica από την Applichem (A1553)
- 2) Εκχύλισμα ζυμομύκητα για μοριακή βιολογία από την Applichem (A3732)
- 3) Χλωριούχο νάτριο για μοριακή βιολογία από την Applichem (A2942)
- 4) Άγαρ για μοριακή βιολογία από την Applichem (A3477)
- 5) D(+)-Γλυκόζη από την Pancreac Quimica (A3666)
- 6) Χλωριούχο κάλιο από την Sigma Aldrich (P3911)
- 7) Χλωριούχο μαγνήσιο από τη Sigma Aldrich (M2670)
- 8) Αμπικιλλίνη Biochemica από την Applichem (A0839)
- 9) Ισοπρόπυλο-β-D-θειογαλακτοπυρανοσίδιο (IPTG) από την Applichem (A4773)

Διαλύονται 10 gr. τρυπτόνης, 5 gr. εκχύλισμα ζυμομύκητα και 5 gr. NaCl σε 1 L ddH₂O. Προστίθενται 17 gr. άγαρ και ακολουθεί αποστείρωση σε κλίβανο στους 121 °C για 30 min. Το δοχείο αφαιρείται από τον κλίβανο και μεταφέρεται στο υδατόλουτρο το οποίο έχει ρυθμιστεί σε θερμοκρασία 45 °C. Αφού η θερμοκρασία του δοχείου υποχωρήσει στους 45 °C, προστίθεται αμπικιλλίνη σε τελική συγκέντρωση 100 μgr./mL. Το θρεπτικό υλικό μεταφέρεται ασηπτικά σε τρυβλία Petri όπου και αφήνεται να στερεοποιηθεί. Τα τρυβλία φυλάσσονται στους 4 °C έως ότου χρησιμοποιηθούν.

2.2. Παρασκευή θρεπτικού υλικού υγρής βακτηριακής καλλιέργειας (LB):

Διαλύονται 10 gr. τρυπτόνης, 5 gr. εκχύλισμα ζυμομύκητα και 5 gr. NaCl σε 1 L ddH₂O. Ακολουθεί αποστείρωση σε κλίβανο στους 121 °C για 30 min.

2.3. Παρασκευή θρεπτικού μέσου για ανάκαμψη των βακτηρίων μετά το μετασχηματισμό (SOC medium):

Διαλύονται 10 gr. τρυπτόνης, 5 gr.

εκχύλισμα ζυμομύκητα και 5 gr. NaCl σε 1 L ddH₂O. Ακολουθεί αποστείρωση σε κλίβανο στους 121 °C για 30 min. Προστίθενται ασηπτικά 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 25 mM KCl και 20 mM γλυκόζης.

2.4. Προετοιμασία δεκτικών προς μετασχηματισμό βακτηρίων *E.coli* στέλεχος BL21 DE3 και XL-1 Blue: Επιλέγεται μονή αποικία βακτηρίων που έχουν αναπτυχθεί σε στερεό θρεπτικό υλικό LB άγαρ απουσία αντιβιοτικού. Ενοφθαλμίζεται σε σωληνάριο falcon των 15 mL που περιέχει 2 mL LB απουσία αντιβιοτικού. Την επόμενη ημέρα, τα 2 mL της βακτηριακής καλλιέργειας ενοφθαλμίζονται σε κωνική φιάλη που περιέχει 200 mL LB. Η καλλιέργεια επωάζεται υπό ανάδευση (200 στροφές ανά min, 37 °C) έως ότου η οπτική απορρόφηση στα 600 nm φτάσει 0.4. Κατόπιν η καλλιέργεια συλλέγεται σε 4 falcon σωληνάρια των 50 mL και φυγοκεντρείται (4000 στροφές ανά min, 4 °C, 20 min). Το υπερκείμενο αποχύνεται και το ίζημα επαναδιασπείρεται προσθέτοντας σε κάθε falcon 25 mL διαλύματος 100 mM MgCl₂ θερμοκρασίας 4 °C. Ακολουθεί φυγοκέντριση (4000 στροφές ανά min, 4 °C, 20 min), αποχύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναδιασπείρεται προσθέτοντας σε κάθε falcon 25 mL διαλύματος 100 mM CaCl₂. Ακολουθεί φυγοκέντριση (4000 στροφές ανά min, 4 °C, 20 min), αποχύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναδιασπείρεται προσθέτοντας σε κάθε falcon 2 mL διαλύματος το οποίο περιέχει: 100 mM CaCl₂ και 14 % v/v γλυκερόλη. Στη συνέχεια, μεταφέρονται 50 µL σε κάθε σωληνάριο Eppendorf και εμβαπτίζονται αμέσως σε υγρό άζωτο (flash freeze). Τα βακτήρια φυλάσσονται στους -80 °C.

2.5. Διαδικασία μετασχηματισμού: Δεκτικά βακτήρια *E.coli* στέλεχος BL21 DE3 μετασχηματίζονται με πλασμίδιο το οποίο φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη ως δείκτη επιλογής και το γονίδιο που εκφράζει τη βαριά αλυσίδα του αλληλμόρφου B*08:01 του μείζονος συμπλόκου ιστοσυμβατότητας τάξης 1 (MHC class I). 20 ng πλασμιδιακού DNA διαλυμένα σε όγκο 2 µL μεταφέρονται σε σωληνάριο Eppendorf που περιέχει 50 µL βακτηρίων. Τα βακτήρια τοποθετούνται στον πάγο για 30 min. Ακολουθεί θερμικό σοκ στους 42 °C για 90 δευτερόλεπτα. Τα βακτήρια επανατοποθετούνται για 2 min στον πάγο και κατόπιν προστίθενται 150 µL θρεπτικού μέσου SOC. Ύστερα τα βακτήρια μεταφέρονται στον επωαστικό για 2 ώρες στους 37 °C υπό ανάδευση στις 200 στροφές ανά min. Μετά το πέρασ

των 2 ωρών, 200 μ L βακτηρίων επιστρώνονται ασηπτικά σε ένα τρυβλίο Petri με LB agar που περιέχει 100 μ gr./mL αμπικιλίνη και τοποθετούνται στον επωαστικό στους 37 °C άνευ ανάδευσης για 12-14 ώρες ώστε να σχηματισθούν αποικίες.

2.6. Έκφραση των πρωτεϊνών β_2 μικρογλοβουλίνη και βαριάς αλυσίδας HLA B*08:01 ως κυτταρικών εγκλειστών (inclusion bodies): Επιλέγεται μονή αποικία από το τρυβλίο και ενοφθαλμίζεται σε σωληνάριο falcon 50 mL το οποίο περιέχει 5 mL LB και 100 μ gr./mL αμπικιλίνη. Το falcon μεταφέρεται στον επωαστικό υπό ανάδευση στις 200 στροφές ανά min, στους 37 °C για 14-16 ώρες. Την επόμενη ημέρα 4 mL της βακτηριακής καλλιέργειας ενοφθαλμίζονται σε αποστειρωμένη κωνική φιάλη χωρητικότητας 2 L που περιέχει 400 mL LB (αραίωση 1/1000) και 100 μ gr./mL αμπικιλίνη. Η κωνική φιάλη μεταφέρεται στον επωαστικό υπό ανάδευση στις 200 στροφές ανά min, στους 37 °C. Όταν η οπτική απορρόφηση (optical density) της βακτηριακής καλλιέργειας στα 600 nm ξεπεράσει την τιμή 0.8 τότε προστίθεται στην κωνική φιάλη ισοπροπυλο β -D-1-θειογαλακτοπυρανοσίδιο (IPTG) σε τελική συγκέντρωση 1 mM για επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης. Η επαγωγή πραγματοποιείται για 4 ώρες. Μετά το πέρας των 4 ωρών η βακτηριακή καλλιέργεια συλλέγεται σε 8 falcon σωληνάρια των 50 mL. Μεταφέρεται σε σωληνάριο Eppendorf 1 mL της καλλιέργειας ώστε να ελεγχθεί η έκφραση με SDS-PAGE. Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 20 min, στις 4.000 στροφές ανά min σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο αποχύνεται και το βακτηριακό ίζημα φυλάσσεται στους -80 °C. 1 mL της βακτηριακής καλλιέργειας φυγοκεντρείται (15 min, 4000 στροφές ανά min, 15 °C), το υπερκείμενο αποχύνεται και το ίζημα επαναδιασπείρεται σε διάλυμα φόρτωσης δειγμάτων για SDS-PAGE (sample loading buffer) όγκου 90 μ L όπου και προστίθενται 10 μ L διθειοθρεϊτόλης (DTT). 10 μ L χρησιμοποιούνται για SDS-PAGE. Η ίδια διαδικασία ακολουθείται και με τον πλασμιδιακό φορέα ο οποίος φέρει το γονίδιο που κωδικοποιεί τη β_2 μικρογλοβουλίνη.

2.7. Έκφραση της πρωτεϊνικής υπομονάδας HLA A*02:01 βαριά αλυσίδα ως κυτταρικών εγκλειστών (inclusion bodies): Το γονίδιο που κωδικοποιεί τη βαριά αλυσίδα του αλληλομόρφου A*02:01 του μείζονος συμπλόκου ιστοσυμβατότητας τάξης 1 βρίσκεται ενσωματωμένο στον πλασμιδιακό φορέα

έκφρασης pHN1+, ο οποίος φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη. Δεκτικά βακτήρια *E.coli* στέλεχος XL-1 Blue μετασχηματίζονται με το πλασμιδιακό DNA σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφηκε προηγουμένως. Κατόπιν, μονή αποικία επιλέγεται και ενοφθαλμίζεται σε σωληνάριο falcon όγκου 50 mL που περιέχει 5 mL LB και 100 µgr./mL αμπικιλίνη. Το σωληνάριο falcon μεταφέρεται στον επωαστικό υπό ανάδευση στις 200 στροφές ανά min, στους 37 °C για 8 ώρες. Κατόπιν, λαμβάνονται 4 mL υγρής βακτηριακής καλλιέργειας και ενοφθαλμίζονται σε αποστειρωμένη κωνική φιάλη χωρητικότητας 2 L που περιέχει 400 mL LB (αραίωση 1/1000) και 100 µgr./mL αμπικιλίνη. Η κωνική φιάλη μεταφέρεται στον επωαστικό υπό ανάδευση στις 200 στροφές ανά min, στους 37 °C. Η επώαση διαρκεί για 20 ώρες ώστε να επιτευχθεί η έκφραση της πρωτεΐνης. Δεν προστίθεται επαγωγέας έκφρασης. Η καλλιέργεια ακολούθως φυγοκεντρείται (15 min, 4000 στροφές ανά min, 15 °C), το υπερκείμενο αποχύνεται και το βακτηριακό ίζημα φυλάσσεται στους -80 °C.

2.8. Διάρρηξη βακτηρίων, απομόνωση κυτταρικών εγκλείστων και διαλυτοποίηση των πρωτεϊνικών υπομονάδων:

Αντιδραστήρια:

- 1) Σακχαρόζη από την BDH Laboratory Supplies
- 2) Δεοξυχολικό οξύ από την Fisher Scientific (BP349100)
- 3) Λυσοζύμη Biochemica από την Applichem (A3711)
- 4) Δεοξυριβονουκλεάση από τη Sigma Aldrich (DN25)
- 5) Triton X-100 από τη Fisher Scientific (BP151-100)
- 6) Tris Ultrapure από την Applichem (A1086)
- 7) Χλωριούχο μαγνήσιο από τη Sigma Aldrich (M2670)
- 8) 2-(N-μορφολινο)-αιθανοσουλφονικό οξύ (MES) από τη Sigma Aldrich (M3671)
- 9) Ουρία από την Penta

10) Αιθυλενο-διαμινο-τετρα-οξικό οξύ (EDTA) από την PanRreac Quimica (A5097)

11) Νατραζίδιο (NaN_3) από τη Sigma Aldrich (S2002)

12) Χλωριούχο νάτριο για μοριακή βιολογία από την Applichem (A2942)

Παρασκευάζονται τα ακόλουθα υδατικά διαλύματα:

- 1) Διάλυμα σακχαρόζης: 25 % w/v σακχαρόζη, 50 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA και 0.1 % w/v NaN_3 .
- 2) Διάλυμα δεοξυχολικού οξέος-Triton X-100: 1 % w/v δεοξυχολικό οξύ, 1 % v/v Triton X-100, 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl και 0.1 % w/v NaN_3 .
- 3) Διάλυμα Triton X-100: 0.5 % v/v Triton X-100, 50 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA και 0.1 % w/v NaN_3 .
- 4) Διάλυμα Tris-HCl: 50 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA και 0.1 % w/v NaN_3
- 5) Διάλυμα ουρίας: 8 M ουρίας, 25 mM MES pH 6 και 10 mM EDTA.
- 6) Διάλυμα δεσοξυριβονουκλεάσης (DNAse): 75 mM NaCl, 50 % v/v γλυκερόλη και 2 mg/mL δεσοξυριβονουκλεάση.

Σε κάθε σωληνάριο falcon που περιέχει βακτηριακό ίζημα από όγκο καλλιέργειας 50 mL προστίθενται 5 mL διαλύματος σακχαρόζης και διασπείρεται το ίζημα. Προστίθενται 5 mg ξηρής λυσοζύμης (1 mg/mL εναιωρήματος) και τα σωληνάρια falcon αναδεύονται για 20 min. Προστίθενται 10 mL διαλύματος δεοξυχολικού οξέος-Triton X-100, 5 mM MgCl_2 (τελική συγκέντρωση) και 100 μL διαλύματος δεσοξυριβονουκλεάσης και ακολουθεί ανάδευση μέχρι τα βακτήρια να διαρραγούν πλήρως και το διάλυμα να αποκτήσει το ιξώδες του ύδατος. Έπειτα τα σωληνάρια falcon μεταφέρονται στους $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Την επόμενη ημέρα τοποθετούνται στο υδατόλουτρο σε θερμοκρασία $37\text{ }^\circ\text{C}$ έως ότου ξεπαγώσει το διάλυμα πλήρως. Ακολουθεί φυγοκέντρωση (8000 g, 20 min, $4\text{ }^\circ\text{C}$) και κατόπιν το υπερκείμενο αποχύνεται. Το ίζημα ομογενοποιείται μηχανικά, επαναδιασπείρεται σε 15 mL διαλύματος Triton X-100 και ακολουθεί φυγοκέντρωση (8000 g, 20 min, $4\text{ }^\circ\text{C}$). Το

προαναφερθέν στάδιο της διαδικασίας επαναλαμβάνεται 4 φορές. Μετά το ίζημα επαναδιασπείρεται σε 15 mL διαλύματος Tris-HCl και ακολουθεί φυγοκέντριση (8000 g, 20 min, 4 °C). Το προαναφερθέν στάδιο της διαδικασίας επαναλαμβάνεται επίσης 4 φορές. Τέλος, το υπερκείμενο αποχύνεται και προστίθενται 10 mL διαλύματος ουρίας σε κάθε σωληνάριο falcon. Ακολουθεί μια τελευταία φυγοκέντριση (10000 g, 1 ώρα, 20 °C) ώστε να διαλυτοποιηθούν τα κυτταρικά έγκλειστα. Μετά τη φυγοκέντριση το διάλυμα φιλτράρεται με τη χρήση αποστειρωμένου φίλτρου μιας χρήσης με διάμετρο πόρων 0.2 μm (Whatman® Puradisc 13 syringe filters from Merck - WHA67841302). Μετράται η οπτική απορρόφηση στα 280 nm με τη χρήση του φασματοφωτομέτρου Nanodrop της εταιρίας Thermo Scientific. Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης των πρωτεϊνικών υπομονάδων υπολογίζεται με το πρόγραμμα Expsy Protparam με βάση την αλληλουχία των αμινοξέων τους. Η αμινοξική αλληλουχία ανακτάται από κρυσταλλικές δομές συμπλόκων HLA-B*08:01 που βρίσκονται κατατεθειμένες στην τράπεζα δεδομένων πρωτεϊνών (Protein Data Bank). Η συγκέντρωση των αποδιαταγμένων πρωτεϊνικών υπομονάδων υπολογίζεται χρησιμοποιώντας το νόμο Beer-Lambert. Οι αποδιαταγμένες πρωτεΐνες σε διάλυμα ουρίας φυλάσσονται στους -80 °C.

2.9. Σχηματισμός *in vitro* (refolding) των συμπλόκων HLA B*08:01-b_{2m}-πεπτιδίου και HLA A*02:01-b_{2m}-πεπτιδίου:

Αντιδραστήρια:

- 1) L-Αργινίνη Biochemica από την Applichem (A3675)
- 2) Tris MLtrapure από την Applichem (A1086)
- 3) Αιθυλενο-διαμινο-τετρα-οξικό οξύ (EDTA) από την PanRreac Quimica (A5097)
- 4) L-γλουταθειόνη ανηγμένη από την Applichem (A2084)
- 5) L-γλουταθειόνη οξειδωμένη από την Acros Organics (320220050)
- 6) Γλυκερόλη για μοριακή βιολογία από την Sigma Aldrich (G5516)

- 7) Φαινυλ-μεθυλ-σουλφονυλο-φθορίδιο (PMSF) από την Applichem (A0999)
- 8) DL-διθειοθρεϊτόλη (DTT) από την Sigma (D5545)
- 9) Διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) από την MP Biomedicals (MFCD00002089)
- 10) Μεμβράνη διαπίδυσης (όριο αποκλεισμού 10 kDa) από την Sigma
- 11) Συγκεντρωτήρες πρωτεϊνών από την Merck (Amicon® MLtra-15 Centrifugal Filter Unit, 15ML - 10 KDa cutoff - UFC901024)
- 12) Πεπτιδία από την GeneCust και τη JPT

Παρασκευάζεται υδατικό διάλυμα επαναδίπλωσης (refolding buffer) όγκου 50 mL που περιέχει: 0.4 M αργινίνη, 100 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM ανηγμένη γλουταθειόνη, 0.5 mM οξειδωμένη γλουταθειόνη, 5 % v/v γλυκερόλη, 2 mM EDTA και 0.1 mM PMSF. Το ανωτέρω διάλυμα τοποθετείται στους 4 °C. Αναμιγνύονται 1.6 mg βαριάς αλυσίδας HLA (1 μM τελική συγκέντρωση στα 50 mL), 1.2 mg β₂ μικροσφαιρίνης (2 μM τελική συγκέντρωση στα 50 mL) και 40 μM πεπτιδίου διαλυμένα σε διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) σε σωληνάριο falcon των 15 mL όπου και προστίθεται διθειοθρεϊτόλη (DTT) σε τελική συγκέντρωση 5 mM. Ακολουθεί επώαση στους 37 °C για 30 min. Κατόπιν το πρωτεϊνικό διάλυμα μεταφέρεται στο σωληνάριο falcon που περιέχει το διάλυμα επαναδίπλωσης και τοποθετείται στους 4 °C για 2 ώρες. Μετά το πέρας των 2 ωρών το διάλυμα μεταφέρεται σε μεμβράνη διαπίδυσης (10 kDa MW cutoff) η οποία τοποθετείται σε ογκομετρικό κύλινδρο 2 L που περιέχει διάλυμα 10 mM Tris-HCl pH 8 σε θερμοκρασία 4 °C. Πραγματοποιείται διαπίδυση στους 4 °C για 48 ώρες με μια αλλαγή του υδατικού διαλύματος του κυλίνδρου μετά τις πρώτες 24 ώρες.

2.10. Χρωματογραφία μοριακής διήθησης για την απομόνωση του πρωτεϊνικού συμπλόκου: Παρασκευάζεται υδατικό διάλυμα που περιέχει 10 mM Tris-HCl pH 8 και 150 mM NaCl. Πραγματοποιείται εξισορρόπηση της χρωματογραφικής στήλης Sephacryl S-200 με 2 όγκους στήλης (240 mL) του ανωτέρω διαλύματος. Το διάλυμα του πρωτεϊνικού συμπλόκου μεταφέρεται

από την μεμβράνη διαπίδωσης σε σωληνάριο falcon των 50 mL και φιλτράρεται με τη χρήση αποστειρωμένου φίλτρου μιας χρήσης με διάμετρο πόρων 0.2 μm. Ακολουθεί συμπύκνωση έως όγκου 1 mL και χρωματογραφία μοριακής διήθησης στη συσκευή FPLC (AKTA) στους 4 °C. Συλλέγονται τα κλάσματα έκλουσης που αντιστοιχούν στο σύμπλοκο και αναλύονται με SDS-PAGE. Μετράται η οπτική απορρόφηση στα 280 nm με τη χρήση της συσκευής Nanodrop. Τα κλάσματα έκλουσης συμπυκνώνονται έως συγκέντρωσης 8-11 μM. Προστίθεται 10 % v/v αποστειρωμένη γλυκερόλη και τα κλάσματα φυλάσσονται στους -80 °C. Η συγκέντρωση του πρωτεϊνικού συμπλόκου υπολογίζεται με το άθροισμα των συντελεστών μοριακής απόσβεσης των 2 υπομονάδων και του πεπτιδίου στην περίπτωση που το τελευταίο διαθέτει ένα ή περισσότερα αρωματικά αμινοξέα. Η ίδια διαδικασία ακολουθείται για το σχηματισμό όλων των συμπλόκων HLA B*08:01 και HLA A*02:01 με όλα τα πεπτίδια.

2.11. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από *E.coli* στέλεχος XL1-Blue:

Χρησιμοποιείται το QIAprep spin kit της Qiagen ακολουθώντας τις οδηγίες που εσωκλείονται.

2.12. Πέψη του πλασμιδιακού φορέα που φέρει το γονίδιο της βαριάς αλυσίδας του HLA B08 με περιοριστικές ενδονουκλεάσες:

Αντιδραστήρια:

- 1) Περιοριστική ενδονουκλεάση BamHI από τη New England Biolabs
- 2) Περιοριστική ενδονουκλεάση HindIII από τη New England Biolabs
- 3) Ρυθμιστικό διάλυμα 2.1 από τη New England Biolabs

Η αντίδραση πραγματοποιείται στους 37 °C και διαρκεί 1 ώρα. Χρησιμοποιούνται 1.75 μL από κάθε ενζυμικό διάλυμα, 7 μL ρυθμιστικού διαλύματος και 6 μL πλασμιδιακού DNA 80 ngr./μL. Ο τελικός όγκος αντίδρασης συμπληρώνεται ως τα 20 μL με αποστειρωμένο ddH₂O.

2.13. Ηλεκτροφόρηση πλασμιδιακού DNA σε πηκτή αγαρόζης:

Αντιδραστήρια:

- 1) Αγαρόζη από τη Fisher Scientific (BP160-100)
- 2) Βρωμιούχο αιθίδιο από τη Fisher Scientific (15-585-011)

Η πηκτή διαχωρισμού παρασκευάζεται με διάλυμα αγαρόζης 1 % w/v. Διαλύεται 1 gr. αγαρόζης σε 100 mL ρυθμιστικού διαλύματος 40 mM Tris-HCl pH 7.6, 20 mM οξικού οξέος και 1 mM EDTA. Προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 10 µgr./mL και το διάλυμα τοποθετείται άμεσα στη συσκευή όπου αφήνεται να πολυμεριστεί για 30 min. Σε κάθε δείγμα DNA προστίθεται χρωστική Orange G σε τελική συγκέντρωση 1X για την παρακολούθηση των μετακινούμενων ζωνών. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε διάλυμα 40 mM Tris-HCl pH 7.6, 20 mM οξικού οξέος και 1 mM EDTA σε σταθερό δυναμικό 120 V. Οι ζώνες του DNA γίνονται ορατές υπό υπεριώδη ακτινοβολία μήκους κύματος 260 nm.

2.14. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου παρουσία δωδεκανοθειικού νατρίου (SDS-PAGE):

Αντιδραστήρια:

- 1) Διάλυμα Ακρυλαμιδίου (30 %)-Μίξη 29:1 για μοριακή βιολογία από την Applichem (A4983)
- 2) Tris από την Applichem
- 3) Δωδεκανοθειικό νάτριο (SDS) από τη J.T. Baker (BP166-100)
- 4) Υπερθειικό αμμώνιο (APS) από τη Sigma Aldrich (A3678)
- 5) Τετραμεθυλ-αιθυλενο-διαμίνη (TEMED) από τη Sigma Aldrich (T9281)
- 6) Γλυκίνη από την AppliChem (A1067)
- 7) Χρωστική Coomassie Brilliant Blue από τη Sigma Aldrich (27816)
- 8) Μεθανόλη από την Chem-Lab-NV (CL00.1307)

- 9) Οξικό οξύ από την Chem-Lab NV (CL00.0116)
- 10) Γλυκερόλη για μοριακή βιολογία από τη Sigma Aldrich (G5516)
- 11) Κυανό της βρωμοφαινόλης από τη Sigma Aldrich (B0126)
- 12) β-μερκαπτοαιθανόλη από τη Sigma Aldrich (M3148)
- 13) Ισοπροπανόλη από τη Merck (W292907)
- 14) Δείκτης μοριακών βαρών p7704s από New England Biolabs

Ο σχηματισμός της πηκτής διαχωρισμού πραγματοποιείται με ανάμειξη 1.6 mL ddH₂O, 2 mL διαλύματος ακρυλαμιδίου 30 %, 1.25 mL Tris-HCl 1.5 M pH 8.8, 50 µL διαλύματος SDS 10 % w/v, 100 µL APS 10 % w/v και 5 µL TEMED. Προστίθεται 1 mL ισοπροπανόλης για το σχηματισμό επίπεδης επιφάνειας της πηκτής. Ο πολυμερισμός πραγματοποιείται για 30 min. Μετά τον πολυμερισμό της πηκτής διαχωρισμού αφαιρείται η ισοπροπανόλη και τοποθετείται η πηκτική στοίβαξης. Ο σχηματισμός της πηκτής στοίβαξης πραγματοποιείται με ανάμειξη 1.7 mL ddH₂O, 0.4 mL διαλύματος ακρυλαμιδίου 30 %, 0.3 mL Tris-HCl 1 M pH 6.8, 25 µL διαλύματος SDS 10 % w/v, 50 µL APS 10% w/v και 5 µL TEMED. Ο πολυμερισμός πραγματοποιείται για 30 min. Το διάλυμα φόρτωσης δειγμάτων αποτελείται από 3.75 mL γλυκερόλης, 0.9 mL Tris-HCl 1 M pH 6.8, 3 mL διαλύματος SDS 10 % w/v, 5.1 mL dH₂O, 0.75 mL β-μερκαπτοαιθανόλης και 1.5 mL διαλύματος κυανού της βρωμοφαινόλης 1 % w/v. Το διάλυμα ηλεκτροφόρησης παρασκευάζεται με 25 mM Tris, 192 mM γλυκίνης και 3.5 mM SDS. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται για περίπου 2 ώρες σε σταθερό δυναμικό 120 Volt σε θερμοκρασία δωματίου. Η χρώση των πρωτεϊνικών ζωνών στην πηκτική πραγματοποιείται με ανάδευση σε διάλυμα χρωστικής Coomassie Brilliant Blue (1 g στερεής Coomassie Brilliant Blue διαλύεται σε 480 mL ddH₂O, 420 mL μεθανόλης και 100 mL οξικού οξέος) για 30 min. Η χρωστική προσδένεται μη αντιστρεπτά στις πρωτεϊνικές ζώνες και η πηκτική έπειτα αποχρωματίζεται με ανάδευση για 30 min σε διάλυμα που περιέχει 48 % v/v ddH₂O, 42 % v/v μεθανόλη και 10 % v/v οξικό οξύ. Κατόπιν η πηκτική τοποθετείται υπό ανάδευση μέχρι την επόμενη ημέρα σε διάλυμα που περιέχει 5 % v/v οξικό οξύ ώστε η πηκτική (πλην των πρωτεϊνικών ζωνών) να αποχρωματιστεί πλήρως.

2.15. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου απουσία αποδιατακτικών και αναγωγικών παραγόντων (Native PAGE):

Ο σχηματισμός της πηκτής διαχωρισμού πραγματοποιείται με ανάμειξη 2.9 mL διαλύματος Tris-HCl 0.375 M pH 8.8, 2 mL διαλύματος ακρυλαμιδίου 30 %, 100 μ L APS 10 % w/v και 5 μ L TEMED. Προστίθεται 1 mL ισοπροπανόλης για το σχηματισμό επίπεδης επιφάνειας της πηκτής. Ο πολυμερισμός πραγματοποιείται για 30 min. Μετά τον πολυμερισμό της πηκτής διαχωρισμού αφαιρείται η ισοπροπανόλη και τοποθετείται η πηκτή στοίβαξης. Ο σχηματισμός της πηκτής στοίβαξης πραγματοποιείται με ανάμειξη 2.14 mL διαλύματος Tris-HCl 0.375 M pH 8.8, 0.34 mL διαλύματος ακρυλαμιδίου 30 %, 50 μ L APS 10 % w/v και 5 μ L TEMED. Το διάλυμα φόρτωσης δειγμάτων αποτελείται από 62.5 mM διαλύματος Tris-HCl pH 6.8, 25 % v/v γλυκερόλη και 1 % v/v διαλύματος κυανού της βρωμοφαινόλης. Το διάλυμα ηλεκτροφόρησης αποτελείται από 25 mM Tris και 192 mM γλυκίνης. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται για 5 ώρες σε σταθερό δυναμικό 100 Volt στους 4 °C. Η συνέχεια της διαδικασίας είναι πανομοιότυπη με το SDS-PAGE.

2.16. Προσδιορισμός της θερμοδυναμικής σταθερότητας των πρωτεϊνικών συμπλόκων HLA μέσω θερμικής μετουσίωσης (differential scanning fluorimetry-DSF):

Η αύξηση της θερμοκρασίας επιφέρει σταδιακή αποδιάταξη και απώλεια της τριτοταγούς δομής των πρωτεϊνών. Η υδρόφοβη φθορίζουσα χρωστική Sypro Orange (Sigma Aldrich-S5692) προσδένεται στις υδρόφοβες περιοχές των πρωτεϊνών καθώς αυτές εκτίθενται κατά τη διάρκεια της θερμικής αποδιάταξης, με αποτέλεσμα ο φθορισμός να αυξάνεται ως συνάρτηση με την αύξηση της θερμοκρασίας. Η θερμοκρασία αποδιάταξης (T_m) αποτελεί τη θερμοκρασία στην οποία έχει αποδιαταχθεί το 50 % της ποσότητας της πρωτεΐνης. Η θερμική μετουσίωση πραγματοποιείται στη συσκευή αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (rt-PCR) LightCycler 96 (Roche). Η αρχική θερμοκρασία ρυθμίζεται στους 30 °C και η τελική θερμοκρασία φθάνει τους 80 °C. Τα πείραμα διαρκεί 50 min (αύξηση θερμοκρασίας 1 °C/min). Το μήκος κύματος διέγερσης είναι 533 nm και το μήκος κύματος εκπομπής είναι 572 nm. Ο όγκος της κάθε αντίδρασης είναι 20 μ L. Τοποθετούνται σε κάθε αντίδραση

16 μL πρωτεϊνικού συμπλόκου συγκέντρωσης 8-10 μM . Η χρωστική Sypro Orange βρίσκεται σε αρχική συγκέντρωση 5000X. Αραιώνεται 100 φορές σε ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM Tris-HCl pH 8 και 150 mM NaCl (συγκέντρωση 50X). Μεταφέρονται 4 μL από την ανωτέρω αραιώση σε κάθε πηγαδάκι αντίδρασης ώστε η τελική συγκέντρωση της χρωστικής να είναι 10X. Το διάγραμμα της πρώτης παραγώγου ($-dF/dT$, άξονας y) της αύξησης του φθορισμού σε συνάρτηση της αύξησης της θερμοκρασίας (T, άξονας x) προκύπτει από την ανάλυση των δεδομένων απορρόφησης από το πρόγραμμα της συσκευής (melting curve analysis). Η μικρότερη τιμή στον άξονα x αντιστοιχεί στη θερμοκρασία αποδιάταξης (T_m) της πρωτεΐνης.

2.17. Προσδιορισμός της θερμοδυναμικής σταθερότητας των πρωτεϊνικών συμπλόκων HLA με κυκλικό διχρωισμό: Ο κυκλικός διχρωισμός πραγματοποιείται στη συσκευή Jasco J-715, η οποία είναι εξοπλισμένη με το σύστημα ελέγχου θερμοκρασίας PTC-348. Η θερμοκρασία αυξάνεται από τους 20 $^{\circ}\text{C}$ στους 90 $^{\circ}\text{C}$ με ρυθμό αύξησης 1 $^{\circ}\text{C}$ ανά min. Τα σημεία ελήφθησαν ανά 0.2 $^{\circ}\text{C}$ μετρώντας στο μήκος κύματος των 230 nm. Χρησιμοποιούνται 120 μL πρωτεϊνικού συμπλόκου HLA συγκέντρωσης 8-10 μM . Αρχικά λαμβάνεται φάσμα κυκλικού διχρωισμού από 190 έως 280 nm. Τα δεδομένα κυκλικού διχρωισμού σε συνάρτηση με την αύξηση της θερμοκρασίας αναλύονται με την εξίσωση Boltzmann sigmoidal στο πρόγραμμα Graph Pad Prism και υπολογίζεται η θερμοκρασία αποδιάταξης από το 50 % της σιγμοειδούς μετάβασης στην καμπύλη (V50).

2.18. Προσδιορισμός της κινητικής σταθερότητας των πρωτεϊνικών συμπλόκων HLA: Το πείραμα πραγματοποιείται στη συσκευή αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (rt-PCR) LightCycler 96. Η θερμοκρασία διατηρείται σταθερή στους 37 $^{\circ}\text{C}$ και το πείραμα διεξάγεται για 1653 ή για 137 min, ανάλογα με τη σταθερότητα του κάθε πρωτεϊνικού συμπλόκου. Το μήκος κύματος διέγερσης είναι 533 nm και το μήκος κύματος εκπομπής είναι 572 nm. Χρησιμοποιείται η χρωστική Sypro Orange (Sigma Aldrich-S5692) η οποία ανταγωνίζεται το πεπτιδίο για την πρόσδεση στην υδρόφοβη αύλακα του MHC class I, με αποτέλεσμα την αύξηση του φθορισμού σε συνάρτηση με το χρόνο. Ο όγκος της κάθε αντίδρασης είναι 20 μL . Τοποθετούνται σε κάθε αντίδραση 16 μL πρωτεϊνικού συμπλόκου

συγκέντρωσης 8-10 μM και 4 μL χρωστικής 50X, ώστε η τελική της συγκέντρωση στην αντίδραση να είναι 10X. Τα δεδομένα αναλύονται με την εξίσωση dissociation-one phase exponential decay στο πρόγραμμα Graph Pad Prism και υπολογίζεται ο χρόνος ημιζωής του πρωτεϊνικού συμπλόκου.

2.19. Χρωματογραφία ανάστροφης φάσης για τον έλεγχο καθαρότητας των πεπτιδίων LSILLKHKKAAL και ARAALRSRYWAI: Τα πεπτίδια παραλαμβάνονται και διαλύονται σε διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) σε συγκέντρωση 10 mM. Παρασκευάζονται υδατικό διάλυμα Α που περιέχει 5 % v/v ακετονιτρίλιο (AppliChem-131881) και 0.05 % v/v τριφθοροοξικό οξύ (AppliChem-A0697) και υδατικό διάλυμα Β που περιέχει 50 % v/v ακετονιτρίλιο και 0.05 % v/v τριφθοροοξικό οξύ. Στη συνέχεια το διάλυμα του πεπτιδίου αραιώνεται 100 φορές (τελική συγκέντρωση 100 μM) σε διάλυμα 10 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl. Ο τελικός όγκος ένεσης στη συσκευή HPLC είναι 200 μL . Χρησιμοποιείται αναλυτική στήλη Semiprep C18 και εφαρμόζεται αυξανόμενη βαθμίδα ακετονιτρίλιου για την έκλυση, η οποία αναλύεται στον παρακάτω πίνακα:

Χρόνος (min)	Διάλυμα Α (%)	Διάλυμα Β (%)	Ροή (mL/min)
5	100	0	2
45	0	100	2
50	0	100	2
51	100	0	2
56	100	0	2
57	100	0	2
58	100	0	0

2.20. Έκφραση και καθαρισμός των αμινοπεπτιδασών του ενδοπλασματικού δικτύου 1 και 2 (ERAP1 + ERAP2):

Αντιδραστήρια:

- 1) Θρεπτικό μέσο Gibco® Sf-900™ III SFM από τη ThermoFisher Scientific (12658019)
- 2) Δισόξινο φωσφορικό νάτριο (NaH_2PO_4) από τη Sigma Aldrich (04269)

- 3) Χλωριούχο νάτριο (NaCl) για μοριακή βιολογία από την Applichem (A2942)
- 4) Hepes (4-(2-υδροξυαιθυλ)-1-πιπεραζινο-αιθανοσουλφονικό οξύ από τη Sigma Aldrich (54457)
- 5) Ιμιδαζόλιο από την AppliChem (A3635)
- 6) Υδροξείδιο του νατρίου (NaOH) από τη Merck (S8045)
- 7) Ni-NTA σφαιρίδια αγαρόζης από την ThermoFisher Scientific (R90101)
- 8) Στήλες χρωματογραφίας όγκου 10 mL από την Biorad
- 9) Φαινυλ-μεθυλ-σουλφονυλο-φθορίδιο (PMSF) από την Applichem (A0999)

Καλλιέργεια κυττάρων εντόμου Hi-5 (όγκος 50 mL, $1-1.5 \cdot 10^6$ κύτταρα/mL) επιμολύνεται με 2 mL βακουλοϊού που περιέχει το γονίδιο που κωδικοποιεί την ERAP1. Ύστερα από 3 ημέρες, η καλλιέργεια συλλέγεται σε σωληνάριο falcon όγκου 50 mL. Ακολουθεί φυγοκέντριση (4500 στροφές ανά min, 4 °C, 15 min) και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο falcon. Ακολουθεί ξανά φυγοκέντριση (4500 στροφές ανά min, 4 °C, 45 min) και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο falcon. Προστίθεται 0.1 mM PMSF και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε μεμβράνη διαπίδυσης (όριο αποκλεισμού 10 kDa). Πραγματοποιείται διαπίδυση έναντι ρυθμιστικού διαλύματος 10 mM NaH_2PO_4 pH 8, 100 mM NaCl για 6 ώρες στους 4 °C. Το ρυθμιστικό διάλυμα αλλάζει ανά 2 ώρες. Μετά την τελευταία αλλαγή, η διαπίδυση πραγματοποιείται για όλη τη διάρκεια της νύχτας. Η στήλη χρωματογραφίας αρχικά πλένεται με 20 mL ddH₂O. Στη συνέχεια 0.5 mL Ni-NTA σφαιρίδια αγαρόζης φορτώνονται στη στήλη και ακολουθεί πλύση με 40 mL ddH₂O. Έπειτα, τα σφαιρίδια εξισοροπούνται με 20 mL ρυθμιστικού διαλύματος πρόσδεσης (50 mM NaH_2PO_4 pH 8, 300 mM NaCl και 10 mM ιμιδαζόλιο). Τα σφαιρίδια φυλάσσονται κατά τη διάρκεια της νύχτας σε ρυθμιστικό διάλυμα πρόσδεσης. Την επόμενη ημέρα, το πρωτεϊνικό διάλυμα μεταφέρεται από τη μεμβράνη διαπίδυσης σε σωληνάριο falcon και εξισοροπείται βάσει όγκου στο ρυθμιστικό διάλυμα πρόσδεσης. Ακολουθεί φυγοκέντριση (4500 στροφές ανά

min, 4 °C, 15 min). Κατόπιν το πρωτεϊνικό διάλυμα μεταφέρεται στο falcon που περιέχει τα εξισορροπημένα Ni-NTA σφαιρίδια και αφήνεται να περιστρέφεται για 2 ώρες στους 4 °C, ώστε να πραγματοποιηθεί η πρόσδεση του ενζύμου στα σφαιρίδια, λόγω του επιτόπου 6 ιστοδινών. Έπειτα, το πρωτεϊνικό διάλυμα και τα σφαιρίδια φορτώνονται στη στήλη χρωματογραφίας και ακολουθούν διαδοχικά οι πλύσεις: 20 mL ρυθμιστικού διαλύματος 50 mM NaH₂PO₄ pH 8, 300 mM NaCl και 10 mM ιμιδαζόλιο, 30 mL ρυθμιστικού διαλύματος 50 mM NaH₂PO₄ pH 8, 300 mM NaCl και 20 mM ιμιδαζόλιο, 4 mL ρυθμιστικού διαλύματος 50 mM NaH₂PO₄ pH 8, 300 mM NaCl και 30 mM ιμιδαζόλιο. Η έκλυση επιτυγχάνεται με 5 mL ρυθμιστικού διαλύματος 50 mM NaH₂PO₄ pH 8, 300 mM NaCl και 150 mM ιμιδαζόλιο. Τα κλάσματα έκλυσης συλλέγονται ανά 1 mL. Ακολουθεί μια τελική πλύση με 2 mL ρυθμιστικού διαλύματος 50 mM NaH₂PO₄ pH 8, 300 mM NaCl και 300 mM ιμιδαζόλιο. Ακολουθεί τελική διαπίδυση των κλασμάτων έκλυσης έναντι ρυθμιστικού διαλύματος 10 mM HEPES pH 7, 100 mM NaCl για όλη τη διάρκεια της νύχτας. Φυλάσσονται 25 μL από κάθε κλάσμα έκλυσης για SDS-PAGE και μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας. Η ίδια διαδικασία ακολουθείται για την έκφραση του ενζύμου ERAP2.

2.21. Προσδιορισμός κινητικής σταθερότητας των συμπλόκων B*08 με τα 12μερή πεπτίδια, σε ανταγωνισμό με 9μερές πεπτίδιο υψηλής συγγένειας: Τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα B*08-LSILLKHKKAAL (9 μM) και B*08-ARAALRSRYWAI (11 μM) επωάζονται στους 37 °C με το 9μερές πεπτίδιο ALRSRYWAI, το οποίο βρίσκεται σε τελική συγκέντρωση 100 μM. Τα δείγματα (όγκος 10 μL) μετά το πέρας της επώασης υποβάλλονται αμέσως σε ηλεκτροφόρηση (Native PAGE). Το 9μερές πεπτίδιο που έχει υψηλή συγγένεια για το πρωτεϊνικό σύμπλοκο ανταγωνίζεται για την πρόσδεση τα 12μερή πεπτίδια. Τα σύμπλοκα έχουν συνολικά διαφορετικά φορτία, λόγω διαφορετικού φορτίου του κάθε πεπτιδίου. Ως αποτέλεσμα, είναι ορατές δυο πρωτεϊνικές ζώνες στην πηκτή, γεγονός που επιτρέπει την εκτίμηση του χρόνου ημιζωής των συμπλόκων B*08 με τα 12μερή πεπτίδια βάσει της έντασης χρώσης των ζωνών, με τη χρήση του προγράμματος ImageJ. Ακολούθως, υπολογίζεται ο χρόνος ημιζωής των πρωτεϊνικών συμπλόκων χρησιμοποιώντας την εξίσωση one phase decay στο Graph Pad Prism.

2.22. Μέτρηση ενζυμικής δραστηριότητας των αμινοπεπτιδασών ERAP1 και ERAP2:

Αντιδραστήρια:

- 1) L-λευκίνη-7-amido-4-methylcoumarin hydrochloride (L-AMC) από τη Sigma Aldrich (L2145)
- 2) L-Αργινίνη-7-amido-4-methylcoumarin hydrochloride (R-AMC) από τη Sigma Aldrich (A2027)

Το πείραμα πραγματοποιείται στη συσκευή Spark 10M multimode microplate reader (TECAN). Το φθορίζον υπόστρωμα L-Λευκίνη-7-άμιδο-4-μεθυλκουμαρινο- υδροχλωρίδιο (L-AMC) από τη Sigma, χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα για τη μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας της ERAP1. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε ρυθμιστικό διάλυμα: 50 mM HEPES pH 7, 100 mM NaCl. Χρησιμοποιούνται 100 μ M υποστρώματος σε όγκο αντίδρασης 150 μ L. Το μήκος κύματος διέγερσης ρυθμίζεται στα 380 nm και το μήκος κύματος εκπομπής στα 460 nm. Χρησιμοποιούνται 10 nM ενζύμου. Η ίδια διαδικασία ακολουθείται και για τον ERAP2, με τη διαφορά ότι χρησιμοποιείται το φθορίζον υπόστρωμα L-Αργινίνη-7-άμιδο-4-μεθυλκουμαρινο-υδροχλωρίδιο (R-AMC). Ο υπολογισμός της σταθεράς αναστολής της ένωσης DG078 ως προς το ένζυμο ERAP1, ERAP2 και LAP πραγματοποιείται αυξανόμενες συγκεντρώσεις του αναστολέα (10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM, 1 μ M, 10 μ M και 30 μ M). Το διάγραμμα σχηματίζεται ως εξής: Ο λογάριθμος της συγκέντρωσης του αναστολέα σε nM (άξονας x) προς το λόγο της εφαιπτομένης της ενζυμικής δραστηριότητας χωρίς αναστολέα/εφαιπτομένη της ενζυμικής δραστηριότητας με αναστολέα (άξονας y). Η IC_{50} υπολογίζεται χρησιμοποιώντας την εξίσωση equation log (inhibitor) vs. Response-Variable slope στο πρόγραμμα GraphPad Prism.

2.23. Φασματομετρία μάζας MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization- Time of Flight Mass Spectrometry) για τη διερεύνηση του καταβολισμού των πεπτιδίων από τις αμινοπεπτιδάσες ERAP1, ERAP2 και LAP: Τα πεπτίδια διαλύονται σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει 10 mM Tris-HCl pH 8 και 150 mM NaCl, στην ίδια συγκέντρωση στην

οποία βρίσκεται το πρωτεϊνικό σύμπλοκο με το ίδιο πεπτιδίδιο. Σε όγκο 50 μL προστίθεται μια αμινοπεπτιδάση (ERAP1, ERAP2 ή LAP) σε διάφορες συγκεντρώσεις (από 2 έως 100 nM) και η αντίδραση πραγματοποιείται στους 37 $^{\circ}\text{C}$. Σε καθορισμένα χρονικά διαστήματα λαμβάνονται δείγματα όγκου 8 μL , προστίθεται 1 % v/v τριφθοροοξικό οξύ (τελική συγκέντρωση) και αποθηκεύονται στους -80 $^{\circ}\text{C}$. Τα δείγματα αραιώνονται (1:10) σε διάλυμα (7 mg/mL άλφα-κύανο-4-υδροξυκινναμικό οξύ σε 50 % ακετονιτρίλιο, 0.1 % τριφθοροοξικό οξύ) και επιστρώνονται σε MALDI target ανοξειδωτού χάλυβα με τη μέθοδο της αποξηραμένης σταγόνας. Τα μοριακά βάρη των πεπτιδίων προσδιορίζονται με τη συσκευή MALDI-TOF/TOF MS (MLtraflex TOF/TOF, Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Η λίστα των κορυφών δημιουργείται με το λογισμικό Flexanalysis v3.3 (Bruker) και η εξομάλυνση (smoothing) εφαρμόζεται με τον αλγόριθμο Savitzky-Golay (εύρος 0.2 m/z, αριθμός κύκλων 1). Επιτρέπεται ένα κατώφλι (threshold) λόγου σήματος/θορύβου ίσο με 2.5. 10 x 1000 βολές ανά φάσμα αποκτώνται με θετικά φορτισμένο ιόν σε συχνότητα laser 500 Hz. Όλα τα φάσματα και οι αντίστοιχες κορυφές εξάγονται με Flexanalysis v3.3. Στη συνέχεια αθροίζονται οι εντάσεις των κορυφών των αρχικών πεπτιδίων-υποστρωμάτων και των προϊόντων καταβολισμού για κάθε χρονικό σημείο. Υπολογίζεται το ποσοστό του αρχικού πεπτιδίου-υποστρώματος που απομένει προς το άθροισμα όλων των πεπτιδίων. Έπειτα υπολογίζεται ο χρόνος ημιζωής μέσω της εξίσωσης one phase decay στο Graph Pad Prism.

2.24. Κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση: Επιλέγεται να γίνει μετάλλαξη στο γονίδιο που κωδικοποιεί τη βαριά αλυσίδα του HLA B*08:01 (NCBI Reference Sequence: NM_005514.8), ώστε το γλουταμικό οξύ στη θέση 76 να μεταλλαχθεί σε κυστεΐνη (E76C). Το κωδικόνιο GAG που κωδικοποιεί το γλουταμικό οξύ μεταλλάσσεται στο κωδικόνιο TGC, το οποίο κωδικοποιεί την κυστεΐνη. Οι 2 εκκινητές (primers) για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης επιλέγονται με τη χρήση του προγράμματος Quickchange Primer Design της Agilent. Χρησιμοποιείται το QuickChange II site-directed mutagenesis kit της Agilent για την κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση σύμφωνα με τις οδηγίες και τα αντιδραστήρια που εσωκλείονται. Οι εκκινητές αραιώνονται με ddH₂O σε τελική συγκέντρωση 100 ngr./ μL . Η ποσότητα του δίκλωνου πλασμιδιακού DNA που

χρησιμοποιείται είναι 100 ngr. σε όγκο 1.3 μL . Στην αντίδραση προστίθενται 5 μL 10X ρυθμιστικού διαλύματος αντίδρασης, 1.25 μL από κάθε αραίωση εκκινήτη, 1 μL dNTPs, 3 μL Quicksolution και 1 μL PfuUltra DNA πολυμεράσης (2.5 U/ μL). Η αντίδραση συμπληρώνεται με ddH₂O έως τελικού όγκου 50 μL . Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματοποιείται σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

95 °C	1 min	1 κύκλος
95 °C	50 δευτερόλεπτα	18 κύκλοι
62 °C	1 min	
72 °C	8 min	
72 °C	7 min	1 κύκλος
4 °C		Τερματισμός

Ύστερα προστίθεται 1 μL του ενζύμου Dpn I (10 U/ μL). Ακολουθεί φυγοκέντριση για 1 min και αμέσως το φιαλίδιο μεταφέρεται για 1 ώρα στους 37 °C, ώστε το ένζυμο να διασπάσει το πατρικό (μη μεταλλαγμένο) υπερελικωμένο dsDNA. Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης για τον εντοπισμό του προϊόντος της PCR. Στη συνέχεια πραγματοποιείται μετασχηματισμός σε *E.coli* στέλεχος XL-10 Gold. Τέλος, απομονώνεται πλασμιδιακό DNA και αποστέλλεται για αλληλούχιση ώστε να διαπιστωθεί αν πραγματοποιήθηκε επιτυχώς η μετάλλαξη.

2.25. Βάσεις δεδομένων για την επιλογή των πεπτιδίων:

Immune epitope database and analysis resource (IEDB.org): Βάση δεδομένων αντιγονικών επιτόπων. Περιέχει πειραματικά δεδομένα αντισωμάτων και επιτόπων T-λεμφοκυττάρων που έχουν μελετηθεί σε ανθρώπους, πρωτεύοντα θηλαστικά εκτός του ανθρώπου και σε άλλα είδη ζώων στο πλαίσιο μολυσματικών ασθενειών, αλλεργιών, αυτοανοσίας και

μεταμόσχευσης. Επίσης, χρησιμοποιεί υπολογιστικά εργαλεία για την ανάλυση και πρόβλεψη των επιτόπων.

NetMHCpan 4.0 Server: Προβλέπει την σταθερά συγγένειας των πεπτιδίων σε καταχωρημένα αλληλόμορφα MHC χρησιμοποιώντας τεχνητά νευρωνικά δίκτυα. Η μέθοδος έχει εκπαιδευτεί στο συνδυασμό περισσότερων από 180.000 ποσοτικών δεδομένων πρόσδεσης και πεπτιδίων που έχουν απομονωθεί από MHC και έχουν αναλυθεί με φασματομετρία μάζας. Τα δεδομένα που αφορούν την πρόβλεψη της σταθεράς συγγένειας των πεπτιδίων (binding affinity) καλύπτουν 172 μόρια MHC προερχόμενα από άνθρωπο (HLA-A, B, C, E), ποντίκι (H-2), βοοειδή (BoLA), πρωτεύοντα θηλαστικά (Patr, Mamu, Gogo) και χοίρο (SLA). Τα δεδομένα που προέρχονται από ανάλυση φασματομετρίας μάζας πεπτιδίων που έχουν απομονωθεί από MHC καλύπτουν 55 αλληλόμορφα HLA προερχόμενα από άνθρωπο και ποντίκι. Ακόμη, ο χρήστης μπορεί να αποκομίσει προβλέψεις οποιουδήποτε αλληλομόρφου MHC τάξης 1 αν γνωρίζει και χρησιμοποιήσει ως δεδομένο την πλήρη αλληλουχία αμινοξέων της πρωτεΐνης. Οι προβλέψεις που αφορούν πεπτιδία μεγαλύτερα των 11 αμινοξέων, όσον αφορά τα αλληλόμορφα MHC τάξης 1, θα πρέπει να αξιολογούνται με επιφύλαξη. Επίσης, δεν υπάρχει δυνατότητα πρόγνωσης για πεπτιδία μεγαλύτερα των 14 αμινοξέων, όσον αφορά στα αλληλόμορφα MHC τάξης 1.

Syfeithi: Βάση δεδομένων που αποτελείται από περισσότερες από 7000 αλληλουχίες πεπτιδίων για τις οποίες έχει αποδειχθεί ότι προσδένονται στα MHC τάξης 1 και 2. Οι καταχωρίσεις προέρχονται μόνο από δημοσιεύσεις. Δείχνει τα αμινοξικά κατάλοιπα αγκυροβόλησης στην αλληλουχία του πεπτιδίου.

Uniprot: Πρόκειται για την κεντρική βάση δεδομένων που συλλέγονται λειτουργικές πληροφορίες για πρωτεΐνες (κυρίως η αλληλουχία των αμινοξέων, όνομα και περιγραφή πρωτεΐνης, οργανισμός προέλευσης και πληροφορίες παραπομπών).

Protein Data Bank: Συλλογή δομών πρωτεϊνών από δεδομένα κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ, πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, ηλεκτρονικής μικροσκοπίας.

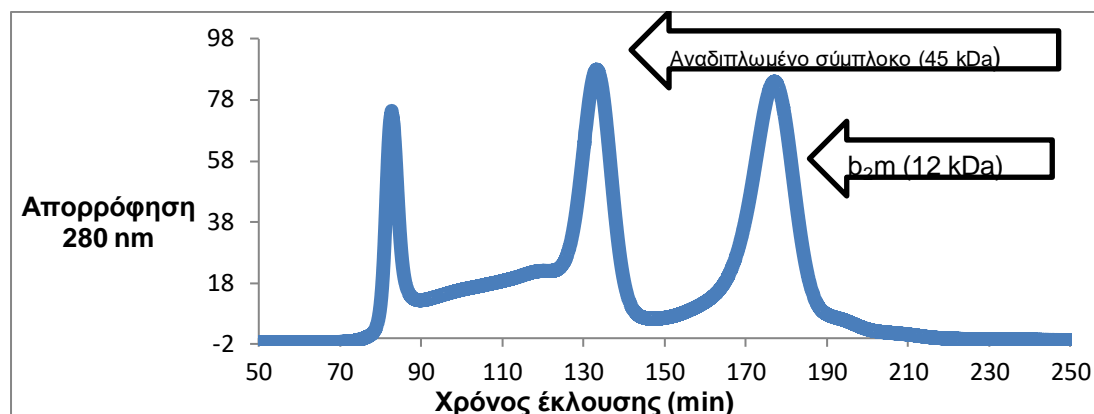
Κεφάλαιο 3^ο: Αποτελέσματα

3.1. Σχηματισμός *in vitro* των πρωτεϊνικών συμπλόκων HLA-A*02 με τα πεπτίδια GLIEKNIEL, FVLELEPEWTVK και FLNKDLEVDGHFVTM

Το πεπτίδιο FVLELEPEWTVK αποτελεί αντιγονικό επίτοπο (κωδικός IEDB: 546880) προερχόμενο από πρωτεΐνη της οικογένειας της ουβικουΐνης (UniProt: B6KDY1) του πρωτόζωου *Toxoplasma gondii*. Η εκτιμώμενη *in silico* συγγένεια για το αλληλόμορφο HLA-A*02 είναι 283.7 nM. Υπάρχει επίσης κρυσταλλική δομή για το σύμπλοκο HLA-A*02 με το πεπτίδιο FVLELEPEWTVK (κωδικός PDB: 5DDH). Το πεπτίδιο FLNKDLEVDGHFVTM αποτελεί αντιγονικό επίτοπο προερχόμενο από τη Ras-σχετιζόμενη πρωτεΐνη Rab-9A (UniProt: P51151) του ανθρώπου. Υπάρχει κρυσταλλική δομή για το σύμπλοκο HLA-A*02 με το πεπτίδιο FLNKDLEVDGHFVTM (κωδικός PDB: 4U6Y). Επίσης, επιλέχθηκε και το πεπτίδιο GLIEKNIEL για το σχηματισμό συμπλόκου αναφοράς, λόγω βέλτιστου μήκους και υψηλής συγγένειας. Το πεπτίδιο GLIEKNIEL αποτελεί αντιγονικό επίτοπο (κωδικός IEDB: 20914) προερχόμενο από τη DNA (κυτοσίνη-5)-μεθυλοτρανσφεράση 1 (UniProt: P26358) του ανθρώπου. Η εκτιμώμενη *in silico* συγγένεια για το αλληλόμορφο HLA-A*02 είναι 11.4 nM.

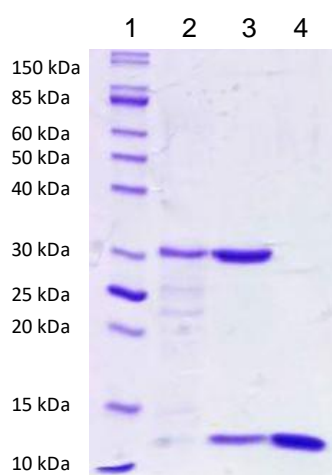
Τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα HLA A*02-GLIEKNIEL, HLA A*02-FVLELEPEWTVK και HLA A*02-FLNKDLEVDGHFVTM απομονώνονται με χρωματογραφία μοριακής διήθησης (εικόνες 1, 4 και 7 αντιστοίχως). Στη συνέχεια, τα κλάσματα έκλουσης που συλλέγονται αναλύονται με SDS-PAGE (εικόνες 2, 5 και 8). Έπειτα, τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα υποβάλλονται σε φασματομετρία μάζας MALDI-TOF ώστε να ανιχνευθεί το πεπτίδιο μέσω του μοριακού βάρους (εικόνες 3, 6 και 9). Η ακεραιότητα των ετεροδιμερών συμπλόκων ανιχνεύεται μέσω ηλεκτροφόρησης απουσία αναγωγικών και αποδιατακτικών παραγόντων (εικόνα 10). Παρατηρήθηκε ότι ο σχηματισμός συμπλόκου με τα εκτεταμένα πεπτίδια είναι εφικτός, ωστόσο η αποτελεσματικότητα αναδίπλωσης (mg αναδίπλωμένου συμπλόκου/mg βαριάς αλυσίδας HLA-A*02) είναι μειωμένη συγκριτικά με το βέλτιστο 9μερές πεπτίδιο.

3.1.1. Σχηματισμός συμπλόκου HLA-A*02 με το πεπτίδιο GLIEKNIEL



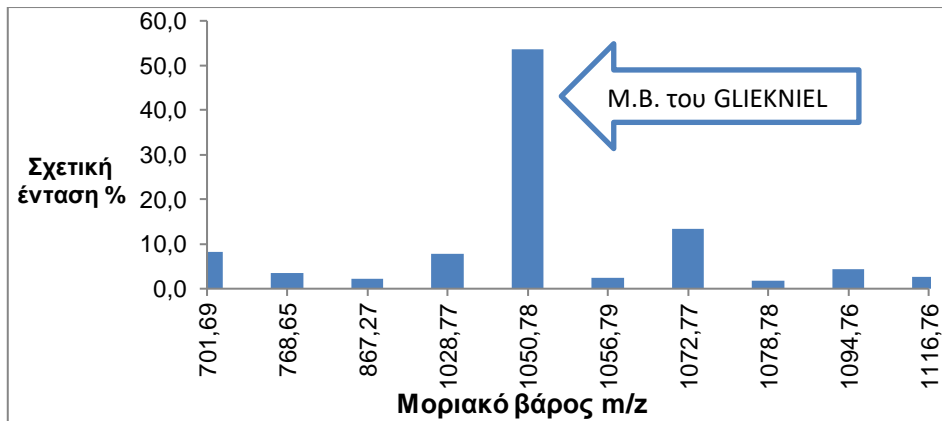
Εικόνα 1: Χρωματογράφημα μοριακής διήθησης του συμπλόκου HLA-A*02 με το πεπτίδιο GLIEKNIEL. Συλλέγονται ξεχωριστά τα κλάσματα έκλουσης 80-90 min, 122-138 min και 165-185 min.

- 1) 1^η κορυφή: Συσσωματώματα βαριάς αλυσίδας HLA-A*02
- 2) 2^η κορυφή: Αναδιπλωμένο σύμπλοκο HLA A*02-GLIEKNIEL (μοριακό βάρος 45 kDa)
- 3) 3^η κορυφή: β_2m σε περίσσεια που αναδιπλώνεται ξεχωριστά (μοριακό βάρος 12 kDa)



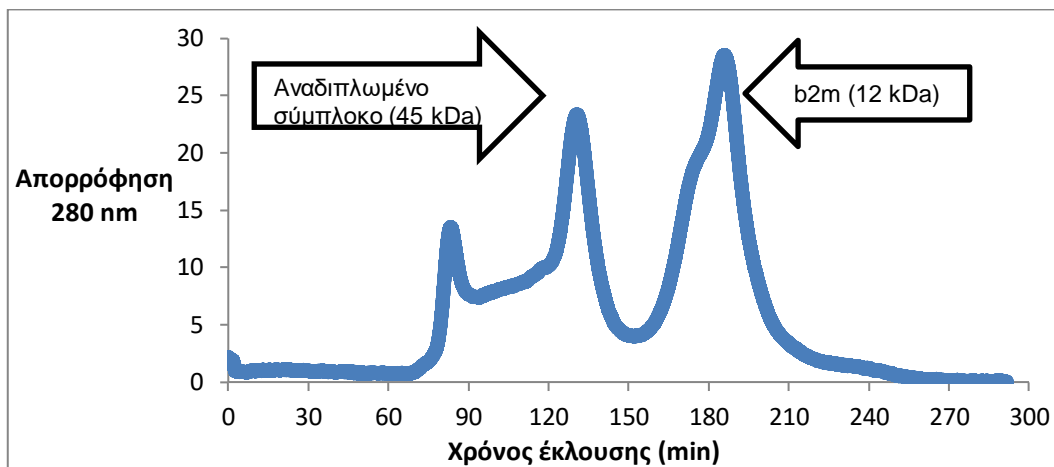
Εικόνα 2: SDS-PAGE των κλασμάτων έκλουσης που συλλέχθηκαν κατά τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης:

- 1) Δείκτης μοριακών βαρών p7704s
- 2) κλάσματα έκλουσης 80-90 min (συσσωματώματα βαριάς αλυσίδας), 32 kDa
- 3) κλάσματα έκλουσης 122-138 min: Αναδιπλωμένο σύμπλοκο HLA A*02-GLIEKNIEL (μοριακό βάρος 45 kDa)
- 4) κλάσματα έκλουσης 165-185 min (β_2m που βρίσκεται σε περίσσεια), 12 kDa



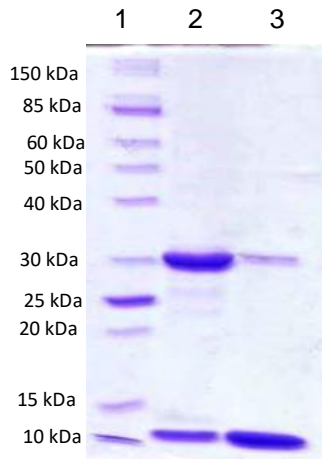
Εικόνα 3: Φασματομετρία μάζας MALDI-TOF των κλασμάτων έκλουσης 122-138 min. Το πεπτιδίο GLIEKNIEL έχει μοριακό βάρος 1028 Da. Η κορυφή των 1050 Da αντιστοιχεί στο πεπτιδίο, στο καρβοξυτελικό άκρο του οποίου έχει σχηματιστεί ιοντικός δεσμός με ένα ιόν Na⁺ από το ρυθμιστικό διάλυμα.

3.1.2. Σχηματισμός συμπλόκου HLA-A*02 με το πεπτιδίο FVLELEPEWTVK



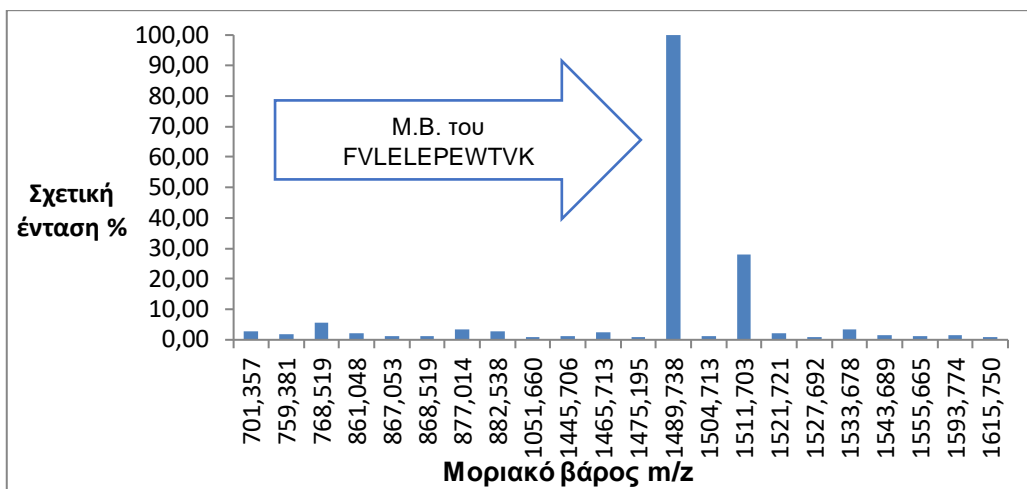
Εικόνα 4: Χρωματογράφημα μοριακής διήθησης του συμπλόκου HLA-A*02 με το πεπτιδίο FVLELEPEWTVK. Συλλέγονται ξεχωριστά τα κλάσματα έκλουσης 80-90 min, 122-138 min και 165-185 min.

- 1) 1η κορυφή: Συσσωματώματα βαριάς αλυσίδας HLA-A*02
- 2) 2η κορυφή: Αναδιπλωμένο σύμπλοκο HLA A*02-FVLELEPEWTVK (μοριακό βάρος 45 kDa)
- 3) 3η κορυφή: b2m σε περίσσεια που αναδιπλώνεται ξεχωριστά (μοριακό βάρος 12 kDa)



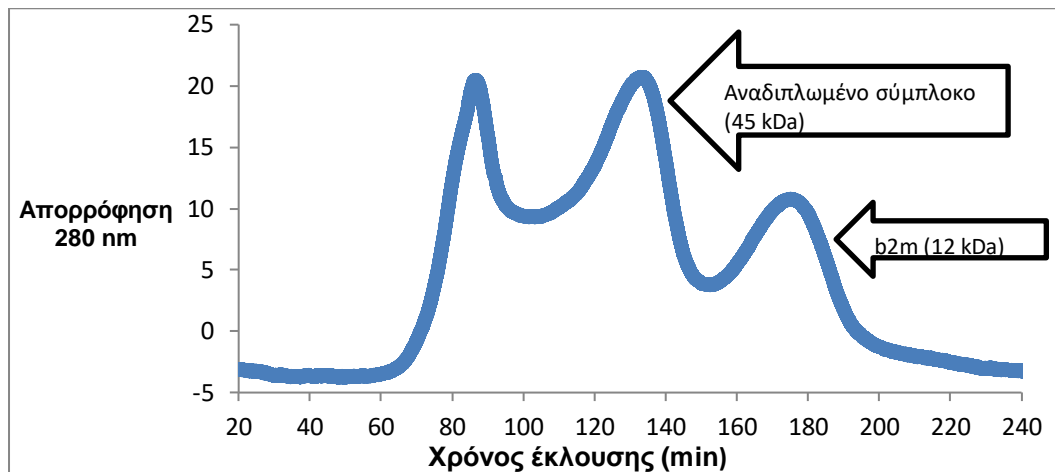
Εικόνα 5: SDS-PAGE των κλασμάτων έκλουσης που συλλέχθηκαν κατά τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης:

- 1) Δείκτης μοριακών βαρών p7704s
- 2) κλάσματα έκλουσης 122-138 min: Αναδιπλωμένο σύμπλοκο HLA A*02-FVLELEPEWTVK (μοριακό βάρος 45 kDa)
- 3) κλάσματα έκλουσης 165-185 min (β 2m που βρίσκεται σε περίσσεια), 12 kDa



Εικόνα 6: Φασματομετρία μάζας MALDI-TOF των κλασμάτων έκλουσης 122-138 min. Το πεπτίδιο FVLELEPEWTVK έχει μοριακό βάρος 1489 Da.

3.1.3. Σχηματισμός συμπλόκου HLA-A*02 με το πεπτίδιο FLNKDLEVDGHHFVTM

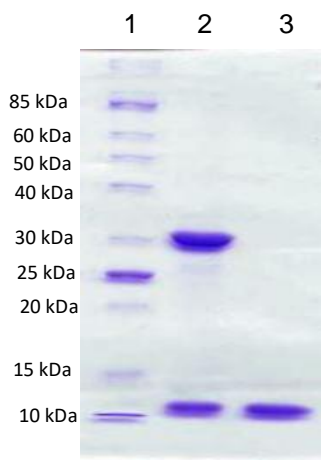


Εικόνα 7: Χρωματογράφημα μοριακής διήθησης του συμπλόκου HLA-A*02 με το πεπτίδιο FLNKDLEVDGHFVTM. Συλλέγονται ξεχωριστά τα κλάσματα έκλουσης 122-138 min και 165-185 min και αναλύονται σε SDS-PAGE.

1η κορυφή: Συσσωματώματα βαριάς αλυσίδας HLA-A*02

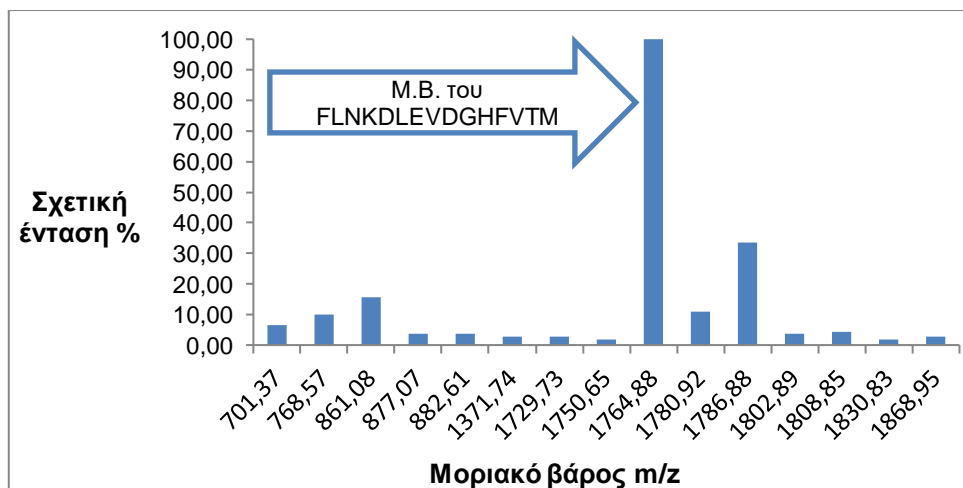
2η κορυφή: Αναδιπλωμένο σύμπλοκο HLA A*02-FLNKDLEVDGHFVTM (μοριακό βάρος 45 kDa)

3η κορυφή: b_{2m} σε περίσσεια που αναδιπλώνεται ξεχωριστά (μοριακό βάρος 12 kDa)

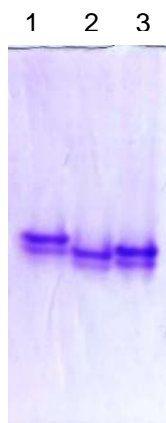


Εικόνα 8: SDS-PAGE των κλασμάτων έκλουσης που συλλέχθηκαν κατά τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης:

- 1) Δείκτης μοριακών βαρών p7704s
- 2) κλάσματα έκλουσης 122-138 min: Αναδιπλωμένο σύμπλοκο HLA A*02- FLNKDLEVDGHFVTM (μοριακό βάρος 45 kDa)
- 3) κλάσματα έκλουσης 165-185 min: (b_{2m} που βρίσκεται σε περίσσεια), 12 kDa



Εικόνα 9: Φασματομετρία μάζας MALDI-TOF των κλασμάτων έκλουσης 122-138 min. Το πεπτίδιο FLNKDLEVDGHFVTM έχει μοριακό βάρος 1765 Da.



Εικόνα 10: Μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση των συμπλόκων HLA-A*02 με τα 3 διαφορετικά πεπτίδια. Η διαφορά φορτίου μεταξύ των πεπτιδίων συντελεί στη διαφορετική ταχύτητα μετακίνησης των πρωτεϊνικών ζωνών προς το θετικό πόλο.

- 1) HLA A*02-GLIEKNIEL
- 2) HLA A*02-FVLELEPEWTVK
- 3) HLA A*02-FLNKDLEVDGHFVTM

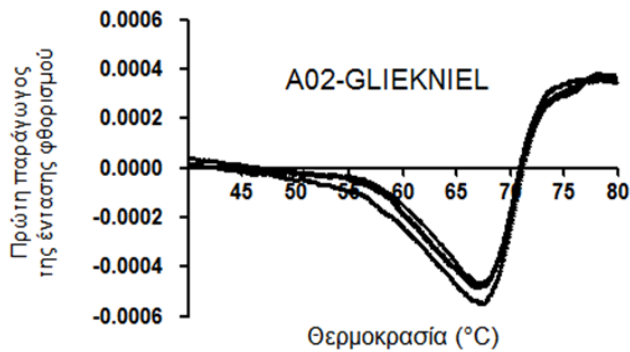
3.2. Βιοφυσικός προσδιορισμός της θερμοδυναμικής και κινητικής σταθερότητας των συμπλόκων HLA-A*02 με τα πεπτίδια GLIEKNIEL, FVLELEPEWTVK και FLNKDLEVDGHFVTM

Πραγματοποιήθηκε βιοφυσικός προσδιορισμός της θερμοδυναμικής σταθερότητας των συμπλόκων HLA A*02-GLIEKNIEL, HLA A*02-FVLELEPEWTVK και HLA A*02-FLNKDLEVDGHFVTM μέσω θερμικής μετουσίωσης παρουσία της υδρόφοβης χρωστικής Sypro Orange (εικόνες 11, 12 και 13 αντιστοίχως), ώστε να προσδιοριστεί η θερμοκρασία αποδιάταξης (Temperature melting, T_m). Παρατηρήθηκε ότι η T_m του συμπλόκου HLA A*02-GLIEKNIEL είναι πολύ υψηλότερη συγκριτικά με τα σύμπλοκα των εκτεταμένων αντιγονικών πεπτιδίων. Επίσης, προσδιορίστηκε η κινητική σταθερότητα των ανωτέρω συμπλόκων παρουσία της υδρόφοβης χρωστικής Sypro Orange διατηρώντας τη θερμοκρασία σταθερή στους 37 °C. Παρατηρήθηκε ότι τα σύμπλοκα HLA A*02-FVLELEPEWTVK και HLA A*02-FLNKDLEVDGHFVTM (εικόνες 15 και 16 αντιστοίχως) εμφανίζουν πολύ μειωμένο χρόνο ημιζωής συγκριτικά με το σύμπλοκο του βέλτιστου πεπτιδίου GLIEKNIEL (εικόνα 14). Ακόμη, η εκτίμηση του χρόνου ημιζωής του συμπλόκου HLA A*02-FVLELEPEWTVK πραγματοποιήθηκε με Native PAGE κατόπιν επώασης με το πεπτίδιο υψηλής συγγένειας GLIEKNIEL, καθώς τα 2 πεπτίδια φέρουν διαφορετικό φορτίο (εικόνα 17).

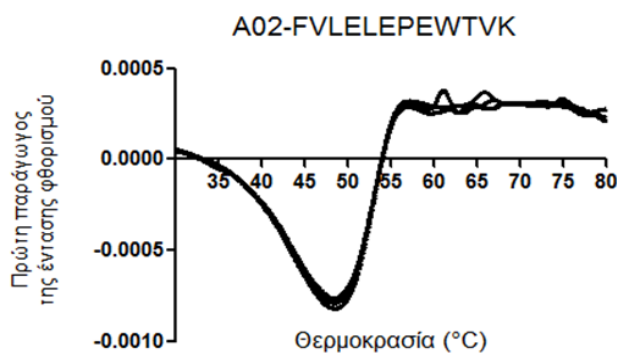
Συμπερασματικά, τα σύμπλοκα του αλληλομόρφου HLA-A*02 με τα εκτεταμένα αντιγονικά πεπτίδια είναι θερμοδυναμικά και κινητικά πολύ πιο ασταθή συγκριτικά με τα σύμπλοκα πεπτιδίων βέλτιστου μήκους 9 αμινοξέων. Η μείωση της θερμοδυναμικής και κινητικής σταθερότητας συμβαδίζει ακόμη με τη μείωση προβλεπόμενης *in silico* συγγένειας. Ωστόσο, τα σύμπλοκα είναι

επαρκώς σταθερά ώστε να πραγματοποιηθούν τα πειράματα ενζυμικού καταβολισμού των δεσμευμένων πεπτιδίων από την αμινοπεπτιδάση ERAP1.

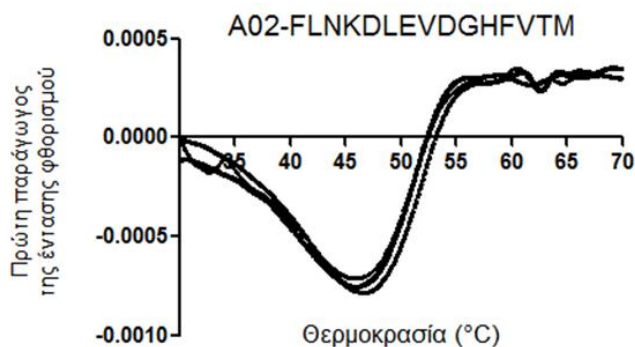
3.2.1. Προσδιορισμός της θερμοδυναμικής σταθερότητας μέσω θερμικής μετουσίωσης παρουσία της υδρόφοβης χρωστικής Sypro Orange



Εικόνα 11



Εικόνα 12

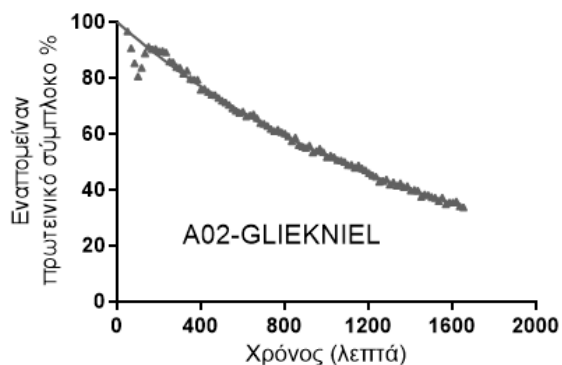


Εικόνα 13

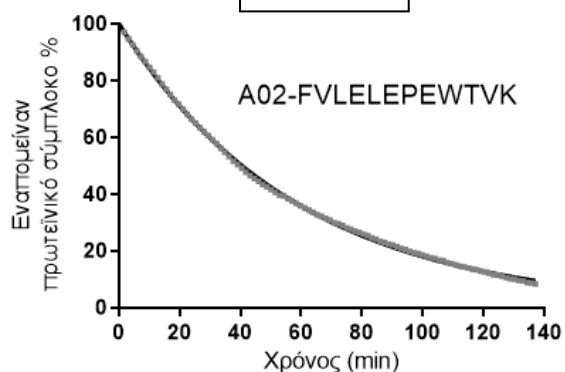
Εικόνες 11-13: Διαγράμματα πρώτης παραγώγου της έντασης του φθορισμού (άξονας y) σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία (άξονας x). Το χαμηλότερο σημείο στον άξονα y αντιστοιχεί στη θερμοκρασία αποδιάταξης (T_m) του πρωτεϊνικού συμπλόκου.

Σύμπλοκο HLA-A*02	T_m (°C)
A*02-GLIEKNIEL	67.5 ± 1.7
A*02-FVLELEPEWTVK	48.6 ± 0.1
A*02-FLNKDLEVDGHFVTM	46.2 ± 0.5

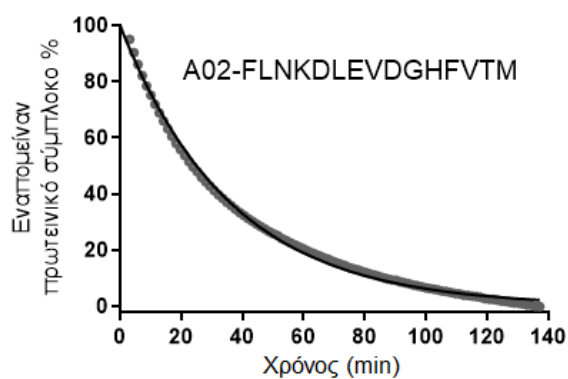
3.2.2. Προσδιορισμός της κινητικής σταθερότητας παρουσία της υδρόφοβης χρωστικής Sypro Orange



Εικόνα 14



Εικόνα 15

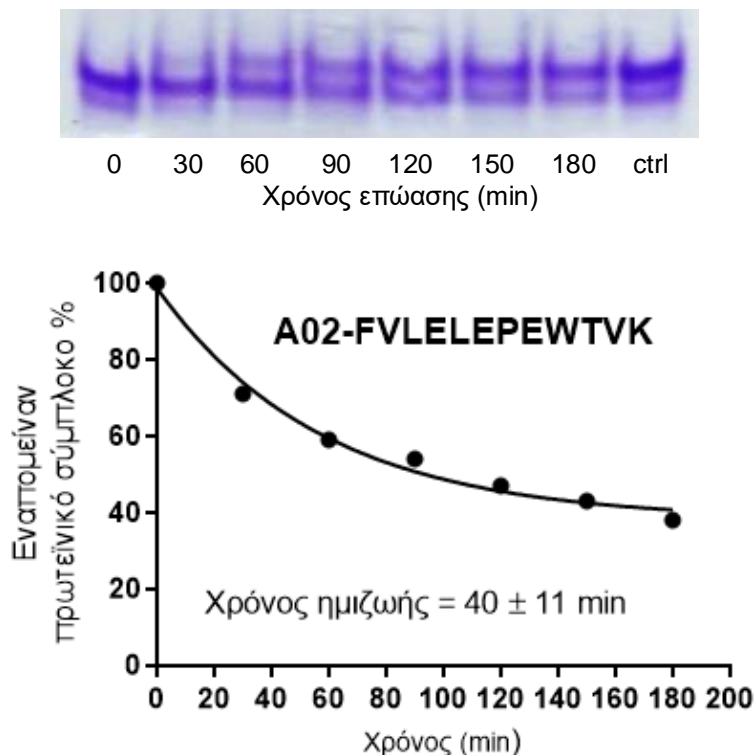


Εικόνα 16

Εικόνες 14-16: Διαγράμματα του ποσοστού % πρωτεΐνης που παραμένει σε σύμπλοκο με το πεππίδιο (άξονας y) σε συνάρτηση με το χρόνο (άξονας x). Η θερμοκρασία παραμένει σταθερή στους 37 °C. Η υδρόφοβη χρωστική ανταγωνίζεται το πεππίδιο για την πρόσδεση στην υδρόφοβη αύλακα της πρωτεΐνης αυξάνοντας το φθορισμό.

Σύμπλοκο HLA-A*02	Χρόνος ημιζωής (min)
A*02-GLIEKNIEL	1.013 ± 245
A*02-FVLELEPEWTVK	38.3 ± 1
A*02-FLNKDLEVDGHFVTM	26 ± 1.8

3.2.3. Προσδιορισμός χρόνου ημιζωής του συμπλόκου HLA A*02-FVLELEPEWTVK κατόπιν επώασης με το 9μερές πεπτιδίο υψηλής συγγένειας GLIEKNIEL

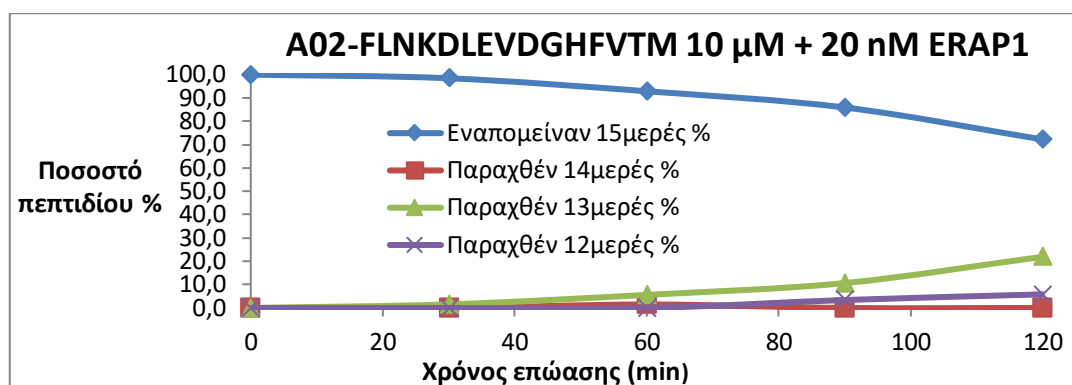


Εικόνα 17: Επώαση του πρωτεϊνικού συμπλόκου HLA A*02-FVLELEPEWTVK (10 μ M) με 100 μ M πεπτιδίου GLIEKNIEL στους 37 $^{\circ}$ C για 180 min. Το 9μερές πεπτιδίο υψηλής συγγένειας ανταγωνίζεται το 12μερές για την πρόσδεση στην αύλακα του MHC I. Κατόπιν τα δείγματα υποβάλλονται σε Native PAGE. Ο προσδιορισμός του χρόνου ημιζωής πραγματοποιείται με βάση την ένταση των πρωτεϊνικών ζωνών στην εφαρμογή ImageJ και κατόπιν την εξίσωση one-phase decay στο GraphPad Prism.

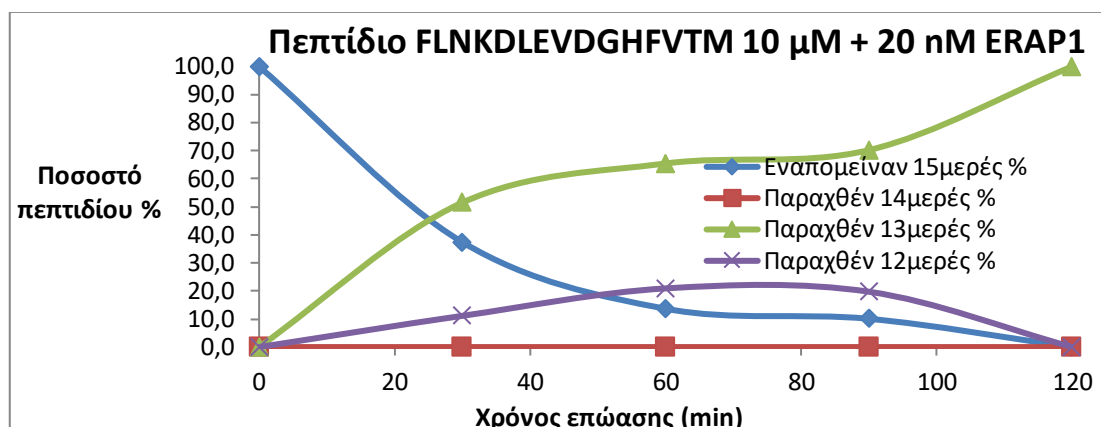
3.3. Παρακολούθηση του καταβολισμού των πεπτιδίων FVLELEPEWTVK και FLNKDLEVDGHFVTM από την αμινοπεπτιδάση ERAP1 κατόπιν επώασης στους 37 $^{\circ}$ C. Τα πεπτιδία ανιχνεύονται με φασματομετρία μάζας MALDI-TOF

Μελετάται ο καταβολισμός σε 2 περιπτώσεις: όταν τα πεπτιδία βρίσκονται ελεύθερα στο διάλυμα και όταν βρίσκονται σε σύμπλοκο με το HLA-A*02. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με 20 και 100 nM ενζύμου. Παρατηρήθηκε ότι το 15μερές πεπτιδίο FLNKDLEVDGHFVTM αποτελεί πολύ καλό υπόστρωμα

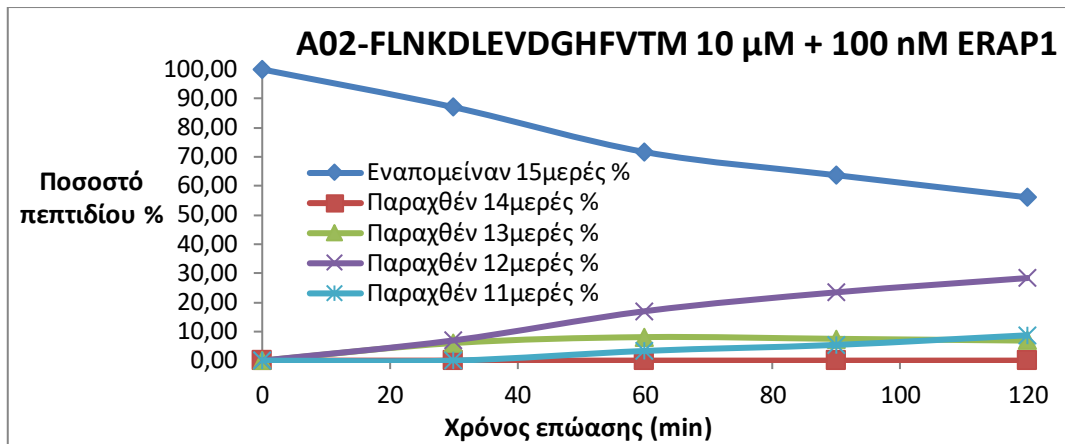
για την ERAP1 καθώς καταβολίζεται γρήγορα και αποτελεσματικά όταν βρίσκεται ελεύθερο στο διάλυμα (εικόνες 19 και 21). Αντίθετα, η αντίδραση εξελίσσεται πολύ πιο αργά όταν το πεπτίδιο βρίσκεται δεσμευμένο στο σύμπλοκο HLA-A*02, με το χρόνο ημιζωής του πεπτιδίου να αυξάνεται κατά 15 φορές και με τις 2 συγκεντρώσεις ενζύμου (εικόνες 18 και 20). Το πεπτίδιο FVLELEPEWTVK αποτελεί ένα μέτριο υπόστρωμα για το ένζυμο ERAP1 όταν βρίσκεται στο διάλυμα, καθώς μετά το πέρας της αντίδρασης παραμένει στο διάλυμα το 50 % του υποστρώματος (εικόνα 23). Ωστόσο, το πεπτίδιο παρέμεινε σχεδόν ανεπηρέαστο από τη δράση του ενζύμου όταν βρισκόταν δεσμευμένο στο MHC I (εικόνα 22). Συμπερασματικά, τα 2 συγκεκριμένα αντιγονικά πεπτίδια προστατεύονται σε σημαντικό βαθμό από τη δράση της ERAP1 όταν βρίσκονται σε σύμπλοκο με το αλληλόμορφο HLA-A*02.



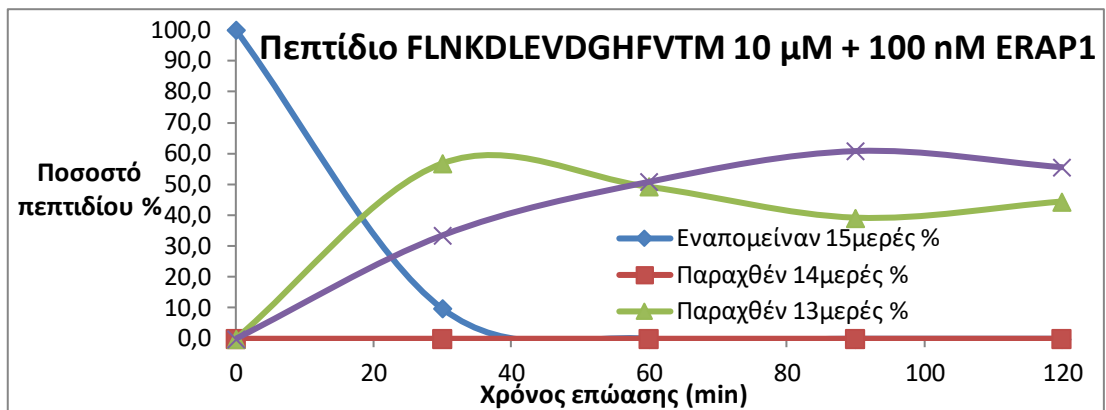
Εικόνα 18: Το πεπτίδιο FLNKDLEVDGHFVTM σε σύμπλοκο με το HLA-A*02 εμφανίζει χρόνο ημιζωής 338 ± 98 min, κατόπιν επώασης με 20 nM ERAP1. $R^2 = 0.84$



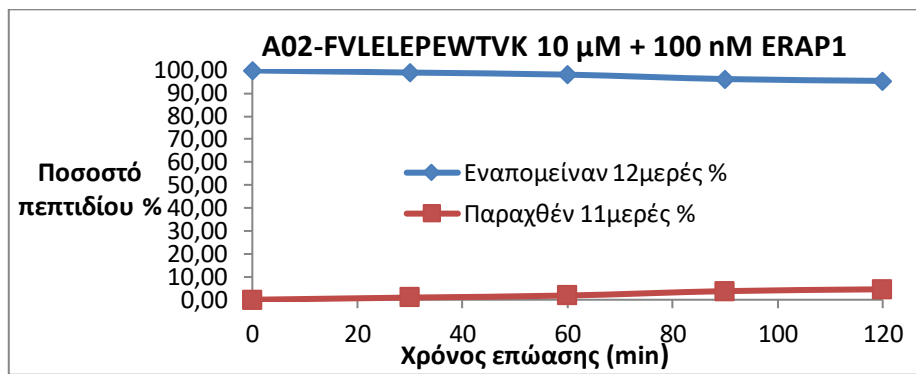
Εικόνα 19: Αντιθέτως παρατηρείται ότι το πεπτίδιο FLNKDLEVDGHFVTM όταν βρίσκεται ελεύθερο στο διάλυμα καταβολίζεται πολύ πιο γρήγορα από την αμινοπεπτιδάση ERAP1, εμφανίζοντας χρόνο ημιζωής 22 ± 1.5 min. $R^2 = 0.99$



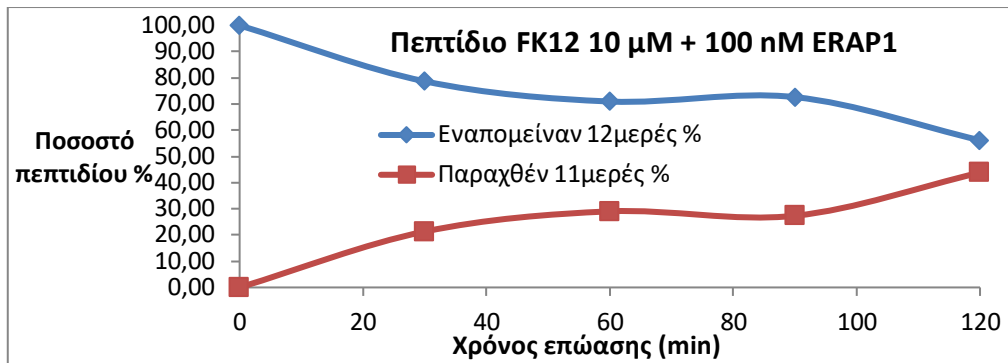
Εικόνα 20: Αυξάνοντας τη συγκέντρωση του ενζύμου ERAP1 σε 100 nM, ο χρόνος ημιζωής του πεπτιδίου FLNKDLEVDGHFVTM σε σύμπλοκο με το HLA-A*02 μειώνεται σε 139 ± 6 min. $R^2 = 0.99$



Εικόνα 21: Παράλληλα, παρατηρείται ότι ο χρόνος ημιζωής του πεπτιδίου FLNKDLEVDGHFVTM όταν βρίσκεται ελεύθερο στο διάλυμα μειώνεται σε 9 ± 0.3 min, κατόπιν επώασης με 100 nM ERAP1. $R^2 = 0.99$



Εικόνα 22: Παρατηρείται ότι δεν είναι εφικτός ο καταβολισμός του πεπτιδίου FVLELEPEWTVK από την αμινοπεπτιδάση ERAP1, όταν βρίσκεται σε σύμπλοκο με το HLA-A*02.



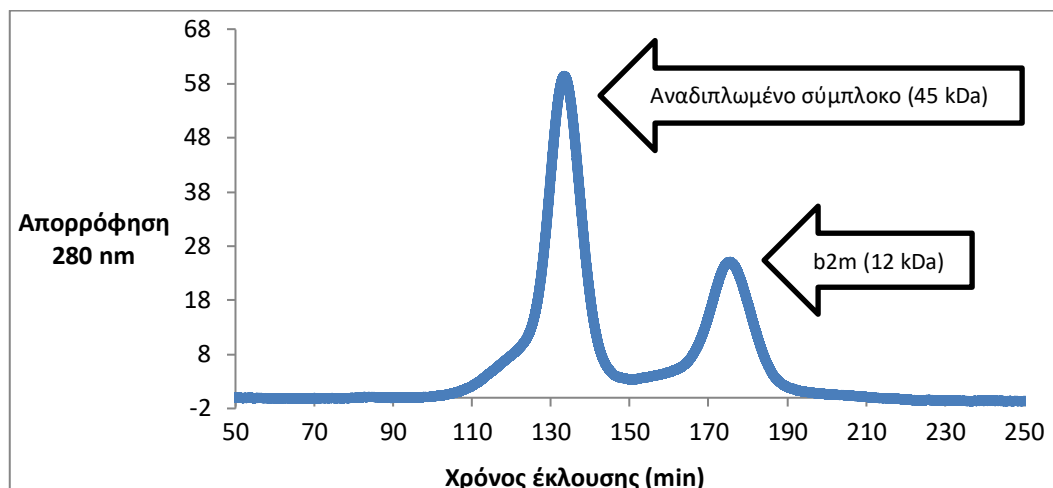
Εικόνα 23: Αντιθέτως, όταν το πεπτίδιο βρίσκεται ελεύθερο στο διάλυμα δύναται να καταβολιστεί από την αμινοπεπτιδάση ERAP1, εμφανίζοντας χρόνο ημιζωής 146 ± 27 min. $R^2 = 0.86$

3.4. Σχηματισμός *in vitro* των πρωτεϊνικών συμπλόκων HLA-B*08 με τα πεπτίδια ELRSRYWAI, ALRSRYWAI, LSILLKHKKAAL και ARAALRSRYWAI

Το πεπτίδιο LSILLKHKKAAL αποτελεί αμινοτελικά εκτεταμένο πρόδρομο του αντιγονικού επιτόπου LLKHKKAAL, όπως προκύπτει από την αλληλουχία της πρωτεΐνης και η εκτιμώμενη *in silico* συγγένεια για το HLA-B*08 είναι 72.5 nM. Το πεπτίδιο LLKHKKAAL αποτελεί αντιγονικό επίτοπο (κωδικός IEDB: 214321) προερχόμενο από την πρωτεϊνική υπομονάδα p105 του πυρηνικού παράγοντα NF-kappa-B (UniProt: P19838) του ανθρώπου. Το 12μερές πεπτίδιο ARAALRSRYWAI επιλέχθηκε με βάση την υφιστάμενη βιβλιογραφία. Δεν αποτελεί πρόδρομο αντιγονικό επίτοπο και η εκτιμώμενη *in silico* συγγένεια για το HLA-B*08 είναι 203 nM. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν τα βέλτιστα 9μερή πεπτίδια ALRSRYWAI και ELRSRYWAI για το σχηματισμό συμπλόκων αναφοράς. Η εκτιμώμενη *in silico* συγγένεια του πεπτιδίου ALRSRYWAI για το HLA-B*08 είναι 8.6 nM. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε επίλυση της κρυσταλλικής δομής του αλληλομόρφου HLA-B*08 με το αντιγονικό πεπτίδιο ELRSRYWAI (Παράρτημα - Σελίδα 153). Τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα HLA B*08-ALRSRYWAI, HLA B*08-ELRSRYWAI, HLA B*08-ARAALRSRYWAI και HLA B*08-LSILLKHKKAAL απομονώνονται με χρωματογραφία μοριακής διήθησης (εικόνες 24, 26, 29 και 32 αντιστοίχως). Στη συνέχεια, τα κλάσματα έκλυσης που συλλέγονται αναλύονται με SDS-PAGE (εικόνες 25, 27, 30 και 33). Έπειτα, τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα υποβάλλονται σε φασματομετρία μάζας MALDI-TOF

ώστε να ανιχνευθεί το πεπτίδιο μέσω του μοριακού βάρους (εικόνες 28, 31 και 34). Η ακεραιότητα των ετεροδιμερών συμπλόκων ανιχνεύεται μέσω ηλεκτροφόρησης απουσία αναγωγικών και αποδιατακτικών παραγόντων (εικόνα 35).

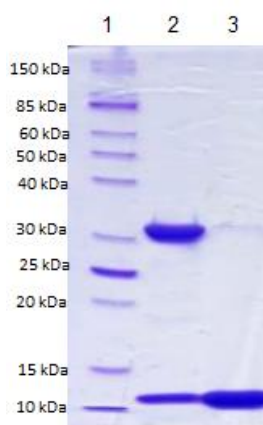
3.4.1. Σχηματισμός συμπλόκου HLA-B*08 με το πεπτίδιο ALRSRYWAI



Εικόνα 24: Χρωματογράφημα μοριακής διήθησης του συμπλόκου HLA-B*08 με το πεπτίδιο ALRSRYWAI. Συλλέγονται ξεχωριστά τα κλάσματα έκλουσης 122-138 min και 165-185 min.

1η κορυφή: Αναδιπλωμένο σύμπλοκο HLA B*08-ALRSRYWAI (45 kDa)

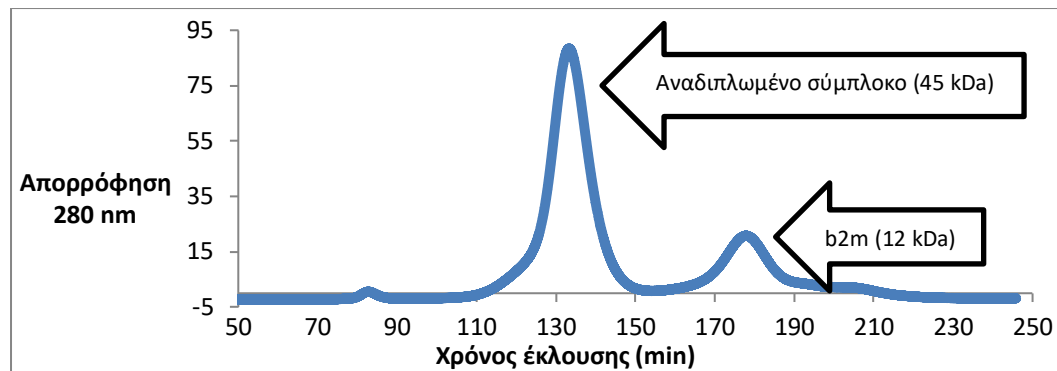
2η κορυφή: b_{2m} σε περίσσεια που αναδιπλώνεται ξεχωριστά (12 kDa)



Εικόνα 25: SDS-PAGE των κλασμάτων έκλουσης που συλλέχθηκαν κατά τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης.

- 1) Δείκτης μοριακών βαρών p7704s
- 2) κλάσματα έκλουσης 122-138 min: Αναδιπλωμένο σύμπλοκο HLA B*08-ARAALRSRYWAI (45 kDa)
- 3) κλάσματα έκλουσης 165-185 min (b_{2m} σε περίσσεια που αναδιπλώνεται ξεχωριστά, 12 kDa)

3.4.2. Σχηματισμός συμπλόκου HLA-B*08 με το πεπτίδιο ELRSRYWAI



Εικόνα 26: Χρωματογράφημα μοριακής διήθησης του συμπλόκου HLA B*08-ELRSRYWAI. Συλλέγονται ξεχωριστά τα κλάσματα έκλουσης 122-138 min και 165-185 min

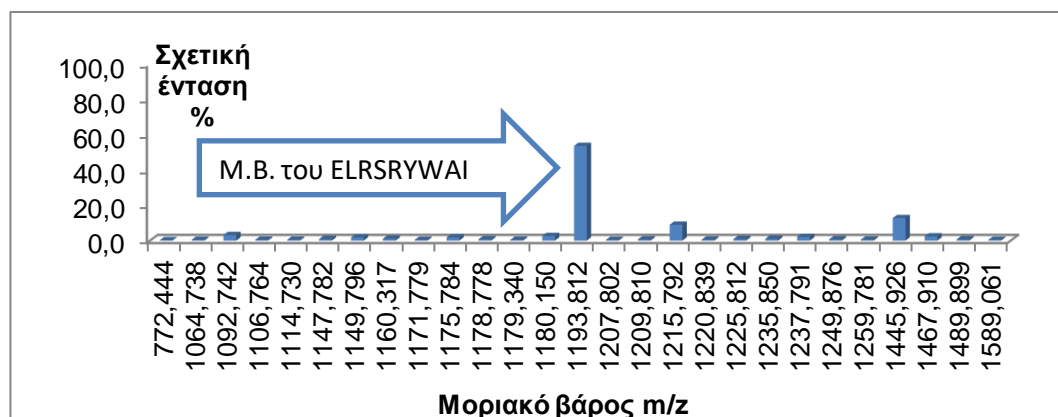
1η κορυφή: Αναδιπλωμένο σύμπλοκο HLA B*08-ELRSRYWAI (45 kDa)

2η κορυφή: b2m σε περίσσεια που αναδιπλώνεται ξεχωριστά (12 kDa)



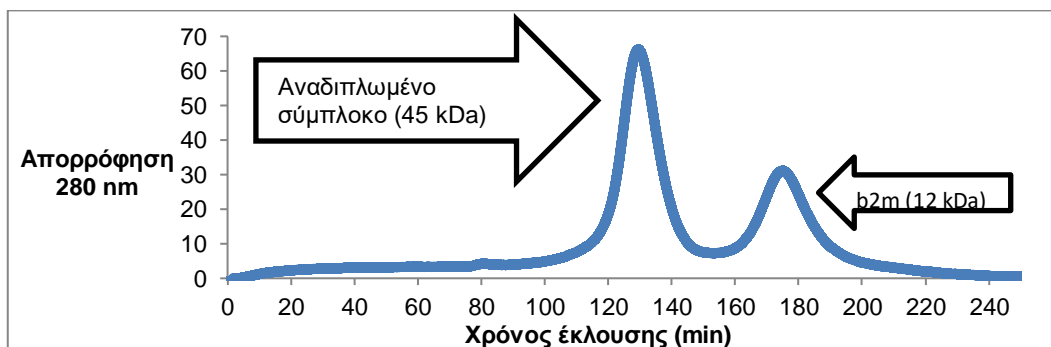
Εικόνα 27: SDS-PAGE των κλασμάτων έκλουσης που συλλέχθηκαν κατά τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης.

- 1) Δείκτης μοριακών βαρών p7704s
- 2) κλάσματα έκλουσης 122-138 min: Αναδιπλωμένο σύμπλοκο HLA B*08-ELRSRYWAI (45 kDa)
- 3) κλάσματα έκλουσης 165-185 min (b2m σε περίσσεια που αναδιπλώνεται ξεχωριστά, 12 kDa)



Εικόνα 28: Φασματομετρία μάζας MALDI-TOF των κλασμάτων έκλουσης 122-138 min. Το πεπτίδιο ELRSRYWAI έχει μοριακό βάρος 1193 Da.

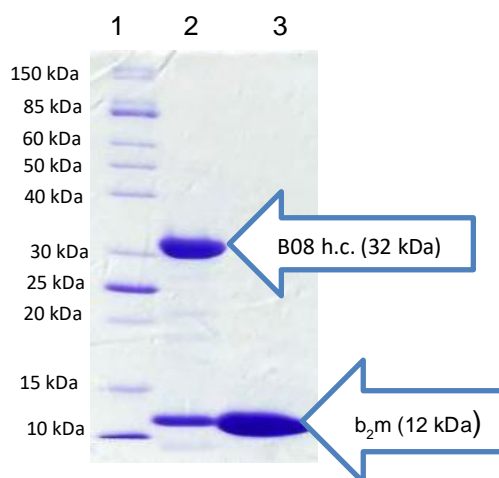
3.4.3. Σχηματισμός συμπλόκου HLA-B*08 με το πεπτίδιο ARAALRSRYWAI



Εικόνα 29: Χρωματογράφημα μοριακής διήθησης του συμπλόκου HLA-B*08 με το πεπτίδιο ARAALRSRYWAI. Συλλέγονται ξεχωριστά τα κλάσματα έκλουσης 122-138 min και 165-185 min.

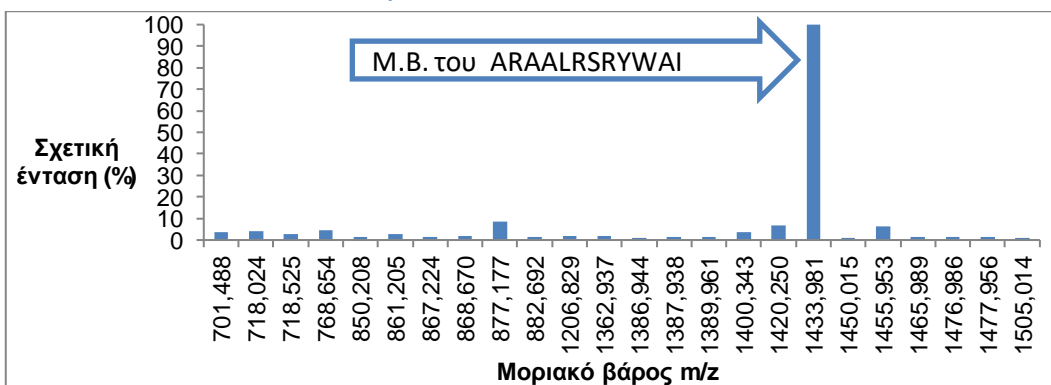
1η κορυφή: Αναδιπλωμένο σύμπλοκο HLA B*08-ARAALRSRYWAI (45 kDa)

2η κορυφή: β_2m σε περίσσεια που αναδιπλώνεται ξεχωριστά (12 kDa)



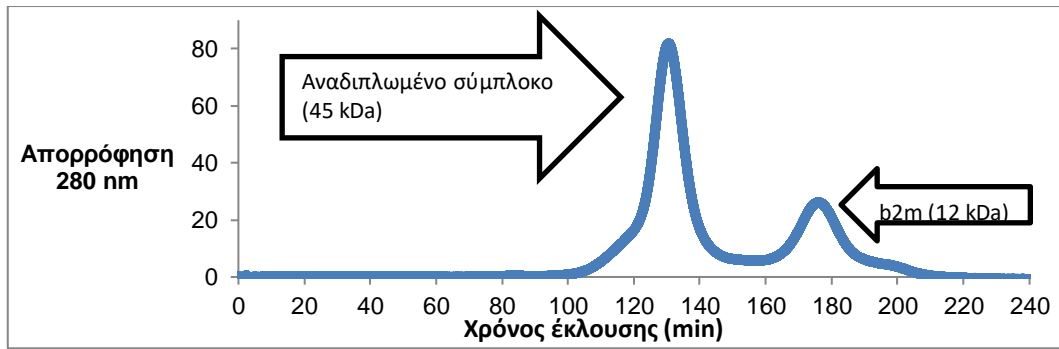
Εικόνα 30: SDS-PAGE των κλασμάτων έκλουσης που συλλέχθηκαν κατά τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης.

- 4) Δείκτης μοριακών βαρών p7704s
- 5) κλάσματα έκλουσης 122-138 min: Αναδιπλωμένο σύμπλοκο HLA B*08-ARAALRSRYWAI (45 kDa)
- 6) κλάσματα έκλουσης 165-185 min (β_2m σε περίσσεια που αναδιπλώνεται ξεχωριστά, 12 kDa)



Εικόνα 31: Φασματομετρία μάζας MALDI-TOF των κλασμάτων έκλουσης 122-138 min. Το πεπτίδιο ARAALRSRYWAI έχει μοριακό βάρος 1433 Da.

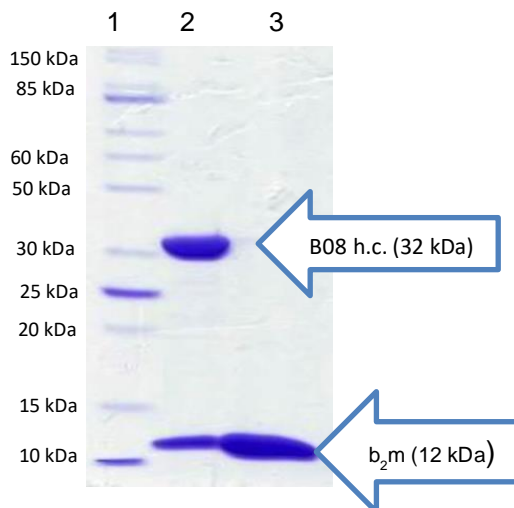
3.4.4. Σχηματισμός συμπλόκου HLA-B*08 με το πεπτίδιο LSILLKHKKAAL



Εικόνα 32: Χρωματογράφημα μοριακής διήθησης του συμπλόκου HLA-B*08 με το πεπτίδιο LSILLKHKKAAL. Συλλέγονται ξεχωριστά τα κλάσματα έκλουσης 122-138 min και 165-185 min.

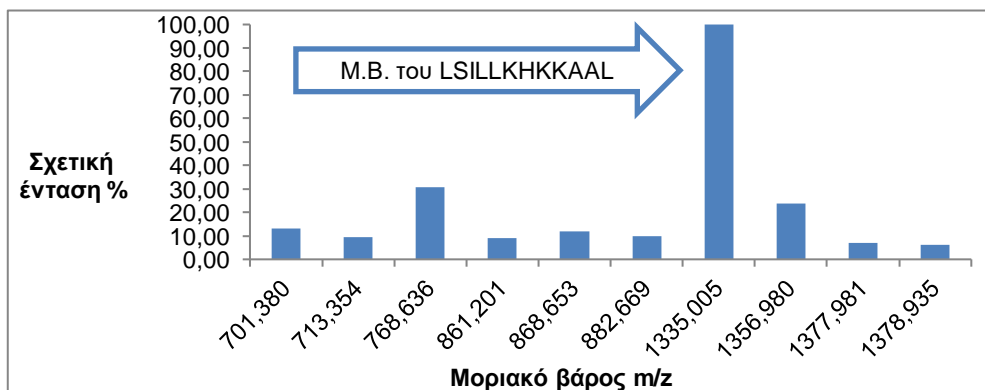
1η κορυφή: Αναδιπλωμένο σύμπλοκο HLA B*08-LSILLKHKKAAL (45 kDa)

2η κορυφή: b₂m σε περίσσεια που αναδιπλώνεται ξεχωριστά (12 kDa)



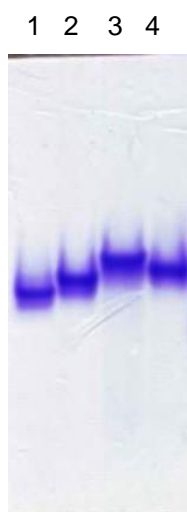
Εικόνα 33: SDS-PAGE των κλασμάτων έκλουσης που συλλέχθηκαν κατά τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης.

- 1) Δείκτης μοριακών βαρών p7704s
- 2) κλάσματα έκλουσης 122-138 min: Αναδιπλωμένο σύμπλοκο HLA B*08-LSILLKHKKAAL (45 kDa)
- 3) κλάσματα έκλουσης 165-185 min (b₂m σε περίσσεια που αναδιπλώνεται ξεχωριστά, 12 kDa)



Εικόνα 34: Φασματομετρία μάζας MALDI-TOF των κλασμάτων έκλουσης 122-138 min. Το πεπτίδιο LSILLKHKKAAL έχει μοριακό βάρος 1335 Da.

3.4.5. Ηλεκτροφόρηση απουσία αναγωγικών και αποδιατακτικών παραγόντων των 4 διαφορετικών συμπλόκων HLA-B*08



Εικόνα 35: Ηλεκτροφόρηση απουσία αναγωγικών και αποδιατακτικών παραγόντων (Native PAGE) των συμπλόκων HLA-B*08 με τα 4 πεπτίδια. Η διαφορά φορτίου μεταξύ των πεπτιδίων συντελεί στη διαφορετική ταχύτητα μετακίνησης των πρωτεϊνικών ζωνών προς το θετικό πόλο.

- 1) HLA B*08-ELRSRYWAI
- 2) HLA B*08-ALRSRYWAI
- 3) HLA B*08-ARAALRSRYWAI
- 4) HLA B*08-LSILLKHKKAAL

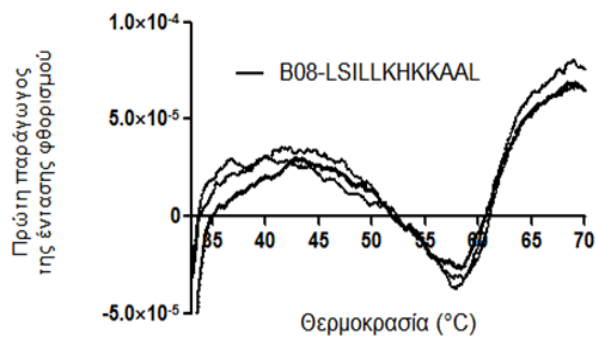
3.5. Βιοφυσικός προσδιορισμός της θερμοδυναμικής και κινητικής σταθερότητας των συμπλόκων HLA-B*08 με τα πεπτίδια ALRSRYWAI, ELRSRYWAI, ARAALRSRYWAI και LSILLKHKKAAL

Ακολούθησε βιοφυσικός προσδιορισμός της θερμοδυναμικής και κινητικής σταθερότητας ώστε να διαπιστωθεί αν τα σύμπλοκα με τα εκτεταμένα πεπτίδια είναι πιο ασταθή, όπως στην περίπτωση του αλληλομόρφου HLA-A*02. Ο προσδιορισμός της θερμοκρασίας αποδιάταξης (T_m) πραγματοποιήθηκε μέσω θερμικής μετουσίωσης παρουσία της υδρόφοβης χρωστικής Sypro Orange (εικόνες 36-39) και με κυκλικό διχρωισμό (εικόνες 40-43). Πράγματι, διαπιστώθηκε ότι τα σύμπλοκα B*08-ELRSRYWAI (εικόνες 38 και 41) και B*08-ALRSRYWAI (εικόνες 39 και 40) ήταν πιο σταθερά θερμοδυναμικά συγκριτικά με τα σύμπλοκα των εκτεταμένων πεπτιδίων. Ωστόσο, είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι η θερμοδυναμική σταθερότητα του συμπλόκου B*08-ARAALRSRYWAI (εικόνες 37 και 42) ήταν και στις 2 μεθόδους προσδιορισμού κατά μέσο όρο 10 βαθμούς χαμηλότερη συγκριτικά με το σύμπλοκο B*08-LSILLKHKKAAL (εικόνες 36 και 43). Συμπερασματικά, τα εκτεταμένα πεπτίδια σχηματίζουν θερμοδυναμικώς ασταθέστερα σύμπλοκα και με το αλληλόμορφο HLA-B*08. Ωστόσο, παρατηρείται σημαντική διαφορά μεταξύ των συμπλόκων με τα εκτεταμένα πεπτίδια, το οποίο υποδηλώνει ότι η αλληλουχία και τα κατάλοιπα αγκυροβόλησης διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο

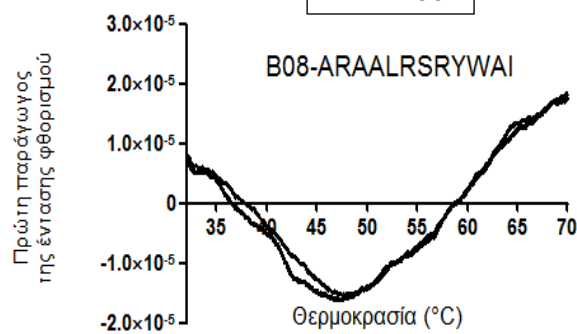
στην ισχύ των αλληλεπιδράσεων εντός της αύλακας πρόσδεσης και τη θερμοδυναμική σταθερότητα, ανεξάρτητα από το μήκος του πεπτιδίου.

Ακόμη, προσδιορίστηκε η κινητική σταθερότητα των συμπλόκων B*08-ELRSRYWAI, B*08-ALRSRYWAI, B*08-LSILLKHKKAAL και B*08-ARAALRSRYWAI παρουσία της υδρόφοβης χρωστικής Sypro Orange διατηρώντας τη θερμοκρασία σταθερή στους 37 °C (εικόνες 44, 45, 46 και 47 αντιστοίχως). Παρατηρήθηκε ότι το σύμπλοκο B*08-ARAALRSRYWAI εμφανίζει πολύ χαμηλό χρόνο ημιζωής σε αντίθεση με το σύμπλοκο B*08-LSILLKHKKAAL. Επιπλέον, ο προσδιορισμός του χρόνου ημιζωής των συμπλόκων με τα 12μερή πεπτίδια πραγματοποιήθηκε με Native PAGE κατόπιν επώασης με το πεπτίδιο υψηλής συγγένειας ALRSRYWAI, το οποίο φέρει διαφορετικό φορτίο από τα πεπτίδια ARAALRSRYWAI και LSILLKHKKAAL επιτρέποντας το διαχωρισμό των συμπλόκων. Σε χρονικό διάστημα 8 ωρών, το σύμπλοκο B*08-LSILLKHKKAAL παρέμεινε ανεπηρέαστο (εικόνα 49). Αντίθετα, το πεπτίδιο ALRSRYWAI προσδέθηκε στην αύλακα της πρωτεΐνης, με το σύμπλοκο B*08-ARAALRSRYWAI να εμφανίζει χρόνο ημιζωής 18 λεπτών (εικόνα 48). Συμπερασματικά, η θερμοδυναμική και κινητική σταθερότητα των συμπλόκων MHC I με τα εκτεταμένα πεπτίδια μειώνεται συγκριτικά με τα σύμπλοκα βέλτιστων πεπτιδίων. Ωστόσο τα επίπεδα της μείωσης διαφέρουν αισθητά, γεγονός που οφείλεται στην αλληλουχία των πεπτιδίων. Τέλος, η μείωση της προβλεπόμενης *in silico* συγγένειας συμπίπτει με τη μείωση της θερμοδυναμικής και κινητικής σταθερότητας.

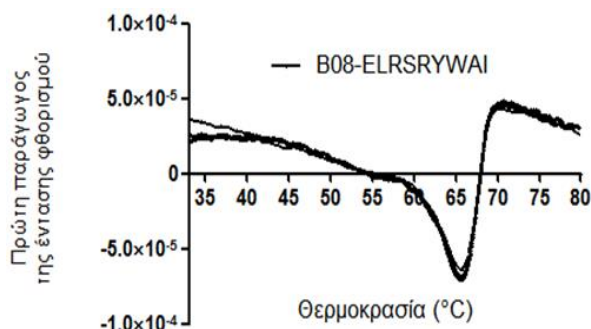
3.5.1. Προσδιορισμός της θερμοδυναμικής σταθερότητας μέσω θερμικής μετουσίωσης παρουσία της υδρόφοβης χρωστικής Sygro Orange



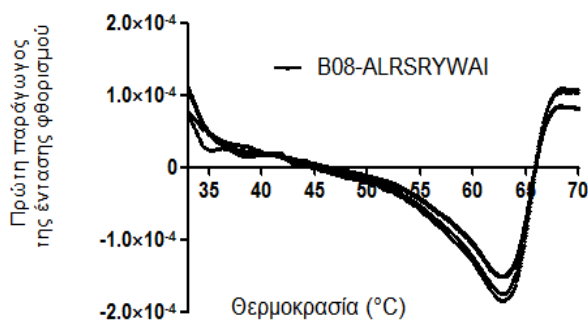
Εικόνα 36



Εικόνα 37



Εικόνα 38

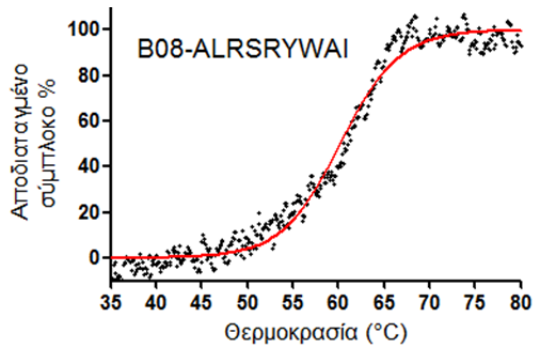


Εικόνα 39

Εικόνες 36-39: Διαγράμματα πρώτης παραγώγου της έντασης του φθορισμού (άξονας y) σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία (άξονας x). Το χαμηλότερο σημείο στον άξονα y αντιστοιχεί στη θερμοκρασία αποδιάταξης (T_m) του πρωτεϊνικού συμπλόκου.

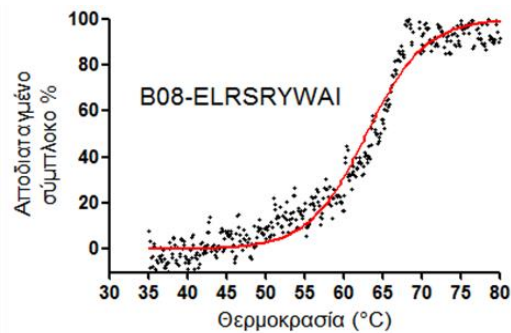
Σύμπλοκο HLA-B*08	T_m (°C)
B*08-ARAALRSRYWAI	47.8 ± 2.3
B*08-LSILLKHKKAAL	57.7 ± 0.4
B*08-ELRSRYWAI	66.1 ± 0.3
B*08-ALRSRYWAI	63.6 ± 0.8

3.5.2. Προσδιορισμός της θερμοδυναμικής σταθερότητας μέσω κυκλικού διχρωισμού



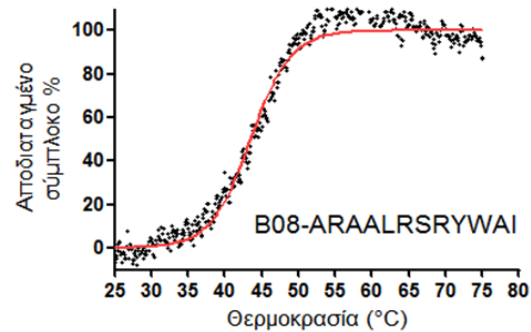
Εικόνα 40

Σύμπλοκο HLA-B*08	Tm (°C)
B*08-ARAALRSRYWAI	43.5 ± 0.2
B*08-LSILLKHKKAAL	53.2 ± 0.2
B*08-ELRSRYWAI	62.9 ± 0.2
B*08-ALRSRYWAI	60.2 ± 0.2

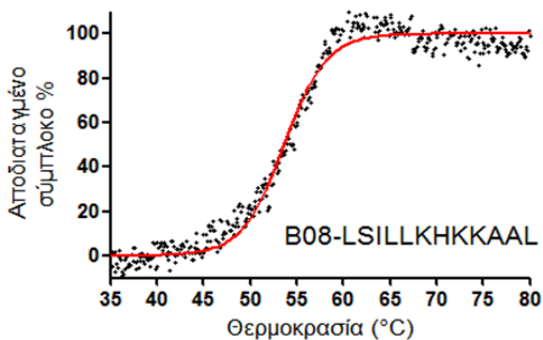


Εικόνα 41

Εικόνες 40-43: Διάγραμμα του αποδιαταγμένου συμπλόκου (άξονας y) σε συνάρτηση με την αύξηση της θερμοκρασίας (άξονας x), όπως προκύπτει από το σήμα κυκλικού διχρωισμού στα 230 nm. Η θερμοκρασία αποδιάταξης (Tm) αντιστοιχεί στο 50 % της αποδιαταγμένης πρωτεΐνης.

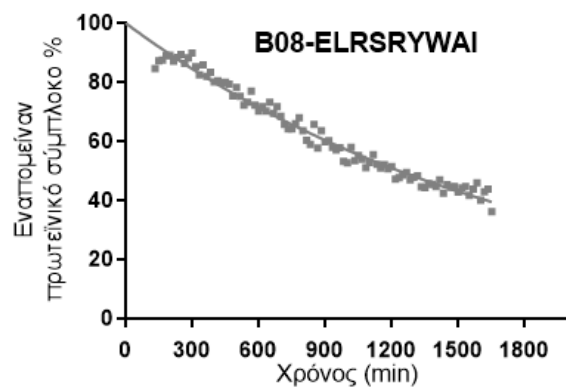


Εικόνα 42

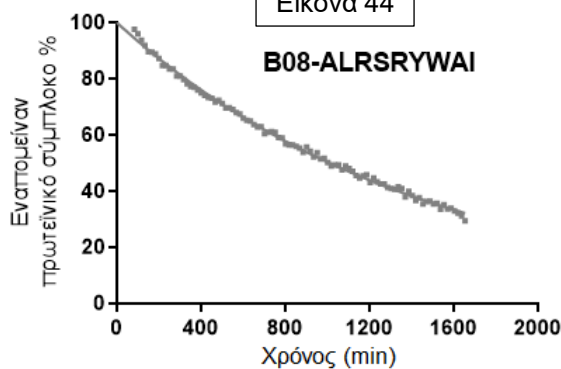


Εικόνα 43

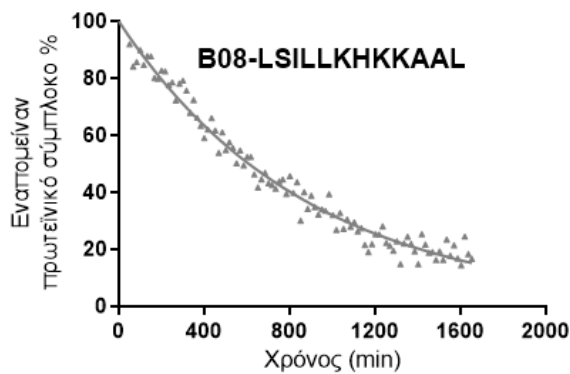
3.5.3. Προσδιορισμός κινητικής σταθερότητας παρουσία της υδρόφοβης χρωστικής Sypro Orange



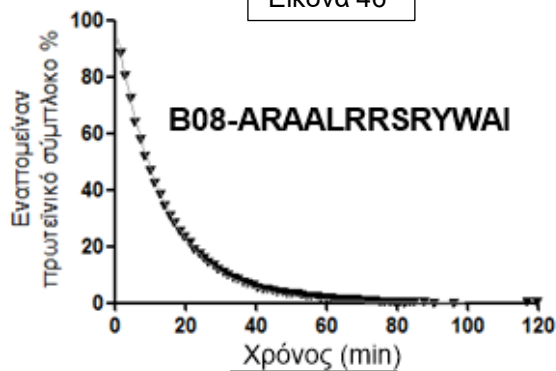
Εικόνα 44



Εικόνα 45



Εικόνα 46

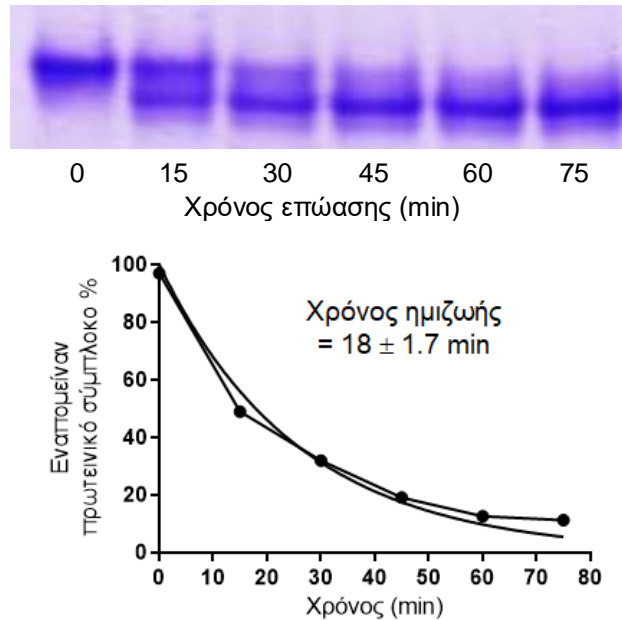


Εικόνα 47

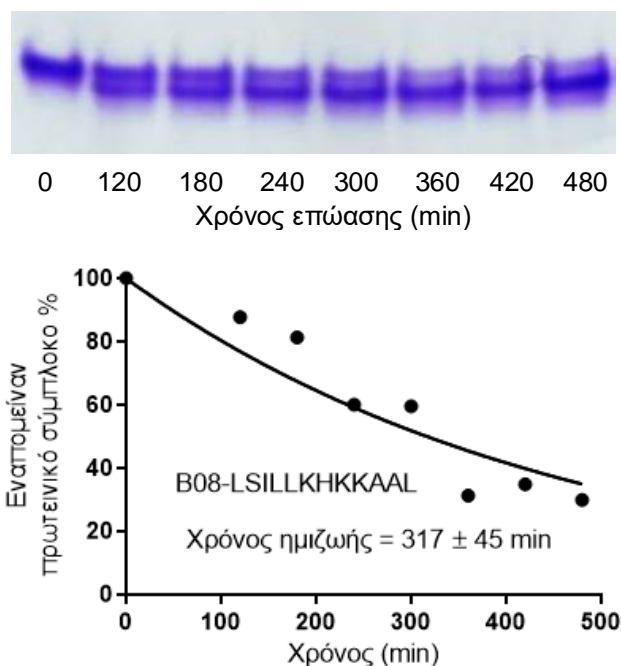
Εικόνες 44-47: Διαγράμματα του ποσοστού % πρωτεΐνης που παραμένει σε σύμπλοκο με το πεπτιδίο (άξονας y) σε συνάρτηση με το χρόνο (άξονας x). Η θερμοκρασία παραμένει σταθερή στους 37 °C. Η υδρόφοβη χρωστική ανταγωνίζεται το πεπτιδίο για την πρόσδεση στην υδρόφοβη αύλακα της πρωτεΐνης αυξάνοντας το φθορισμό.

Σύμπλοκο HLA-B*08	Χρόνος ημιζωής (min)
B*08-ARAALRSRYWAI	9 ± 1
B*08-LSILLKHKKAAL	362 ± 91
B*08-ELRSRYWAI	891 ± 91
B*08-ALRSRYWAI	1056 ± 152

3.5.4. Προσδιορισμός χρόνου ημιζωής των συμπλόκων HLA B*08-LSILLKHKKAAL και HLA B*08-ARAALRSRYWAI κατόπιν επώασης με το 9μερές πεπτίδιο υψηλής συγγένειας ALRSRYWAI



Εικόνα 48: Επώαση του πρωτεϊνικού συμπλόκου HLA B*08-ARAALRSRYWAI (10 μ M) με 100 μ M πεπτιδίου ALRSRYWAI στους 37 $^{\circ}$ C για 75 min. Το 9μερές πεπτίδιο υψηλής συγγένειας ανταγωνίζεται το 12μερές για την πρόσδεση στην αύλακα του MHC I. Κατόπιν τα δείγματα υποβάλλονται σε Native PAGE. Ο προσδιορισμός του χρόνου ημιζωής πραγματοποιείται με βάση την ένταση των πρωτεϊνικών ζωνών στην εφαρμογή ImageJ και κατόπιν την εξίσωση one-phase decay στο GraphPad Prism.

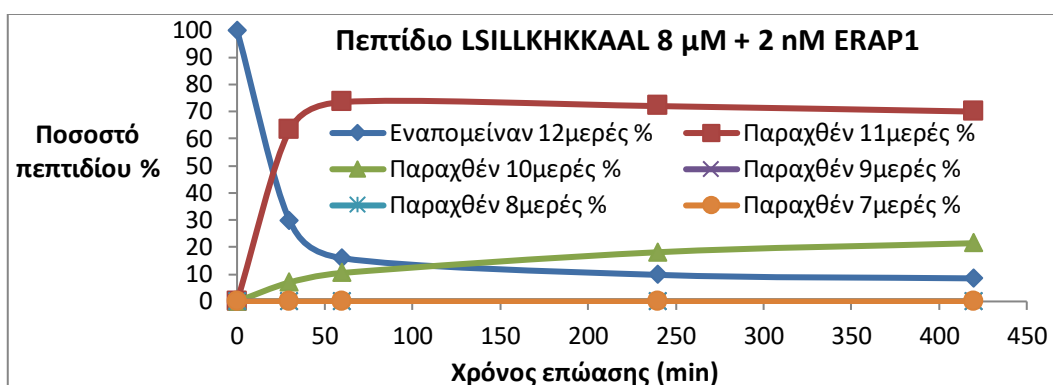


Εικόνα 49: Επώαση του πρωτεϊνικού συμπλόκου HLA B*08-LSILLKHKKAAL (10 μ M) με 100 μ M πεπτιδίου ALRSRYWAI στους 37 $^{\circ}$ C για 480 min. Το 9μερές πεπτίδιο υψηλής συγγένειας ανταγωνίζεται το 12μερές για την πρόσδεση στην αύλακα του MHC I. Κατόπιν τα δείγματα υποβάλλονται σε Native PAGE. Ο προσδιορισμός του χρόνου ημιζωής πραγματοποιείται με βάση την ένταση των πρωτεϊνικών ζωνών στην εφαρμογή ImageJ και κατόπιν την εξίσωση one-phase decay στο GraphPad Prism.

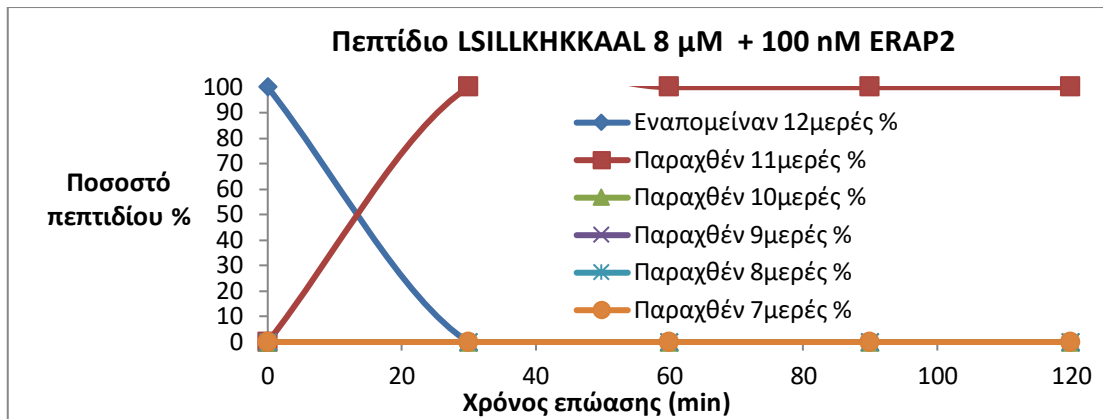
3.6. Παρακολούθηση του καταβολισμού των 12μερών πεπτιδίων LSILLKHKKAAL και ARAALRSRYWAI από τις αμινοπεπτιδάσες ERAP1, ERAP2 και LAP, κατόπιν επώασης στους 37 $^{\circ}$ C. Τα πεπτίδια ανιχνεύονται με φασματομετρία μάζας MALDI-TOF.

Μελετάται ο καταβολισμός σε 2 περιπτώσεις: όταν τα πεπτίδια βρίσκονται ελεύθερα στο διάλυμα και όταν βρίσκονται σε σύμπλοκο με το HLA-B*08. Αρχικά, διαπιστώθηκε ότι το πεπτίδιο LSILLKHKKAAL αποτελούσε ένα πολύ καλό υπόστρωμα τόσο για την ERAP1 (εικόνα 50) όσο και για την ERAP2 (εικόνα 51) ενώ παραγόταν κυρίως το 11μερές πεπτίδιο, όμως όχι ο αντιγονικός επίτοπος LLKHKKAAL. Ωστόσο, το πεπτίδιο παρέμεινε απρόσβλητο από τη δράση των αμινοπεπτιδασών όταν βρισκόταν δεσμευμένο στο HLA-B*08, ακόμη και σε συγκέντρωση 100 nM ERAP2 (εικόνες 52 και 53).

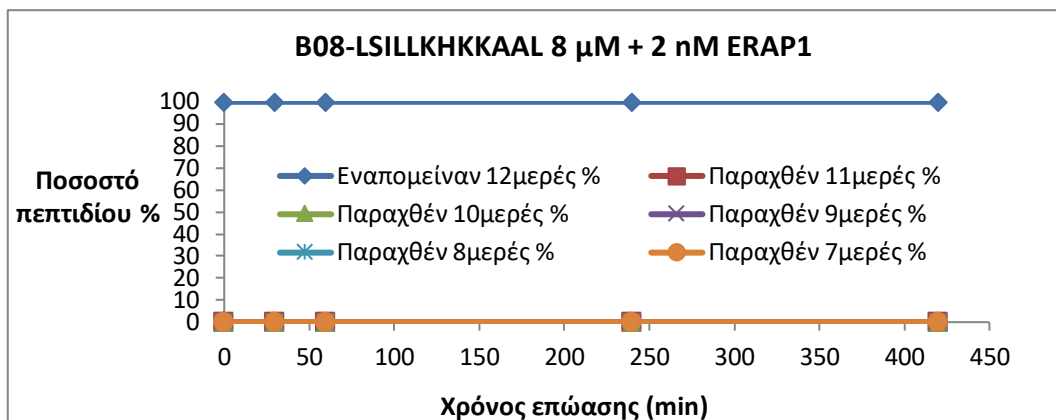
3.6.1. Επώαση του πεπτιδίου LSILLKHKKAAL και του συμπλόκου HLA B08-LSILLKHKKAAL με τις αμινοπεπτιδάσες ERAP1 και ERAP2



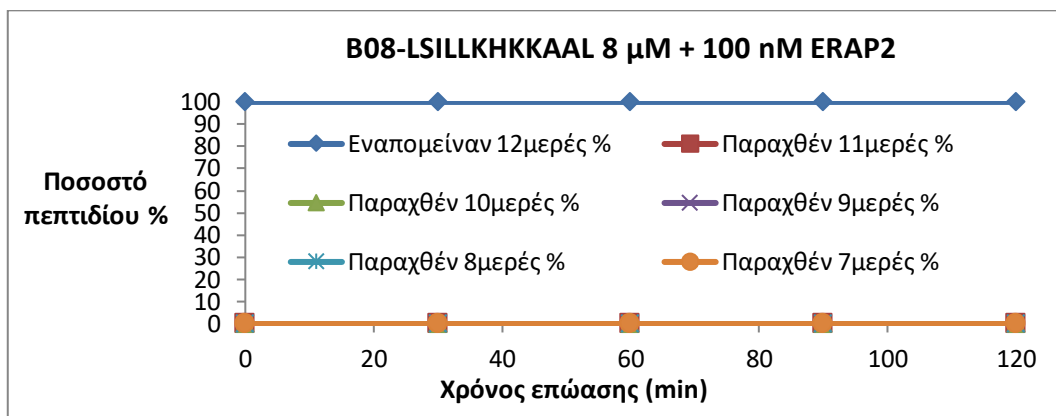
Εικόνα 50: Το πεπτίδιο LSILLKHKKAAL, όταν βρίσκεται ελεύθερο στο διάλυμα, καταβόλιζεται με χρόνο ημιζωής 19 ± 5.3 min από την αμινοπεπτιδάση ERAP1. $R^2 = 0.966$



Εικόνα 51: Το πεπτιδίο LSILLKHKKAAL, όταν βρίσκεται ελεύθερο στο διάλυμα, καταβολίζεται με χρόνο ημιζωής ≤ 15 min από την αμινοπεπτιδάση ERAP2. $R^2 = 0.966$



Εικόνα 52: Παρατηρείται ότι δεν είναι εφικτός ο καταβολισμός του πεπτιδίου LSILLKHKKAAL από την αμινοπεπτιδάση ERAP1, όταν βρίσκεται σε σύμπλοκο με το HLA-B*08.

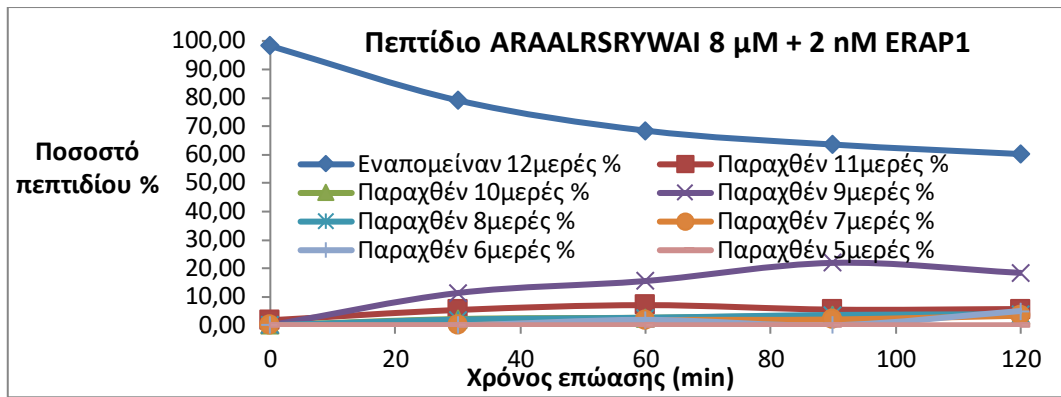


Εικόνα 53: Παρατηρείται ότι δεν είναι εφικτός ο καταβολισμός του πεπτιδίου LSILLKHKKAAL από την αμινοπεπτιδάση ERAP2, όταν βρίσκεται σε σύμπλοκο με το HLA-B*08.

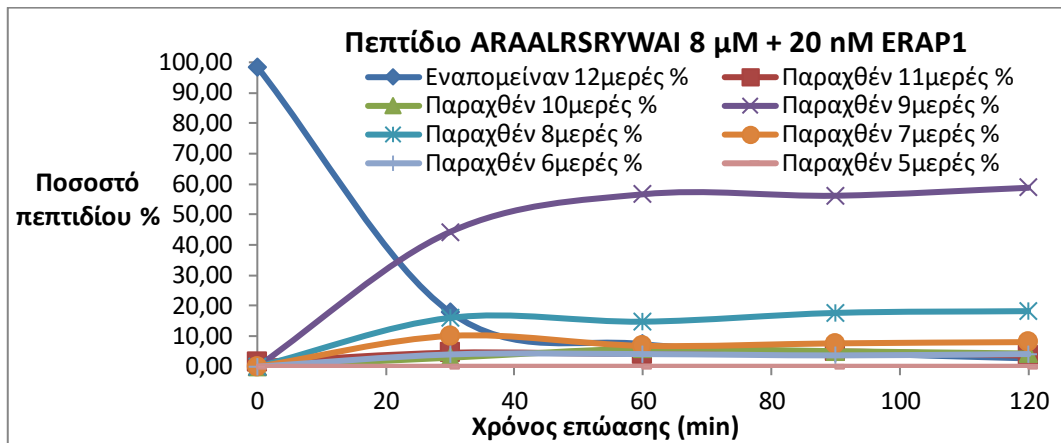
3.6.2. Επώαση του πεπτιδίου ARAALRSRYWAI και του συμπλόκου HLA B*08-ARAALRSRYWAI με την αμινοπεπτιδάση ERAP1

Στη συνέχεια μελετήθηκε ο καταβολισμός του πεπτιδίου ARAALRSRYWAI όταν βρισκόταν ελεύθερο στο διάλυμα, χρησιμοποιώντας αυξανόμενες συγκεντρώσεις ενζύμου (2, 20 και 100 nM-εικόνες 54, 55 και 56 αντιστοίχως), ώστε να διαπιστωθεί αν ακολουθείται το ίδιο μοτίβο με το πεπτίδιο LSILLKHKKAAL. Σε όλες τις συγκεντρώσεις ενζύμου, το πεπτίδιο ARAALRSRYWAI αποδείχθηκε πολύ καλό υπόστρωμα και ο χρόνος ημιζωής του πεπτιδίου ήταν ανάλογος της συγκέντρωσης του ενζύμου. Ο 9μερής επίτοπος ALRSRYWAI παρήχθη σε όλες τις περιπτώσεις, όμως σε μεγαλύτερο ποσοστό όταν χρησιμοποιήθηκαν 20 nM ενζύμου. Επίσης, παρατηρήθηκε συσσώρευση και μικρότερων πεπτιδίων στην περίπτωση των 100 nM ERAP1. Το ανωτέρω αποτέλεσμα συνάδει με τη διττή φύση της ERAP1, η οποία μπορεί να λειτουργήσει τόσο ως παραγωγός αλλά και ως καταστροφέας αντιγονικών επιτόπων.

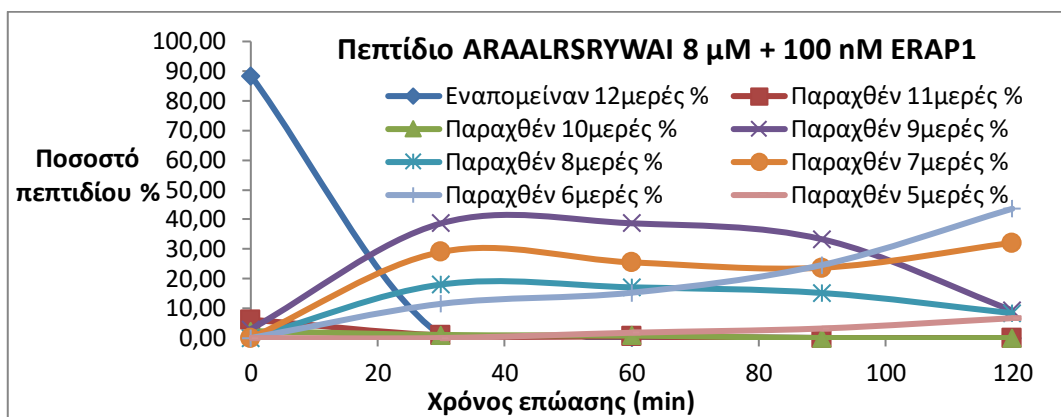
Έπειτα οι ενζυμικές αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με το πεπτίδιο ARAALRSRYWAI δεσμευμένο στο σύμπλοκο HLA-B*08 χρησιμοποιώντας τις ίδιες συγκεντρώσεις ERAP1 (2, 20 και 100 nM-εικόνες 57, 58 και 59 αντιστοίχως). Αξιοσημείωτο ήταν το γεγονός ότι παρατηρήθηκε καταβολισμός του πεπτιδίου, όταν χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα το θερμοδυναμικά και κινητικά ασταθές σύμπλοκο B*08-ARAALRSRYWAI. Ο χρόνος ημιζωής του πεπτιδίου στο σύμπλοκο μειώνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης του ενζύμου από τα 2 στα 20 nM, ωστόσο παραμένει σταθερός μεταξύ 20 και 100 nM ERAP1, σε αντίθεση με το πεπτίδιο που βρίσκεται ελεύθερο στο διάλυμα. Επίσης, παρατηρήθηκε παραγωγή σε ποσοστό 40 % του 9μερούς επιτόπου ALRSRYWAI όταν χρησιμοποιήθηκαν 2 και 20 nM ERAP1, ωστόσο υπήρξε συσσώρευση κυρίως του 5μερούς RYWAI και απουσία του 9μερούς επιτόπου όταν χρησιμοποιήθηκαν 100 nM ERAP1. Συμπερασματικά, ο καταβολισμός του πεπτιδίου στο σύμπλοκο είναι εφικτός, αλλά πραγματοποιείται με πιο αργούς ρυθμούς συγκριτικά με την αντίδραση στο διάλυμα. Επίσης, η παραγωγή του επιτόπου ALRSRYWAI πραγματοποιείται αποτελεσματικότερα στο διάλυμα.



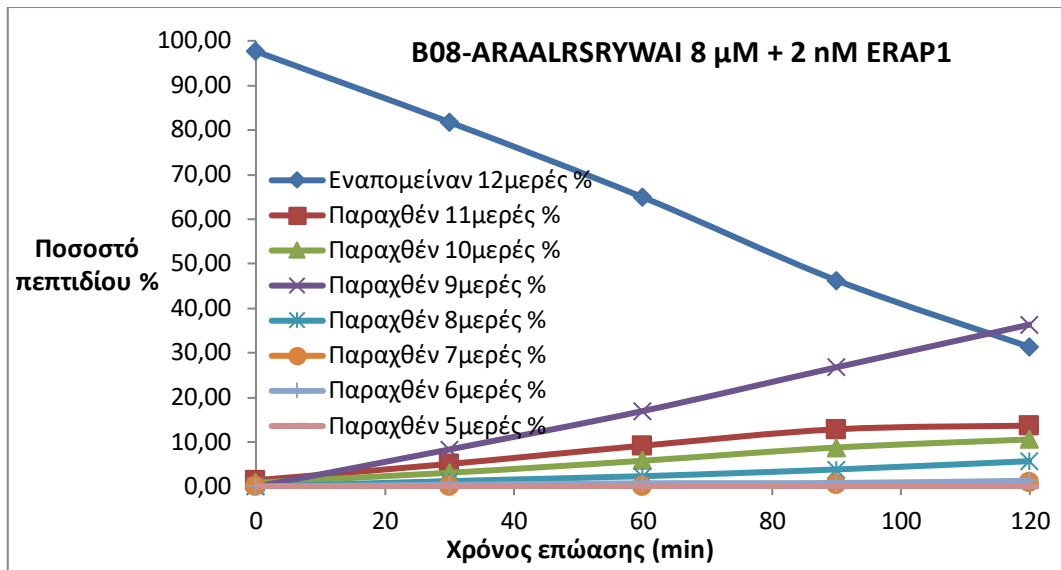
Εικόνα 54: Το ελεύθερο στο διάλυμα πεπτίδιο ARAALRSRYWAI καταβολίζεται με χρόνο ημιζωής 136 ± 21 min, χρησιμοποιώντας 2 nM ERAP1. $R^2 = 0.88$



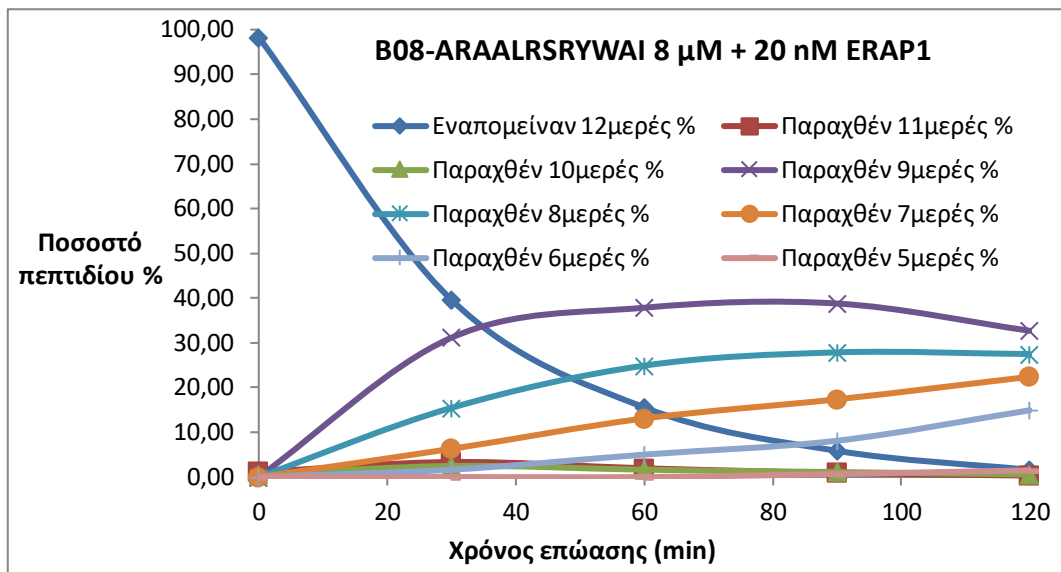
Εικόνα 55: Ο χρόνος ημιζωής του πεπτιδίου ARAALRSRYWAI που βρίσκεται ελεύθερο στο διάλυμα μειώνεται στα 13 ± 1.7 αυξάνοντας τη συγκέντρωση ERAP1 στα 20 nM. $R^2 = 0.994$



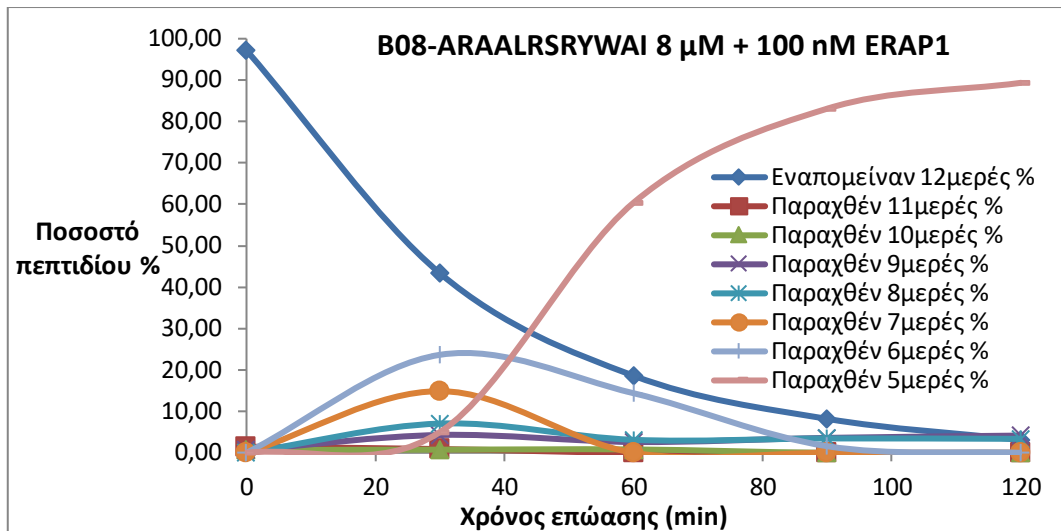
Εικόνα 56: Ο χρόνος ημιζωής του πεπτιδίου ARAALRSRYWAI που βρίσκεται ελεύθερο στο διάλυμα μειώνεται στα 4.4 min αυξάνοντας τη συγκέντρωση ERAP1 στα 100 nM. $R^2 = 0.978$



Εικόνα 57: Ο χρόνος ημιζωής του πεπτιδίου ανέρχεται στα 83 ± 11.5 min όταν το πεπτίδιο ARAALRSRYWAI βρίσκεται δεσμευμένο στο σύμπλοκο HLA-B*08, χρησιμοποιώντας 2 nM ERAP1. $R^2 = 0.976$



Εικόνα 58: Όταν η συγκέντρωση της αμινοπεπτιδάσης ERAP1 αυξάνεται στα 20 nM, ο χρόνος ημιζωής του πεπτιδίου ARAALRSRYWAI που βρίσκεται δεσμευμένο στο HLA-B*08 μειώνεται στα 22.3 ± 1 min. $R^2 = 0.999$

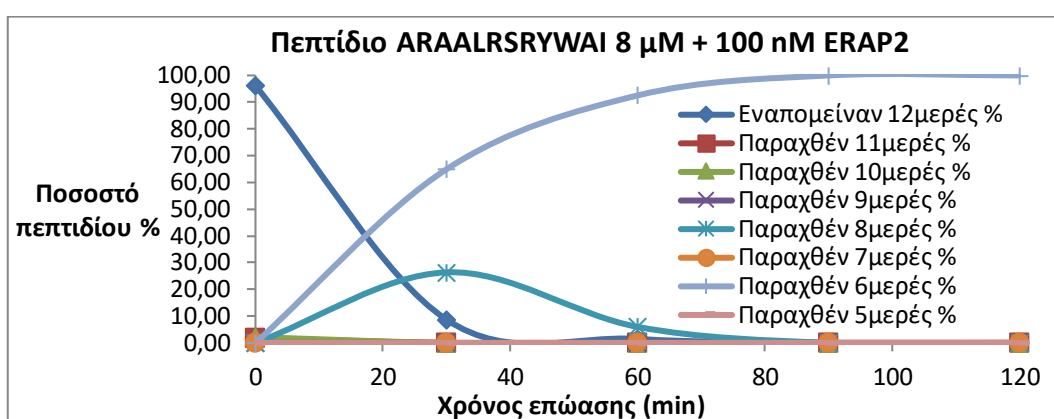


Εικόνα 59: Η μεγαλύτερη συγκέντρωση ενζύμου που χρησιμοποιήθηκε ήταν 100 nM. Ο χρόνος ημιζωής του πεπτιδίου ARAALRSRYWAI δεσμευμένου στο σύμπλοκο HLA-B*08 παρέμεινε ουσιαστικά ο ίδιος (24.8 ± 1 min) συγκριτικά με τα 20 nM ενζύμου. $R^2 = 0.998$

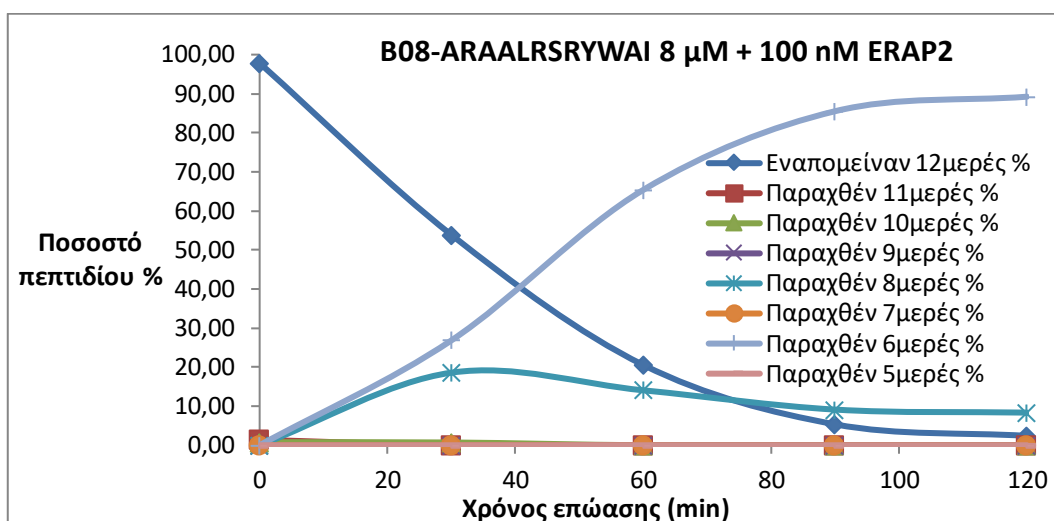
3.6.3. Επώαση του πεπτιδίου ARAALRSRYWAI και του συμπλόκου HLA B*08-ARAALRSRYWAI με τις αμινοπεπτιδάσες ERAP2 και LAP

Καθώς η περίπτωση του συμπλόκου B*08-ARAALRSRYWAI ήταν η μοναδική στην οποία παρατηρήθηκε καταβολισμός του δεσμευμένου στο MHC I πεπτιδίου από την ERAP1, οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν και με τις αμινοπεπτιδάσες ERAP2 και LAP ώστε να διαπιστωθεί το μοτίβο καταβολισμού του προαναφερθέντος συμπλόκου με τις ανωτέρω αμινοπεπτιδάσες. Όταν χρησιμοποιήθηκαν 100 nM ERAP2, το ελεύθερο στο διάλυμα πεπτίδιο παρουσίασε χρόνο ημιζωής 8.6 λεπτών (εικόνα 60), ωστόσο συσσωρεύτηκε το 6μερές πεπτίδιο σε αντίθεση με την ERAP1. Όταν το πεπτίδιο βρίσκεται δεσμευμένο στο σύμπλοκο HLA-B*08 και επωάζεται με 100 nM ERAP2, τότε ο χρόνος ημιζωής κυμαίνεται σε πολύ κοντινά επίπεδα με την αντίδραση επώασης με ERAP1 (εικόνα 61). Έπειτα, οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με την αμινοπεπτιδάση λευκίνης (Leucine Aminopeptidase-LAP), η οποία δε σχετίζεται άμεσα με την επεξεργασία αντιγονικών πεπτιδίων, ώστε να διαπιστωθεί αν διαφέρει το μοτίβο καταβολισμού. Αρχικά, το πεπτίδιο ARAALRSRYWAI επωάστηκε με 2 και 20 nM LAP (εικόνες 62 και 63 αντιστοίχως) και διαπιστώθηκε ότι αποτελεί καλό υπόστρωμα για το

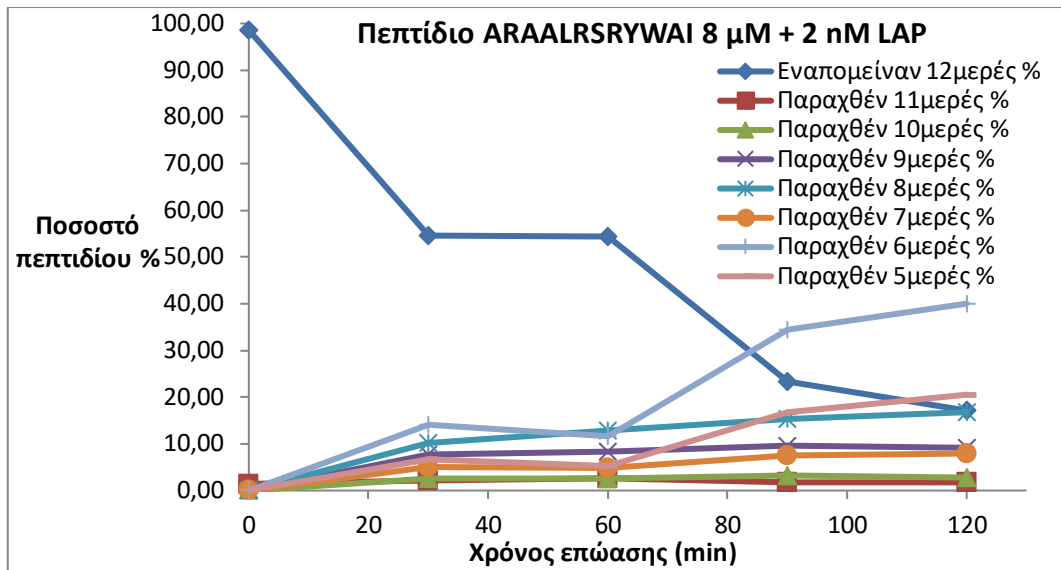
συγκεκριμένο ένζυμο, με το χρόνο ημιζωής του υποστρώματος να μειώνεται ανάλογα με την αύξηση της συγκέντρωσης του ενζύμου. Ωστόσο, το μοτίβο των μικρότερων πεπτιδίων που παρήχθησαν διέφερε από τις αντίστοιχες αντιδράσεις με ERAP1, και ειδικότερα ο 9μερής επίτοπος ALRSRYWAI παρήχθη σε πολύ μικρότερα ποσοστά. Τέλος, κατά την επώαση του συμπλόκου B*08-ARAALRSRYWAI με 2 και 20 nM LAP (εικόνες 64 και 65 αντιστοίχως) παρατηρήθηκε ότι ο χρόνος ημιζωής του πεπτιδίου παραμένει ανεπηρέαστος παρά τον δεκαπλασιασμό της συγκέντρωσης του ενζύμου, αντίθετα με την αντίδραση επώασης με ERAP1.



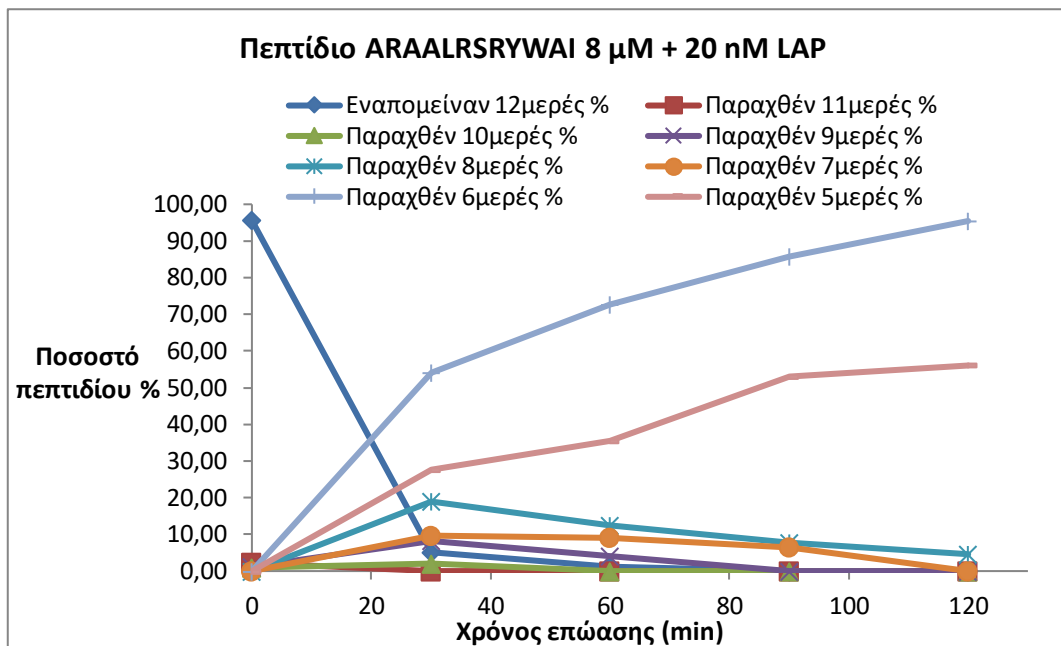
Εικόνα 61: Ο χρόνος ημιζωής του πεπτιδίου ARAALRSRYWAI όταν βρίσκεται ελεύθερο στο διάλυμα ανέρχεται σε 8.6 ± 1 min, κατόπιν επώασης με 100 nM αμινοπεπτιδάσης ERAP2. $R^2 = 0.998$



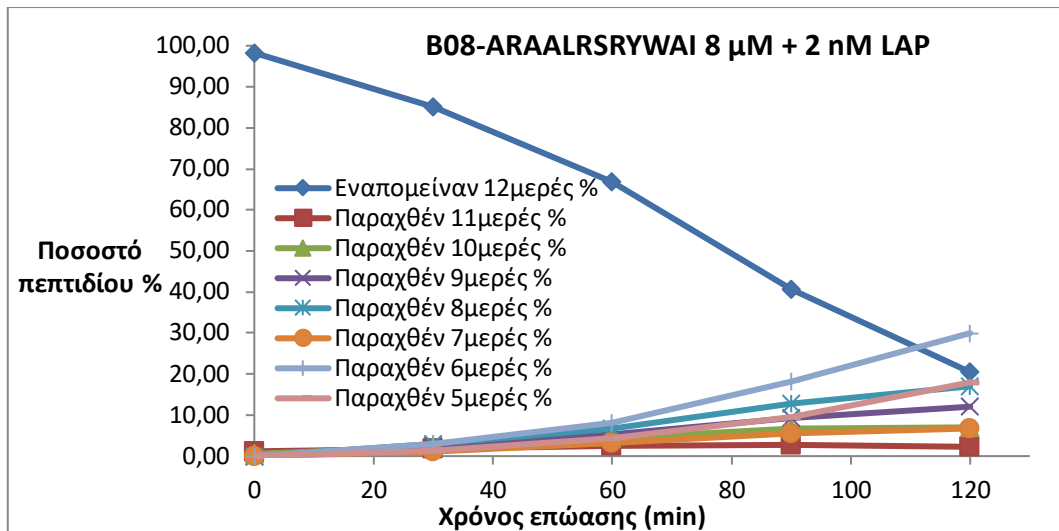
Εικόνα 61: Ο χρόνος ημιζωής του πεπτιδίου ARAALRSRYWAI δεσμευμένου στο πρωτεϊνικό σύμπλοκο HLA-B*08 ανέρχεται σε 27.8 ± 3.3 min, κατόπιν επώασης με 100 nM αμινοπεπτιδάσης ERAP2. $R^2 = 0.987$



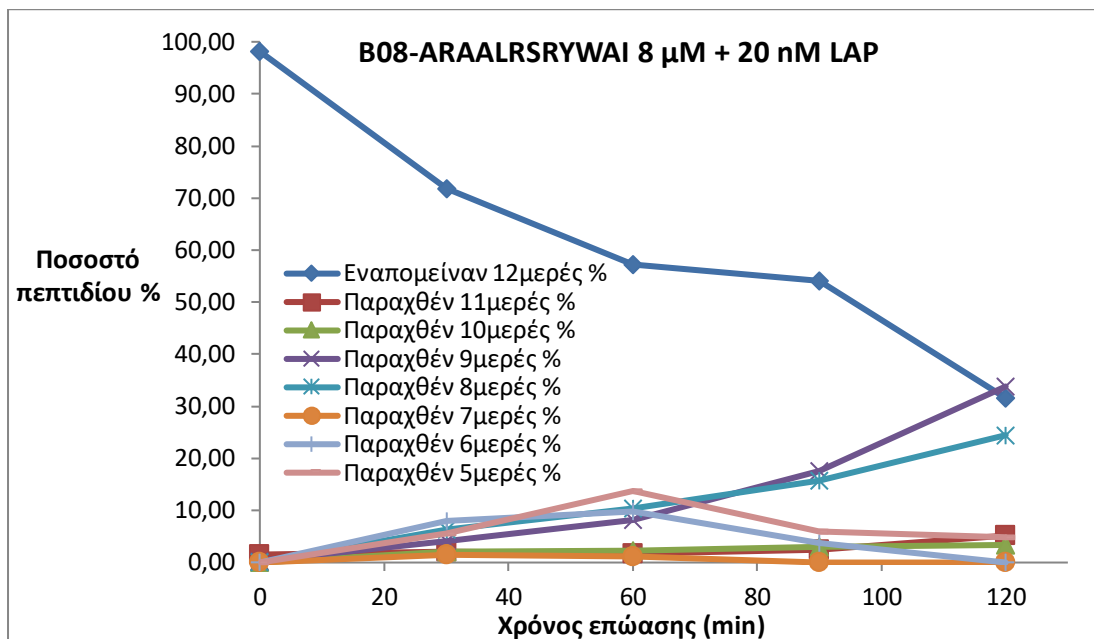
Εικόνα 62: Ο χρόνος ημιζωής του πεπτιδίου ARAALRSRYWAI όταν βρίσκεται ελεύθερο στο διάλυμα ανέρχεται στα 48 ± 9.5 min, κατόπιν επώασης με 2 nM LAP. $R^2 = 0.934$



Εικόνα 63: Το πεπτίδιο ARAALRSRYWAI καταβολίζεται ταχύτατα όταν βρίσκεται ελεύθερο στο διάλυμα κατόπιν επώασης με 20 nM LAP, με το χρόνο ημιζωής να μειώνεται στα 7 ± 2.5 min. $R^2 = 0.997$



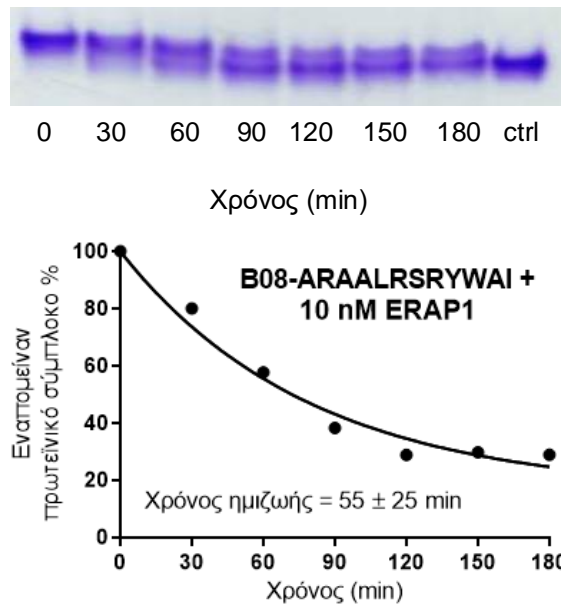
Εικόνα 64: Ο χρόνος ημιζωής του πεπτιδίου ARAALRSRYWAI δεσμευμένου στο πρωτεϊνικό σύμπλοκο HLA-B*08 ανέρχεται στα 74 ± 18 min, κατόπιν επώασης με 2 nM LAP. $R^2 = 0.915$



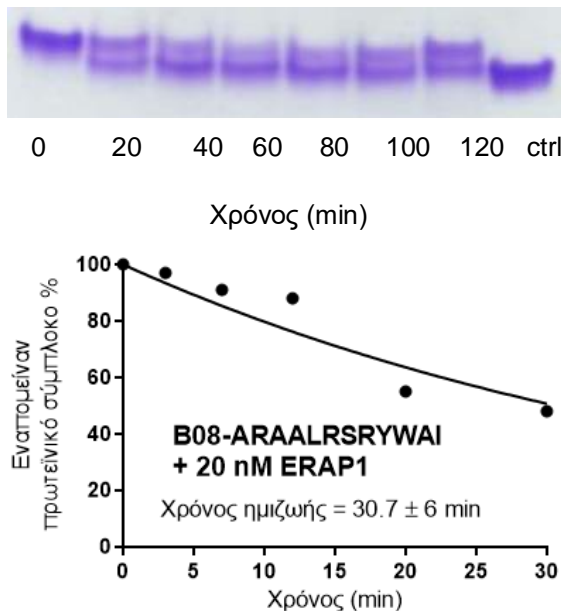
Εικόνα 65: Ο χρόνος ημιζωής του πεπτιδίου ARAALRSRYWAI δεσμευμένου στο πρωτεϊνικό σύμπλοκο HLA-B*08 ανέρχεται στα 80 ± 10 min, κατόπιν επώασης με 20 nM LAP. $R^2 = 0.95$

3.7. Παρακολούθηση του καταβολισμού του πεπτιδίου ARAALRSRYWAI όταν βρίσκεται σε σύμπλοκο με το HLA-B*08, από τις αμινοπεπτιδάσες ERAP1 και ERAP2. Η αντίδραση παρακολουθείται με Native PAGE.

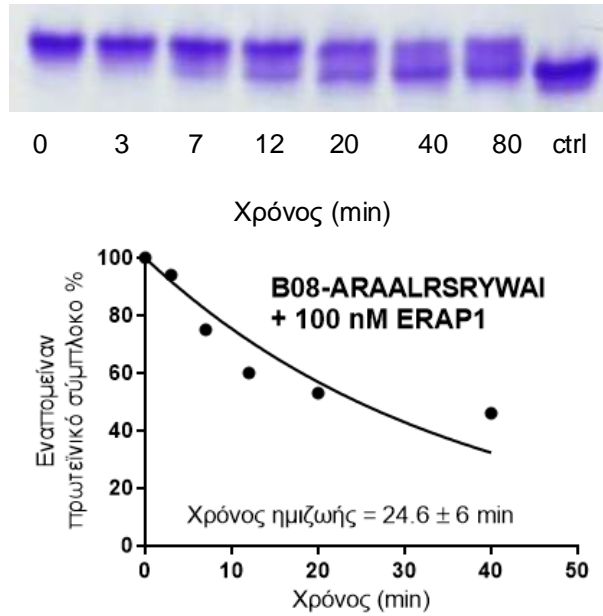
Η παρακολούθηση των αντιδράσεων του πρωτεϊνικού συμπλόκου B*08-ARAALRSYWAI με τις αμινοπεπτιδάσες ERAP1 και ERAP2 πραγματοποιήθηκε και με Native PAGE, ώστε να συγκριθούν με τα αποτελέσματα των αντιδράσεων MALDI-TOF. Στην περίπτωση αυτή, μπορεί να μελετηθεί ο καταβολισμός του πεπτιδίου ARAALRSRYWAI από τον σχηματισμό συμπλόκου HLA-B*08 με το 9μερές πεπτίδιο ALRSRYWAI που παράγεται, το οποίο φέρει διαφορετικό φορτίο από το αρχικό σύμπλοκο-υπόστρωμα. Οι αντιδράσεις αρχικά πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας 10, 20 και 100 nM ERAP1 (εικόνες 66, 67 και 68 αντιστοίχως). Ο χρόνος ημιζωής του πεπτιδίου σε κάθε περίπτωση κυμαίνεται σε πολύ κοντινά επίπεδα με τα αποτελέσματα της ανάλυσης φασματομετρίας μάζας. Ύστερα το σύμπλοκο B*08-ARAALRSYWAI επωάστηκε με 20 και 100 nM ERAP2 (εικόνες 69 και 70 αντιστοίχως) και επαληθεύτηκε ότι το πεπτίδιο είναι προσβάσιμο και στην ERAP2. Σε όλες τις περιπτώσεις, η ταχύτητα σχηματισμού του συμπλόκου B*08-ALRSRYWAI αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης αμινοπεπτιδασών, όμως ο ρυθμός αποδόμησης του συμπλόκου B*08-ALRSRYWAI πραγματοποιείται με πιο αργούς ρυθμούς συγκριτικά με τον ανταγωνισμό από το πεπτίδιο ALRSRYWAI (εικόνα 48). Τέλος, το σύμπλοκο B*08-LSILLKHKKAAL παρέμεινε ανεπηρέαστο στη δράση της ERAP1 (εικόνα 71), επαληθεύοντας την ανάλυση που πραγματοποιήθηκε με φασματομετρία μάζας.



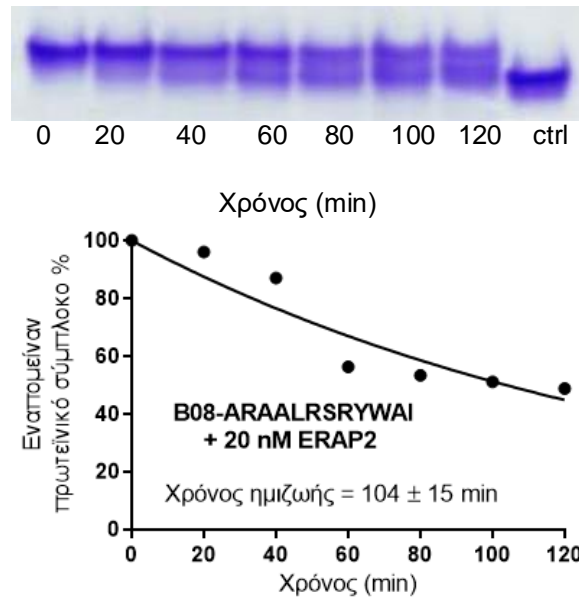
Εικόνα 66: Επώαση του πρωτεϊνικού συμπλόκου HLA B*08-ARAALRSRYWAI (8 μ M) με 10 nM ERAP1 στους 37 °C για 180 min. Κατόπιν τα δείγματα υποβάλλονται σε Native-PAGE. Ο προσδιορισμός του χρόνου ημιζωής πραγματοποιείται με βάση την ένταση των πρωτεϊνικών ζωνών στην εφαρμογή ImageJ και κατόπιν την εξίσωση one-phase decay στο GraphPad Prism.



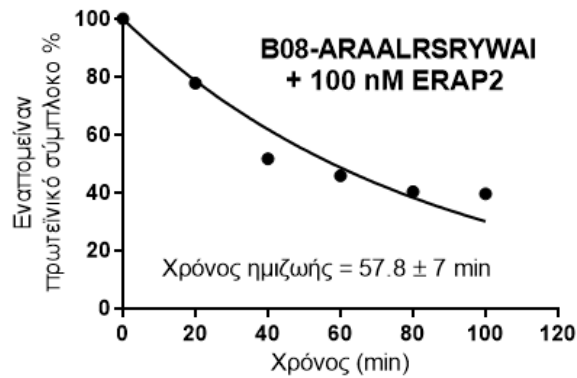
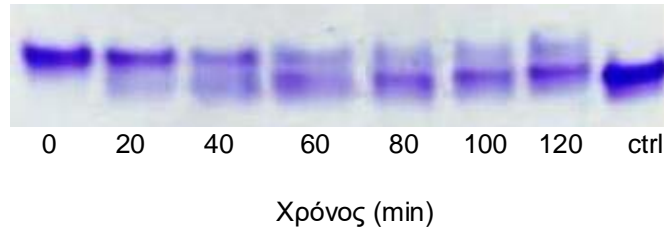
Εικόνα 67: Επώαση του πρωτεϊνικού συμπλόκου HLA B*08-ARAALRSRYWAI (8 μ M) με 20 nM ERAP1 στους 37 °C για 120 min. Κατόπιν τα δείγματα υποβάλλονται σε Native-PAGE. Ο προσδιορισμός του χρόνου ημιζωής πραγματοποιείται με βάση την ένταση των πρωτεϊνικών ζωνών στην εφαρμογή ImageJ και κατόπιν την εξίσωση one-phase decay στο GraphPad Prism.



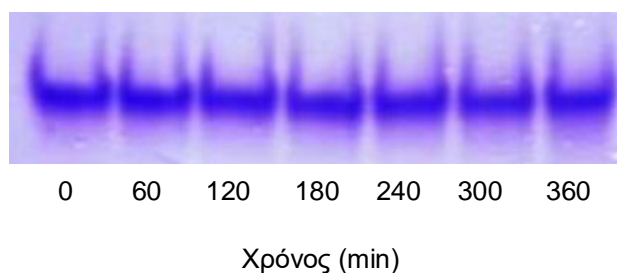
Εικόνα 68: Επώαση του πρωτεϊνικού συμπλόκου HLA B*08-ARAALRSRYWAI (8 μ M) με 100 nM ERAP1 στους 37 $^{\circ}$ C για 80 min. Κατόπιν τα δείγματα υποβάλλονται σε Native PAGE. Ο προσδιορισμός του χρόνου ημιζωής πραγματοποιείται με βάση την ένταση των πρωτεϊνικών ζωνών στην εφαρμογή ImageJ και κατόπιν την εξίσωση one-phase decay στο GraphPad Prism.



Εικόνα 69: Επώαση του πρωτεϊνικού συμπλόκου B08-ARAALRSRYWAI (8 μ M) με 20 nM ERAP2 στους 37 $^{\circ}$ C για 120 min. Κατόπιν τα δείγματα υποβάλλονται σε Native PAGE. Ο προσδιορισμός του χρόνου ημιζωής πραγματοποιείται με βάση την ένταση των πρωτεϊνικών ζωνών στην εφαρμογή ImageJ και κατόπιν την εξίσωση one-phase decay στο GraphPad Prism.



Εικόνα 70: Επώαση του πρωτεϊνικού συμπλόκου B08-ARAALRSRYWAI (8 μ M) με 100 nM ERAP2 στους 37 °C για 120 min. Κατόπιν τα δείγματα υποβάλλονται σε Native PAGE. Ο προσδιορισμός του χρόνου ημιζωής πραγματοποιείται με βάση την ένταση των πρωτεϊνικών ζωνών στην εφαρμογή ImageJ και κατόπιν την εξίσωση one-phase decay στο GraphPad Prism.

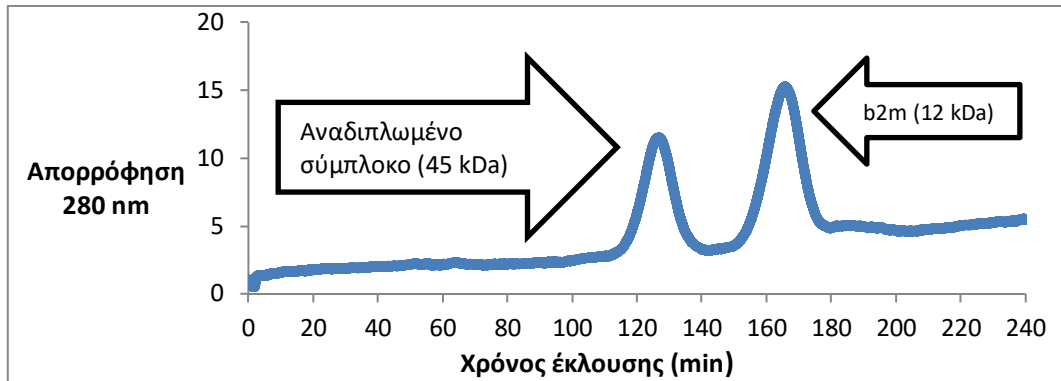


Εικόνα 71: Επώαση του πρωτεϊνικού συμπλόκου B08-LSILLKHKKAAL (8 μ M) με 20 nM ERAP1 στους 37 °C για 360 min. Συλλέγονται δείγματα ανά 60 min και υποβάλλονται σε Native PAGE. Ωστόσο, στη συγκεκριμένη περίπτωση δεν παρατηρείται δεύτερη πρωτεϊνική ζώνη στη χρονική διάρκεια που διαρκεί η επώαση, επομένως ο χρόνος ημιζωής του συμπλόκου υπερβαίνει τα 360 min.

3.8. Πραγματοποίηση σημειακής μετάλλαξης (E76C) στη βαριά αλυσίδα του HLA-B*08 και σχηματισμός *in vitro* των συμπλόκων HLA-B*08 E76C-ALRSRYWCI και HLA-B*08 E76C-ARAALRSRYWCI. Βιοφυσικός προσδιορισμός της θερμοδυναμικής σταθερότητας των ανωτέρω συμπλόκων.

Όπως αναφέρθηκε, το σύμπλοκο B*08-ARAALRSRYWAI διαπιστώθηκε ότι είναι θερμοδυναμικά και κινητικά ασταθές. Επίσης, κατόπιν επώασης του συμπλόκου με τις αμινοεπτιδάσες ERAP1, ERAP2 και LAP παρατηρήθηκε καταβολισμός του πεπτιδίου. Επομένως, προκειμένου να διαπιστωθεί αν ο καταβολισμός οφείλεται σε κάποιο βαθμό στην αποδέσμευση του πεπτιδίου από το ασταθές σύμπλοκο, επιλέχθηκε να σχηματιστεί τεχνητά δισουλφιδικός δεσμός μεταξύ του καρβοξυτελικού άκρου του πεπτιδίου και της αύλακας πρόσδεσης του HLA-B*08. Για το σκοπό αυτό επιλέχθηκε να πραγματοποιηθεί η σημειακή μετάλλαξη E76C. Το γλουταμικό οξύ στη θέση 76 βρίσκεται εντός της αύλακας πρόσδεσης του αλληλομόρφου HLA-B*08 και αλληλεπιδρά με το προτελευταίο αμινοξύ που βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο του πεπτιδίου. Καθώς είχαν σχηματιστεί και μελετηθεί ως προς τη θερμοδυναμική και κινητική σταθερότητα τα πεπτίδια ALRSRYWAI και ARAALRSRYWAI σε σύμπλοκο με το αλληλόμορφο HLA-B*08 αγρίου τύπου, επιλέχθηκε η αλλαγή σε κυστεΐνη του προτελευταίου αμινοξέος πριν από το καρβοξυτελικό άκρο στα ανωτέρω πεπτίδια ώστε να σχηματίσουν δισουλφιδικό δεσμό με το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο HLA-B*08 E76C. Το σύμπλοκο HLA-B*08 E76C-ARAALRSRYWCI απομονώθηκε με χρωματογραφία μοριακής διήθησης (εικόνα 72). Τα κλάσματα έκλουσης αναλύθηκαν με SDS-PAGE (εικόνα 73). Η ανίχνευση του πεπτιδίου πραγματοποιήθηκε με φασματομετρία μάζας MALDI-TOF ύστερα από προσθήκη DTT, ώστε να διαρραγεί ο δισουλφιδικός δεσμός και να αποδεσμευτεί το πεπτίδιο (εικόνα 74). Στη συνέχεια προσδιορίστηκε η θερμοδυναμική σταθερότητα των συμπλόκων HLA-B*08 E76C-ALRSRYWCI (εικόνα 75) και HLA-B*08 E76C-ARAALRSRYWCI (εικόνα 76). Παρατηρήθηκε ότι οι θερμοκρασίες αποδιάταξης δε διέφεραν από τις αντίστοιχες των συμπλόκων B*08-ALRSRYWAI και B*08-ARAALRSRYWAI.

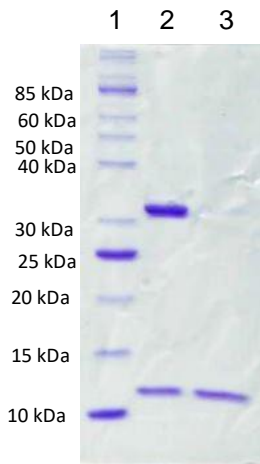
3.8.1. Σχηματισμός συμπλόκου HLA-B*08 E76C-ARAALRSRYWCI



Εικόνα 72: Χρωματογράφημα μοριακής διήθησης του συμπλόκου HLA-B*08 E76C με το πεπτιδίο ARAALRSRYWCI. Συλλέγονται ξεχωριστά τα κλάσματα έκλουσης 122-138 min και 165-185 min.

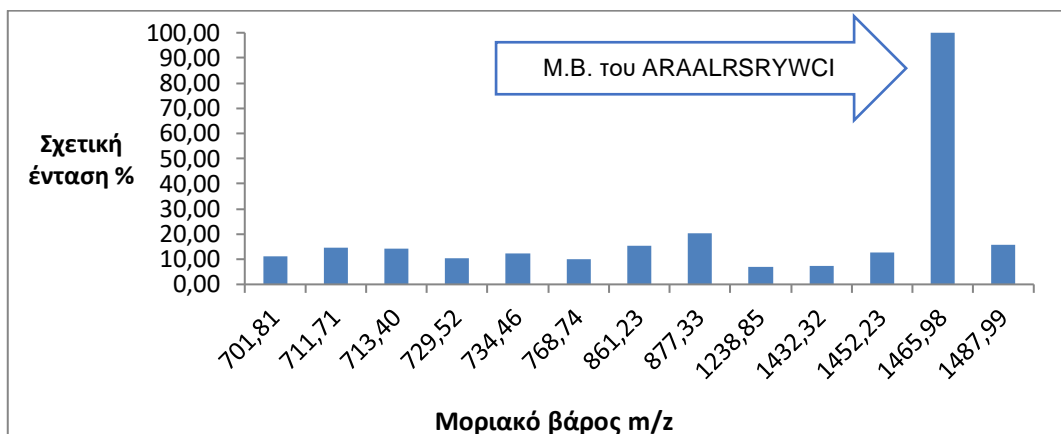
1η κορυφή: Αναδιπλωμένο σύμπλοκο HLA-B*08 E76C-ARAALRSRYWCI (μοριακό βάρος 45 kDa)

2η κορυφή: b₂m σε περίσσεια που αναδιπλώνεται ξεχωριστά (μοριακό βάρος 12 kDa)



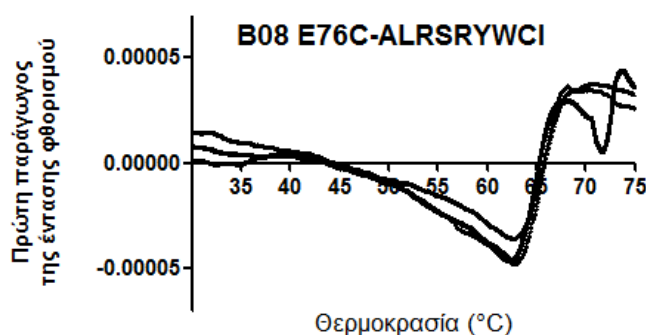
Εικόνα 73: SDS-PAGE των κλασμάτων έκλουσης που συλλέχθηκαν κατά τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης.

- 1) Δείκτης μοριακών βαρών p7704s
- 2) κλάσματα έκλουσης 122-138 min: Αναδιπλωμένο σύμπλοκο HLA B*08 E76C-ARAALRSRYWCI (μοριακό βάρος 45 kDa)
- 3) κλάσματα έκλουσης 165-185 min: (b₂m που βρίσκεται σε περίσσεια), 12 kDa

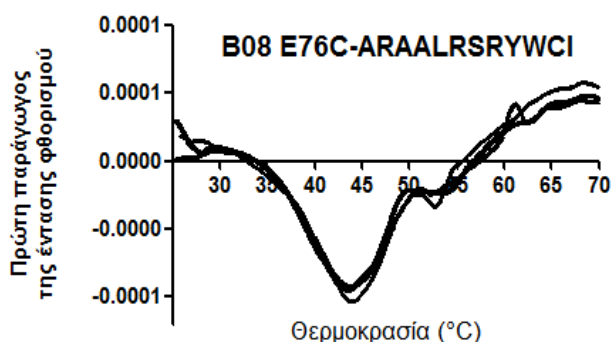


Εικόνα 74: Φασματομετρία μάζας MALDI-TOF των κλασμάτων έκλουσης 122-138 min μετά την προσθήκη 100 mM DTT, ώστε να διασπαστεί ο δισουλφιδικός δεσμός και να αποδεσμευτεί το πεπτίδιο. Το πεπτίδιο ARAALRSRYWCI έχει μοριακό βάρος 1465 Da. Δίχως την προσθήκη DTT δεν ανιχνεύεται το πεπτίδιο στη φασματομετρία μάζας. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει το σχηματισμό δισουλφιδικού δεσμού, διότι το πεπτίδιο καταβυθίζεται μαζί με το πρωτεϊνικό σύμπλοκο απουσία DTT.

3.8.2. Προσδιορισμός της θερμοδυναμικής σταθερότητας των συμπλόκων HLA-B*08 E76C-ALRSRYWCI και HLA-B*08 E76C-ARAALRSRYWCI



Εικόνα 75

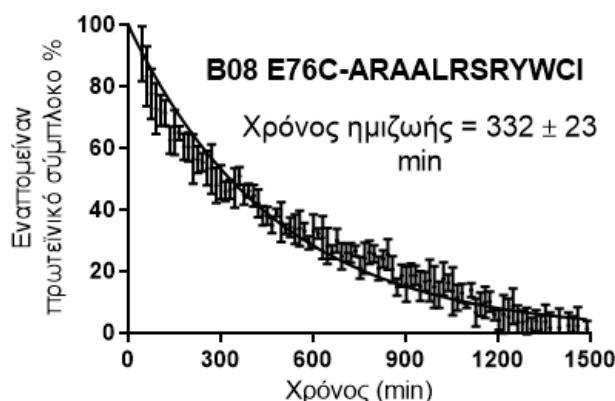


Εικόνα 76

Εικόνες 75-76: Διαγράμματα πρώτης παραγώγου της έντασης του φθορισμού (άξονας y) σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία (άξονας x). Το χαμηλότερο σημείο στον άξονα y αντιστοιχεί στη θερμοκρασία αποδιάταξης (T_m) του πρωτεϊνικού συμπλόκου. Η θερμοκρασία αποδιάταξης των συμπλόκων B08 E76C-ARAALRSRYWCI και B08 E76C-ALRSRYWCI είναι 44 ± 0.5 και 63 ± 0.4 °C, αντιστοίχως. Οι θερμοκρασίες αποδιάταξης δεν διαφέρουν αντιστοίχως από τα σύμπλοκα B08-ALRSRWAI και B08-ARAALRSRYWAI με το αλληλόμορφο αγρίου τύπου, στα οποία δε σχηματίζεται δισουλφιδικός δεσμός με το πεπτίδιο.

3.8.3. Προσδιορισμός κινητικής σταθερότητας του συμπλόκου HLA-B*08 E76C-ARAALRSRYWCI

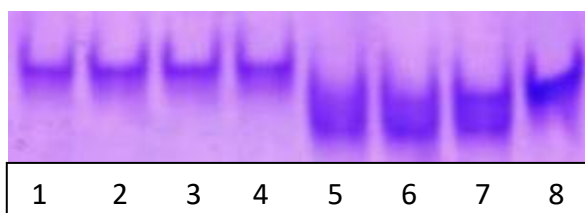
Έπειτα πραγματοποιήθηκε βιοφυσικός προσδιορισμός της κινητικής σταθερότητας του συμπλόκου HLA-B*08 E76C-ARAALRSRYWCI. Όπως αναμενόταν, δεν παρατηρήθηκε αύξηση της έντασης φθορισμού στο σύμπλοκο HLA-B*08 E76C-ALRSRYWCI κατά τη διάρκεια 24 ωρών, καθώς το ομοιοπολικά συνδεδεμένο πεπτιδίο ALRSRYWAI εμποδίζει πλήρως την πρόσδεση της χρωστικής στην υδρόφοβη αύλακα του MHC I. Ωστόσο, σε αντίθεση με τη θερμοκρασία αποδιάταξης, το σύμπλοκο HLA-B*08 E76C-ARAALRSRYWCI παρουσίασε πολύ μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής συγκριτικά με το αγρίου τύπου σύμπλοκο B*08-ARAALRSRYWAI (εικόνα 77). Καθώς το καρβοξυτελικό άκρο του πεπτιδίου βρίσκεται δεσμευμένο στην πρωτεΐνη μέσω δισουλφιδικού δεσμού, πιθανώς το αμινοτελικό άκρο αλληλεπιδρά ασθενώς με τα αμινοξέα της αύλακας πρόσδεσης επιτρέποντας την εισχώρηση της χρωστικής.



Εικόνα 77: Διάγραμμα του ποσοστού % πρωτεΐνης που παραμένει σε σύμπλοκο με το πεπτιδίο (άξονας y) σε συνάρτηση με το χρόνο (άξονας x). Η θερμοκρασία παραμένει σταθερή στους 37 °C. Η υδρόφοβη χρωστική ανταγωνίζεται το πεπτιδίο για την πρόσδεση στην υδρόφοβη αύλακα της πρωτεΐνης αυξάνοντας το φθορισμό. Ωστόσο, το σύμπλοκο B*08 E76C-ARAALRSRYWCI εμφανίζει πολύ μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής συγκριτικά με το σύμπλοκο B*08-ARAALRSRYWAI, στο οποίο δε σχηματίζεται δισουλφιδικός δεσμός μεταξύ της βαριάς αλυσίδας του HLA-B*08 και του πεπτιδίου.

3.8.4. Επώαση του συμπλόκου HLA-B*08 E76C-ARAALRSRYWCI με την αμινοπεπτιδάση ERAP1 και υποβολή των δειγμάτων σε Native PAGE

Πραγματοποιήθηκε επώαση του συμπλόκου B*08 E76C-ARAALRSRYWCI με την αμινοπεπτιδάση ERAP1 και υποβολή των δειγμάτων σε Native PAGE (εικόνα 78), ώστε να διαπιστωθεί αν είναι εφικτή η πρόσβαση του ενζύμου στο αμινοτελικό άκρο του πεπτιδίου, όταν το τελευταίο βρίσκεται ομοιοπολικά δεσμευμένο στο MHC I. Παρατηρείται μόνο η ζώνη που αντιστοιχεί στο σύμπλοκο B*08 E76C-ARAALRSRYWCI. Το αποτέλεσμα υποδεικνύει ότι δεν πραγματοποιείται η αντίδραση καταβολισμού του πεπτιδίου από το ένζυμο. Αν είχε καταβολιστεί η αργινίνη από το 12μερές πεπτίδιο, τότε το νέο σύμπλοκο που θα προέκυπτε θα είχε διαφορετικό φορτίο και θα ήταν ορατή και δεύτερη ζώνη στην πηκτή. Αντιθέτως, αυτό συμβαίνει με το ασταθές σύμπλοκο HLA-B*08 w.t.-ARAALRSRYWAI.



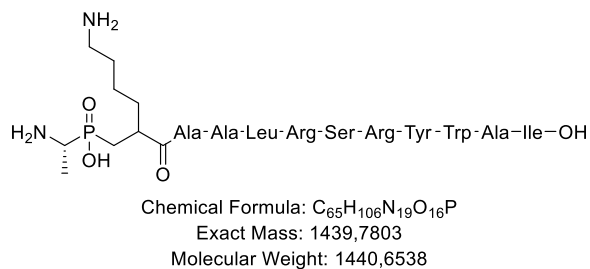
Εικόνα 78: Native PAGE των συμπλόκων B*08 E76C-ARAALRSRYWCI και B*08 w.t.-ARAALRSRYWAI κατόπιν επώασης με ERAP1

- 1) B*08 E76C-ARAALRSRYWCI + 20 nM ERAP1, 0 min επώαση
- 2) B*08 E76C-ARAALRSRYWCI + 20 nM ERAP1, 30 min επώαση
- 3) B*08 E76C-ARAALRSRYWCI + 20 nM ERAP1, 60 min επώαση
- 4) B*08 E76C-ARAALRSRYWCI + 20 nM ERAP1, 120 min επώαση
- 5) B*08 w.t.-ARAALRSRYWAI + 20 nM ERAP1, 120 min επώαση
- 6) B*08 w.t.-ARAALRSRYWAI + 20 nM ERAP1, 90 min επώαση
- 7) B*08 w.t.-ARAALRSRYWAI + 20 nM ERAP1, 60 min επώαση
- 8) B*08 w.t.-ARAALRSRYWAI + 20 nM ERAP1, 0 min επώαση

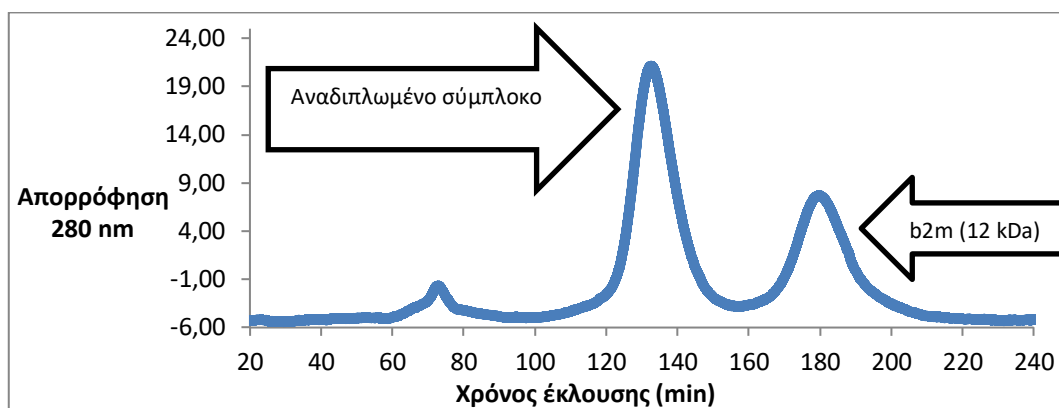
3.9. Έλεγχος σχηματισμού του τριμερούς συμπλόκου HLA B*08-φωσφινικό ψευδοπεπτιδίο-ERAP1

Όπως έχει αναφερθεί, τα φωσφινικά ψευδοπεπτιδία δρουν ως ανάλογα μεταβατικής κατάστασης τα οποία δεσμεύονται μη αντιστρεπτά στον ιόν ψευδαργύρου των αμινοπεπτιδασών παρεμποδίζοντας την κατάλυση. Τα αποτελέσματα καταβολισμού του δεσμευμένου στο σύμπλοκο HLA-B*08 πεπτιδίου ARAALRSRYWAI από τα ένζυμα ERAP1 και ERAP2 σε συνδυασμό με την αδυναμία πρόσβασης της ERAP1 στο πεπτιδίο του συμπλόκου HLA B*08 E76C-ARAALRSRYWCI, οδήγησαν στη σύνθεση ενός φωσφινικού ψευδοπεπτιδίου (DG078-εικόνα 79) βασισμένου στην αλληλουχία ARAALRSRYWAI. Σκοπός ήταν η ομοιοπολική δέσμευση του πεπτιδίου στην αμινοπεπτιδάση, ώστε να εξεταστεί η πιθανότητα σχηματισμού τριμερούς συμπλόκου MHC I-πεπτιδίο-ERAP1. Αρχικά, απομονώθηκε το πρωτεϊνικό σύμπλοκο HLA B*08-DG078 με χρωματογραφία μοριακής διήθησης (εικόνα 80). Τα κλάσματα έκλυσης αναλύθηκαν με SDS-PAGE (εικόνα 81) και η ανίχνευση του πεπτιδίου στο σύμπλοκο πραγματοποιήθηκε με φασματομετρία μάζας MALDI-TOF (εικόνα 82). Έπειτα πραγματοποιήθηκε βιοφυσικός προσδιορισμός της θερμοδυναμικής (εικόνα 83) και κινητικής σταθερότητας (εικόνα 84) του συμπλόκου HLA B*08-DG078. Παρατηρήθηκε ότι η θερμοκρασία αποδιάταξης και ο χρόνος ημιζωής βρίσκονταν σε πολύ κοντινά επίπεδα με το σύμπλοκο HLA B*08-ARAALRSRYWAI. Στη συνέχεια, προσδιορίστηκε η σταθερά αναστολής του φωσφινικού ψευδοπεπτιδίου DG078 έναντι των αμινοπεπτιδασών ERAP1, ERAP2 και LAP (εικόνες 85, 86 και 87 αντιστοίχως). Όπως αναμενόταν, το DG078 αποτελεί ισχυρό αναστολέα του ενζύμου ERAP1. Επίσης παρεμπόδιζε αποτελεσματικά την καταλυτική δραστηριότητα της LAP, αλλά η σταθερά αναστολής για την ERAP2 ήταν 50 φορές μικρότερη συγκριτικά με την ERAP1. Δεδομένης της υψηλής συγγένειας του αναστολέα DG078 για την ERAP1 και τη δυνατότητα σχηματισμού του συμπλόκου B*08-DG078 πραγματοποιήθηκε Native PAGE του συμπλόκου B*08-DG078 παρουσία της ERAP1 ή της ERAP2 (εικόνα 88). Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός τριμερούς συμπλόκου, αποτέλεσμα που υποδεικνύει ότι το ένζυμο αδυνατεί να αλληλεπιδράσει ισχυρά με το πεπτιδίο που βρίσκεται δεσμευμένο στο σύμπλοκο HLA-B*08.

3.9.1. Σχηματισμός *in vitro* του πρωτεϊνικού συμπλόκου HLA-B*08 με το φωσφινικό ψευδοπεπτιδίο DG078



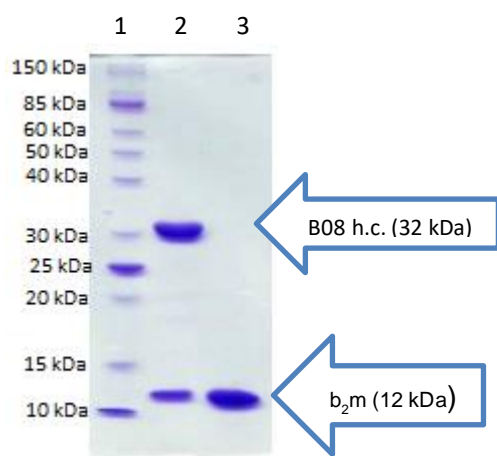
Εικόνα 79: Δομή του φωσφινικού ψευδοπεπτιδίου DG078



Εικόνα 80: Χρωματογράφημα μοριακής διήθησης του συμπλόκου HLA B*08 με το πεπτιδίο DG078. Συλλέγονται ξεχωριστά τα κλάσματα έκλουσης 122-138 min και 165-185 min

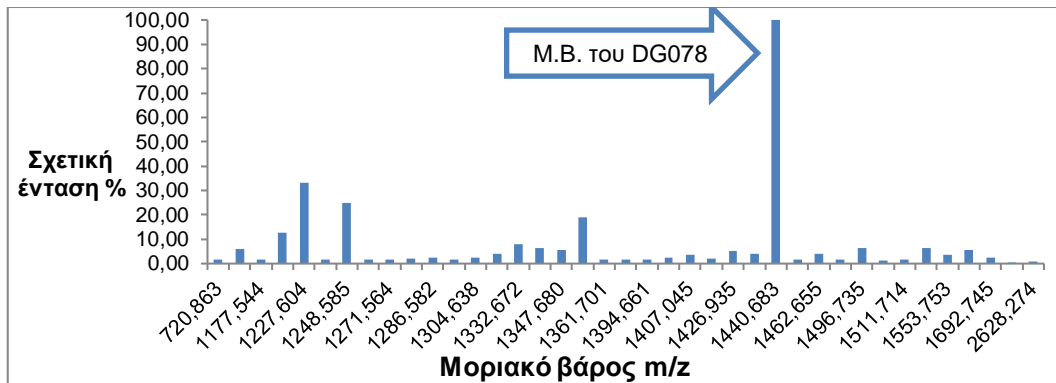
1η κορυφή: Αναδιπλωμένο σύμπλοκο HLA B*08-DG078 (45 kDa)

2η κορυφή: b_2m σε περίσσεια που αναδιπλώνεται ξεχωριστά (12 kDa)



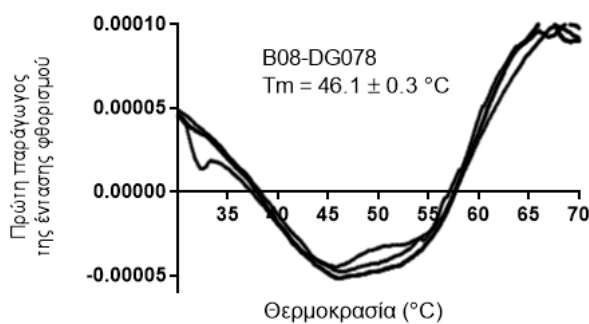
Εικόνα 81: SDS-PAGE των κλασμάτων έκλουσης που συλλέχθηκαν κατά τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης.

- 1) Δείκτης μοριακών βαρών p7704s
- 2) κλάσματα έκλουσης 122-138 min: Αναδιπλωμένο σύμπλοκο HLA B*08-DG078 (45 kDa)
- 3) κλάσματα έκλουσης 165-185 min (b_2m σε περίσσεια που αναδιπλώνεται ξεχωριστά, 12 kDa)



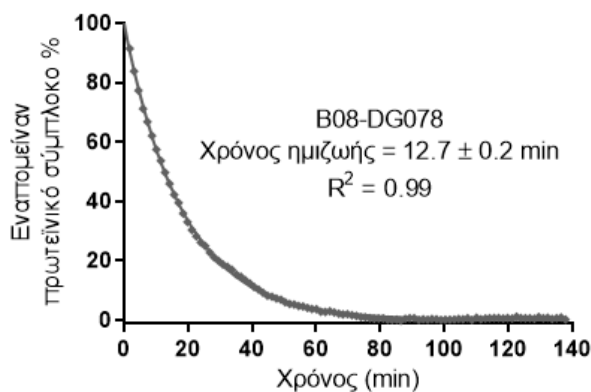
Εικόνα 82: Φασματομετρία μάζας MALDI-TOF των κλασμάτων έκλουσης 122-138 min. Το ψευδοπεπτίδιο DG078 έχει μοριακό βάρος 1440 Da.

3.9.2. Βιοφυσικός προσδιορισμός θερμοδυναμικής και κινητικής σταθερότητας του συμπλόκου HLA-B*08 με το ψευδοπεπτίδιο DG078



Εικόνα 83

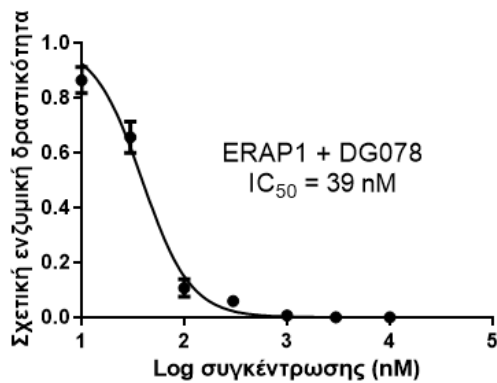
Εικόνα 83: Διάγραμμα πρώτης παραγώγου της έντασης του φθορισμού (άξονας y) σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία (άξονας x). Το χαμηλότερο σημείο στον άξονα y αντιστοιχεί στη θερμοκρασία αποδιάταξης (T_m) του πρωτεϊνικού συμπλόκου.



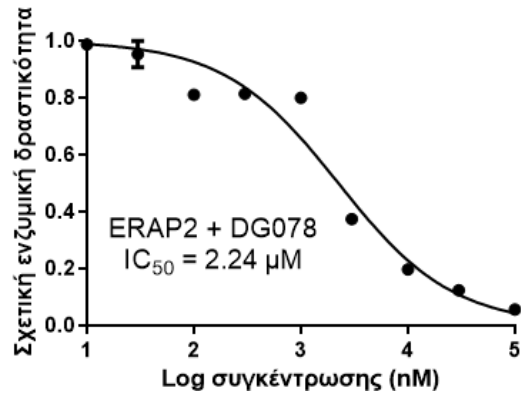
Εικόνα 84

Εικόνα 84: Διάγραμμα του ποσοστού % πρωτεΐνης που παραμένει σε σύμπλοκο με το πεπτίδιο (άξονας y) σε συνάρτηση με το χρόνο (άξονας x). Η θερμοκρασία παραμένει σταθερή στους $37 \text{ } ^\circ\text{C}$. Η υδρόφοβη χρωστική ανταγωνίζεται το πεπτίδιο για την πρόσδεση στην υδρόφοβη αύλακα της πρωτεΐνης αυξάνοντας το φθορισμό.

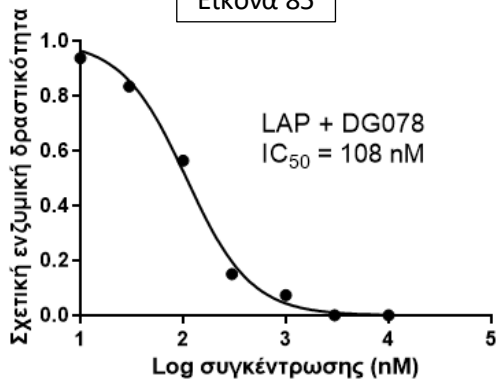
3.9.3. Προσδιορισμός της σταθεράς αναστολής του DG078 έναντι της δραστηριότητας των αμινοπεπτιδασών ERAP1, ERAP2 και LAP.



Εικόνα 85



Εικόνα 86



Εικόνα 87

Εικόνες 85-87: Προσδιορισμός της σταθεράς αναστολής (inhibition constant, IC₅₀) του DG078 έναντι της δραστηριότητας των αμινοπεπτιδασών ERAP1 και LAP ως προς το υπόστρωμα L-AMC και της ERAP2 ως προς το υπόστρωμα R-AMC.

3.9.4. Native PAGE του συμπλόκου HLA B*08-DG078 παρουσία της αμινοπεπτιδάσης ERAP1 ή της ERAP2 για τον έλεγχο σχηματισμού τριμερούς συμπλόκου

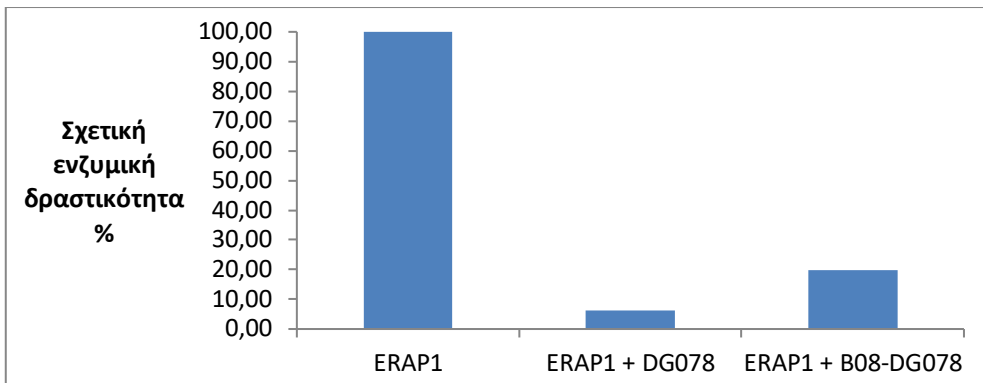


Εικόνα 88: Native PAGE του συμπλόκου B*08-DG078 παρουσία ERAP1 ή ERAP2

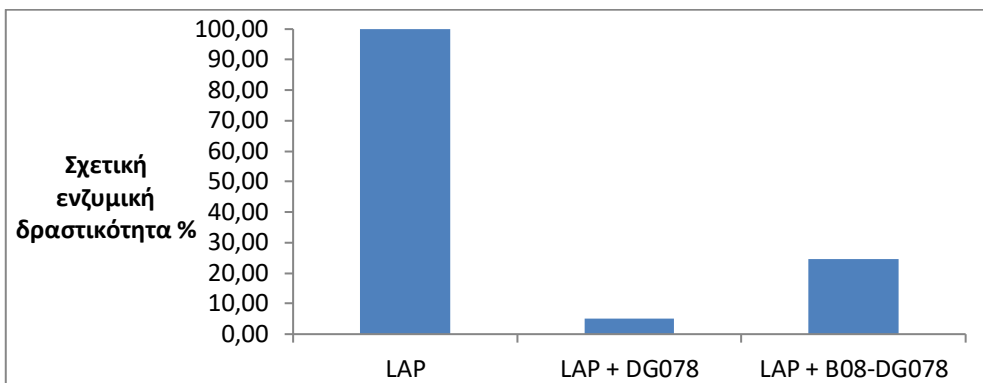
- 1) HLA B*08-AI12 (1 μg)
- 2) HLA B*08-DG078 (1 μg)
- 3) ERAP1 (2 μg)
- 4) HLA B*08-DG078 (1 μg) + ERAP1 (2 μg)
- 5) ERAP2 (1 μg)
- 6) HLA B*08-DG078 (1 μg) + ERAP2 (2 μg)

3.9.5 Προσδιορισμός της σταθεράς αναστολής του συμπλόκου B*08-DG078 έναντι της δραστικότητας των αμινοπεπτιδασών ERAP1 και LAP.

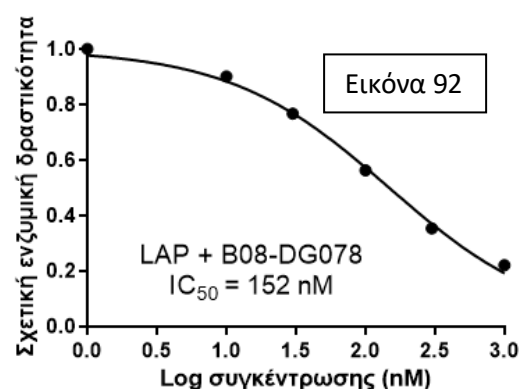
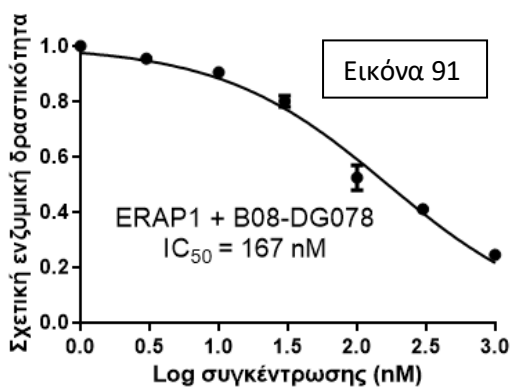
Η διαπίστωση μη σχηματισμού τριμερούς συμπλόκου και η μεγάλη συγγένεια του αναστολέα DG078 για την ERAP1 και τη LAP, σε συνδυασμό με την ικανότητα των ανωτέρω ενζύμων να καταβολίσουν το δεσμευμένο στο HLA-B*08 πεπτιδίο ARAALRSRYWAI, οδήγησαν στην παρακολούθηση της πιθανής αναστολής της δραστικότητάς τους από το σύμπλοκο B*08-DG078. Σκοπός ήταν να διαπιστωθεί αν έστω και παροδικά ο δεσμευμένος στο σύμπλοκο αναστολέας μπορεί να αλληλεπιδράσει με τις αμινοπεπτιδάσες. Αρχικά, μελετήθηκε η αναστολή της δραστικότητας της ERAP1 χρησιμοποιώντας 500 nM ελεύθερου στο διάλυμα DG078 και 500 nM συμπλόκου B*08-DG078 (εικόνα 89). Αξιοσημείωτο ήταν ότι το σύμπλοκο προκάλεσε σημαντική αναστολή της ενζυμικής δραστικότητας, αν και όχι σχεδόν πλήρη όπως συνέβη με τον ελεύθερο αναστολέα. Παρόμοιο μοτίβο αναστολής επαναλήφθηκε με τη LAP (εικόνα 90). Έπειτα, προσδιορίστηκε η σταθερά αναστολής του συμπλόκου B*08-DG078 έναντι της δραστικότητας της ERAP1 (εικόνα 91) και διαπιστώθηκε ότι είναι 4 φορές ασθενέστερη συγκριτικά με τον ελεύθερο αναστολέα. Επίσης, η καμπύλη αναστολής παρουσίαζε μικρότερη κλίση, γεγονός που υποδεικνύει πιο πολύπλοκο κινητικό φαινόμενο. Ακόμη, το σύμπλοκο B*08-DG078 ανέστειλε και την ενζυμική δραστικότητα της LAP (εικόνα 92), αν και η σταθερά αναστολής ήταν μόλις 30 % ασθενέστερη συγκριτικά με τον ελεύθερο αναστολέα. Εν κατακλείδι, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι ο αναστολέας DG078 έχει πρόσβαση στο ενεργό κέντρο της ERAP1 ενώ βρίσκεται δεσμευμένος στο σύμπλοκο HLA-B*08, ωστόσο δεν μπορεί να σχηματιστεί σταθερό τριμερές σύμπλοκο. Είναι πιθανό ότι ένα μικρό ποσοστό του πεπτιδίου αποδεσμεύεται από το πρωτεϊνικό σύμπλοκο και προκαλεί την αναστολή της ERAP1, καθώς η συγκέντρωση του B*08-DG078 στην αντίδραση ξεπερνάει κατά 50 φορές τη συγκέντρωση του ενζύμου. Συμπερασματικά, ο φαινομενικός καταβολισμός του πεπτιδίου στο σύμπλοκο B*08-ARAALRSRYWAI από την ERAP1 θα μπορούσε να οφείλεται σε γρήγορη αποδέσμευση του πεπτιδίου από το σύμπλοκο και συνεπακόλουθο καταβολισμό στο διάλυμα, παρά στον παροδικό σχηματισμό τριμερούς συμπλόκου.



Εικόνα 89: Σύγκριση της ενζυμικής δραστηριότητας της ERAP1 έναντι του υποστρώματος L-AMC: α) απουσία αναστολέα, β) παρουσία 500 nM πεπτιδίου DG078 και γ) παρουσία 500 nM πρωτεϊνικού συμπλόκου HLA B*08-DG078.



Εικόνα 90: Σύγκριση της ενζυμικής δραστηριότητας της LAP έναντι του υποστρώματος L-AMC: α) απουσία αναστολέα, β) παρουσία 500 nM πεπτιδίου DG078 και γ) παρουσία 500 nM πρωτεϊνικού συμπλόκου HLA B*08-DG078.

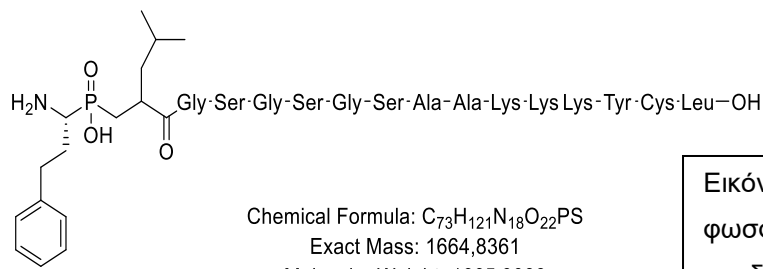


Εικόνες 91-92: Προσδιορισμός της σταθεράς αναστολής (inhibition constant, IC_{50}) του συμπλόκου B*08-DG078 έναντι της δραστηριότητας των αμινοπεπτιδασών ERAP1 και LAP ως προς το υπόστρωμα L-AMC μέσω φθορισμομετρίας.

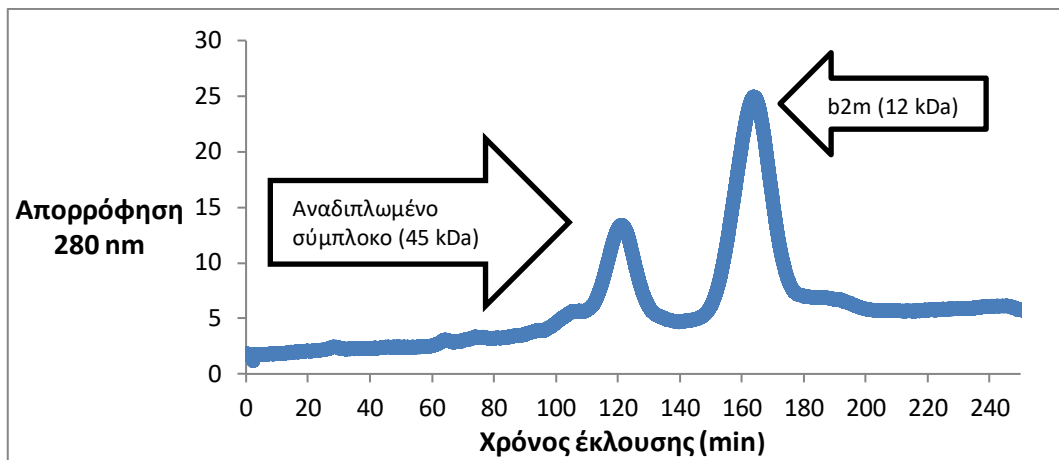
3.10. Έλεγχος σχηματισμού του τριμερούς συμπλόκου HLA B*08 E76C-φωσφινικό ψευδοπεπτίδιο-ERAP1

Σε πρόσφατη μελέτη (100) χρησιμοποιήθηκε 20μερές πεπτίδιο το οποίο έφερε Cys στο καρβοξυτελικό του άκρο ώστε να σχηματιστεί δισουλφιδικός δεσμός με το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο HLA B*08 E76C και να ακινητοποιηθεί το πεπτίδιο. Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε επώαση με ERAP1 και διαπιστώθηκε ότι το δεσμευμένο πεπτίδιο στο προσχηματισμένο σύμπλοκο μπορούσε να καταβολιστεί σε μήκος 14 αμινοξέων. Προκειμένου να ακολουθηθεί η ανωτέρω στρατηγική, συνετέθη το 16μερές φωσφινικό ψευδοπεπτίδιο DG080 (εικόνα 93), χρησιμοποιώντας τον επίτοπο AAKKKKYCL και εισάγοντας την αμινοτελική επέκταση (GS)₃. Αρχικά, απομονώθηκε το πρωτεϊνικό σύμπλοκο HLA B*08 E76C-DG080 με χρωματογραφία μοριακής διήθησης (εικόνα 94). Τα κλάσματα έκλουσης αναλύθηκαν με SDS-PAGE (εικόνα 95) και η ανίχνευση του πεπτιδίου στο σύμπλοκο πραγματοποιήθηκε με φασματομετρία μάζας MALDI-TOF έπειτα από πρόσθεση DTT ώστε να διασπαστεί ο δισουλφιδικός δεσμός (εικόνα 96). Έπειτα πραγματοποιήθηκε βιοφυσικός προσδιορισμός της θερμοδυναμικής σταθερότητας του συμπλόκου HLA B*08 E76C-DG080 (εικόνα 99). Στη συνέχεια προσδιορίστηκε η σταθερά αναστολής του φωσφινικού ψευδοπεπτιδίου DG080 έναντι της αμινοπεπτιδάσης ERAP1 (εικόνα 97) και πραγματοποιήθηκε σύγκριση της αναστολής του ενζύμου έναντι του υποστρώματος L-AMC παρουσία είτε 1 μM του πεπτιδίου DG080 είτε 1 μM του προσχηματισμένου συμπλόκου HLA B*08 E76C-DG080 (εικόνα 98). Στην ανωτέρω συγκέντρωση το ελεύθερο πεπτίδιο προκάλεσε σχεδόν πλήρη αναστολή του ενζύμου, ενώ το προσχηματισμένο σύμπλοκο μείωσε τη δραστηριότητα κατά 25 %. Τέλος, διερευνήθηκε η δυνατότητα σχηματισμού του τριμερούς συμπλόκου ERAP1-DG080-B*08 E76C μέσω της βιοχημικής μεθόδου μη αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης σε γέλη πολυακρυλαμιδίου (Native PAGE), ωστόσο δεν παρατηρήθηκε ορατή ένδειξη αλληλεπίδρασης του ενζύμου με το MHC I (εικόνα 100).

3.10.1. Σχηματισμός *in vitro* του πρωτεϊνικού συμπλόκου HLA-B*08 E76C με το φωσφινικό ψευδοπεπτιδίο DG080



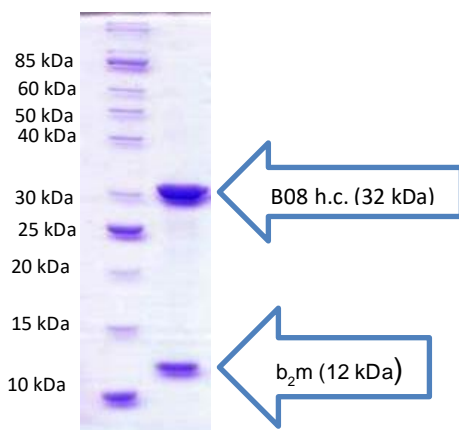
Εικόνα 93: Δομή του φωσφινικού ψευδοπεπτιδίου DG080



Εικόνα 94: Χρωματογράφημα μοριακής διήθησης του συμπλόκου HLA B*08 E76C με το πεπτιδίο DG080. Συλλέγονται τα κλάσματα έκλουσης 122-138 min

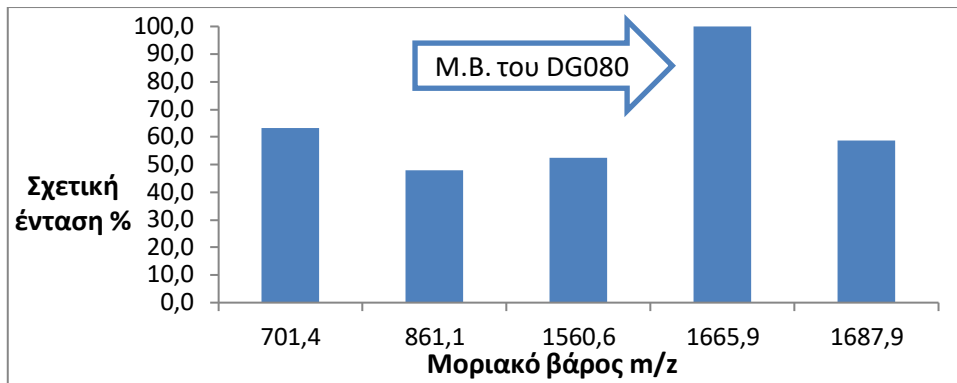
1η κορυφή: Αναδιπλωμένο σύμπλοκο HLA B*08 E76C-DG080 (45 kDa)

2η κορυφή: b₂m σε περίσσεια που αναδιπλώνεται ξεχωριστά (12 kDa)



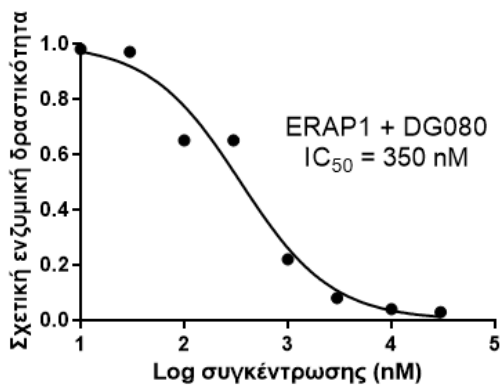
Εικόνα 95: SDS-PAGE των κλασμάτων έκλουσης που συλλέχθηκαν κατά τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης.

- 4) Δείκτης μοριακών βαρών p7704s
- 5) κλάσματα έκλουσης 122-138 min: Αναδιπλωμένο σύμπλοκο HLA B08 E76C-DG080 (45 kDa)

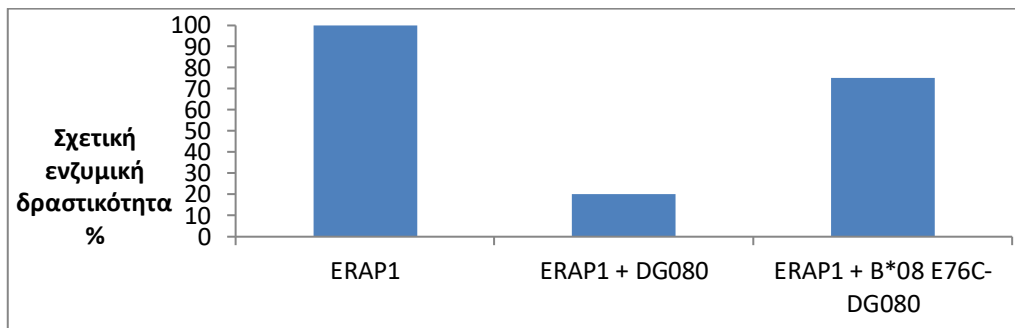


Εικόνα 96: Φασματομετρία μάζας MALDI-TOF των κλασμάτων έκλυσης 122-138 min μετά την προσθήκη 100 mM DTT, ώστε να διασπαστεί ο δισουλφιδικός δεσμός και να αποδεσμευτεί το πεπτιδίο. Το ψευδοπεπτιδίο DG080 έχει μοριακό βάρος 1665,9 Da.

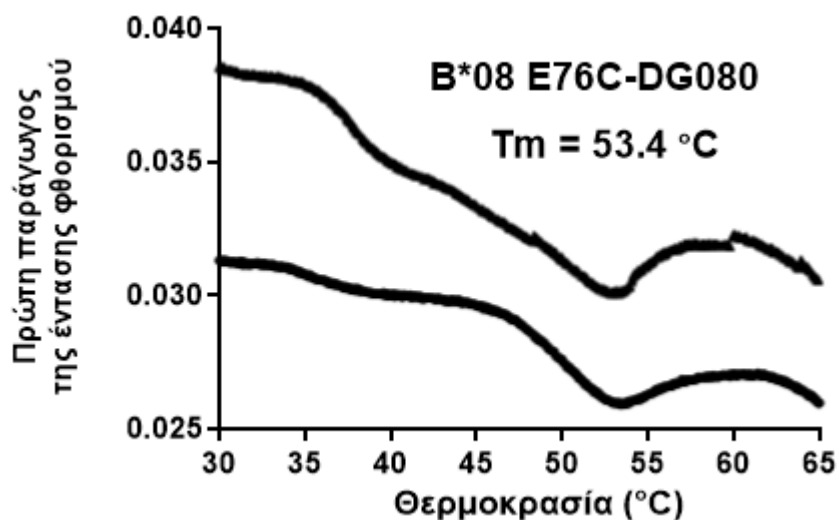
3.10.2. Προσδιορισμός της σταθεράς αναστολής του DG080 έναντι της δραστηριότητας της αμινοπεπτιδάσης ERAP1 και βιοφυσικός προσδιορισμός της θερμοδυναμικής σταθερότητας του συμπλόκου HLA B*08 E76C-DG080



Εικόνα 97: Προσδιορισμός της σταθεράς αναστολής (inhibition constant, IC_{50}) του πεπτιδίου DG080 έναντι της δραστηριότητας της αμινοπεπτιδάσης ERAP1 ως προς το υπόστρωμα L-AMC μέσω φθορισμομετρίας.

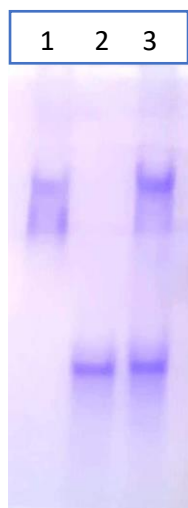


Εικόνα 98: Σύγκριση της ενζυμικής δραστηριότητας της ERAP1 έναντι του υποστρώματος L-AMC: α) απουσία αναστολέα, β) παρουσία 1 μ M πεπτιδίου DG080 και γ) παρουσία 1 μ M πρωτεϊνικού συμπλόκου HLA B*08 E76C-DG080.



Εικόνα 99: Διάγραμμα πρώτης παραγώγου της έντασης του φθορισμού (άξονας y) σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία (άξονας x). Το χαμηλότερο σημείο στον άξονα y αντιστοιχεί στη θερμοκρασία αποδιάταξης (T_m) του πρωτεϊνικού συμπλόκου.

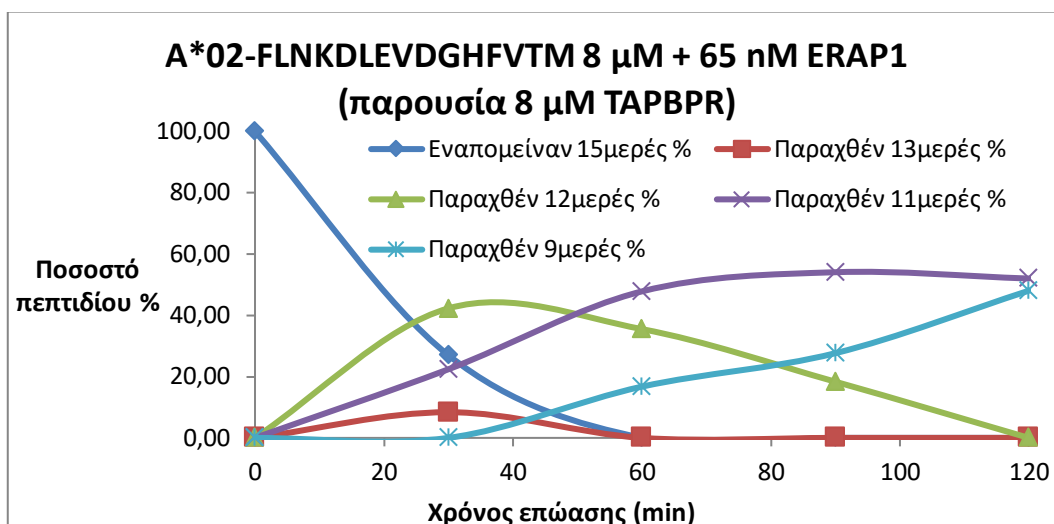
3.10.3. Διερεύνηση του πιθανού σχηματισμού του τριμερούς συμπλόκου ERAP1-DG080-HLA B*08 E76C



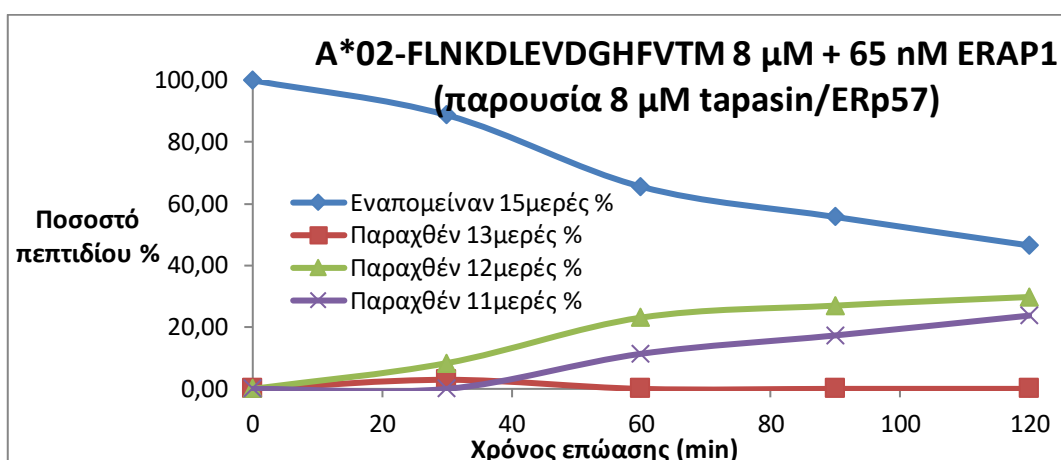
Εικόνα 100: Native PAGE του συμπλόκου B*08 E76C-DG080 παρουσία ERAP1

- 1) ERAP1 3 μg
- 2) HLA B*08 E76C-DG080 1,5 μg
- 3) ERAP1 3 μg + HLA B*08 E76C-DG080 1,5 μg

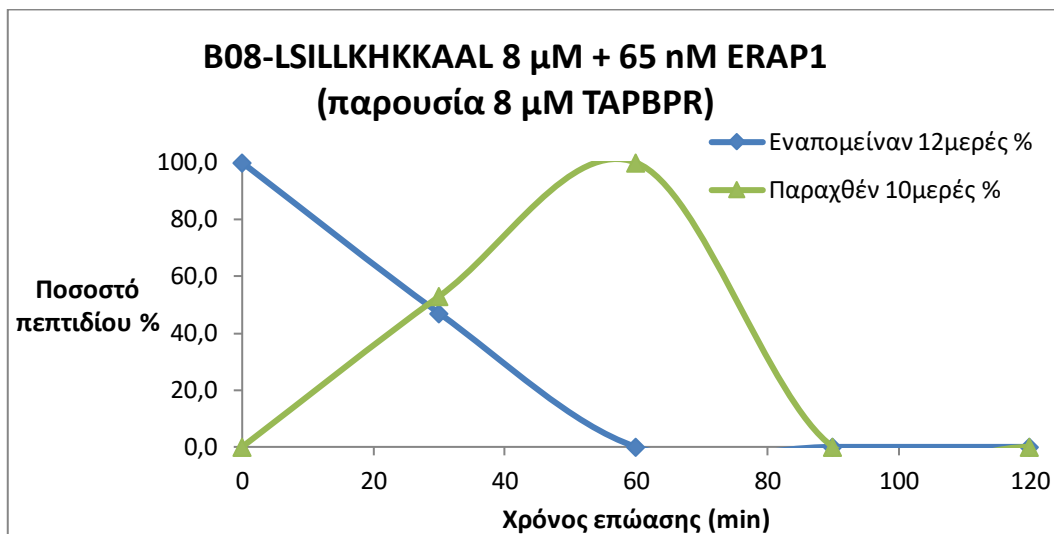
3.11. Παρακολούθηση του καταβολισμού των πεπτιδίων FLNKDLEVDGHHFVTM και LSILLKHKKAAL όταν βρίσκονται δεσμευμένα στα σύμπλοκα HLA A*02 και HLA B*08 w.t. αντιστοίχως, από την αμινοπεπτιδάση ERAP1 παρουσία της συνοδού πρωτεΐνης TAPBPR ή του διμερούς ταπασίνης/δισουλφιδικής ισομεράσης ERp57



Εικόνα 101: Επώαση του συμπλόκου A*02-FLNKDLEVDGHHFVTM με 65 nM ERAP1 παρουσία της συνοδού πρωτεΐνης TAPBPR. Ο χρόνος ημιζωής του πεπτιδίου ανέρχεται σε 11 ± 3 min ($R^2 = 0.99$). Το αποτέλεσμα αυτό προσομοιάζει με τον καταβολισμό του ελεύθερου πεπτιδίου (9 min, εικόνα 21) παρά με τον καταβολισμό του πεπτιδίου που βρίσκεται δεσμευμένο στο σύμπλοκο HLA-A*02 (139 min, εικόνα 20).



Εικόνα 102: Επώαση του συμπλόκου A*02-FLNKDLEVDGHFVTM με 65 nM ERAP1 παρουσία του διμερούς ταπασίνης/δισουλφιδικής ισομεράσης ERp57. Ο χρόνος ημιζωής του πεπτιδίου ανέρχεται σε 109 ± 9 min ($R^2 = 0.99$). Το αποτέλεσμα αυτό δε διαφέρει σημαντικά από το control (του πεπτιδίου που βρίσκεται δεσμευμένο στο σύμπλοκο HLA-A*02 και επωάζεται με ERAP1 απουσία συνοδών πρωτεϊνών, εικόνα 20), σε αντίθεση με το αποτέλεσμα που παρατηρείται παρουσία της TAPBPR.



Εικόνα 103: Επώαση του συμπλόκου B08-LSILLKHKKAAL με 65 nM ERAP1 παρουσία της συνοδού πρωτεΐνης TAPBPR. Ο χρόνος ημιζωής του πεπτιδίου ανέρχεται σε 20 ± 7 min ($R^2 = 0.96$). Το αποτέλεσμα αυτό προσομοιάζει με τον καταβολισμό του ελεύθερου πεπτιδίου (19 ± 5 min, εικόνα 50) παρά με τον καταβολισμό του πεπτιδίου που βρίσκεται δεσμευμένο στο σύμπλοκο HLA-B*08, το οποίο προστατεύεται πλήρως από τη δράση του ενζύμου (εικόνα 52). Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης το γεγονός ότι το πεπτίδιο LSILLKHKKAAL προστατεύεται πλήρως στο σύμπλοκο HLA-B*08, ακόμη και παρουσία του διμερούς ταπασίνης/δισουλφιδικής ισομεράσης ERp57.

Κεφάλαιο 4^ο: Συμπεράσματα-Συζήτηση

Διερευνήθηκε η δυνατότητα της ERAP1 να επεξεργαστεί συγκεκριμένα πρόδρομα και ώριμα αντιγονικά πεπτίδια, όταν τα τελευταία βρίσκονταν ελεύθερα στο διάλυμα αλλά και σε σύμπλοκο με τα αλληλόμορφα HLA-B*08:01 και HLA-A*02:01. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν αντιγονικά πεπτίδια μεγαλύτερα του βέλτιστου μήκους των 9 αμινοξέων (FLNKDLEVDGHFVTM και FVLELEPEWTVK), των οποίων τα καρβοξυτελικά και αμινοτελικά άκρα βρίσκονται θαμμένα εντός της αύλακας πρόσδεσης του HLA-A*02:01 ενώ το κεντρικό τμήμα προεξέχει, όπως προκύπτει από τις αντίστοιχες κρυσταλλικές δομές. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν αμινοτελικά εκτεταμένοι πρόδρομοι αντιγονικοί επίτοποι (LSILLKHKKAAL, ARAALRSRYWAI), οι οποίοι σχημάτιζαν σύμπλοκο με το αλληλόμορφο HLA-B*08:01. Η παρακολούθηση του καταβολισμού των πεπτιδίων είχε ως στόχο τη διερεύνηση της ενζυμικής κινητικής των αντιδράσεων, η οποία αποτελεί καθοριστικό παράγοντα ώστε να εκτιμηθεί αν κάποια αντίδραση είναι πιθανή σε ένα βιοχημικό μονοπάτι *in vivo*. Σε όλες τις περιπτώσεις διαπιστώθηκε ότι τα σύμπλοκα των δυο αλληλομόρφων MHC I προστάτευαν τα εκτεταμένα πεπτίδια από τον καταβολισμό, αντί να διευκολύνουν τη δράση του ενζύμου. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι η ERAP1 αδυνατούσε πλήρως να επεξεργαστεί τα πεπτίδια σε 2 περιπτώσεις προσχηματισμένων συμπλόκων (A*02:01-FVLELEPEWTVK και B*08:01-LSILLKHKKAAL), ενώ τα ίδια πεπτίδια όταν βρίσκονταν ελεύθερα στο διάλυμα υπέστησαν καταβολισμό από την ERAP1. Στην περίπτωση του συμπλόκου A*02:01-FLNKDLEVDGHFVTM, ο χρόνος ημιζωής του ελεύθερου πεπτιδίου στο διάλυμα κατόπιν επώασης με ERAP1, ήταν περισσότερο από μια τάξη μεγέθους χαμηλότερος συγκριτικά με το προσχηματισμένο σύμπλοκο και στις 2 συγκεντρώσεις ενζύμου που χρησιμοποιήθηκαν (20 και 100 nM).

Ενδιαφέρουσα περίπτωση αποτέλεσε το πεπτίδιο ARAALRSRYWAI, του οποίου ο χρόνος ημιζωής κατόπιν επώασης με την ERAP1 κυμαινόταν στην ίδια τάξη μεγέθους είτε βρισκόταν σε προσχηματισμένο σύμπλοκο με το αλληλόμορφο B*08:01 είτε βρισκόταν ελεύθερο στο διάλυμα. Ωστόσο ακόμη και σε αυτή την περίπτωση, δε σημειώθηκε μείωση του χρόνου ημιζωής του πεπτιδίου στο προσχηματισμένο σύμπλοκο όταν η συγκέντρωση του ενζύμου αυξήθηκε από τα 20 στα 100 nM. Αντίθετα, η μείωση του χρόνου ημιζωής όταν

το πεπτιδίο βρισκόταν ελεύθερο στο διάλυμα ήταν ταχύτερη και ανάλογη της αύξησης της συγκέντρωσης του ενζύμου. Η μεγάλη διαφορά μεταξύ των συμπλόκων του B*08:01 με τα 2 προαναφερθέντα 12μερή πεπτιδία ώθησε στην εξέταση της θερμοδυναμικής και κινητικής τους σταθερότητας με βιοφυσικές μεθόδους. Διαπιστώθηκε ότι το σύμπλοκο B*08:01-ARAALRSRYWAI ήταν θερμοδυναμικά και κινητικά αρκετά πιο ασταθές από το σύμπλοκο B*08:01-LSILLKHKKAAL. Επομένως, η γρήγορη αποδέσμευση του πεπτιδίου ARAALRSRYWAI από το MHC I πιθανώς ερμηνεύει το γρήγορο καταβολισμό του δεσμευμένου πεπτιδίου στο σύμπλοκο από την ERAP1. Πράγματι, η ταχύτητα καταβολισμού από το ένζυμο ήταν πιο αργή συγκριτικά με το ρυθμό αποδέσμευσης του πεπτιδίου από το σύμπλοκο. Το ανωτέρω αποτέλεσμα πιθανώς υποδηλώνει ότι η φαινομενική επεξεργασία του δεσμευμένου πεπτιδίου στο σύμπλοκο από την ERAP1 οφείλεται σε ένα μηχανισμό δυο σταδίων που περιλαμβάνει την αποδέσμευση του πεπτιδίου και κατόπιν καταβολισμό στο διάλυμα από το ένζυμο. Επομένως, η φαινομενική αποδόμηση του πεπτιδίου στη συγκεκριμένη περίπτωση οφείλεται στις ιδιότητες του συμπλόκου B*08:01-ARAALRSRYWAI κι όχι στο ένζυμο. Στο ανωτέρω συμπέρασμα συνηγορεί και το αποτέλεσμα που παρατηρήθηκε κατόπιν επώασης με την ομόλογη αμινοπεπτιδάση ERAP2 και την αμινοπεπτιδάση λευκίνης (LAP), οι οποίες επίσης διασπούσαν το 12μερές πεπτιδίο στο προσχηματισμένο σύμπλοκο B*08:01-ARAALRSRYWAI, αν και με διαφορετική ταχύτητα και παράγοντας διαφορετικά πεπτιδία-προϊόντα. Το προαναφερθέν αποτέλεσμα με την αμινοπεπτιδάση λευκίνης - η οποία δε σχετίζεται άμεσα με την αντιγονοπαρουσίαση και δεδομένου ότι εδράζεται στο κυτταρόπλασμα δε διαθέτει δυνατότητα αλληλεπίδρασης με το MHC I - υποδηλώνει ότι ο βιοχημικός μηχανισμός επεξεργασίας αντιγονικών πεπτιδίων που βρίσκονται μερικώς δεσμευμένα στο MHC I συγκεντρώνει λιγότερες πιθανότητες.

Η αποδέσμευση πεπτιδίων από το σύμπλοκο υποστηρίζεται και από τα αποτελέσματα της επώασης των συμπλόκων B*08-LSILLKHKKAAL και A*02-FLNKDLEVDGHFVMT με την αμινοπεπτιδάση ERAP1, με ταυτόχρονη παρουσία της συνοδού πρωτεΐνης TAPBPR. Το μοτίβο καταβολισμού των 2 ανωτέρω περιπτώσεων προσομοιάζει πολύ με εκείνο των ελεύθερων πεπτιδίων στο διάλυμα. Τα ανωτέρω πεπτιδία στα αντίστοιχα

προσχηματισμένα σύμπλοκα προστατεύονται είτε ολικώς (LSILLKHKKAAL) είτε μερικώς (FLNKDLEVDGHFVMT) από τη δράση του ενζύμου. Είναι πιθανό ότι η TAPBPR, η οποία καταλύει των ποιοτικό έλεγχο και την εναλλαγή πεπτιδίων, διευκολύνει την αποδέσμευση των 2 ανωτέρω πεπτιδίων από τα αντίστοιχα πρωτεϊνικά σύμπλοκα και ακολούθως η ERAP1 τα επεξεργάζεται στο διάλυμα.

Στην πρόσφατη βιβλιογραφία (119), αναφέρεται πραγματοποίηση της σημειακής μετάλλαξης B*08:01 E76C, η οποία εντοπίζεται εντός της αύλακας πρόσδεσης του υποστρώματος. Κατόπιν, χρησιμοποιήθηκε αμινοτελικά εκτεταμένο πεπτίδιο μήκους 20 αμινοξέων που έφερε Cys στο προτελευταίο αμινοξύ πριν το καρβοξυτελικό άκρο ώστε να σχηματιστεί δισουλφιδικός δεσμός. Ύστερα από επώαση του προσχηματισμένου συμπλόκου με ERAP1, διαπιστώθηκε ότι δεν υπήρχε καταβολισμός του ομοιοπολικά δεσμευμένου πεπτιδίου σε μήκος μικρότερο των 14 αμινοξέων. Αντίθετα, το ίδιο 20μερές πεπτίδιο διασπάστηκε σε μικρότερα πεπτίδια μήκους έως και 5 αμινοξέων κατόπιν επώασης με ERAP1, όταν βρισκόταν ελεύθερο στο διάλυμα. Στην παρούσα μελέτη, σχηματίστηκε το σύμπλοκο B*08:01 E76C-ARAALRSRYWCI και διαπιστώθηκε ότι το αμινοτελικό άκρο του δεσμευμένου πεπτιδίου ήταν μη προσβάσιμο από το ένζυμο. Τα ανωτέρω αποτελέσματα συνάδουν και υποδηλώνουν ότι το αμινοτελικά εκτεταμένο πεπτίδιο που βρίσκεται δεσμευμένο στο σύμπλοκο πρέπει να διαθέτει μήκος τουλάχιστον 15 αμινοξέων ώστε να προσεγγιστεί από την ERAP1, αλλιώς υφίσταται στερεοχημική παρεμπόδιση μεταξύ του ενζύμου και του MHC I.

Επίσης, χρησιμοποιήθηκε πεπτιδικό ανάλογο μήκους 12 αμινοξέων (DG078), το οποίο έφερε τη φωσφινική ομάδα στο αμινοτελικό του άκρο λειτουργώντας ως αναστολέας της ERAP1. Αφού σχηματίστηκε το σύμπλοκο B*08:01-DG078, πραγματοποιήθηκε σύγκριση της αναστολής της ενζυμικής δραστηριότητας της ERAP1 από το ελεύθερο στο διάλυμα φωσφινικό ψευδοπεπτίδιο και το προαναφερθέν προσχηματισμένο σύμπλοκο. Διαπιστώθηκε ότι η IC₅₀ του ελεύθερου πεπτιδίου ήταν κατά 4 φορές ισχυρότερη έναντι του προσχηματισμένου συμπλόκου (39 nM έναντι 167 nM, αντιστοίχως). Ωστόσο, διαπιστώθηκε με βιοχημική μέθοδο ότι ήταν αδύνατος ο σχηματισμός του τριμερούς συμπλόκου ERAP1-DG078-MHC I, αποτέλεσμα το οποίο επιβεβαιώνει τις προαναφερθείσες παρατηρήσεις στερεοχημικής

παρεμπόδισης σε μήκη πεπτιδίου μικρότερα των 14 αμινοξέων. Η ασυμφωνία μεταξύ της αδυναμίας σχηματισμού του τριμερούς συμπλόκου αλλά και της ταυτόχρονης δυνατότητας πρόσβασης του αμινοτελικού άκρου του δεσμευμένου DG078 στο ενεργό κέντρο του ενζύμου οδήγησε στη διερεύνηση της κινητικής σταθερότητας του συμπλόκου B*08:01-DG078. Διαπιστώθηκε ότι το πεπτίδιο στο ανωτέρω σύμπλοκο εμφάνιζε γρήγορο ρυθμό αποδέσμευσης, γεγονός που υποδηλώνει ότι ένα ποσοστό του πεπτιδίου αποδεσμεύεται από το σύμπλοκο MHC I κατά τη διάρκεια της αντίδρασης και αναστέλλει την ERAP1, δεδομένου ότι η συγκέντρωση του συμπλόκου υπερβαίνει κατά 50 φορές της συγκέντρωσης του ενζύμου και ο αναστολέας παρουσιάζει υψηλή συγγένεια με το ένζυμο.

Τα ανωτέρω αποτελέσματα οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η πιθανότητα σχηματισμού του τριμερούς συμπλόκου ERAP1-πεπτίδιο-MHC I *in vitro* απαιτεί ταυτόχρονα: i) τη χρησιμοποίηση ενός πεπτιδίου μήκους μεγαλύτερου των 15 αμινοξέων ώστε να αποφευχθεί η στερεοχημική παρεμπόδιση, ii) την ακινητοποίηση του καρβοξυτελικού άκρου του πεπτιδίου στο MHC I μέσω σχηματισμού δισουλφιδικού δεσμού και iii) την ύπαρξη φωσφινικής ομάδας στο αμινοτελικό άκρο του πεπτιδίου που θα λειτουργεί ως ανάλογο μεταβατικής κατάστασης και θα δεσμεύεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Προκειμένου να ακολουθηθεί η ανωτέρω στρατηγική, χρησιμοποιήθηκε το 16μερές φωσφινικό ψευδοπεπτίδιο DG080 και σχηματίστηκε σύμπλοκο με το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο B*08:01 E76C. Η IC₅₀ του αναστολέα στο διάλυμα έναντι της ERAP1 υπολογίστηκε στα 350 nM. Το δεσμευμένο φωσφινικό ψευδοπεπτίδιο στο σύμπλοκο MHC I σε συγκέντρωση 1 μM περιόρισε τη δραστηριότητα του ενζύμου κατά μόλις 25 %, ενώ όταν το πεπτίδιο βρισκόταν ελεύθερο στο διάλυμα η δραστηριότητα της ERAP1 μειώθηκε κατά 80 % χρησιμοποιώντας την ίδια συγκέντρωση αναστολέα. Το ανωτέρω αποτέλεσμα υποδηλώνει περιορισμένη πρόσβαση του ενζύμου στη φωσφινική ομάδα του αμινοτελικού άκρου του πεπτιδίου, το οποίο δε θα μπορούσε να έχει αποδεσμευθεί καθώς το καρβοξυτελικό του άκρο σχηματίζει δισουλφιδικό δεσμό με το σύμπλοκο MHC I. Όμως ακόμη και σε αυτή την περίπτωση, δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός του τριμερούς συμπλόκου *in vitro* κατά τη βιοχημική ανάλυση με Native PAGE. Η αντίφαση μεταξύ των 2 προαναφερθέντων αποτελεσμάτων πιθανώς ερμηνεύεται από τη

σχετικά χαμηλή συγγένεια του DG080 με το ένζυμο, επομένως θα απαιτούνταν υψηλές ποσότητες ενζύμου και συμπλόκου B*08:01 E76C-DG080, ώστε να παρατηρηθεί ελάχιστα σχηματισμός τριμερούς συμπλόκου.

Πρόσφατη μελέτη (133) επίσης συνηγορεί στο συμπέρασμα ότι η επεξεργασία πρόδρομων αντιγονικών πεπτιδίων από την ERAP1 σε προσχηματισμένα σύμπλοκα MHC I και κατά συνέπεια ο προσωρινός σχηματισμός του τριμερούς συμπλόκου δεν αποτελεί το βιοχημικό μονοπάτι που ακολουθεί το ένζυμο. Συγκεκριμένα, ένα φυσικό προϊόν που προέρχεται από το φυτό *Dodonaea viscosa* αναστέλλει *in vitro* και σε κύτταρα τη δραστηριότητα του ενζύμου ως προς τη δημιουργία του ώριμου αντιγονικού επιτόπου SIINFEKL κατόπιν επεξεργασίας του πρόδρομου αντιγονικού πεπτιδίου SGLEQLESIIINFEKL κατά δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Επομένως, ο συγκεκριμένος αναστολέας δρα ανταγωνιστικά ως προς τα αντιγονικά πεπτίδια και τους πρόδρομους αντιγονικούς επιτόπους. Ωστόσο, η ίδια ένωση ενισχύει τη δραστηριότητα του ενζύμου όσον αφορά στην υδρόλυση μικρών υποστρωμάτων (L-AMC) κατά 2-2.5 φορές. Η επίλυση της κρυσταλλικής δομής έδειξε ότι το φυσικό προϊόν προσδένεται στο ρυθμιστικό κέντρο της ERAP1 στην περιοχή που δεσμεύεται το καρβοξυτελικό άκρο των αντιγονικών πεπτιδίων, 25 Å μακρύτερα από το καταλυτικό κέντρο που περιέχει το ιόν ψευδαργύρου. Η περιοχή πρόσδεσης του ανωτέρω αλλοστερικού τροποποιητή επιβεβαιώθηκε μέσω μετάλλαξης 2 αμινοξέων (Tyr684Phe και Lys685Ala) στο ένζυμο, τα οποία πραγματοποιούν καθοριστικές αλληλεπιδράσεις με το φυσικό προϊόν. Πράγματι, η δραστηριότητα της μεταλλαγμένης ERAP1 ως προς το υπόστρωμα L-AMC παρουσία του φυσικού προϊόντος αποδείχθηκε πολύ μειωμένη συγκριτικά με το ένζυμο αγρίου τύπου. Συμπερασματικά, η λειτουργία της ERAP1 εντός των κυττάρων απαιτεί την πρόσβαση του καρβοξυτελικού άκρου των πρόδρομων αντιγονικών επιτόπων στο ρυθμιστικό κέντρο του ενζύμου, αφού η κατάλυση παρεμποδίζεται όταν προσδένεται ο αλλοστερικός αναστολέας σε εκείνη την περιοχή. Επομένως, η μερική πρόσδεση του καρβοξυτελικού άκρου ενός αμινοτελικά εκτεταμένου πεπτιδίου στο σύμπλοκο MHC I και η ταυτόχρονη επεξεργασία του αμινοτελικού άκρου του πεπτιδίου από την ERAP1 καθίσταται ανέφικτη, τουλάχιστον όσον αφορά στην περίπτωση του αντιγονικού επιτόπου SIINFEKL.

Εν κατακλείδι, πραγματοποιήθηκε μια ενδελεχής σύγκριση της

επεξεργασίας πεπτιδίων από την ERAP1, όταν τα τελευταία βρίσκονται είτε ελεύθερα στο διάλυμα είτε δεσμευμένα σε προσχηματισμένο σύμπλοκο με το MHC I. Διαπιστώθηκε ότι ο καταβολισμός στο διάλυμα είναι πάντοτε ταχύτερος καθώς τα σύμπλοκα προστατεύουν ως ένα βαθμό το πεπτίδιο από τη δράση του ενζύμου σε όλες τις περιπτώσεις. Επιπλέον παρατηρήθηκε ότι ο φαινομενικός καταβολισμός του δεσμευμένου πεπτιδίου σε προσχηματισμένο σύμπλοκο εξαρτάται από το ρυθμό αποδέσμευσης του πεπτιδίου ενώ δε βρέθηκαν ενδείξεις αλληλεπίδρασης της ERAP1 με το MHC I. Συνεπώς, συμπεραίνεται ότι τα πειραματικά αποτελέσματα μπορούν να ερμηνευθούν από την επαρκώς τεκμηριωμένη δυνατότητα της ERAP1 να επεξεργάζεται τα πρόδρομα αντιγονικά πεπτίδια στο διάλυμα και ότι οι παρούσες ενδείξεις μέχρι στιγμής δε δικαιολογούν την υιοθέτηση του βιοχημικού μονοπατιού επεξεργασίας πεπτιδίων σε προσχηματισμένα σύμπλοκα MHC I.

Συμπερασματικά, η ERAP1 εξακολουθεί να διαδραματίζει τον κυρίαρχο ρόλο στη διαμόρφωση του ανοσοπεπτιδιώματος, αφού οι αλληλεπιδράσεις των συμπλόκων MHC I - πεπτιδίων δεν επηρεάζουν τη δράση του ενζύμου ως προς την παραγωγή των ώριμων αντιγονικών επιτόπων. Ο καθορισμός του ακριβούς μηχανισμού δημιουργίας των αντιγονικών πεπτιδίων είναι σημαντικός για την ανάπτυξη αναστολέων, καθώς η ERAP1 αποτελεί αναδυόμενο φαρμακολογικό στόχο για την ανοσοθεραπεία του καρκίνου και τη ρύθμιση της αυτοανοσίας. Ως αποτέλεσμα, αν υιοθετούνταν το βιοχημικό μονοπάτι επεξεργασίας πρόδρομων επιτόπων μερικώς δεσμευμένων στο σύμπλοκο MHC I, τότε η έρευνα για την ανάπτυξη αποτελεσματικών και εκλεκτικών αναστολέων θα έπρεπε να ανακατευθυνθεί προς διαφορετική, πιο ευρεία διαμόρφωση της δομής του ενζύμου.

Βιβλιογραφία

1. Janeway's Immunobiology
2. Homef, M.W., Wick, M.J., Rhen, M., Normark, S., 2002. Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptive immune responses. *Nature Immunology* **3**, 1033-1040
3. De Smet, K., Contreras, R., 2005 Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins. *Biotechnology Letters* **27**,1337-1347
4. Gros, P., Milder, F.J., Janssen, B.J., 2008. Complement driven by conformational changes. *Nature Reviews Immunology* **8**, 48-58
5. Janssen, B.J., Huizinga, E.G., Raaijmakers, H.C., Roos, A., Daha, M.R., Nilsson-Ekdahl, K., Nilsson, B., Gros, P., 2005. Structures of complement component C3 provide insights into the function and evolution of immunity. *Nature* **437**, 505-511
6. Bohlsón, S.S., Fraser, D.A., Tenner, A.J., 2007. Complement proteins C1q and MBL are pattern recognition molecules that signal immediate and long-term protective immune functions. *Molecular Immunology* **44**, 33-43
7. Aderem, A., Underhill, D.M., 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annual Reviews Immunology* **17**, 593-623
8. Bogdan, C., Rollinghoff, M., Diefenbach, A., 2000. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Current Opinions Immunology* **12**, 64-76
9. Chertov, O., Yang, D., Howard, O.M., Oppenheim, J.J., 2000. Leukocyte granule proteins mobilize innate host defenses and adaptive immune responses. *Immunology Reviews* **177**, 68-78
10. Lanier, L.L., 2008. Evolutionary struggles between NK cells and viruses. *Nature Reviews Immunology* **8**, 259-268
11. Edelman, G.M., 1991. Antibody structure and molecular immunology. *Scandinavian Journal of Immunology* **34**, 4-22
12. Porter, R.R., 1991 Structural studies of immunoglobulins. *Scandinavian Journal of Immunology* **34**, 382-389.

13. Early, P., Huang, H., Davis, M., Calame, K., Hood, L., 1980. An immunoglobulin heavy chain variable region gene is generated from three segments of DNA: V_H, D and J_H, *Cell* **19**, 981-992
14. Hozumi, N., Tonegawa, S., 1976. Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. *PNAS* **73**, 3628-3632
15. Slifka, M.K., Antia, R., Whitmire, J.K., Ahmed, R., 1998. Humoral immunity due to long-lived plasma cells. *Immunity* **8**, 363-372
16. Murphy, K.M., Reiner, S.L., 2002. The lineage decisions of helper T cells. *Nature Reviews Immunology* **2**, 933-944
17. Garcia, K.C., Adams, E.J., 2005. How the T cell receptor sees antigen- a structural view. *Cell* **122**, 333-336
18. Al-Lazikani, B., Lesk, A.M., Chothia, C., 2000. Canonical structures for the hypervariable regions of T cell $\alpha\beta$ receptors. *Journal of Molecular Biology* **295**, 979-995
19. Rudolph, M.G., Stanfield, R.L., Wilson, I.A., 2006. How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Annual Reviews Immunology* **24**, 419-466.
20. Villadangos, J.A., 2001. Presentation of antigens by MHC class II molecules: getting the most out of them. *Molecular Immunology* **38**, 329-346
21. Uwy Usey, L.M., Ames Ughes, J.H., Imothy Chacker, T.S., Heresa Hea, T.S., Awrence Orey, L.C., Uliana M C E Lrath, M.J., 1997 Cytotoxic-t-cell responses, viral load, and disease progression in early human immunodeficiency virus type 1 infection. *The New England Journal of Medicine* **337**, 1267-1274
22. Khanna, R., Burrows, S.R., 2000. Role of Cytotoxic T Lymphocytes in Epstein-Barr virus-associated diseases. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**, 19-48
23. Neumann, H., Medana M., Bauer, J., Lassmann, H., 2002. Cytotoxic T-lymphocytes in autoimmune and degenerative diseases. *TRENDS in Neurosciences* **25**, 313-319
24. Rock, K., Reits, E., Neefjes, J., 2016. Present Yourself! By MHC Class I and MHC Class II Molecules. *Trends in Immunology* **37**, 724-737

25. Yaneva, R., Schneeweiss, E., Zacharias, M., Springer, S., 2010. Peptide binding to MHC class I and II proteins: New avenues from new methods. *Molecular Immunology* **47**, 649-657
26. Mallal, S., Nolan, D., Witt, C., Masel, G., Martin, A., Moore, C., Sayer, D., Castley, A., Mamotte, C., Maxwell, D., James, I., 2002. Association between presence of HLA-B*5701, HLA-DR7, and HLA-DQ3 and hypersensitivity to HIV-1 reverse-transcriptase inhibitor abacavir. *Lancet* **359**, 727–732
27. Chung, WH., Hung, Sl., Hong HS., Hsieh MS., Yang, LC., Ho, HC., Wu, JY., Chen, YT., 2004. Medical genetics: A marker for Stevens–Johnson syndrome *Nature* **428**, 486
28. Ozeki, T., Mushiroda, T., Yowang, A., Takahashi, A., Kubo, M., Shirakata, Y., Ikezawa Z., Iijima, M., Shiohara, T., Hashimoto, K., Kamatani, N., Nakamura, Y., 2011. Genome-wide association study identifies HLA-A*3101 allele as a genetic risk factor for carbamazepine-induced cutaneous adverse drug reactions in Japanese population. *Human Molecular Genetics* **20**, 1034-1041
29. Littera, R., Carcassi, C., Masala, A., Piano, P., Serra, P., Ortu, F., Corso, N., Casula, B., La Nasa, G., Contu, L., Manconi, P., 2006. HLA-dependent hypersensitivity to nevirapine in Sardinian HIV patients. *AIDS* **20**, 1621-1626
30. Fan W-L., Shiao, M-S., Hui, R., Su, S-C., Wang, C-W., Chang, Y-C., Chung W-H., 2017. HLA Association with Drug-Induced Adverse Reactions. *Journal of Immunology Research*, Article ID 3186328
31. Ramsbottom, K., Carr, D., Jones, A., Rigden D., 2018. Critical assessment of approaches for molecular docking to elucidate associations of HLA alleles with adverse drug reactions. *Molecular Immunology* **101**, 488-499
32. Illing, P.T., Vivian, J.P., Dudek, N.L., Kostenko, L., Chen, Z., Bharadwaj, M., Miles, J.J., Kjer-Nielsen, L., Gras, S., Williamson, N.A., Burrows, S.R., Purcell, A.W., Rossjohn, J., McCluskey, J., 2012. Immune self-reactivity triggered by drug-modified HLA-peptide repertoire. *Nature* **486**, 554–558

33. Chen B., Li, J., He, C., Li, D., Tong, W., Zou Y., Xu, W., 2017. Role of HLA-B27 in the pathogenesis of ankylosing spondylitis (Review). *Molecular medicine reports* **15**, 1943-1951
34. Dangoria, N., DeLay, M., Kingsbury, D., Mear, J., Uchanska-Ziegler, B., Ziegler, A., Colbert, R., 2002. HLA-B27 Misfolding Is Associated with Aberrant Intermolecular Disulfide Bond Formation (Dimerization) in the Endoplasmic Reticulum. *The journal of Biological Chemistry* **277**, 23459–23468
35. Antoniou, A., Ford, S., Taurog, J., Butcher, G., Powis, S., 2002. Formation of HLA-B27 Homodimers and Their Relationship to Assembly Kinetics. *The journal of Biological Chemistry* **279**, 8895–8902
36. Uchanska-Ziegler B., Ziegler, A., 2003. Ankylosing spondylitis: a b2m–deposition disease? *TRENDS in Immunology* **24**, 73-76
37. Narzi, D., Becker, C., Fiorillo, M., Uchanska-Ziegler, B., Ziegler, A., Böckmann, R., 2012. Dynamical Characterization of Two Differentially Disease Associated MHC Class I Proteins in Complex with Viral and Self-Peptides. *Journal of Molecular Biology* **415**, 429-442
38. Wallace, G., 2014. HLA-B*51 the primary risk in Behçet disease. *PNAS*, **111**, 8706-8707
39. Ombrello, M., Kirino, Y., de Bakker, P., Gül, A., Kastner, D., Remmers, E., 2014. Behçet disease-associated MHC class I residues implicate antigen binding and regulation of cell-mediated cytotoxicity. *PNAS* **111**, 8867–8872
40. Wei, J., Zanker, D., Carluccio, A., Smelkinson, M., Takeda, K., Seedhom, M., Dersh, D., Gibbs, J., Yang, N., Jadhav, A., 2017. Varied Role of Ubiquitylation in Generating MHC Class I Peptide Ligands. *The Journal of Immunology* **198**, 3835-3845
41. Lázaro, S., Gamarra, D., Del Val, M., 2015. Proteolytic enzymes involved in MHC class I antigen processing: A guerrilla army that partners with the proteasome. *Molecular Immunology* **68**, 72–76
42. Palmer, A., de Jong, A., Leestemaker, Y., Geurink, P., Wijdeven, R., Ovaa, H., Dolan, B., 2018. Inhibition of the Deubiquitinase Usp14 Diminishes Direct MHC Class I Antigen Presentation. *The Journal of Immunology* **200**, 928-936

43. Milner, E., Gutter-Kapon, L., Bassani-Strenberg, M., Barnea, E., Beer, I., Admon, A., 2013. The Effect of Proteasome Inhibition on the Generation of the Human Leukocyte Antigen (HLA) Peptidome. *Molecular & Cellular Proteomics* **12**, 1853–1864
44. Liepe, J., Marino, F., Sidney, J., Jeko, A., Bunting, D., Sette, A., Kloetzel, P., Stumpf, M., Heck, A., Mishto M., 2016. A large fraction of HLA class I ligands are proteasome-generated spliced peptides *Science* **354**, 354-358
45. Dolan, B., Li, L., Veltri, C., Ireland, C., Bennink, J., Yewdell, J., 2011. Distinct Pathways Generate Peptides from Defective Ribosomal Products for CD8 + T Cell Immunosurveillance. *The Journal of Immunology* **186**, 2065-2072
46. Kasteren, S., Overkleeft, H., Ovaas H., Neefjes, J., 2014. Chemical biology of antigen presentation by MHC molecules. *Current Opinion in Immunology* **26**, 21-31
47. Kisselev, A., Akopian, T., Woo, KM., Goldberg, A., 1999. The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes. Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 3363-3371
48. Mo, X., Cascio, P., Lemerise, K., Goldberg AL., Rock K., 1999. Distinct Proteolytic Processes Generate the C and N Termini of MHC Class I-Binding Peptides. *The Journal of Immunology* **163**, 5851-5859
49. Neefjes, J., Jongstra, M., Petra Paul, P., and Bakke, O., 2011. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nature Reviews Immunology* **11**, 823-836
50. Leone, P., Shin, E-C., Perosa, F., Vacca, A., Dammacco, F., Racanelli V., 2013. MHC Class I Antigen Processing and Presenting Machinery: Organization, Function, and Defects in Tumor Cells. *Journal of the National Cancer Institute* **105**, 1172-1187
51. Parcej, D., Tampé, R., 2010. ABC proteins in antigen translocation and viral inhibition. *Nature Chemical Biology* **6**, 572-580
52. Praest, P., Liaci, M., Friedrich F., Wiertz, E., 2018. New insights into the structure of the MHC class I peptide-loading complex and

- mechanisms of TAP inhibition by viral immune evasion proteins. *Molecular Immunology* **113**, 103-114
53. Bouvier, M., 2003. Accessory proteins and the assembly of human class I MHC molecules: a molecular and structural perspective. *Molecular Immunology* **39**, 697-706
54. Thomas, C., Tampé, R., 2019. MHC I chaperone complexes shaping immunity. *Current Opinions in Immunology* **58**, 9-15
55. Blees, A., Januliene, D., Hofmann, T., Koller, N., Schmidt, C., Trowitzsch, S., Moeller A., Tampé R., 2017. Structure of the human MHC-I peptide-loading complex. *Nature* **551**, 525–528
56. Dong G., Wearsch, P., Peaper, D., Cresswell, P., Reinisch K., 2009. Insights into MHC Class I Peptide Loading from the Structure of the Tapasin-ERp57 Thiol Oxidoreductase Heterodimer. *Immunity* **30**, 21–32
57. Thomas, C., Tampé, R., 2017. Structure of the TAPBPR-MHC I complex defines the mechanism of peptide loading and editing. *Science* **358**, 1060-1064
58. Morozov, G., Zhao, H., Mage, M., Boyd, L., Jiang, J., Dolan, M., Venna, R., Norcross, M., McMurtrey, C., Hildebrand, W., Schuck, P., Natarajan, K., Margulies, D., 2016. Interaction of TAPBPR, a tapasin homolog, with MHC-I molecules promotes peptide editing. *PNAS* **113**, E1006-E1015
59. Weimershaus, M., Evnouchidou, I., Saveanu, L., van Endert, P., 2013. Peptidases trimming MHC class I ligands. *Current opinion in Immunology* **25**, 90-96
60. Nguyen, T., Chang, S-C., Evnouchidou, I., York, I., Zikos, C., Rock, K., Goldberg, A., Stratikos, E., Stern, L., 2011. Structural Basis for Antigenic Peptide Precursor Processing by the Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase ERAP1. *Nature Structural & Molecular Biology* **18**, 604-613
61. Chang, S-C., Momburg, F., Bhutani, N., Goldberg, A., 2005. The ER aminopeptidase, ERAP1, trims precursors to lengths of MHC class I peptides by a “molecular ruler” mechanism. *PNAS* **102**, 17107-17112
62. Evnouchidou, I., Momburg, F., Papakyriakou, A., Chroni, A., Leondiadis, L., Chang, S-C., Goldberg, A., Stratikos, E., 2008. The Internal

- Sequence of the Peptide-Substrate Determines Its N-Terminus Trimming by ERAP1. *PLOS one* **3**, e3658
63. Hearn, A., York, I., Rock, K., 2009. The Specificity of Trimming of MHC Class I-Presented Peptides in the Endoplasmic Reticulum. *The Journal of Immunology* **183**, 5526-5536
64. York, I., Chang, S-C., Saric, T., Keys, J., Favreau, J., Goldberg, A., Rock, L., 2002. The ER aminopeptidase ERAP1 enhances or limits antigen presentation by trimming epitopes to 8–9 residues. *Nature Immunology* **3**, 1177-1184
65. Blanchard, N., Gonzalez, F., Schaeffer, M., Joncker, N., Cheng, T., Shastri, A., Robey, E., Shastri N., 2008. Immunodominant, protective response to the parasite *Toxoplasma gondii* requires antigen processing in the endoplasmic reticulum. *Nature Immunology* **9**, 937–944
66. Hammer, G., Gonzalez, F., Champsaur, M., Cado, D., Shastri, N., 2006. The aminopeptidase ERAAP shapes the peptide repertoire displayed by major histocompatibility complex class I molecules. *Nature Immunology* **7**, 103-112
67. Hammer, G., Gonzalez, F., James, E., Nolla H., Shastri, N., 2007. In the absence of aminopeptidase ERAAP, MHC class I molecules present many unstable and highly immunogenic peptides. *Nature Immunology* **8**, 101-108
68. Aldhamen, Y., Seregin, S., Rastall, D., Aylsworth, C., Pepelyayeva, Y., Busuito, C., Godbehre-Roosa, S., Kim, S., Amalfitano A., 2013. Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase-1 Functions Regulate Key Aspects of the Innate Immune Response. *PLOS one* **8**, e69539
69. Stamogiannos, A., Maben, Z., Papakyriakou, A., Mpakali, A., Kokkala, P., Georgiadis, D., Stern, L., Stratikos, E., 2017. Critical Role of Interdomain Interactions in the Conformational Change and Catalytic Mechanism of Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 1. *Biochemistry* **56**, 1546-1558
70. Saric, T., Chang S-C., Hattori, A., York, I., Markant, S., Rock, K., Tsujimoto, M., Goldberg, A., 2002. An IFN- γ -induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides. *Nature Immunology* **3**, 1169-1176

71. Alvarez-Navarro, C., de Castro, J., 2014. ERAP1 structure, function and pathogenetic role in ankylosing spondylitis and other MHC-associated diseases. *Molecular Immunology* **57**, 12-21
72. Reeves, E., Edwards, C., Elliott, T., James E., 2013. Naturally Occurring ERAP1 Haplotypes Encode Functionally Distinct Alleles with Fine Substrate Specificity. *The Journal of Immunology* **191**, 35-43
73. The Australo-Anglo-American Spondyloarthritis Consortium & the Wellcome Trust Case Control Consortium, 2011. Interaction between ERAP1 and HLA-B27 in ankylosing spondylitis implicates peptide handling in the mechanism for HLA-B27 in disease susceptibility. *Nature Genetics* **43**, 761-769
74. Harvey, D., Pointon, J., Evans, D., Karaderi, T., Farrar, C., Appleton, L., Sturrock, R., Stone, M., Oppermann, U., Brown, M., Paul Wordsworth, P., 2009. Investigating the genetic association between ERAP1 and ankylosing spondylitis. *Human Molecular Genetics* **18**, 4204-4212
75. Evnouchidou, E., Kamal, R., Seregin, S., Goto, Y., Tsujimoto, M., Hattori, A., 2011. Cutting Edge: Coding Single Nucleotide Aminopeptidase 1 Can Affect Antigenic Peptide Generation In Vitro by Influencing Basic Enzymatic Properties of the Enzyme. *The Journal of Immunology* **186**, 1909-1913
76. Genetic Analysis of Psoriasis Consortium & the Wellcome Trust Case Control Consortium 2010. A genome-wide association study identifies new psoriasis susceptibility loci and an interaction between HLA-C and ERAP1. *Nature Genetics* **42**, 985-990
77. Kirino, Y., Bertsias, G., Ishigatsubo, Y., Mizuki, N., Tugal-Tutkun, I., Seyahi, E., Ozyazgan, Y., Sacli, F., Erer, B., Inoko, H., Emrence, Z., Cakar, A., Abaci, N., Ustek, D., Satorius, C., Ueda, A., Takeno, M., Kim, Y., Wood, G., Ombrello, M., Meguro, A., Gül, A., Remmers, E., Kastner, D., 2013. Genome-wide association analysis identifies new susceptibility loci for Behçet's disease and epistasis between HLA-B*51 and ERAP1. *Nature Genetics* **13**, 202-207
78. Alvarez-Navarro, C., Martín-Esteban, A., Barnea, E., Admon, A., JosA. de Castro, J., 2015. Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 1 (ERAP1) Polymorphism Relevant to Inflammatory Disease Shapes the Peptidome

- of the Birdshot Chorioretinopathy-Associated HLA-A*29:02 Antigen. *Molecular & Cellular Proteomics* **14**, 1770-1780
79. Seregin, S., Rastall, D., Evnouchidou, I., Aylsworth, C., Quiroga, D., Kamal, R., Godbehere-Roosa, S., Blum, C., York, I., Stratikos, E., Amalfitano, A., 2013. Endoplasmic reticulum aminopeptidase-1 alleles associated with increased risk of Ankylosing Spondylitis reduce HLA-B27 mediated presentation of multiple antigens. *Autoimmunity* **46**, 497-508
80. Stamogiannos, A., Koumantou, D., Athanasios Papakyriakou, A., Stratikos, E., 2015. Effects of polymorphic variation on the mechanism of Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 1. *Molecular Immunology* **67**, 426-435
81. Kuiper, J., Rothova, A., de Boer, J., Radstake, T., 2015. The immunopathogenesis of birdshot chorioretinopathy; a bird of many feathers. *Progress in Retinal and Eye Research* **44**, 99-110
82. Aldhamen, Y., Pepelyayeva, Y., Rastall, D., Seregin, S., Zervoudi, E., Koumantou, D., Aylsworth, C., Quiroga, D., Godbehere, S., Georgiadis, D., Stratikos, E., Amalfitano, A., 2015. Autoimmune disease-associated variants of extracellular endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 induce altered innate immune responses by human immune cells. *Journal of Innate Immunology* **7**, 275-289
83. Stratikos, E., Stamogiannos, A., Zervoudi, E., Fruci, D., 2014. A role for naturally occurring alleles of endoplasmic reticulum aminopeptidases in tumor immunity and cancer pre-disposition. *Frontiers in Oncology* **4**, 1-10
84. Cifaldi, L., Lo Monaco, E., Forloni, M., Giorda, E., Lorenzi, S., Petrini, S., Tremante, E., Pende, D., Locatelli, F., Giacomini, P., Fruci, D., 2011. Natural Killer Cells Efficiently Reject Lymphoma Silenced for the Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase Associated with Antigen Processing. *Cancer Research* **71**, 1597-1606
85. James, E., Bailey, I., Sugiyarto G., Elliott T., 2013. Induction of Protective Antitumor Immunity through Attenuation of ERAAP Function. *The Journal of Immunology* **190**, 5839-5846

86. Fruci, D., Ferracuti, S., Limongi, M., Cunsolo, V., Giorda, E., Fraioli, R., Sibilio, L., Carroll, O., Hattori, A., van Endert, P., Giacomini P., 2006. Expression of Endoplasmic Reticulum Aminopeptidases in EBV-B Cell Lines from Healthy Donors and in Leukemia/Lymphoma, Carcinoma, and Melanoma Cell Lines. *The Journal of Immunology* **176**, 4869-4879
87. Kamphausen, E., Kellert, C., Abbas, T., Akkad, N., Tenzer, S., Pawelec, G., Schild, H., van Endert, P., Seliger, B., 2010. Distinct molecular mechanisms leading to deficient expression of ER-resident aminopeptidases in melanoma. *Cancer Immunology Immunotherapy* **59**, 1273-1284
88. Fruci, D., Giacomini, P., Nicotra, M., Forloni, M., Fraioli, R., Saveanu, L., van Endert, P., Natali P., 2008. Altered Expression of Endoplasmic Reticulum Aminopeptidases ERAP1 and ERAP2 in Transformed Non-Lymphoid Human Tissues. *Journal of Cellular Physiology* **216**, 742-749
89. Stoehr, C., Buettner-Herold, M., Kamphausen, E., Simone Bertz, S., Hartmann, A., Seliger, B., 2013. Comparative expression profiling for human endoplasmic reticulum-resident aminopeptidases 1 and 2 in normal kidney versus distinct renal cell carcinoma subtypes. *International Journal of clinical and experimental Pathology* **6**, 998-1008
90. Mehta, M., Jordanova, E., Kenter, G., Ferrone, S., Fleuren, G-J., 2008. Association of antigen processing machinery and HLA class I defects with clinicopathological outcome in cervical carcinoma **57**, 197-206
91. Ayshamgul, H., Ma, H., Ilyar, S., Zhang, LW., Abulizi, A., 2011. Association of defective HLA-I expression with antigen processing machinery and their association with clinicopathological characteristics in Kazak patients with esophageal cancer. *Chinese Medical Journal (Engl)* **124**, 341-346
92. Kuiper, J., Van Setten, J., Ripke, S., Van 'T Slot, R., Mulder, F., Missotten, T., Baarsma, G., Francioli, L., Pulit, S., De Kovel, C., Dam-Van Loon, N., Den Hollander, A., het Veld, P., Hoyng, C., Cordero-Coma, M., Martín, J., Llorenç, V., Arya, B., Thomas, D., Bakker, S., Ophoff, R., Rothova, A., De Bakker, P., Mutis, T., Koeleman, B., 2014. A genome-wide association study identifies a functional ERAP2

- haplotype associated with birdshot chorioretinopathy. *Human Molecular Genetics* **23**, 6081-6087
93. Cagliani, R., Riva, S., Biasin, M., Fumagalli, M., Pozzoli, U., Lo Caputo, S., Mazzotta, F., Piacentini, L., Bresolin, N., Mario Clerici, M., Sironi, M., 2010. Genetic diversity at endoplasmic reticulum aminopeptidases is maintained by balancing selection and is associated with natural resistance to HIV-1 infection. *Human Molecular Genetics* **19**, 4705–4714
94. Johnson, M., Roten, L., Dyer, T., East, C., Forsmo, S., Blangero, J., Brennecke, S., Austgulen, R., Moses, E., 2009. The *ERAP2* gene is associated with preeclampsia in Australian and Norwegian populations. *Human Genetics* **126**, 655-666
95. International Genetics of Ankylosing Spondylitis Consortium (IGAS) 2013. Identification of multiple risk variants for ankylosing spondylitis through high-density genotyping of immune-related loci. *Nature genetics* **45**, 730-738
96. Evnouchidou, E., Birtley, J., Seregin, S., Papakyriakou, A., Zervoudi, E., Samiotaki, M., Panayotou, G., Giastas, P., Petrakis, O., Georgiadis, D., Amalfitano, A., Saridakis, E., Mavridis, I., Stratikos, E., 2012. A Common Single Nucleotide Polymorphism in Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 2 Induces a Specificity Switch That Leads to Altered Antigen Processing. *The Journal of Immunology* **189**, 2383-2392
97. Mehta, A., Jordanova, E., Corver, W., van Wezel, T., Uh, H-W., Kenter, G., Fleuren, G., 2009. Single Nucleotide Polymorphisms in Antigen Processing Machinery Component ERAP1 Significantly Associate with Clinical Outcome in Cervical Carcinoma. *Genes, chromosomes & cancer* **48**, 410-418
98. Birtley, J., Saridakis, E., Stratikos, E., Mavridis, I., 2011. The Crystal Structure of Human Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 2 Reveals the Atomic Basis for Distinct Roles in Antigen Processing. *Biochemistry* **51**, 286-295
99. de Castro, J., Stratikos, E., 2019. Intracellular antigen processing by ERAP2: Molecular mechanism and roles in health and disease. *Human Immunology* **80**, 310-317

100. Saveanu, L., Carroll, O., Lindo, V., Del Val, M., Lopez, D., Lepelletier, Y., Greer, F., Schomburg, L., Fruci, D., Niedermann, G., van Endert, P., 2005. Concerted peptide trimming by human ERAP1 and ERAP2 aminopeptidase complexes in the endoplasmic reticulum. *Nature Immunology* **6**, 689-697
101. Evnouchidou, I., Weimershaus, M., Saveanu, L., van Endert, P., 2014. ERAP1-ERAP2 Dimerization Increases Peptide-Trimming Efficiency. *The Journal of Immunology* **193**, 901-908
102. Mpakali, A., Giastas, P., Mathioudakis, N., Mavridis, I., Saridakis, E., Stratikos, E., 2015. Structural basis for antigenic peptide recognition and processing by ER aminopeptidase 2. *Journal of Biological Chemistry* **290**, 26021-26032
103. Giastas, P., Mpakali, A., Papakyriakou, A., Lelis, A., Kokkala, P., Neu, M., Rowland, P., Liddle, J., Georgiadis, D., Stratikos, E., 2019. Mechanism for antigenic peptide selection by endoplasmic reticulum aminopeptidase 1. *PNAS* **116**, 26709-26716
104. Mobbs, J., Illing, P., Dudek, N., Brooks, A., Baker, D., Purcell, A., Rossjohn, J., Vivian, J., 2017. The molecular basis for peptide repertoire selection in the Human Leucocyte Antigen (HLA) C*06:02 molecule. *Journal of Biological Chemistry* **292**, 17203-17215
105. Lim, Y., Chen-Harris, H., Mayba, O., Lianoglou, S., Arthur Wuster, A., Bhangale, T., Khan, Z., Mariathasan, S., Daemen, A., Reeder, J., Haverty, P., Forrest, W., Brauer, M., Mellman, I., Albert, M., 2018. Germline genetic polymorphisms influence tumor gene expression and immune cell infiltration. *PNAS* **115**, E11701-E11710
106. Kuo, I-C., Kao, H-K., Huang, Y., Wang, C-I., Yi, J-S., Liang, Y., Liao, C-T., Yen, T-C., Wu, C-C., Chang, K-P., 2017. Endoplasmic reticulum aminopeptidase 2 involvement in metastasis of oral cavity squamous cell carcinoma discovered by proteome profiling of primary cancer cells. *Oncotarget* **8**, 61698-61708
107. Reeves, E., Wood, O., Ottensmeier, C., King, E., Thomas, G., Elliott, T., James, E., 2019. HPV Epitope Processing Differences Correlate with ERAP1 Allotype and Extent of CD8⁺ T-cell Tumor Infiltration in OPSCC. *Cancer Immunology Research* **7**, 1202-1213

108. Andrés, A., Dennis, M., Kretzschmar, W., Cannons, J., Shih-Queen Lee-Lin, S-Q, Hurle, B., NISC Comparative Sequencing Program, Schwartzberg, P., Williamson, S., Bustamante, C., Nielsen, R., Clark, A., Green, E., 2010. Balancing Selection Maintains a Form of *ERAP2* that Undergoes Nonsense-Mediated Decay and Affects Antigen Presentation. *PLOS Genetics* **6**, e1001157
109. Georgiadou, D., Hearn, A., Evnouchidou, E., Chroni, A., Leondiadis, L., York, I., Rock, K., Stratikos, E., 2010. Placental Leucine Aminopeptidase Efficiently Generates Mature Antigenic Peptides In Vitro but in Patterns Distinct from Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 1. *The Journal of Immunology* **185**, 1584-1592
110. Saveanu, L., Carroll, O., Weimershaus, M., Guermonprez, P., Firat, E., Lindo, V., Greer, F., Davoust, J., Kratzer, R., Keller, S., Niedermann, G., Endert, P., 2009. IRAP Identifies an Endosomal Compartment Required for MHC Class I Cross-Presentation. *Science* **325**, 213-216
111. Wallis, M., Lankford, M., Keller S., Vasopressin is a physiological substrate for the insulin-regulated aminopeptidase IRAP. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism* **293**, E1092–E1102
112. Mpakali, A., Saridakis, E., Harlos, K., Zhao, Y., Papakyriakou, A., Kokkala, P., Georgiadis, D., Stratikos, E., 2015. Crystal Structure of Insulin-Regulated Aminopeptidase with Bound Substrate Analogue Provides Insight on Antigenic Epitope Precursor Recognition and Processing. *The Journal of Immunology* **195**, 2842-2851
113. Mpakali, A., Saridakis, E., Harlos, K., Zhao, Y., Kokkala, P., Georgiadis, D., Giastas, P., Papakyriakou, A., Stratikos, E., 2017. Ligand-Induced Conformational Change of Insulin-Regulated Aminopeptidase: Insights on Catalytic Mechanism and Active Site Plasticity. *Journal of Medicinal Chemistry* **60**, 2963-2972
114. Mpakali, A., Maben, Z., Stern, L., Stratikos, E., 2019. Molecular pathways for antigenic peptide generation by ER aminopeptidase 1. *Molecular Immunology* **113**, 50-57

115. Infantes, S., Samino, Y., Lorente, E., Jiménez, M., García, R., Del Val, M., López D., 2010. Cutting Edge: H-2L^d Class I Molecule Protects an HIV N-Extended Epitope from In Vitro Trimming by Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase Associated with Antigen Processing. *The Journal of Immunology* **184**, 3351-3355
116. Kim, S., Lee, S., Shin, J., Kim, Y., Evnouchidou, I., Kim, D., Kim, Y-K., Kim, Y-E., Ahn, J-H., Riddell, S., Stratikos, E., Kim, V., Ahn, K., 2012. Human cytomegalovirus microRNA miR-US4-1 inhibits CD8+ T cell response by targeting the aminopeptidase ERAP1. *Nature Immunology* **12**, 984-991
117. Kanaseki, T., Blanchard, N., Hammer, G., Federico Gonzalez, F., Shastri, N., 2006. ERAAP Synergizes with MHC Class I Molecules to Make the Final Cut in the Antigenic Peptide Precursors in the Endoplasmic Reticulum. *Immunity* **25**, 795-806
118. Chen, H., Li, L., Weimershaus, M., Evnouchidou, I., van Endert, P., Bouvier, M., 2016. ERAP1-ERAP2 dimers trim MHC I-bound precursor peptides; implications for understanding peptide editing. *Scientific Reports* **6**, 28902
119. Li, L., Baltiwala, M., Bouvier, M., 2019. ERAP1 enzyme-mediated trimming and structural analyses of MHC I-bound precursor peptides yield novel insights into antigen processing and presentation. *Journal of Biological Chemistry* **294**, 18534-18544
120. Papakyriakou, A., and Stratikos, E., 2017. The Role of Conformational Dynamics in Antigen Trimming by Intracellular Aminopeptidases. *Frontiers in Immunology* **8**
121. McMurtrey, C., Trolle, T., Sansom, T., Remesh, S., Kaeffer, T., Bardet, W., Jackson, K., McLeod, R., Sette, A., Nielsen, M., Zajonc, D., Blader, I., Peters, B., Hildebrand, W., 2016. Toxoplasma gondii peptide ligands open the gate of the HLA class I binding groove. *eLife* **5**, e12556
122. Hassan, C., Chabrol, E., Jahn, L., Kester, M., de Ru, A., Drijfhout, J., Rossjohn, Falkenburg, F., Heemskerk, M., Gras, S., van Veelen, P., 2015. Naturally Processed Non-canonical HLA-A*02:01 Presented Peptides. *Journal of Biological Chemistry* **290**, 2593-2603

123. Tynan, F., Burrows, S., Buckle, A., Clements, C., Borg, N., Miles, J., Beddoe, T., Whisstock, J., Wilce, M., Silins, S., Burrows, J., Kjer-Nielsen, L., Kostenko, L., Purcell, A., McCluskey, J., Rossjohn, J., 2005. T cell receptor recognition of a 'super-bulged' major histocompatibility complex class I-bound peptide. *Nature Immunology* **6**, 1114-1122
124. Probst-Kepper, M., Hecht, H-J., Herrmann, H., Janke, V., Frank Ocklenburg, F., Klempnauer, J., van den Eynde, B., Siegfried Weiss, S., 2004. Conformational Restraints and Flexibility of 14-Meric Peptides in Complex with HLA-B*3501. *The Journal of Immunology* **173**, 5610-5611
125. Pymm, P., Illing, P. T., Ramarathinam, S. H., O'Connor, G. M., Hughes, V. A., Hitchen, C., Price, D. A., Ho, B. K., McVicar, D. W., Brooks, A. G., Purcell, A. W., Rossjohn, J., Vivian, J. P., 2017. MHC-I peptides get out of the groove and enable a novel mechanism of HIV-1 escape. *Nature Structural Molecular Biology* **24**, 387-394
126. Li, X., Lamothe, P. A., Walker, B. D., Wang, J. H., 2017. Crystal structure of HLA-B*5801 with a TW10 HIV Gag epitope reveals a novel mode of peptide presentation. *Cellular and Molecular Immunology* **14**, 631-634
127. Papakyriakou, A., Reeves, E., Beton, M., Mikolajek, H., Douglas, L., Cooper, G., Elliott, T., Werner, J., James, E., 2018. The partial dissociation of MHC class I-bound peptides exposes their N terminus to trimming by endoplasmic reticulum aminopeptidase 1. *Journal of Biological Chemistry* **293**, 7538-7548
128. Kochan, G., Escors, D., Breckpot, K., Guerrero-Setas, D., 2013. Role of non-classical MHC class I molecules in cancer immunosuppression. *Oncolimmunology* **2**, e26491
129. Bukur, J., Jasinski, S., Seliger, B., 2012. The role of classical and non-classical HLA class I antigens in human tumors. *Seminars in Cancer Biology* **22**, 350-358
130. Dendrou, C., Petersen, J., Rossjohn, J., Fugger, L., 2018. HLA variation and disease. *Nature Reviews Immunology* **18**, 325–339
131. Koumantou, D., Barnea, E., Martin-Esteban, A., Zachary Maben, Z., Papakyriakou, A., Mpakali, A., Kokkala, P., Pratsinis, H., Georgiadis,

- D., Stern, L., Admon, A., Stratikos, E., 2019. Editing the immunopeptidome of melanoma cells using a potent inhibitor of endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 (ERAP1). *Cancer Immunology, Immunotherapy* **68**, 1245-1261
132. Kochan, G., Krojer, T., Harvey, D., Fischer, R., Chen, L., Vollmar, M., von Delft, F., Kavanagh, K., Brown, M., Bowness, P., Wordsworth, P., 2011. Crystal structures of the endoplasmic reticulum aminopeptidase-1 (ERAP1) reveal the molecular basis for N-terminal peptide trimming. *PNAS* **108**, 7745-7750
133. Liddle, J., Hutchinson, J., Kitchen, S., Rowland, P., Neu, M., Ceconie, T., Holmes, D., Jones, E., Korczynska, J., Koumantou, D., Lea, J., Nickels, L., Pemberton, M., Phillipou, A., Schneck, J., Sheeder, H., Tinworth, C., Uings, I., Wojno-Picon, J., Young, R., Stratikos, E., 2020. Targeting the Regulatory Site of ER Aminopeptidase 1 Leads to the Discovery of a Natural Product Modulator of Antigen Presentation. *Journal of Medicinal Chemistry* **63**, 3348-3358
134. Jiang, J., Natarajan, K., Boyd L., Morozov, G., Mage, M., Margulies, D., 2017. Crystal structure of a TAPBPR–MHC I complex reveals the mechanism of peptide editing in antigen presentation. *Science* **358**, 1064-1068
135. Hermann, C., van Hateren, A., Trautwein, N., Neerincx, A., Duriez, P., Stevanovic, S., Trowsdale, J., Deane, J., Elliott, T., Boyle, L., 2015. TAPBPR alters MHC class I peptide presentation by functioning as a peptide exchange catalyst. *eLife* **4**, e09617
136. Ilca, T., Drexhage, L., Brewin, G., Peacock, S., Boyle, L., 2019. Distinct Polymorphisms in HLA Class I Molecules Govern Their Susceptibility to Peptide Editing by TAPBPR. *Cell Reports* **29**, 1621-1632

Ευχαριστίες

- 1) **Δρ. Στρατικός Ευστράτιος**, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών και Συνεργαζόμενος Ερευνητής, Εργαστήριο Χημείας Πρωτεϊνών, Ινστιτούτο Πυρηνικών & Ραδιολογικών Ερευνών & Τεχνολογίας Ενέργειας & Ασφάλειας, Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. Δημόκριτος

- 2) **Δρ. Καρπούζας Μιχαήλ**, Αναπληρωτής Καθηγητής, Διευθυντής Εργαστηρίου Φυσικής, Τμήμα Βιοτεχνολογίας Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

- 3) **Δρ. Μπεθάνης Κωνσταντίνος**, Επίκουρος Καθηγητής, Εργαστήριο Φυσικής, Τμήμα Βιοτεχνολογίας Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

- 4) **Δρ. Παπακυριακού Αθανάσιος**, Ερευνητής, Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών, Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. Δημόκριτος

- 5) **Δρ. Μπακάλη Αναστασία**, μεταδιδακτορική ερευνήτρια, Εργαστήριο Χημείας Πρωτεϊνών, Ινστιτούτο Πυρηνικών & Ραδιολογικών Ερευνών & Τεχνολογίας Ενέργειας & Ασφάλειας, Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. Δημόκριτος

«Με την άδειά μου, η παρούσα εργασία ελέγχθηκε από την Εξεταστική Επιτροπή μέσα από λογισμικό ανίχνευσης λογοκλοπής που διαθέτει το ΓΠΑ και διασταυρώθηκε η εγκυρότητα και η πρωτοτυπία της»

Παράρτημα

Δομή του συμπλόκου HLA-B*08:01 με το αντιγονικό πεπτιδίο ELRSRYWAI (κωδικός PDB: 7NUI)

Τα γονίδια της κατηγορίας HLA-B εμφανίζουν το μεγαλύτερο βαθμό πολυμορφισμού στο μείζον σύμπλοκο ιστοσυμβατότητας I, συγκριτικά με τα αλληλόμορφα των κατηγοριών HLA-A και HLA-C (1). Η κατηγορία HLA-B περιλαμβάνει σχεδόν 200 χαρακτηρισμένα αλληλόμορφα, τα περισσότερα εκ των οποίων προτιμούν ως κατάλοιπα αγκυροβόλησης τα αμινοξέα που εντοπίζονται στη θέση 2 από το αμινοτελικό άκρο και στο καρβοξυτελικό άκρο του πεπτιδίου (1). Ενδεικτικά, στη βάση δεδομένων Sypreithi προτίμηση για κατάλοιπα αγκυροβόλησης στις ανωτέρω θέσεις φέρουν τα ακόλουθα αλληλόμορφα HLA-B: B*18, B*07, B*15:10, B*15:16, B*27, B*35, B*37, B*38, B*39, B*40, B*41, B*44, B*45, B*47, B*49, B*50, B*51, B*53 και B*57. Ωστόσο, το αλληλόμορφο B*08:01 είναι μοναδικό μεταξύ των αλληλομόρφων HLA-B που έχουν μελετηθεί ως προς το γεγονός ότι οι ισχυρότερες αλληλεπιδράσεις στην αύλακα πρόσδεσης πραγματοποιούνται με τα αμινοξικά κατάλοιπα αγκυροβόλησης στις θέσεις 3 και 5 του πεπτιδίου (1). Η προτίμηση στη θέση 2 απουσιάζει στο B*08:01, ωστόσο ως κατάλοιπο αγκυροβόλησης θεωρείται και το καρβοξυτελικό άκρο (1). Στις θέσεις 3 και 5, το αλληλόμορφο HLA-B*08:01 παρουσιάζει προτίμηση για τα βασικά αμινοξέα Lys και Arg, όμως η προτίμηση για τη Lys είναι ισχυρότερη (1). Στη θέση 2 κυριαρχούν τα υδρόφοβα αμινοξέα, κυρίως Lys και Pro (1). Οι αμινοξικές διαφορές μεταξύ των αλληλομόρφων HLA-B συχνά περιλαμβάνουν την περιοχή μεταξύ των αμινοξέων 77-83 (1). Το HLA-B*08:01 διαφέρει σε 5 αμινοξέα από το HLA-B*08:02, όπως παρατηρείται στον παρακάτω πίνακα:

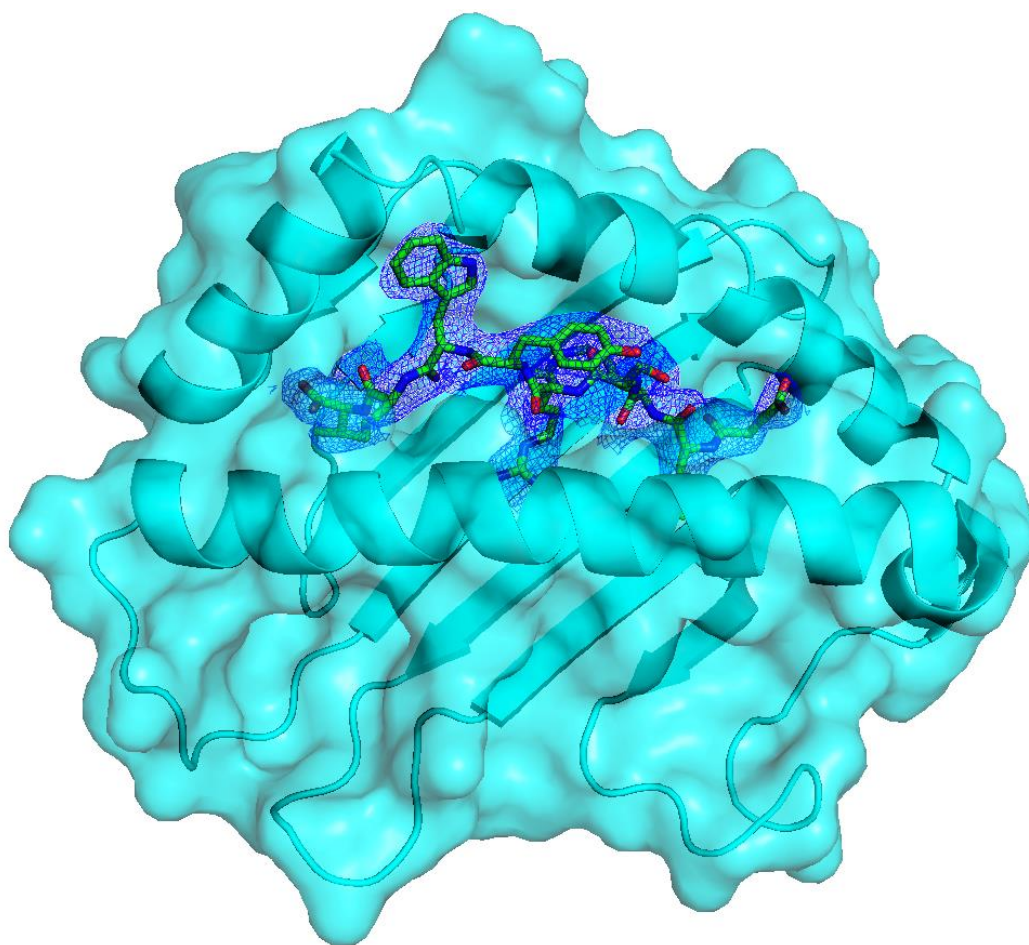
Αλληλόμορφο	Αμινοξύ				
	77 Ser	80 Asn	81 Leu	82 Arg	83 Gly
HLA-B*08:01	77 Ser	80 Asn	81 Leu	82 Arg	83 Gly
HLA-B*08:02	77 Asn	80 Thr	81 Ala	82 Leu	83 Arg

Ως αποτέλεσμα, παρατηρούνται διαφορές στην εξειδίκευση των καταλοίπων αγκυροβόλησης μεταξύ των αλληλομόρφων HLA-B*08:01 και HLA-B*08:02, με την κυριότερη να εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό άκρο: το B*08:01 προτιμά την ύπαρξη Leu ενώ το HLA-B*08:02 τη Phe.

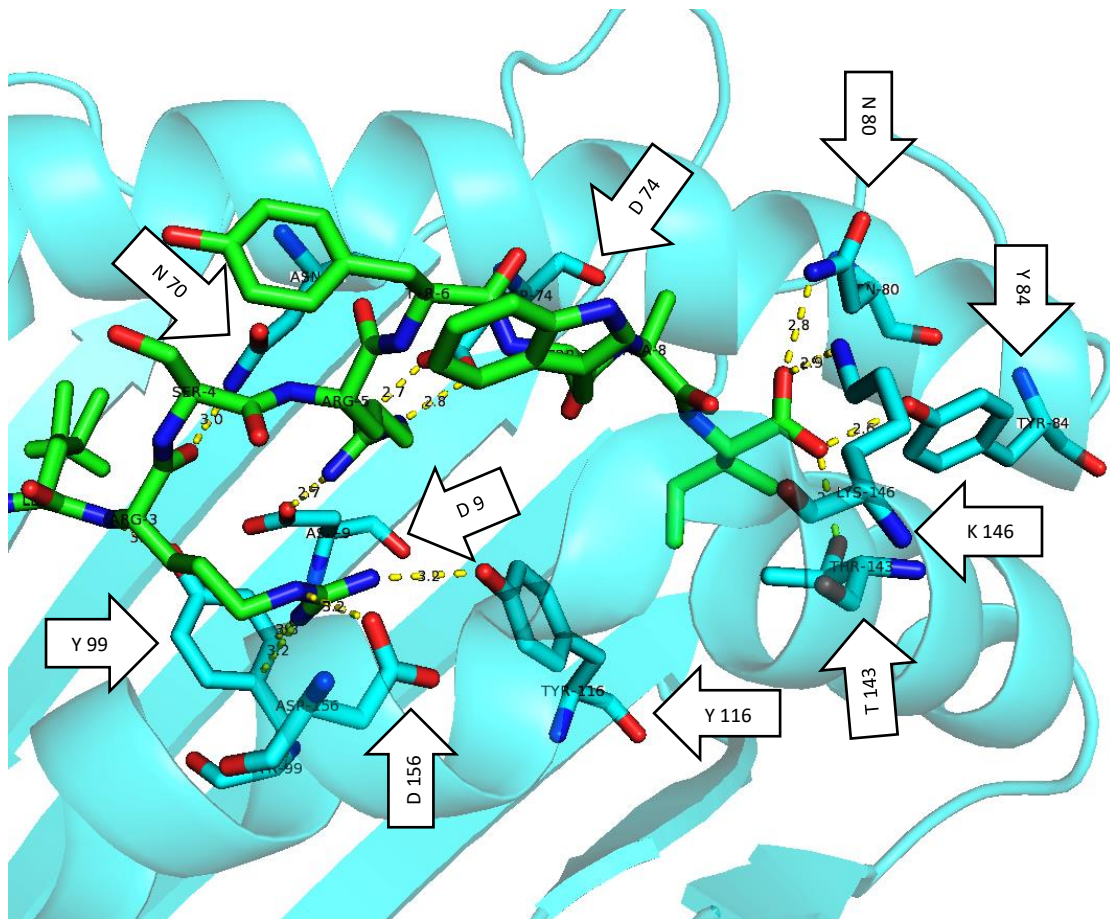
Το αλληλόμορφο HLA-B*08:01 ενδεχομένως συσχετίζεται με την εμφάνιση της ερπετοειδούς δερματίτιδας (Dermatitis Herpetiformis-DH), μιας σπάνιας αυτοάνοσης εξανθηματικής νόσου που συνδέεται με την ευαισθησία στη γλουτένη (2). Συγκεκριμένα, η αλληλούχιση DNA 24 ασθενών και 480 υγιών ατόμων Κινεζικού πληθυσμού έδειξε ότι το αλληλόμορφο HLA-B*08:01 ήταν παρόν στο 36.1 % του συνόλου των ασθενών αλλά μόνο στο 1.5 % του συνόλου των υγιών ατόμων (2). Επίσης, μελέτη έδειξε ότι το αλληλόμορφο HLA-B*08:01 είναι ο μοναδικός γενετικός παράγοντας εντός της χρωμοσωμικής περιοχής των γονιδίων HLA, ο οποίος ευθύνεται για την πρώιμη εκδήλωση της βαριάς μυασθένειας (Myasthenia Gravis-MD) σε ασθενείς Καυκάσιας εθνοτικής προέλευσης που φέρουν τον απλότυπο 8.1: HLA-A*01:01, HLA-B*08:01, DRB1*03:01, DQB1*02:01 (3). Πρόκειται για μια σπάνια αυτοάνοση ασθένεια που χαρακτηρίζεται από σοβαρή μυϊκή αδυναμία και μη φυσιολογική ευαισθησία στην κόπωση (3). Το HLA-B*08:01 προκαλεί ανοσολογική απόκριση μέσω αλληλεπίδρασης με τον υποδοχέα των Τ-κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων δεσμεύοντας και παρουσιάζοντας πεπτίδια τα οποία προέρχονται από τους ιούς Epstein-Bar (EBV), τον ιό της επίκτητης ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV), τον κυτταρομεγαλοϊό (CMV), τον ιό της ηπατίτιδας Β (HBV) και τους ιούς που προκαλούν δάγκειο και κίτρινο πυρετό (IEDB.org). Στις κρυσταλλικές δομές του αλληλομόρφου που έχουν επιλυθεί ανήκουν οι ακόλουθες:

- 1) B*08:01-FLRGRAYGL (PDB κωδικός: 1MI5). Το αντιγονικό πεπτίδιο προέρχεται από τον EBV. Το σύμπλοκο MHC I έχει συγκρυσταλλωθεί με τον υποδοχέα Τ-λεμφοκυττάρων LC13 (4).
- 2) B*08:01-ELRRKMMYM (PDB κωδικός: 4QRU). Το αντιγονικό πεπτίδιο προέρχεται από τον CMV (5).
- 3) B*08:01-GGKKKYKL (PDB κωδικός: 1AGD). Ο αντιγονικός επίτοπος προέρχεται από την πολυπρωτεΐνη Gag του HIV και περιορίζεται στο αλληλόμορφο HLA-B*08:01 (6).

Η ιδιαιτερότητα του ανωτέρω αλληλομόρφου ως προς την επιλογή των καταλοίπων αγκυροβόλησης συγκριτικά με τα υπόλοιπα HLA-B, οι γενετικές συσχετίσεις με τις προαναφερθείσες αυτοάνοσες παθήσεις και η δέσμευση πεπτιδίων προερχόμενων από τους ανωτέρω ιούς ώθησαν στην επιλογή του πεπτιδίου ELRSRYWAI για το σχηματισμό συμπλόκου με το HLA-B*08:01, την κρυστάλλωση και επίλυση της δομής του. Το πεπτίδιο με αλληλουχία ELRSRYWAI αποτελεί αντιγονικό επίτοπο (κωδικός IEDB: 13263) προερχόμενο από τη νουκλεοπρωτεΐνη (UniProt: Q8QPJ5) του ιού της γρίπης Α και η εκτιμώμενη *in silico* συγγένεια για το αλληλόμορφο HLA-B*08:01 είναι 6 nM. Το πρωτεϊνικό σύμπλοκο HLA B*08:01-ELRSRYWAI συμπυκνώθηκε έως 7.5 mg/mL σε ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM Tris-HCl pH 8 και 100 mM NaCl. Η κρυστάλλωση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο sitting drop vapor diffusion στη συνθήκη 0.2 M sodium iodide, 0.1 M Bis-Tris propane pH 6.5, 20 % w/v PEG 3350. Ο όγκος της σταγόνας ήταν 0.6 μL (0.3 μL πρωτεΐνης και 0.3 μL διαλύματος συνθήκης). Η πλάκα κρυστάλλωσης τοποθετήθηκε στους 16 °C και οι κρύσταλλοι σχηματίστηκαν εντός 2 εβδομάδων. Η κρυστοπροστασία των κρυστάλλων επετεύχθη με άμεση βύθιση για 10 δευτερόλεπτα σε διάλυμα 20% v/v αιθυλενογλυκόλης και 80 % v/v διάλυμα συνθήκης (mother liquor). Ακολούθως, εμβαπτίσθηκαν αμέσως σε υγρό άζωτο. Τα δεδομένα περίθλασης συλλέχτηκαν στους 100 K, μήκος κύματος 0.9763 Å, σε beamline P13 PETRA III στο synchrotron του Ευρωπαϊκού Εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας (EMBL) στο Αμβούργο της Γερμανίας. Η δομή επιλύθηκε με τη μέθοδο της μοριακής αντικατάστασης (molecular replacement) στο πρόγραμμα PHENIX χρησιμοποιώντας ως πρότυπο τη δομή με κωδικό PDB: 5WMQ (7).



Εικόνα 1: Ηλεκτρονική πυκνότητα (μπλε) των αμινοξέων του αντιγονικού πεπτιδίου ELRSRYWAI (πράσινο) εντός της αύλακας πρόσδεσης του υποστρώματος του HLA-B*08:01 (κυανό), της οποίας παρουσιάζεται η δευτεροταγής δομή.



Εικόνα 2: Αποστάσεις έως 3.4 Å των αμινοξικών καταλοίπων αγκυροβόλησης του πεπτιδίου (πράσινο) με τα αμινοξέα της αύλακας πρόσδεσης του υποστρώματος HLA-B*08:01 (κυανό). Η Arg στη θέση 3 αλληλεπιδρά με το υδροξύλιο της Tyr 99 (απόσταση 3 Å), το υδροξύλιο της Tyr 116 (απόσταση 3.2 Å), το οξυγόνο της πλευρικής αλυσίδας του Asp 156 (απόσταση 3.2 Å) και την Asn 70 (απόσταση 3 Å). Η Arg στη θέση 5 αλληλεπιδρά με την πλευρική αλυσίδα του Asp 9 (απόσταση 2.7 Å) και με τα 2 οξυγόνα της πλευρικής αλυσίδας του Asp 74 (αποστάσεις 2.7 και 2.8 Å). Η ισολευκίνη στη θέση 9 βρίσκεται θαμμένη στην F κοιλότητα της αύλακας και αλληλεπιδρά με την αμινομάδα της πλευρικής αλυσίδας της Asn 80 (απόσταση 2.8 Å), με το υδροξύλιο της Tyr 84 (απόσταση 2.6 Å), με το υδροξύλιο της πλευρικής αλυσίδας της Thr 143 (απόσταση 2.6 Å) και με την αμινομάδα της πλευρικής αλυσίδας της Lys 146 (απόσταση 2.9 Å). Τα αρωματικά αμινοξέα Tyr 6 και Trp 7 του πεπτιδίου εξέχουν από την αύλακα πρόσδεσης και αντιπροσωπεύουν άμεσες επαφές για αναγνώριση από τον υποδοχέα των κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων (7).

Πίνακας 1: Crystallographic data and refinement statistics

Space group	C 1 2 1
Cell	a = 90.24 Å, b = 40.21 Å, c = 125.98 Å α και γ = 90°, β = 101.53°
Data collection	
Temperature	100 K
Resolution	2 Å
Completeness	99.68
Redundancy	3.4
Unique reflections used	30184
Refinement	
Refinement program	Phenix.refine
Resolution (Å)	2
R _{factor}	21.8
R _{free}	27.5
RMSD from ideal bond lengths	0.0092
RMSD from ideal bond angles	0.98
Ramachandran statistics	
Ramachandran statistics Non Gly-Pro residues in most favored positions	96.56 %
Non Gly-Pro residues in additionally allowed regions	3.44 %

1. Arnett, K., Huang, W., Valiante, N., Barber, L., Parham, P., 1998. The Bw4/Bw6 difference between HLA-B*0802 and HLA-B*0801 changes the peptides endogenously bound and the stimulation of alloreactive T cells. *Immunogenetics* **48**, 56-61
2. Sun, Y., Lin, Y., Yang, B., Wang, C., Fu, X., Bao, F., Yu, G., Zhang, Q., Wang, Z., Zhou, G., Chen, X., Wu, M., Wang, G., Liu, H., Liu, J., Zhang, F., 2016. The HLA Alleles B*0801 and DRB1*0301 Are Associated with Dermatitis Herpetiformis in a Chinese Population. *Journal of Investigative Dermatology* **136**, 530-532
3. Varade, J., Wang, N., Lim, C., Zhang, T., Zhang, Y., Liu, X., Piehl, F., Matell, R., Cao, H., Xu, X., Hammarström, L., 2017. Novel genetic loci associated HLA-B*08:01 positive myasthenia gravis. *Journal of Autoimmunity* **88**, 43-49
4. Nielsen, L., Clements, C., Purcell, A., Brooks, A., Whisstock, J., Burrows, S., McCluskey, J., Rossjohn, J., 2003. A Structural Basis for the Selection of Dominant $\alpha\beta$ T Cell Receptors in Antiviral Immunity. *Immunity* **18**, 53-64
5. Smith, C., Gras, S., Brennan, R., Bird, N., Valkenburg, S., Twist, K-A., Burrows, J., Miles, J., Chambers, D., Bell, S., Campbell, S., Kedzierska, K., Burrows, S., Rossjohn, J., Khanna, R., 2014. Molecular Imprint of Exposure to Naturally Occurring Genetic Variants of Human Cytomegalovirus on the T cell Repertoire. *Scientific Reports* **4**, 3993
6. Reid, S., McAdams, S., Smith, K., Klenerman, P., O'Callaghan, C., Harlos, K., Jakobsen, B., McMichael, A., Bell, J., Stuart, D., Jones, E.Y., 1996. Antagonist HIV-1 Gag Peptides Induce Structural Changes in HLA B8. *Journal of Experimental Medicine* **184**, 2279-2286
7. Rowntree, L., Nguyen, T., Halim, H., Purcell, A., Rossjohn, J., Gras, S., Kotsimbos T., Mifsud, N., 2018. Inability To Detect Cross-Reactive Memory T Cells Challenges the Frequency of Heterologous Immunity among Common Viruses. *The Journal of Immunology* **200**, 3993-4003