

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Μελέτη της λειτουργίας της πρωτεΐνης της ντομάτας

LeRpt5 (LeMA-1 *Lycopersicon esculentum* Mg-
dependent ATPase-1), σε φυτά.

ΚΟΝΤΟΔΗΜΟΥ Α. ΑΡΓΥΡΩ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2002

Error! Style not defined.

Στους γονείς μου

Ευχαριστίες

Ευχαριστώ όλους τους συναδέλφους στο εργαστήριο για την φιλία τους και την συμπαράστασή τους. Η παρέμβασή τους στάθηκε αποφασιστική, ειδικά σε κρίσιμες στιγμές.

Ευχαριστώ την Μαίρη Προβιδάκη για χιλιάδες λόγους, επιστημονικούς και μή, αλλά κυρίως γιατί ήταν πάντα εκεί με χαμόγελο.

Ευχαριστώ την Dr Michela Dentì που είχε πάντα χρόνο να ακούσει, να βοηθήσει, να δώσει κάποια καλή ιδέα, και να είναι και πολύ καλή φίλη.

Ευχαριστώ την Αλεξάνδρα Μπούτλα που βγήκε αρκετές φορές απο τον δρόμο της για να βοηθήσει, ειδικά όταν δεν υπήρχε κανένας άλλος να το κάνει.

Ευχαριστώ τον Στέλιο Μαυράκη για την πολύτιμη βοήθειά του και την φροντίδα που πρόσφερε στα φυτά μου όσο εγω τα «κατέστρεφα».

Ευχαριστώ το Emilio Martinez, τον Christian Hamman, τον Κρίτωνα Καλαντίδη και την Σεργία Τζωρτζακάκη, η παρουσία τους έκανε την ζωή στα εργαστήρια ευχάριστη.

Ευχαριστώ επίσης την Ντίνα Κοτσυφάκη για την βοήθειά και τις συμβουλές της στις βιοχημικές τεχνικές ανάλυσης πρωτεϊνών και την Νατάσσα Ταμπακάκη για όλες τις συζητήσεις που πάντα οδήγησαν σε κάποιο συμπέρασμα.

Ειδικά οφείλω ενα μεγάλο ευχαριστώ στην Δρ Δέσποινα Αλεξανδράκη, η οποία, σαν μέλος της τριμελούς επιτροπής, συνέβαλε ουσιαστικά στην ολοκλήρωση της εργασίας αυτής, σε όλη την πορεία της.

Τέλος, ευχαριστώ τον σύζυγό μου Μιχάλη Αθανασάκη, που χωρίς την επιμονή και την υπομονή του η εργασία αυτή δεν θα είχε φτάσει ποτέ σε τέλος.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Π Ε Ρ Ι Ε Χ Ο Μ Ε Ν Α	<i>i</i>
Περίληψη	<i>1</i>
Abstract	<i>2</i>
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	<i>1</i>
A. Πρωτεΐνες AAA	<i>1</i>
Εισαγωγή	<i>1</i>
1. Μηχανισμός δράσης των AAA πρωτεϊνών	<i>2</i>
1.1. Λειτουργίες των AAA πρωτεϊνών	<i>2</i>
1.1.1 Ξεδίπλωμα πρωτεϊνών για πρωτεόλυση ή αναδίπλωση	<i>2</i>
1.1.2 Διάσπαση πρωτεϊνικών συμπλόκων	<i>3</i>
1.1.3 Μοριακοί κινητήρες	<i>4</i>
1.2. Δομές των AAA πρωτεϊνών	<i>4</i>
1.2.1 Συμμετρικοί δακτύλιοι.....	<i>4</i>
1.2.2 Ασύμμετροι δακτύλιοι	<i>5</i>
2. Οι AAA πρωτεΐνες	<i>5</i>
2.1. Ευβακτηριακές μεταλλοπρωτεάσες	<i>5</i>
2.2. AAA ρυθμιστικές πρωτεΐνες του πρωτεασώματος	<i>8</i>
2.3. AAA πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τον κυτταρικό σκελετό	<i>16</i>
2.4. AAA πρωτεΐνες σύντηξης μεμβρανών	<i>17</i>
B. Το Πρωτεάσωμα	<i>20</i>
Εισαγωγή	<i>20</i>
1. Δομή και υπομονάδες του 20S πρωτεασώματος	<i>20</i>
2. Η 26S Πρωτεάση	<i>25</i>
2.1 Το πρωτεάσωμα 20S και τα σύμπλοκα με τα οποία αλληλεπιδρά	<i>25</i>
2.2 Ανάλυση της δομής και της λειτουργίας του Ρυθμιστικού σωματιδίου (RP, ή PA700).....	<i>27</i>
2.2.1 Η βάση και οι AAA ATPάσες	<i>35</i>
2.2.2 Το καπάκι	<i>36</i>
2.3 Ο ρυθμιστής (modulator).....	<i>38</i>
2.4. Σύμπλοκα που σχετίζονται με τον PA700	<i>39</i>
2.5 Πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την 26S πρωτεάση: συνεργάτες και υποκαταστάτες.....	<i>40</i>
2.6 Με ουβικιτίνη ή χωρίς ουβικιτίνη;	<i>44</i>
2.7 Ο PA28	<i>47</i>
3. Το πρωτεάσωμα και η παρουσίαση αντιγόνων	<i>48</i>
3.1 Σύσταση του 20S ανοσοπρωτεασώματος.....	<i>48</i>
3.2 PA28, και τα ανοσοπρωτεασώματα.....	<i>50</i>
4. Το πρωτεάσωμα: τελική και μοναδική επιλογή;	<i>52</i>
5. Η ουβικιτίνη και οι συγγενείς πεπτιδικές αλυσίδες	<i>53</i>
5.1 UDPs	<i>54</i>
5.2 UBLs	<i>55</i>
5.3 SUMO (Small Ubiquitin-related Modifier)	<i>55</i>
5.4 RUB (Related to Ubiquitin),.....	<i>56</i>
5.5 Η Ουβικιτίνη.....	<i>57</i>
6. ATP-εξαρτώμενες πρωτεάσες	<i>62</i>
Γ. Γονιδιακή σίγηση μέσω RNA	<i>66</i>
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	<i>70</i>
Εισαγωγή	<i>70</i>

LeMA-1, ή LeRpt5 (<i>Lycopersicon esculentum</i> Regulatory Particle Triple-A ATPase 5)	70
1. Παρασκευή, έλεγχος και εμπλουτισμός του ορού σε ειδικά για την LeMA-1 αντισώματα.....	71
1.1 Καθαρισμός του αντισώματος με στήλη ανοσοσυγγένειας	74
2. Πειράματα ανοσοεντοπισμού της LeMA-1 σε φυτά.	76
2.1 Η LeMA-1 εντοπίζεται σε όλους τους φυτικούς ιστούς	76
2.2 Η LeMA-1 εντοπίζεται σε πυρήνες αλλά όχι σε χλωροπλάστες	78
2.3 Η LeMA-1 εντοπίζεται σε φύλλα διαφόρων φυτών	79
3. Πειράματα υπερέκφρασης της LeMA-1 σε φυτά με το σύστημα του PVX.....	80
3.1 Το σύστημα έκφρασης ξένων γονιδίων σε φυτά μέσω του ιικού φορέα PVX	80
3.2 Κατασκευές	82
3.2.1 Κατασκευές σε GC3:	82
3.2.2 Κατασκευές στον pPVX202	83
3.2.2.1 p2Lema	83
3.2.2.2 Κατασκευές ελλείψεων	84
3.2.2.3 Κατασκευές με κατεστραμμένο πλαίσιο διαβάσματος	85
3.2.2.4 Κλωνοποιήσεις μεταλλαγμάτων της LeMA-1	85
3.2.2.5 Κλωνοποιήσεις τμημάτων των υπολοίπων ΑΤΡασών του πρωτεασώματος ντομάτας σε PVX	85
3.2.3 Κατασκευές σε bluescript KSII	86
3.3 Πειράματα υπερέκφρασης της LeMA-1 σε φυτά	87
3.3.1 Πειράματα έκφρασης της LeMA-1 σε φυτά με τον φορέα GC3	87
3.3.2 Η έκφραση της LeMA-1 σε φυτά με τον φορέα pPVX202 προκαλεί θνησιγόνο φαινότυπο	88
3.3.3 Η έκφραση ελλειπτικών τμημάτων της LeMA-1 σε φυτά προκαλεί θνησιγόνο φαινότυπο παρόμοιο με εκείνο που παρατηρείται με ολόκληρη την πρωτεΐνη	99
3.3.4 Πειράματα ελέγχου της ποιότητας των εκχυλισμάτων RNA των μολυσμένων φυτών. 105	
3.3.5 Η έκφραση του τμήματος RNA της LeMA-1 που περιέχει τα πρώτα 740 νουκλεοτίδια (pMscNF), το οποίο περιέχει διακοπή του πλαισίου διαβάσματος μετά το 43 ^ο αμινοξύ, προκαλεί θνησιγόνο φαινότυπο!	107
3.3.6 Έκφραση τμημάτων της LeMA-1 που δεν παράγουν πρωτεΐνη προκαλούν θνησιγόνο φαινότυπο	111
3.3.7 Η έκφραση τμημάτων των υπολοίπων AAA ΑΤΡασών του πρωτεασώματος σε φυτά συνοδεύεται από θνησιγόνους φαινοτύπους	115
4. Περίληψη αποτελεσμάτων	119
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ, ΣΥΖΗΤΗΣΗ	125
ΥΛΙΚΑ και ΜΕΘΟΔΟΙ.....	131
1. Το αντίσωμα.....	131
1.1 Παρασκευή αντισώματος για την LeMA-1	131
1.2 Τιτλοδότηση αντισώματος με την τεχνική ELISA	131
1.3 Καθαρισμός αντισώματος με θειικό αμμώνιο (NH ₄ SO ₄)	131
1.4 Καθαρισμός αντισώματος από στήλη ανοσοσυγγένειας	132
1.4.1 Κατασκευή της στήλης ανοσοσυγγένειας	132
1.4.2 Καθαρισμός του αντισώματος από στήλη ανοσοσυγγένειας	133
2. Βακτήρια	134
2.1 Βακτηριακά στελέχη	134
2.2 Παρασκευή κυττάρων επιδεκτικών σε μετασηματισμό	134
2.3 Μετασηματισμός Βακτηρίων	134
2.4 Καλλιέργεια βακτηρίων	135
2.5 Αποθήκευση στελεχών με γλυκερόλη	135
3. Απομόνωση υποκυτταρικών οργανιδίων από φύλλα φυτών.....	135
3.1 Απομόνωση πυρήνων	135
3.2 Απομόνωση χλωροπλάστων	136
4. Επεξεργασία, ανάλυση πρωτεϊνών	138
4.1 Εκχύλιση πρωτεϊνών από φυτικούς ιστούς	138

4.2	Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνών σε διαλύματα	139
4.3	Συμπύκνωση πρωτεϊνικών διαλυμάτων με τριχλωροξικό οξύ (TCA)	139
4.5	Ανάλυση πρωτεϊνών σε πήκτωμα ακρυλαμίδης	139
4.5.1	Αποδιατακτικά πήκτωμα ακρυλαμίδης	139
4.5.2	Αποδιατακτικά Πηκτώματα Τρισίνης για πρωτεΐνες <10kDa	140
4.5.3	Επεξεργασία των πηκτωμάτων	140
4.6	Προσδιορισμός πρωτεϊνών με αντίσωμα (western)	141
4.6.1	Αναλύσεις της πρωτεΐνης LeMA-1	141
4.6.2	Αναλύσεις της καμυδιακής πρωτεΐνης του PVX	142
5	Επεξεργασία ανάλυση νουκλεϊκών οξέων.....	142
5.1	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA	142
5.1.1	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (από 1-6μg DNA)	142
5.1.1.1	Αλκαλική λύση για 1-1.5μg DNA (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	142
5.1.1.2	Λύση με βρασμό για 5-10μg DNA	143
5.1.2	Απομόνωση DNA για >100μg DNA (midi-prep)	143
5.2	Πέψη με περιοριστικά ένζυμα	144
5.3	Διαχωρισμός Ν.Ο. σε πήκτωμα αγαρόζης	144
5.3.1	Διαχωρισμός τμημάτων DNA σε πήκτωμα αγαρόζης	144
5.3.2	Διαχωρισμός RNA σε πήκτωμα αγαρόζης	144
5.3.2.1	Διαχωρισμός RNA σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα αγαρόζης	144
5.3.2.2	Διαχωρισμός RNA σε αποδιατακτικό πήκτωμα αγαρόζης	145
5.4	Διαχωρισμός Ν.Ο. σε πήκτωμα ακρυλαμίδης	145
5.4.1	Πήκτωμα ακρυλαμίδης για ανάλυση μικρών RNA (<50 βάσεις)	145
5.5	Εκχύλιση τμημάτων DNA από πηκτώματα αγαρόζης	146
5.5.1	Ηλεκτροέκλυση	146
5.5.2	Με στήλη χημικής συγγένειας (GENECLEAN III kit)	147
5.6	Εκχύλιση RNA από φυτικούς ιστούς	147
5.7	Κλασμάτωση RNA με χλωριούχο λίθιο (LiCl)	148
5.8	Ανασυνδυασμός τμημάτων DNA (cloning)	148
5.9	In vitro σύνθεση RNA μετάγραφον	150
5.9.1	Κρύα μετάγραφη	150
5.9.2	Ραδιενεργός μετάγραφη	151
5.10	Μεταφορά RNA σε μεμβράνες και προσδιορισμός με ραδιοσημασμένο ανιχνευτή (Northern blot)	152
5.10.1	Μεταφορά RNA σε μεμβράνη	152
5.10.2	Ανίχνευση RNA με ραδιοσημασμένο ανιχνευτή	153
5.11	Προσδιορισμός συγκεκριμένων RNA με RT-PCR	153
5.12	Ραδιοσήμανση μάρτυρα μεγέθους	154
6.	Προσωρινή έκφραση γονιδίων σε φυτά.....	155
6.1	Σύνθεση των φορέων έκφρασης μέσω του PVX	155
6.2	Μόλυνση φυτών με πλασμιδιακό DNA	155
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ		157

Περίληψη

Η LeMA-1 είναι πρωτεΐνη της ντομάτας που ανήκει σε μια νέα ομάδα Mg-εξαρτώμενων ΑΤΡασών, τις AAA πρωτεΐνες, και ειδικά στην υποοικογένεια των ρυθμιστικών ΑΤΡασών της 26S πρωτεάσης (Rpts, ανασκόπηση Patel & Latterich 1998).

Η πρωτεΐνη εντοπίζεται σε πυρήνες καθώς και σε όλους τους ιστούς του φυτού (ντομάτα) που εξετάστηκαν.

Στην εργασία αυτή παρουσιάζεται για πρώτη φορά μελέτη της συμπεριφοράς μιας πρωτεΐνης της ομάδας αυτής, *in vivo*, σε ολόκληρο ευκαρυωτικό οργανισμό.

Η κωδική περιοχή της πρωτεΐνης κλωνοποιήθηκε στο γένωμα του ιού της πατάτας X (PVX), και εκφράστηκε σε φυτά που μολύνθηκαν με την κατασκευή αυτή (ντοματιές, *Nic. Benthamiana* και *Nic. Clevelandi*). Οι ανασυνδασμένοι ιοί που έφεραν την πλήρη ή και διάφορα τμήματα της κωδικής περιοχής της LeMA-1 προκάλεσαν θνησιγόνο φαινότυπο με χαρακτηριστικά συμπτώματα, ίδια και στα τρία είδη φυτών που χρησιμοποιήθηκαν, τα οποία είναι πολύ εντονότερα στα νεα φύλλα: αναστολή της ανάπτυξης του φυτού, χαρακτηριστική επινασσία βλαστών και φύλλων (καρούλιασμα), συρρίκνωση των νεύρων και των ελασμάτων και παραμόρφωση των φύλλων.

Η παρουσία του ιού στο κύτταρο προκάλεσε την έναρξη του φαινομένου της γονιδιακής σίγησης μέσω ιών (VIGS) το οποίο εκτός από τις ιικές ακολουθίες επηρεάζει και το RNA της LeMA-1 που περιέχεται στο γένωμα του ιού σαν ένθεση και πιθανό το ενδογενώς παραγόμενο RNA της πρωτεΐνης με συνέπεια την εμφάνιση του χαρακτηριστικού θνησιγόνου φαινοτύπου στα φυτά.

Με βάση τα αποτελέσματα από την έκφραση της LeMA-1 σε φυτά, θεωρήθηκε σκόπιμο να μελετηθεί και η συμπεριφορά των άλλων πέντε AAA ΑΤΡασών της ντομάτας της υποοικογένειας των Rpts, με τις οποίες η LeMA-1 έχει αναφερθεί να σχηματίζει εξαμελή δακτύλιο, μέρος του συμπλόκου της 26S πρωτεάσης. Τμήματα της κωδικής περιοχής των πρωτεϊνών αυτών της ντομάτας (Rpt1, 2, 3, 4, και 6) κλωνοποιήθηκαν στον PVX και οι κατασκευές διοχετεύθηκαν σε φυτά. Από αυτές τις κατασκευές επιτυχής ήταν η μόλυνση με την PVX-Rpt1, η οποία προκάλεσε επίσης θνησιγόνο φαινότυπο με ηπιότερα συμπτώματα από εκείνα που παρατηρήθηκαν με τις κατασκευές της LeMA-1: το φυτό παρουσιάζει επίσης αναστολή της ανάπτυξης και ηπιότερη παραμόρφωση των νέων φύλλων και βλαστών.

Abstract

Tomato protein LeMA-1 is a member of a new family of Mg-dependent ATPases called AAA protein family, and specifically member of the subgroup of the regulatory particle triple A ATPases (Rpts) of the 26S protease complex.

The protein is located in the nucleus and is expressed in all plant tissues examined (tomato).

This work is the first report of an *in vivo* study of one of these proteins in whole organism (apart from yeast). The coding region of LeMA-1 was cloned onto the genome of the Potato virus X (PVX) and the construct was used to inoculate plants (tomato, *Nicotiana benthamiana* and *Nicotiana glauca*). The plants that were infected with virus carrying LeMA-1 sequences developed a lethal phenotype with characteristic symptoms: growth arrest, epinasty of shoots and distortion of the newly emerging leaves, which 15 days post infection lead to plant death.

Constructs carrying the whole coding sequences as well as those carrying different deletion fragments of LeMA-1, both exhibited the same sequence of events after infection.

Viruses trigger RNA silencing in infected plants (VIGS virus induced gene silencing). When they carry endogenous sequences then the insert -the endogenous gene- is attacked by RNA silencing as well, which in the case of LeMA-1 caused the observed lethal phenotype.

Based on these results it was estimated that this tool could be applied to study the phenotype caused by the expression of the other Rpts via PVX. For this purpose, parts of the coding sequences of four Rpts of tomato (the clones were obtained from a sequence bank) were cloned onto PVX and the constructs were used to inoculate plants. Of these, the PVX-Rpt1 construct was infectious and caused a lethal phenotype, with symptoms less severe than the ones observed with the LeMA-1 constructs. The Rpt1 plants were arrested, the symptoms affected the newly emerging leaves which were distorted as well as the shoots but to a lesser extent compared with the LeMA-1 phenotype.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η μελέτη αυτή αφορά τον χαρακτηρισμό της πρωτεΐνης LeMA-1 η οποία απομονώθηκε σε μια προσπάθεια εντοπισμού φυτικών παραγόντων που αλληλεπιδρούν με το ιοειδές PSTVd, με στόχο να μελετηθεί ο μηχανισμός παθογένειας των ιοειδών (Prombona *et al.*, 1995). Η πρωτεΐνη που απομονώθηκε εμφάνισε πολύ υψηλή ομολογία με έναν ανθρώπινο παράγοντα, την πρωτεΐνη TBP-1 (Tat Binding Protein 1) (Ohana *et al.*, 1993), η οποία απομονώθηκε ως αρνητικός ρυθμιστής της μεταγραφής του ιού HIV-1 μέσω αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη TAT του HIV-1.

Αργότερα έγινε γνωστό από την βιβλιογραφία ότι οι δυο αυτές πρωτεΐνες ανήκουν σε μια ραγδαία αποκαλυπτόμενη ομάδα πρωτεϊνών με μόνο κοινό χαρακτηριστικό μια αυστηρά συντηρημένη - συνήθως κεντρική- περιοχή 200 περίπου αμινοξέων που υιοθετεί την ίδια τριτοταγή δομή και προσδένει ATP. Οι ATPάσες αυτές εμφανίζουν μικρή ή καθόλου ομολογία στις περιοχές εκτός της περιοχής αυτής και συμμετέχουν σε ποκίλες κυτταρικές λειτουργίες με αποτέλεσμα να ονομαστούν AAA (ή Triple-A) πρωτεΐνες (ATPases Associated with different cellular Activities (ανασκόπηση Patel & Latterich 1998), ενώ η συντηρημένη περιοχή που τις κατατάσσει στην ίδια οικογένεια ονομάστηκε AAA- δομή (AAA-fold).

Η δομή AAA προσδίδει στις πρωτεΐνες που την φέρουν την ίδια ικανότητα: εκμεταλλεύονται την ενέργεια που εκλύεται από την υδρόλυση του ATP για να αλλάξουν διαμόρφωση στο χώρο. Πρόκειται δηλαδή για μια μορφή γεννήτριας που παρέχει ενέργεια με στόχο την αλλαγή σχήματος της πρωτεΐνης. Κάθε μια από τις πρωτεΐνες αυτές χρησιμοποιεί την ικανότητα αλλαγής σχήματος με διαφορετικό τρόπο, με αποτέλεσμα να προκύπτει μια μεγάλη ποικιλία μηχανικών ενζύμων με τελείως διαφορετικούς ρόλους, με μόνο κοινό χαρακτηριστικό την «κίνηση» της AAA περιοχής.

Στο πρώτο κεφάλαιο της εισαγωγής - AAA πρωτεΐνες- περιγράφονται οι υποοικογένειες των AAA πρωτεϊνών καθώς και ο μηχανισμός δράσης τους.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η ιδιότητα των AAA πρωτεϊνών να σχηματίζουν πολυμελείς δακτυλίους που αποτελούνται από την ίδια ή διαφορετικές υπομονάδες. Οι δακτύλιοι αυτοί μπορούν να περιστρέφονται γύρω από τον κεντρικό άξονα του δακτυλίου χάρη στη συντονισμένη αλλαγή σχήματος των υπομονάδων που τον αποτελούν. Τα σύμπλοκα αυτά συμπεριφέρονται σαν μοριακοί μοχλοί παρασύροντας στην κίνησή τους άλλους πρωτεϊνικούς παράγοντες που αλληλεπιδρούν με τον δακτύλιο. Η υποοικογένεια της LeMA-1 αποτελείται από έξι AAA πρωτεΐνες, αυστηρά συντηρημένες σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, που εμφανίζουν σημαντική ομολογία και εκτός της AAA περιοχής και σχηματίζουν εξαμελή δακτύλιο, ο οποίος εντοπίζεται σε ένα μεγαλύτερο σύμπλοκο στην 26S πρωτεάση.

Η 26S πρωτεάση αποτελείται από έναν καταλυτικό κύλινδρο (20S) κατασκευασμένο από τέσσερα επταμελή δακτυλίδια. Στον κύλινδρο αυτό συνδέεται μια άλλη μεγάλη δομή, το καπάκι (19S) το οποίο ρυθμίζει την λειτουργία του κυλίνδρου: επιλέγει τους στόχους, ξεδιπλώνει τις πρωτεΐνες και τις τροφοδοτεί σταδιακά στον κύλινδρο όπου πρωτεολύονται. Ο δακτύλιος των 6 AAA ATPάσων της υποοικογένειας της LeMA-1 εντοπίζεται στην βάση του καπακιού σε αλληλεπίδραση με τον πρωτεολυτικό κύλινδρο, οπότε ονομάστηκαν Rpts (Regulatory Particle Triple A ATPases). Με βάση τον τρόπο δράσης παρόμοιων AAA δακτυλιδιών πιστεύεται ότι το δακτυλίδι αυτό παρέχει την ενέργεια που απαιτείται για το ξεδιπλωμα και την προώθηση των προς αποδόμηση πρωτεϊνών στον καταλυτικό κύλινδρο.

Η 26S πρωτεάση αποτελεί την κύρια εξω-λυσσοσωματική πρωτεολυτική μηχανή των κυττάρων υπεύθυνη για την ελεγχόμενη εκλεκτική απομάκρυνση παραγόντων στο

κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα καθώς και για την συντήρηση των συμπλόκων στα κύτταρα σαν τσαπερόνη.

Στο δεύτερο κεφάλαιο της εισαγωγής -Το πρωτεάσωμα- περιγράφεται η δομή του συμπλόκου αυτού με αναφορά στις υπομονάδες που το αποτελούν και παρατίθενται στοιχεία για την λειτουργία του πρωτεολυτικού αυτού συστήματος στο οποίο συμμετέχει και η LeMA-1.

Συνδυάζοντας πληροφορίες για τις ιδιότητες των AAA ΑΤΡασών της υποοικογένειας Rpt, και για την δράση της 26S πρωτεάσης γίνεται κατανοητή η σημασία και ο ρόλος της LeMA-1 στα κύτταρα..

Για να μελετηθεί ο ρόλος της πρωτεΐνης LeMA-1 στα φυτά, πριν να γίνει γνωστή η παρουσία της στο σύμπλοκο της 26S πρωτεάσης, και δεδομένου ότι κάποιες από τις Rpts του πρωτεασώματος (όπως η *SUG1* και η *MSS1*) φάνηκαν να έχουν ιδιότητες μεταγραφικών παραγόντων (χωρίς να είναι ξεκάθαρο ακόμη αν αυτό έχει κάποια σχέση με την παρουσία τους στο πρωτεάσωμα), αποφασίστηκε να προχωρήσουμε προς αυτήν την κατεύθυνση. Η τεχνική της υπερέκφρασης της πρωτεΐνης σε φυτά μέσω ενός ιού θεωρήθηκε καλή προσέγγιση για να διερευνηθεί η παραπάνω υπόθεση. Στην πορεία της εργασίας αυτής εμφανίστηκαν στην βιβλιογραφία τα πρώτα στοιχεία για το φαινόμενο της γονιδιακής σίγησης μέσω RNA, φαινόμενο που αποτελεί μηχανισμό άμυνας των φυτών ενάντια σε ιούς. Το φυτό αποδομεί εκλεκτικά το RNA που ανήκει στον ιό, και βέβαια το RNA των γονιδίων που φέρει σαν ένθεση ο ιός.

Το τρίτο μέρος της εισαγωγής ασχολείται σύντομα με το φαινόμενο της γονιδιακής σίγησης μέσω RNA το οποίο εξηγεί ικανοποιητικά τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής.

A. Πρωτεΐνες AAA

Εισαγωγή

Ένζυμα που δεσμεύουν και υδρολύουν ATP παίζουν βασικό ρόλο στη μετατροπή της αποθηκευμένης χημικής ενέργειας σε μεταβολική δραστηριότητα. Τα ένζυμα αυτά συνήθως αποτελούν ετερόκλητες ομάδες με μόνο κοινό χαρακτηριστικό την περιοχή πρόσδεσης του ATP. Οι AAA πρωτεΐνες είναι μια νέα οικογένεια -ραγδαία αυξανόμενη- ATPαών, που καθορίζεται από μια αυστηρά συντηρημένη αλληλουχία 230-250 αμινοξέων που αποτελεί νέο μοτίβο πρόσδεσης ATP. Εκτός της περιοχής αυτής δεν παρουσιάζουν σημαντική αμινοξική ομολογία, ούτε παρουσιάζουν κοινές λειτουργίες, αλλά συμμετέχουν σε πλειάδα δραστηριοτήτων στο κύτταρο, κάτι που οδήγησε στην επιλογή του συγκεκριμένου ονόματος: AAA: ATPases associated with different cellular Activities (ανασκόπηση Patel & Latterich 1998).

Όλα τα μέλη της οικογένειας AAA είναι Mg^{2+} -εξαρτώμενες ATPάσες και παίζουν σημαντικό ρόλο σε πολυάριθμες κυτταρικές λειτουργίες, όπως η κυτταρική διαίρεση, η διαφοροποίηση, η ελεγχόμενη πρωτεόλυση, η κυκλοφορία μεμβρανών και κυστιδίων, και ο έλεγχος του γενετικού υλικού. Βρίσκονται σε όλα σχεδόν τα κύτταρα, σε ευβακτήρια, αρχαιοβακτήρια και ευκαρυωτικά κύτταρα, ενώ υποκυτταρικά εντοπίζονται σε κυτταρόπλασμα, πυρήνα, μιτοχόνδριο και χλωροπλάστη, καθώς και σε αλληλεπίδραση με διάφορες μεμβράνες. Μερικές από αυτές δρουν ως μονομερή, ενώ οι περισσότερες πολυμερίζονται σε διμερή, τριμερή, εξαμερή ή και πολυμερή, με τον εαυτό τους ή/και με άλλες πρωτεΐνες σε μεγαλύτερα σύμπλοκα.

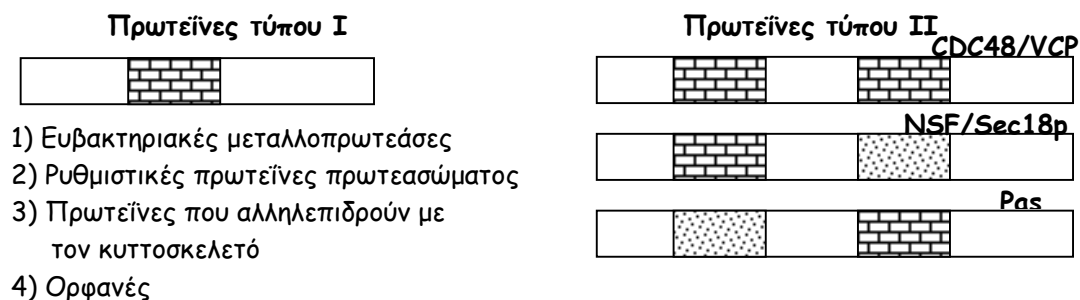
Η AAA ταυτότητα που καθορίζει τις πρωτεΐνες της ομάδας είναι μια συντηρημένη αλληλουχία 230-250 αμινοξέων που περιέχει την περιοχή δέσμευσης του ATP (επίσης αναφέρεται και ως CAD Conserved ATPase Domain), η οποία, όπως προκύπτει από τις τρεις πρωτεΐνες των οποίων είναι γνωστή η τριτοταγής δομή σήμερα (p97, NSF, HslVU, ανασκόπηση Dalal & Hanson 2001), υιοθετεί μάλλον την ίδια τριτοταγή δομή σε όλες τις πρωτεΐνες της οικογένειας. Η περιοχή αυτή περιέχει την «υπογραφή» του μοτίβου Walker των ATPαών με Θηλιά P (P-loop ATPases), το οποίο αποτελείται από τρία δομικά χαρακτηριστικά: (1) ένα υδρόφοβο τμήμα με δομή φύλλων β-σάκρας που τελειώνει σε ασπαρτικό, (2) μια α-έλικα από δυο λυσίνες χωρισμένες από τρία κατάλοιπα, δύο από τα οποία είναι υδρόφοβα, και (3) μια ευέλικτη πλούσια σε γλυκίνη Θηλιά P που περιέχει την πολύ αυστηρά συντηρημένη αλληλουχία "GKT". Η λυσίνη της τριπλέτας αυτής κάνει την άμεση επαφή με το Mg -ATP, και οποιαδήποτε μεταλλαγή του αμινοξέος αυτού καταστρέφει την λειτουργία της πρωτεΐνης. (Swaffield & Purugganan 1997).

Η ανάμειξη των πρωτεϊνών αυτών σε λειτουργίες διαφορετικές μεταξύ τους κάνει δύσκολη την κατασκευή ενός γενικού μοντέλου δράσης, συγκρίνοντας όμως τις βιολογικές δραστηριότητες μελών της οικογένειας που είναι ήδη γνωστές, οι Confalonieri & Duguet (1995) πρότειναν σαν γενικό τρόπο δράσης της περιοχής αυτής δυο πιθανές εκδοχές: (1) μια ATP-εξαρτώμενη λειτουργία τσαπερόνης ή πρωτεασώματος, και (2) την ικανότητα να συμπεριφέρεται σαν ATP-εξαρτώμενο «άγκιστρο» ή «πρωτεϊνική δαγκάνα».

Με βάση τις εξελικτικές τους σχέσεις και τις - εκτός της AAA περιοχής- ομολογίες τους, οι πρωτεΐνες αυτές σχηματίζουν έξι υποοικογένειες (Swaffield & Purugganan 1997), πέντε από τις οποίες αντιστοιχούν σε μονοφυλετικούς κλάδους, ενώ στην έκτη, τις ορφανές, κατατάσσονται πρωτεΐνες με αρκετά διαφοροποιημένη AAA αλληλουχία. Οι υποοικογένειες αυτές είναι: (1) οι ευβακτηριακές μεταλλοπρωτεάσες, (2) οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες του πρωτεασώματος, (3) οι πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τον κυττοσκελετό, (4) οι πρωτεΐνες σύντηξης μεμβρανών περιοχής I και (5) οι πρωτεΐνες σύντηξης μεμβρανών περιοχής II. Οι

τρεις πρώτες ομάδες, όπως και οι «ορφανές», περιέχουν ένα αντίτυπο της AAA αλληλουχίας (τύπου I), ενώ οι (4) και (5) περιέχουν δύο AAA αλληλουχίες (τύπου II), με βάση τις οποίες χωρίζονται σε τρεις ομάδες: α) την CDC48/VCP με δυο καλά συντηρημένα αντίτυπα, β) την NSF/Sec με το Αμινο-τελικό αντίτυπο καλά συντηρημένο, και γ) την Pas με το κάρβοξυ-τελικό αντίτυπο καλά συντηρημένο.

Παρατηρεί κανείς ότι η φυλογενετική ανάλυση των αλληλουχιών 100 περίπου AAA πρωτεϊνών (οι 20 από τις οποίες ανήκουν στον *S. cerevisiae*), κατέταξε τις πρωτεΐνες σε ομάδες, καθεμία από τις οποίες περιέχει πρωτεΐνες παρόμοιας λειτουργίας, κάτι που σημαίνει ότι πρωτεΐνες διαφορετικών οργανισμών που συμμετέχουν στην ίδια λειτουργία είναι πιο ομόλογες μεταξύ τους, παρά με πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε άλλες λειτουργίες, ακόμη και αν ανήκουν στον ίδιο οργανισμό.



1. Μηχανισμός δράσης των AAA πρωτεϊνών.

Αρχικά, στην οικογένεια των AAA ΑΤΡασών κατατάσσονταν πρωτεΐνες οι οποίες περιείχαν την συντηρημένη περιοχή της πρόσδεσης ΑΤΡ (AAA) και σύμφωνα με την αμινοξική ομολογία τους προς αυτήν. Η οικογένεια όμως είναι κατά πολύ μεγαλύτερη όπως προκύπτει από νέα στοιχεία τριτοταγών δομών πρωτεϊνών που δεν παρουσιάζουν σημαντική ομολογία με την περιοχή AAA (Neuwald *et al.*, 1999). Η «εκτεταμένη» AAA⁺ οικογένεια περιλαμβάνει και πρωτεΐνες οι οποίες περιέχουν την τριτοταγή δομή AAA, δηλαδή περιοχή με ίδια τριτοταγή διαμόρφωση, ακόμη και αν αυτό δεν είναι εμφανές από την αμινοξική ακολουθία και μόνο. Στην ομάδα αυτή περιλαμβάνονται και πρωτεΐνες όπως η υπομονάδα δ της DNA πολυμεράσης («δαγκάνα» φορτώματος, clamp loading), η δυνείνη (dynein) (ανασκόπηση Vale 2000), και η ομάδα των Clp/Hsp100 πρωτεϊνών (Bochtler *et al.*, 1999).

Το κοινό χαρακτηριστικό όλων αυτών των πρωτεϊνών είναι η AAA δομή η οποία έχει προκύψει νωρίς στην εξέλιξη (Swaffield & Purugganan 1997), βρίσκεται σε οργανισμούς και των τριών βασιλείων και συμμετέχει σε μια πλειάδα ασύνδετων κατά τα άλλα λειτουργιών, πράγμα που δυσχεραίνει την εξαγωγή συμπεράσματος για τον μηχανισμό δράσης της. Η αυστηρά συντηρημένη AAA δομή σε όλους τους οργανισμούς οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο μηχανισμός δράσης των πρωτεϊνών αυτών πρέπει να είναι παρόμοιος. Στις περισσότερες περιπτώσεις, οι AAA πρωτεΐνες λειτουργούν σαν μηχανικά ένζυμα τα οποία με την ενέργεια που εκλύεται από την υδρόλυση του ΑΤΡ προκαλούν μια βασικά ίδια αλλαγή στο σχήμα τους, η οποία έχει εφαρμοστεί σε ποικίλες, διαφορετικές μεταξύ τους, διαδικασίες.

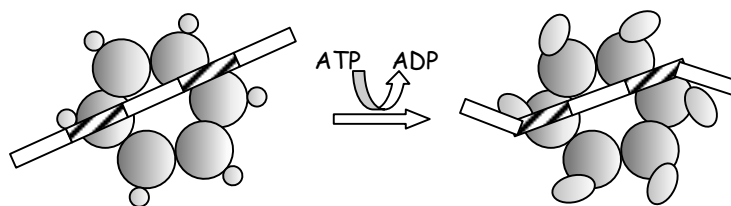
1.1. Λειτουργίες των AAA πρωτεϊνών

1.1.1 Ξεδίπλωμα πρωτεϊνών για πρωτεόλυση ή αναδίπλωση

Μια από τις δραστηριότητες AAA πρωτεϊνών είναι η αποδιάταξη πρωτεϊνών σαν προετοιμασία για την ακόλουθη αποδόμησή τους από πρωτεάσες όπως η FtsH και η ομάδα

των Clp ΑΤΡασών με τη συνεργαζόμενη ClpP πρωτεάση της *E. coli*, και οι έξι ΑΤΡάσες του πρωτεασώματος.

Οι ΑΤΡάσες της ομάδας αυτής συνήθως σχηματίζουν εξαμελείς δακτυλίους που προσδένονται, παρουσία ΑΤΡ, σε επταμελείς δακτυλίους πρωτεάσης, σχηματίζοντας έτσι ένα κανάλι κατά μήκος ενός κυλίνδρου με τις θέσεις πρωτεόλυσης στο κέντρο του (βλέπε ΑΤΡ-εξαρτώμενες πρωτεάσες Κεφ. Β, Παρ 6). Ο κύλινδρος χωράει μόνο αποδιαταγμένα πεπτίδια, οπότε για να υδρολυθεί μια πρωτεΐνη πρέπει πρώτα να ξεδιπλωθεί και μετά να διοχετευθεί προς τα κέντρα κατάλυσης. Στην περίπτωση των Clp ΑΤΡασών, τα μόρια αυτά, αλλάζοντας διαμόρφωση από την μορφή που δεσμεύει ΑΤΡ σε εκείνη που δεσμεύει ΑΔΡ, προκαλούν στροφή του εξαμελούς δακτυλίου τους ως προς τον δακτύλιο της πρωτεάσης με ένα μηχανισμό οδοντωτού τροχού «κλειδώνοντας» σε διαδοχικές θέσεις πάνω στο επταμελή δακτύλιο συμπαρασύροντας το τμήμα της πρωτεΐνης την οποία έχουν δεσμεύσει προκαλώντας έτσι την κατάρρευση της δομής. Παράλληλα, η πρωτεΐνη διοχετεύεται με μικρά διαδοχικά βήματα μέσα στον κύλινδρο όπου υδρολύεται.



Η ίδια δύναμη με την οποία ξεδιπλώνονται οι πρωτεΐνες μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για το δίπλωμα των πρωτεϊνών, δηλαδή σε αυτή την περίπτωση οι ΑΤΡάσες λειτουργούν σαν τσαπερόνες όπως η AAA περιοχή της ClpA (Leonhard *et al.*, 1999) και του συμπλόκου ΥΤΑ10-ΥΤΑ12 (i-AAA) (Arlt *et al.*, 1996). Οι υποκαταστάτες δεσμεύονται από το σύμπλοκο AAA-ΑΤΡ, ξεδιπλώνονται, και ελευθερώνονται στο περιβάλλον από το σύμπλοκο AAA-ΑΔΡ το οποίο έχει τώρα χαμηλή συγγένεια για τον αποδιαταγμένο υποκαταστάτη. Η ξεδιπλωμένη πρωτεΐνη έχει την ευκαιρία να διπλωθεί ξανά. Με τον τρόπο αυτό, η ίδια δράση τσαπερόνης που ξεδιπλώνει τις πρωτεΐνες για να υδρολυθούν τις βοηθάει να διπλωθούν ξανά σωστά.

1.1.2 Διάσπαση πρωτεϊνικών συμπλόκων.

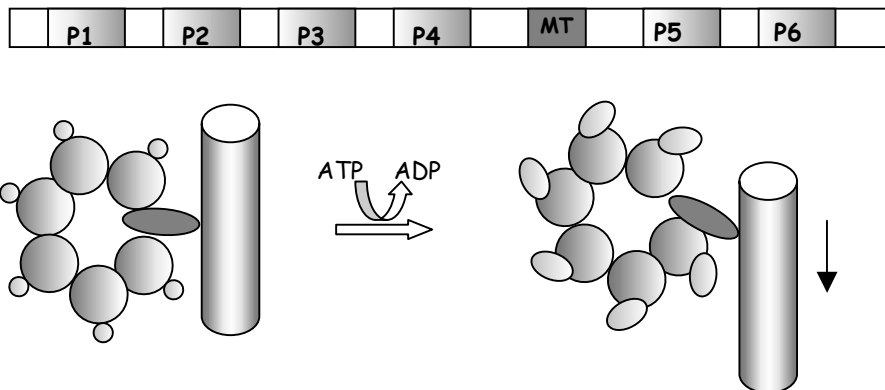
Πολλές κυτταρικές λειτουργίες απαιτούν την διάσπαση συμπλόκων με σπάσιμο ισχυρών αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στις υπομονάδες. Η πιο καλά μελετημένη διάσπαση είναι εκείνη της NSF και του συμπλόκου SNARE κατά την σύντηξη κυστιδίων με μεμβράνες οργανιδίων. Το σύμπλοκο αυτό σχηματίζεται πάνω στις μεμβράνες που πρόκειται να συγκολληθούν με την συμμετοχή της διαλυτής α -SNAP (βλέπε Κεφ Α Παρ 2.4), η οποία προσελκύει τον εξαμελή δακτύλιο της NSF. Μια αλλαγή στη διαμόρφωση της NSF μετά από υδρόλυση ΑΤΡ μεταδίδεται στην α -SNAP που με την σειρά της προκαλεί την διάσπαση του συμπλόκου την οποία ακολουθεί η σύντηξη των δυο μεμβρανών. Ελλείπει NSF η κυκλοφορία των κυστιδίων αναστέλλεται πολύ γρήγορα λόγω ελάττωσης των διαθέσιμων συμπλόκων SNARE τα οποία η NSF ανακυκλώνει.

Παρόμοια είναι και η δράση της VCP στο διμερές του IκΒα-NFκΒ (Dai *et al.*, 1998) το οποίο διασπά απομακρύνοντας τον IκΒα προς το πρωτεάσωμα όπου υδρολύεται, και της ClpA στο διμερές της RepA το οποίο μετατρέπεται στο ενεργό μονομερές χωρίς να εμπλέκεται η πρωτεόλυση στην διαδικασία αυτή (βλέπε ΑΤΡ-εξαρτώμενες πρωτεάσες Κεφ. Β. Παρ 6).

Η AAA πρωτεΐνη κατανίνη (catanin) διασπά τις σταθερές αλληλεπιδράσεις των μορίων τουμπουλίνης στους μικροσωληνίσκους παρουσία ΑΤΡ σε μερικά λεπτά (Vale, 2000).

1.1.3 Μοριακοί κινητήρες

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των Neuwald *et al.*, (2000), στην εκτεταμένη AAA οικογένεια ανήκει και η περιοχή κίνησης της δυνείνης, η οποία σχετίζεται με την τουμπουλίνη και είναι υπεύθυνη για την κίνηση μικροσωληνίσκων και οργανιδίων. Η πρωτεΐνη περιέχει έξι AAA περιοχές, τέσσερις από τις οποίες έχουν δράση ΑΤΡάσης, κάτι που συμφωνεί με τα πειραματικά δεδομένα που δείχνουν τέσσερις λειτουργικές θέσεις πρόσδεσης ΑΤΡ. Οι άλλες δυο περιοχές όμοια με την D1 της NSF δεν είναι σε θέση να δεσμεύσουν ΑΤΡ και συμβάλλουν στην σταθερότητα της δομής της πρωτεΐνης. Το μόριο σχηματίζει έναν εξαμελή δακτύλιο με τις AAA περιοχές στον οποίο παρεμβάλλεται η περιοχή πρόσδεσης μικροσωληνίσκων (ΜΤ).



Εκτός της δυνείνης με τον ίδιο τρόπο λειτουργούν το αντιγόνο T και κάποιες DNA ελικάσες όπως η RuVB. Χρησιμοποιούν δηλαδή την περιοχή AAA για να προκαλούν κινήσεις κατά μήκος γραμμών.

1. 2. Δομές των AAA πρωτεϊνών

Οι περισσότερες AAA πρωτεΐνες λειτουργούν σαν ολιγομερή που σχηματίζουν εξαμελή δακτυλίδια. Από τις πρωτοταγείς δομές που είναι ήδη γνωστές (Dalal & Hanson 2001), φαίνεται ότι η κεντρική δομή των AAA περιοχών είναι αυστηρά συντηρημένη και ότι οι αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στις υπομονάδες είναι απαραίτητες για την εκδήλωση ενζυμικής δραστηριότητας.

1.2.1 Συμμετρικοί δακτύλιοι.

Δύο μόνο από τις πρωτεΐνες με μία AAA περιοχή στην αλληλουχία τους συνυπάρχουν σε ισορροπία σαν μονομερείς και σαν ομοεξαμερείς δακτυλίοι, η Vps4p (Babst *et al.*, 1998), και η κατανίνη (katanin). Ο σχηματισμός του ολιγομερούς απαιτεί, όπως και σε όλες τις άλλες, την πρόσδεση ΑΤΡ (όχι υδρόλυση), επίσης επάγεται από την παρουσία και πρόσδεση των υποκαταστατών τους όπως η τουμπουλίνη για την κατανίνη (Vale 2000).

Συμμετρικούς ομοεξαμελείς δακτυλίου σχηματίζουν όλες οι AAA πρωτεΐνες της ομάδας της σύντηξης μεμβρανών οι οποίες περιέχουν δύο AAA περιοχές με αποτέλεσμα να φαίνονται στο μικροσκόπιο σαν διπλοί δακτύλιοι. Η μία AAA δεσμεύει και υδρολύει ΑΤΡ με πολύ αργούς ρυθμούς (ή και καθόλου όπως στην περίπτωση της D2 AAA περιοχής της NSF) και συνδέει τα μονομερή μεταξύ τους ενώ η άλλη AAA περιοχή αποτελεί το ενεργό κέντρο της δραστηριότητας της πρωτεΐνης όπως πρόσδεση με τους υποκαταστάτες.

Ο σχηματισμός του συμπλόκου απαιτεί μια ενεργή AAA περιοχή η οποία δεσμεύει και υδρολύει ΑΤΡ. Ο διπλασιασμός της περιοχής αυτής με την ακόλουθη απώλεια της δράσης ΑΤΡάσης επιτρέπει στις AAA περιοχές να χαλαρώνουν τις μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις

ακόμη και να απομακρύνονται η μία από την άλλη κατά τους ενζυματικούς κύκλους της πρωτεΐνης χωρίς να διασπάται η συνοχή του συμπλόκου αφού βρίσκονται πάντα συνδεδεμένες μέσω του δεύτερου AAA δακτυλίου (Vale 2000).

1.2.2 Ασύμμετροι δακτύλιοι.

Οι AAA πρωτεΐνες μπορούν να σχηματίσουν και ασύμμετρους δακτυλίους με αλληλεπίδραση διαφορετικών υπομονάδων όπως συμβαίνει στην περίπτωση της δυνείνης για παράδειγμα η οποία περιέχει έξι AAA περιοχές με διαφορετική συμπεριφορά η καθεμία στον δακτύλιο που σχηματίζει το μόριο. Μικροσκοπικά το μόριο της δυνείνης φαίνεται σαν ένας επίπεδος τροχός με επτά λοβούς, οι έξι από τους οποίους έχουν AAA δομή ενώ ο έβδομος προεξέχει από τον τροχό και είναι το σημείο πρόσδεσης της δυνείνης στους μικροσωληνίσκους (MT microtubule-binding).



Η πρώτη AAA περιοχή P1 δεσμεύει και υδρολύει ATP γρήγορα και είναι υπεύθυνη για την κατανάλωση ATP από το μόριο. Οι τρεις επόμενες P2-P3-P4 δεσμεύουν επίσης ATP αλλά το υδρολύουν πολύ αργά, πιθανόν ο ρόλος τους να είναι ρυθμιστικός και εκεί να οφείλεται η ταλάντευση που παρατηρείται στην δράση της πρωτεΐνης. Οι τελευταίες δυο περιοχές δεν δεσμεύουν ATP και πιθανόν διατηρούν την συνοχή της δομής.

Ετερο-μερείς δακτύλιοι σχηματίζονται επίσης από τις δυο μιτοχονδριακές μεταλλοπρωτεάσες YTA10-YTA12 κατά τον σχηματισμό της i-AAA πρωτεάσης των μιτοχονδρίων. Ενώ και τα δυο μόρια είναι πρωτεολυτικά ενεργά η δράση της πρωτεάσης απαιτεί την παρουσία και των δύο στο σύμπλοκο.

Τέλος, παρόμοιος δακτύλιος σχηματίζεται και από τις έξι AAA ATPάσες του πρωτεασώματος όπου καταστροφή του ενεργού κέντρου ATPάσης της μιας καταστρέφει την λειτουργία του συμπλόκου.

2. Οι AAA πρωτεΐνες

2.1. Ευβακτηριακές μεταλλοπρωτεάσες.

Σύμφωνα με τους Swaffield και Rugganan (1997), η ομάδα αυτή αποτελεί την βάση του φυλογενετικού δέντρου των AAA πρωτεϊνών. Υποστηρίζουν μάλιστα ότι οι ευκαρυωτικές ομόλογές τους έχουν προκύψει μετά από μεταφορά γενετικού υλικού, προγονικών ενδοσυμβιωτικών οργανιδίων στον ευκαρυωτικό πυρήνα, όπου μετά από γονιδιακό αναδιπλασιασμό προέκυψαν οι υπόλοιπες ομάδες. Η άποψη αυτή ενισχύεται και από το ότι δεν έχει εντοπισθεί μέλος της ομάδας αυτής σε αρχαιοβακτήρια, και δεν υπάρχει ομόλογο γονίδιο στο γενετικό υλικό του *M. jannaschii* του οποίου η αλληλουχία έχει προσδιοριστεί πλήρως.

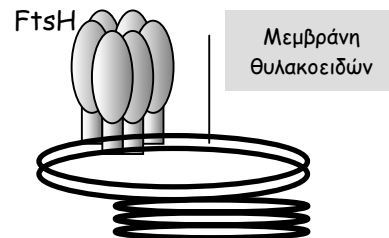
Οι πρωτεΐνες αυτές, με αντιπρόσωπο την FtsH της *E. coli*, είναι προσδεδεμένες σε μεμβράνες και περιέχουν ένα αντίτυπο της AAA περιοχής στο Αμινο-τελικό τους άκρο, και μια περιοχή (HEXXGH) πρόσδεσης μετάλλου (Zn^{2+}) στο κάρβοξυ-τελικό άκρο. Εμφανίζουν πρωτεολυτική δραστηριότητα που απαιτεί παρουσία του μετάλλου και υδρόλυση ATP. Οι υποκαταστάτες τους, κυρίως μη σωστά διπλωμένες πρωτεΐνες και μη ενσωματωμένες υπομονάδες συμπλόκων, επιλέγονται και δεσμεύονται από την AAA περιοχή η οποία έχει δράση τσαπερόνης, και εντοπίζεται πολύ κοντά στην επιφάνεια της μεμβράνης όπου είναι προσκολλημένες (ανασκόπηση Langer, 2000).

Η προκαρυωτική FtsH σχηματίζει ένα ολιγομερές σύμπλοκο το οποίο προσκολλάται στην κυτταρική μεμβράνη με δύο διαμεμβρανικά υδρόφοβα τμήματα στο Αμινο-τελικό άκρο της αφήνοντας το μεγαλύτερο μέρος της πρωτεΐνης (το κάρβοξυ-τελικό άκρο), την AAA και την περιοχή δέσμευσης Zn^{2+} προς το κυτταρόπλασμα (Akiyama *et al.*, 1994). Η πρωτεΐνη συμμετέχει σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες, όπως: η ενσωμάτωση και η έκκριση πρωτεϊνών στην κυτταρική μεμβράνη (Akiyama *et al.*, 1994a,b), ο πρωτεολυτικός έλεγχος των επιπέδων πρωτεϊνών όπως ο μεταγραφικός παράγοντας θερμικού σοκ σ^{32} , και ο μεταφραστικός ενεργοποιητής του λ φάγου cII (Tomoyasu *et al.*, 1996), και η ρύθμιση του σχηματισμού σπορίων στον *Bacillus subtilis* (ανασκόπηση Patel & Latterich 1998).

Η δράση της FtsH ρυθμίζεται από την διαμεμβρανική περιοχή της, όπως προκύπτει από πειράματα έκφρασης της πρωτεΐνης, με έλλειψη στην περιοχή αυτή. Με γενετικές αναλύσεις μεταλλαγμένων στελεχών *E. coli* που σταθεροποιούν τον παράγοντα cII του λ φάγου εντοπίστηκαν δυο ακόμη γονίδια, τα HflC και HflK (high frequency of lysogeny), τα προϊόντα των οποίων συμμετέχουν σε ένα σύμπλοκο που βρίσκεται στην περιπλαστική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης και αλληλεπιδρά με το ολιγομερές σύμπλοκο της FtsH (ανασκόπηση, Langer 2000). Το σύμπλοκο HflCK ρυθμίζει την πρωτεολυτική δράση της FtsH, επηρεάζοντας διαφορετικά την πρωτεόλυση διαλυτών και μεμβρανικών πρωτεϊνών (cII και μη ενσωματωμένη SecY), είτε σταθεροποιώντας την πρωτεάση σε διαμόρφωση με χαμηλή πρωτεολυτική ενεργότητα για τις μεμβρανικές πρωτεΐνες, είτε επιλέγοντας τους υποκαταστάτες της πρωτεάσης. Η δράση του συμπλόκου αυτού, παρομοιάζεται με την δράση των συμπλόκων προχιμπιτίνης (prohibitin) της ζύμης, λόγω της ομολογίας των πρωτεϊνών HflC, K με τις πρωτεΐνες αυτές, το οποίο προστατεύει μη ενσωματωμένες υπομονάδες συμπλόκων μεμβράνης από πρωτεόλυση.

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα οι AAA μεταλλοπρωτεάσες εμφανίζονται μόνο στις εσωτερικές τους μεμβράνες των συμβιωτικών οργανιδίων: χλωροπλάστες και μιτοχόνδρια.

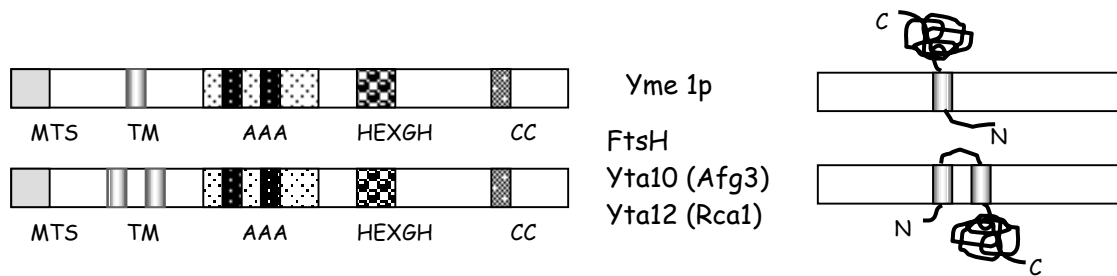
Η FtsH του χλωροπλάστη (Lindahl *et al.*, 1996), της οποίας η έκφρασή ρυθμίζεται από το φως, εντοπίζεται σαν ολιγομερές σύμπλοκο στην μεμβράνη των θυλακοειδών με το κάρβοξυ-μέρος της πρωτεΐνης προς το στρώμα, όπου απομακρύνει μη ενσωματωμένες υπομονάδες των συμπλόκων της μεμβράνης.



Στα μιτοχόνδρια εντοπίζονται τρεις μεταλλοπρωτεάσες οι Yme1p, η Afg3 (Yta10p), και η Rca1p (Yta12p).

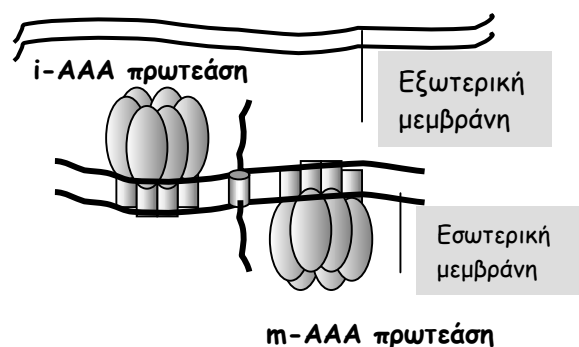
Η πρωτεΐνη Yme1 (yeast mitochondrial escape) απομονώθηκε από μεταλλαγμένα στελέχη ζύμης με αυξημένο ρυθμό διαφυγής μιτοχονδριακού DNA προς τον πυρήνα (Thorsness *et al.*, 1993). Μεταλλαγές στην Yme1, προκαλούν επίσης ανικανότητα αύξησης με υπόστρωμα που δεν επεξεργάζεται με ζύμωση (αιθανόλη, γλυκερόλη), και συσώρευση μιτοχονδρίων με ανώμαλη μορφολογία, φαινότυπος που αποδίδεται σε αυξημένη διαρροή ουσιών από την εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου. Έλλειψη του γονιδίου σταθεροποιεί εκλεκτικά την μη ενσωματωμένη υπομονάδα 2 της οξειδάσης του κυττοχρώματος (Cox II) σε κύτταρα όπου έλλειψη της υπομονάδας 4 δεν επιτρέπει σχηματισμό του συμπλόκου, που σημαίνει ότι η Yme1 δρα σαν πρωτεάση στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου (Nakai *et al.*, 1995). Η πρωτεΐνη περιέχει ένα υδρόφοβο τμήμα στο Αμινο-τελικό της άκρο, με το οποίο διαπερνά την εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου μία φορά, οπότε το κυρίως σώμα της πρωτεΐνης βρίσκεται στον διαμεμβρανικό χώρο. Η Yme1 σχηματίζει ένα ολιγομερές σύμπλοκο στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου προς τον διαμεμβρανικό χώρο, με την AAA περιοχή πολύ κοντά στην επιφάνεια της μεμβράνης. Οι Leonhard *et al.*, (1999) έδειξαν ότι οι AAA περιοχές των υπομονάδων του συμπλόκου της Yme1 έχουν δράση τσαπερόνης, αναγνωρίζουν μη σωστά διπλωμένες περιοχές μεμβρανικών πρωτεϊνών τις οποίες δεσμεύουν

και διατηρούν σε διαλυτή κατάσταση. Με υδρόλυση ATP αλλάζει διαμόρφωση το σύμπλοκο και απελευθερώνει τον υποκαταστάτη ο οποίος είτε αναδιπλώνεται είτε πρωτεολύεται.



Οι Yta10 (AFG3 ATPase family gene 3) και Yta12 (Rca1), επίσης ομόλογες στην FtsH και στην Yme1, απομονώθηκαν από κύτταρα ζύμης με θερμο-ευαίσθητη ανωμαλία στην αναπνοή. Οι φαινότυποι αυτοί συνήθως προκαλούνται από μεταλλαγές στα μιτοχονδριακά γονίδια που κωδικοποιούνται από τον πυρήνα, και απαιτούνται για την λειτουργία ή τον σχηματισμό των μιτοχονδρίων (Guélin *et al.*, 1994). Έλλειψη είτε της Yta10 είτε της Yta12 προκαλεί τον ίδιο φαινότυπο: ενώ παράγονται τα αναπνευστικά ένζυμα, τα κύτταρα δεν μεγαλώνουν σε μη ζυμώσιμες πηγές άνθρακα, που σημαίνει ότι οι πρωτεΐνες αυτές συμμετέχουν στο σχηματισμό και την συντήρηση των αναπνευστικών συμπλόκων. Οι Arlt *et al.*, (1996) έδειξαν ότι οι Yta10 και η Yta12 αποτελούν ένα ολιγομερές σύμπλοκο στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Οι πρωτεΐνες έχουν δυο υδρόφοβα τμήματα στο Αμινο-τελικό τους άκρο, με τα οποία διαπερνάνε την μεμβράνη δυο φορές, οπότε το κυρίως σώμα της πρωτεΐνης βρίσκεται προς το στρώμα. Το σύμπλοκο απομακρύνει πρωτεολυτικά μεμβρανικές πρωτεΐνες. Ενώ και οι δύο πρωτεΐνες (Yta10-Yta12) περιέχουν την χαρακτηριστική δομή HEXGH της μεταλλοπρωτεάσης και έχουν πρωτεολυτική δράση παρουσία Zn^{2+} , απαιτούνται και οι δύο για την πρωτεολυτική δράση του συμπλόκου. Πιθανόν τα ενεργά κέντρα να σχηματίζονται κατά την ένωση των υπομονάδων στο σύμπλοκο. Ο σχηματισμός του συμπλόκου απαιτεί την πρόσδεση (όχι την υδρόλυση) ATP, το οποίο είναι απαραίτητο για την συνοχή του συμπλόκου, ενώ υδρόλυση ATP απαιτείται για την πρωτεόλυση. Εκτός της πρωτεολυτικής δράσης, το σύμπλοκο εμφανίζει και δράση τσπερόνης στον σχηματισμό του συμπλόκου της συνθάσης του ATP, το οποίο σχηματίζεται ακόμη και παρουσία πρωτεολυτικά ανενεργού συμπλόκου Yta10-Yta12, αλλά όχι όταν αυτό λείπει (Arlt *et al.*, 1996).

Η Yme1 και οι Yta10-12 αποτελούν δυο πρωτεολυτικά σύμπλοκα στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων με τα ενεργά κέντρα στις δυο επιφάνειες της μεμβράνης. Οι Leonhard *et al.*, (1996) έδειξαν ότι τα δυο αυτά σύμπλοκα αποτελούν το σύστημα ποιοτικού ελέγχου των πρωτεϊνών της εσωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων απομακρύνοντας πρωτεολυτικά μη ενσωματωμένες ομάδες συμπλόκων ή μη σωστά διπλωμένες μεμβρανικές πρωτεΐνες.



Η Yme1 δρα στον διαμεμβρανικό χώρο και ονομάστηκε i-AAA πρωτεάση (intermembrane) ενώ το σύμπλοκο Yta10-Yta12 στο στρώμα, m-AAA (matrix) πρωτεάση (Arlt *et al.*, 1996).

Το κρίσιμο ερώτημα για τις μεμβρανικές πρωτεάσες είναι πώς απομακρύνουν τα διαμεμβρανικά τμήματα τα οποία δεν βρίσκονται σε υδατικό περιβάλλον που είναι απαραίτητο

για την υδρόλυση των πεπτιδικών δεσμών, και επίσης απαιτούνται μεγάλα ποσά ενέργειας για να απομακρυνθούν από τις ισχυρές οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις που τα συγκρατούν στα φωσfolιπίδια της μεμβράνης. Οι Leonhard *et al.*, (1996) έδειξαν ότι οι δύο πρωτεάσες δρουν σε συνεργασία, απομακρύνοντας η καθεμία τα τμήματα της πρωτεΐνης που προεξέχουν προς τις δυο επιφάνειες της μεμβράνης. Χρησιμοποίησαν ένα πεπτίδιο που αποτελείτο από την Αμινο-τελική περιοχή της Υτα10 (με το ένα από τα δυο διαμεμβρανικά τμήματα), σε σύντηξη με την αναγωγή του φολικού οξέως (DHFR) από ποντίκι. Κατασκεύασαν δυο πεπτίδια, ένα με την DHFR άγριου τύπου σαν πρωτεΐνη αναφοράς που ενσωματώνεται και σταθεροποιείται στην μεμβράνη, και ένα με μια μεταλλαγμένη μορφή της DHFR^{mut}, η οποία δεν διπλώνεται σωστά και απομακρύνεται πρωτεολυτικά αμέσως μετά την εγκατάστασή της στην μεμβράνη. Η πρωτεΐνη αυτή πρωτεολύεται προς 4 διαφορετικά προϊόντα, το ένα από τα οποία παράγεται με υδρόλυση μέσα στο διαμεμβρανικό τμήμα. Με το σύστημα αυτό, μεταλλάσσοντας επιλεκτικά τις πρωτεάσες, έδειξαν ότι δυο από τα προϊόντα είναι αποτέλεσμα δράσης της m-AAA (Υτα10-12) ενώ τα άλλα δυο, το ένα από τα οποία είναι τμήμα του διαμεμβρανικού κομματιού, είναι προϊόντα της δράσης της i-AAA (Υme1). Η πρωτεόλυση απαιτεί υδρόλυση ATP, ενώ η δέσμευση των υποκαταστατών γίνεται ακόμη και απουσία ATP, που πιθανόν σημαίνει ότι η υδρόλυση του ATP ρυθμίζει την διαμόρφωση των πρωτεολυτικών κέντρων. Και οι δύο πρωτεάσες αναγνωρίζουν μόνο μη διπλωμένες μορφές (μόνο η DHFR^{mut} αναγνωρίστηκε).

2.2 AAA ρυθμιστικές πρωτεΐνες του πρωτεασώματος

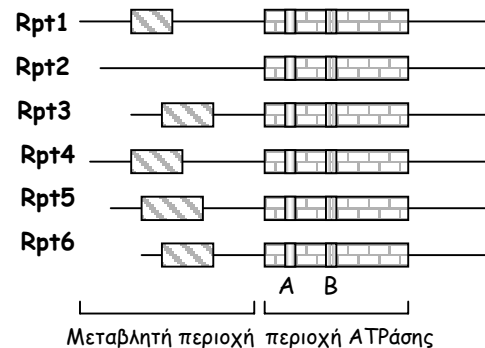
Οι πρωτεΐνες της ομάδας αυτής είναι παρόμοιες σε μέγεθος και δομή, εμφανίζουν αυξημένη ομολογία, όχι μόνο στην AAA περιοχή, αλλά σε όλο το μήκος τους, και πιστεύεται ότι υιοθετούν την ίδια τριτοταγή διαμόρφωση. Οι πρωτεΐνες αυτές διαχωρίζονται σε έξι υποοικογένειες με τα μέλη σε κάθε υποοικογένεια να εμφανίζουν ομολογία της τάξης του 80-99% στους διάφορους οργανισμούς (Swaffield & Purugganan 1997, Patel & Latterich 1995).

Κάθε οργανισμός περιέχει μια πρωτεΐνη από κάθε υποομάδα, δηλαδή περιέχει έξι ομόλογες πρωτεΐνες. Αυτές σχηματίζουν έναν εξαμελή δακτύλιο ο οποίος αποτελεί την βάση του ρυθμιστικού συμπλόκου PA700 της 26S πρωτεάσης, το οποίο προσδίδει στο πρωτεολυτικό πρωτεάσωμα την ικανότητα να αναγνωρίζει και να υδρολύει ουβικιτινιλιωμένες πρωτεΐνες (βλέπε Κεφ.Β Παρ. 2.2.1). Στην ζύμη, όπου είναι γνωστό όλο το γονιδίωμα, υπάρχουν μόνο έξι γονίδια (Glickman *et al.*, 1998a).

Πρωτεάσωμα υπάρχει και σε κάποια είδη βακτηρίων (ακτινομύκητες), όπου όμως δεν υπάρχει το σύστημα σήμανσης πρωτεϊνών με ουβικιτίνη οπότε δεν είναι απαραίτητη η παρουσία ενός συμπλόκου σαν το PA700. Για να λειτουργήσει όμως το πρωτεάσωμα απαιτείται η συνεργασία του με ATPάσες, οι οποίες ξεδιπλώνουν και προωθούν τις πρωτεΐνες προς τις θέσεις κατάλυσης μέσα στο κανάλι του κυλίνδρου. Στα είδη αυτά εντοπίζεται μια προκαρυωτική ομόλογη ATPάση η οποία πιστεύεται ότι σχηματίζει εξαμελείς δακτυλίους που προσδένονται στο πρωτεάσωμα και το ενεργοποιούν, όπως η PAN (Proteasome Activating Nucleotidase) στο βακτήριο *Methanococcus jannaschii*, (Zwickl *et al.*, 1999), και η ARC (AAA ATPase forming Ring-shaped Complexes) στον ακτινομύκητα *Rhodococcus erythropolis*, (Wolf *et al.*, 1998). Από τις πρωτεΐνες αυτές διαφοροποιήθηκαν και εξελίχθηκαν έξι ομάδες πρωτεϊνών οι οποίες πιστεύεται ότι διευρύνουν την ειδικότητα αναγνώρισης της πρωτεολυτικής μηχανής. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρείται και στο πρωτεάσωμα, όπου από την μια καταλυτική β- και ρυθμιστική α- υπομονάδα των βακτηρίων, εξελίχθηκαν επτά ευκαρυωτικές α- και β- υπομονάδες αντίστοιχα.

Οι πρωτεΐνες αυτές απομονώθηκαν από διάφορα εργαστήρια σε μελέτες άσχετες με το πρωτεάσωμα και τις λειτουργίες του, με αποτέλεσμα να τους έχουν αποδοθεί διάφορα ονόματα που κάθε φορά σχετίζονται με την αντίστοιχη λειτουργία που οδήγησε στην απομόνωσή τους, αλλά δημιουργούν πρόβλημα στην επιστημονική ομάδα που ασχολείται με αυτές, πράγμα που έκανε αναγκαία την απόδοση ενιαίας ονοματολογίας για τις πρωτεΐνες αυτές (Finley *et al.*, 1998). Κατατάχθηκαν με βάση το μέγεθός τους από την μεγαλύτερη προς την μικρότερη και ονομάστηκαν Rpt 1-6 (Regulatory Particle Triple-A proteins) σαν υπομονάδες του ρυθμιστικού ΡΑ700 σωματιδίου της 26S πρωτεάσης.

Εκτός της χαρακτηριστικής AAA περιοχής, οι πρωτεΐνες αυτές χαρακτηρίζονται επίσης και από την α-έλικα που εμφανίζουν στο αμινο-τελικό άκρο τους, την πιο διαφοροποιημένη περιοχή τους, η οποία θεωρείται υπεύθυνη για την αναγνώριση και δέσμευση των υποκαταστατών τους. Τέτοια δομή προβλέπεται για όλες, (από τις επαναλαμβανόμενες λευκίνες ή παρόμοια αμινοξέα στην αρχή της πρωτεΐνης) εκτός της Rpt2 η οποία όμως πιστεύεται ότι παρουσιάζει επίσης αναδίπλωση α-έλικας ακόμη και αν δεν προβλέπεται κάτι τέτοιο από τον υπολογιστή.



Rpt1 ή Mss1 ή cim5 ή ΥΤΑ3 ή S7

Είναι η μεγαλύτερη πρωτεΐνη της ομάδας. Αρχικά απομονώθηκε από κύτταρα ζύμης, σαν την ανθρώπινη πρωτεΐνη που διορθώνει μεταλλαγή στο γονίδιο *SGV1* της ζύμης, το οποίο κωδικοποιεί για μια *CDC28/CDC2* σχετιζόμενη κινάση που ρυθμίζει τις κυκλίνες *G1*, οπότε ονομάστηκε *Mss1* (*m*ammalian *s*uppressor of the *sgv-1* mutation) (Shibuya *et al.*, 1992). Το cDNA που προέκυψε κωδικοποιούσε για μια πρωτεΐνη 433 αμινοξέων με σημαντική δομική ομοιότητα με την TBP1 (Tat binding protein), η οποία προσδένεται στην Tat πρωτεΐνη του ιού HIV και ρυθμίζει αρνητικά την μεταγραφή του από το TAR RNA (βλέπε παρακάτω). Η δομική ομοιότητα των δυο πρωτεϊνών οδήγησε τους Shibuya *et al.*, (1992) να ελέγξουν αν η *Mss1* επηρεάζει την μεταγραφή του ιού. Χρησιμοποιώντας σαν γονίδιο αναφοράς την *CAT* (chloramphenicol acetyl transferase) σε σύντηξη με την μακριά τελική επαναλαμβανόμενη περιοχή του ιού (LTR long terminal repeat) με την οποία αλληλεπιδρά η Tat, μέτρησαν την επίδραση της έκφρασης της *Mss1* στο παραπάνω σύστημα, παρουσία της πρωτεΐνης Tat. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά τους η *Mss1*, αντίθετα με την TBP1, ρυθμίζει θετικά την ενεργοποίηση της μεταγραφής μέσω της Tat, και τα επίπεδα της ρύθμισης αυτής ήταν ανάλογα με τα επίπεδα του mRNA της πρωτεΐνης στα κύτταρα που ελέγχθηκαν. Με βάση τα στοιχεία αυτά η TBP-1 καθώς και η *Mss1* θεωρήθηκαν παράγοντες της μεταγραφικής μηχανής με θετική και αρνητική δράση αντίστοιχα, τουλάχιστον όσον αφορά το σύστημα μεταγραφής του HIV.

Οι Dubiel *et al.*, (1993) έδειξαν, με άμεσο τρόπο, ότι η *Mss1* είναι υπομονάδα του συμπλόκου ΡΑ700 και υποστηρίζουν ότι οι επιδράσεις της πρωτεΐνης στην μεταγραφική δραστηριότητα οφείλονται στην σχέση του πρωτεασώματος με την εκλεκτική πρωτεολυτική απομάκρυνση μεταγραφικών παραγόντων. Απομόνωσαν σύμπλοκα 26S πρωτεάσης από ανθρώπινα ερυθρά αιμοσφαίρια, τα ανέλυσαν σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης και απομόνωσαν κάποιες υπομονάδες του των οποίων προσδιόρισαν την αλληλουχία με μερική πέψη. Η έβδομη ζώνη, *S7*, αποδείχθηκε ταυτόσημη με την *Mss1* των Shibuya *et al.*, (1992).

Υπομονάδα της 26S πρωτεάσης ή μεταγραφικός παράγοντας; Οι Yanagi *et al.*, (2000) έδειξαν ότι το ένα δεν είναι απαραίτητο να αποκλείει το άλλο. Συγκρίνοντας τα

επίπεδα της πρωτεΐνης με τα επίπεδα της 26S πρωτεάσης σε διάφορα ανθρώπινα κύτταρα, παρατήρησαν ότι υπάρχει μεγάλη ποσότητα της Mss1 η οποία δεν είναι δεσμευμένη σε σύμπλοκα του πρωτεασώματος αλλά καθιζάνει επίσης και με ένα άλλο σύμπλοκο 700 περίπου kDa το οποίο δεν ανέλυσαν. Στηριζόμενοι όμως στα στοιχεία που συνδέουν την πρωτεΐνη με την μεταγραφή, προσπάθησαν να εντοπίσουν γνωστούς μεταγραφικούς παράγοντες (με αντισώματα) στα σύμπλοκα που απομονώνονται από εκχυλίσματα κυττάρων με την Mss1 ακινητοποιημένη σε κατάλληλη στήλη. Ανάμεσα στις πρωτεΐνες που απομόνωσαν με τον τρόπο αυτό αναγνώρισαν γνωστούς βασικούς μεταγραφικούς παράγοντες (BTF basal transcriptional factors) όπως ο TBP, ο TFIIIB, και ο TFIIIF, ενώ δεν έδωσαν σήμα οι TFIIA, TFIIIE και η RNA πολυμεράση II. Προτείνουν λοιπόν ότι εκτός του πρωτεασώματος, η Mss1 συμμετέχει και σε ένα άλλο σύμπλοκο το οποίο έχει σχέση με την μεταγραφή.

Rpt2, ή S4, ή mts2, ή YTA5, ή TBP2(rice)

Η ανθρώπινη πρωτεΐνη απομονώθηκε από τους Dubiel *et al.*, (1992b) κατά την ανάλυση των υπομονάδων του ρυθμιστικού συμπλόκου PA700 της 26S πρωτεάσης. Η αλληλουχία της προσδιορίστηκε από πεπτίδια που προέκυψαν από την ζώνη 4 (S4) του ηκτητώματος ακρυλαμίδης όπου αναλύθηκαν οι υπομονάδες του συμπλόκου.

Η ομόλογη πρωτεΐνη σε ζύμη απομονώθηκε από τους Gordon *et al.*, (1993) από κύτταρα με ανωμαλίες στον διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων στα οποία, μεταλλαγή της πρωτεΐνης οδηγεί στον σχηματισμό δυο θυγατρικών κυττάρων, ένα εμπύρνο με 4n DNA και ένα απύρνο. Η πρωτεΐνη ονομάστηκε mts2 (methyl-benzyl-carbamylate (MBC) temperature sensitive), γιατί μεταλλαγή της πρωτεΐνης προσδίδει ανθεκτικότητα στο μιτωτικό δηλητήριο MBC το οποίο σχετίζεται με την λειτουργία των μικροσωληνίσκων. Η ανθρώπινη S4 διορθώνει τον φαινότυπο της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης της ζύμης που σημαίνει και λειτουργική εκτός της αμινοξικής ομολογία, οπότε πρόκειται για την αντίστοιχη της S4 σε ζύμη. Σε παράλληλο πείραμα με την S4, από ποντίκι όμως, αντί της S4 απομόνωσαν μια άλλη μεταλλαγμένη πρωτεΐνη του ποντικού, η οποία αποδείχθηκε ότι είναι η Mss1 (Rpt1) μεταλλαγή της οποίας σε ζύμη προκαλεί επίσης πρόβλημα στον διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων (Ghislain *et al.*, 1993), στοιχεία που οδηγούν στο συμπέρασμα ότι οι δυο αυτές πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν *in vivo*. Πράγματι, στον δακτύλιο των ΑΤΡασών στην 26S πρωτεάση οι δυο αυτές πρωτεΐνες βρίσκονται σε γειτονικές θέσεις (βλέπε AAA ΑΤΡάσες του πρωτεασώματος Κεφ. Β Παρ 2.2.1).

Η S4 είναι Mg^{2+} -εξαρτώμενη ΑΤΡάση όπως έδειξαν οι Lucero *et al.*, (1995), δράση η οποία εξαφανίζεται αν μεταλλαγή η λυσίνη της περιοχής της θηλιάς Ρ της πολύ αυστηρά συντηρημένης αλληλουχίας GKT, η οποία θεωρείται υπεύθυνη για την δέσμευση του ΑΤΡ. Παράλληλα έδειξαν ότι η αμινο-τελική περιοχή της πρωτεΐνης ρυθμίζει την δράση της ΑΤΡάσης, αφού ελλείψεις στην περιοχή αυτή αυξάνουν την ενεργότητα του ενζύμου.

Rpt3 ή MS73 ή dDTBP2 ή TBP7

Αρχικά απομονώθηκε από τους Shaw & Ennis (1993) στον οργανισμό *Dictyostelium discoideum*, σε μια προσπάθεια εντοπισμού πρωτεϊνών με ομολογία προς την TBP-1 με στόχο την απομόνωση μεταγραφικών παραγόντων στον οργανισμό αυτό. Μαζί με την DdTBP2/MS73 απομόνωσαν επίσης και την DdTBP10/SUG1 και έδειξαν ότι και τα δυο γονίδια είναι ρυθμιζόμενα αναπτυξιακά.

Οι Dawson *et al.*, (1995) μελετούσαν τις διαδικασίες του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου στα νευρομυϊκά κύτταρα του εντόμου *Manduca sexta*, προσπαθώντας να εντοπίσουν τον πρωτεολυτικό μηχανισμό που είναι υπεύθυνος για την απομάκρυνση των

κυτταρικών υπολειμμάτων μέσα σε 24-30 ώρες από την έναρξη του φαινομένου. Επειδή αυτό συνοδεύεται από μεγάλη αύξηση των επιπέδων ενός παράγοντα του μονοπατιού της πολύ-ουβικιτίνης καθώς και των πολύ-ουβικιτινιλιωμένων πρωτεϊνών στα κύτταρα αυτά, οδηγήθηκαν στην υπόθεση ότι η πρωτεολυτική μηχανή πίσω από αυτό είναι η 26S πρωτεάση. Παρακολούθησαν λοιπόν τα επίπεδα των υπομονάδων του συμπλόκου της 26S πρωτεάσης, τα οποία αυξάνονται δραματικά ώστε να αντιμετωπίσουν τις αυξημένες ανάγκες για πρωτεόλυση, και επικεντρώθηκαν στις ρυθμιστικές ΑΤΡάσες, με αποτέλεσμα την απομόνωση της νέας MS73 η οποία αυξάνεται κατά 5-6 φορές. Στην εργασία αυτή παρατήρησαν ότι παράλληλα με τις υπομονάδες του 20S πρωτεασώματος αυξάνονται επίσης και οι ΑΤΡάσες Mss1, η mts2, ενώ δεν παρατήρησαν αλλαγές στα επίπεδα της TBP-1 κάτι που πιθανόν εξηγείται από την παρουσία του ρυθμιστή (modulator) που αποτελείται από τις TBP-1 και SUG2, και διατηρεί τα επίπεδα των πρωτεϊνών αυτών ήδη πολύ υψηλά.

Rpt4 ή SUG2 ή S10b

Η πρωτεΐνη κλωνοποιήθηκε από τους Russell *et al.*, (1996), όπως και η SUG-1 (Swaffield *et al.*, 1992), σε μια προσπάθεια απομόνωσης παραγόντων που παρακάμπτουν μεταλλαγή στην περιοχή ενεργοποίησης του GAL4 σε ζύμη, και τις ονόμασαν SUG-1 και SUG-2 (suppressor of gal4D mutation). Οι DeMartino *et al.*, (1996) εντόπισαν την πρωτεΐνη σε ένα σύμπλοκο, τον ρυθμιστή (modulator), το οποίο ενεργοποιεί την πρόσδεση του PA700 στο πρωτεασώμα, ενώ οι Hastings *et al.*, (1999), την εντοπίζουν παράλληλα και στον ρυθμιστή και στο PA700. Και εδώ, όπως και στις υπόλοιπες ΑΤΡάσες του πρωτεασώματος, τίθεται το ίδιο ερώτημα: υπομονάδες του πρωτεασώματος ή μεταγραφικοί παράγοντες, ή και τα δυο σαν υπομονάδες διαφορετικών συμπλόκων; Μερική απάντηση στην ερώτηση αυτή δίνεται από το ίδιο εργαστήριο από τους Russell and Johnston (2001) και αναλύεται στην SUG-1 (βλέπε παρακάτω).

Rpt5 ή TBP-1 ή YTA-1 ή S6' ή S6b

Οι Nelbock *et al.*, (1990) προσπαθώντας να εντοπίσουν ανθρώπινους κυτταρικούς παράγοντες που αλληλεπιδρούν με τον HIV και ειδικότερα με την TAT, η οποία ενεργοποιεί τον ιό μέσω της πρόσδεσης στο TAR RNA, σάρωσαν λgt11 cDNA βιβλιοθήκη σύντηξης με δόλωμα την βιτινυλ-TAT. Το αποτέλεσμα ήταν η απομόνωση μίας νέας πρωτεΐνης, της TAT-binding Protein-1 TBP-1. Βρίσκεται κυρίως σε πυρήνες, και είναι σε θέση να καταστείλει την ενεργοποίηση του ιού μέσω της TAT. Τα στοιχεία αυτά ενισχύονται με την απομόνωση και κλωνοποίηση μιας ανθρώπινης πρωτεΐνης, της TBPIP (TBP-1 Interacting Protein), η οποία δρα συνεργιστικά με την TBP-1 στην καταστολή της ενεργοποίησης του HIV (Tanaka *et al.*, 1997 b)

Οι Ohana *et al.*, (1993) έδειξαν ότι, παρά το ότι η TBP-1 δεν προσδένεται άμεσα σε DNA, δρα σαν ισχυρός μεταγραφικός παράγοντας όταν βρίσκεται σε γειτονία με διάφορους υποκινητές. Παράλληλα, και επειδή αρκετοί μεταγραφικοί παράγοντες λειτουργούν σαν ομο-ή ετερο-διμερή, σε ανάλογο έλεγχο με κατάλληλο σύστημα στη ζύμη, έδειξαν ότι σχηματίζει διμερή με τον εαυτό της, και με μία άλλη ομόλογη AAA ΑΤΡάση, την TBP-7 (RPT3).

Όπως αποδείχθηκε αργότερα, πρόκειται για μια πρωτεΐνη αυστηρά συντηρημένη σε όλους τους οργανισμούς, και ο αριθμός των ομόλογων με αυτή πρωτεϊνών αυξάνεται συνέχεια, με τα περισσότερα μέλη της ομάδας να απομονώνονται με βάση την ομολογία τους με την TBP-1, σε ποντίκια (Nakamura *et al.*, 1998), σε κατώτερους οργανισμούς όπως το *Dictyostelium d.* (Shaw *et al.*, 1993), στη ζύμη (Schnall *et al.*, 1994) και σε φυτά όπως ρύζι (Suzuka *et al.*, 1994), ντομάτα (Prombona *et al.*, 1995), και *Arabidopsis Th.* (Fu *et al.*, 1999).

Με βάση τις πρώτες ενδείξεις που παρουσιάστηκαν από τους Ohana *et al.*, (1993), η μελέτη της TBP-1 στρέφεται προς την πιθανή σχέση της πρωτεΐνης με την μεταγραφική μηχανή με την οποία φαίνεται να αλληλεπιδρά. Την υπόθεση στηρίζουν και τα στοιχεία που προκύπτουν για δύο άλλες πρωτεΐνες πολύ ομόλογες με την TBP-1, την hMSS1 (Dubiel *et al.*, 1993), και την γ SUG1 (Swaffield *et al.*, 1992), που φαίνονται να αλληλεπιδρούν και αυτές με την μεταγραφική μηχανή. Η πρώτη αποδεικνύεται να είναι θετικός ρυθμιστής της μεταγραφής του HIV, και μάλιστα, προτείνεται και μοντέλο ρύθμισης της διαδικασίας από τις TBP-1, MSS1 και την TAT, με την πρώτη αρνητικό και την δεύτερη θετικό ρυθμιστή της ενεργοποίησης του ιού μέσω της TAT (Shibuya *et al.*, 1992).

Ανάλυση της πιθανής δομής της πρωτεΐνης αποκαλύπτει ότι, πέρα από την συντηρημένη περιοχή πρόσδεσης του ATP (βλέπε AAA πρωτεΐνες), εμφανίζει μια περιοχή αλληλεπίδρασης με πρωτεΐνες στο αμινο-τελικό άκρο, καθώς και ένα DEAD μοτίβο που εμφανίζεται σε RNA ελικάσες. Με βάση αυτό οι Suzuka *et al.*, (1998) έδειξαν ότι η TBP-1 είναι RNA-εξαρτώμενη ΑΤΡάση, αφού η ύπαρξη RNA διεγείρει την υδρόλυση του ATP, ενώ το DNA δεν έχει καμία επίδραση.

Παράλληλα με όλα αυτά αθροίζονται και τα στοιχεία για την 26S πρωτεάση, η οποία φαίνεται να είναι βασικότατο εργαλείο των κυττάρων και αποδεικνύεται ότι συμμετέχει σε όλες σχεδόν τις κυτταρικές λειτουργίες (βλέπε λειτουργίες της 26S πρωτεάσης). Με βάση τα νέα δεδομένα, η 26S πρωτεάση αποτελείται από δύο υποσύνπλοκα (DeMartino *et al.*, 1994), το καταλυτικό σωματίδιο (Catalytic Particle CP ή 20S), και ένα δεύτερο υποσύνπλοκο, -το καπάκι- (PA700), που μετατρέπει το 20S σε μηχανή αποδόμησης Ub-πρωτεϊνών. Η πρόσδεση του PA700 στο 20S απαιτεί υδρόλυση ATP. Έξι από τις υπομονάδες του PA700 είναι AAA ΑΤΡάσες: η TBP-1, η MSS1, η SUG1, η MS73, η SUG2, και η mts2 (Richmond *et al.*, 1997, τα ονόματα των πρωτεϊνών της ζύμης), (πρόσφατη ανασκόπηση Ferrell *et al.*, 2000). Σύμφωνα με τα στοιχεία αυτά, προτάθηκε ότι η επίδραση των πρωτεϊνών αυτών στην μεταγραφική μηχανή είναι έμμεση, μέσω της εκλεκτικής απομάκρυνσης με πρωτεόλυση μεταγραφικών παραγόντων και όχι με άμεση αλληλεπίδραση με την μεταγραφική μηχανή.

Για αρκετά χρόνια υπήρχε αμφιβολία για το αν η TBP-1 αποτελεί υπομονάδα του συμπλόκου ή όχι, και βασικός λόγος για αυτό ήταν ότι δεν είχε πιστοποιηθεί η παρουσία της σε αυτό. Το 1995 οι Dawson *et al.*, μελετώντας την συμπεριφορά της 26S πρωτεάσης στο *Manduca sexta*, κατά την αλλαγή του ζώου από κάμπια σε πεταλούδα, παρατήρησαν ότι η αλλαγή αυτή απαιτεί επαγωγή και συνεπαγόμενα δραματική αύξηση των επιπέδων της 26S πρωτεάσης, ώστε να αποδομηθούν οι μύες της κοιλίας της κάμπιας και να πραγματοποιηθεί η μεταμόρφωση. Παρακολούθησαν τα γονίδια που επάγονται κατά την διαδικασία αυτή, και απομόνωσαν ένα νέο μέλος της οικογένειας, την MS73 (Rpt3, S7). Παράλληλα έδειξαν ότι τα επίπεδα αυτής και δύο ακόμα πρωτεϊνών της ομάδας, της MSS1(Rpt1) και της mts2 (S4, RPT2) αυξάνονται παράλληλα με την παρατηρούμενη αύξηση των επιπέδων της 26S πρωτεάσης στα κύτταρα, ενώ τα επίπεδα της TBP-1 παραμένουν αναλλοίωτα. Απομόνωσαν 20S και 26S πρωτεάση, και για πρώτη φορά έδειξαν ανοσολογικά την παρουσία της TBP-1 στο σύμπλοκο. Η μη αλλαγή των επιπέδων της πρωτεΐνης εξηγείται από δύο στοιχεία που ήρθαν αργότερα : (1) όλες οι AAA ΑΤΡάσες του 26S έχουν μεγάλο χρόνο ημιζωής (Tanaka *et al.*, 1997), και (2) η TBP-1 αποτελεί μέλος και ενός δεύτερου συμπλόκου, του ρυθμιστή (modulator) (Adams *et al.*, 1997), ο οποίος αποτελείται από τρεις πρωτεΐνες την TBP-1, την SUG2, και μια άγνωστης ακόμη δράσης πρωτεΐνη, την p27 (DeMartino *et al.*, 1996). Η ύπαρξη του ρυθμιστή καθιστά τον προσδιορισμό των επιπέδων της TBP-1 στο σύμπλοκο της 26S δύσκολο.

Η TBP-1, όπως και οι άλλες πέντε της ομάδας της, είναι απαραίτητη για την βιωσιμότητα των κυττάρων σε ζύμη, και εκφράζεται σε όλους τους ιστούς των οργανισμών

που ελέγχθηκαν. Απαντάται στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα, κάτι που είναι σύμφωνο με τον εντοπισμό της 26S στα κύτταρα.

Η TBP-1 και η MSS1 είναι υπομονάδες της 26S, και παράλληλα αλληλεπιδρούν με την TAT του HIV, επηρεάζοντας την μεταγραφή του ιού. Αυτά τα στοιχεία οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η 26S πρωτεάση παίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση του HIV στα κύτταρα. Έχει επίσης δειχθεί ότι η TAT δρα ανταγωνιστικά με τον PA28 (Seeger *et al.*, 1997), έναν ενεργοποιητή του πρωτεασώματος που επάγεται από γ-ιντερφερόνη και μετατρέπει το πρωτεάσωμα σε μηχανή παραγωγής πεπτιδίων για παρουσίαση αντιγόνων. Οι Seeger *et al.*, (1997) έδειξαν ότι η TAT, πιθανόν μέσω της TBP-1, προσδένεται στον PA700, καθώς και στο 20S, παρεμποδίζοντας έτσι την πρόσδεση του 20S με τον PA28 και την ακόλουθη μετατροπή του σε ανοσοπρωτεάσωμα, αποδίδοντας σε αυτό το μοντέλο, τουλάχιστον εν μέρει, την αδρανοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος σε ασθενείς με AIDS.

Έχει προταθεί από πολλά εργαστήρια, ότι η παρουσία ATPασών στην 26S πρωτεάση έχει στόχο το ξεδίπλωμα των προς πρωτεόλυση πρωτεϊνών δεδομένου, ότι μόνο πεπτίδια χωρίς δευτεροταγή δομή χωράνε στα ανοίγματα του καταλυτικού 20S κυλίνδρου, και συνεπώς οι πρωτεΐνες ξεδιπλώνονται και τροφοδοτούνται προς πρωτεόλυση από τις ATPάσες, οι οποίες δρουν σαν τσαπερόνες ή, δεσμεύοντας τις μη σωστά διπλωμένες πρωτεΐνες, τις διατηρούν σε κάπως διαλυτή μορφή ώστε να δώσουν χρόνο είτε στο πρωτεάσωμα να τις υδρολύσει είτε/και σε κάποιες άλλες τσαπερόνες να τις αναδιπλώσουν σωστά.

Για την ακρίβεια έχει δειχθεί από τους Ghee *et al.*, (2000), ότι η TBP-1 αλληλεπιδρά με την α-συνουκλεΐνη. Η α-συνουκλεΐνη είναι μια τελική πρωτεΐνη προσυναπτικού εγκεφαλικού νευρώνα άγνωστης δράσης, η οποία εμφανίζεται μεταλλαγμένη σε κύτταρα ασθενών με Parkinson. Οι μεταλλαγμένες μορφές συσσωματώνονται σε ινίδια (Lewy bodies). Χρησιμοποιώντας το σύστημα δυο υβριδίων στη ζύμη, οι Ghee *et al.*, (2000) έδειξαν ότι η α-συνουκλεΐνη αλληλεπιδρά ειδικά με την TBP-1, όπως έδειξαν και τα πειράματα της ανοσοκατακρήμνισης. Τα στοιχεία αυτά υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η 26S πρωτεάση απομακρύνει ανώμαλα διπλωμένες πρωτεΐνες, και είναι πιθανόν η TBP-1 να είναι ο παράγοντας που αναγνωρίζει και επιλέγει την α-συνουκλεΐνη προς αποδόμηση. Δεν φαίνεται να υπάρχει σήμα ουβικιτίνης, αν και αυτό δεν είναι απαραίτητο για την δέσμευση πρωτεϊνών από την βάση του PA700 (Strickland *et al.*, 2000).

Πρόσφατα, οι Park *et al.*, (1999) έδειξαν ότι η TBP-1 συμμετέχει στο μονοπάτι μεταφοράς σημάτων των κινασών τυροσίνης. Η μετατροπή κακοήθη φαινότυπου σε έναν πιο ήπιο, ή ακόμη και εξαφάνισή του, μπορεί να επιτευχθεί αν κατασταλεί η λειτουργία των κινασών τυροσίνης των επιφανειακών υποδοχέων της οικογένειας erbB. Αυτό μπορεί να γίνει με αδρανοποίηση των υποδοχέων με κατάλληλα αντισώματα. Ο μηχανισμός αυτής της καταστολής δεν είναι ξεκάθαρος, αλλά η πρόσδεση αντισωμάτων στον υποδοχέα οδηγεί στην καταστολή της λειτουργίας του, και στην αποδόμηση του από κάποιο μονοπάτι πρωτεόλυσης. Μελετώντας με διαφορική εμφάνιση μεταγράφων (mRNA differential display) την επαγωγή γονιδίων κατά το φαινόμενο αυτό, απομόνωσαν την TBP-1 η οποία επάγεται σε κύτταρα υπό καταστολή. Με βάση τα δεδομένα αυτά προτείνεται ότι η TBP-1 συμμετέχει στην αδρανοποίηση των κινασών αυτών.

Όλοι συμφωνούν ότι είναι δύσκολο να προσδιορίσει κανείς τις επιμέρους λειτουργίες μιας πρωτεΐνης που συμμετέχει σε δύο τουλάχιστον σύμπλοκα μέσα στα κύτταρα, ειδικά αν η λειτουργία του συμπλόκου είναι αποτέλεσμα συνεργιστικής δράσης περισσότερων από μιας υπομονάδων. Η έλλειψή της TBP-1 έχει αποδειχθεί θνησιγόνος, τουλάχιστον στη ζύμη. Υπάρχουν κάποια στοιχεία που εστιάζονται στην μεταλλαγή της συντηρημένης περιοχής και ειδικά στην λυσίνη του μοτίβου Walker, GPPGKT, όπου εντοπίζεται η πρόσδεση του ATP, πάντα στη ζύμη, από τα οποία όμως δεν προκύπτει ξεκάθαρα κάποια λειτουργία για την TBP-

1, η οποία πρέπει να αναζητηθεί στην συνεργασία των έξι ΑΤΡασών στην δράση της 26S πρωτεάσης και του συμπλόκου PA700, (Richmond *et al.*, 1998).

Μεταγραφικός παράγοντας, ΑΤΡ-εξαρτώμενη πρωτεάση, Mg^{2+} -εξαρτώμενη ΑΤΡάση ή τσαπερόνη, μένει να δειχθεί .

Rpt6 ή SUG1 ή cim3 ή Trip1

Είναι η πιο συζητημένη από όλες τις ΑΤΡάσες του πρωτεασώματος. Αρχικά απομονώθηκε από τους Swaffield *et al.*, (1992) σε σάρωση βιβλιοθήκης έκφρασης ζύμης, προς αναζήτηση παραγόντων που αλληλεπιδρούν με την μεταλλαγμένη GAL4 πρωτεΐνη στην οποία λείπουν τα 14 τελευταία αμινοξέα της περιοχής ενεργοποίησης, με αποτέλεσμα ελάττωση της λειτουργίας της κατά 97%. Ενεργοποίηση της μεταγραφής από την μεταλλαγμένη πρωτεΐνη απαιτεί κάποιο παράγοντα ο οποίος, παρακάμπτοντας την παραπάνω μεταλλαγή λειτουργεί σαν ενδιάμεσος (mediator) ανάμεσα στην GAL4 και την βασική μεταγραφική μηχανή. Η SUG1 (suppressor of GAL4 mutation), όπως και η SUG2 (Russell *et al.*, 1996), είναι σε θέση να προκαλέσουν μεταγραφή από τον μεταλλαγμένο GAL4, κάτι που οδήγησε στο συμπέρασμα ότι, όπως και οι TBP-1 και η MSS1, αποτελούν παράγοντες της μεταγραφικής μηχανής. Το γονίδιο της SUG1 εντοπίστηκε από τους Goyer *et al.*, (1992) στις αλληλουχίες που προηγούνται του γονιδίου της μεγάλης υπομονάδας του παράγοντα έναρξης eIF-4F και την ονόμασαν TBPΥ σαν την ομόλογη της TBP-1 στη ζύμη.

Οι Ghislain *et al.*, (1993) απομόνωσαν δυο μεταλλαγμένες πρωτεΐνες οι οποίες προκαλούν σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου στο μεταβατικό στάδιο G2/μετάφαση, που όταν συνδυάζονται προκαλούν θνησιγόνο φαινότυπο, οπότε ονομάστηκαν cim3(SUG1) και cim5 (MSS1) (co-lethal in mitosis). Στα κύτταρα αυτά συσσωρεύονται οι κυκλίνες CLB2, CLB3 και δεν διαχωρίζονται τα χρωμοσώματα κατά την ανάφαση. Τα στοιχεία αυτά αποδίδουν στις πρωτεΐνες αυτές ρόλο στην πρωτεολυτική μηχανή, και εδώ αρχίζει η αντιπαράθεση στοιχείων για την SUG1 όσον αφορά την εξήγηση των πειραματικών δεδομένων με βάση την ανάμειξή της σε δυο διαδικασίες: της πρωτεόλυσης και της μεταγραφής.

Οι Kim *et al.*, (1994) εντόπισαν ανοσολογικά την πρωτεΐνη στο σύμπλοκο του ολοενζύμου της RNA πολυμεράσης II, και υποστήριξαν ότι η πρωτεΐνη είναι απαραίτητη για να ανασυσταθεί η λειτουργία της πολυμεράσης σε *in vitro* σύστημα, οπότε, σαν υπομονάδα του ενζύμου αυτού, αποτελεί παράγοντα της μεταγραφικής μηχανής.

Η σχέση της SUG1 με την μεταγραφή ενισχύθηκε από μια σειρά στοιχείων που όλα δείχνουν την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης με γνωστούς μεταγραφικούς παράγοντες:

Η ανθρώπινη πρωτεΐνη απομονώθηκε από τους Lee *et al.*, (1995) σε σάρωση ανθρώπινης βιβλιοθήκης έκφρασης με το σύστημα δυο υβριδίων στη ζύμη για παράγοντες που αλληλεπιδρούν με τον υποδοχέα της θυρεοειδικής ορμόνης T_3 . Μια από τις πρωτεΐνες που απομονώθηκαν με τον τρόπο αυτό, η Trip-1 (thyroid-hormone receptor interacting protein), αποδείχθηκε ότι είναι το ανθρώπινο λειτουργικό ανάλογο της SUG-1. Η Trip-1 αλληλεπιδρά επίσης και με τον υποδοχέα του ρετινοϊκού-Χ (retinoid-X). Τα στοιχεία αυτά επεκτάθηκαν από τους von Baur *et al.*, (1996), οι οποίοι έδειξαν ότι εκτός των υποδοχέων της θυρεοειδικής ορμόνης (TRα) και του ρετινοϊκού οξέως (RARα), η πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με την περιοχή ενεργοποίησης και άλλων πυρηνικών υποδοχέων των οποίων η δράση εξαρτάται από την πρόσδεση υποκαταστάτη σε αυτούς (AF-2) όπως ο υποδοχέας του οιστρογόνου ER, και της βιταμίνης D₃, (VDR), των οποίων τα επίπεδα ενεργοποίησης από την Trip-1 είναι συγκρίσιμα με τα αντίστοιχα ενός γνωστού μεταγραφικού παράγοντα του TIF1.

Η εικόνα περιπλέχθηκε όταν οι Akiyama *et al.*, (1995) έδειξαν άμεσα ότι η p45, υπομονάδα της 26S πρωτεάσης από ανθρώπινα κύτταρα της οποίας ανέλυσαν την αλληλουχία με μερική πέψη και προσδιορισμό των πεπτιδίων που προέκυψαν, είναι η Trip-1. Το αποτέλεσμα αυτό αμφισβητήθηκε από τους Swaffield *et al.*, (1995), τουλάχιστον για την

SUG-1 της ζύμης, για την οποία έδειξαν ότι δεν εντοπίζεται στο 26S, ενώ παράλληλα, λειτουργεί σαν ενδιάμεσος σύνδεσης της περιοχής ενεργοποίησης μεταγραφικών παραγόντων όπως ο GAL4 και ο ιικός VP-16 με την βασική μεταγραφική μηχανή, κάτι που συμφωνεί με τα δεδομένα των Xu *et al.*, (1995), οι οποίοι έδειξαν ότι η SUG-1 ρυθμίζει την ενεργοποίηση της μεταγραφής από την Cdc68 η οποία απαιτείται για μεταγραφή διαφόρων γονιδίων στις ζύμη όπως της κυκλίνης G1.

Τελικά, οι Rubin *et al.*, (1996) απομόνωσαν σύμπλοκο 26S πρωτεάσης από κύτταρα ζύμης, στα οποία η SUG-1 και η Pre1 (β-υπομονάδα του 20S πρωτεασώματος) εκφράζονται με ετικέττα 6-ιστιδινών μέσω της οποίας αναγνωρίζονται ανοσολογικά οι πρωτεΐνες που την φέρουν αφ' ενός, και αφ' ετέρου χρησιμοποιείται σαν μέσο ανοσοκαθίξεσης των συμπλόκων στα οποία συμμετέχουν οι πρωτεΐνες αυτές. Παράλληλα, παρακολούθησαν και την παρουσία του συμπλόκου της RNA πολυμεράσης II στα κλάσματα που προέκυψαν κατά την απομόνωση του συμπλόκου της 26S πρωτεάσης. Έδειξαν λοιπόν ότι η SUG-1 συνκαθιζάνει με την 26S πρωτεάση και δεν περιέχεται στο σύμπλοκο της πολυμεράσης, προτείνουν μάλιστα ότι η επίδραση της πρωτεΐνης στις μεταγραφικές διαδικασίες οφείλεται στην ανάμειξη της 26S πρωτεάσης στην πρωτεολυτική ρύθμιση των παραγόντων αυτών, κάτι που συμβαίνει στην περίπτωση της πρωτεΐνης c-Fos (Wang *et al.*, 1996). Οι Wang *et al.*, (1996) απομόνωσαν σε ποντίκι μια πρωτεΐνη, την FZA-B (που είναι η ομόλογη της SUG-1) η οποία αλληλεπιδρά με την περιοχή «φερμουάρ λευκίνης» (leucine zipper) της c-Fos. Έδειξαν ότι οι δύο πρωτεΐνες εντοπίζονται στο σύμπλοκο της 26S πρωτεάσης και πρότειναν ότι η SUG-1 συμμετέχει στο μονοπάτι πρωτεόλυσης της c-Fos και πιθανόν και άλλων μεταγραφικών παραγόντων.

Αναζητώντας κάποια ενζυμική δραστηριότητα της πρωτεΐνης οι Fraser *et al.*, (1997) έδειξαν ότι η SUG1 είναι 3'-5' DNA ελικάση, στηριζόμενοι στο γεγονός ότι η SUG1, όπως και οι υπόλοιπες της ομάδας, περιέχουν ένα μοτίβο, το DexH/D, το οποίο συναντάται σε ελικάσες, ενώ οι Makino *et al.*, (1997) έδειξαν ότι η πρωτεΐνη έχει δράση ΑΤΡάσης η οποία ρυθμίζεται από ειδικά RNA (ενεργοποιείται από poly(A)⁺, αλλά όχι από poly(A)⁻). Τέλος, η SUG-1 είναι αδιαμφισβήτητα υπομονάδα της 26S πρωτεάσης, και μάλιστα του συμπλόκου PA700, όπου με τις άλλες πέντε σχηματίζουν τον δακτύλιο της βάσης με τον οποίο ο PA700 προσδένεται στον 20S πρωτεολυτικό κύλινδρο του πρωτεασώματος (Rubin *et al.*, 1997).

Και εδώ, όπως και στις άλλες πέντε, παραμένει ανοιχτό το ερώτημα: σίγουρα έχουν σχέση με την μεταγραφική μηχανή, και είναι υπομονάδες του PA700, πώς όμως συνδυάζεται η συμμετοχή τους στο πρωτεολυτικό μονοπάτι της 26S με την επίδραση που έχουν στην μεταγραφική διαδικασία των κυττάρων;

Οι Russell & Johnston (2001) προσπάθησαν να απαντήσουν το παραπάνω ερώτημα συνδυάζοντας τα υπάρχοντα στοιχεία για την SUG1 και SUG2, για τις οποίες αυτοί πρώτοι εντόπισαν σχέση με την μεταγραφή από τον GAL4. Η έκφραση των GAL γονιδίων ελαττώνεται δραματικά όταν από την πρωτεΐνη GAL4 λείπουν τα τελευταία 14 αμινοξέα της περιοχής ενεργοποίησης (Gal4D), κάτι που διορθώνεται μερικά όταν η μεταλλαγμένη Gal4D υπερεκφράζεται, και αποκαθίσταται σχεδόν πλήρως από την παρουσία συγκεκριμένων μεταλλαγμένων μορφών των SUG1 και SUG2. Η επίδραση των μεταλλαγμένων SUG1 και SUG2 στην μεταγραφή από τον Gal4d, αποδίδεται στην σταθεροποίηση του Gal4D λόγω της προβληματικής λειτουργίας της 26S πρωτεάσης. Οι Russell & Johnston (2001) έδειξαν ότι η αύξηση των επιπέδων της Gal4D δεν συνοδεύεται πάντα από αποκατάσταση της μεταγραφικής της λειτουργίας. Μεταλλαγές των β-υπομονάδων του 20S πρωτεασώματος, καθώς και κάποια μεταλλαγμένα αλληλόμορφα των SUG1 και SUG2 που έχουν σαν αποτέλεσμα την αδρανοποίηση του πρωτεασώματος δεν διορθώνουν την μεταγραφική δραστηριότητα (ανάπτυξη σε γαλακτόζη), παρά την δραματική αύξηση των επιπέδων της Gal4D. Παράλληλα, υπάρχουν κάποια αλληλόμορφα των SUG1 και SUG2 η παρουσία των οποίων δεν αυξάνει την Gal4D στα προηγούμενα επίπεδα, μάλιστα, σε κάποια από αυτά η

Gal4D βρίσκεται σε χαμηλότερα επίπεδα από την *GAL4* «άγριου τύπου». Τα αλληλόμορφα αυτά αποκαθιστούν την λειτουργία της *Gal4D*, δράση η οποία δεν εξηγείται με την όποια πρωτεολυτική δράση της 26S πρωτεάσης. Παράλληλα με τα στοιχεία αυτά, οι Molinari *et al.*, (Russell & Johnston, 2001) έδειξαν ότι το πρωτεάσωμα απομακρύνει εκλεκτικά μεταγραφικούς παράγοντες εν δράσει, και ότι μεταλλαγές στις περιοχές ενεργοποίησης ή πρόσδεσης σε DNA προκαλούν σταθεροποίηση των ανενεργών αυτών παραγόντων.

Οι Russell & Johnston (2001) προτείνουν ότι η επίδραση των *SUG1* και *SUG2*, και πιθανόν και των υπολοίπων ΑΤΡαών του *PA700*, στην μεταγραφή, δεν οφείλεται στην πρωτεολυτική δραστηριότητα της 26S πρωτεάσης αλλά στην δράση του *PA700* ανεξάρτητα από το πρωτεάσωμα. Ο *PA700* λειτουργεί σαν σύμπλοκο με δράση τσαπερόνης που συμμετέχει στην σταθεροποίηση ή αποσταθεροποίηση μεταγραφικών συμπλόκων και στην ενσωμάτωση υπομονάδων σε αυτά, χωρίς την συμμετοχή πρωτεολυτικής δραστηριότητας. Αυτό θα εξηγούσε και την σχέση της 26S πρωτεάσης και ειδικά των ΑΤΡαών του *PA700* με την διαδικασία διόρθωσης DNA (Lommel *et al.*, 2000, Schaubert *et al.*, 1998, Russell & Johnston, 2001), για την οποία είναι απαραίτητη η παρουσία του *PA700* αλλά όχι και η πρωτεολυτική δράση του 20S. Θεωρούν δηλαδή ότι ο *PA700* λειτουργεί σαν τσαπερόνη στην ελεύθερη μορφή του, ή προσαρμόζει την δράση αυτή στις ανάγκες του 20S για ξεδίπλωμα των υποκαταστατών που αποδομούνται από αυτό. Αυτό θα εξηγούσε και την «προτίμηση» της 26S πρωτεάσης για τους ενεργούς και όχι τους αδραντοποιημένους μεταγραφικούς παράγοντες που παρατηρήθηκε από τους Molinari *et al.*, (Russell & Johnston, 2001).

2.3. AAA πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τον κυτταρικό σκελετό

Οι πρωτεΐνες της ομάδας αυτής βρίσκονται αποκλειστικά σε ευκαρυωτικά κύτταρα και περιλαμβάνουν τις *mei-1* του *C. elegans*, και τις *Msp1*, *SAP1*, και *Vps4p* του *S. cerevisiae*.

Η *mei-1* (meiosis) απαιτείται για την οργάνωση της μειωτικής ατράκτου στα θηλυκά γαμετοκύτταρα και πρέπει να απομακρυνθεί πριν την μίτωση. Η πρωτεΐνη εντοπίζεται με κατάλληλο αντίσωμα στην άτρακτο κατά τις μειώσεις I και II ενώ λείπει από την μιτωτική άτρακτο. Μεταλλαγές ή έλλειψη του γονιδίου προκαλούν αναστολή του σχηματισμού της ατράκτου και της διαδικασίας της μείωσης. (Clark-Maguire 1994).

Η *msp1* (mitochondrial sorting of proteins) εντοπίζεται στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων προς το κυτταρόπλασμα. Έλλειψη της πρωτεΐνης δεν προκαλεί ανωμαλίες στην ανάπτυξη των κυττάρων ούτε παρατηρούνται ανωμαλίες στην εισαγωγή πρωτεϊνών στο μιτοχόνδριο, η υπερέκφρασή της όμως προκαλεί τοποθέτηση των πρωτεϊνών σε λάθος μεμβράνη (Nakai *et al.*, 1993).

Η *SAP1* απομονώθηκε με το σύστημα των δυο υβριδίων στη ζύμη σαν παράγοντας που αλληλεπιδρά με την *SIN-1* έναν μεταγραφικό καταστολέα της ζύμης που δρα ανταγωνιστικά με το σύμπλοκο *SWI/SNF* το οποίο προκαλεί ανασχηματισμό της χρωματίνης σε περιοχές όπου συμβαίνει εκλεκτική έκφραση του γενετικού υλικού. Η *SIN-1* είναι παράγοντας της χρωματίνης ο οποίος λειτουργεί σαν άγκιστρο μορίων στην χρωματίνη. Η κάρβοξυ-τελική άκρη της πρωτεΐνης αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες που δεσμεύονται στον υποκινητή των γονιδίων που καταστέλλει, η κεντρική περιοχή της προσδέεται σε DNA, ενώ η Αμινο-τελική περιοχή της δεσμεύει άλλες πρωτεΐνες όπως η *CDC23* που απαιτείται για την μετάβαση από την μετάφαση στην ανάφαση. Στην ίδια περιοχή δεσμεύεται και η *SAP-1* (Liberzon *et al.*, 1994)

Τέλος, η *Vps4p* (vacuolar protein sorting) είναι πρωτεΐνη του κυτταροπλάσματος και απαιτείται για την μεταφορά λυσοσωματικών και ενδοκυττωμένων πρωτεϊνών από το προ-λυσοσωματικό ενδόσωμα (διαμέρισμα E) στο λυσόσωμα. Η πρωτεΐνη εντοπίζεται σαν

μονομερές, αλλά και σαν σύμπλοκο έξι υπομονάδων σε ισορροπία με το μονομερές. Πιθανόν να δρα σαν μοριακή τσαπερόνη ή ATP-εξαρτώμενο πρωτεϊνικό άγκιστρο που ρυθμίζει τον σχηματισμό συμπλόκου των πρωτεϊνών τάξης E (απαραίτητο για την λειτουργία του κυστιδίου τάξης E) (Babst *et al.*, 1997).

2.4. AAA πρωτεΐνες σύντηξης μεμβρανών

Η σύντηξη μεμβρανών είναι απαραίτητη για μια σειρά γεγονότων στα κύτταρα όπως η μετακίνηση κυστιδίων, (ετεροτυπική σύντηξη, heterotypic fusion), και η συντήρηση οργανιδίων (συναρμολόγηση και αποσυναρμολόγηση) κατά την κυτταρική διαίρεση (ομοτυπική σύντηξη, homotypic fusion). Η μετακίνηση και ο προσανατολισμός των κυστιδίων μεταφοράς απαιτεί την συνεργασία παραγόντων μεμβρανικών και διαλυτών. Ανάμεσα στους διαλυτούς παράγοντες κάθε διαδικασίας ομο ή ετεροτυπικής σύντηξης μεμβρανών στα κύτταρα βρίσκεται και μια AAA πρωτεΐνη.

Οι AAA πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην διαχείριση των μεμβρανών αποτελούν μια ξεχωριστή υποοικογένεια των AAA ΑΤΡασών. Οι πρωτεΐνες της ομάδας αυτής αντίθετα από όλες τις άλλες περιέχουν δύο αντίτυπα της AAA περιοχής τα οποία ονομάζονται CAD-N το άμινο-τελικό και CAD-C το κάρβοξυ-τελικό. Με βάση τις περιοχές αυτές χωρίζονται σε τρεις υποομάδες, την CDC48/VCP όπου και τα δύο AAA αντίτυπα είναι καλά συντηρημένα, την NSF/Sec18 όπου μόνο το CAD-N είναι συντηρημένο και την Pas όπου το CAD-C είναι συντηρημένο. Μέλη της ομάδας αυτής, όπως η Vat και η SAV (Confalonieri *et al.*, 1994), εντοπίζονται και σε αρχαιοβακτήρια, τα οποία όμως δεν έχουν εσωτερικές μεμβράνες, όπου συμμετέχουν σε σύντηξη μεμβρανών που σχετίζονται με την κυτταρική διαίρεση. Τα μέλη της ομάδας εξελίχθηκαν παράλληλα με την εμφάνιση υποκυτταρικών οργανιδίων χρησιμοποιώντας ίσως κάποιους κοινούς μηχανισμούς (Row & Balch 1997)

Η **CDC48** (Frölich *et al.*, 1991) απομονώθηκε από κύτταρα ζύμης στα οποία σταματάει η μίτωση με αδιαίρετο πυρήνα και δέσμες μικροσωληνίσκων διάσπαρτες στο κυτταρόπλασμα να ξεκινάνε από ένα επίσης αδιαίρετο πολικό σωματίο. Η πρωτεΐνη σχηματίζει ομοεξαμερή δαχτυλίδια στο κυτταρόπλασμα και σχετίζεται με τις μικροσωμικές μεμβράνες (microsomal membranes), είναι δε απαραίτητη για την ομοτυπική σύντηξη των μεμβρανών του πυρήνα με το ενδοπλασματικό δίκτυο κατά την μίτωση.

Οι Koller and Brownstein (1987) έδειξαν ότι αυτό που αρχικά είχε απομονωθεί σαν πρόδρομο ορμονικό πεπτιδίο και ονομάστηκε βαλοσίνη περιέχεται σε cDNA γουρουνιού που κωδικοποιεί για ένα πολυπεπτιδίο τουλάχιστον 90kDa και ονομάστηκε **VCP** (Valosis containing protein). Ο πλήρης κλώνος κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 100kDa, το λειτουργικό ανάλογο την CDC48 σε θηλαστικά, που αποτελεί έναν από τους πρώτους στόχους για φωσφορυλίωση τυροσίνης από κινάση σε απάντηση της ενεργοποίησης των T-κυττάρων μέσω του υποδοχέα αντιγόνων (Egerton *et al.*, 1992). Η VCP, όπως και οι άλλες της ομάδας σχηματίζει ένα ομοεξαμερή δακτύλιο ο οποίος αλληλεπιδρά με την κλαθρίνη (πρωτεΐνη επικάλυψης μεμβρανών κυστιδίων που σχηματίζονται μετά από ενδοκύτωση σε απάντηση υποδοχέα), συμμετέχει σε σχηματισμό συμπλόκου όπου εντοπίζεται και η Hsc70 και έχει συμπεριφορά τσαπερόνης (Pleasure *et al.*, 1993). Τέλος, όπως έδειξαν οι Dai *et al.*, (1998) η VCP συνεργάζεται με το πρωτεάσωμα, απομακρύνει τον Iκ-Ba από τα διμερή IκBa-NFκB και τον μεταφέρει στο πρωτεάσωμα όπου αποδομείται. Η VCP προσδένεται στον IκBa μόνο αφού αυτός έχει φωσφορυλιωθεί και ακόλουθα ουβικιτινιλιωθεί σε απάντηση εξωτερικού ερεθίσματος.

Η ομόλογη της VCP η **p97** απομονώθηκε από πυρήνες ωαρίων του *Xenopus laevis* (Peters *et al.* 1990) σαν ένα ομοεξαμερές δαχτυλίδι το οποίο απαιτεί υδρόλυση ATP για τον σχηματισμό του και παρουσιάζει δράση ΑΤΡάσης σαν ολιγομερές η οποία χάνεται όταν

διασπαστεί το σύμπλοκο. Η δομή του δακτυλίου αυτού ήταν και η πρώτη δομή AAA πρωτεΐνης που αναλύθηκε (Peters *et al.*, 1992). Στην ανάλυση αυτή, δυο εξαμερείς δακτύλιοι ενώνονται (ουρά-ουρά) με αποτέλεσμα τον σχηματισμό ενός κυλίνδρου που φαίνεται να αποτελείται από τέσσερις ζώνες. Η μελέτη αυτή αποτέλεσε την βάση μιας σειράς δομικών αναλύσεων AAA συμπλόκων με στόχο την εύρεση του τρόπου με τον οποίο οι AAA πρωτεΐνες συμπλοκοποιούνται και χρησιμοποιούν την ενέργεια από την υδρόλυση του ATP για να προκαλέσουν μετατροπές στην διαμόρφωση του συμπλόκου οι οποίες μεταδίδόμενες στον υποκαταστάτη τους προκαλούν τελικά την αποδιάταξή του (ανασκόπηση Dalal and Hanson 2001). Η p97 είναι απαραίτητη για τον ανασχηματισμό των κυστιδίων του συστήματος Golgi μετά την κυτταρική διαίρεση. Πρόσφατα, εντοπίστηκε μια δεύτερη πρωτεΐνη η p47 (Dalal & Hanson 2001) η οποία αλληλεπιδρά με την p97 και ονομάστηκε εφαρμοστής (adaptor). Η p97 περιέχει στο Αμινο-τελικό της άκρο μια περιοχή 200 περίπου αμινοξέων (περιοχή N) που χαρακτηρίζεται ως περιοχή αναγνώρισης: εκεί προσδένονται η p47 ή οι υποκαταστάτες της. Η περιοχή N παρουσιάζει την ίδια ακριβώς τριτοταγή δομή και στις άλλες AAA που την περιέχουν των οποίων έχει αναλυθεί η δομή, όπως η NSF, η VAT και η Sec18p. Την περιοχή N ακολουθούν δυο AAA περιοχές πρόσδεσης ATP οι περιοχές D1 και D2. Όπως η περιοχή N έτσι και η D1 AAA περιοχή της p97 παρουσιάζει την ίδια ακριβώς δομή με τις άλλες AAA περιοχές των οποίων είναι γνωστή η δομή, όπως η D2 περιοχή της NSF, και η AAA περιοχή της HslVU. Από την κρυσταλλογραφική ανάλυση του πολυμερούς που προκύπτει από την σύνδεση έξι N-D1 μορίων παρουσία ADP (έκφραση της p97 χωρίς τη κάρβοξυ-τελική AAA περιοχή, D2), προκύπτει ότι οι D1 AAA περιοχές σχηματίζουν έναν τροχό σαν κυρτό χωνί το οποίο φέρει στην περιφέρειά του τα N τμήματα σαν προεξοχές στο ίδιο επίπεδο με στροφή αντίστροφη από τους δείκτες του ρολογιού (Dalal & Hanson 2001). Το ATP δεσμεύεται στην επιφάνεια δυο γειτονικών AAA περιοχών ενώ οι υποκαταστάτες, αντίθετα με την μέχρι τώρα αντίληψη δεσμεύονται μάλλον στην περιφέρεια του τροχού στις προεξέχουσες περιοχές N και όχι στο κέντρο του πόρου των AAA δομών. Ο εφαρμοστής προσδένεται επίσης εκεί σε αναλογία 1p47:1p97 και περιορίζει την κινητικότητα της περιοχής μάλλον καταστέλλοντας την δράση του συμπλόκου

Η NSF (N-ethyl-maleimide sensitive factor) αποτελεί την πιο καλά μελετημένη πρωτεΐνη της AAA οικογένειας. Οι Block *et al.*, (1998), μελετώντας την μεταφορά πρωτεϊνών στα διαδοχικά κυστίδια των οργανιδίων Golgi σε σύστημα εκτός κυτάρων, παρατήρησαν ότι οι μεμβράνες αδρανοποιούνται με την προσθήκη NEM (N-ethyl-maleimide), και απομόνωσαν τον παράγοντα που αδρανοποιείται από το μόριο αυτό, την πρωτεΐνη NSF. Η NSF σχηματίζει ομο-τριμερή ή εξαμερή δακτυλίδια στο κυτταρόπλασμα και απαιτείται για όλα τα γεγονότα σύνδεσης και σύντηξης κυστιδίων στο κύτταρο, από το μονοπάτι έκκρισης πρωτεϊνών ως την μετάδοση ώσης στις συνάψεις, όπου δρα στο αρχικό στάδιο αναγνώρισης των μικρών κυστιδίων τα οποία ακόλουθα προσκολλώνται στην μεμβράνη «στόχο». Το πολυμερές της NSF προσδένεται σε διαλυτούς κυτταρικούς παράγοντες τους α-, β- και γ-SNAPs (soluble NSF attachment proteins), (Wilson *et al.*, 1992), μόνο παρουσία κατάλληλων υποδοχέων στις αντίστοιχες μεμβράνες που πρόκειται να συντηχθούν, τους v/t SNARE (SNAP receptors, v=vesicle, t=target) (Söllner *et al.*, 1993), με αποτέλεσμα τον σχηματισμό ενός συμπλόκου με συντελεστή καθίζησης 20S. Με υδρόλυση ATP από την NSF το σύμπλοκο διασπάται και οι δυο μεμβράνες ενώνονται. Η Αμινο-τελική AAA περιοχή της πρωτεΐνης (D1) απαιτείται για την αλληλεπίδραση SNAP-SNARE, ενώ η κάρβοξυ-τελική (D2) για τον σχηματισμό του ομοπολυμερούς.

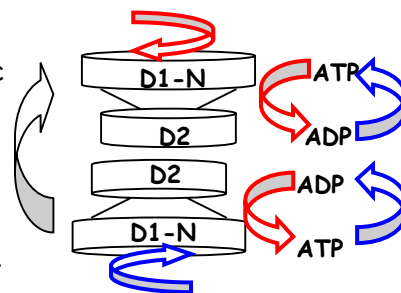
Το ομόλογο της NSF γονίδιο σε ζύμη, το **SEC18p** (Secretory) απομονώθηκε από κύτταρα ζύμης με ανικανότητα μεταφοράς πρωτεϊνών από το ενδοπλασματικό δίκτυο στο σύστημα Golgi (Eakle *et al.*, 1988). Η πρωτεΐνη είναι απαραίτητη για το πρώτο βήμα ανίχνευσης κατά την διαδικασία σύντηξης κυστιδίων με το λυσόσωμα, φαίνεται να προσελκύει στον υποδοχέα Vam3p, τύπου t-SNARE, της μεμβράνης «στόχου» ένα σύμπλοκο χαμηλού

μοριακού βάρους από το οποίο αποσπάται αμέσως πριν την σύντηξη των δυο μεμβρανών (ανασκόπηση Patel & Latterich 1998).

Η p97 και η NSF αποτελούν την βάση με την οποία μελετάται ο μηχανισμός δράσης των AAA πρωτεϊνών γιατί έχει αναλυθεί η δομή των μονομερών τους και έχουν επίσης κρυσταλλωθεί τα εξαμερή σύμπλοκα που σχηματίζουν μέσα στα κύτταρα με δεσμευμένο ADP (p97) ή ATP (NSF) (με το ATP ανάλογο ATP-PNP γιατί το ATP υδρολύεται αμέσως) των οποίων έχει αναλυθεί η δομή. Είναι γνωστό ότι η υδρόλυση του ATP προκαλεί αλλαγές στην διαμόρφωση των συμπλόκων των ΑΤΡακών και αυτό αποτελεί την βάση της λειτουργίας των πρωτεϊνών αυτών. Πιστεύεται ότι τα σύμπλοκα αυτά υιοθετούν δυο διαμορφώσεις: την μορφή που προσδένεται σε ATP και αυτήν που προσδένεται σε ADP. Σύγκριση των δυο αυτών δομών θα εξηγήσει ποιος είναι ο ρόλος της υδρόλυσης του ATP καθώς και γιατί είναι αναγκαίος ο σχηματισμός πολυμερών για την δράση των πρωτεϊνών αυτών. Οι Zhang *et al.*, προσπάθησαν να κρυσταλλώσουν την N-D1 περιοχή της p97 με AMP-PNP την οποία θα συνέκριναν με την αντίστοιχη με ADP που διέθεταν, αυτό όμως δεν έγινε, οπότε συνέκριναν την p97-ADP με την δομή της D2 περιοχής της NSF με AMP-PNP των Brunger *et al.*, 2000 (Dalal & Hanson 2001). Το αποτέλεσμα αυτής της μελέτης έδειξε ότι η Περιοχή N βρίσκεται μετακινημένη κατά πολύ.

Οι Zhang *et al.*, προτείνουν ότι τα AAA ολιγομερή λειτουργούν με μηχανισμό παρόμοιο με εκείνον του οδοντωτού τροχού με κίνηση η οποία παλινδρομεί ανάμεσα στα δυο εξαμερή δακτυλίδια του τελικού πολυμερούς. Υδρόλυση του ATP στον ένα δακτύλιο προκαλεί στροφή του τροχού ως προς τον άλλο πράγμα που προκαλεί αντικατάσταση του ADP του άλλου τροχού με ATP.

Μετά την υδρόλυση ο πρώτος δακτύλιος έχει ADP οπότε ξαναρχίζει ο κύκλος από το δεύτερο δακτυλίδι αυτή την φορά και αντικατάσταση του ADP του πρώτου με ATP. Η κίνηση αυτή μεταδίδεται στους υποκαταστάτες που βρίσκονται δεσμευμένοι στην επιφάνεια του τροχού προκαλώντας αντίστοιχες αλλαγές στην διαμόρφωσή τους.



Η τρίτη υποοικογένεια της ομάδας, οι πρωτεΐνες PAS (peroxisome assembly) απομονώθηκαν από κύτταρα στα οποία δεν υπάρχουν διακριτές μορφές υπεροξειδιοσωμάτων, ή συσσωρεύουν ανώμαλες μορφές κυστιδίων με συμπεριφορά υπεροξειδιοσωμάτων σαν αποτέλεσμα προβληματικής σύντηξης των προδρόμων κυστιδίων προς σχηματισμό των οργανιδίων τα οποία σχηματίζονται με την έναρξη της έκφρασης των αντίστοιχων πρωτεϊνών στα κύτταρα αυτά. Σε αντίθεση με την κατάσταση στον άνθρωπο, όπου η έλλειψη της PΧΑΑΑ1 (Yahraus *et al.*, 1996), είναι θνησιγόνα -πολλές νόσοι αποδίδονται σε μεταλλαγές στις πρωτεΐνες διαχείρισης των μεμβρανών των υπεροξειδιοσωμάτων - οι ομόλογες πρωτεΐνες σε ζύμη, όπως η Pas1 (Erdmann *et al.*, 1991), Pas8 (Voorn-Brouwer *et al.*, 1993), και η PΑΥ4 (του μύκητα *Yarrowia lipolytica*, Nuttley *et al.*, 1994) δεν είναι απαραίτητες για την βιωσιμότητα του κυττάρου.

B. Το Πρωτεάσωμα

Εισαγωγή

Τα ευκαρυωτικά κύτταρα διαθέτουν δυο βασικά μεταβολικά μονοπάτια αποδόμησης πρωτεϊνών. Το ένα είναι αυτό του λυσοσώματος, ένα κυστίδιο που περιέχει πρωτεολυτικά ένζυμα όπου υδρολύονται πρωτεΐνες που προέρχονται από το εξωτερικό περιβάλλον (ενδοκύττωση), και ενδογενείς πρωτεΐνες, κυρίως σε καταστάσεις στρες. Το άλλο είναι το εξωλυσοσωματικό, υπεύθυνο για την εκλεκτική απομάκρυνση ενδοκυτταρικών παραγόντων κάτω από συγκεκριμένες μεταβολικές συνθήκες. Με τον τρόπο αυτό τα κύτταρα διαθέτουν έναν πολύ σημαντικό μηχανισμό ελέγχου των επιπέδων των ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών, με τον οποίο ρυθμίζονται πολλές σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες όπως ο κυτταρικός κύκλος, η ογκογένεση, η μεταγραφή, η ανάπτυξη, η διοχέτευση υποκαταστατών σε μεταβολικά μονοπάτια, η εκλεκτική απομάκρυνση ανώμαλων πρωτεϊνών και η παρουσίαση αντιγόνων.

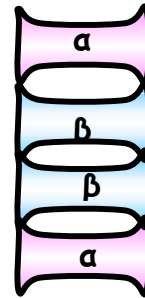
Το ένζυμο που είναι κυρίως υπεύθυνο για τον έλεγχο της πλειοψηφίας των ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών είναι μία πρωτεάση μεγάλου μοριακού βάρους, 700.000 Da, το πρωτεάσωμα. Η ανάμειξη ενός μόνο ενζύμου σε μεγάλο αριθμό διαφορετικών λειτουργιών είναι εφικτή μόνο κάτω από ένα πολύπλοκο μηχανισμό ρύθμισης σε πολλαπλά επίπεδα. Πολλά από τα βήματα της ρύθμισης αυτής είναι γνωστά και αποκαλύπτουν μια καταπληκτική μηχανή λεπτών χειρισμών και ισορροπιών.

1. Δομή και υπομονάδες του 20S πρωτεασώματος

Από την δεκαετία του '70 οι επιστήμονες είχαν εντοπίσει την ύπαρξη ενός πρωτεολυτικού μηχανισμού που δρα εξωλυσοσωματικά και ελέγχει ενδοκυτταρικές λειτουργίες. Υπέθεταν μάλιστα ότι επρόκειτο για σύμπλοκο μεγάλου μοριακού βάρους. Για πρώτη φορά, ένα τέτοιο σύμπλοκο απομονώθηκε από μύες ποντικού από τους Dahlman *et al.*, το 1983 και προσδιορίστηκαν οι καταλυτικές του ιδιότητες (Dahlman *et al.*, 1985). Πρόκειται για ένα σύμπλοκο περίπου 650-700kDa, με πολλαπλές καταλυτικές ιδιότητες, που αποτελείται από τουλάχιστον οκτώ υπομονάδες μικρού μοριακού βάρους (25-32000 Da). Το ένζυμο, κόβει δεσμούς στο καρβοξυ-άκρο (C-τελικό) μετά από ουδέτερα /υδρόφοβα (δράση χυμοθρυψίνης (ChT-L)), βασικά (δράση τρυψίνης (T-L)) και όξινα (υδρόλυση πεπτιδουλ-γλουτάμυλ πεπτιδίου (PGPH)) αμινοξέα, χωρίς να είναι ακόμη τότε γνωστό αν αυτές οι δραστηριότητες εκτελούνται από μία καταλυτική υπομονάδα, ή από συνεργασία περισσότερων υπομονάδων. Αργότερα αποδείχθηκε ότι πρόκειται για σύμπλοκο που βρίσκεται σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα, αφού απομονώθηκε από ζύμη (Heinemeyer *et al.*, 1991, Emori *et al.*, 1991), και φυτά, όπως σπανάκι (Ozaki *et al.*, 1992), και αρακά (Skoda *et al.*, 1992), ενώ φαίνεται ότι απουσιάζει από τα προκαρυωτικά κύτταρα, μέχρι που οι Dahlmann *et al.*, (1989) απομόνωσαν πρωτεάσωμα από το αρχαιοβακτήριο *Thermoplasma Acidophilum*. Συγκριτική ανάλυση γενωμάτων από αντιπροσωπευτικά είδη αρχαιβακτηρίων αποκάλυψε την παρουσία δομικών γονιδίων για το 20S πρωτεάσωμα σε όλα τα γενώματα των οποίων έχει ολοκληρωθεί ο προσδιορισμός της αλληλουχίας (DeMot *et al.*, 1999). Η κατάσταση είναι διαφορετική στα ευβακτήρια, όπου πρωτεάσωμα έχει εντοπισθεί μόνο σε κάποια είδη ακτινομουκήτων (ευβακτήρια, πρόσφατη ανασκόπηση Luras *et al.*, 1997). Στα άλλα ευβακτήρια, η λειτουργία του πρωτεασώματος εκτελείται από την πρωτεάση HslVU μια ATP-εξαρτώμενη πρωτεάση (βλέπε συγγενείς πρωτεάσες). Το ευβακτηριακό, όπως και το αρχαιβακτηριακό πρωτεάσωμα, σε αντίθεση με αυτό των θηλαστικών, παρουσιάζει μόνο δράση χυμοθρυψίνης, (Dahlmann *et al.*, 1989), και τα ενεργά κέντρα σχηματίζονται από θρεονίνες στο N-τελικό άκρο των β-αλυσίδων, (Seemüller *et al.*, 1995).

Το αρχαίο πρωτεάσωμα ξεκαθάρισε αρκετά την κατάσταση, δεδομένου ότι είναι απλούστερο και θεωρείται πρόδρομη μορφή του ευκαρυωτικού πρωτεασώματος (ανάλυση της δομής από τους Lowe *et al.*, 1995). Όλο το σύμπλοκο κατασκευάζεται από δυο βασικές υπομονάδες την τύπου α- και τύπου β- υπομονάδα, σε αναλογία $\alpha_{14}\beta_{14}$, οι οποίες παρουσιάζουν σημαντική ομολογία μεταξύ τους, πράγμα που υποδηλώνει κοινό πρόγονο. Καθεμία από αυτές σχηματίζει ένα ομο-επταμερές δαχτυλίδι. Το πρωτεάσωμα είναι ένας κενός κύλινδρος που αποτελείται από τέσσερα δαχτυλίδια, τοποθετημένα το ένα πάνω στο άλλο, με τα β-δαχτυλίδια στο εσωτερικό και τα α- στο εξωτερικό, δηλαδή αββα δομή, (Grziwa *et al.*, 1991). Οι θέσεις κατάλυσης είναι 14 και σχηματίζονται από την αλληλεπίδραση των δυο επταμερών β-δακτυλίων.

Στο εσωτερικό του κυλίνδρου σχηματίζονται τρία συνεχόμενα διαμερίσματα: το κεντρικό, ανάμεσα στα δυο ενωμένα β-δαχτυλίδια, στο οποίο εντοπίζονται τα ενεργά κέντρα, και δύο εξωτερικά, ανάμεσα στα ενωμένα α- και β- δαχτυλίδια. Στο αρχαίο πρωτεάσωμα, η κοιλότητα αυτή φαίνεται να συνεχίζεται και στο περιβάλλον μέσω των α-δακτυλίων με ένα άνοιγμα των 13\AA , που σχηματίζουν οι α-υπομονάδες (Grziwa *et al.*, 1991). Δηλαδή, οι θέσεις κατάλυσης βρίσκονται στο εσωτερικό ενός κυλίνδρου τα πλαϊνά τοιχώματα του οποίου τις απομονώνουν από το περιβάλλον, και η δράση τους ρυθμίζεται από τα ανοίγματα των α-δακτυλίων, που επιτρέπουν η όχι την είσοδο πρωτεϊνών στο εσωτερικό. Σε αντίθεση με τα συμβατικά ένζυμα, ο υποκαταστάτης που δεσμεύεται στο ενεργό κέντρο δεν υφίσταται σε ισορροπία με την ελεύθερη μορφή του, που σημαίνει ότι η φαινομενική συγκέντρωση του υποκαταστάτη στο μικροπεριβάλλον του ενζύμου είναι περίπου 100mM (αυτο-διαμερισματοποίηση) (Weissman *et al.*, 1995). Το άνοιγμα του κυλίνδρου είναι πολύ μικρό, ικανό να στεγάσει πεπτίδια χωρίς δευτεροταγή δομή, αλλά όχι ολόκληρες πρωτεΐνες, πράγμα που σημαίνει ότι μόνο αποδιαταγμένες πρωτεΐνες μπορούν να διοχετευθούν στο εσωτερικό για αποδόμηση. Η δομή του πρωτεασώματος είναι αξιοσημείωτα όμοια με εκείνη της τσαπερόνης GroEL. Και τα δύο σύμπλοκα είναι κυλινδρικές δομές ίδιου μεγέθους, αποτελούνται από τέσσερα επταμελή δαχτυλίδια που σχηματίζουν τρεις εσωτερικές κοιλότητες. Οι διαφορές τους αντανακλούν τους αντίστροφους ρόλους τους, ξεδίπλωμα για αποδόμηση ή αναδίπλωση, όπως πχ η είσοδος του κυλίνδρου που στην τσαπερόνη είναι ανοιχτή και μεγαλύτερη (45\AA), αφού δεν υπάρχουν περιορισμοί για την αλληλεπίδραση πρωτεϊνών με αυτή, και τα εσωτερικά διαμερίσματα, επίσης μεγαλύτερα αφού η τσαπερόνη στεγάζει μεγάλες μη κανονικές δομές σε αντίθεση με το πρωτεάσωμα που μπορεί να δεχτεί μόνο απλές δομές, α-έλικες ή β-φύλλα (Weissman *et al.*, 1995).



Η υπόθεση ότι το πρωτεάσωμα του *Thermoplasma acidophilum* αποτελεί προγονική μορφή των ευκαρυωτικών πρωτεασωμάτων, ενισχύθηκε από τον εντοπισμό πρωτεασώματος σε κάποια είδη ακτινομυκήτων (ευβακτήρια, Luras *et al.*, 1997), το οποίο παρουσιάζει ίδια καταλυτική συμπεριφορά με το αρχαίο, αλλά αποτελείται από δύο ζεύγη υπομονάδων α και β, (α_1 , β_1 και α_2 , β_2), τα οποία κωδικοποιούνται από δυο διαφορετικά οπερόνια, αλλά οι δυο διαφορετικές β-υπομονάδες έχουν ίδια καταλυτική δράση τύπου χυμοθρυψίνης. Οι Luras *et al.*, 1997, προτείνουν ότι πιθανόν πρόκειται για οριζόντια μεταφορά γονιδίων ίσως και από ευκαρυωτικό κύτταρο στηριζόμενοι στο γεγονός ότι τα ζεύγη υπομονάδων είναι ισοδύναμα όπως αποδείχθηκε από σειρά συνθετικών πρωτεασωμάτων που παρασκεύασαν (με έκφραση των υπομονάδων σε *E. Coli*) με όλους τους πιθανούς συνδυασμούς των τεσσάρων υπομονάδων, και σε κάθε περίπτωση σχηματίσθηκε ενεργό σύμπλοκο, με καλύτερη όμως την περίπτωση εκείνου που αποτελείται και από τις τέσσερις.

Τα ευκαρυωτικά πρωτεασώματα που απομονώθηκαν από πλειάδα οργανισμών, όπως, ζύμη, (Heinemeyer *et al.* 1997, Groll *et al.*, 1997), θηλαστικά (Salzmann *et al.*, 1999), και

φυτά (Ozaki *et al.*, 1992), παρουσιάζουν την ίδια μακροσκοπική δομή, αυτή του κυλίνδρου με τα τέσσερα στρώματα, αλλά διαφέρουν από το προκαρυωτικό σε δυο βασικά σημεία :

α) Οι δακτύλιοι δεν είναι ομο-μερή της ίδιας πρωτεΐνης, αλλά αποτελούνται από επτά διαφορετικές α-, και επτά διαφορετικές β-υπομονάδες αντίστοιχα (α_1 - α_7 , β_1 - β_7) (Hendil *et al.*, 1995, Arendt & Hochstrasser 1997, Fu *et al.*, 1998). Όλες οι υπομονάδες που έχουν απομονωθεί μέχρι σήμερα παρουσιάζουν σημαντική ομολογία είτε με την α-, είτε με την β-υπομονάδα του αρχαίου πρωτεασώματος, οπότε μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο οικογένειες, την α-, και την β-. Μάλιστα είναι αξιοσημείωτο ότι υπομονάδες της ίδιας οικογένειας παρουσιάζουν μεγαλύτερη ομολογία με τις αντίστοιχες άλλων ειδών, παρά με τις άλλες του ίδιου οργανισμού, οπότε, η κάθε ομάδα, υποδιαιρείται σε 7 υποοικογένειες που έχουν εξελιχθεί παράλληλα. Οι σχετικές τους θέσεις στο πρωτεάσωμα παραμένουν οι ίδιες, με τις β-υπομονάδες στο κέντρο του κυλίνδρου να σχηματίζουν τα ενεργά κέντρα του πολυενζύμου, και τις α- να σχηματίζουν τα δυο εξωτερικά δαχτυλίδια. Κάθε υπομονάδα υπάρχει στο σύμπλοκο σε δυο αντίτυπα, σε αντιδιαμετρικές θέσεις στους δυο δακτυλίους, (Groll *et al.*, 1999), οπότε το μόριο εμφανίζει διπλή συμμετρία. Βασική διαφορά των υπομονάδων α- και β- τύπου είναι τα αμινο-τελικά (N-τελικά) άκρα τους. Στις α-υπομονάδες, μια σημαντικά συντηρημένη N-τελική προέκταση σχηματίζει μια α-έλικα η οποία καλύπτει την εσοχή του ενεργού κέντρου, οπότε μόνο οι β- μπορούν να δράσουν καταλυτικά. Στην θέση της α-έλικας των α-υπομονάδων, οι περισσότερες β-υπομονάδες περιέχουν ένα μικρό N-τελικό προπεπτιδίο, δηλαδή παράγονται σαν ανενεργά πρόδρομα μόρια και ενεργοποιούνται με αυτοπρωτεόλυση κατά τον σχηματισμό του συμπλόκου (Groll *et al.*, 1999). Σύμφωνα με τους (Frentzel *et al.*, 1994), αρχικά φτιάχνεται ένα προσύμπλοκο, ένας δακτύλιος με τις α-υπομονάδες, το οποίο καθοδηγεί την πρόσδεση των προ-β-υπομονάδων, όπου ίσως συμμετέχουν και κάποιες τσαπερόνες, έτσι φτιάχνεται το μισό πρωτεάσωμα. Η σύνδεση των δυο μισών προσυμπλόκων γίνεται μέσω αλληλεπίδρασης των προπεπτιδίων των β-υπομονάδων. Έκφραση των β-υπομονάδων χωρίς το προπεπτιδίο έχει σαν αποτέλεσμα την ενσωμάτωση των υπομονάδων σε σύμπλοκα τα οποία όμως δεν συνδέονται προς σχηματισμό του τελικού συμπλόκου, εκτός αν χορηγηθεί το προπεπτιδίο, οπότε και σχηματίζονται ενεργά πρωτεασώματα και μάλιστα σε πολύ λιγότερο χρόνο αφού δεν χρειάζεται ωρίμανση των β-υπομονάδων (Baumeister *et al.*, 1998) Την πρόσδεση των δυο μισών ακολουθεί τροποποίηση των β-υπομονάδων με αυτοκαταλυτική πρωτεόλυση (Schmidt & Kloetzel 1997), προς σχηματισμό του τελικού συμπλόκου. Η δέσμευση των υπομονάδων στο σύμπλοκο γίνεται παράλληλα με την μετάφραση, οπότε δεν υπάρχουν ελεύθερες υπομονάδες στα κύτταρα. Ελλείψει των β, οι α- σχηματίζουν ανενεργά δαχτυλίδια, ενώ ελλείψει των α-, οι β- παραμένουν ελεύθερες σαν πρόδρομα μόρια (τουλάχιστον όσον αφορά το αρχαίο πρωτεάσωμα). Στην περίπτωση που β-υπομονάδες εκφράζονται χωρίς τα προπεπτιδία, ελλείψει των α-, σχηματίζουν συσσωματώματα με περιορισμένη καταλυτική δράση (Seemüller *et al.*, 1995). Με βάση τα στοιχεία αυτά η καταλυτική δράση αποδίδεται στις β-υπομονάδες. Καμία από τις β-υπομονάδες δεν παρουσιάζει ομολογία με κάποια από τις γνωστές οικογένειες πρωτεασών. Μετά την πρωτεολυτική απομάκρυνση του προπεπτιδίου, οι καταλυτικές β-αλυσίδες εμφανίζουν μια πρωτεολυτικά ενεργή N-τελική θρεονίνη, αυστηρά συντηρημένη σε όλες τις β-υπομονάδες (Kisselev *et al.*, 2000), πρόκειται λοιπόν για νέα οικογένεια πρωτεασών θρεονίνης (Seemüller *et al.*, 1995, Groll, *et al.*, 1997). Με βάση την δομή του πρωτεασώματος (Groll, *et al.*, 1997), καθώς και με στοιχεία που συλλέγονται από μεταλλάξεις των β-υπομονάδων (Heinemeyer *et al.*, 1991, Heinemeyer *et al.*, 1993, Seemüller *et al.*, 1995, Arendt & Hochstrasser 1997, Groll *et al.*, 1999), κάθε καταλυτική δραστηριότητα αποδίδεται σε μία συγκεκριμένη β-υπομονάδα, πχ η β5 ή PRE2, (Heinemeyer *et al.*, 1991) απομονώθηκε από κύτταρα ζύμης ανίκανα να εκτελέσουν δράση χυμοθρυψίνης, η β2 ή Pup1 εκτελεί την δράση τρυψίνης και η β1 ή Pre3 την υδρόλυση πεπτιδυλ-γλουτάμυλ-

πεπτιδίου (Arendt & Hochstrasser 1997) (Ανασκόπηση Baumeister & Lupas 1997, και λεπτομέρειες για τον μηχανισμό κατάλυσης του πρωτεασώματος Orłowski & Wilk 2000).

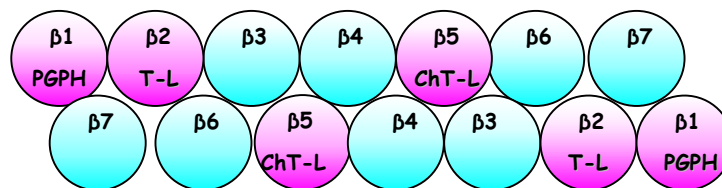
Υπομονάδα	Υπομονάδα ζύμης	Ανθρώπινη	Arabidopsis	Λειτουργία
Υπομονάδες τύπου α				
α1	PRS2/C7/CSL1/Y8	IOTA/PROS27	PAA1 PAA2	Rνάση ;
α2	PRE8/Y7	C3	PAB1 PAB2	
α3	PRE9/Y13	C9	PAC1 PAC2	
α4	PRE6	XAPC7	PAD1 PAD2	
α5	DOA5/PUP2	ZETA	PAE1 PAE2	RΝάση ;
α6	PRE5	C2/PROS30	PAF1 PAF2	
α7	PRS1/PRE10/C1	C8	PAG1	NDK;
Υπομονάδες τύπου β				
β1 β1-i	PRE3	Y/Delta/ LMP2	PBA1	PGPH (BRAP?) ChT-L
β2 β2-i	PUP1	Z/ MECL1-LMP10	PBB1 PBB2	T-L T-L
β3	PUP3	C10	PBC1 PBC2	
β4	PRE1/C11	C7	PBD1 PBD2	
β5 β5-i	DOA3/PRE2/PR G1	X/MB1/ LMP7	PBE1	ChT-L ChT-L
β6	PRS3/PRE7/C5	C5	PBF1	
β7	PRE4	N3/Beta	PBG1	

Πίνακας Error! Unknown switch argument. Υπομονάδες του 20S πρωτεασώματος

Σήμερα είναι γνωστές οι πλήρεις ακολουθίες όλων των υπομονάδων του πρωτεασώματος από διάφορους οργανισμούς (Hendil *et al.*, 1995, Fu *et al.*, 1998, Rivett *et al.*, 1993). Οι Rivett *et al.*, (1993) υποστηρίζουν ότι ο αριθμός των υπομονάδων του πρωτεασώματος ποικίλλει ανάλογα με τον οργανισμό (ζύμη 14, φυτά 12-15, άλλοι μέχρι και 20), ακόμη και με το στάδιο ανάπτυξης όπως πχ στη δροσόφιλα, ενώ οι Palmer *et al.*, (1996) βρίσκουν ότι η σύσταση των πρωτεασωμάτων ποικίλλει ακόμη και με την υποκυτταρική τους θέση, όπως πχ τα πρωτεασώματα του ΕΔ είναι κάπως εμπλουτισμένα σε LMP2 (υπομονάδα τύπου β που επάγεται από γ-ιντερφερόνη, (βλέπε ανοσοπρωτεάσωμα Κεφ Β Παρ 3). Αντίθετα οι Hendil *et al.*, (1995), οι οποίοι με ειδικά αντισώματα ταυτοποίησαν τις υπομονάδες σε πρωτεασώματα από διάφορες σειρές ανθρώπινων κυττάρων και από διάφορους ανθρώπινους ιστούς, βρίσκουν ότι η σύσταση είναι παντού η ίδια, και υποστηρίζουν ότι οι διάφορες, επιπλέον των 14, πρωτεΐνες που βρίσκουν οι άλλοι σε πηκτώματα δυο διαστάσεων είναι αποτέλεσμα μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων των συγκεκριμένων υπομονάδων και δεν πρόκειται για νέες πρωτεΐνες. Σε ζύμη έχουν εντοπισθεί

14 γονίδια για τις 14 υπομονάδες του πρωτεασώματος. Στον άνθρωπο είναι σίγουρα περισσότερα δεδομένου η γ-ιντερφερόνη προκαλεί αντικαταστάσεις υπομονάδων και σχηματισμό πρωτεασωμάτων με άλλες υπομονάδες και άλλες ιδιότητες (ανοσοπρωτεασώματα). Στην *Arabidopsis thaliana* εντοπίζονται 23 γονίδια (Fu *et al.*, 1998), με τα ομόλογα πολύ πιο συντηρημένα μεταξύ τους (σε σχέση με τα ανθρώπινα επαγόμενα από γ-ιντερφερόνη και τα ομόλόγιά τους), αλλά δεν είναι γνωστό αν συμβαίνουν αντικαταστάσεις υπομονάδων και αν υπάρχουν διαφορετικοί πληθυσμοί πρωτεασωμάτων.

Η πολυπλοκότητα των υπομονάδων αντικατοπτρίζεται και στην πολυπλοκότητα του μηχανισμού δράσης των αντίστοιχων συμπλόκων: το προκαρυωτικό πρωτεάσωμα με το ομομερές των β-υπομονάδων εμφανίζει μόνο δράση χυμοθρυψίνης, και 14 ενεργά κέντρα, σε αντίθεση με το ευκαρυωτικό όπου οι τρεις από τις επτά β-υπομονάδες (β1, β2, β5) σχηματίζουν έξι ενεργά κέντρα με τρεις πρωτεολυτικές δραστηριότητες (χυμοθρυψίνης, θρυψίνης και υδρόλυσης πεπτιδουλ-γλουταμυλ πεπτιδίου), και καθεμία από αυτές έχει μία ομόλογη που επάγεται από γ-ιντερφερόνη (LMP2, MECL1, LMP7 αντίστοιχα).



Για καθεμία από τις πρωτεολυτικές δραστηριότητες του πρωτεασώματος έχει εντοπισθεί και ένα φθορογονικό πεπτιδίο «μοντέλο» που αντικατοπτρίζει την ενεργότητα κάθε καταλυτικού κέντρου. Τα πεπτιδία αυτά είναι τα LLE-βNA, PFR-MCA, και LLVY-MCA για την υδρόλυση πεπτιδουλ-γλουταμυλ-πεπτιδίου, τρυψίνης και χυμοθρυψίνης αντίστοιχα, που επιτρέπουν τον προσδιορισμό της ενεργότητας κάθε πρωτεολυτικού κέντρου εύκολα με φθορομέτρηση. (Heinemyer *et al.*, 1993). Οι υπόλοιπες β-υπομονάδες δεν εμφανίζουν καταλυτική δράση, αλλά, συμμετέχουν στον σχηματισμό των καταλυτικών κέντρων μέσω ειδικών αλληλεπιδράσεων με τις γειτονικές β-υπομονάδες του ίδιου ή και του γειτονικού β-δακτυλίου (Arendt & Hochstrasser 1997, Groll *et al.*, 1999,). Οι προσπάθειες απομόνωσης ελεύθερων β- ενεργών υπομονάδων δεν απέδωσαν. Οι υπομονάδες είναι πρωτεολυτικά ενεργές μόνο μέσα στο σύμπλοκο, κάτι που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα πρωτεολυτικά κέντρα σχηματίζονται από αλληλεπιδράσεις γειτονικών υπομονάδων, όπου συμμετέχουν και οι β- μη πρωτεολυτικές υπομονάδες (Orlowski and Wilk, 2000).

β) Οι ακραίοι δακτύλιοι των α-υπομονάδων του προκαρυωτικού πρωτεασώματος αφήνουν στο κέντρο ένα άνοιγμα 13Å περίπου (Löwe *et al.*, 1995). Η ανάλυση της δομής του ευκαρυωτικού πρωτεασώματος (από ζύμη) (Groll, M., *et al.*, 1997), έδειξε ότι τα N-τελικά άκρα των α-υπομονάδων καλύπτουν την επιφάνεια του κυλίνδρου, και αφήνουν ένα άνοιγμα 2Å μόνο.



In vitro, το πρωτεάσωμα δεν είναι σε θέση να αποδομήσει πρωτεΐνες εκτός αν αυτές είναι σημαντικά μετουσιωμένες και το ίδιο έχει προηγουμένως ενεργοποιηθεί με έκθεση σε χαμηλές συγκεντρώσεις SDS, θερμοκρασία ή συγκεκριμένες ιονικές συνθήκες (Coux *et al.*, 1996, McGuire *et al.*, 1989). Αυτό σημαίνει ότι το ελεύθερο 20S πρωτεάσωμα δεν είναι ενεργό μέσα στα κύτταρα και απαιτείται είτε αλλαγή στη διαμόρφωση των α-αλυσίδων (μετακίνηση των N-τελικών άκρων προς τα έξω), ώστε να ελευθερωθεί το άνοιγμα και να επιτραπεί η είσοδος των υποκαταστατών στην καταλυτική κοιλότητα, είτε αλλοστερική ρύθμιση των ενεργών κέντρων προς ενεργοποίησή τους. Πρόσφατα, οι Ostulski & Gaczynska (2000) δημοσίευσαν μια νέα μελέτη της δομής του 20S από ζύμη, όπου φαίνεται ότι το άνοιγμα της εισόδου του κυλίνδρου δεν απαιτεί την αλληλεπίδραση με άλλους

παράγοντες. Στην εργασία αυτή φαίνεται ότι τα πρωτεασώματα βρίσκονται σε δυο μορφές την ανενεργό (κλειστή) και την ενεργό (ανοιχτή) σε ισορροπία σε σχετικές αναλογίες: 75%-25% αντίστοιχα, και ότι η παρουσία και μόνο των υποκαταστατών είναι ικανή να μετατοπίσει την ισορροπία προς την ανοιχτή ενεργό μορφή. Η παρουσία αναστολέων δεν αυξάνει το ποσοστό της κλειστής μορφής, παρεμποδίζει όμως την μετατόπιση της ισορροπίας προς την ανοιχτή ενεργό μορφή. Αν αυτό ισχύει στην πραγματικότητα ανατρέπονται αρκετά από τα δεδομένα όσον αφορά την σχέση του πρωτεασώματος με άλλα σύμπλοκα και υποκυτταρικούς παράγοντες, ενώ παράλληλα υποδηλώνει ότι, αντίθετα με την μέχρι τώρα άποψη, το πρωτεάσωμα δρα και μόνο του, οπότε πιθανόν να παίζει και κάποιον άλλο ρόλο εκτός από αυτούς που του αποδίδονται μέσω της αλληλεπίδρασής του με άλλα σύμπλοκα όπως ο PA700 στην 26S πρωτεάση και ο PA28 στα ανοσοσυστήματα. Είναι πάντως σίγουρο ότι το 20S αλληλεπιδρά με διάφορους παράγοντες μέσα στα κύτταρα, και αυτή η αλληλεπίδραση έχει σαν αποτέλεσμα την αλλαγή της εκλεκτικότητας, ειδίκευσης καθώς και της συμπεριφοράς του συμπλόκου όσον αφορά την ελεγχόμενη πρωτεόλυση μέσα στα κύτταρα. Τα σύμπλοκα, η σχέση τους με το πρωτεάσωμα και η λειτουργία τους αναλύονται παρακάτω. (Πρόσφατη ανασκόπηση Baumeister *et al.*, 1998, DeMartino *et al.*, 1999, Zwickl *et al.*, 2000).

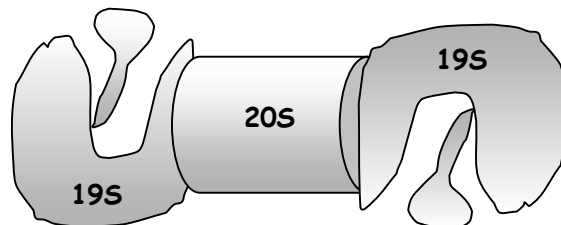
2. Η 26S Πρωτεάση

2.1 Το πρωτεάσωμα 20S και τα σύμπλοκα με τα οποία αλληλεπιδρά

Πρώτοι οι Hough *et al.*, (1987) παρατήρησαν ότι η πρωτεόλυση *in vitro* από το 20S πρωτεάσωμα, ουβικιτινιλιωμένων πρωτεϊνών (Ub-λυσοζύμη), απαιτεί ATP και το μεγάλο μοριακού βάρους κλάσμα από εκχύλισμα κυττάρων. Ακόμη, παρατήρησαν ότι η πρωτεόλυση των πεπτιδίων «μοντέλων» του πρωτεασώματος καθιζάνει στα κλάσματα με συντελεστή καθίζησης 20S, ενώ η πρωτεόλυση των ουβικιτινιλιωμένων πεπτιδίων καθιζάνει αργότερα στο κλάσμα του 26S. Έτσι βαφτίστηκαν τα δύο σύμπλοκα ως 20S το πρωτεάσωμα, ή το πρωτεολυτικό σωματίδιο (Catalytic Particle CP), και 26S πρωτεάση το σύμπλοκο του CP με το 19S, το ρυθμιστικό σωματίδιο (Regulatory Particle RP), που πρωτεολύει και Ub-πρωτεΐνες.

Ενώ ακόμη δεν είναι ξεκάθαρο αν το 20S αποτελεί κομμάτι του 26S, οι Seufert *et al.*, (1992) αναφέρουν ότι τα κύτταρα ζύμης με μεταλλαγμένη την β-υπομονάδα PRE1 του 20S δεν μπορούν να πρωτεολύσουν τις Ub-πρωτεΐνες, που φυσιολογικά αποδομούνται σε κύτταρα «άγριου τύπου», μέσω του μονοπατιού της ουβικιτίνης.

Αργότερα, οι Peters *et al.*, (1992), απομονώνουν από μύες κουνελιού ένα σύμπλοκο με συντελεστή καθίζησης 26S, και αναλύουν την δομή αυτού του συμπλόκου με την βοήθεια ηλεκτρονικής μικροσκοπίας και ψηφιακή ανάλυση εικόνας. Πρόκειται για ένα ασύμμετρο σύμπλοκο, το οποίο περιέχει τον κύλινδρο του 20S, με την χαρακτηριστική



δομή των τεσσάρων δαχτυλιδιών, αλλά φέρει και στις δύο άκρες του κυλίνδρου από μία μάζα πρωτεϊνών με συντελεστή καθίζησης 19S, που χαρακτηρίζεται ως η «μπάλα» (the ball), σε σχήμα V ακουμπισμένο στον κύλινδρο με την μια πλευρά του. Οι 7 α-υπομονάδες που σχηματίζουν τα εξωτερικά δαχτυλίδια, του κυλίνδρου είναι τοποθετημένες σε συγκεκριμένες θέσεις, ώστε να προσαρμόζουν τα νέα σύμπλοκα ασύμμετρα πάνω στον κύλινδρο. Το

σύμπλοκο 26S χωρίζεται στα δύο υποσύμπλοκα, και οι υπομονάδες τους αναλύονται με ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων. Η ανάλυση αυτή έδειξε ότι το 26S περιέχει το 20S.

Παράλληλα, και ενώ τα αποτελέσματα των Peters *et al.*, (1992) βρίσκονται υπό αμφισβήτηση όσον αφορά την παρουσία του πρωτεασώματος στην 26S, οι Sawada *et al.*, (1993) απομονώνουν σύμπλοκο 26S από σκελετικούς μύες κουνελιού, το οποίο, σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα, εύκολα διαχωρίζεται σε δύο υποσύμπλοκα που αντιστοιχούν στο 20S και στο 19S, των οποίων η σύνθεση αναλύεται με ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων. Το σχήμα των υπομονάδων του 20S υποσυμπλόκου συμφωνεί με αυτό του 20S πρωτεασώματος. Το απομονωμένο ενεργό 26S σύμπλοκο υπάρχει σε δύο ισομορφές, που αποτελούνται από το 20S συμπλοκοποιημένο με ένα, ή δύο σύμπλοκα 19S αντίστοιχα. Προτείνουν λοιπόν ότι η ενεργός μορφή της 26S πρωτεάσης αποτελείται από το καταλυτικό σωματίδιο (το πρωτεάσωμα), και από ένα ή δύο σύμπλοκα 19S.

Ο Udvardy (1993) απομόνωσε το 19S υποσύμπλοκο από δροσόφιλα, και το αποκάλυψε σωματίδιο μ. Αυτό το σωματίδιο είναι πρωτεολυτικά ανενεργό και, σύμφωνα με την παραπάνω εργασία, το σύμπλοκο που απομονώθηκε δεν είναι ικανό από μόνο του να ενεργοποιήσει *in vitro* το 20S προς αποδόμηση ουβικιτινιλιωμένων προϊόντων, ακόμη και με την προσθήκη ATP, αλλά χρειάζεται και κάποιους άλλους υποκυτταρικούς παράγοντες. Σε αντίθεση με τα στοιχεία αυτά οι Chu-Ring *et al.*, (1994), απομόνωσαν ένα παρόμοιο σύμπλοκο από ανθρώπινα ερυθρά αιμοσφαίρια, που και σε αυτή την περίπτωση είναι πρωτεολυτικά ανενεργό, αλλά, μετά από προσθήκη του 19S με ATP και Mg^{2+} σε απομονωμένο 20S, αυξάνει την ενεργότητα του πρωτεασώματος από 15-100 φορές. Το σύμπλοκο, είναι περίπου 700kDa, αποτελείται από τουλάχιστον 16 πολυπεπτιδικές αλυσίδες 20-100kDa, και ονομάστηκε ενεργοποιητής του πρωτεασώματος, PA700 (Proteasome Activator). Έδειξαν επίσης ότι το ATP απαιτείται για την συμπλοκοποίηση των δύο συμπλόκων και όχι για την πρωτεόλυση. Αν η απομόνωση γίνει σε συνθήκες έλλειψης ATP το 19S βρίσκεται σε ελεύθερη μορφή, ενώ αν προστεθεί ATP, συμπλοκοποιείται με το 20S και σχηματίζει την ενεργό 26S πρωτεάση. Με βάση αυτά τα στοιχεία, οι Fisher *et al.*, (1994) κατάφεραν να εντοπίσουν και να απομονώσουν 26S σύμπλοκο και από κύτταρα ζύμης, τα οποία όμως επώασαν πριν την απομόνωση, με ATP και Mg^{2+} . Τα δύο υποσύμπλοκα συνυπάρχουν στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα σε ωκύτταρα *Xenopus laevis*, σε ισορροπία με την συμπλοκοποιημένη μορφή τους (26S πρωτεάση), η οποία εξαρτάται από την διαθεσιμότητα του ATP (Peters *et al.*, 1994).

Το σύμπλοκο 19S δεν είναι ο μόνος παράγοντας που ελέγχει τις δραστηριότητες του 20S πρωτεασώματος *in vivo*, τουλάχιστον σε ανώτερους οργανισμούς. Όπως διαπίστωσαν οι Dubiel *et al.*, (1992), υπάρχουν τρία είδη πρωτεασώματος, με διαφορετική ηλεκτροφορητική συμπεριφορά σε εκχύλισμα δικτυοκυττάρων κουνελιού, που υδρολύουν πεπτίδια «μοντέλα». Αυτά περιλαμβάνουν το 20S πρωτεάσωμα, την 26S πρωτεάση, και μια ενδιάμεση μορφή, η οποία αποτελείται από το 20S και έναν ακόμη πολυπρωτεϊνικό παράγοντα με συντελεστή καθίζησης 11S. Το 11S, απομακρύνεται εύκολα από το 20S, και η επανασύνδεση δεν απαιτεί υδρόλυση ATP. Αυτός ο νέος παράγοντας δεν συμμετέχει στην αποδόμηση Ub-πρωτεϊνών, ενεργοποιεί όμως την υδρόλυση πεπτιδίων από το 20S κατά 60 περίπου φορές. Η σύνδεση του 11S με το 20S δεν αλλάζει τις πρωτεολυτικές ιδιότητες του 20S, οπότε μάλλον το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης προέρχεται από αλλαγές στην διαμόρφωση των α-υπομονάδων στην είσοδο του 20S, οπότε διευκολύνει την πρόσβαση των υποκαταστατών στα ενεργά κέντρα του καταλυτικού σωματιδίου.

Το συμπέρασμα από όλες αυτές τις εργασίες είναι ότι η πρωτεάση πίσω από όλα αυτά τα γεγονότα είναι ο 20S κύλινδρος του πρωτεασώματος, ο οποίος προσαρμόζεται στις εκάστοτε συνθήκες και απαιτήσεις του κυττάρου αλλάζοντας πρόσωπο και ιδιότητες είτε αντικαθιστώντας τις καταλυτικές του υπομονάδες (ανοσοαντισώματα) ή/και αλληλεπιδρώντας με ρυθμιστικά σύμπλοκα τα οποία κατευθύνουν τις πρωτεολυτικές του

ιδιότητες ανάλογα με τις ανάγκες του κυττάρου. (Ανασκόπηση Tanaka 1998, Baumeister *et al.*, 1998, DeMartino & Slaughter 1999). Η μελέτη της λειτουργίας του πρωτεασώματος μετατοπίζεται στην μελέτη των δομικών υπομονάδων των συμπλόκων με τα οποία αλληλεπιδρά μέσα στα κύτταρα, ώστε να αποκωδικοποιηθεί η συμβολή του κάθε παράγοντα στο συνολικό φαινόμενο της εκλεκτικής πρωτεόλυσης μέσω πρωτεασώματος.

2.2 Ανάλυση της δομής και της λειτουργίας του Ρυθμιστικού σωματιδίου (RP, ή PA700).

Το ρυθμιστικό σωματίδιο (RP), ή PA700 (Proteasome Activator 700kDa), ή μ σωματίδιο, ή μπάλα, αποτελείται από 16-18 πρωτεΐνες και έχει απομονωθεί από όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Χρειάζεται υδρόλυση ATP για να συνδεθεί με το καταλυτικό σωματίδιο (πρωτεάσωμα) και η σύνδεση αυτή προκαλεί πρώτον ενεργοποίηση του πρωτεασώματος, και δεύτερον του προσδίδει την ικανότητα να πρωτεολύει πολύ-ουβικιτινιλιωμένες πρωτεΐνες. Τα βασικά ερωτήματα που προκύπτουν λοιπόν είναι: α) ποια ή ποιες υπομονάδες είναι υπεύθυνες για την σύνδεση με το πρωτεάσωμα, και πώς αυτό οδηγεί σε ενεργοποίηση της κατάλυσης, και β) ποια ή ποιες υπομονάδες είναι υπεύθυνες για την αναγνώριση και δέσμευση των πολύ-ουβικιτινιλιωμένων πρωτεϊνών. Για να αποκωδικοποιηθεί ο τρόπος δράσης του συμπλόκου πρέπει να ταυτοποιηθούν οι υπομονάδες, η μεταξύ τους σχέση, και να αποδοθούν οι ρόλοι της καθέμιας στο περιβάλλον του συμπλόκου.

Υπομονάδα	Υπομονάδες ζύμης Προηγούμενα ονόματα	Ομόλογες				Μορ. Βάρος
		Ανθρώπου	Βοδιού	Arabidopsis	Άλλες	
Rpn1	Hrd2/Nas1	S2/Trap-2	p97	AtRpn1	mts4	109.4
Rpn2	Sen3	S1	p112	AtRpn2		104.3
Rpn3	Sun2	S3	p58	AtRpn3		60.4
Rpn4	Son1/Ufd5			AtRpn4		60.1
Rpt1	Cim3/Yta3	S7/Mss1		AtRpt1		52.0
Rpt2	Yta5	S4	p56	AtRpt2	mts2	48.8
Rpt3	Yta2/Ynt1	S6/TBP7	p48	AtRpt3	MS73	48.0
Rpt4	Crl13/Sug2/Pcs1	S10b	p42	AtRpt4	CADp44	49.4
Rpt5	Yta1	S6'/TBP1		AtRpt5		48.2
Rpn5	Nas5		p55	AtRpn5		51.8
Rpn6	Nas6	S9	p44.5	AtRpn6		49.8
Rpn7	ORF u32445	S10	p44	AtRpn7		49.0
Rpt6	Sug1/Cim3/Crl3	S8/Trip1	p45	AtRpt6	m56	45.2
Rpn8	ORF z75169	S12	p40	AtRpn8	Mon-34	38.3
Rpn9	Nas7		p40.5	AtRpn9		45.9
Rpn10	Mcb1/Sun1	S5a		AtRpn10/Mbp1	p54	29.7
Rpn11	Mpr1	Poh1		Rpn11	pad1	34.4
Rpn12	Nin1	S14	p31	Rpn12	mts3	31.9

Πίνακας 2: Οι υπομονάδες του ρυθμιστικού σωματιδίου (19S, RP, PA700). Η ταξινόμηση και αρίθμηση των υπομονάδων του *Saccharomyces cerevisiae* έγινε με βάση το μοριακό τους βάρος από την μεγαλύτερη προς την μικρότερη. Επίσης διαχωρίστηκαν σε δύο υποκατηγορίες στις AAA ATPάσες και στις μη ATPάσες. Όλες είναι υπομονάδες του ρυθμιστικού σωματιδίου (Regulatory Particle 19S, RP); Regulatory Particle Triple-A proteins: Rpt 1-6 και Regulatory Particle Non-ATPase proteins: Rpn 1-12 (Finley *et al.*, 1998).

Πολλές από τις υπομονάδες απομονώθηκαν έμμεσα, κυρίως από κύτταρα ζύμης, λόγω των φαινοτύπων που προκαλούν διάφορες μεταλλαγές στα γονίδια τους, όμως η παρουσία τους στο σύμπλοκο αποδείχθηκε άμεσα με ανάλυση των υπομονάδων απομονωμένων συμπλόκων. Σε γενικές γραμμές, το σύμπλοκο απομονώνεται με βάση την πρωτεολυτική του δραστηριότητα με φθορογόνα πεπτιδία, ακόλουθα, οι υπομονάδες αναλύονται σε αποδιατακτικά πηκτώματα ακρυλαμίδης και απομονώνονται. Τέλος, προσδιορίζεται η ακολουθία τους με πεπτιδία που προκύπτουν από μερική πρωτεόλυση. Με τον τρόπο αυτό οι DeMartino *et al.*, (1994) ανέλυσαν τις υπομονάδες του 19S από ερυθρά αιμοσφαίρια βοδιού στο οποίο εντόπισαν τρεις AAA ATPάσες, τις S4(Rpt2), TBP7(Rpt3) και SUG1(Rpt6), και τέσσερις μη ATPάσες τις p58(Rpn1), p112(Rpn2), p97(Rpn1) και p31(Rpn12) οι οποίες δεν είχαν περιγραφεί προηγουμένως. Έδειξαν ότι ο PA700 έχει δράση ATPάσης, και προτείνουν ότι το σωματίδιο περιέχει και άλλες, πλέον των τριών, ATPάσες στις οποίες αποδίδεται η υδρόλυση του ATP κατά την σύνδεση του σωματιδίου με το πρωτεάσωμα. Με παρόμοιο τρόπο, οι Tanaka & Tsurumi (1997), οι Glickman *et al.*, (1998a), οι Fu *et al.*, (1999) και οι Hölzl *et al.*, (2000), ταυτοποίησαν τις υπομονάδες του συμπλόκου από ανθρώπινα ερυθρά αιμοσφαίρια, ζύμη (*S. cerevisiae*), φυτά (*Arabidopsis thaliana*) και δροσόφιλα αντίστοιχα.

Οι ATPάσες (Rpts)

Το ρυθμιστικό σωματίδιο περιέχει 6 ATPάσες, που είναι οι πιο συντηρημένες υπομονάδες του σωματιδίου σε όλους τους οργανισμούς, με αυξημένη όμως ομολογία μεταξύ τους. Τα γονίδια είναι απαραίτητα σε ζύμη, και για τις περισσότερες, μεταλλαγές προκαλούν σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου σε κάποια από τις φάσεις της μίτωσης. Οι υπομονάδες αυτές ανήκουν σε μια νέα οικογένεια ATPασών, τα μέλη της οποίας φέρουν μια αυστηρά συντηρημένη περιοχή 200 περίπου αμινοξέων όπου εντοπίζονται δυο περιοχές πρόσδεσης ATP (A και B μοτίβα Walker). Οι πρωτεΐνες αυτές εκτελούν διάφορες λειτουργίες μέσα στα κύτταρα, γεγονός που τους έδωσε και το όνομά τους: AAA (ATPases Associated with several cellular Activities) (βλέπε Κεφ. Α Παρ 1, Ανασκόπηση: Patel & Latterich (1998)), Οι ATPάσες του πρωτεασώματος είναι 6 σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα στα οποία αναλύθηκε η σύσταση του PA700, και αποτελούν υποοικογένεια των AAA ATPασών. (Η ανάλυση της καθεμίας γίνεται στο κεφάλαιο των AAA ATPασών.) Στην ζύμη, όπου είναι γνωστό όλο το γονιδίωμα υπάρχουν μόνο έξι γονίδια (Glickman *et al.*, 1998a).

Οι AAA πρωτεΐνες του πρωτεασώματος απομονώθηκαν από διάφορα εργαστήρια σε μελέτες διαφορετικές μεταξύ τους, και αυτός είναι ο λόγος που έχουν πολλά ονόματα, το καθένα από τα οποία αντιπροσωπεύει την λειτουργία που τους αποδόθηκε στην εκάστοτε εργασία, όπως για παράδειγμα η SUG1(Rpt6) της ζύμης, που απομονώθηκε σαν συμπιεστής μεταλλαγής στην όξινη περιοχή του Gal4 (Suppressor of Gal4), και χαρακτηρίστηκε σαν μεταγραφικός παράγοντας από τους Swaffield *et al.*, (1992), ονομάζεται επίσης και CIM5 από τους Ghislain *et al.*, (1993) οι οποίοι απομόνωσαν μια πρωτεΐνη μεταλλαγή της οποίας είναι συνθετική θνησιγόνος με μεταλλαγή στην κυκλίνη Cdc28(Co-lethal in Mitosis) και πρότειναν ότι απαιτείται για τον διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων, και τέλος Trip1 από τους Lee *et al.*, (1994) σαν παράγοντας που αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα της ορμόνης του θυρεοειδούς (Thyroid Recceptor Interacting Protein1). Μέχρι στιγμής δεν υπάρχει ένα ικανοποιητικό μοντέλο δράσης των πρωτεϊνών αυτών που να συνδυάζει όλα όσα είναι γνωστά για την καθεμία από αυτές, και σίγουρα δεν εξηγούνται όλα από την παρουσία τους στο σύμπλοκο της 26S και μόνο.

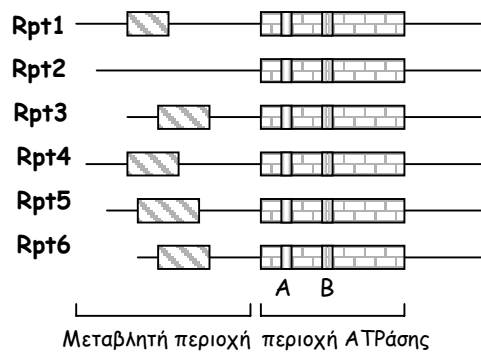
Το χαρακτηριστικό αυτής της υποομάδας των AAA ATPασών είναι μια περιοχή υπερελικωμένο ελατήριου (coiled-coil) στην N-τελική μεταβλητή περιοχή τους, μέσω της οποίας αλληλεπιδρούν με άλλες πρωτεΐνες. Σχηματίζουν έναν εξαμελή δακτύλιο, ο οποίος είναι ενεργός μόνο όταν υπάρχουν και οι έξι σε συγκεκριμένες θέσεις (Seeger *et al.*, 1997).

Τέτοιο σύμπλοκο δεν έχει απομονωθεί, οπότε μάλλον ο σχηματισμός του ρυθμίζεται από το υπόλοιπο σύμπλοκο (ρυθμιστικό σωματίδιο, 19S). Ο εξαμελής δακτύλιος συνδέεται με τον δακτυλίου των α-υπομονάδων του 20S πρωτεασώματος, το οποίο και ενεργοποιούν, πιθανόν μέσω αλλαγής της διαμόρφωσης των α-υπομονάδων και άνοιγμα του καναλιού του πρωτεασώματος. Για την Rpt2, ο υπολογιστής δεν προβλέπει δομή ελατηρίου, αλλά εκτιμάται ότι σχηματίζεται *in vivo*.

Η συνεργασία ΑΤΡασών με πρωτεάσες δεν είναι κάτι νέο στην εξέλιξη των κυττάρων (βλέπε Κεφ. Β Παρ. 6). Για την ακρίβεια πολλές προκαρυωτικές πρωτεάσες συνεργάζονται με ΑΤΡάσες, με την διαφορά ότι στις περιπτώσεις αυτές μία μόνο ΑΤΡάση σχηματίζει ένα ολιγομερές σύμπλοκο (συνήθως με έξι υπομονάδες), σε αντίθεση με το πρωτεάσμα, όπου συμμετέχουν έξι διαφορετικές πρωτεΐνες.

Ο PA700 συνδέεται με το 20S καταλυτικό σωματίδιο (το πρωτεάσμα) σε αναλογίες 1:1 ή 2:1 και κατασκευάζει την 26S πρωτεάση, η οποία είναι μια ΑΤΡ-εξαρτώμενη πρωτεάση. Η σύνδεση των δύο συμπλόκων απαιτεί υδρόλυση ΑΤΡ, όπως και η ακόλουθη πρωτεόλυση. Η δράση νουκλεοτιδάσης εντοπίζεται στον PA700 και όχι στο 20S. Οι Hoffman & Rechesteiner (1996) μελέτησαν την υδρόλυση νουκλεοτιδίων από την 26S και το PA700, και βρήκαν ότι η δράση νουκλεοτιδάσης των δύο συμπλόκων είναι παρόμοια, αλλά όχι ίδια. Υδρολύονται και τα τέσσερα νουκλεοτίδια (ΑΤΡ, CΤΡ, GΤΡ, UΤΡ), αλλά, ενώ τα GΤΡ και UΤΡ υδρολύονται πιο αποτελεσματικά, η πρωτεόλυση υποστηρίζεται από τα ΑΤΡ και CΤΡ. Και τα δυο σύμπλοκα απαιτούν ιόντα Mn^{2+} και Mg^{2+} . Προτείνουν ότι αυτό που μετρήθηκε ως δράση νουκλεοτιδάσης συμπλόκου είναι στην πραγματικότητα ένας μέσος όρος της ενεργότητας των έξι ΑΤΡασών που βρίσκονται στο σύμπλοκο, οι οποίες πιθανόν να παρουσιάζουν διαφορετικές προτιμήσεις ως προς τα νουκλεοτίδια που υδρολύουν.

Η σύνδεση του 19S στο πρωτεάσμα και η ακόλουθη ενεργοποίησή του απαιτεί υδρόλυση του ΑΤΡ που αποδίδεται στις έξι ΑΤΡάσες. Γιατί όμως, απαιτούνται έξι, ενώ μια θα ήταν αρκετή, όπως αποδεικνύεται από τα αντίστοιχα προκαρυωτικά συστήματα; Στις προκαρυωτικές ΑΤΡ-εξαρτώμενες πρωτεάσες, ο δακτύλιος των ΑΤΡασών είναι που κάνει την αναγνώριση και την επιλογή των υποκαταστατών, και μάλιστα το πρωτεολυτικό σύμπλοκο επιτυγχάνει αλλαγές ειδικεύσης αλλάζοντας συντρόφους (ΑΤΡάσες), όπως στην περίπτωση των βακτηριακών Clp πρωτεασών ClpAP και ClpXP. Η παρουσία των έξι αντί μιας στο σύμπλοκο 19S πιθανόν διευρύνει το φάσμα των υποκαταστατών που επιλέγονται. Το ερώτημα είναι, αν απαιτούνται και οι έξι σε ένα σύμπλοκο, ή μπορούν οι άλλες να αντικαταστήσουν την έλλειψη της μιας, ή και ακόμη, αν είναι πιθανόν να υπάρχουν υποπληθυσμοί πρωτεασμάτων με μία μόνο ΑΤΡάση κάθε φορά. Προσπαθώντας να απαντήσουν στις παραπάνω ερωτήσεις οι Glickman *et al.*, (1998a), σήμαναν τις έξι πρωτεΐνες της ζύμης με αλυσίδα 6-ιστιδινών, μέσω της οποίας μπόρεσαν να απομονώσουν σύμπλοκα που περιέχουν την εκάστοτε πρωτεΐνη. Κάθε φορά, το σύμπλοκο που απομονώνεται από την μία, περιέχει και τις άλλες σε ίσες ποσότητες, δηλαδή απομονώνοντας πρωτεασώματα μέσω της His₆-Rpt2 εντοπίζουν και τις Rpt1 και Rpt6 σε ποσότητες που αντιστοιχούν σε αναλογίες 1/σύμπλοκο. Με βάση την παραπάνω εργασία, και επεκτείνοντας τα αποτελέσματα από την ζύμη και στα υπόλοιπα ευκαρυωτικά κύτταρα, μπορούμε να υποθέσουμε ότι και οι έξι ΑΤΡάσες απαιτούνται για τον σχηματισμό ενός 19S συμπλόκου. Το ερώτημα που τίθεται στη συνέχεια είναι: λειτουργούν και οι έξι σαν μια μηχανή, ή η καθεμία



έχει ξεχωριστούς ρόλους στο σύμπλοκο; Αν ακολουθήσουμε το μοντέλο των προκαρυωτικών ΑΤΡακών τύπου ClpAP, HslVU, τότε, ο εξαμερής δακτύλιος λειτουργεί σαν σύνολο, σαν ένας μοριακός μοχλός, οπότε, και στην περίπτωση του πρωτεασώματος, θα μπορούσαν και οι έξι να λειτουργούν με όμοιο συντονισμένο τρόπο. Για να ελεγχθεί αυτή η εκδοχή, οι Rubin *et al.*, (1998) σχεδίασαν μια σειρά πειραμάτων που απαντά αρκετά ικανοποιητικά στο παραπάνω ερώτημα. Χρησιμοποίησαν μια σειρά από κύτταρα ζύμης, στο καθένα από τα οποία είχε αφαιρεθεί το γονίδιο μιας από τις έξι ΑΤΡάσεις. Ακόλουθα, παρείχαν στο στέλεχος αυτό μια μεταλλαγμένη μορφή της ΑΤΡάσης που έλλειπε. Με τον τρόπο αυτό, μελέτησαν την φαινοτυπική επίδραση των μεταλλαγών στην περιοχή πρόσδεσης του ΑΤΡ, και ειδικά στην αυστηρά συντηρημένη λυσίνη του Α μοτίβου Walker (GPPGTGKT). Τυχόν ανωμαλίες στα πειράματα αυτά οφείλονται στην δυσλειτουργία της εκάστοτε εξωγενώς παρεχόμενης πρωτεΐνης, και ειδικά στην ανικανότητα πρόσδεσης του ΑΤΡ στο ενεργό της κέντρο. Στόχος της παραπάνω εργασίας ήταν να ξεκαθαριστεί αν ο θνησιγόνος φαινότυπος που παρατηρείται από την έλλειψη των πρωτεϊνών αυτών οφείλεται στην έλλειψη της λειτουργίας της πρωτεΐνης, ή στην αδυναμία σχηματισμού συμπλόκου 26S. Αντίθετα με το αναμενόμενο, οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες δεν προκαλούν τις ίδιες φαινοτυπικές εικόνες, αλλά διαφέρουν σημαντικά. Σε όλες τις περιπτώσεις (των βιώσιμων μεταλλαγών), απομονώθηκαν σύμπλοκα που περιέχουν τις μεταλλαγμένες υπομονάδες, οι οποίες ενσωματώνονται στο σύμπλοκο, αλλά αυτό δεν ήταν πάντα λειτουργικό. Δηλαδή η περιοχή που μελετάται με μεταλλαγές (περιοχή πρόσδεσης ΑΤΡ), δεν συμμετέχει στις αλληλεπιδράσεις σχηματισμού του συμπλόκου. Δοκίμασαν συντηρητικές (λυσίνη σε αργινίνη L→R), και μη συντηρητικές (λυσίνη σε σερίνη L→S) μεταλλαγές. Οι μεταλλαγές αυτές δεν ήταν ανεκτές με τον ίδιο τρόπο. Ενώ όλες προκαλούν σημαντική καταστολή στον ρυθμό ανάπτυξης, για τις Rpt5, και Rpt1 συντηρητικές και μη μεταλλαγές ήταν βιώσιμες ενώ για τις Rpt3, Rpt4 και Rpt6 μόνο οι συντηρητικές, και τέλος, για την Rpt2 καμία μεταλλαγή συντηρητική ή μη δεν ήταν βιώσιμη. Για την τελευταία, βρέθηκε μια πρόσθετη μεταλλαγή εκτός της συντηρημένης περιοχής, που καταστέλλει την θνησιμότητα, στην οποία μια σερίνη²⁴¹ είχε αντικατασταθεί με φαινυλαλανίνη (S→F, Rpt2RF), η οποία χρησιμοποιήθηκε ώστε να μελετηθεί και αυτή η πρωτεΐνη.

Εκτός της βιωσιμότητας, οι συγκεκριμένες μεταλλαγές παρουσιάζουν και διαφορετική πρωτεολυτική συμπεριφορά: τα κύτταρα με Rpt1S, όπως και αυτά με Rpt6R δεν παρουσιάζουν ιδιαίτερα προβλήματα στην πρωτεόλυση των πεπτιδίων «μοντέλων», σε αντίθεση με τα Rpt1R, και τα Rpt3R, που παρουσιάζουν σταθεροποίηση των πεπτιδίων που ελέγχθηκαν. Αντίθετα, τα κύτταρα Rpt2RF δείχνουν σοβαρότατη εικόνα καταστολής της πρωτεολυτικής δράσης.

Από τις έξι, επιλέχθηκαν τελικά δύο για παραπάνω ανάλυση λόγω της ιδιαιτερότητας των φαινοτυπικών αλλαγών που προκαλούν η Rpt1, και η Rpt2.

Από κύτταρα με την τελευταία (Rpt2RF), απομόνωσαν πρωτεασώματα για να εξηγήσουν κάπως το φαινόμενο της καταστολής της πρωτεόλυσης. Τα Rpt2RF πρωτεασώματα υπάρχουν μόνο στην διπλή συμπλοκοποιημένη μορφή, (δηλαδή RP₂CP), και δεν υπάρχουν σύμπλοκα με ένα μόνο RP, πιθανόν επειδή επάγεται αύξηση των επιπέδων του συμπλόκου 19S εξ' αιτίας της καταστολής της πρωτεόλυσης, οπότε είναι συνολικά περισσότερα ανά κύτταρο. Τα σύμπλοκα αυτά ήταν πρωτεολυτικά ανενεργά, και όταν αποσπασθηκε το 19S από τον κύλινδρο, ο τελευταίος ανέκτησε πρωτεολυτική δραστηριότητα. Επίσης, ενώ συνήθως προσθήκη SDS σε απομονωμένο 20S έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίησή του κατά 10 περίπου φορές, στην περίπτωση όμως των Rpt2RF πρωτεασωμάτων, το SDS τα ενεργοποίησε κατά 25 φορές. Η μεταλλαγμένη δηλαδή Rpt2RF προκαλεί ανασταλτική δράση στο καταλυτικό σωματίδιο. Οι Rubin *et al.*, (1998) προτείνουν ότι η Rpt2, σε αντίθεση με την μέχρι τώρα άποψη, έχει άμεση σχέση με την πρωτεόλυση, και ότι το κανάλι μπορεί να είναι κλειστό ακόμη και μέσα στο σχηματισμένο σύμπλοκο 26S.

Πιστεύουν ότι η Rpt2 είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση του πρωτεασώματος, μέσω της ρύθμισης της εισόδου του κυλίνδρου.

Η εικόνα της Rpt1 είναι τελείως διαφορετική. Συντηρητικές και μη μεταλλαγές είναι ανεκτές, παρουσιάζουν όμως προβλήματα ανάπτυξης (χαμηλό ρυθμό ανάπτυξης). Τα κύτταρα δεν εμφανίζουν σημαντικά προβλήματα πρωτεόλυσης, σταματάνε όμως στην G1, και περιέχουν απλοειδές DNA. Ενώ η πρωτεόλυση δεν εμφανίζει προβλήματα, πιθανόν οι μεταλλαγές της Rpt1 να προκαλούν σταθεροποίηση κάποιου συγκεκριμένου παράγοντα που παρεμποδίζει την μετάβαση στην φάση S.

Γενικά, από την παραπάνω αναφορά φαίνεται ότι οι ΑΤΡάσες συνεργάζονται για την επεξεργασία των υποκαταστατών της 26S, δεν υπάρχει συνεργιστική δράση, δεν μπορούν να αντικαταστήσουν η μία την άλλη και είναι απαραίτητες και οι έξι για τον σχηματισμό ενεργού συμπλόκου 26S.

Οι μη ΑΤΡάσες (non-ATRases RPNs)

Το 19S σύμπλοκο διαχωρίζεται σε περίπου 18 υπομονάδες, από τις οποίες οι 6 είναι AAA ατράσες και συζητήθηκαν παραπάνω. Οι υπόλοιπες χαρακτηρίστηκαν ως μη ΑΤΡάσες (non ATPases, RPNs). Οι πρωτεΐνες αυτές είναι πολύ λιγότερο συντηρημένες και με περιορισμένη ομολογία μεταξύ τους, επίσης πολύ λιγότερα πράγματα είναι γνωστά γι' αυτές. Πειράματα προστασίας από πρωτεόλυση δείχνουν ότι αυτές εδράζονται στην επιφάνεια του συμπλόκου και όχι στο εσωτερικό όπως οι ΑΤΡάσες, που σημαίνει ότι εύκολα αποσπώνται από το σύμπλοκο κατά την διαδικασία απομόνωσης, οπότε δεν είναι σαφές πόσες ακριβώς υπομονάδες αποτελούν το σύμπλοκο. Και εδώ, σε κάποιες περιπτώσεις οι υπομονάδες έχουν περισσότερα από ένα ονόματα, και, για τις περισσότερες, δεν είναι γνωστή η λειτουργία της μέσα στο σύμπλοκο (ανάλυση των υπομονάδων: *Seeger et al., (1997)*, *Tanaka & Tsurumi (1997)*). Όπως και οι ΑΤΡάσες, όλες οι Rpn είναι απαραίτητα γονίδια εκτός των Rpn10/S5a/Mbp1, και Rpn4/SON1 η οποία δεν εντοπίζεται πάντα στα απομονωμένα σύμπλοκα μάλλον γιατί αποσπάται εύκολα (*Glickman et al., 1998a*).

Ακολουθεί παράθεση των στοιχείων που είναι γνωστά για τις υπομονάδες αυτές:

R97/TRAP2/mts4⁺/Rpn1: η δεύτερη σε μέγεθος υπομονάδα του 19S, πολύ όμοια με την TRAP2 (Tumor Necrosis Factor Receptor, TNFR, Associated Protein 2) της δροσόφιλα. Πρόκειται για πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την κυτταροπλασματική περιοχή του παράγοντα νέκρωσης όγκου τύπου α (TNF Tumor Necrosis Factor). Τελευταία εντοπίστηκε και μια ομόλογη πρωτεΐνη από ζύμη, η NAS1 (Non ATPase Subunit 1), καταστροφή του γονιδίου της οποίας προκαλεί θνησιμότητα, και πολλαπλασιασμό ευαίσθητο σε θερμοκρασία. Στα κύτταρα αυτά παρατηρείται συσσώρευση ουβικιτινιωμένων πρωτεϊνών. Στον *S. rosmpe* μεταλλαγή της mts4⁺ προκαλεί σταμάτημα της μίτωσης στην μετάφαση με συμπυκνωμένο DNA και κοντή άτρακτο. Η mts4⁺ είναι η τρίτη υπομονάδα του 26S πρωτεασώματος που προκύπτει με αναζήτηση για στελέχη ανθεκτικά στο μιτωτικό δηλητήριο μεθυλ-βενζυλ-καρβαμυλικό οξύ (MBC), και παρουσιάζουν τον ίδιο θερμικά ευαίσθητο φαινότυπο (αδυναμία μετάβασης από την μετάφαση στην ανάφαση), που τους έδωσε και το όνομά τους mts (MBC-resistant temperature sensitive). Οι άλλες δύο είναι οι mts2/S4/Rpt2 και mts3/S14/Nin1/Rpn12. Η mts4⁺ αλληλεπιδρά με την mts2, αλλά όχι με την mts3. Η mts4⁺ απαιτείται για την ενσωμάτωση της mts2 (*Wilkinson et al., 1997*) στο σύμπλοκο. Τα στοιχεία από τις τρεις αυτές πρωτεΐνες δείχνουν ότι το 26S πρωτεάσμα αλληλεπιδρά με τα APC σύμπλοκα των λιγασών ουβικιτίνης που απαιτούνται για την πρόοδο της διαδικασίας της μίτωσης (βλέπε ουβικιτίνη Κεφ. Β Παρ 5).

p112/SEN3/Rpn2 : Είναι η μεγαλύτερη υπομονάδα του συμπλόκου και ομόλογη στο γονίδιο SEN3, που κωδικοποιεί για έναν παράγοντα που επηρεάζει το σύστημα

ενδονουκλεάσης της συγκόλλησης του t-RNA (t-RNA-splicing). Καταστροφή του γονιδίου προκαλεί σταμάτημα της μίτωσης και του πολλαπλασιασμού. Το SEN3 αλληλεπιδρά με το NIN1(Rpn12). Μεταλλαγές και στα δύο προκαλούν αλλοιώσεις στο σύστημα πρωτεόλυσης μέσω ουβικιτίνης και στο σύστημα πρωτεόλυσης μέσω του κανόνα του άμινο-τελικού άκρου (N-end rule pathway). Αξιοσημείωτο είναι ότι η μετακίνηση μιας πρωτεΐνης «μοντέλου» στον πυρήνα παρεμποδίζεται σε κύτταρα με SEN3 μεταλλαγή, κάτι που δεν παρατηρείται στην NIN1 (Tanaka & Tsurumi 1997).

p58/SUN2/Rpn3 είναι απαραίτητο γονίδιο, και αλληλεπιδρά με την SUN2(Rpn10).

Son1/Ufd5/Rpn4, Πρόκειται για υπομονάδα που δεν εντοπίζεται πάντα στο σύμπλοκο 19S, διότι πιθανόν αποσπάται κατά την απομόνωση.

Η Rpn5 (Nas5) και Rpn6(Nas4) αποδείχθηκαν απαραίτητες για βιωσιμότητα.

Η Rpn9/Nas7 (Takeuchi *et al.*, 1999) δεν έχει χαρακτηριστεί ακόμη, αλλά η έλλειψη της δημιουργεί όχι θνησιγόνο, αλλά θερμικά ευαίσθητο θνησιγόνο φαινότυπο. Η πρωτεΐνη απομονώθηκε από σύστημα δύο υβριδίων σε ζύμη με δόλωμα την Rpn10. Απομονώθηκαν 26S πρωτεασώματα από ΔRpn9 κύτταρα, τα οποία ήταν μικρότερα. Όπως αποδείχθηκε, εκτός της Rpn9 δεν περιείχαν και την Rpn10. Πιθανόν η Rpn9 να είναι απαραίτητη για την ενσωμάτωση της Rpn10 και την σταθερότητα του συμπλόκου.

S5a/Mcb1/Mbp1/Sun1/Rpn10: Είναι η πιο καλά μελετημένη υπομονάδα του συμπλόκου. Δεδομένης της σχέσης της 26S πρωτεάσης με τις αλυσίδες της ουβικιτίνης, οι Devereaux *et al.*, (1994) προσπάθησαν να συνδέσουν πολύ-ουβικιτίνη με το 26S σύμπλοκο με υπεριώδες φως (UV cross-linking), με στόχο τον εντοπισμό της ή των υπομονάδων που αλληλεπιδρούν με ουβικιτίνη. Αυτό δεν πέτυχε, αλλά το σύμπλοκο δέσμευε αλυσίδες πολύ-ουβικιτίνης, μετά από απομόνωση και ανάλυση σε μη αποδιατακτικά πηκτώματα. Στην συνέχεια, ανέλυσαν το σύμπλοκο σε αποδιατακτικό πήκτωμα (SDS-PAGE) και επανέλαβαν το πείραμα με αποδιαταγμένες υπομονάδες. Μια πρωτεΐνη, 50kDa, ήταν σε θέση να δεσμεύσει πολύ-ουβικιτίνη ακόμη και μετά από αποδιάταξη. Η πρωτεΐνη αυτή ονομάστηκε S5. Η S5 αλληλεπιδρά με ουβικιτίνη, και μάλιστα με αλυσίδες που έχουν μήκος από 4 μόρια ουβικιτίνης και πάνω. Η πρωτεΐνη είναι παρούσα σε όλα τα 26S σύμπλοκα, από όποιον οργανισμό και να προέρχονται και επίσης, σε αντίθεση με τις άλλες υπομονάδες του συμπλόκου, το μεγαλύτερο μέρος της πρωτεΐνης βρίσκεται σε ελεύθερη μορφή και όχι συμπλοκοποιημένο (Harasca & Udvardy, 1995). Με βάση τα στοιχεία αυτά, κατά γενική ομολογία, η S5 είναι η υπομονάδα που αναγνωρίζει και δεσμεύει τις αλυσίδες της ουβικιτίνης. Όμως, παρά τον σημαντικότερο ρόλο που της αποδίδεται, έλλειψη του γονιδίου σε ζύμη δεν προκαλεί κανένα δραματικό φαινότυπο (Rubin *et al.*, 1997). Τα κύτταρα αυτά αδυνατούν να υδρολύσουν κάποιες πρωτεΐνες που περιέχουν ουβικιτίνη σαν αποτέλεσμα συγκόλλησης κατά την μετάφραση και όχι τις κανονικά ουβικιτινιλιωμένες πρωτεΐνες μέσω κάποιας λυσίνης, ενώ κατά τα άλλα είναι απόλυτα φυσιολογικά. Το ίδιο παρατηρήθηκε και σε φυτά, αν και εκεί τα πολλαπλά ομόλογα μπορεί να καλύπτουν την έλλειψη. Οι van Nocker *et al.*, (1996a) απομόνωσαν το αντίστοιχο γονίδιο από *Arabidopsis thaliana* με σάρωση βιβλιοθήκης έκφρασης με δόλωμα αλυσίδες πολύ-ουβικιτίνης, και το ονόμασαν Mbp1 (Multi-ubiquitin binding protein1), το οποίο, όπως και τα ομόλογά του αναγνωρίζει αλυσίδες ουβικιτίνης μέσω της Λυσ48 (βλέπε ουβικιτίνη, Κεφ. Β, Παρ 5), και δεν είναι απαραίτητο για την βιωσιμότητα του φυτού. Ανάλυση της αλληλουχίας της πρωτεΐνης έδειξε ότι η πιθανή περιοχή πρόσδεσης των αλυσίδων ουβικιτίνης είναι μια περιοχή με επαναλαμβανόμενες υδρόφοβες περιοχές κοντά στο κάρβοξυ-τελικό άκρο της πρωτεΐνης, που αλληλεπιδρά με τα επαναλαμβανόμενα υδρόφοβα τμήματα στην επιφάνεια της αλυσίδας ουβικιτίνης με μήκος 4 μορίων και πάνω. Οι Devereaux *et al.*, (1995b) χρησιμοποίησαν αυτή την πρωτεΐνη σε εκχύλισμα ωαρίων από *Xenopus* και παρατήρησαν αναστολή της υδρόλυσης ουβικιτινιλιωμένων πεπτιδίων στο εκχύλισμα, ενώ η υδρόλυση των μη ουβικιτινιλιωμένων πεπτιδίων δεν επηρεάστηκε.

In vitro, η S5 αναγνωρίζει πολύ-ουβικιτίνη, όμως, η έλλειψή της δεν προκαλεί τον φαινότυπο που θα περίμενε κανείς από ένα σύμπλοκο που δεν αναγνωρίζει ουβικιτινιλιωμένα προϊόντα, άρα πρέπει να υπάρχει και άλλη ή άλλες υπομονάδες στο σύμπλοκο που να συμμετέχουν στην αναγνώριση και δέσμευση των υποκαταστατών, ή, όπως έδειξαν οι Kawahara *et al.*, (2000), πιθανόν να υπάρχουν ισομορφές της πρωτεΐνης που λειτουργούν επιλεκτικά κάτω από συγκεκριμένες μεταβολικές συνθήκες. Συγκεκριμένα, το παραπάνω εργαστήριο βρήκε ότι σε ποντίκια υπάρχουν τουλάχιστον πέντε mRNA για την S5 τα οποία παράγονται από το ίδιο γονίδιο, κάτω από αναπτυξιακή ρύθμιση, με διαφορεική ωρίμανση του RNA (alternative splicing). Ονόμασαν τις πέντε αυτές μορφές της πρωτεΐνης Rpn10a, b, c, d, και e, και παρατήρησαν ότι η a εκφράζεται συνεχώς, ενώ η e εμφανίζεται μόνο στα έμβρυα και ειδικά στον εγκέφαλο. Όλες συμμετέχουν στον σχηματισμό συμπλόκων 26S, και μπορούν να καταστείλουν την υδρόλυση ουβικιτινιλιωμένων πεπτιδίων σε εκχύλιμα ωαρίων *Xenopus*, αλλά σε αντίθεση με την Rpn10a η Rpn10e δεν μπορεί να καταστείλει την αποδόμηση της κυκλίνης B στο παραπάνω σύστημα. Επίσης επηρεάζουν με διαφορετικό τρόπο την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου *in vivo* στον ίδιο οργανισμό. Τα στοιχεία αυτά συμφωνούν με εκείνα των Girard *et al.*, (1999), οι οποίοι κατέστρεψαν το γονίδιο της Rpn10 στο φυτό *P. patens* όπου σε αντίθεση με τα στοιχεία των van Nocker *et al.*, (1996a), έλλειψη του γονιδίου δεν προκαλεί τον θάνατο, αλλά σταμάτημα της ανάπτυξης και ανικανότητα σχηματισμού μπουμπουκιών.

Η εικόνα γίνεται ακόμη πιο πολύπλοκη από την εργασία των Anand *et al.*, (1997), οι οποίοι απομόνωσαν την S5 με το σύστημα δύο υβριδίων αναζητώντας πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την περιοχή Ελικα-Θηλιά-Ελικα (Helix-Loop-Helix, HLH), πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην διαφοροποίηση και στην ογκογένεση. Οι πρωτεΐνες HLH κατατάσσονται σε 4 κατηγορίες τις A, B, C, και D. Οι τρεις πρώτες περιέχουν μια βασική περιοχή σε άμεση γειτονία με την HLH. Οι A και B αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, και οι C με τον εαυτό τους σχηματίζοντας έτερο- και ομο-διμερή αντίστοιχα μέσω της περιοχής HLH. Ο διμερισμός φέρνει κοντά τις δύο βασικές περιοχές οι οποίες αποτελούν την περιοχή πρόσδεσης σε DNA. Οπότε τα διμερή είναι ενεργά. Η ομάδα D, δεν περιέχει βασική περιοχή, και προσδένεται μέσω της HLH στις A και B, λόγω όμως της έλλειψης βασικής περιοχής, τα διμερή αυτά είναι ανενεργά (δεν έχουν περιοχή πρόσδεσης σε DNA), οπότε οι πρωτεΐνες αυτές ονομάστηκαν Ids (Inhibition of DNA). Η περιοχή HLH της Id1 φάρεψε την S5. Η S5 αποσπά την Id1 από τα διμερή τα οποία σχηματίζει, επιτρέποντας τον σχηματισμό ενεργών διμερών. Το αποτέλεσμα είναι η ενεργοποίηση της πρόσδεσης σε DNA, και δεν προκύπτει από την πρωτεολυτική απομάκρυνση της Id1, αλλά μόνο από την αλληλεπίδρασή της με την S5. Επιπλέον, η περιοχή της S5 που απαιτείται για αυτή την αλληλεπίδραση δεν είναι η περιοχή πρόσδεσης σε πολύ-ουβικιτίνη αφού αφαίρεση αυτής της καρβοξυ-τελικής περιοχής δεν επηρεάζει τα παραπάνω πειράματα.

H Mpr1/Rpn11 είναι η MPR1, μεταλλαγή της οποίας απομονώθηκε από κύτταρα με προβληματικό μεταβολισμό των t-RNA (splicing). Έλλειψη του γονιδίου προκαλεί θνησιμότητα. Περιέχει μια συντηρημένη κυστεΐνη περιστοιχιζόμενη από συντηρημένη ακολουθία (κουτί κυστεΐνης), που περιέχεται σε πολλά ένζυμα που απομακρύνουν ουβικιτίνες (Glickman *et al.*, 1998a).

H p31/NIN1/ Rpn12: (Nuclear Integrity) (Kominami *et al.*, 1995), απαιτείται για την μετάβαση G₁/S και G₂/M. Μια θερμικά ευαίσθητη μεταλλαγή της πρωτεΐνης προκαλεί διάφορους φαινοτύπους όπως αστάθεια χρωμοσωμάτων, και ευαισθησία σε υπεριώδες φως. Είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση της κινάσης Cdc28p, που πιθανόν οφείλεται στην σταθεροποίηση του αναστολέα της κινάσης Cdc28p, p40^{SIC1}, αν και αυτό εξηγεί την σταθεροποίηση στην φάση G₁ και δεν εξηγεί το σταμάτημα στην G₂. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με την εικόνα κυττάρων με τις μεταλλαγμένες ΑΤΡάσες, που παρουσιάζουν υψηλή δράση της κινάσης Cdc28p λόγω σταθεροποίησης της κυκλίνης B, που επίσης δεν μπορούν

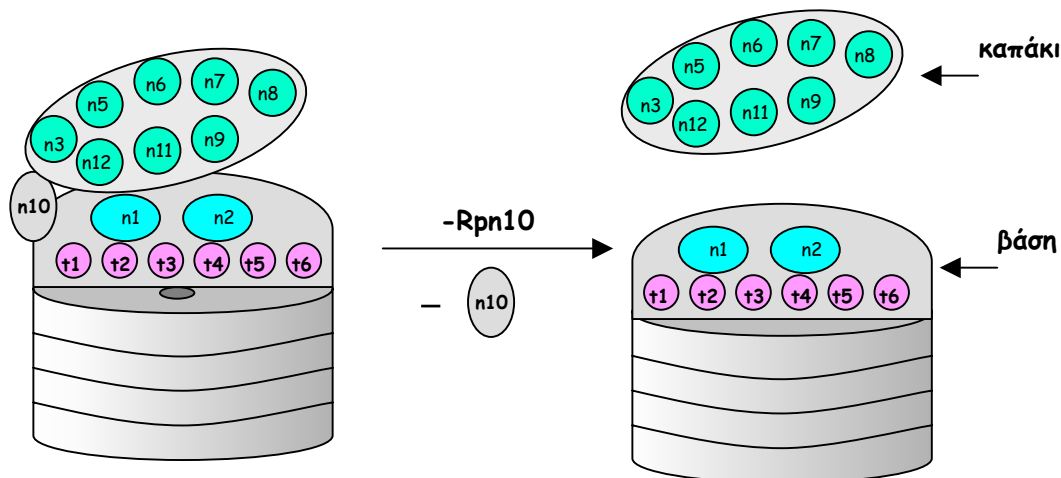
να βγουν από την μίτωση. Μεταλλαγές σε διαφορετικές υπομονάδες του ίδιου συμπλόκου, παρουσιάζουν διαφορετικούς φαινοτύπους, χωρίς να μπορεί να εξηγηθεί το φαινόμενο.

p37: Οι Holzl *et al.*, (2000) απομόνωσαν και ανέλυσαν τις υπομονάδες του 19S συμπλόκου από δροσόφιλα. Στο σύμπλοκο αυτό εντοπίζουν μια νέα πρωτεΐνη την p37 για την οποία δεν εντοπίστηκε ομόλογο στη ζύμη, αλλά υπάρχουν ομόλογα στις βάσεις δεδομένων για γονίδια στον άνθρωπο, και στο βόδι. Η πρωτεΐνη αυτή ανήκει στην οικογένεια των κάρβοξυτελικών υδρολασών ουβικιτίνης (UCHs). Για να ελέγξουν το παραπάνω ενδεχόμενο παρήγαγαν την πρωτεΐνη σε *E. Coli*. Η απομονωμένη πρωτεΐνη πράγματι απομακρύνει ουβικιτίνη από το πεπτιδίο Ub-AMC (Ubiquitin COOH-terminal amido-4-coumarin), και καταστέλλεται από τον αναστολέα Ub-Al (Ubiquitin COOH-terminal aldehyde). Χρησιμοποιώντας αντισώματα για τον αναστολέα εντόπισαν την πρωτεΐνη στην άκρη του καπακιού του 19S. Προτείνουν ότι η πρωτεΐνη αυτή είναι υπεύθυνη για την απομάκρυνση ουβικιτίνης από υποκαταστάτες που έχουν σημαντικά πρωτεολυθεί (απαιτεί ελεύθερο C-άκρο κοντά στην ουβικιτίνη). Επίσης η θέση της (αποσπάται εύκολα), εξηγεί την δυσκολία συνκαθίζησης με το σύμπλοκο στους άλλους οργανισμούς.

Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υπομονάδων – δομή του συμπλόκου 19S

Προσπαθώντας να λύσουν τον γρίφο της Rpn10, οι Glickman *et al.*, (1998b) μελέτησαν την δομή των πρωτεασωμάτων στελέχους ζύμης στο οποίο είχε αφαιρεθεί το γονίδιο της Rpn10. Τα σύμπλοκα ανιχνεύονται μετά από ανάλυση σε μη αποδιατακτικά ηλεκτρόδια μέσω της υδρόλυση φθορογόνων πεπτιδίων. Στα πρώτα στάδια καθαρισμού, τα ΔRpn10 σύμπλοκα δεν διαφέρουν από εκείνα κυττάρων άγριου τύπου. Στα επόμενα βήματα καθαρισμού όμως, τα ΔRpn10 πρωτεασώματα είναι μικρότερα. Αυτά τα μικρότερα σύμπλοκα, δεν είναι σε θέση να υδρολύσουν ουβικιτινιωμένες πρωτεΐνες, μπορούν όμως να πρωτεολύσουν μη ουβικιτινιωμένη καζεΐνη. Η ηλεκτρονική μικρογραφία αυτών των συμπλόκων έδειξε ότι περιέχουν τον κύλινδρο 20S, αλλά το σύμπλοκο 19S με το οποίο αυτός είναι συμπλοκοποιημένος είναι μικρότερο, και σε εικόνες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου φαίνεται να του λείπει η επάνω ακραία μάζα πρωτεϊνών. Μετά από απομόνωση και ανάλυση των συμπλόκων αυτών αποδείχθηκε ότι λείπουν οι υπομονάδες Rpn3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11 και 12. Δηλαδή παραμένουν ενωμένες οι 6 ΑΤΡάσες και οι Rpn1 και Rpn2. Στη συνέχεια, προσπάθησαν να εντοπίσουν τις υπομονάδες που λείπουν, τις οποίες απομόνωσαν σαν ένα δεύτερο σύμπλοκο το οποίο αποσπάται στα αρχικά στάδια του καθαρισμού. Ο 19S δηλαδή αποτελείται από δύο υποσύμπλοκα, η σύνδεση των οποίων απαιτεί την Rpn10: την βάση (base) και το καπάκι (lid).

Η εργασία των Glickman *et al.*, (1998b) έδειξε ότι η βάση και η ομάδα των ΑΤΡάσων είναι ικανή να ενεργοποιήσει την πρωτεολυτική δραστηριότητα του πρωτεασώματος, ακόμη και απέναντι σε ολόκληρες πρωτεΐνες (όχι μόνο πεπτιδία), αλλά η αναγνώριση και η επεξεργασία ουβικιτινιωμένων πρωτεϊνών απαιτεί το καπάκι. Η βάση συμπεριφέρεται όπως



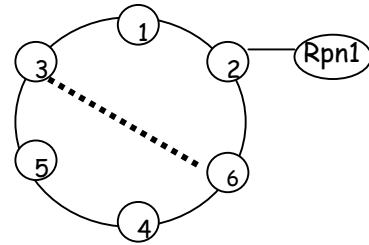
και οι προκαρυωτικές ΑΤΡάσες, δηλαδή σαν αντίστροφη τσαπερόνη που ξεδιπλώνει τις πρωτεΐνες και τις τροφοδοτεί στην πρωτεάση, και βέβαια ανοίγει το κανάλι του πρωτεασώματος επιτρέποντας την πρόσβαση των υποκαταστατών στις θέσεις κατάλυσης. Το

καπάκι από την άλλη, είναι κάτι που έχει εξελιχθεί στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς για να εξυπηρετήσει το σύστημα της ουβικιτίνης που είναι επίσης αποκλειστικότητα των ευκαρυωτικών κυττάρων. Το πιο περίεργο στοιχείο αυτής της ιστορίας είναι ότι αυτό το υποσύμπλοκο (καπάκι) αποτελείται από υπομονάδες ομόλογα των οποίων σχηματίζουν δυο παρόμοια σύμπλοκα στα ευκαρυωτικά κύτταρα, το COP9-σηματόσωμα και το σύμπλοκο του παράγοντα επιμήκυνσης eIF3. Η εξελικτική σχέση των τριών αυτών συμπλόκων, καθώς και οι αλληλεπιδράσεις των υπομονάδων της βάσης και η πιθανή λειτουργία τους αναλύονται παρακάτω.

2.2.1 Η βάση και οι AAA ATPάσες

Η βάση του 19S αποτελείται από τις 6 ATPάσες και τις Rpn1 και Rpn2 που είναι οι μεγαλύτερες υπομονάδες του συμπλόκου. Οι ATPάσες πιστεύεται ότι συνδέονται μέσω της δομής υπερελικωμένου ελατήριου στην αμινο-τελική περιοχή τους (μεταβλητή περιοχή), και ότι συμμετέχουν στον σχηματισμό ενός εξαμελούς δακτυλίου (Ανασκόπηση Ferrell *et al.*, 2000). Η ακριβής θέση των ATPάσων στον δακτύλιο αυτό δεν είναι τελείως ξεκάθαρη. Τα περισσότερα στοιχεία που υπάρχουν για τις αλληλεπιδράσεις αυτές έχουν προκύψει είτε μέσω του συστήματος δύο υβριδίων σε ζύμη, είτε από μελέτες των αλληλεπιδράσεων των πρωτεϊνών *in vitro*. Στις περισσότερες εργασίες μελετώνται οι σχέσεις των πρωτεϊνών κατά ζεύγη. Τα ζευγάρια αλληλεπιδράσεων είναι:

Rpt3(TBP7)-Rpt5(TBP1)	Ohana <i>et al.</i> , (1993)
Rpt2(S4) - Rpt1(S7)	Gordon <i>et al.</i> , (1993)
Rpt4-Rpt6	Russell <i>et al.</i> , (1996)
Rpt2(S4)-Rpt1(S7)	Seeger <i>et al.</i> , (1997)
Rpt5-Rpt4	DeMartino <i>et al.</i> , (1996)



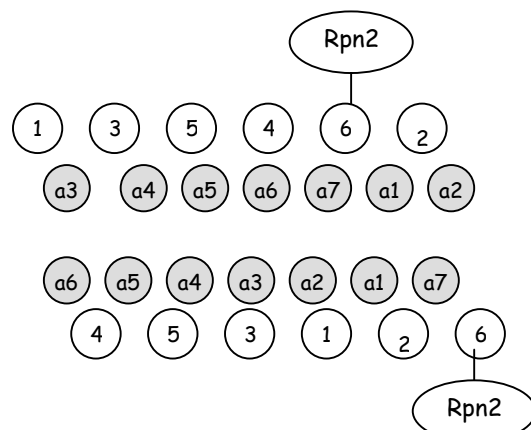
Οι πρώτη πιο ολοκληρωμένη μελέτη έγινε από τους Richmond *et al.*, (1997), οι οποίοι παρήγαγαν τις ανθρώπινες πρωτεΐνες *in vitro* με ραδιενεργό μεθειονίνη. Απομόνωσαν σύμπλοκα 19S από ερυθρά αιμοσφαίρια, και διαχώρισαν τις υπομονάδες με ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικά πηκτώματα δύο διαστάσεων, τα οποία ακόλουθα μετέφεραν σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης. Χρησιμοποιώντας τις ραδιοσημασμένες πρωτεΐνες, ανέλυσαν το σχήμα αλληλεπιδράσεων της καθεμιάς με τις υπομονάδες του συμπλόκου. Από την εργασία αυτή προέκυψε ότι εκτός των ζευγαριών Rpt2-Rpt1, Rpt3-Rpt6, και Rpt4-Rpt5, οι Rpt1,2,3 και 4 σχηματίζουν ένα τετραμερές σύμπλοκο. Σε παρόμοια μελέτη των σχέσεων των υπομονάδων οι Gorbea *et al.*, (2000) έδειξαν ότι η Rpt1 αλληλεπιδρά με την Rpt2 με το αμινο-τελικό της άκρο, ενώ με το καρβοξυ-τελικό τους άκρο, αλληλεπιδρούν η πρώτη με την Rpn1 και η δεύτερη με την Rpn10.

Αν προσπαθήσει κανείς να σχηματίσει δακτύλιο με βάση τα παραπάνω ζευγάρια, η μόνη αλληλεπίδραση που δεν συμβαδίζει με δομή δακτυλίου είναι η σχέση των Rpt3-Rpt6.

Για να επιβεβαιώσουν τα παραπάνω στοιχεία οι Hartmann-Petersen *et al.*, (2001) προσπάθησαν να μελετήσουν τις σχετικές θέσεις των πρωτεϊνών στο σύμπλοκο χρησιμοποιώντας την μέθοδο της χημικής διασύνδεσης (chemical cross-linking). Με την μέθοδο αυτή συγκολλώνται χημικά πρωτεΐνες που βρίσκονται σε άμεση επαφή.

Στην δική τους εργασία, συμφωνούν με όλα τα ζευγάρια αλληλεπιδράσεων εκτός αυτό των Rpt3-Rpt6. Με την μέθοδο αυτή κατάφεραν να τοποθετήσουν στο σύμπλοκο τις ATPάσες σε σχέση με τον α-δακτύλιο του 20S και την Rpn2:

Η βάση λοιπόν του 19S με τις 6 ATPάσες προσδένεται στο καταλυτικό σωματίδιο, το οποίο



με τον τρόπο αυτό ενεργοποιείται (ανοίγει το κανάλι των α-δακτυλίων). Αυτό το σύμπλοκο από μόνο του είναι ικανό να υδρολύσει πρωτεΐνες που δεν είναι ουβικιτινιλιωμένες, όπως πχ: καζεΐνη (Glickman *et al.*, 1998b). Το πρωτεάσωμα όμως μπορεί να επεξεργαστεί πεπτιδικές αλυσίδες χωρίς δευτεροταγή δομή, πράγμα που απαιτεί το ξεδίπλωμα των πρωτεϊνών πριν την πρωτεόλυση.

Όπως έδειξαν οι Braun *et al.*, (1999), η βάση του 19S μπορεί να λειτουργήσει σαν τσαπερόνη, τουλάχιστον *in vitro*. Δηλαδή, εκτός της ενεργοποίησης της κατάλυσης, οι ΑΤΡάσες είναι επίσης υπεύθυνες για το ξεδίπλωμα και την μετακίνηση των υποκαταστατών μέσα στον πρωτεολυτικό κύλινδρο.

2.2.2 Το καπάκι

Οι οκτώ υπομονάδες που λείπουν από το πρωτεάσωμα που απομονώθηκε από ΔRpn10 κύτταρα, απομονώνονται σαν ένα ενιαίο σύμπλοκο 400 περίπου kDa (Glickman *et al.*, 1988b, Glickman *et al.*, 1999), που αποτελεί την ακραία μάζα στις ηλεκτρονικές εικόνες του συμπλόκου 26S. Ανάλυση των οκτώ αυτών υπομονάδων αποκάλυψε την παρουσία δυο συντηρημένων δομών που απαντούν και σε άλλα πολυπρωτεϊνικά συστήματα (Hoffmann & Bucher 1998, Aravind & Ronting 1998), το COP9-σηματόσωμα (ανασκόπηση Wei & Deng 1999) και τον παράγοντα 3 έναρξης της μετάφρασης eIF3(ανασκόπηση Asano *et al.*, 1997) .

Υπομονάδα	Οργανισμός	Ομόλογη με ...	περιοχή
Sgn1 Gps1 COPS1 COP11/FUS	human human human <i>A. Thaliana</i>	S10a, p44, Rpn4	PCI
Sgn2 Trip15 Trip15 COPS2	Human Human <i>Drosophila</i> mouse	S9, p44.5, Rpn6	PCI
Sgn3 COPS3 LC15	Human Mouse <i>L. chilence</i>	S3, p58, Rpn3	PCI
Sgn4 COPS4 COS41.8	Human Mouse <i>C. intestinalis</i>	p55, Rpn5	PCI
Sgn5 JAB1 COPS5 COPS5	Human Human mouse <i>A. thaliana</i>	S13, Poh1, Rpn11	MPN
Sgn6 34kDaMov34 COPS6	Human Human Mouse	S12, p40, Rpn8	MPN
Sgn7 ACOB COPS7a	Human <i>E. nidulans</i> Mouse	S11, p40.5, Rpn9	PCI
Sgn8 COPS8 COPS8	Human Human <i>A. thaliana</i>	S14, p31, Rpn12	PCI

Πίνακας 3 : Υπομονάδες του ανθρώπινου COP9-σηματοσώματος και οι ομόλογές τους σε άλλα είδη και στο καπάκι του 26S πρωτεασώματος (Henke *et al.*, 1999)

Ενώ η αμινοξική ακολουθία των περιοχών αυτών δεν παρουσιάζει σημαντική ομολογία, οι δευτεροταγείς δομές τους είναι όμοιες. Το πρώτο είναι το μοτίβο PCI/PINT (Proteasome, COP9-signalosome, Initiation factor 3/ Proteasome subunits, Int-6, Nip-5, Trip-15), μια καθαρή α-έλικα 200 περίπου αμινοξέων (ή μια ομάδα από έλικες) που συνήθως βρίσκεται

στο κάρβοξυ-τελικό άκρο των πρωτεϊνών, και προς το τέλος του, και απαντά στις έξι από τις οκτώ αυτές πρωτεΐνες. Στις άλλες δύο βρίσκεται το δεύτερο μοτίβο, επίσης κοινό ανάμεσα στις υπομονάδες των τριών συμπλόκων, το MPN (Mpr1p, Rad1p, οι πρωτεΐνες της ζύμης όπου εντοπίσθηκε αρχικά). Αυτή η περιοχή, είναι μια α/β δομή μήκους περίπου 140 αμινοξέων και βρίσκεται συνήθως στο άμινο-τελικό άκρο των πρωτεϊνών που την περιέχουν. Όλες οι πρωτεΐνες που περιέχουν PCI ή MPN περιοχή αποτελούν υπομονάδες πολυπρωτεϊνικών συστημάτων, και όλες οι πρωτεΐνες του συμπλόκου 26S που τις περιέχουν βρίσκονται στο καπάκι. Δυο πράγματα μπορεί να συμβαίνουν με αυτές τις περιοχές, είτε αποτελούν βασική δομική μονάδα σχηματισμού συμπλόκων, είτε υπάρχει πράγματι βιολογική σχέση ανάμεσα στα τρία σύμπλοκα.

Η ομοιότητα των υπομονάδων του 19S με τις αντίστοιχες του eIF3 περιορίζεται στις περιοχές αυτές, όμως, οι υπομονάδες του COP9-σηματοσώματος αντιστοιχίζονται μία προς μία με τις αντίστοιχες του 19S με ομολογίες που επεκτείνονται και εκτός της περιοχής αυτής. Το COP9-σηματοσώμα απομονώθηκε αρχικά από το φυτό *Arabidopsis thaliana*, σαν το σύμπλοκο που ελέγχει την ενεργοποίηση των γονιδίων της φωτομορφόγνεσης (Wei & Deng 1999), αποτελείται από οκτώ τουλάχιστον υπομονάδες και εντοπίζεται στους πυρήνες των κυττάρων. Δεν έχει απομονωθεί παρόμοιο σύμπλοκο από κύτταρα ζύμης, και δεν υπάρχουν αλληλουχίες ομόλογες με τις υπομονάδες του σηματοσώματος στο γονιδίωμα της ζύμης. Αργότερα απομονώθηκε και από κύτταρα θηλαστικών σαν σύμπλοκο με δράση κινάσης που φωσφορυλιώνει πρωτεΐνες όπως ο IκBa, και η p105. Η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών αυτών ακολουθείται από ουβικιτινίωση και αποδόμησή τους από την 26S πρωτεάση, ενώ αντίθετα της c-Jun σημαίνει προστασία από πρωτεόλυση. Επίσης, παρουσιάζει τόσο όμοια δομή με το 19S που το σηματοσώμα ακολουθεί την 26S πρωτεάση κατά τα αρχικά στάδια καθαρισμού από ανθρώπινα ερυθρά αιμοσφαίρια (Henke *et al.*, 1999). Η σχέση τους όμως δεν παραμένει στην ομοιότητα της δομής τους, αφού αλληλεπίδραση υπομονάδων του σηματοσώματος (sgn-3) με την 26S πρωτεάση έγινε η αιτία απομόνωσης του σηματοσώματος από ανθρώπινα ερυθρά αιμοσφαίρια από τους Seeger *et al.*, (1998). Η πρωτεΐνη sgn-3 είχε απομονωθεί αρχικά σαν νέα υπομονάδα του 19S και αρχικά ονομάστηκε από τους παραπάνω ερευνητές S11. Όμως, δεν βρέθηκε ομόλογη πρωτεΐνη σε ζύμη, πράγμα που τους παρακίνησε να την μελετήσουν περισσότερο, με αποτέλεσμα την απομόνωση του σηματοσώματος. Οι Henke *et al.*, (1999), οι οποίοι συνέκριναν τα δύο σύμπλοκα, το COP9-σηματοσώμα και το καπάκι του 19S, (το οποίο απομόνωσαν από κύτταρα χωρίς προηγούμενη καταστροφή της Rpn10), υποστηρίζουν ότι είναι πιθανή ακόμη και η ανταλλαγή τους στο σύμπλοκο βάση 19S-20S. Είναι πολύ πιθανό ότι τα δυο σύμπλοκα, σηματοσώμα-26S πρωτεάση συνεργάζονται *in vivo*, όπως φάνηκε από την εργασία των Kwok *et al.*, (1999), οι οποίοι αναζητώντας παράγοντες που αλληλεπιδρούν με την υπομονάδα FUS6/COP11 του σηματοσώματος (σε σύστημα δύο υβριδίων σε ζύμη), απομόνωσαν την S9/Rpn6 του 19S. Εξετάζοντας την υπόθεση η τελευταία να είναι υπομονάδα και του σηματοσώματος, βρήκαν ότι δεν συμβαίνει κάτι τέτοιο, ενώ παράλληλα η Rpn6 αλληλεπιδρά με την Rpt5/TBP1 του 26S, οπότε η αλληλεπίδραση Fus6/COP11 - Rpn6 που παρατήρησαν οφείλεται μάλλον στην συνεργασία του σηματοσώματος με το πρωτεάσωμα. Μια τέτοια σχέση αποκαλύφθηκε στην ρύθμιση της φωτομορφόγνεσης σε φυτά. Η επαγωγή από το φως ελέγχεται από δυο παράγοντες που δρουν ανταγωνιστικά, τον COP9 (constitutively photomorphogenesis) και τον HY5 (hypercotyl elongation), έναν μεταγραφικό παράγοντα τύπου bZIP, ο οποίος προσδένεται άμεσα στους υποκινητές των φωτο-επαγόμενων γονιδίων. Η παρουσία του COP9 στον πυρήνα δρα ανασταλτικά στην επαγωγή της μεταγραφής μέσω HY5. Παρουσία φωτός, ο COP9 μεταναστεύει στο κυτταρόπλασμα μετά από φωσφορυλίωση από το σηματοσώμα, επιτρέποντας την συσσώρευση του HY5 στον πυρήνα και την ακόλουθη επαγωγή των φωτο-ελεγχόμενων γονιδίων. Όπως αποδείχθηκε από τους Osterlund *et al.*, (2000), το COP9 είναι λιγάζση ουβικιτίνης (E3) που ουβικιτινιλιώνει τον HY5 με συνέπεια την ακόλουθη

αποδόμησή του από την 26S πρωτεάση. Παρουσία φωτός, απομακρύνεται από τον πυρήνα, οπότε ο HY5 διαφεύγει της πρωτεόλυσης και ενεργοποιεί τα φωτο-ελεγχόμενα γονίδια (ανασκόπηση Karniol & Chamovitz 2000).

Τελευταία, οι Kapelari *et al.*, (2000) απομόνωσαν τα δυο σύμπλοκα από ανθρώπινα ερυθρά αιμοσφαίρια και προσπάθησαν να αναλύσουν την δομή τους με ηλεκτρονική μικροσκοπία. Βρήκαν ότι οι πληθυσμοί σωματιδίων που απομόνωσαν παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια, την οποία αποδίδουν στην μη ομογενή σύσταση των σωματιδίων λόγω προσκόλλησης ή απόσπασης πρωτεϊνών κατά την απομόνωση, καθώς επίσης και στον διαφορετικό βαθμό φωσφορυλίωσης των υπομονάδων του σηματοσώματος. Η δομή των δύο συμπλόκων δεν είναι ίδια αλλά παρουσιάζει όμοια δομικά χαρακτηριστικά. Τα σύμπλοκα χαρακτηρίζονται ως κελύφη με μια κοιλότητα στο κέντρο. Πρόκειται για ασύμμετρες δομές που προκύπτουν από πολλαπλές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υπομονάδων τους, και δεν έχουν καμιά ομοιότητα με δακτυλίους ή ράβδους.

Οι Kapelari *et al.*, (2000) προτείνουν ότι τα δυο σύμπλοκα είναι συνδεδεμένα εξελικτικά, και δεδομένου ότι το σηματοσώμα δε υπάρχει στη ζύμη, το καπάκι του 19S είναι αρχαιότερο. Υποστηρίζουν ότι, μετά από γενετικό διπλασιασμό προέκυψαν δυο παρόμοια σύμπλοκα τα οποία εξελίχθηκαν παράλληλα εξυπηρετώντας διαφορετικούς αλλά σχετιζόμενους σκοπούς.

2.3 Ο ρυθμιστής (modulator)

Βαδίζοντας πάντα στα βήματα της ιδέας ότι το 20S υπόκειται σε πολύπλοκο έλεγχο (ενεργοποίηση, ρύθμιση, καταστολή) από διάφορους υποκυτταρικούς παράγοντες, οι DeMartino *et al.*, (1996) προσπάθησαν να εντοπίσουν παράγοντες που επηρεάζουν την δράση του 20S με τον ακόλουθο τρόπο: Κλασμάτωσαν κυτταρικό εκχύλισμα ανθρώπινων ερυθρών αιμοσφαιρίων με κατάλληλα μοριακά κόσκινα ώστε να διαχωριστεί το κυτταρικό περιεχόμενο σε κλάσματα που περιέχουν σωματίδια διαφόρων μεγεθών. Στη συνέχεια, απομόνωσαν 20S πρωτεασώματα των οποίων η παρουσία ανιχνεύεται με απλή μέτρηση φθορισμού που προκύπτει από την πρωτεόλυση των φθορογόνων πεπτιδίων «μοντέλων». Η διαδικασία είναι απλή: κάθε κλάσμα εκχυλίσματος κυττάρων προστίθεται σε απομονωμένα 20S πρωτεασώματα και μετράται ο φθορισμός του διαλύματος που προκύπτει. Με τον τρόπο αυτό εντοπίζει κανείς, με βάση το κυτταρικό κλάσμα στο οποίο βρίσκεται, το μέγεθος των παραγόντων που επηρεάζουν την δράση του πρωτεασώματος. Από την ανάλυση αυτή προέκυψαν δύο κλάσματα, τα οποία ενεργοποιούν το πρωτεασώμα. Το ένα από αυτά συμπίπτει με το μέγεθος του PA700. Το άλλο είναι πολύ μικρότερο, περίπου 300kDa, και ονομάστηκε ρυθμιστής (modulator). Το νέο αυτό σύμπλοκο δεν έχει καμιά άμεση επίδραση στο 20S, αλλά αν σε αυτό προστεθεί και ο PA700, τότε η δράση του πρωτεασώματος ενισχύεται περίπου 8 φορές. Το σύμπλοκο αποτελείται από τρεις υπομονάδες, τις p50, p42, και p27. Οι πρωτεΐνες απομονώθηκαν και προσδιορίστηκε η αλληλουχία τους. Η p50 είναι η TBP-1(ή Rpt5) (Nelbock *et al.*, 1990), μέλος της οικογένειας των AAA ATPασών (βλέπε Κεφ Α Παρ 2.2). Η p42 (SUG2, Rpt4), ανήκει επίσης στην οικογένεια των AAA ATPασών, και για πρώτη φορά απομονώνεται εδώ, ενώ η p27 είναι νέα πρωτεΐνη (Watanabe *et al.*, 1998). Οι δύο από αυτές η TBP-1 και η SUG2 είναι επίσης υπομονάδες του 19S, οπότε συμμετέχουν σε δύο σύμπλοκα που αλληλεπιδρούν με το πρωτεασώμα.

Προσπαθώντας να κατανοήσουν τον τρόπο δράσης του ρυθμιστή (modulator), οι Adams *et al.*, (1997), απομόνωσαν και τα τρία σύμπλοκα ώστε να μελετήσουν τον τρόπο αλληλεπίδρασης μεταξύ τους. Συνδύασαν τα τρία σύμπλοκα και, χρησιμοποιώντας ηλεκτρονική μικροσκοπία μελέτησαν το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης στα δομικά χαρακτηριστικά τους. Η προσθήκη του 19S σε 20S παρουσία ATP προκαλεί την δέσμευση

του πρώτου στο τελευταίο προς σχηματισμό ενός συμπλόκου που πρωτεολύει ουβικιτινιλιωμένα προϊόντα, το οποίο δομικά και λειτουργικά είναι ταυτόσημο με την 26S πρωτεάση. Από τις μετρήσεις τους φαίνεται ότι η πρόσδεση του πρώτου 19S λειτουργεί συνεργιστικά για την πρόσδεση του δεύτερου 19S με αποτέλεσμα τον σχηματισμό του συμπλόκου 26S. Η προσθήκη του ρυθμιστή (modulator) προάγει την σύνδεση των 19S στο 20S χωρίς αυτό να προσδένεται σταθερά στο σύμπλοκο που προκύπτει. Η ενεργοποίηση δηλαδή που παρατηρείται από τον ρυθμιστή οφείλεται στην μετατόπιση της ισορροπίας 19S-20S \leftrightarrow 19S-20S-19S προς τη μεριά του διπλού συμπλόκου.

Ένα παρόμοιο σύμπλοκο απομονώθηκε από το έντομο *Manduca sexta* από τους Hastings *et al.*, (1999), στην προσπάθειά τους να κατανοήσουν τις διαφορές που παρατηρήθηκαν στα επίπεδα των 6 ΑΤΡαών κατά τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο των μυών του εντόμου, όταν από κάμπια μετατρέπεται σε πεταλούδα. Η καταστροφή των μυών της κοιλιάς συμβαίνει μέσα σε 24 ώρες, με ταυτόχρονη δραματική αύξηση των ουβικιτινιλιωμένων πρωτεϊνών και της δράσης του πρωτεασώματος. Παρακολουθώντας την επαγωγή των γονιδίων της 26S πρωτεάσης παρατήρησαν αύξηση των επιπέδων των MSS1(Rpt1), mts2(Rpt2) MS73(Rpt3), και μιας τότε ακόμη άγνωστης ΑΤΡάσης της SUG2(Rpt4), ενώ δεν παρατήρησαν καμία αλλαγή στα επίπεδα της TBP1(Rpt5) (Dawson *et al.*, 1995). Κλωνοποίησαν την SUG2 και μελέτησαν την αλληλεπίδρασή της με άλλες πρωτεΐνες ανιχνεύοντας την συμμετοχή της σε σύμπλοκα με κατάλληλο αντι-SUG2 αντίσωμα. Η πρωτεΐνη εντοπίσθηκε σε δυο πολυπρωτεϊνικά συστήματα, 700 και 220kDa. Το πρώτο αποδείχθηκε ταυτόσημο με το 19S(PA700) της 26S πρωτεάσης. Αναλύοντας το δεύτερο βρήκαν ότι αποτελείται από δυο πρωτεΐνες, την SUG1(Rpt4) και την TBP1(Rpt5), που με βάση τα στοιχεία των DeMartino *et al.*, (1996) είναι ίδιο με τον ρυθμιστή (modulator), και ενεργοποιεί την 26S πρωτεάση 2-10 φορές, με την διαφορά ότι οι Hastings *et al.*, (1999) δεν βρίσκουν την p27 στο σύμπλοκο. Στη συνέχεια απομόνωσαν το σύμπλοκο από διάφορους ανθρώπινους ιστούς, και σε καμία περίπτωση δεν βρήκαν την p27, αλλά τα σύμπλοκα που απομονώθηκαν μπορούν να ενεργοποιήσουν απομονωμένα 26S σύμπλοκα από διάφορους οργανισμούς αποδεικνύοντας ότι το σύμπλοκο είναι γενικός ρυθμιστής της λειτουργίας του συμπλόκου 26S. Υποστηρίζουν ακόμη ότι αν απομονωθούν σύμπλοκα 26S από ιστούς που έχουν διατηρηθεί για κάποιο διάστημα (-80°C), τότε απομονώνονται διάφορα υποσύμπλοκα του 19S λόγω μάλλον της αστάθειας του συμπλόκου στις συνθήκες διατήρησης.

2.4. Σύμπλοκα που σχετίζονται με τον PA700

Η μελέτη των υπομονάδων του 19S αποκάλυψε για κάποιες από αυτές συμμετοχή σε δραστηριότητες που δεν εξηγούνται από την παρουσία τους στο σύμπλοκο, όπως για τις ΑΤΡάσες (βλέπε Κεφ. Β Παρ 2.2.1). Ανάλυση των υπομονάδων αυτών οδήγησε στην απομόνωση πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων για τα οποία ελάχιστα είναι γνωστά ακόμη. Με τον τρόπο αυτό απομονώθηκε ο ρυθμιστής (DeMartino *et al.*, 1996, Hastings *et al.*, 1999), και το σηματοσώμα (Kwok *et al.*, 1999). Με παρόμοιο τρόπο, οι Peng *et al.*, (2001) μελετώντας την λειτουργία της Rpn6 στο φυτό *Arabidopsis thaliana*, εντόπισαν ένα δεύτερο (εκτός του PA700) σύμπλοκο στο οποίο αυτή συμμετέχει και το ονόμασαν PR500 (Proteasome Related Complex). Απομόνωσαν το σύμπλοκο και αναλύοντας τις υπομονάδες, που το αποτελούν, βρήκαν ότι η σύσταση του είναι παρόμοια με εκείνη του PA700, δηλαδή περιέχει εκτός της Rpn6 τις Rpn3 και Rpn5a. Ανέλυσαν τις υπομονάδες του νέου συμπλόκου σε αποδιατακτικά πεπτάσματα και συνέκριναν την εικόνα αυτή με εκείνη του PA700. Τα δυο σύμπλοκα αναλύονται σε υπομονάδες που συμπεριφέρονται το ίδιο ηλεκτροφορητικά εκτός της μεγαλύτερης υπομονάδας του νέου συμπλόκου που δεν φαίνεται να υπάρχει στον PA700. Παρατήρησαν επίσης ότι μια πρωτεΐνη 70kDa ακολουθεί το PR500 σε όλα τα στάδια του

καθαρισμού, η οποία αποδείχθηκε ότι είναι η τσαπερόνη Hsp70. Κατόπιν μελέτησαν τις αλλαγές στα επίπεδα του συμπλόκου σε μια σειρά φυτών που φέρουν μεταλλαγές στα γονίδια ελέγχου της φωτομορφογένεσης, δηλ στις υπομονάδες του COP9-σηματοσώματος, καθώς και σε συνθήκες στρες, όπως θερμικό σοκ και έκθεση σε καναβανίνη, που προκαλεί σχηματισμό ανώμαλων πρωτεϊνών. Σε όλες αυτές τις περιπτώσεις το σύμπλοκο εξαφανίζεται, χωρίς να αποδομείται, οπότε υπέθεσαν ότι η ελάττωση που παρατηρούν οφείλεται σε ενσωμάτωση του συμπλόκου αυτού στο σύμπλοκο της 26S πρωτεάσης. Το κοινό χαρακτηριστικό των τριών αυτών καταστάσεων είναι η αυξημένη ανάγκη του κύτταρου για πρωτεόλυση από το σύμπλοκο της 26S πρωτεάσης. Σύμφωνα με τα στοιχεία αυτά οι Peng *et al.*, (2001) προτείνουν τρεις πιθανές εκδοχές για την λειτουργία του PR500:

- 1) επειδή περιέχει κάποιες από τις πρωτεΐνες του 19S και την Hsp70, πιθανόν να λειτουργεί σαν «κυτταρική αποθήκη» για το 19S, που ενεργοποιείται όταν υπάρχει αυξημένη ανάγκη για πρωτεόλυση. Είναι πιθανόν το PR500 με την βοήθεια της Hsp70 να σχηματίζει γρήγορα τα επιπλέον 19S που απαιτούνται. Βέβαια, δεδομένης της ποσότητας των πρωτεασωμάτων ανά κύτταρο, η ύπαρξη τέτοιας αποθήκης είναι μάλλον περιορισμένης σημασίας.
- 2) Είναι πιθανόν το PR500 να είναι κάποια εξειδικευμένη μορφή του 19S, το οποίο και αντικαθιστά κάτω από συγκεκριμένες μεταβολικές συνθήκες. Αυτό θα ξεκαθαριστεί όταν ταυτοποιηθούν όλες οι υπομονάδες του PR500.
- 3) Αν και δεν έχει δείχτει παρόμοια δράση για το PR500, είναι πιθανό να λειτουργεί παρόμοια με τον ρυθμιστή (modulator), δηλαδή να αλληλεπιδρά με λειτουργικά ολοκληρωμένα 26S σύμπλοκα και να ρυθμίζει ή να τροποποιεί την λειτουργία τους.

Πρόσφατα, ένα ακόμη σύμπλοκο απομονώθηκε το PC530(Protein Complex) μεγέθους 530kDa από ωάρια αστερία (Tanaka *et al.*, 2000). Το σύμπλοκο αυτό απομονώθηκε ενωμένο με το 20S πρωτεάσωμα και αρχικά θεωρήθηκε ότι πρόκειται για το 19S, μόνο που είναι μικρότερο. Ανάλυση των υπομονάδων του συμπλόκου αυτού έδειξε ότι δεν υπάρχει καμία σχέση ανάμεσα στα δυο σύμπλοκα, με εξαίρεση ίσως μιας από τις υπομονάδες του νέου συμπλόκου που παρουσιάζει κάποια ομολογία με την Rpn3. Αποτελείται από 6 πρωτεΐνες με μεγέθη 105, 70, 50, 34, 30 και 23kDa. Ανάλυση της πεπτιδικής αλληλουχίας των πρωτεϊνών αυτών δεν έδειξε ομολογία με κάποια γνωστή πρωτεΐνη, ανθρώπινη ή ζύμης. Το σύμπλοκο αλληλεπιδρά με το 20S πρωτεάσωμα, αλλά αυτή η σύνδεση δεν παρουσιάζει καμία επίδραση στην πρωτεολυτική δραστηριότητα του πρωτεασώματος.

2.5 Πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την 26S πρωτεάση: συνεργάτες και υποκαταστάτες

Η 26S πρωτεάση αποτελεί τον κύριο ATP-εξαρτώμενο μηχανισμό πρωτεόλυσης σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Κάθε νέο στοιχείο που προκύπτει για το σύμπλοκο αυτό ενισχύει την άποψη ότι πρόκειται για έναν αυστηρά συντηρημένο μηχανισμό ο οποίος διέπεται από τους ίδιους κανόνες σε όλα τα κύτταρα, αποτελείται από τις ίδιες υπομονάδες και υπόκειται στους ίδιους ελέγχους. Ένα από τα μεγαλύτερα προβλήματα στην μελέτη του συμπλόκου είναι ο τρόπος απομόνωσης ακέραιων μορφών από τα κύτταρα. Τα σύμπλοκα που έχουν απομονωθεί κατά καιρούς δεν εμφανίζουν ακριβώς την ίδια σύσταση, υπάρχουν υπομονάδες για τις οποίες δεν είναι ακόμη βέβαιο ότι ανήκουν στο σύμπλοκο, όπως η Rpn4, και η Rpn9, και πιθανόν υπάρχουν και άλλες που δεν έχουν απομονωθεί ακόμη. Διάφορες υπομονάδες του συμπλόκου και ειδικά του 19S έχουν βρεθεί να αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες ή σύμπλοκα, χωρίς να είναι γνωστό αν οι αλληλεπιδράσεις αυτές αφορούν και το σύμπλοκο, ή γίνονται από ελεύθερες μορφές των υπομονάδων αυτών, ή αφορούν άλλα σύμπλοκα στα οποία

αυτές συμμετέχουν. Και τέλος, ποια είναι η λειτουργία των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την 26S πρωτεάση, είναι συνεργάτες ή υποκαταστάτες ;

Το πόσο σημαντική είναι η δράση της 26S πρωτεάσης στα κύτταρα φαίνεται στην εργασία των Rock *et al.*, (1994), οι οποίοι εντόπισαν αναστολείς του πρωτεασώματος με τους οποίους κατέστειλαν την πρωτεόλυση των περισσότερων πρωτεϊνών του κυττάρου. Με την 26S πρωτεάση απομακρύνονται, εκτός των ουβικιτινιλιωμένων πρωτεϊνών, πρωτεΐνες με μικρό και μεγάλο χρόνο ημιζωής, ανώμαλα προϊόντα της μετάφρασης ή μη καλά διπλωμένες πρωτεΐνες. Για να αποδομηθούν όλες αυτές οι πρωτεΐνες πρέπει να γίνουν κάποια βήματα: πρώτα να αναγνωρισθούν από κάποιο παράγοντα, μετά να προσκολληθούν με κάποιο τρόπο στην πρωτεάση, ακόλουθα να αποδιαταχθούν, να μετατοπισθούν στο εσωτερικό του καταλυτικού σωματιδίου, να υδρολυθούν και τέλος να απελευθερωθούν σαν προϊόντα. Κάποια από τα βήματα αυτά γίνονται από τις υπομονάδες του συμπλόκου της πρωτεάσης, όπως τα τελευταία. Η αποδιάταξη των πρωτεϊνών και η διοχέτευσή τους στον κύλινδρο γίνεται από τις 6 AAA ATPάσες του 19S. Το τμήμα της πρωτεΐνης που βρίσκεται μέσα στον κύλινδρο διατηρείται σε ξεδιπλωμένη μορφή μέσω των αλληλεπιδράσεων της πεπτιδικής αλυσίδας με τους εναλλασσόμενους α/β δακτυλίους του πρωτεασώματος, όπου με υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις ευνοούν την εμφάνιση μη φυσιολογικών υδρόφοβων περιοχών, ενώ με πολικές αλληλεπιδράσεις απομακρύνουν τα προϊόντα (Baumeister *et al.*, 1998). Η υδρόλυση των πεπτιδικών δεσμών είναι δουλειά των β-καταλυτικών υπομονάδων του 20S πρωτεασώματος. Για να ολοκληρωθεί η εικόνα μας λείπει η αρχή αυτής της ιστορίας. Πού και πώς γίνεται η αναγνώριση των προς αποδόμηση πρωτεϊνών, πώς αυτές φτάνουν στην πρωτεολυτική μηχανή και πώς δεσμεύονται σε αυτή ώστε να αρχίσει η διαδικασία της πρωτεόλυσης. Με άλλα λόγια δεν είναι ακόμη γνωστοί όλοι οι παράγοντες που συμμετέχουν στο σύστημα. Οι προσπάθειες που γίνονται για να απαντηθούν τα ερωτήματα αυτά ακολουθούν τρεις βασικές στρατηγικές. Η πρώτη ακολουθεί τα βήματα από την πρωτεΐνη που πρωτεολύεται και μελετώνται οι παράγοντες που αλληλεπιδρούν με αυτή μέχρι να φτάσει σε κάποια ή κάποιες υπομονάδες της 26S. Η δεύτερη μελετάει τις αλληλεπιδράσεις των υπομονάδων της 26S με άλλες πρωτεΐνες, κάτι που συνήθως γίνεται έχοντας απομονώσει την πρωτεΐνη, της οποίας η συμπεριφορά σε ελεύθερη μορφή δεν αντανάκλα πάντα την συμπεριφορά της μέσα στο σύμπλοκο. Η τρίτη είναι να απομονωθούν τα σύμπλοκα και να γίνει απόπειρα εντοπισμού πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με αυτά.

Ακολουθώντας την τελευταία μέθοδο οι Verma *et al.*, (2000) εντόπισαν διάφορες ομάδες πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με τα σύμπλοκα 19S και 26S, κατάφεραν μάλιστα να μελετήσουν και την επιδράση του ATP στις αλληλεπιδράσεις αυτές. Με την εργασία αυτή απομονώθηκαν, παράγοντες των οποίων η σχέση με την 26S πρωτεάση ήταν ήδη γνωστή από τις άλλες δύο μεθόδους, νέοι παράγοντες, καθώς και μια τουλάχιστον υπομονάδα του συμπλόκου που οι άλλες μέθοδοι δεν κατάφεραν να εντοπίσουν. Κάποιοι από αυτούς τους παράγοντες καλύπτουν σημαντικά κενά στο παραπάνω σχήμα της διαδικασίας αποδόμησης μιας πρωτεΐνης από το σύστημα της 26S πρωτεάσης, όπως και κάποια κενά άλλων μελετών που αφορούν τις σχέσεις των υπομονάδων του συμπλόκου με άλλες κυτταρικές λειτουργίες, όπως ρύθμιση της μεταγραφής και της μετάφρασης.

Σε γενικές γραμμές συγκόλλησαν σε δυο υπομονάδες του συμπλόκου (μία ATPάση, την Rpt1, και μία α-υπομονάδα του 20S) μια ετικέτα (FLAG-6His) μέσω της οποίας μπόρεσαν να απομονώσουν τα σύμπλοκα που τις φέρουν με στήλες ανοσοσυγγένειας που δεσμεύουν την ετικέτα. Η επιλογή της Rpt1 αποδείχθηκε πολύ σωστή, δεδομένου ότι η συγκόλληση της ετικέτας είχε σαν αποτέλεσμα την αστάθεια του συμπλόκου 19S-20S, γεγονός που τους επέτρεψε να απομονώσουν 19S σύμπλοκο παρουσία ATP, χωρίς αυτό να είναι δεσμευμένο στο 20S πρωτεάσωμα, και να εντοπισθούν με τον τρόπο αυτό πρωτεΐνες των οποίων η αλληλεπίδραση με την 26S πρωτεάση επηρεάζεται από το ATP. Τα σύμπλοκα που απομονώνονται με τον τρόπο αυτό αναλύονται με φασματογράφιση μάζας (DALPC Direct

Analysis of the composition of Large Protein Complexes) μέθοδος η οποία αποτελεί πολύτιμο εργαλείο στην ανάλυση πολυπρωτεϊνικών συστημάτων.

Πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με το σύμπλοκο της 26S πρωτεάσης

1) Νέες υπομονάδες:

Μία από τις πρωτεΐνες που απομονώθηκε με την παραπάνω μέθοδο είναι η Daq1, την οποία και μετονόμασαν σε Rpn13. Η διαφορά της από τις υπόλοιπες είναι ότι σε πειράματα ανοσοκαθίζησης συμπαρασύρει τις υπόλοιπες υπομονάδες του συμπλόκου σε στοιχειομετρικές αναλογίες, χωρίς αυτό να επηρεάζεται από την παρουσία ή απουσία ATP, κάτι που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για υπομονάδα του συμπλόκου.

2) Πρωτεΐνες του συστήματος της ουβικιτίνης.

Η αλληλεπίδραση των ενζύμων της ουβικιτίνης με την 26S πρωτεάση έχει δείχθει από διάφορα εργαστήρια, και επιβεβαιώνεται εδώ από τους Verma *et al.*, (2000). Η άμεση επαφή των ενζύμων της ουβικιτίνης με την 26S πρωτεάση θα εξηγούσε πως φτάνουν τα ουβικιτινιλιωμένα προϊόντα στο πρωτεολυτικό ένζυμο.

Η αναγνώριση των πρωτεϊνών σαν υποψήφιες προς αποδόμηση, γίνεται από μια ομάδα ενζύμων, τα E3 ή αλλιώς λιγάσες ουβικιτίνης, τα οποία μεταφέρουν ενεργοποιημένη ουβικιτίνη από το E2 στον υποκαταστάτη. Υπάρχουν τέσσερις κατηγορίες λιγασών (E3) ανάλογα με τον τρόπο αναγνώρισης των υποκαταστατών (βλέπε ουβικιτίνη Κεφ. Β Παρ 5). Οι Xie & Varshavsky (2000) έδειξαν ότι λιγάσες δύο διαφορετικών μονοπατιών προσδένονται άμεσα στο 19S: η Ubrp1 (ή αλλιώς N-recognin) η οποία περιέχει δομή ουβικιτίνης στο αμινοτελικό της άκρο, και αναγνωρίζει υποκαταστάτες μέσω του κανόνα του N-τελικού αποσταθερο-ποιοτικού αμινοξέος (βασικό ή ογκώδες υδρόφοβο), και η Ufd4 του μονοπατιού UFD (Ubiquitin Fusion Degradation pathway), που ουβικιτινιλιώνει πρωτεΐνες που περιέχουν ουβικιτίνη στο αμινο-τελικό τους άκρο σαν συγκολλημένο τμήμα (fusion). Η πρώτη, η Ubrp1, αλληλεπιδρά με τις Rpn1, Rpt1 και Rpt6, ενώ η δεύτερη αλληλεπιδρά με την Rpt6.

Σε μια ανάλογη εργασία οι Tongaokar *et al.*, (2000) έδειξαν ότι μια σειρά ενζύμων E2 (στην ζύμη υπάρχουν 11) αλληλεπιδρούν με την 26S πρωτεάση. Έδειξαν επίσης ότι κάτω από συνθήκες στρες ενισχύεται αυτή η αλληλεπίδραση. Συγκεκριμένα η Ubc2 συγκαθιζάνει με την 26S πρωτεάση κατά την απομόνωση του συμπλόκου, το οποίο είναι σε θέση να ουβικιτινιλιώσει πρωτεΐνη *in vitro* χωρίς προσθήκη πρόσθετων ενζύμων. Αυτή είναι η πρώτη φορά που υποστηρίζεται με βιοχημικά στοιχεία η υπόθεση ότι η ουβικιτινιλίωση γίνεται μέσα στο σύμπλοκο της 26S ταυτόχρονα με την πρωτεόλυση.

Οι Verma *et al.*, (2000) βρίσκουν ότι υπάρχει αλληλεπίδραση της 26S με λιγάσες ουβικιτίνης και των άλλων δύο κατηγοριών, του αναφασικού συμπλόκου APC και των τετραμερών συμπλόκων SCF, τα οποία προσδένονται στο σύμπλοκο ακόμη και σε κύτταρα στα οποία δεν είναι δυνατή η ουβικιτινιλίωση των υποκαταστατών τους, οπότε η σύνδεση με το 19S δεν γίνεται μέσω της αλυσίδας των ουβικιτινίων, όπως προτείνεται από διάφορους ερευνητές, αλλά μέσω των συμπλόκων που προσθέτουν ουβικιτίνη σε υποκαταστάτες.

Με βάση τα στοιχεία αυτά, δεν πάνε οι ουβικιτινιλιωμένες πρωτεΐνες στην 26S πρωτεάση, αλλά τα E3 (ή και συνδυασμοί E3/E2) προσκολλώνται στο ένζυμο όπου προσελκύονται οι υποκαταστάτες και ακολουθεί προσθήκη ουβικιτίνης και αποδόμηση.

3). Τσαπερόνες

Ο 20S κύλινδρος είναι πολύ μικρός για να χωρέσει ολόκληρες πρωτεΐνες, και από πολύ νωρίς υπήρχε η αίσθηση ότι πριν την πρωτεόλυση οι υποκαταστάτες με κάποιο τρόπο ξεδιπλώνονται. Υπεύθυνες για την λειτουργία αυτή θεωρήθηκαν οι 6 AAA ATPάσες του συμπλόκου με βάση τα μοντέλα των προκαρυωτικών ATP-εξαρτώμενων πρωτεασών.

Υπάρχουν όμως περιπτώσεις όπου η δράση άλλων τσαπερονών συνδυάζεται με την δράση της 26S πρωτεάσης, όπως η περίπτωση του IκΒα και της VCP (Dai *et al.*, 1998). Σε αυτή την περίπτωση, εξωτερικά ερεθίσματα προκαλούν φωσφορυλίωση του IκΒα (πιθανόν από το σηματοσώμα, βλέπε Κεφ. Β Παρ 2.5), που σημαίνει την ακόλουθη ουβικιτινίωσή του. Οι Dai *et al.*, (1998) έδειξαν ότι η VCP, μια πρωτεΐνη της οικογένειας των AAA ΑΤΡασών, η οποία λειτουργεί σαν τσαπερόνη, αποσπά τον Ub-IκΒα από τα διμερή με τον NF-κΒ και τον μεταφέρει στην 26S πρωτεάση με την οποία αλληλεπιδρά. Στην περίπτωση αυτή η πρωτεΐνη υποκαταστάτης μεταφέρεται στην 26S από κάποια τσαπερόνη.

Η VCP δεν είναι η μόνη τσαπερόνη που συνεργάζεται με την 26S πρωτεάση. Οι Luders *et al.*, (2000) έδειξαν ότι οι τσαπερόνες Hsc70, που εκφράζεται συνεχώς, και η Hsp70 που εκφράζεται μετά από θερμικό σοκ, αλληλεπιδρούν με την BAG-1, η οποία προσδένεται στο 19S. Η BAG-1 ανήκει στις πρωτεΐνες που περιέχουν δομή ουβικιτίνης (UDP), για την οποία πιστεύεται ότι λειτουργεί σαν ενδιάμεσος για την σύνδεση πρωτεϊνών με την 26S πρωτεάση. Η πρόσδεση της BAG-1 στο πρωτεάσωμα είναι ΑΤΡ-εξαρτώμενη και απαιτεί την αμινο-τελική περιοχή της πρωτεΐνης με την δομή ουβικιτίνης. Το ίδιο ακριβώς παρατηρείται και με την Rad23, μια άλλη UDP πρωτεΐνη, η οποία εμπλέκεται στην διόρθωση του DNA και για την οποία έχει προταθεί ότι επίσης λειτουργεί σαν κρίκος σύνδεσης του μηχανισμού διόρθωσης του DNA με το σύστημα της 26S πρωτεάσης, μέσω της περιοχής ουβικιτίνης που περιέχει (Schauber *et al.*, 1998).

Οι Verma *et al.*, (2000) βρίσκουν αλληλεπίδραση του 19S με τρεις διαφορετικές κατηγορίες τσαπερονών, τις Ssa, και Ssb της οικογένειας των Hsc70, την Hsc82 και την Pac2. Προτείνουν ότι είτε οι τσαπερόνες προσελκύονται από μη φυσιολογικές δομές που προκύπτουν κατά το ξεδίπλωμα των υποκαταστατών από την 26S, είτε αποτελούν βοηθητικούς παράγοντες της πρωτεάσης για το ξετύλιγμα των πρωτεϊνών.

4). Ριβοσωμικές πρωτεΐνες

Η πρωτεολυτική ωρίμανση της p105 προς σχηματισμό ενεργού NF-κΒ γίνεται από την 26S πρωτεάση, ταυτόχρονα με την μετάφραση. Είναι επίσης γνωστό ότι σε κύτταρα θηλαστικών το 30% των νέο-συντιθέμενων πρωτεϊνών αποδομούνται από το πρωτεάσωμα (Schubert *et al.*, 2000b). Πιθανόν λοιπόν να μην είναι τυχαίο το ότι οι Verma *et al.*, (2000) βρίσκουν ριβοσωμικές πρωτεΐνες να συγκαθιζάνουν με το σύμπλοκο της 26S πρωτεάσης, που σημαίνει πιθανή συνεργασία της πρωτεολυτικής μηχανής με τα ριβοσώματα και έλεγχο σωστής αναδίπλωσης των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών ταυτόχρονα με την μετάφραση.

5). Άλλες κυτταρικές πρωτεΐνες

Στην ομάδα αυτή κατατάσσονται πρωτεΐνες που σχετίζονται με τον έλεγχο της μεταγραφής (Ctr1, Raf1, Rtf1), την μετάφραση (Tef1, Bel1), την λειτουργία του κυττοσκελετού (Sli5, Pac2), τον μεταβολισμό του RNA (Ddp9, Pub1), την κυτταρική διαίρεση (Pds5), την μετάδοση σημάτων (Bmh1) και τον μεταβολισμό (Shm1, Trp5, Ura2, Psa1, Acc1). Ειδικά οι Ctr1 και η Raf1 είναι υπομονάδες ενός συμπλόκου που σχετίζεται με την RNA-πολυμεράση II, το οποίο πιστεύεται ότι στρατολογεί την κινάση C στην μεταγραφική μηχανή. Εκτός των πρωτεϊνών αυτών, οι ΑΤΡάσες του 19S έχουν συνδεθεί με την μεταγραφική μηχανή και μάλιστα έχουν χαρακτηριστεί σαν μεταγραφικοί παράγοντες, όπως η SUG1, η TBP-1 και η MSS1 (βλέπε AAA ΑΤΡάσες Κεφ Α, Παρ 2.3).

6). Ιικές πρωτεΐνες

Μια από τις πρώτες υπομονάδες του συστήματος της 26S πρωτεάσης που απομονώθηκε ήταν η TBP-1 (Tat-binding protein1) (Nelbock *et al.*, 1990) η οποία αλληλεπιδρά με την Tat του HIV και καταστέλλει την μεταγραφή του. Οι Seeger *et al.*, (1997b) έδειξαν ότι η Tat προσδένεται στα σύμπλοκα 19S και 20S, ενισχύει την δράση της 26S, και καταστέλλει την δράση απομονωμένου 20S. *In vitro* πειράματα έδειξαν ότι Tat ανταγωνίζεται τον PA28(11S) στην πρόσδεση με το 20S πρωτεάσωμα, η Tat αντικαθιστά τον

PA28 στο πρωτεάσωμα και αντίστροφα. Επειδή ο PA28 έχει συνδεθεί με την παρουσίαση αντιγόνων, οι Seeger *et al.*, (1997b) προτείνουν ότι, η ανικανότητα των μολυσμένων με τον ιό κυττάρων να παρουσιάσουν αντιγόνα, οφείλεται εν μέρει στο ότι η Tat δεν επιτρέπει την πρόσδεση του PA28 στο 20S πρωτεάσωμα. Δεν μπόρεσαν να δώσουν ικανοποιητική εξήγηση στο γιατί η Tat ενισχύει την δράση της 26S πρωτεάσης. Την απάντηση στο τελευταίο έδωσαν εν μέρει οι Schubert *et al.*, (2000a), οι οποίοι μελέτησαν την επίδραση της καταστολής της 26S πρωτεάσης στην φυσιολογία του ιού. Στην εργασία αυτή έδειξαν ότι ο ιός εκμεταλλεύεται το σύστημα της 26S πρωτεάσης και το σύστημα της ουβικιτίνης, για την ωρίμανση των πρωτεϊνών του (της πολυπρωτεΐνης Gag) και την απελευθέρωση μολυσματικών ιοσωματίων. Καταστολή της λειτουργίας της 26S πρωτεάσης ελαττώνει δραματικά τα επίπεδα της ελεύθερης ουβικιτίνης στα κύτταρα, και η ρ6⁹⁹ πρωτεΐνη του ιού απαιτεί ουβικιτινιλίωση για να ενεργοποιηθεί. Η πρωτεΐνη αυτή κωδικοποιείται στην κάρβοξυ-τελική περιοχή της Gag και απαιτείται για τον αποτελεσματικό διαχωρισμό των ώριμων ιοσωματίων από την επιφάνεια των κυττάρων. Οι Schubert *et al.*, (2000a), προτείνουν ότι η παρεμπόδιση ωρίμανσης και απελευθέρωσης μολυσματικών ιοσωματίων που παρατηρείται κατά την καταστολή της 26S πρωτεάσης οφείλεται στην έλλειψη ουβικιτίνης, και μάλιστα θεωρούν ότι υπάρχει έδαφος στα παραπάνω στοιχεία ώστε να δημιουργηθεί κάποια θεραπευτική αγωγή που να βασίζεται σε αυτά.

Η Tat δεν είναι η μόνη ιική πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με την 26S. Ένα τόσο σημαντικό σύστημα ήταν επόμενο είτε να καταστρέφεται είτε να χρησιμοποιείται από ιούς. Η πρωτεΐνη X του ιού της ηπατίτιδας Β προσδένεται στην XAPC7, μια α-υπομονάδα του πρωτεασώματος, χωρίς να υπάρχουν στοιχεία για τα αποτελέσματα της σχέσης αυτής, (Seeger *et al.*, 1997). Η Tax, μια πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από τον ανθρώπινο ιό της λευχαιμίας των Τα-κυττάρων (HTLV-1), προσδένεται επίσης σε δύο υπομονάδες του 20S, μια α- (HC9) και μια β- υπομονάδα (HsN3). Ούτε και σε αυτή την περίπτωση υπάρχουν στοιχεία για τις επιδράσεις αυτής της πρόσδεσης στην λειτουργία των πρωτεασωμάτων, αλλά φαίνεται να έχει κάποια σχέση με την ωρίμανση του NF-κΒ από την p105 (Seeger *et al.*, 1997).

2.6 Με ουβικιτίνη ή χωρίς ουβικιτίνη;

Πρωτεόλυση από την 26S προαπαιτεί οι υποκαταστάτες να είναι ουβικιτινιλιωμένοι, ή όχι:

Η αποκαρβοξυλάση της ορνιθίνης (ODC) φαίνεται να αποτελεί μια φωτεινή εξαίρεση στον κανόνα (Murakami *et al.*, 2000), αφού η πρωτεόλυσή της από την 26S γίνεται χωρίς ουβικιτίνη. Η ODC είναι το πρώτο ένζυμο της βιοσύνθεσης πολυαμινών και είναι αυτό που κανονίζει τον ρυθμό παραγωγής τους (rate-limiting). Η ενεργός μορφή του ενζύμου είναι ένα ομο-διμερές, στο οποίο εμφανίζονται δυο ενεργά κέντρα. Η αύξηση του επιπέδου των πολυαμινών στο κύτταρο είναι τοξική και επάγει την σύνθεση του αντιζύμου (AZ), το οποίο προσδένεται στην ODC αποτρέποντας τον σχηματισμό των διμερών, απενεργοποιώντας έτσι το ένζυμο. Το AZ μεταφέρει την ODC στην 26S πρωτεάση όπου και αποδομείται. Το AZ δεν καταστρέφεται, αλλά ελευθερώνεται και συνεχίζει την απομάκρυνση των ODC, μεταφέροντας ένα νέο μόριο στην 26S κοκ...Το AZ με την σειρά του ελέγχεται από έναν αναστολέα, ο οποίος είναι μια πρωτεΐνη ίδια με την ODC μόνο που είναι ενζυματικά ανενεργή. Η λειτουργία της ODC ρυθμίζεται λοιπόν από την ισορροπία των επιπέδων των πολυαμινών και των δυο ενζύμων, του AZ και του αναστολέα του. Αρχικά θεωρήθηκε ότι το AZ λειτουργεί σαν ενδιάμεσος σύνδεσης με την 26S πρωτεάση, όμως, αυτό που προσδένεται στην πρωτεάση είναι η ODC και όχι το AZ, και μόνο όταν είναι συμπλοκοποιημένη με AZ, που σημαίνει ότι το σήμα αναγνώρισης για πρόσδεση φτιάχνεται με τον διμερισμό τους. Απουσία

AZ, η ODC πρωτεολύεται *in vitro*, αργά από την 26S πρωτεάση. Η αλληλεπίδραση της ODC με την πρωτεάση έχει σαν αποτέλεσμα την ενζυματική αδρανοποίηση του ενζύμου πολύ πριν την τελική υδρόλυση. Το ένζυμο που είναι δεσμευμένο στην πρωτεάση είναι αδρανές, και αυτή η αδρανοποίηση είναι μη αντιστρέψιμη, σε αντίθεση με την δράση του AZ που είναι αντιστρέψιμη απουσία 26S πρωτεάσης. Η πρόσδεση και μόνο στο AZ είναι ικανή να αδρανοποιήσει την ODC, αλλά απομάκρυνση του AZ αποκαθιστά την ενζυματική λειτουργία. Η πρόσδεση του ενζύμου στην πρωτεάση, προκαλεί τέτοιες αλλαγές στην πρωτεΐνη, που ενώ δεν έχει υδρολυθεί είναι αδρανής. Με βάση τα στοιχεία αυτά εξάγεται το συμπέρασμα ότι το διμερές AZ-ODC προσδένεται στην 26S πρωτεάση, μέσω της ODC, και πιθανόν αποδιατάσσεται από αυτήν πολύ πριν αρχίσει η διαδικασία της πρωτεόλυσης. Άρα υπάρχει κάποιος παράγοντας στην 26S πρωτεάση που αναγνωρίζει την ODC χωρίς να απαιτείται ουβικιτίνη.

Πρόσφατα εμφανίστηκε και μια δεύτερη πρωτεΐνη, η οποία αποδομείται από την 26S χωρίς να είναι ουβικιτινιλιωμένη (ανασκόπηση Verma & Deshais 2000). Πρόκειται για τον αναστολέα p21^{Cip1} της εξαρτώμενης από κυκλίνη κινάσης (Cdk), ο οποίος πρωτεολύεται από την 26S ακόμη και όταν όλες οι λυσίνες στο μόριο του μεταλλάγουν σε αργινίνες. Βέβαια δεν έχει ελεγχθεί (κάτι που έγινε για την ODC) αν η πρωτεΐνη αυτή πρωτεολύεται σε στελέχη ζύμης όπου δεν λειτουργεί το σύστημα της ουβικιτίνης, οπότε δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα να ουβικιτινιλιώνεται όχι σε κάποια εσωτερική λυσίνη αλλά στο άμινο-τελικό της άκρο (όπως η MyoD), αν και δεν εντοπίζονται ουβικιτινιλιωμένες μορφές της που θα ξεχώριζαν λόγω αλλαγής μεγέθους. Αν όμως είναι πράγματι έτσι, τότε η ODC δεν είναι η μόνη, αλλά η πρώτη από κάποια ομάδα πρωτεϊνών που έχει διατηρήσει τον παλιό δρόμο αποδόμησης, πριν εμφανιστεί η ουβικιτίνη.

Από δύο διαφορετικά εργαστήρια αναφέρθηκε ότι ο PA700 εκτός της αλυσίδας ουβικιτίνης αναγνωρίζει και μη φυσιολογικές δομές πρωτεϊνών, χωρίς την μεσολάβηση ουβικιτίνης. (Strickland *et al.*, 2000, Braun *et al.*, 1999). Απομονώθηκαν σύμπλοκα PA700(19S) τα οποία επωάστηκαν *in vitro* με αποδιαταγμένες μορφές πρωτεϊνών που χρησιμοποιούνται στα πειράματα μελέτης της λειτουργίας τσαπερονών, όπως η κιτρική συνθάση μετά από θερμική επεξεργασία (Braun *et al.*, 1999, Strickland *et al.*, 2000), η Β αλυσίδα της ινσουλίνης (μετά από αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών κροκιδώνεται), και η μεταλλαγή ΔF-508 της περιοχής πρόσδεσης νουκλεοτιδίου 1 του διαμεμβρανικού ρυθμιστή της κυστικής ίνωσης (Strickland *et al.*, 2000). Οι τρεις αυτές πρωτεΐνες αποτελούν χαρακτηριστικά παραδείγματα τριών τρόπων αποδιάταξης πρωτεϊνών, με θερμική επεξεργασία, με αναγωγή δισουλφιδικών δεσμών, και μη σωστή αναδίπλωση. Και στις τρεις περιπτώσεις ο PA700 καθυστέρησε την κροκιδωση των αποδιαταγμένων πρωτεϊνών, ενώ στην περίπτωση της κιτρικής συνθάσης παρατηρήθηκε ακόμη και αναδίπλωση της πρωτεΐνης στην ενεργό μορφή της. Ο PA700 ήταν αποτελεσματικός μόνο όταν ήταν παρών κατά την έναρξη της διαδικασίας αποδιάταξης, ενώ δεν είχε καμία επίδραση σε ήδη κροκιδωμένες πρωτεΐνες. Οι Strickland *et al.*, (2000) προτείνουν ότι ο PA700 αναγνωρίζει μή φυσιολογικά απαντώμενες περιοχές των πρωτεϊνών που είναι χαρακτηριστικές της έναρξης της αποδιάταξης.

Η δράση τσαπερόνης του PA700 εντοπίζεται και από τα δύο εργαστήρια, στην βάση του συμπλόκου, δηλαδή στις 6 ATPάσες και τις Rpn1 και 2. Στην αρχή λοιπόν ήταν ο καταλυτικός κύλινδρος ο οποίος μπορούσε να επεξεργαστεί μόνο πεπτιδία χωρίς δευτεροταγή δομή, οπότε, στρατολόγησε ένα σύστημα μοριακών μοχλών που με κατανάλωση ενέργειας, θα εξυπηρετούσαν στο ξεδίπλωμα και ίσως στην αναγνώριση και επιλογή των υποκαταστατών, όπως συμβαίνει στις προκαρυωτικές ATP-εξαρτώμενες πρωτεάσες τύπου Clp. Τι συμβαίνει όμως με τα προκαρυωτικά πρωτεασώματα, όπου δεν υπάρχει ουβικιτίνη, οπότε δεν χρειάζεται και το καπάκι του PA700; Πώς ξεδιπλώνονται εκεί οι πρωτεΐνες; Στο βακτήριο *Methanococcus jannaschii*, και πιθανόν και στα άλλα αρχαιοβακτήρια όπου

εντοπίζεται πρωτεάσωμα, υπάρχει ένα γονίδιο της οικογένειας των AAA ATPασών ομόλογο με την S4(Rpt2) του ανθρώπινου 19S. Οι Zwickl *et al.*, (1999) κλωνοποίησαν το γονίδιο αυτό και παρήγαγαν την πρωτεΐνη (50kDa) σε βακτήρια *E.coli*. Σε μη αποδιατακτικές συνθήκες η πρωτεΐνη απομονώνεται σαν ένα σύμπλοκο 650kDa. Το σύμπλοκο αυτό ονομάστηκε PAN (Proteasome Activating Nucleotidase) και ελέγχθηκε η πιθανότητα να ενεργοποιεί πρωτεασώματα, είτε βακτηριακά (από το βακτήριο *Thermoplasma acidophilum*), είτε από κύτταρα θηλαστικών. Η PAN ενεργοποίησε την υδρόλυση αποδιαταγμένων πρωτεϊνών και στα δυο είδη πρωτεασωμάτων -βακτηριακά και ευκαρυωτικά- αλλά όχι και μικρών πεπτιδίων. Η ενεργοποίηση των πρωτεασωμάτων από την PAN απαιτεί υδρόλυση ATP όπως και με τον PA700. Οι Zwickl *et al.*, (1999) υποστηρίζουν ότι η PAN αποτελεί προγονική μορφή της βάσης του PA700 και ότι, όπως ακριβώς με τον κύλινδρο όπου από μια εξελίχθηκαν επτά διαφορετικές α- και β- υπομονάδες, έτσι και εδώ, από μια εξελίχθηκαν έξι διαφορετικές ATPάσες.

Οι Wolf *et al.*, (1998) εντόπισαν μια παρόμοια AAA ATPάση στον ακτινομύκητα *Rhodococcus erythropolis*, την ARC (AAA ATPase forming Ring-shaped Complexes). Η πρωτεΐνη κωδικοποιείται στη 5' περιοχή του οπερόνιου των υπομονάδων του 20S πρωτεασώματος του βακτηρίου, και, όπως και η PAN, απομονώνεται σαν εξαμελής δακτύλιος, που όμως δεν είναι σε θέση να ενεργοποιήσει πρωτεόλυση πρωτεϊνών από το αντίστοιχο πρωτεάσωμα *in vitro*. Η θέση της στο οπερόνιο των υπομονάδων του πρωτεασώματος, καθώς και η έλλειψή της από τα γενωμικά άλλων βακτηρίων που δεν περιέχουν πρωτεΐνες ομόλογες με εκείνες του 20S, ενισχύουν την άποψη ότι πρόκειται πράγματι για πρωτεΐνη που δρα σε συνεργασία με το πρωτεάσωμα, ενώ η αδυναμία ενεργοποίησης του συμπλόκου 20S *in vitro* από την ATPάση αποδίδεται σε αδυναμία αλληλεπίδρασης ARC-20S, πιθανόν λόγω της έλλειψης κάποιου βοηθητικού παράγοντα που βοηθάει στην σύνδεση των δυο συμπλόκων *in vivo*.

Αφού λοιπόν υπάρχει ο καταλυτικός κύλινδρος, και εξελίχθηκε ένα σύστημα το οποίο επιλέγει και ξεδιπλώνει πρωτεΐνες, το οποίο μετατρέπει το πρωτεολυτικό σωματίδιο σε μηχανή ελεγχόμενης και επιλεκτικής πρωτεόλυσης που μπορεί να υδρολύσει όχι μόνο πεπτιδία, αλλά και πρωτεΐνες (πχ η ODC), τότε γιατί η εξέλιξη «ασχολήθηκε» με το σύστημα της ουβικιτίνης και ουσιαστικά μετατόπισε το βάρος της εξωλυσσοσωματικής πρωτεόλυσης από τις πλάτες της πρωτεάσης στις πλάτες του συστήματος της ουβικιτίνης; Μια σειρά από λόγοι συνηγορούν προς όφελος του συστήματος της ουβικιτίνης (Verma & Deshaies 2000, Glickman 2000):

- Αύξηση του φάσματος των υποκαταστατών

Η επιλογή των υποκαταστατών μετακινείται από τις περιορισμένες δυνατότητες μιας, (ή ακόμη και έξι, όπως στην περίπτωση του 19S) ATPασών στους πολλαπλούς συνδυασμούς των E2/E3 ενζύμων της ουβικιτίνης.

- Αύξηση της ευελιξίας στη ρύθμιση της πρωτεόλυσης

Με την ουβικιτίνη ουσιαστικά πολλαπλασιάζονται τα διαθέσιμα σήματα για πρωτεόλυση, κάτι που δίνει στο σύστημα την δυνατότητα να αποκρίνεται σε διάφορα ερεθίσματα, όπως, απομάκρυνση πρωτεϊνών μετά από κατάλληλη φωσφορυλίωση, όπως στην περίπτωση του IκΒα.

- Αύξηση της επιλεκτικότητας

Ανάμεσα στην επιλογή με προσθήκη ουβικιτίνης και στην τελική πρωτεόλυση του επιλεγόμενου μορίου παρεμβάλλεται ένα κρίσιμο χρονικό διάστημα που αφήνει στο σύστημα το περιθώριο να ελέγξει τις επιλογές του.

- Αυξημένες δυνατότητες δραστηριοτήτων

Εκτός της πρωτεόλυσης, η 26S πρωτεάση είναι σε θέση να απομακρύνει υπομονάδες από σύμπλοκα, όπως η περίπτωση του Sic1 από τα σύμπλοκα της κυκλίνης/Cdk. Ο ρυθμός της πρωτεόλυσης φαίνεται να ρυθμίζεται από τον ρυθμό ξεδιπλώματος των υποκαταστατών

από τις ΑΤΡάσες του συμπλόκου. Το σύστημα λοιπόν επενδύει ενέργεια στο να προσθέτει ουβικιτίνες οι οποίες θα εξασφαλίσουν μια σταθερή πρόσδεση στην πρωτεάση που θα δώσει στο σύμπλοκο ικανό χρόνο να χειριστεί πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις, όπως αυτές που συγκρατούν τις υπομονάδες σε ένα σύμπλοκο. Οι προκαρυωτικές πρωτεάσες δρουν πολύ γρήγορα για να είναι σε θέση να διασπάσουν πολύπλοκες δομές.

Είναι αξιοσημείωτο ότι οι δυο πιο σημαντικοί ρόλοι του πρωτεασώματος, η απομάκρυνση ουβικιτινιλιωμένων πρωτεϊνών και η παραγωγή πεπτιδίων προς παρουσίαση αντιγόνων, δεν υπάρχουν στα προγονικά βακτηριακά πρωτεασώματα. Η προσαρμογή του πρωτεασώματος στις παραπάνω λειτουργίες έγινε με: α) αύξηση της πολυπλοκότητας των υπομονάδων με γονιδιακό αναδιπλασιασμό και διαφοροποίηση των μελών μέσα σε κάθε οικογένεια (ΑΤΡάσες, α- και β- υπομονάδες), και β) προσθήκη ρυθμιστικών σωματιδίων, συμπλόκων και παραγόντων (ρυθμιστής (modulator), PA28), που ρυθμίζουν τι μπαίνει και τι βγαίνει από το πρωτεάσωμα (Glickman 2000).

2.7 Ο PA28

Ο PA28 είναι ένα σύμπλοκο 250-300kDa που απομονώθηκε από διάφορους ανώτερους οργανισμούς και απαντά με διάφορα ονόματα, όπως 11S, από τον συντελεστή καθίζησης σε πρυνές γλυκερόλης, PA28 (Proteasome Activator) από το μέγεθός του, και REG από το regulator (ρυθμιστής πρωτεασώματος). Δεν έχει αναφερθεί τέτοιο σύμπλοκο στη ζύμη, και όπως φαίνεται από την ανάλυση του γονιδιώματος της, δεν υπάρχουν πρωτεΐνες ομόλογες με αυτές του PA28 (Glickman *et al.*, 1998a). Απομονώθηκε από κύτταρα ανώτερων οργανισμών (θηλαστικών), και σε όλες τις περιπτώσεις, αποτελείται από δυο υπομονάδες, προσδένεται στο 20S χωρίς να απαιτεί ενέργεια, και ενεργοποιεί την πρωτεολυτική δράση του πρωτεασώματος για τα πεπτίδια «μοντέλα» 6-8 φορές *in vitro*.

Ο PA28 αποτελείται από δυο πρωτεΐνες, τις REGα, και REGβ, οι οποίες είναι κατά 50% ομόλογες, μοριακής μάζας 27,290 και 28,607kDa αντίστοιχα. Και οι δύο προσδένονται στο 20S, και βρίσκονται σε απομονωμένα ενεργά σύμπλοκα PA28, τα οποία είναι ολιγομερή των δυο πρωτεϊνών με άγνωστη αναλογία, πιθανόν εξα, ή επτα-μερή (Mott *et al.*, 1994). Οι Realini *et al.*, (1997) βρήκαν τρεις ομόλογες πρωτεΐνες σε ανθρώπινα ερυθρά αιμοσφαίρια, τις: REGα, REGβ, και REGγ, οι οποίες είναι επίσης ομόλογες μεταξύ τους, με την γ- παρόμοια με την α-. Η REGγ ονομάζεται επίσης και αντιγόνο K_i, και εντοπίζεται σε ασθενείς με ερυθματώδη λύκο. Βασική διαφορά των α- και γ- από την β- είναι μια ένθεση 17 και 34 αμινοξέων αντίστοιχα, η οποία προτείνεται ότι αλληλεπιδρά με τα N-τελικά άκρα των α- υπομονάδων του πρωτεασώματος. Στην παραπάνω εργασία, cDNAs από τις τρεις πρωτεΐνες εκφράζονται σε *E. Coli*, για να μελετηθούν οι μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις. Η REGα ομοπολυμερίζεται σχηματίζοντας 7-μελή δακτυλίδια, όπως και η REGγ ενώ η REGβ δεν αλληλεπιδρά με τον εαυτό της. Η REGβ συμμετέχει σε σύμπλοκα, μόνο αν υπάρχει REGα, ενώ η REGγ δεν αλληλεπιδρά με καμία εκτος του εαυτού της. Και οι τρεις ενεργοποιούν υδρόλυση των πεπτιδίων «μοντέλων» από το απομονωμένο 20S *in vitro*, με ισχυρότερη ενεργοποίηση από το μείγμα των REGα/REGβ.

Εκμεταλλεούμενοι τον σχηματισμό ομοπολυμερών κατά την έκφραση της REGα σε βακτήρια, ανέλυσαν μέσω αυτών των δακτυλίων την δομή της REGα (Knowlton *et al.*, 1997). Η πρωτεΐνη αναδιπλώνεται σε τέσσερις έλικες, από τις οποίες οι τρεις (οι 2, 3, και 4) πακετάρονται μαζί κατά μήκος της έλικας, και η τέταρτη (η έλικα 1) απέναντι στις άλλες τρεις. Ανάμεσα στην έλικα 1 και 2 σχηματίζεται μια θηλιά η οποία περιέχει τα αμινοξέα της ένθεσης, τα οποία συμμετέχουν στην σύνδεση με το 20S όπως αποδείχθηκε με μεταλλαγές στην περιοχή αυτή. Το επταμερές σχηματίζει έναν δακτύλιο, με τις θηλιές να προεξέχουν. Ο

δακτύλιος εμφανίζει σχήμα κώνου, με την μια μεριά να αφήνει άνοιγμα 20Å, και η άλλη, προς τις θηλιές, 30Å.

Επειδή, όπως έδειξαν οι Realini *et al.*, (1997), τα ομο-ολιγομερή της REGa, λειτουργούν ισότιμα στην ενεργοποίηση του πρωτεασώματος με τα έτερο-ολιγομερή των REGa /REGβ, και οι δύο πρωτεΐνες, με βάση την ομολογία τους, μάλλον υιοθετούν παρόμοιες τριτοταγείς δομές, οι Knowlton *et al.*, (1997) προτείνουν ότι ο PA28, που αποτελείται από τις REGa και REGβ παρουσιάζει την ίδια δομή με αυτήν των επταμελών δαχτυλιδιών της REGa. Βασιζόμενοι σε αυτήν την ιδέα, οι Zhang *et al.*, (1998) προχώρησαν σε μελέτη της αλληλεπίδρασης PA28-πρωτεασώματος με μεταλλαγές των υπομονάδων του PA28 στις κρίσιμες περιοχές, δηλαδή στην θηλιά της ένθεσης, καθώς και στο C-τελικό άκρο, τα οποία, με βάση τη δομή της REGa είναι οι περιοχές αλληλεπίδρασης με το πρωτεάσωμα. Έδειξαν λοιπόν ότι και οι δύο υπομονάδες συμμετέχουν στην ενεργοποίηση του πρωτεασώματος, και αυτό γίνεται μέσω της θηλιάς της ένθεσης, την οποία ονόμασαν θηλιά ενεργοποίησης (activation loop). Αντίστοιχα, ελλείψεις στο C-τελικό άκρο, ενώ δεν επηρεάζουν τον σχηματισμό έτερο-ολιγομερών δεν επιτρέπουν την πρόσδεση στο πρωτεάσωμα. Προτείνουν λοιπόν ότι, τα C-τελικά άκρα προσδένονται στο πρωτεάσωμα, ενώ οι θηλιές ενεργοποίησης αλληλεπιδρούν με τα N-τελικά άκρα των α-υπομονάδων του πρωτεασώματος, ανοίγοντας έτσι την είσοδο του πρωτεολυτικού κυλίνδρου με συνέπεια την ενεργοποίηση της πρωτεόλυσης. Επίσης, με βάση τις σχετικές ενεργοποιητικές δράσεις ολιγομερών υβριδίων (σύμπλοκα με λειτουργική REGa και μεταλλαγμένη REGβ, και αντίστροφα), προτείνουν ότι η στοιχειομετρία στο σύμπλοκο του PA28 είναι τρεις REGa και τέσσερις REGβ υπομονάδες. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνονται και από τους Whitby *et al.*, (2000), οι οποίοι κατάφεραν να κρυσταλλώσουν σύμπλοκο του PA28 με το πρωτεάσωμα, και να αποδείξουν το παραπάνω σχήμα αλληλεπιδράσεων. Στην πραγματικότητα, επειδή οι Whitby *et al.*, (2000), δεν κατάφεραν να κρυσταλλώσουν 11S με 20S από τον ίδιο οργανισμό, χρησιμοποίησαν ένα άλλο σύμπλοκο, το PA26 από το *Trypanosoma brucei* (αναλύεται παρακάτω) το οποίο είναι σε θέση να ενεργοποιήσει απομονωμένο 20S από ποντικό.

Ο PA28, ο οποίος έχει συνδεθεί και με την παρουσίαση αντιγόνων (αμέσως παρακάτω), θεωρείτο αποκλειστικότητα των θηλαστικών, πράγμα που αναιρέθηκε από την εργασία των Yao *et al.*, (1999). Οι Yao *et al.*, (1999), μελετούσαν την ύπαρξη πρωτεασώματος στο πρωτόζωο *Trypanosoma brucei*, το οποίο και απομόνωσαν σε *in vitro* ενεργό μορφή, κάτι που έρχεται σε ασυμφωνία με τα μέχρι τώρα δεδομένα. Αναλύοντας τις υπομονάδες αυτού του συμπλόκου, παρατήρησαν ότι περιέχει μια επιπλέον, των ήδη γνωστών, υπομονάδα, την οποία θεώρησαν υπεύθυνη για την ενεργοποίηση που παρατηρούσαν. Ανάλυση της αλληλουχίας της πρωτεΐνης αυτής έδειξε ότι δεν παρουσιάζει παρά μόνο περιορισμένη ομολογία με τις REG α, β, και γ, του ανθρώπινου πρωτεασώματος. Ανασυνδυασμένη όμως, (μετά από έκφραση σε βακτήρια) σχηματίζει αυθόρμητα ομοπολυμερή δαχτυλίδια, που αποτελούνται από επτά μονομερή. Το σύμπλοκο που προκύπτει είναι σε θέση να ενεργοποιήσει απομονωμένο 20S από ποντικό, αλλά το PA28 του ποντικού δεν αλληλεπιδρά με το πρωτεάσωμα του *Trypanosoma brucei*. Αυτό δείχνει ότι ο PA26 είναι μάλλον προγονική μορφή του PA28, πράγμα που δικαιολογεί την χαμηλότερη εκλεκτικότητα του συμπλόκου.

3. Το πρωτεάσωμα και η παρουσίαση αντιγόνων

3.1 Σύσταση του 20S ανοσοπρωτεασώματος

Τα μόρια MHC τάξης I (class I Major Histocompatibility Complex molecules), αποτελούν την εσωτερική περιπολία του κυττάρου. Η παρουσία ιών, παρασίτων ή και

ανώμαλων πρωτεϊνών που συνοδεύουν την ογκογένεση προδίδεται από ολιγοπεπτίδια που παρουσιάζονται από τα μόρια αυτά. Τα πεπτίδια αυτά απαιτούν έναν πρωτεολυτικό σύστημα που πρέπει να είναι μη επιλεκτικό, γρήγορο και ακριβές. Μη επιλεκτικό γιατί πρέπει να δρα σε μεγάλο αριθμό διαφορετικών υποκαταστατών, γρήγορο γιατί η μόλυνση με παθογόνα δεν αφήνει μεγάλα χρονικά περιθώρια, και ακριβές γιατί τα πεπτίδια που ικανοποιούν τα μόρια MHC τάξης I είναι συγκεκριμένα όσον αφορά το μέγεθος και τα άκρα τους.

Τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του πρωτεασώματος, η πολλαπλή δηλαδή καταλυτική του δράση και η λεπτή ρύθμιση της λειτουργίας του το καθιστούν ιδανικό υποψήφιο μηχανισμό για την παραγωγή πεπτιδίων για παρουσίαση αντιγόνων. Δρα κυττοπλασματικά και σε άμεση γειτονία με το ενδοπλασματικό δίκτυο και τον πυρηνικό φάκελο (Enekel *et al.*, 1998, Palmer *et al.*, 1996), ενώ παράλληλα, τα αντιγονικά πεπτίδια που απαιτούνται από τα τάξης I MHC μόρια παρουσιάζουν κομμάτια από ενδογενείς πρωτεΐνες, όπως ιικές, που προέρχονται από το κυτταρόπλασμα. Αναλύοντας απομονωμένα σύμπλοκα σε πήκτωμα δύο διαστάσεων -2D, οι Yang *et al.*, (1992) παρατήρησαν ότι η σύσταση των υπομονάδων του πρωτεασώματος αλλάζει όταν τα κύτταρα επωάζονται με γ-ιντερφερόνη. Πέντε νέες υπομονάδες επάγονται από την γ-ιντερφερόνη, τέσσερις άλλες εξαφανίζονται, ενώ μία αυξάνεται σημαντικά.

Τα στοιχεία αυτά ενισχύονται από τους Michalek *et al.*, (1993), οι οποίοι συνέδεσαν την παρουσίαση αντιγόνων από τα μόρια MHC τάξης I με το πρωτεολυτικό μονοπάτι της ουβικιτίνης, που παραπέμπει σε δράση πρωτεασώματος (βλέπε Κεφ. Β, Παρ 3). Στην παραπάνω εργασία μελετάται η παρουσίαση αντιγόνων από πρωτεΐνη παραγόμενη ενδογενώς (μέσω του συστήματος των μορίων MHC τάξης I), και παρεχόμενη εξωγενώς, με ενδοκύττωση, (μέσω του συστήματος των μορίων MHC τάξης II), σε κύτταρα με ελλειπές σύστημα ουβικιτίνης (μεταλλαγμένο E1 ένζυμο, βλέπε ουβικιτίνη Κεφ. Β Παρ. 5). Τα κύτταρα αυτά δεν ήταν σε θέση να παρουσιάσουν αντιγόνα στην πρώτη περίπτωση, ενώ η δεύτερη που απαιτεί δράση λυσοσωματικών πρωτεασών διεξάγεται κανονικά. Στο ίδιο αποτέλεσμα κατέληξαν και οι Rock *et al.*, (1994) οι οποίοι, χρησιμοποιώντας αναστολείς (πεπτιδ-αλδεΐδες, LLnL, LLM) κατέστησαν το πρωτεάσωμα άμεσα, με στόχο να προσδιορίσουν τις πρωτεΐνες υποστρώματα του συστήματος. Εκτός των άλλων, η καταστολή του πρωτεασώματος είχε σαν συνέπεια την σημαντική ελάττωση παραγωγής πεπτιδίων-αντιγόνων, πράγμα που σημαίνει ότι το πρωτεάσωμα παίζει σημαντικό ρόλο στην παραγωγή αυτών των πεπτιδίων.

Σημαντικό επίσης είναι και το γεγονός ότι δυο υπομονάδες του πρωτεασώματος (LMP2, LMP7) κωδικοποιούνται στην περιοχή του MHC (Glynnne *et al.*, 1991, Kelly *et al.*, 1991, Martinez & Monaco 1991, Ortiz-Navarrete *et al.*, 1991). Οι Früh *et al.*, (1994) μάλιστα, έδειξαν ότι δύο από τις υπομονάδες που επάγονται από την γ-ιντερφερόνη, οι LMP2 και LMP7 (Low Molecular mass Polypeptide) αντικαθιστούν τις υπομονάδες X και Y αντίστοιχα (πίνακας ονοματολογίας). Η αντικατάσταση γίνεται στο στάδιο του σχηματισμού νέων πρωτεασωμάτων, όπου τα πρόδρομα μόρια των οι LMP2 και LMP7 παίρνουν την θέση των υπομονάδων X και Y, εμποδίζοντας την μετα-μεταφραστική τους ωρίμανση. Σε αυτή την περίπτωση, οι X και Y ανιχνεύονται ελεύθερες σε πρόδρομη μορφή. Με τον τρόπο αυτό το πρωτεάσωμα μετατρέπεται σε ανοσοπρωτεάσωμα. Οι LMP2, LMP7 καθώς και μια ακόμη υπομονάδα, η MECL1, που όμως δεν κωδικοποιείται από την περιοχή του MHC, (καταλυτικές υπομονάδες τύπου β) επάγονται από γ-ιντερφερόνη, ενώ οι αντίστοιχες X, Y, και Z, τις οποίες αντικαθιστούν καταστέλλονται από ιντερφερόνη (Akiyama K., *et al.*, 1994). Σύμφωνα με τους (Groettrup *et al.*, 1997) οι LMP2 και η MECL1 απαιτούν η μία την άλλη για να ενσωματωθούν στο πρωτεάσωμα, ενώ η LMP7 παρουσιάζεται μόνη της σε άλλο ανεξάρτητο γεγονός αντικατάστασης. Τα αποτελέσματα συμφωνούν με αυτά των Patel *et al.*, (1994) οι οποίοι χρησιμοποιώντας ειδικά αντισώματα για τις LMP2 και LMP7, απομόνωσαν δύο πληθυσμούς πρωτεασωμάτων, όπου υπάρχει είτε η μία είτε η άλλη, αλλά ποτέ και οι δύο μαζί σε ένα σύμπλοκο. Όπως αποδείχθηκε τελικά, η MECL1 απαιτεί την LMP2 για να

ενσωματωθεί στο πρωτεάσωμα, και οι πρόδρομες μορφές του συμπλόκου απαιτούν την LMP7 για αποτελεσματική ωρίμανση και σχηματισμό της τελικής ενεργού μορφής του ανοσοπρωτεασώματος (Tanaka 1998). Με βάση αυτά τα στοιχεία εξηγείται και το γεγονός ότι η MECL1 δεν χρειάζεται να κωδικοποιείται από την περιοχή του MHC. Με τον τρόπο αυτό τα κύτταρα εξασφαλίζουν τον σχηματισμό ομοιογενών ανοσοπρωτεασωμάτων μετά από επαγωγή με γ -ιντερφερόνη.

Η ενσωμάτωση των LMP2, LMP7, MECL1, στο πρωτεάσωμα αλλάζει τις πρωτεολυτικές του ιδιότητες ώστε να εξυπηρετεί την παραγωγή πεπτιδίων για αντιγόνα, δηλαδή περιορίζεται η δράση τρυψίνης και ενισχύεται η δράση χυμοθρυψίνης η οποία παράγει πεπτίδια με υδρόφοβα C-τελικά άκρα, (Driscoll *et al.*, 1993), με διακλαδισμένες ή αρωματικές πλαϊνές αλυσίδες, ή βασικά C-τελικά άκρα (πρόσφατη ανασκόπηση Tanaka & Tsurumi 1997, Orłowski & Wilk 2000).

Η συμβολή του πρωτεασώματος στην παραγωγή αντιγόνων προσφέρει ένα ελκυστικό μοντέλο επεξήγησης πολλών πειραματικών δεδομένων, που όμως περιέχουν ακόμη πολλά αναπάντητα ερωτήματα και δεδομένου ότι προέρχονται από *in vitro* μελέτες, πιθανόν να περιέχουν δεδομένα που δεν ισχύουν επακριβώς *in vivo*. Τα πεπτίδια που επιλέγονται από τα μόρια MHC τάξης I είναι συνήθως οκτα- ή εννια-πεπτίδια με συγκεκριμένα άκρα, και προέρχονται από νέο-συντιθέμενες πρωτεΐνες (πρόσφατη ανασκόπηση Yewdel *et al.* 2001). Είναι γνωστό ότι πολλά αντιγόνα συνεχίζουν να παράγονται ακόμη και όταν χρησιμοποιούνται καταστολείς πρωτεασώματος. Επίσης τα πρωτεασώματα είναι ικανά να παράγουν σωστά C-άκρα (συνήθως υδρόφοβα, δράση χυμοθρυψίνης) αλλά όχι και σωστά N-άκρα, για τα οποία απαιτείται «ψαλίδισμα» από συνεργαζόμενες εξωπεπτιδάσες, όπως πχ μια αμινοπεπτιδάση λευκίνης η οποία επάγεται από γ -ιντερφερόνη. Όσο για το μέγεθος και την ποιότητα των προϊόντων οι Kisselev *et al.*, (1999) έδειξαν ότι λιγότερο από το 15% των προϊόντων πέψης από τα πρωτεασώματα έχουν κατάλληλο μέγεθος, ενώ τα 2/3 είναι πολύ μικρότερα (2-3 aa) από αυτό που απαιτείται για την παρουσίαση αντιγόνων. Ακόμη, χρησιμοποιώντας διαφορετικές πρωτεΐνες, που περιέχουν όμως τις ίδιες «θέσεις πρωτεόλυσης», παίρνουν διαφορετικό σχήμα προϊόντων το οποίο δεν αλλάζει ακόμη και αν ανασταλεί η δράση τρυψίνης ή χρησιμοποιηθεί αρχαίο πρωτεάσωμα. Οι Kisselev *et al.*, (1999) προτείνουν ότι η πρωτεόλυση συνεχίζεται μέχρις ότου τα παραγόμενα κομμάτια είναι αρκετά μικρά να διαχυθούν έξω από το πρωτεάσωμα, και πιθανόν εδώ βρίσκεται η συμβολή ενός άλλου συμπλόκου, του PA28 που επάγεται επίσης από γ -ιντερφερόνη, και ενεργοποιεί το 20S πρωτεάσωμα προς την παραγωγή αντισωμάτων (βλέπε Κεφ. Β, Παρ 3).

Συνδυάζοντας όλα αυτά τα στοιχεία καταλήγει κανείς στο συμπέρασμα ότι πράγματι το πρωτεάσωμα σε συνεργασία με άλλα σύμπλοκα (PA28, PA700), και άλλους κυτταρικούς παράγοντες συντελεί σημαντικά στην παρουσίαση αντιγόνων, αλλά δεν είναι η μόνη δυνατή επιλογή.

3.2 PA28, και τα ανοσοπρωτεασώματα.

Ο PA28, λειτουργεί παράλληλα με το 19S στα κύτταρα, σε συνεργασία με το 20S πρωτεάσωμα, με δυο βασικές διαφορές: πρώτον δεν χρειάζεται ATP για να ενεργοποιήσει το πρωτεάσωμα *in vitro*, δεύτερον, οι υπομονάδες του επάγονται από γ -ιντερφερόνη (ανασκόπηση Ciechanover & Schwartz 1998). Δεν ήταν λοιπόν ατυχής η σκέψη ότι το PA28 συμμετέχει στην παρουσίαση αντιγόνων από τα μόρια MHC τάξης I. Με βάση την επίδραση του συμπλόκου στις λειτουργίες του πρωτεασώματος, προτείνεται ότι ο PA28 μετατρέπει το πρωτεάσωμα σε ανοσοπρωτεάσωμα (βλέπε ανοσοπρωτεασώματα Κεφ Β Παρ 3.1). Τα μέχρι τώρα δεδομένα για την σχέση πρωτεασώματος με την παρουσίαση αντιγόνων δεν μπορούν να συμπεριληφθούν σε ένα γενικό μοντέλο δράσης. Αντιγονικά πεπτίδια προέρχονται από

ουβικιτινιλιωμένες πρωτεΐνες, κάτι που εμπλέκει το 19S στην διαδικασία, αλλά και από μη τροποποιημένες. Οι χαρακτηριστικές ιδιότητες των πεπτιδίων που επιλέγονται για παρουσίαση αντιγόνων (μέγεθος και συγκεκριμένα άκρα) απαιτούν ειδικές ρυθμίσεις της πρωτεολυτικής λειτουργίας του πρωτεασώματος ώστε να είναι σε θέση να παράγει κατάλληλα προϊόντα. Αρχικά, πρέπει να ενισχυθεί η δράση χυμοθρυψίνης (υδρόφοβα C-τελικά άκρα) και να περιοριστούν οι άλλες, που μάλλον επιτυγχάνεται με αντικατάσταση των καταλυτικών β-υπομονάδων από τις LMP2, LMP7 και MECL1. Παραμένει η απαίτηση των μορίων MHC τάξης I για πεπτίδια 8-9 αμινοξέων, ενώ από τα μέχρι τώρα δεδομένα, τα προϊόντα του πρωτεασώματος είναι μικρότερα (Kisselev *et al.*, 1999). Αρχικά προτάθηκε ότι η ρύθμιση των προϊόντων της υδρόλυσης γίνεται μέσω του PA28, αλλά απομονωμένα 11S-20S-11S σύμπλοκα είναι πρωτεολυτικά ανενεργά απέναντι ακόμη και σε αποδιαταγμένες ή ουβικιτινιλιωμένες πρωτεΐνες, και σε καμία περίπτωση δεν εξηγούν την παρουσίαση αντιγόνων από τις τελευταίες. Μελέτες που έγιναν σε σύστημα μετάφρασης, το σύμπλοκο 11S-20S-11S μπορεί να «ψαλιδίσει» αποτελεσματικά μεγαλύτερα πεπτίδια, (με πρόσθετες αλληλουχίες και στα δύο άκρα), ώστε να παράγει αντιγονικά πεπτίδια που να ικανοποιούν τα μόρια MHC τάξης I (Ciechanover & Schwartz 1998), οπότε προτάθηκε ότι πιθανόν δρουν σε συνεργασία με την 26S και μετά από αυτήν. Η απάντηση στις ερωτήσεις αυτές βρίσκεται πιθανόν στην εργασία των Tanahashi *et al.*, (2000), οι οποίοι απομόνωσαν με ανοσοκαθίζηση χρησιμοποιώντας ειδικά αντισώματα για το καθένα, σύμπλοκα τα οποία περιέχουν τα τρία υπό συζήτηση υποσύμπλοκα, δηλαδή το 20S, το 19S και το 11S, από συκώτι ποντικού. Σύμφωνα με την παραπάνω εργασία, ο PA28 βρίσκεται ενωμένος με το 20S σε δύο πληθυσμούς συμπλόκων: 11S-20S-11S, και 19S-20S-11S, και ονόμασαν τα τελευταία υβριδικά πρωτεασώματα (hybrid proteasomes), τα οποία αποτελούν το 25% των συνολικών ενεργών συμπλόκων. Έδειξαν ότι, αν και τα υβριδικά πρωτεασώματα είναι λιγότερο ενεργά από την 26S (19S-20S-19S), είναι σε θέση να πρωτεολύσουν την καρβοξυλάση της ορνιθίνης (ODC) (που είναι η μόνη γνωστή περίπτωση πρωτεόλυσης από την 26S χωρίς να είναι ουβικιτινιλιωμένη προηγουμένως) *in vitro*, και παράλληλα, η πρωτεόλυση της ODC επιταχύνεται κατά 50% σε εκχύλισμα κυττάρων που έχουν εκτεθεί σε γ-ιντερφερόνη.

Όλα αυτά τα στοιχεία οδηγούν στο παρακάτω μοντέλο: ο PA28 δεν είναι σε θέση από μόνος του να προσελκύσει στο καταλυτικό 20S πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες επιλέγονται και δεσμεύονται μέσω του 19S, και υδrolύονται είτε τελείως από το σύμπλοκο της 26S, είτε μερικά (όπως στην περίπτωση του IκΒα). Η πρόσδεση του 19S στα υβριδικά πρωτεασώματα πιθανόν εξυπηρετεί αυτόν τον σκοπό, της προσέλκυσης και δέσμευσης των υποκαταστατών στο σύμπλοκο στο οποίο συμμετέχει. Η πρόσδεση του PA28 από την άλλη, είναι πιθανόν να λειτουργεί είτε σαν ρυθμιστής των πρωτεολυτικών ιδιοτήτων του πρωτεασώματος, είτε να διευκολύνει την διάχυση (Kisselev *et al.*, 1999) και συνεπώς την διαφυγή των προϊόντων από τον καταλυτικό κύλινδρο επιτρέποντας την παραγωγή μεγαλύτερων πεπτιδίων προς παρουσίαση αντιγόνων.

4. Το πρωτεάσωμα: τελική και μοναδική επιλογή;

Το πρωτεάσωμα αποτελεί τον μοναδικό εξωλυσοσωματικό πρωτεολυτικό δρόμο στα κύτταρα κάτι που το κάνει σημαντικότερο βιολογικό εργαλείο. Στα περισσότερα βιολογικά συστήματα, η σημασία ενός εργαλείου στην φυσιολογία των κυττάρων μελετάται κυρίως από τις συνέπειες της έλλειψής του. Πολλά από τα στοιχεία για την λειτουργία του πρωτεασώματος έχουν προκύψει με τον τρόπο αυτό, καταστέλλοντας άλλοτε εκλεκτικά την λειτουργία κάποιων υπομονάδων (Rubin *et al.*, 1998), άλλοτε αναστέλλοντας συνολικά την δράση του ενζύμου με αναστολείς των πρωτεολυτικών κέντρων (Rock *et al.*, 1994). Από τέτοιου είδους πειράματα εντοπίστηκε η σχέση του πρωτεασώματος με το σύστημα της ουβικιτίνης, την παραγωγή αντισωμάτων, τον ποιοτικό έλεγχο των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών και την ρύθμιση λειτουργιών όπως ο κυτταρικός κύκλος και η διόρθωση του DNA (βλέπε παραπάνω). Έλλειψη λοιπόν ενός εργαλείου που συμμετέχει σε όλες αυτές τις διαδικασίες δεν μπορεί παρά να έχει δραματικές συνέπειες για το κύτταρο και συνήθως προκαλεί τον θάνατό του.

Οι Glas *et al.*, (παραπομπή από το Yao *et al.*, 1999) προσπάθησαν να εκτιμήσουν το μέγεθος της ζημιάς από την απώλεια της λειτουργίας των πρωτεασωμάτων σε λεμφοκύτταρα EL-4 καταστέλλοντας το πρωτεάσωμα με αναστολέα ο οποίος τροποποιεί μη αντιστρεπτά τα καταλυτικά κέντρα. Προς έκπληξή τους, ένα μικρό μέρος των κυττάρων επιβίωσε κάτω από αυτές τις συνθήκες, με συχνότητα η οποία δεν μπορούσε να αποδοθεί σε μεταλλαγή και ανθεκτικότητα στον αναστολέα. Τα κύτταρα αυτά σχηματίζουν πρωτεασώματα τα οποία όμως είναι ανενεργά. Υπάρχει λοιπόν και άλλος πρωτεολυτικός μηχανισμός που μπορεί να αντικαταστήσει το πρωτεάσωμα ώστε τα κύτταρα να επιβιώνουν και να πολλαπλασιάζονται στηριζόμενα σε αυτόν, όμως ποιος είναι ο μηχανισμός αυτός που επιδεικνύει την εκλεκτικότητα, ειδίκευση και υψηλή ρύθμιση του πρωτεασώματος;

Η απάντηση στο παραπάνω ερώτημα έρχεται πάλι από το βακτήριο *Thermoplasma acidophilum*. Στο βακτήριο αυτό λειτουργεί ο μηχανισμός του πρωτεασώματος (Puhler *et al.*, 1994), αλλά σε αντίθεση με τα ευκαρυωτικά κύτταρα δεν είναι απαραίτητο για την βιωσιμότητα του κυττάρου υπο κανονικές συνθήκες, απαιτείται αυστηρά κάτω από συνθήκες στρες. Αναζητώντας σύμπλοκα που να ρυθμίζουν την λειτουργία του πρωτεασώματος (ανάλογα με τον PA700) οι Tamura *et al.*, (1998) σκόνταψαν πάνω σε μια γιγαντιαία πρωτεάση την οποία ονόμασαν τρίκοχη (tricorn, TRI) λόγω σχήματος, η οποία καλύπτει την έλλειψη πρωτεασώματος. Η πρωτεΐνη TRI, 120kDa περίπου, σχηματίζει διμερή τα οποία συνδέονται σε ένα εξαμερές σωματίδιο με προεξοχές (toroid) στο εσωτερικό του οποίου σχηματίζεται μια κοιλότητα 10nm x 4.3nm και ανοίγματα 2.6nm. Η έκπληξη όμως ήταν το γεγονός ότι τα εξαμερή αυτά πολυμερίζονται περαιτέρω και 20 από αυτά σχηματίζουν ένα εικοσαεδρικό καψίδιο 14.6MDa με μια κοιλότητα στο εσωτερικό του διαμέτρου 37nm, ικανή να στεγάσει ένα ολόκληρο ριβόσωμα. Για να σχηματισθεί το τελευταίο σύμπλοκο απαιτείται η δράση τριών παραγόντων των F1, F2 και F3. Ο F1 είναι ιμινοπεπτιδάση ομόλογα της οποίας εντοπίζονται σε βακτήρια και ευκαρυωτικά κύτταρα, ενώ οι F2 και F3 είναι αμινοπεπτιδάσες που παρουσιάζουν αρκετή ομολογία μεταξύ τους και ομόλογα των οποίων βρίσκονται σε ζύμη. Η F1 απομακρύνει κατάλοιπα προλίνης, η F2 βασικά αμινοξέα και η F3 όξινα.

Οι Tamura *et al.*, (1998) προτείνουν ότι η πρωτεάση TRI δρα σε συνεργασία με το πρωτεάσωμα και μετά από αυτό. Το πρωτεάσωμα κόβει τις πρωτεΐνες σε ολιγοπεπτίδια τα οποία παραλαμβάνονται από την TRI η οποία τα ελαττώνει σε δι- ή τριπεπτίδια τα οποία υδrolύονται από τις τρεις αμινοπεπτιδάσες F1, F2, και F3 σε αμινοξέα.

Μια παρόμοια γιγαντιαία πρωτεάση εντοπίστηκε από τους Glas *et al.*, (Yao *et al.*, 1999) στα λεμφοκύτταρα EL-4 που επιβίωσαν από την πλήρη καταστολή των πρωτεασωμάτων. Τα κύτταρα αυτά παρουσίασαν δραματική αύξηση των επιπέδων της δράσης

χυμοθρυψίνης, η οποία εκλούεται πολύ νωρίτερα από το πρωτεάσωμα. Αναστολείς της πρωτεάσης TRI παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των κυττάρων αυτών ενώ δεν έχουν καμιά επίδραση σε κύτταρα με φυσιολογικό πρωτεάσωμα. Αργότερα, οι Niedermann *et al.*, (αί (Yao *et al.*, 1999) έδειξαν ότι αυτό που καταστέλλεται από τον αναστολέα της TRI στα κύτταρα αυτά είναι μια γιγαντιαία πρωτεάση η τριπεπτιδουλ- πεπτιδάση TRPII, μια πρωτεάση σερίνης που απομακρύνει N-τελικά τριπεπτίδια από ελεύθερα N-άκρα. Και αυτή, όμοια με την TRI σχηματίζει υπερμόρια με ομοπολυμερισμό που σχηματίζουν ένα σωματίδιο σαν ραβδί-κύλινδρο με εσωτερικό κανάλι μήκους περίπου 52nm.

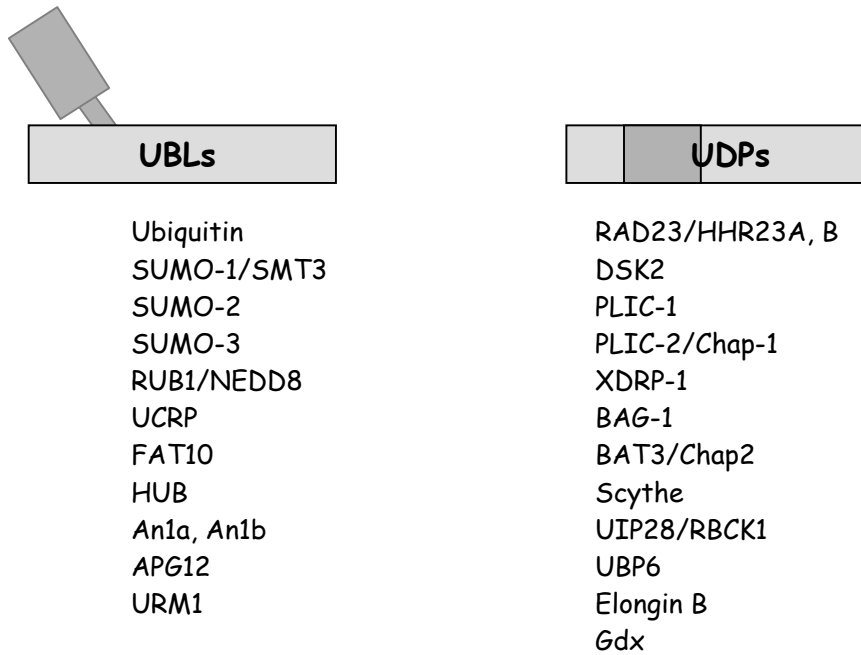
Μια τρίτη γιγαντιαία πρωτεάση 4Mda εντοπίστηκε σε ζύμη και ονομάστηκε πολύκοχη (multicore) επίσης λόγω σχήματος του σωματιδίου.

Τα στοιχεία για τις γιγαντιαίες πρωτεάσες παρουσιάζουν ένα κοινό χαρακτηριστικό: προκύπτουν από πολυμερισμό μικρών πρωτεασών. Ο σχηματισμός του πολυμερούς ρυθμίζει και τροποποιεί την δράση των πρωτεασών αυτών ανάλογα με τις ανάγκες του κυττάρου. Για να αντικαταστήσουν όμως την δράση του πρωτεασώματος πρέπει να έχουν εκλεκτικότητα και ρύθμιση. Το γεγονός ότι στα λεμφοκύτταρα EL-4 των Glas *et al.*, (Yao *et al.*, 1999) δεν παρατηρήθηκε συσσώρευση πολύ-ουβικιτινιωμένων πρωτεϊνών σημαίνει ότι τουλάχιστον κάποιες πρωτεΐνες του συστήματος ουβικιτίνη/πρωτεάσωμα διοχετεύονται στην νέα πρωτεάση (ανασκόπηση Yao *et al.*, 1998).

5. Η ουβικιτίνη και οι συγγενείς πεπτιδικές αλυσίδες

Θεωρείται πλέον δεδομένο ότι οι διάφορες διαδικασίες που ρυθμίζουν την ομοιοστάση, την ανάπτυξη και την διαφοροποίηση των κυττάρων, εκτελούνται από μια επίλεκτη ομάδα ρυθμιστικών παραγόντων, οι οποίοι με την σειρά τους ελέγχονται και αυτοί. Αρχικά θεωρήθηκε ότι ελέγχονται κυρίως στο επίπεδο της μεταγραφής των γονιδίων τους, όμως τώρα είναι γενικά αποδεκτό, ότι οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις μπορεί να είναι εξ' ίσου σημαντικές όσον αφορά τον έλεγχο των επιπέδων, ή/και της ενεργότητας των παραγόντων αυτών στα κύτταρα. Παράδειγμα τέτοιων τροποποιήσεων αποτελούν η φωσφορυλίωση, η μεθυλίωση, η ακετυλίωση κ.ά. Τελευταία, στον κατάλογο αυτό προστέθηκαν και οι πεπτιδικές ετικέτες (peptide tags) (ανασκόπηση, Viestra & Callis 1999, Jentsch & Pyrowolakis, 2000), οι οποίες, αντιστρεπτά ή μη, επηρεάζουν την λειτουργία, την θέση, και/ή την ανακύκλωση πολυάριθμων ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών. Η πρώτη τέτοια ετικέτα που ταυτοποιήθηκε ήταν η ουβικιτίνη, ένα πολυπεπτιδίο 76 αμινοξέων, απαραίτητο για την ATP-εξαρτώμενη αποδόμηση πρωτεϊνών. Δεν υπάρχει ουβικιτίνη ή κάτι παρόμοιο σε προκαρυωτικά κύτταρα. Το σύστημα αυτό εξελίχθηκε για να εξυπηρετήσει ανάγκες ευκαρυωτικών οργανισμών.

Εκτός της ουβικιτίνης, τα κύτταρα περιέχουν και άλλες παρόμοιες ολιγοπεπτιδικές αλυσίδες για τις οποίες όμως λίγα είναι γνωστά. Οι περισσότερες από αυτές βρέθηκαν λόγω της αυξημένης ομολογίας τους με την ουβικιτίνη, και ονομάστηκαν «τύπου ουβικιτίνης» (ubiquitin-like proteins), αλλά εκτελούν διαφορετικές λειτουργίες. Οι πρωτεΐνες τύπου ουβικιτίνης χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: Οι πρωτεΐνες της πρώτης κατηγορίας είναι πολυπεπτίδια παρόμοια με την ουβικιτίνη που απαντούν ελεύθερα, ή, με την δράση κατάλληλων ενζύμων, προσδένονται σε πρωτεΐνες "στόχους" με το C-τελικό τους άκρο, και λέγονται μετατροπείς τύπου ουβικιτίνης UBLs (Ubiquitin-like modifiers). Οι πρωτεΐνες της δεύτερης κατηγορίας είναι πρωτεΐνες που περιέχουν περιοχή με δομή ουβικιτίνης και δεν έχουν καμία άλλη σχέση εκτός της περιοχής αυτής. Οι πρωτεΐνες αυτές λέγονται πρωτεΐνες περιοχής ουβικιτίνης, UDPs (ubiquitin-domain proteins).



5.1 UDPs

Οι UDPs είναι μια, δομικά και λειτουργικά, ετερογενής ομάδα πρωτεϊνών με μόνο κοινό χαρακτηριστικό την ομόλογη στην ουβικιτίνη περιοχή που περιέχουν. Αν και ελάχιστα είναι γνωστά για τα μέλη αυτής της ομάδας, εκτός του ότι ανήκουν σε αυτή, φαίνεται ότι αυτό που παίζει κυρίαρχο ρόλο στη λειτουργία τους είναι αυτή η τριτοταγής δομή ουβικιτίνης (δίπλωμα ουβικιτίνης, ubiquitin fold) που περιέχουν, δεδομένου ότι οι δραστηριότητες της πρωτεΐνης δεν αλλάζουν, αν αυτή η περιοχή αντικατασταθεί από την ίδια την ουβικιτίνη, τουλάχιστον στην περίπτωση της Rad23, η οποία είναι απαραίτητη για την διόρθωση του DNA, (Watkins, J. *et al.*, 1993).

Σε δύο περιπτώσεις, δυο ριβοσωμικές πρωτεΐνες, παράγονται σαν προϊόντα συγκόλλησης με ουβικιτίνη, αλλά η περιοχή αυτή απομακρύνεται αμέσως μετά την σύνθεση, απελευθερώνοντας τα ώριμα ενεργά προϊόντα (Viestra & Callis 1999). Στην περίπτωση αυτή προτείνεται ότι η περιοχή ουβικιτίνης διευκολύνει το δίπλωμα των πρωτεϊνών, ίσως σε συνεργασία με κάποιες τσαπερόνες, δεδομένου ότι η διαμόρφωση της ουβικιτίνης είναι εξαιρετικά σταθερή.

Στην περίπτωση της Rad23 (Watkins, J. *et al.*, 1993), υπάρχει φυσική αλληλεπίδραση με την 26S πρωτεάση (με τις SUG1/Rpt6 και Yta3/Rpt1) και προτείνεται ότι η διόρθωση του DNA (nucleotide excision repair) ρυθμίζεται με εκλεκτική απομάκρυνση παραγόντων από την 26S πρωτεάση (Lommel *et al.*, 2000). Αντίθετα, η XDRP1 (ομόλογος της Rad23 σε *Xenopus*) προσδένεται, μέσω της περιοχής ουβικιτίνης στην κυκλίνη A και παρεμποδίζει την αποδόμησή της από το 26S.

Πολλές από τις UDP παίζουν ενεργούς ρόλους στο σύστημα ουβικιτινιλίωσης, όπως η UBPR6 η οποία απομακρύνει ουβικιτίνη από πρωτεΐνες συζευγμένες με ουβικιτίνη.

Δεν είναι σίγουρο ότι όλες οι UDPs αλληλεπιδρούν με την 26S, για αρκετές όμως από αυτές, η περιοχή αυτή μοιάζει να λειτουργεί σαν ενδιάμεσος στην σύνδεση του μηχανισμού ουβικιτινιλίωσης με τις λειτουργίες της 26S πρωτεάσης. (ανασκόπηση Jentsch & Pyrowolakis 2000).

5.2 UBLs

Τρόκειται για ομάδα πρωτεϊνών με μεγάλη ομολογία με την ουβικιτίνη. Όλες οι UBL παράγονται σαν ανενεργά πρόδρομα μόρια, με C-τελικές προεκτάσεις που παρεμποδίζουν την προσκόλλησή τους σε άλλες πρωτεΐνες. Αυτές οι ουρές (απλά αμινοξέα ή και πολυπεπτίδια), απομακρύνονται γρήγορα με πρωτεόλυση από ειδικές πρωτεάσες, και απελευθερώνεται ο ενεργός τροποποιητής, με αυστηρά συντηρημένη C-τελική γλυκίνη σε όλες τις ενεργές UBL. Επίσης κοινό τους χαρακτηριστικό είναι ότι προσκολλώνται στην πρωτεΐνη στόχο τους, μέσω ενός ισοπεπτιδικού δεσμού ανάμεσα στην C-τελική γλυκίνη και στην ε-αμινομάδα μιας λυσίνης κοντά στο N-τελικό άκρο του στόχου. Η πρόσδεση αυτή οδηγεί, είτε σε μετακίνηση της πρωτεΐνης σε άλλο υποκυτταρικό χώρο, είτε σε ενεργοποίηση/ καταστολή /τροποποίηση της δράσης της, είτε σε αποδόμησή της.

Τα ενζυματικά βήματα που απαιτούνται για τον προσδιορισμό του στόχου και την πρόσδεσή τους σε αυτόν είναι επίσης παρόμοια. Χρησιμοποιούν άλλες ομάδες ενζύμων αλλά με τα ίδια βήματα, τα οποία είναι :

Βήμα 1: ενεργοποίηση του τροποποιητή από ένζυμο-ενεργοποιητή E1 (Ubiquitin activating enzyme UBA), το οποίο υδρολύει ATP και σχηματίζει ενεργό σύμπλοκο με τον τροποποιητή.

Βήμα 2: Ο τροποποιητής μετακινείται σε ένα, από πολλά, δεύτερο ένζυμο, το E2 (Ubiquitin conjugating enzyme UBC), σχηματίζοντας έναν παρόμοιο δεσμό.

Βήμα 3: Το E2-Ub, είτε μεταφέρει απ' ευθείας τον τροποποιητή στον στόχο, είτε προσελκύει ένα τρίτο ένζυμο το E3 (σύμπλοκο) (Ubiquitin - ligase), το οποίο επιλέγει τον στόχο και μετακινεί τον τροποποιητή από το E2 στην πρωτεΐνη στόχο.

Και τα E2, και τα E3 παίζουν ρόλο επιλογέα όσον αφορά το ποιες πρωτεΐνες θα τροποποιηθούν τελικά. Μόνο για την ουβικιτίνη έχουν εντοπισθεί E3 σύμπλοκα, ενώ για τις υπόλοιπες έχουν εντοπισθεί κάποια E2 μόνο. Μία δεύτερη διαφορά των υπολοίπων από την ουβικιτίνη είναι, ότι το E1 για την τελευταία είναι ένα μονομερές ένζυμο, (UBA1), ενώ για τους άλλους τα E1 είναι διμερή δύο πρωτεϊνών, οι οποίες παρουσιάζουν η μία ομολογία με το N-τελικό μισό, και η άλλη με το C-τελικό μισό του UBA1. Επίσης, μόνο η ουβικιτίνη σχηματίζει ολιγομερείς αλυσίδες πάνω σε πρωτεΐνες, κάτι που απαιτεί την δράση ενός τετάρτου ενζύμου E4 (Koepl, M., *et al.*, 1999), ενώ οι άλλες απαντούν σαν μονομερή πρόσθετα σε πρωτεΐνες (ανασκόπηση Jentsch & Pyrowolakis 2000).

Από αυτά αναλύονται περαιτέρω τα SUMO, RUB, και η ουβικιτίνη που σχετίζονται με την 26S πρωτεάση.

5.3 SUMO (Small Ubiquitin-related Modifier)

Το SUMO (ή αλλιώς sentrin, UBL1, PIC1, SMT3, DAP1) είναι ένα πολυπεπτίδιο 93-115 αα με μόνο 19% ομοιότητα με την ουβικιτίνη και μεγαλύτερο, που όμως, όπως και το RUB, υιοθετεί σφαιρική τριτοταγή δομή όμοια με την ουβικιτίνη (δίπλωμα ουβικιτίνης), (Viestra & Callis 1999). Η συγκεκριμένη σφαιρική δομή είναι εξαιρετικά ανθεκτική σε μεγάλο αριθμό αποδιατακτικών παραγόντων. Το SUMO όμως είναι μεγαλύτερο, οπότε προεξέχει και η N-τελική άκρη. Η C-τελική γλυκίνη προεξέχει από την σφαιρική δομή, ακριβώς όπως στην ουβικιτίνη και το RUB. Το SUMO ταυτοποιήθηκε αρχικά κατά την διάρκεια μελέτης της

πρωτεΐνης του πυρηνικού πόρου σε ζύμη, της Ran GAP1. Προσδιορισμός της αλληλουχίας της πρωτεΐνης έδειξε ότι περιέχει όχι ένα, αλλά δύο N-τελικά άκρα, το δεύτερο ήταν από την διακλάδωση του SUMO. Η Ran GAP1 δρα σαν μοριακός διακόπτης στον πυρηνικό πόρο ελέγχοντας την πυρηνο-κυττοπλασματική επικοινωνία. Παρόμοιες αναλύσεις έδειξαν ότι το SUMO βρίσκεται προσκολλημένο σε διάφορες πρωτεΐνες, όπως στην πυρηνική πρωτεΐνη dot Sp100, στον υποδοχέα νέκρωσης όγκου, και στον ΙκΒα, τον αναστολέα του παράγοντα μεταγραφής NF-κΒ.

Ειδικά για τον τελευταίο, μεγάλο μέρος του μηχανισμού ελέγχου έχει αποκαλυφθεί. Ο ΙκΒα και ο NF-κΒ παράγονται σαν ανενεργά πρόδρομα μόρια, και ενεργοποιούνται με μερική πρωτεόλυση από την 26S πρωτεάση. Αυτό είναι ίσως και το μοναδικό παράδειγμα, όπου κάποιες πρωτεΐνες δεν αποδομούνται πλήρως, αλλά μερικά μόνο από την 26S (Orion *et al.*, 2000). Τα ενεργά μόρια διμερίζονται, με αποτέλεσμα ο ΙκΒα να καλύπτει το σήμα μετακίνησης στον πυρήνα του NF-κΒ, οπότε αυτός παραμένει στο κυτταρόπλασμα. Με κατάλληλο ερέθισμα ενεργοποιείται η κινάση του ΙκΒα (IKK), η οποία φωσφορυλιώνει τον ΙκΒα. Η μετατροπή αυτή έχει σαν αποτέλεσμα την ουβικιτινίωση του ΙκΒα και την ακόλουθη αποδόμησή του από την 26S, οπότε απελευθερώνεται ο NF-κΒ, ο οποίος μετακινείται στον πυρήνα και επάγει την μεταγραφή σειράς γονιδίων συμπεριλαμβανομένου και του ΙκΒα. Επαγωγή του γονιδίου του ΙκΒα προκαλεί την παραγωγή νέων μορίων αναστολέα, το οποίος, παραγόμενος, θα δεσμεύσει τα NF-κΒ στο κυτταρόπλασμα. Η περίσσεια των ΙκΒα μορίων του κυτταροπλάσματος ακολουθεί δύο δρόμους : ή αποδομείται μέσω της 26S πρωτεάσης μετά από προσθήκη αλυσίδας ουβικιτινίων, ή εισέρχεται στον πυρήνα για να απομακρύνει τα NF-κΒ προς το κυτταρόπλασμα και να σταματήσει την ενεργοποίηση της μεταγραφής που προκλήθηκε. Για να γίνει το τελευταίο, ο ΙκΒα μετατρέπεται και πάλι, όχι όμως με ουβικιτίνη αλλά με SUMO, και μάλιστα αυτές οι δύο προσκολλήσεις γίνονται στην ίδια λυσίνη του ΙκΒα που πιθανόν είναι ανταγωνιστικές. Δηλαδή εδώ το σχήμα έχει ως εξής : ουβικιτίνη και αποδόμηση από την 26S πρωτεάση, ή SUMO και μετακίνηση στον πυρήνα. Σύμφωνα με τους Pando *et al.*, (2000), η απόφαση αυτή εξαρτάται από τη θέση φωσφορυλίωσης του ΙκΒα, που μάλλον γίνεται από διαφορετικές κινάσες σε κάθε περίπτωση.

Όσον αφορά την μερική πρωτεόλυση των προδρόμων μορίων από την 26S, φαίνεται ότι πάνω και στις δύο πρωτεΐνες υπάρχει κατάλληλο σήμα «αναστολής πρωτεόλυσης» (STOP processing signal), μια περιοχή δηλαδή πλούσια σε γλυκίνη με ακόλουθη όξινη περιοχή, που σταματά την 26S και απελευθερώνει την πρωτεΐνη (Orion *et al.*, 2000).

Οι στόχοι του SUMO είναι λιγότεροι από αυτούς της ουβικιτίνης, και το συμπέρασμα που βγαίνει από τα μέχρι σήμερα δεδομένα για τα SUMO είναι, ότι μάλλον συντελούν στην κυκλοφορία πρωτεϊνών, και ειδικότερα προς τον πυρήνα. Παράλληλα, και ενώ δεν φαίνεται να έχουν άμεση σχέση με την αποδόμηση πρωτεϊνών, συνεργάζονται με το σύστημα ουβικιτινίωσης.

5.4 RUB (Related to Ubiquitin),

Το RUB1 (ή NEDD8 neuronal precursor cell-expressed developmentally downregulated protein 8), είναι ένα πολυπεπτιδίο μήκους 76 αα που εμφανίζει 52-63% ομολογία με την ουβικιτίνη, και η τριτοταγής του δομή είναι ακριβώς ίδια με της ουβικιτίνης. Μάλιστα, σε φυτά υπάρχουν γονίδια που κωδικοποιούν το RUB σε σύντηξη με ουβικιτίνη, και με πρωτεόλυση απελευθερώνονται και οι δύο μετατροπείς σε ενεργό μορφή (Viestra & Callis 1999).

Το RUB1 προσκολλάται μόνο σε μικρό αριθμό πρωτεϊνών, όλες μέλη της οικογένειας των καλινών (cullins) (del Pozo *et al.*, 1999b, del Pozo *et al.*, 1999a). Όλες οι γνωστές πρωτεΐνες της οικογένειας αυτής είναι υπομονάδες των ενζύμων E3 τύπου SCF (SKP, CDC, F-box) (ή λιγάσες ουβικιτίνης). Τα σύμπλοκα αυτά είναι τετραμερή και αποτελούνται από την πρωτεΐνη SKP1, την cullin1 (γνωστή και ως CDC53 σε ζύμη), την Rbx/Roc1 (RING Finger protein) και μία πρωτεΐνη F-box η οποία κάνει την αναγνώριση και επιλογή των υποκαταστατών του συμπλόκου. Το σύμπλοκο παίρνει το όνομά του από την εκάστοτε F-box πρωτεΐνη που περιέχει. Παράδειγμα, το SCF^{β-TrCP}, το οποίο περιέχει την F-box πρωτεΐνη β-TrCP, η οποία προσελκύει στο σύμπλοκο τον φωσφορυλιωμένο Iκβα, την β-catenin, και την Vpu του HIV. Το E3 ένζυμο, μεταφέρει ουβικιτίνη από το E2~Ub στην πρωτεΐνη στόχο.

Η προσθήκη του RUB στον στόχο ακολουθεί τον ενζυματικό δρόμο της ουβικιτίνης, δηλαδή, ενεργοποίηση από ένζυμο E1, και μεταφορά σε ένζυμο E2. Σε αντίθεση με το E1 της ουβικιτίνης, το E1 για το RUB είναι ετεροδιμερές δύο πρωτεϊνών, από τις οποίες η μια είναι ομόλογη με το N-τελικό μισό του E1 της ουβικιτίνης και η άλλη με το C-τελικό μισό. Στα φυτά το E1 του RUB αποτελείται από τις πρωτεΐνες AXR1 και ECR1 (E1 carboxy-terminal region). Η AXR1 (auxin-resistant) απομονώθηκε από μεταλλαγμένα φυτά *A. thaliana*, που έδειχναν ελαττωμένη αντίδραση σε αυξίνη, πράγμα που τοποθετεί την πρωτεΐνη στο μονοπάτι μετάδοσης σημάτων της αυξίνης. Τελικά αποδείχθηκε ότι πρόκειται για υπομονάδα του συμπλόκου που ενεργοποιεί το RUB1.

Το RUB1 εντοπίζεται μόνο σε πρωτεΐνες που είναι συνδεδεμένες στο σύμπλοκο SCF, και προτείνεται ότι συντελεί στην σταθερότητα του συμπλόκου.

Μεταλλαγές στην AXR1 προκαλούν ποικίλες ανωμαλίες στις διαδικασίες που ρυθμίζονται από αυξίνη όπως: γεω- και φωτο- τροπισμό, ανάπτυξη ριζικού συστήματος και ριζιδίων, κυριαρχία του ακραίου μεριστώματος, σχηματισμός ταξιανθίας, επιμήκυνση υποκοτύλων, σχηματισμός πλάγιων ριζών και ανάπτυξη ιστού σε καλλιέργεια.

5.5 Η Ουβικιτίνη

Η ουβικιτίνη, ένα πολυπεπτίδιο μήκους 76 αμινοξέων, βρίσκεται σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα (εξ ου και το όνομά της), ελεύθερη, ή σαν διακλαδισμένη αλυσίδα σε πρωτεΐνες. Είναι καταπληκτικά συντηρημένη, η φυτική από τη ζωική διαφέρει σε τρία μόνο αμινοξέα, ενώ μόνο στην *A. thaliana* έχουν εντοπισθεί 28 γονίδια σε 11 διαφορετικές γενετικές θέσεις που κωδικοποιούν για την ίδια αμινοξική ακολουθία. Η ουβικιτίνη, όπως και οι άλλες παρόμοιες με αυτήν πρωτεΐνες (SUMO, RUB...), χρησιμοποιείται από τα κύτταρα για σήμανση πρωτεϊνών, όμως μόνο αυτή έχει την «άδεια να σκοτώνει». Η ουβικιτίνη έχει χαρακτηριστεί σαν επαναχρησιμοποιήσιμη ετικέτα για την αποδόμηση πρωτεϊνών (πρόσφατη ανασκόπηση Hershko & Ciechanover, 1998), και συνεχώς αυξάνουν τα παραδείγματα όπου σήμανση πρωτεϊνών με ουβικιτίνη σημαίνει την αποδόμησή τους. Αυτό μπορεί να συμβεί με δύο μεταβολικούς δρόμους: α) με ενδοκύτωση και αποδόμηση από το λυσόσωμα, β) με αποδόμηση μέσω της 26S πρωτεάσης. Η διαφορά τους βρίσκεται πρώτον στον τόπο αποδόμησης (το πρωτεάσωμα βρίσκεται παντού στο κύτταρο), δεύτερον στην ταχύτητα αποδόμησης που είναι μεγαλύτερη στην δεύτερη περίπτωση. Αυτά τα δύο χαρακτηριστικά τοποθετούν την αποδόμηση μέσω της 26S πρωτεάσης σε σημαντική θέση στη φυσιολογία των κυττάρων, αφού είναι σε θέση να ελέγχει γρήγορα και με ακρίβεια αποφάσεις όπως έλεγχος μοριακών διακοπών (κυτταρικός κύκλος), έλεγχος μετάδοσης σημάτων και έλεγχος της έκφρασης του γενετικού υλικού. Είναι γενικά αποδεκτό ότι πολλοί ρυθμιστικοί παράγοντες, καθώς και πολλές πρωτεΐνες με μικρή ημίσεια ζωή απομακρύνονται εκλεκτικά από το σύστημα ουβικιτίνης /πρωτεασώματος.

Η προσκόλληση ουβικιτίνης στις επιλεγμένες πρωτεΐνες γίνεται με μία σειρά από ATP-εξαρτώμενα βήματα, και η διαδικασία αρχίζει με την ενεργοποίηση της ουβικιτίνης από το ένζυμο E1 (UBA Ubiquitin Activating), το οποίο καταλύει τον σχηματισμό αδενυλικής ουβικιτίνης υδρολύοντας ATP. Κατόπιν, η ενεργοποιημένη ουβικιτίνη μεταφέρεται σε κάποια κυστεΐνη του E1 σχηματίζοντας κυστεΐνυλ-ουβικιτίνη. Στη συνέχεια το E1-Ub μεταφέρει την ουβικιτίνη σε κυστεΐνη ενός δεύτερου ενζύμου του E2 (UBC Ubiquitin Conjugating enzyme). Τα E2 είναι μια μεγάλη οικογένεια από πρωτεΐνες 25-35kDa που περιέχουν μια συντηρημένη κεντρική περιοχή όπου βρίσκεται η καταλυτική κυστεΐνη (Ανασκόπηση Hershko & Ciechanover 1998). Η μεταφορά της ουβικιτίνης από εκεί στην ε-αμινομάδα λυσίνης των πρωτεϊνών στόχων απαιτεί την δράση ενός τρίτου ενζύμου (ή συμπλόκου), του E3, ή αλλιώς λιγάση ουβικιτίνης (Ubiquitin ligases). Τα E3 είναι μια ετερόκλητη ομάδα πρωτεϊνών με περιορισμένη ομολογία μεταξύ τους, οπότε σε αντίθεση με τις άλλες δύο ομάδες, δεν είναι δυνατή η εύρεση πιθανών E3 ενζύμων αναλύοντας τις υπάρχουσες αλληλουχίες στις βάσεις δεδομένων. Εκτός της αλληλουχίας, τα E3 παρουσιάζουν και διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης που κάνει ακόμη δυσκολότερο τον εντοπισμό τους. Σε κάποιες περιπτώσεις, η ουβικιτίνη μεταφέρεται από το E2 σε κάποια κυστεΐνη του E3 και στην συνέχεια στην πρωτεΐνη στόχο, η οποία προσδένεται στο E3, ενώ σε άλλες, το E3 λειτουργεί σαν ενδιάμεσος στην μεταφορά ουβικιτίνης από το E2 στην πρωτεΐνη στόχο η οποία συνδέεται με το σύστημα μέσω κάποιου άλλου πρωτεϊνικού παράγοντα. Η εξειδίκευση του συστήματος της ουβικιτίνης και η εκλογή των στόχων γίνεται από τα E3 ένζυμα, ή από κατάλληλους συνδυασμούς E3/E2 ενζύμων.

Τα E3 ένζυμα που έχουν ταυτοποιηθεί μέχρι σήμερα ταξινομούνται σε τέσσερις κατηγορίες με βάση τον τρόπο αναγνώρισης και επιλογής του στόχου (ανασκόπηση, Callis and Viestra 2000):

A) Η πρώτη ομάδα είναι τα ένζυμα τύπου HECT (Homology to the E6-AP Carboxy-Terminus), από το πρώτο της ομάδας που προσδιορίστηκε, το E6-AP (E6-Associated protein) των θηλαστικών, το οποίο σε συνεργασία με την ογκοπρωτεΐνη E6 επάγουν την αποδόμηση της p53. Στην ομάδα αυτή κατατάσσονται πρωτεΐνες που περιέχουν στο κάρβοξυτελικό τους άκρο μια περιοχή 350 αμινοξέων περίπου ομόλογη στην αντίστοιχη του E6-AP, (πρωτεΐνες περιοχής *hect*), μεγάλες μονομερείς πρωτεΐνες που λειτουργούν σαν E3 ένζυμα, ή σαν μέλη συμπλόκων με δράση E3.

B) Η δεύτερη ομάδα, ένζυμα του μονοπατιού αποδόμησης με βάση τον κανόνα του N-τελικού αμινοξέος (N-end rule pathway), αντιπροσωπεύεται από την πρωτεΐνη Ubrp1 (Ubiquitin amino-terminal recognizing protein) της ζύμης η οποία επάγει εξειδικευμένα την αποδόμηση πρωτεϊνών που φέρουν συγκεκριμένα αμινοξέα στα N-τελικά τους άκρα, (βασικά (τύπου I) ή ογκώδη υδρόφοβα (τύπου II)), καθώς και πρωτεϊνών που δεν είναι σωστά διπλωμένες ή είναι N-α-ακετυλιωμένες..

Γ) Το APC/C σύμπλοκο (Anaphase Promoting complex/ cyclosome) σε ζύμη, αποτελείται από 8-12 υπομονάδες και απομακρύνει εκλεκτικά αναφασικούς αναστολείς, μιτωτικές κυκλίνες και παράγοντες της ατράκτου.

Δ) Η τέταρτη κατηγορία λιγασών ουβικιτίνης αποτελείται από τα σύμπλοκα τύπου SCF, από τα αρχικά των υπομονάδων, (σε ζύμη) που τα αποτελούν: Skp1 (suppressor of kinetochore protein 1), Cell-division cycle 53 (Cdc53, ή cullins) και μία ακόμη πρωτεΐνη F-box (από την πρώτη που βρέθηκε, την ανθρώπινη κυκλίνη F). Περιέχουν ακόμη και μια τέταρτη πρωτεΐνη την Roc1/Rbx1/Hrt1 (Regulator of cullins / RING-box protein 1 / high-level expression reduces γ 3 transposition 1). Η τελευταία περιέχει το μοτίβο RING-H2 το οποίο χρειάζεται για την αλληλεπίδραση με το κατάλληλο E2, ενώ η Skp1 συνδέει την Cdc53 με την F-box πρωτεΐνη μέσω της περιοχής F-box. Οι F-box πρωτεΐνες είναι υπεύθυνες για την αναγνώριση και επιλογή των υποκαταστατών μέσω μιας άλλης περιοχής τους πλούσιας σε λυσίνη, ή άλλα μοτίβα αλληλεπίδρασης με πρωτεΐνες. Αλλάζοντας την F-

box υπομονάδα, το σύμπλοκο SCF αλλάζει εξειδίκευση και στόχους: π.χ το SCF^{β-TrCP} (Orion *et al.*, 2000) αναγνωρίζει τον φωσφορυλιωμένο IκBa, ενώ το SCF^{TR1} αναγνωρίζει παράγοντες του δρόμου μετάδοσης σημάτων της αυξίνης (Ruegger *et al.* 1998, Gray *et al.*, 1999, ανασκόπηση del Pozo & Estelle 1999a).

Άλλα ένζυμα που συμμετέχουν στο μονοπάτι της ουβικιτίνης είναι οι υδρολάσες της ουβικιτίνης (UBPs Ubiquitin-specific hydrolases), οι οποίες υδρολύουν διάφορους δεσμούς ουβικιτίνης πριν ή μετά την υδρόλυση των υποκαταστατών. Τα ένζυμα αυτά αναγνωρίζουν αλυσίδες ουβικιτίνης που όμως παρουσιάζουν ελεύθερο C-τελικό άκρο κοντά ή πάνω στο μόριο της ουβικιτίνης. Η λειτουργία τους δεν είναι ακόμη γνωστή, αλλά, από γενετικές αναλύσεις αποδεικνύονται απαραίτητα για την *Arabidopsis* (Callis & Viestra 2000). Ελεύθερες τετραμερείς αλυσίδες ουβικιτίνης, πιθανά κατάλοιπα πρωτεόλυσης, δεσμεύονται στην 26S πρωτεάση αναστέλλοντας την δράση της, κάτι που κάνει αναγκαία την απομάκρυνσή τους από το περιβάλλον της πρωτεάσης, και ίσως εκεί βρίσκεται η συμβολή των ενζύμων αυτών. Επίσης, κάποιες φορές ο ρυθμός πρωτεόλυσης ρυθμίζεται από την διαθεσιμότητα της ελεύθερης ουβικιτίνης (κάτω από καταστάσεις στρες), οπότε, η ανακύκλωση της ουβικιτίνης είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την βιωσιμότητα του κυττάρου.

Τα γονίδια που συμμετέχουν στο μονοπάτι της ουβικιτίνης αποτελούν το 1.5% του συνολικού γενετικού υλικού σε ζύμη (Tanaka 1998).

Οι πρωτεΐνες που επιλέγονται και σημαίνονται με ουβικιτίνη, στις περισσότερες περιπτώσεις, αποστέλλονται στην 26S πρωτεάση προς αποδόμηση. Το ή τα σήματα που καθορίζουν ποιες πρωτεΐνες θα τροποποιηθούν δεν είναι ακόμη ξεκάθαρα. Έχουν αναγνωρισθεί τρεις κατηγορίες «σημάτων πρωτεόλυσης» (ανασκόπηση Laney & Hochstrasser 1999):

1) σήμα πρωτεόλυσης εξαρτώμενο από φωσφορυλίωση.

Σε πολλές περιπτώσεις οι πρωτεΐνες που πρόκειται να απομακρυνθούν επιλέγονται μετά από μια ακολουθία σημάτων που καταλήγει σε φωσφορυλίωση της επιλεγόμενης πρωτεΐνης όπως ο IκBa, και η β-κατενίνη. Μετά από εξαντλητική μελέτη της αλληλουχίας του IκBa που είναι υπεύθυνη για την φωσφορυλίωση και την ακόλουθη ουβικιτινίωση βρέθηκε ένα μοτίβο, το DSGLDS, το οποίο αναγνωρίζεται από το E3 που ουβικιτινιώνει τον IκBa. Το μοτίβο αυτό βρίσκεται και σε άλλες πρωτεΐνες μικρού χρόνου ημιζωής που αναγνωρίζονται μετά από φωσφορυλίωση. Μια από αυτές είναι και η Vpu του ιού HIV, η οποία όμως έχει διαβρώσει το σύστημα ώστε να διαφεύγει η ίδια της πρωτεόλυσης και να στρέφει το σύστημα προς τον υποδοχέα CD4, ώστε να αποφεύγεται η υπερμόλυνση.

2) Υδρόφοβες περιοχές στην επιφάνεια της πρωτεΐνης

Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν οι πρωτεΐνες της κυτταρικής ταυτότητας της ζύμης των γενετικών θέσεων *MATa* και *MATα*. Ανάλυση της αλληλουχίας των μεταγραφικών παραγόντων που ελέγχουν την έκφραση των θέσεων αυτών δεν απέδωσε ένα συγκεκριμένο μοτίβο, όμως η περιοχή που είναι υπεύθυνη για την αποδόμηση είναι ένα υδρόφοβο τμήμα στο N-τελικό άκρο των πρωτεϊνών αυτών. Οι υδρόφοβες περιοχές σπάνια εκτίθενται προς τον διαλύτη, συνήθως είναι παγιδευμένες σε μεμβράνες, ή στο εσωτερικό των πρωτεϊνών, ή συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις ανάμεσα σε πρωτεΐνες προς σχηματισμό συμπλόκων. Αναγνώριση των υδρόφοβων τμημάτων από το σύστημα της ουβικιτίνης είναι αναμενόμενη αφού έτσι αναγνωρίζονται μη σωστά διπλωμένες πρωτεΐνες, ή υπομονάδες συμπλόκων που δεν έχουν ενσωματωθεί και πρέπει να απομακρυνθούν.

3) Ο κανόνας του N-τελικού άκρου.

Είναι ίσως το απλούστερο σήμα για πρωτεόλυση. Με βάση τον κανόνα αυτόν η σταθερότητα μιας πρωτεΐνης εξαρτάται από το N-τελικό αμινοξύ της. Τα βασικά και ογκώδη υδρόφοβα αμινοξέα οδηγούν σε γρήγορη ουβικιτινίωση και ακόλουθα αποδόμηση. Πρόσφατα, βρέθηκε και ανάλογη αποσταθεροποίηση που οφείλεται σε περιοχή του κάρβοξυ-

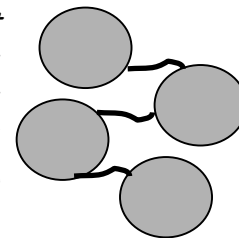
τελικού άκρου, ένα επαναλαμβανόμενο επταπεπτιδίο (SPTSPSY) στην μεγάλη υπομονάδα του συμπλόκου της RNA-πολυμεράσης II (Rpb1).

Το κοινό χαρακτηριστικό των τριών αυτών σημάτων αναγνώρισης είναι ότι είναι πολύ μικρά, ελάχιστα αμινοξέα (ακόμη και ένα μόνο) είναι ικανά σήματα για αναγνώριση από κάποιο E3, ίσως πολύ μικρά για να παρέχουν στο σύστημα την ακρίβεια με την οποία λειτουργεί. Όμως δεν φτάνει μόνο η αναγνώριση, τις περισσότερες φορές η ουβικιτινίωση γίνεται από συνδυασμούς E2/E3 ενζύμων που αλληλεπιδρούν με τον εκάστοτε υποκαταστάτη, όπου σημαντικό ρόλο παίζουν και άλλοι παράγοντες

Με το σύστημα της ουβικιτίνης αποδομούνται ανώμαλα διπλωμένες ή μη κανονικές πρωτεΐνες, αλλά και απόλυτα ενεργά μόρια που πρέπει να απομακρυνθούν ώστε να σταματήσει η δράση τους. Σε όλες όμως τις περιπτώσεις, το σήμα της αποδόμησης είναι μια αλυσίδα πολύ-ουβικιτίνης που αναγνωρίζεται από το ρυθμιστικό σωματίδιο της 26S (RP ή PA700, ή 19S). Οι αλυσίδες αυτές σχηματίζονται με διαδοχική σύνδεση μορίων ουβικιτίνης στο αρχικό, με έναν επίσης ισοπεπτιδικό δεσμό ανάμεσα στην C-τελική γλυκίνη και την ε-αμινομάδα της λυσίνης K48 (K48 → G76) (πρόσφατη ανασκόπηση Pickart 2000). Η αντίδραση αυτή καταλύεται από μια τέταρτη κατηγορία ενζύμων τα E4, τα οποία δημιουργούν αλυσίδες πάνω στο αρχικό μόριο ουβικιτίνης, (van Nocker *et al.*, 1996b).

Αυτό που σίγουρα ισχύει είναι ότι μια αλυσίδα ουβικιτίνης από την K48 αποτελεί σήμα για πρωτεόλυση από την 26S, καθώς επίσης και ότι η συγκόλληση ενός μόνο μορίου ουβικιτίνης δεν είναι αρκετή, πρέπει να είναι αλυσίδα ώστε να αναγνωριστεί από την 26S. Η σύνδεση των μονομερών μέσω ισοπεπτιδικού δεσμού ανάμεσα στην C-τελική γλυκίνη και την ε-αμινομάδα της λυσίνης 48 έχει σαν αποτέλεσμα τον σχηματισμό αλυσίδων με δομή ακορντεόν.

Ένα μόριο ουβικιτίνης δεν αποτελεί σήμα για την 26S, ενώ η αλυσίδα αποτελεί, και τούτο γιατί η αλυσίδα έχει διαφορετική τριτοταγή διαμόρφωση (Lam *et al.*, 1997). Η ειδοποιός δηλαδή διαφορά δεν είναι ο αριθμός των μονομερών αλλά η συγκεκριμένη διαμόρφωση που προκύπτει από την αλληλεπίδραση γειτονικών υπομονάδων. Οι Beal *et al.*, (1996) έδειξαν ότι αυτό που αναγνωρίζεται από την 26S είναι μια επαναλαμβανόμενη διάταξη υδρόφοβων αμινοξέων που προκύπτει στην επιφάνεια της αλυσίδας, και δεν απαντάται στο μονομερές της ουβικιτίνης.



Δεν είναι ακόμη ξεκάθαρο ποια ή ποιες πρωτεΐνες του ρυθμιστικού σωματιδίου 19S της 26S είναι υπεύθυνες για την αναγνώριση και την δέσμευση των αλυσίδων ουβικιτίνης. Η S5a (βλέπε υπομονάδες του 19S Κεφ Β Παρ 2.2), αναγνωρίζει αλυσίδες (όχι μονομερή) ουβικιτίνης, αλλά η έλλειψή της δεν προκαλεί δραματικές ανωμαλίες στην λειτουργία του συστήματος, οπότε πρέπει να υπάρχουν και άλλες πρωτεΐνες στο σύμπλοκο της 26S που βοηθούν στην αναγνώριση. Ένα άλλο ένζυμο του 19S, η Doa4, έχει δράση ισοπεπτιδάσης αφαιρώντας ουβικιτίνες από την άκρη της αλυσίδας προς την πρωτεΐνη, δηλαδή είναι σε θέση να αναγνωρίσει την μακρινή (distal) από την κοντινή (proximal) ουβικιτίνη. Οι Lam *et al.*, (1997) έδειξαν ότι ο αριθμός των μονομερών στην αλυσίδα επηρεάζει την διαμόρφωση του τελικού μονομερούς. Δηλαδή βρίσκουν, όπως και οι Beal *et al.*, (1996), ότι τα κρίσιμα αμινοξέα για την αλληλεπίδραση με την ισοπεπτιδάση της 26S είναι δύο υδρόφοβα αμινοξέα, η λευκίνη⁸ και η ισολευκίνη⁴⁴, τα οποία στο μονομερές και το διμερές της ουβικιτίνης στρέφονται προς το εσωτερικό της πρωτεΐνης. Σε αλυσίδες με περισσότερα μόρια ουβικιτίνης, λόγω αλληλεπίδρασης γειτονικών υπομονάδων, στα εσωτερικά μόρια της αλυσίδας, τα αμινοξέα αυτά στρέφονται προς τα μέσα, ενώ στο τελευταίο, τα αμινοξέα αυτά στρέφονται προς τα έξω, εμφανίζοντας στην επιφάνεια της τελευταίας ουβικιτίνης υδρόφοβες πλάγιες αλυσίδες. Αυτές οι αλυσίδες είναι το σήμα της ισοπεπτιδάσης. Αντίθετα, η δομή του μονομερούς και του διμερούς πιθανόν αποτελούν σήμα για άλλα ένζυμα που είτε

αφαιρούν την ουβικιτίνη και σώζουν την πρωτεΐνη, ή προσθέτουν και άλλα μονομερή ενισχύοντας έτσι το σήμα για πρωτεόλυση (π.χ τα E4 ένζυμα)

Για να μελετήσουν την συμπεριφορά της αλυσίδας σε σχέση με το μήκος της οι Thrower *et al.*, (2000) συνέθεσαν αλυσίδες διαφόρων μηκών (2, 4, 5, 8 ουβικιτίνες) συνδεδεμένες είτε απλά με λυσίνη, είτε με την αναγωγή του δεύδρο-φολικού οξέος (DHFR) που πρωτεολύεται από την 26S *in vivo*, και υπολόγισαν την χημική συγγένεια με την οποία προσδένονται στην 26S, καθώς και την ταχύτητα υδρόλυσης. Παρατήρησαν ότι η συγγένεια δεν αυξάνεται γραμμικά με το μήκος της αλυσίδας, και κάθε φορά εξαρτάται από την ίδια την αλυσίδα και όχι από το που είναι προσκολλημένη. Έδειξαν λοιπόν ότι αυτό που αναγνωρίζεται από την 26S είναι η αλυσίδα της ουβικιτίνης και όχι η πρωτεΐνη που την φέρει, οπότε η επιλογή των πρωτεϊνών που θα πρωτεολυθούν τελικά γίνεται από το σύστημα της ουβικιτίνης και όχι από την 26S πρωτεάση, που στην περίπτωση αυτή θα είχε πρόβλημα περιορισμού εξειδίκευσης, όπως οι αντίστοιχες βακτηριακές Clp και Lon (βλέπε ATP-εξαρτώμενες πρωτεάσες Κεφ. Β, Παρ 6).

Όσο για το βέλτιστο μήκος, από το 1^ο μέχρι το 3^ο μόριο ουβικιτίνης, η χημική συγγένεια της αλυσίδας με την 26S είναι πολύ χαμηλή, τέτοια που δεν δικαιολογεί πρόσδεση. Η προσθήκη του τέταρτου μορίου όμως αυξάνει την χημική συγγένεια 100 φορές περίπου. Δηλαδή τέσσερα μόρια ουβικιτίνης είναι το ελάχιστο ικανό μήκος της αλυσίδας για να οδηγήσει μια πρωτεΐνη στην 26S. Από εκεί και πάνω η συγγένεια δεν αυξάνεται σημαντικά. Οι Thrower *et al.*, (2000) προτείνουν ότι η τετραμερής αλυσίδα της ουβικιτίνης είναι εκείνη που αναγνωρίζεται και προσδένεται στο σύμπλοκο της 26S. Η ισοπεπτιδάση (UCH37, Doa4) του συμπλόκου απομακρύνει μόρια ουβικιτίνης από την άκρη της αλυσίδας, καταναλώνοντας τον ίδιο χρόνο για κάθε μόριο. Μόλις η αλυσίδα ουβικιτίνης φτάσει σε μήκος δύο, αυτόματα η συγγένεια πέφτει 100 φορές οπότε η πρωτεΐνη αποδεσμεύεται από το σύμπλοκο, ακόμη και αν δεν έχει επεξεργαστεί. Το μήκος της αλυσίδας λοιπόν λειτουργεί σαν ρολόι, δηλαδή όσο μεγαλύτερη η αλυσίδα τόσο μεγαλύτερος ο χρόνος παραμονής της πρωτεΐνης στο σύμπλοκο. Αλυσίδες μεγάλου μήκους αφήνουν χρόνο στο σύμπλοκο να ξεδιπλώσει την πρωτεΐνη, ή ακόμη να καλέσει σε βοήθεια κάποιον άλλο παράγοντα όπως μια τσαπερόνη να βοηθήσει στο ξετύλιγμα, όπως στην περίπτωση της VCP κατά την αποδόμηση του φωσφορυλιωμένου Iκβα (Dai *et al.*, 1998), ενώ ταυτόχρονα, μικρές αλυσίδες σώζουν την πρωτεΐνη από πρωτεόλυση.

Η ουβικιτίνη περιέχει επτά λυσίνες, από τις οποίες τρεις συμμετέχουν στον σχηματισμό αλυσίδων πάνω σε πρωτεΐνες στόχους με διαφορετικά αποτελέσματα κάθε φορά. Η αλυσίδα στην λυσίνη K48 οδηγεί τις πρωτεΐνες στο 26S και την αποδόμηση. Μεταλλαγή αυτής της λυσίνης στην ανενεργό αργινίνη προκαλεί θνησιγόνο φαινότυπο σε ζύμη (Pickart 2000). Όμως, εκτός της λυσίνης αυτής, αλυσίδες σχηματίζονται και μέσω της λυσίνης 29 και 63. Η K29 μπορεί επίσης να λειτουργήσει σαν σήμα για πρωτεόλυση, αλλά όχι και η K63. Μεταλλαγή αυτής της λυσίνης σε αργινίνη, σε ζύμη, ενώ δεν επηρεάζει καθόλου την συνολική αποδόμηση, προκαλεί ανωμαλίες στην μετα-μεταγραφική διόρθωση του DNA, την απάντηση σε στρες την ενδοκύττωση κάποιων μεμβρανικών πρωτεϊνών, και την λειτουργία των ριβοσωμάτων. Υπεύθυνα για την σύνθεση αλυσίδων ουβικιτίνης μέσω της λυσίνης 63 είναι μια ομάδα από ένζυμα όμοια με τα E2, τα οποία δεν περιέχουν την χαρακτηριστική λυσίνη στο ενεργό τους κέντρο. Οι πρωτεΐνες αυτές ονομάζονται παραλλαγές των ενζύμων συγκόλλησης ουβικιτίνης UEV (Ubiquitin-conjugating Enzyme Variant), και έχουν συνδεθεί με διαδικασίες όπως ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων, η διαφοροποίηση, και η καταστολή σχηματισμού όγκου. Οι Hoffmann & Pickart (1999), έδειξαν ότι μια τέτοια UEV πρωτεΐνη η Mms2p σχηματίζει ετεροδιμερές με την UBC-13 (ένα E2 ένζυμο) το οποίο σχηματίζει αλυσίδες ουβικιτίνης μέσω της λυσίνης 63, διαδικασία η οποία σχετίζεται με την μετα-αντιγραφική διόρθωση του DNA.

Η σήμανση πρωτεϊνών με ουβικιτίνη αποτελεί όχι ένα, αλλά ομάδα σημάτων. Προσθήκη ενός μόνο μορίου ουβικιτίνης αποστέλλει τις πρωτεΐνες στο λυσόσωμα, ενώ προσθήκη

αλυσίδων αποτελεί διαφορετικού τύπου σήμα ανάλογα με το μήκος και την θέση της αλυσίδας πάνω στην ουβικιτίνη.

6. ATP-εξαρτώμενες πρωτεάσες

Η κυτταροπλασματική πρωτεόλυση είναι μια ευαίσθητη και πιθανά επικίνδυνη διαδικασία, που όμως αποτελεί εργαλείο ζωτικής σημασίας για την φυσιολογική δραστηριότητα των κυττάρων. Σε αντίθεση με τις εξωπεπτιδάσες που δρουν αδιακρίτως, οι κυτταροπλασματικές πρωτεάσες πρέπει να επιδεικνύουν υψηλή εξειδίκευση, ώστε να αποφεύγεται η ανεπιθύμητη πρωτεόλυση λειτουργικών παραγόντων, διότι η απομάκρυνση ενός πρωτεϊνικού παράγοντα είναι διαδικασία μη αντιστρέψιμη, και συνήθως αποτελεί το τελευταίο βήμα μιας σειράς γεγονότων που αποφασίζουν τελικά την καταστροφή του. Τα ένζυμα αυτά πρέπει να είναι σε θέση να επιλέγουν ανάμεσα σε πληθώρα πρωτεϊνικών παραγόντων, τους υποκαταστάτες τους, οι οποίοι μπορεί να είναι ανώμαλα προϊόντα μετάφρασης, αλλά και απόλυτα λειτουργικές πρωτεΐνες που πρέπει να απομακρυνθούν γρήγορα και με ακρίβεια όταν η λειτουργία τους δεν είναι πια επιθυμητή.

Για να μπορέσει λοιπόν το κύτταρο να θέσει σε λειτουργία έναν τέτοιο αυστηρό μηχανισμό επιλογής των προς αποδόμηση πρωτεϊνών, «επένδυσε» ενέργεια στην πρωτεόλυση, η οποία είναι κανονικά μια εξεργονική διαδικασία, προσθέτοντας στο σύστημα ATPάσες, οι οποίες ελέγχουν την δραστηριότητα των πρωτεασών (Goldberg 1992).

Στα προκαρυωτικά κύτταρα, που δεν διαθέτουν εσωτερικές μεμβράνες, η πρωτεόλυση γίνεται στο κυτταρόπλασμα από ATP-εξαρτώμενες πρωτεάσες, οι οποίες παρουσιάζουν τα ίδια γενικά χαρακτηριστικά.

- Το πρωτεολυτικό σωματίδιο αποτελείται από μια πρωτεάση μικρού μοριακού βάρους, η οποία σχηματίζει επταμελή ή εξαμελή δαχτυλίδια που διμεριζόμενα σχηματίζουν κυλίνδρους με πολλαπλά ενεργά κέντρα στο εσωτερικό τους. Με τον τρόπο αυτό, τα ενεργά κέντρα είναι απομονωμένα από το περιβάλλον και η πρόσβαση των υποκαταστατών σε αυτά ελέγχεται από τις εισόδους του κυλίνδρου (αυτο-διαμερισματοποίηση). Το κανάλι που σχηματίζεται στο εσωτερικό του κυλίνδρου έχει πολύ μικρή διάμετρο (11-13 Å) που αποκλείει την είσοδο μεγάλων δομών, και έχει μήκος περίπου 60 Å, απόσταση που πρέπει να διανύσουν οι πρωτεΐνες που αποδομούνται. Τα κανάλια αυτά που πιθανόν αρχικά εξυπηρετούσαν τον αποκλεισμό των πρωτεϊνών από τις θέσεις κατάλυσης μετατράπηκαν σε θέσεις εξειδικευμένης πρωτεόλυσης με την προσθήκη ρυθμιστικών σωματιδίων (ATPάσες) τα οποία επιλέγουν τους υποκαταστάτες και ανοίγουν την είσοδο του πρωτεολυτικού σωματιδίου (Ανασκόπηση: Larsen *et al.*, 1997, Schmidt *et al.*, 1999).

- Ο πρωτεολυτικός κύλινδρος συνεργάζεται με μία ή περισσότερες ATPάσες, όλες μέλη της «εκτεταμένης» οικογένειας των AAA ATPασών (Neuwald *et al.*, 1998), οι οποίες σχηματίζουν επίσης ομοεξαμελή -συνήθως- δαχτυλίδια, τα οποία, παρουσία ATP, συνδέονται στις εισόδους του κυλίνδρου και τις ελέγχουν, ενώ παράλληλα επιλέγουν και τους υποκαταστάτες τους οποίους και δεσμεύουν. Τα σύμπλοκα των ATPασών λειτουργούν επίσης σαν αντίστροφες τσαπερόνες ξεδιπλώνοντας τις πρωτεΐνες, οι οποίες μόνο έτσι χωράνε στον καταλυτικό κύλινδρο. Η πλήρης αποδόμηση μιας πρωτεΐνης εκτός του ξεδιπλώματος απαιτεί επίσης και σταδιακή μετακίνηση της πρωτεΐνης κατά μήκος του κυλίνδρου, διαδικασία της οποίας ο μηχανισμός δεν είναι ξεκάθαρος αλλά απαιτεί επίσης υδρόλυση ATP. Οι Gottesman *et al.*, (1997) συγκρίνοντας τις λειτουργίες των τσαπερόνων με τις αντίστοιχες των ATP-εξαρτώμενων πρωτεασών παρατήρησαν ότι τα αρχικά στάδια δράσης τους είναι παρόμοια, δηλαδή αναγνωρίζουν και προσδένονται σε μη φυσιολογικές δομές πρωτεϊνών τις οποίες διατηρούν σε διαλυτή μορφή, και συνεπώς διαθέσιμες προς το περιβάλλον είτε προς αναδίπλωση είτε προς αποδόμηση, προτείνουν μάλιστα ότι το σύστημα τσαπερόνες-ATP-

εξαρτώμενες πρωτεάσες αποτελεί τον μηχανισμό ποιοτικού ελέγχου των πρωτεϊνών του κυττάρου. Αυτό δηλαδή που στην πραγματικότητα συμβαίνει με αυτές τις πρωτεολυτικές μηχανές είναι, ATP-εξαρτώμενη ανίχνευση υποκαταστατών και ATP-εξαρτώμενη δράση τσαπερόνης και όχι ATP-εξαρτώμενη πρωτεόλυση (Gottesman and Maurizi 1992).

Ένα σημείο στο οποίο διαφέρουν οι προκαρυωτικές ATP-εξαρτώμενες πρωτεάσες από την ευκαρυωτική 26S είναι ο τρόπος αναγνώρισης των προς αποδόμηση πρωτεϊνών. Τα ευκαρυωτικά κύτταρα χρησιμοποιούν κυρίως την ATP-εξαρτώμενη σήμανση πρωτεϊνών με ουβικιτίνη, σύστημα το οποίο λείπει από τα βακτήρια, στα οποία, (*E. Coli*) έχει εντοπισθεί ένα σύστημα πεπτιδικής σήμανσης το οποίο αναγνωρίζει όμως μόνο ημιτελείς πρωτεΐνες (Gottesman S. 1999, Herman & D'Ari 1998). Κατά την μετάφραση κατεστραμμένων μεταγράφων mRNA χωρίς αλληλουχία λήξης, το ριβόσωμα βρίσκεται με την πεπτιδική αλυσίδα στην θέση P1 χωρίς κωδικόνιο στην δίπλα θέση, τότε η μετάφραση ολοκληρώνεται με ένα μικρό τμήμα RNA, το 10Sα RNA ή tmRNA προϊόν του γονιδίου *ssaA*, το οποίο προσθέτει 11 αμινοξέα στο κάρβοξυ-τελικό άκρο της πρωτεΐνης που αναγνωρίζονται από τις ClpAP, ClpXp πρωτεάσες και αποδομούνται. Οι βακτηριακές ATPάσες μάλλον αναγνωρίζουν τις πρωτεΐνες με βάση τα σήματα που αναγνωρίζει και το σύστημα της ουβικιτίνης, όπως ο κανόνας του N-τελικού αποσταθεροποιητικού αμινοξέος που στην περίπτωση των προκαρυωτικών πρωτεϊνών είναι το N-τελικό άκρο και όχι η N-τελική μεθειονίνη. Κάθε ATPάση αναγνωρίζει διαφορετικές ομάδες πρωτεϊνών, κάτι που ίσως εξηγεί και τον μεγάλο αριθμό τους σε σχέση με την μια μοναδική 26S πρωτεάση των ευκαρυωτικών.

Στα βακτήρια έχουν εντοπισθεί τέσσερις ομάδες ATP-εξαρτώμενων ATPασών: η Lon, η ClpAP/ClpXp, η ClpYQ/HslVU και η FtsH/Hf1B. (Ανασκόπηση Goldberg 1992, Gottesman and Maurizi 1992, Suzuki *et al.*, 1997).

1) Πρωτεάση La ή Lon

Η πρωτεάση La ή Lon είναι το μη απαραίτητο για την βιωσιμότητα του κυττάρου προϊόν του γονιδίου *lon* της *E. Coli*, και είναι υπεύθυνη για την αποδόμηση πολύ ανώμαλων πρωτεϊνών καθώς και κάποιων ρυθμιστικών παραγόντων με πολύ μικρό χρόνο ημίσειας ζωής. Το ένζυμο, ασυνήθιστα μεγάλο (360kDa), παρουσιάζει δράση πρωτεάσης σερίνης και ATPάσης στην ίδια πεπτιδική αλυσίδα, η οποία αναδιπλώνεται σε δύο περιοχές, την πρωτεάση και την ATPάση. Σχηματίζει τετραμερή σύμπλοκα, με υψηλή συγγένεια για ATP. Η δράση ATPάσης ρυθμίζεται αλλοστερικά από την παρουσία υποκαταστατών. Η υδρόλυση πεπτιδίων χωρίς σταθερή δευτεροταγή δομή απαιτεί πρόσδεση αλλά όχι και ταυτόχρονη υδρόλυση του ATP η οποία είναι αναγκαία για την αποδόμηση μεγάλων πρωτεϊνών. Απουσία ATP, αντί των συνηθισμένων πεπτιδίων 5-20 αμινοξέων, τα προϊόντα της πρωτεόλυσης είναι πολύ μεγαλύτερα, αποτέλεσμα μερικής πρωτεόλυσης. Η παρουσία υποκαταστατών προκαλεί ανταλλαγή του ADP με ATP πράγμα που ενισχύει την άποψη ότι η ενέργεια καταναλώνεται για αλλαγές στην αλληλεπίδραση των υποκαταστατών με την ATPάση.

Ευκαρυωτικά ομόλογα της Lon έχουν βρεθεί στο σώμα μιτοχονδρίων ηπατικών κυττάρων ποντικού και ζύμης (PIM1), (Suzuki *et al.*, 1997).

2) Πρωτεάση ClpAP και ClpXP

Οι πρωτεάσες τύπου Clp (Caseinolytic Proteases) απαντούν σε όλα τα βακτήρια, αλλά και σε ευκαρυωτικά κύτταρα όπως η ClpC, σε χλωροπλάστες ανώτερων φυτών και η οικογένεια των πρωτεϊνών Hsp100 στη ζύμη (ανασκόπηση, Suzuki *et al.*, 1997). Στο βακτήριο *E. Coli* αποτελούνται από δυο πρωτεΐνες, την πρωτεάση ClpP και μια ATPάση, την ClpA ή την ClpX. Η ClpP, πρωτεάση σερίνης, σχηματίζει έναν ομοεπταμερή δακτύλιο ο οποίος διμεριζόμενος σχηματίζει τον πρωτεολυτικό κύλινδρο με τα ενεργά κέντρα στο εσωτερικό του. Οι ClpA και ClpX, είναι AAA⁺ ATPάσες, με δύο και μια περιοχή πρόσδεσης ATP αντίστοιχα (βλέπε AAA ATPάσες Κεφ. Α, Παρ 2.2). Η ATPάση σχηματίζει έναν εξαμελή δακτύλιο ο οποίος, παρουσία ATP, προσκολλάται στην είσοδο του κυλίνδρου. Με τον τρόπο αυτό σχηματίζονται η ClpAP και η ClpXP πρωτεάσες με διαφορετικούς υποκαταστάτες η

καθεμία (η επιλογή των υποκαταστατών γίνεται από την ΑΤΡάση). Η ClpA, απομονώνεται σαν εξαμελής δακτύλιος ο οποίος συμπεριφέρεται *in vitro* σαν τσαπερόνη με δράση που δεν διαφέρει από εκείνη των DnaK και DnaJ (Wickner *et al.*, 1994). Η δράση τσαπερόνης εκδηλώνεται, *in vitro*, ακόμη και στην συμπλοκοποιημένη με την πρωτεάση μορφή (ClpAP), και εντοπίζεται στο άμινο-τελικό άκρο της πρωτεΐνης ClpA (Pak *et al.*, 1999). Και στις δυο περιπτώσεις (μόνη της ή σε σύμπλοκο με την πρωτεάση) είναι σε θέση να ενεργοποιήσει την αντιγραφή του φάγου P1 μετατρέποντας το ανενεργό διμερές της RepA στο ενεργό μονομερές. Η ClpX, αντίστοιχα, είναι σε θέση να αποδεσμεύσει το τετραμερές της MuA από το DNA και να παρεμποδίσει την κροκίδωση της πρωτεΐνης λΟ (Gottesman *et al.*, 1997). Οι Pak *et al.*, (1999) έδειξαν ότι οι υποκαταστάτες που προσδένονται στην ClpAP δεν καταλήγουν πάντα σε πρωτεόλυση, κάποιες διορθώνονται και ελευθερώνονται. Για να μελετήσουν τον μηχανισμό με τον οποίο μια πρωτεΐνη ξεδιπλώνεται από τον δακτύλιο της ClpA και της ClpX οι Weber-Ban *et al.*, (1999) χρησιμοποίησαν σαν υποκαταστάτη των συμπλόκων ClpAP και ClpXP την πρωτεΐνη πράσινου φωσφορισμού (GFP) σε σύντηξη με ένα αποσταθεροποιητικό πεπτίδιο. Τα πειράματα αυτά έδειξαν ότι ο υποκαταστάτης προσδένεται σε πολλά σημεία πάνω στις γειτονικές υπομονάδες του δακτυλίου των ΑΤΡασών, οι οποίες με υδρόλυση ATP αλλάζουν διαμόρφωση, και πιθανόν μετακινούνται συμπαρασύροντας το προσδεμένο τμήμα, πράγμα που προκαλεί κατάρρευση της δομής της πρωτεΐνης. Ο δακτύλιος των ΑΤΡασών λειτουργεί σαν μοριακός μοχλός που προσδένεται σε κάποιο τμήμα της πρωτεΐνης το οποίο συμπαρασύρει κατά την περιστροφή του πάνω στον δακτύλιο των πρωτεασών (ανασκόπηση Vale 2000, Zwickl *et al.*, 2000). Οι Beuron *et al.*, (1998) ανέλυσαν την δομή της ClpAP με κρυο-ηλεκτρονική μικροσκοπία και προσπάθησαν να κατανοήσουν το λόγο ύπαρξης ασυμμετρίας πρωτεασών (επταμελείς δακτύλιοι) και ΑΤΡασών (εξαμελείς). Προτείνουν λοιπόν ότι τα δύο σύμπλοκα συνδέονται με αλληλεπίδραση ενός μόνο ζευγαριού πρωτεϊνών, που συμπίπτουν, από κάθε δακτύλιο, οπότε η αλληλεπίδραση είναι ασθενής, σε αντίθεση με σύμπλοκα με όμοιο αριθμό υποκαταστατών σε κάθε δακτύλιο όπου συμπίπτουν όλες οι υπομονάδες 1:1, οπότε η σύνδεση γίνεται με αλληλεπιδράσεις όλων των υπομονάδων και άρα πολύ ισχυρότερη. Υποστηρίζουν λοιπόν ότι ένα τέτοιο ασύμμετρο σύμπλοκο δίνει την δυνατότητα κίνησης του ενός δακτυλίου ως προς τον άλλο με διαδοχικές μικρές περιστροφές. Μια πολύ μικρή περιστροφή του ενός δακτυλίου (8.6°) μετατοπίζει την σύνδεση στο γειτονικό ζευγάρι που τώρα συμπίπτει, οπότε με έξι τέτοια διαδοχικά βήματα ο εξαμελής δακτύλιος κάνει μια πλήρη περιστροφή γύρω από τον κεντρικό άξονα «κλειδώνοντας» κάθε φορά σε μια διαδοχική υπομονάδα του δακτυλίου των πρωτεασών.

3) Πρωτεάση ClpYQ ή HslVU

Η πρωτεάση HslVU δομικά και λειτουργικά είναι όμοια με το πρωτεάσωμα, μάλιστα, στα είδη βακτηρίων που έχουν εξετασθεί, η παρουσία πρωτεασώματος αποκλείει την παρουσία της HslVU και αντίστροφα (ανασκόπηση De Mot 1999). Η HslVU (heat shock locus V and U) αποτελείται από την πρωτεάση HslV/ClpQ, και την ΑΤΡάση HslU/ ClpY. Η HslV είναι ομόλογη με την β-υπομονάδα του πρωτεασώματος των αρχαιβακτηρίων, και αντίθετα με την ClpP είναι πρωτεάση θρεονίνης. Σχηματίζει δυο εξαμελή δαχτυλίδια που συνδέονται σχηματίζοντας τον καταλυτικό κύλινδρο, ο οποίος μπορεί να επιτεθεί ακριβώς στον αντίστοιχο του 20S πρωτεασώματος, με την διαφορά ότι η εξωτερική επιφάνεια του καταλυτικού συμπλόκου παρουσιάζει ομοιότητες με εκείνη των α- υπομονάδων του πρωτεασώματος. Η HslU/ ClpY είναι AAA⁺ ΑΤΡάση με μια περιοχή πρόσδεσης ATP, μέλος της οικογένειας των τσαπερονών Hsp100. Σχηματίζει εξαμελή δαχτυλίδια τα οποία συνδέονται στις δυο άκρες του κυλίνδρου. Η δομή του συμπλόκου σε κρυστάλλους και σε διάλυμα έχει αναλυθεί από δυο εργαστήρια, αρχικά από τους Bochtler *et al.*, (2000) και αργότερα από τους Sousa *et al.*, (2000). Συμφωνούν όσον αφορά την δομή του καταλυτικού κυλίνδρου αλλά διαφωνούν ως προς τον προσανατολισμό των δακτυλίων της HslU πάνω στον καταλυτικό κύλινδρο. Η πρωτεΐνη HslU παρουσιάζει τρεις δευτεροταγείς δομές, δύο από τις

οποίες, η άμινο-τελική σφαιρική περιοχή πρόσδεσης ATP και η κάρβοξυ-τελική σφαιρική περιοχή όμοιες και σε ίδιες σχετικές θέσεις με τις αντίστοιχες της NSF, μιας AAA πρωτεΐνης απαραίτητης για την σύντηξη κυστιδίων (βλέπε AAA ATPάσες Κεφ Α, Παρ 2.2). Η διαφορά της HslU από τις υπόλοιπες AAA είναι η τρίτη, μια ενδιάμεση περιοχή I, κυρίως α-έλικα, η οποία προεκτείνεται σαν πλοκάμι από το σώμα της πρωτεΐνης. Στο μοντέλο των Bochtler *et al.*, (2000) τα πλοκάμια αυτά συνδέουν τους δακτυλίους της ATPάσης με την πρωτεάση, ενώ στο μοντέλο των Sousa *et al.*, (2000), ο δακτύλιος είναι ανεστραμμένος, οπότε τα πλοκάμια στρέφονται προς το περιβάλλον και προτείνεται ότι αυτά κάνουν την ανίχνευση και πρόσδεση των υποκαταστατών στο σύμπλοκο.

4) Πρωτεάση FtsH ή HflB

Η FtsH (*f*ilamentous *t*emperature *s*ensitive *g*rowth) απομονώθηκε από τους Ogura *et al.*, (1991) από κύτταρα *E.Coli* που ήταν ανίκανα να εκτελέσουν κυτταρική διαίρεση, και από τους Bouloc *et al.*, (Suzuki *et al.*, 1997), από κύτταρα με υψηλή συχνότητα λυσογονίας (HflB *h*igh *f*requency *l*ysogeny). Πρόκειται για μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη 71 kDa, η οποία περιέχει δυο υδρόφοβα διαμεμβρανικά τμήματα στο N-τελικό της άκρο, με τα οποία δεσμεύεται στην κυτταρική μεμβράνη αφήνοντας το υπόλοιπο μέρος της πρωτεΐνης, τις δραστηριότητες ATPάσης και πρωτεάσης, στο κυτταρόπλασμα. Η FtsH περιέχει δυο φορές την συντηρημένη περιοχή πρόσδεσης ATP των AAA ATPάσων, και το συντηρημένο μοτίβο HEXXH των μεταλλοπρωτεασών (βλέπε AAA ATPάσες Κεφ Α, Παρ 2.2). Οι Akiyama *et al.*, (1994a, 1994b) έδειξαν ότι η FtsH είναι αναμειγμένη με την μετακίνηση πρωτεϊνών στην κυτταρική μεμβράνη. Μεταλλαγές στην περιοχή πρόσδεσης του ATP επηρεάζουν την μετακίνηση διαφόρων μεμβρανικών πρωτεϊνών, όπως η OmpA. Χρησιμοποιώντας σαν πρωτεΐνη αναφοράς την περιπλασμική αλκαλική φωσφατάση (PhoA), η οποία υιοθετεί την ενεργό δομή της μόνο μετά την μεταφορά της στην περιπλασμική περιοχή, σε σύντηξη στην τελευταία περιπλασμική θηλιά της SecY, που περιέχει δέκα διαμεμβρανικά τμήματα, εντόπισαν την περιοχή υπεύθυνη για την δράση της μετακίνησης των πρωτεϊνών στην περιοχή δέσμευσης του ATP.

Οι Tomoyasu *et al.*, (1995) έδειξαν ότι η FtsH είναι μια μεμβρανική ATP-εξαρτώμενη μεταλλοπρωτεάση η οποία εμπλέκεται στην ρύθμιση του γενετικού υλικού μέσω του ελέγχου των επιπέδων του μεταγραφικού παράγοντα θερμικού σοκ σ^{32} , δράση που απαιτεί ATP και Zn^{2+} . Εκτός της διαλυτής σ^{32} , η FtsH είναι σε θέση να αποδομήσει και μεμβρανικές περιπλασμικές πρωτεΐνες τις οποίες έλκει δια μέσου της μεμβράνης. Οι Akiyama *et al.*, (1999), χρησιμοποιώντας την αλκαλική φωσφατάση σε σύντηξη με διαμεμβρανική την πρωτεΐνη «στόχο» YccA της FtsH, έδειξαν ότι η PhoA αποδομείται από την FtsH σε μεταλλαγμένα κύτταρα ανίκανα να σχηματίσουν δισουλφιδικούς δεσμούς στην PhoA, οι οποίοι παρεμποδίζουν την μετακίνηση της PhoA διαμέσου της μεμβράνης.

Η FtsH σχηματίζει έναν εξαμελή δακτύλιο ο οποίος διατρέχει την κυτταρική μεμβράνη σχηματίζοντας έτσι ένα κανάλι διαμέσου του οποίου έλκει τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, δράση η οποία απαιτεί υδρόλυση ATP (Schmidt *et al.*, 1999).

Πρωτεΐνες ομόλογες με την FtsH έχουν εντοπισθεί σε ευκαρυωτικά κύτταρα σε χλωροπλάστες και μιτοχόνδρια.

Με αντισώματα για την βακτηριακή FtsH, οι Lindahl *et al.*, (1996) εντόπισαν την μια πρωτεΐνη στην μεμβράνη των θυλακοειδών σε σπανάκι, με το κυρίως σώμα της πρωτεΐνης προς το στρώμα. Η πρωτεΐνη αυτή όμοια με την βακτηριακή συμμετέχει στην μετακίνηση πρωτεϊνών στην μεμβράνη των θυλακοειδών, και στην αποδόμηση διαλυτών (στρώμα) και μεμβρανικών πρωτεϊνών.

Σε μιτοχόνδρια ζύμης έχουν εντοπισθεί τρεις πρωτεΐνες ομόλογες με την FtsH, όλες μεταλλοπρωτεάσες, μέλη της οικογένειας των AAA ATPάσων, οι YTA10 (AFG3), YTA12, και Yme1p (βλέπε AAA ATPάσες Κεφ Α, Παρ 2.2).

Γ. Γονιδιακή σίγηση μέσω RNA

Με τον όρο γονιδιακή σίγηση μέσω RNA περιγράφεται το φαινόμενο που οδηγεί στην ειδική μετα-μεταγραφική αποδόμηση μορίων RNA συγκεκριμένης αλληλουχίας, που είτε χαρακτηρίζονται ως «ξένα», είτε τα επίπεδά τους στο κύτταρο είναι εξαιρετικά αυξημένα.

Το φαινόμενο αυτό παρατηρήθηκε στις αρχές της δεκαετίας του '90 σε πειράματα υπερέκφρασης ενδογενών γονιδίων σε φυτά, με την εισαγωγή ενός αντίγραφου του γονιδίου κάτω από τον έλεγχο ισχυρών υποκινητών στο γενετικό υλικό του φυτού. Ενώ από το πείραμα αυτό αναμένεται υπερέκφραση του διαγονιδίου αντίθετα παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων των mRNA και του διαγονιδίου αλλά και του ενδογενούς γονιδίου. Το φαινόμενο ονομάστηκε αρχικά συν-καταστολή (co-suppression).

Αργότερα, παρατηρήθηκαν παρόμοια φαινόμενα και σε άλλους εκτός των φυτών οργανισμούς όπως μύκητες (fungi, quelling), δροσόφιλα, και ζωικά κύτταρα (RNA interference) που υποδεικνύουν την ύπαρξη ενός γενικότερου μηχανισμού ελέγχου του RNA των κυττάρων.

Υπάρχουν δυο είδη γονιδιακής σίγησης μέσω RNA (ανασκόπηση Grant S., 1999):

- 1- Καταστολή της μεταγραφής του γονιδίου (TGS: transcriptional gene silencing), όπου δεν ανιχνεύεται μετάγραφο από την συγκεκριμένη ακολουθία και συνήθως παρατηρείται υπερμεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου. Το φαινόμενο αυτό επάγεται και από τα ιντρόνια του υπό σίγηση γονιδίου.
- 2- Αποδόμηση του προϊόντος της μεταγραφής της συγκεκριμένης ακολουθίας (PTGS: post-transcriptional gene silencing), όπου δεν επηρεάζεται η μεταγραφή, αλλά τα επίπεδα του mRNA του γονιδίου είναι σημαντικά ελαττωμένα. Στην περίπτωση αυτή παρατηρείται υπερμεθυλίωση της κωδικής περιοχής και το φαινόμενο της αποδόμησης του mRNA δεν προκαλείται από ιντρόνια του γονιδίου.

Οι φυτικοί ιοί προκαλούν κυρίως το δεύτερο (PTGS) το οποίο φαίνεται να αποτελεί μηχανισμό άμυνας των φυτών ενάντια στην προσβολή από ιούς, και αναλύεται περαιτέρω.

Με την διαδικασία αυτή ανιχνεύονται και απομακρύνονται ελλειπτικά μόρια RNA (aberrant RNAs) (Voignet *et. al.*, 1998), διατηρούνται σε ελεγχόμενα επίπεδα τα RNA μεταθετών στοιχείων (Matzke *et. al.*, 1996), απομακρύνονται δίκλινα μόρια RNA (Selker *et. al.*, 1999) και τέλος αντιμετωπίζονται RNA και DNA ιοί (Vaucheret *et. al.*, 1998).

Η μετα-μεταγραφική σίγηση γονιδίων χαρακτηρίζεται από τρία διακριτά στάδια: Την έναρξη, την μετάδοση του σήματος και την διατήρηση της σίγησης. (Ruiz *et. al.*, 1998, Vaucheret *et. al.*, 2001).

Η έναρξη της αποδόμησης του RNA στόχου απαιτεί την παρουσία δίκλωνου RNA της συγκεκριμένης ακολουθίας και αποδομείται μόνο η περιοχή του μετάγραφου που εμφανίζεται δίκλωνη (ανασκόπηση Bass B., 2000).

Δίκλινο RNA στα κύτταρα σχηματίζεται, σαν ενδιάμεσο προϊόν κατά την μεταγραφή των ιών, από την μεταγραφή διαγονιδίων που περιέχουν ανεστραμμένες αλληλουχίες (inverted repeats ή raphanddle), και από την μεταγραφή μεταθετών στοιχείων σε αντίθετους προσανατολισμούς. Στις περιπτώσεις αυτές, ο σχηματισμός δίκλωνου RNA δικαιολογεί την επαγωγή του φαινομένου.

Στην περίπτωση των διαγονιδίων κάτω από έλεγχο ισχυρών υποκινητών, καθώς και στην περίπτωση διαγονιδιακών τμημάτων DNA χωρίς υποκινητή που επίσης επάγουν το φαινόμενο της γονιδιακής σίγησης (Voignet *et. al.*, 1998), ο σχηματισμός δίκλωνου RNA αποδίδεται σε ενδογενή λειτουργία των κυττάρων. Στις περιπτώσεις αυτές, το δίκλινο RNA σχηματίζεται από κυτταρικές RNA-εξαρτώμενες RNA πολυμεράσες (RdRp) που

χρησιμοποιούν σαν καλούπι για την σύνθεσή του ελλειπτικά μόρια RNA τα οποία συντίθενται από κυτταρικούς παράγοντες (όπως η πρωτεΐνη DDM1), με μεταγραφή των διαγονιδίων. RNA-εξαρτώμενες RNA πολυμεράσες έχουν απομονωθεί από φυτά με κατεστραμμένο τον μηχανισμό σίγησης (PTGS) ενάντια σε διαγονίδια αλλά ικανά να καταστείλουν με παρόμοιο μηχανισμό τον πολλαπλασιασμό ιών που επάγουν PTGS, όπως η SDE1/SGS2 (silencing defective) από το φυτό *A. thaliana*. (Dalmay *et. al.*, 2000).

Τον σχηματισμό του δίκλωνου RNA ακολουθεί η αναγνώριση και η σταδιακή αποδόμησή του προς ολιγομερή δίκλινα προϊόντα μήκους 22-23 νουκλεοτιδίων η παρουσία των οποίων συνοδεύει πάντα το φαινόμενο του PTGS (Hamilton & Baulcombe, 1999). Το μοντέλο αυτό προϋποθέτει την ύπαρξη κυτταρικών παραγόντων όπως πρωτεΐνη(ες) πρόσδεσης σε δίκλινο RNA, ελικάση δίκλωνου RNA και νουκλεάση δίκλωνου RNA (Bass B., 2000). Νουκλεάσες του τύπου αυτού έχουν απομονωθεί από δροσόφιλα (DICER) (Bernstein *et. al.*, 2001) και από το φυτό *A. thaliana* (caf ή sin1 ή sus1) (Jacobsen *et. al.*, 1999).

Τα 23μερή δίκλινα μόρια RNA που προκύπτουν από την αποδόμηση του δίκλωνου RNA λειτουργούν ως οδηγοί για την αποδόμηση του RNA στόχου με ομολογία προς αυτά, γεγονός που δικαιολογεί το ότι με τον μηχανισμό αυτό, αποδομείται μόνο η περιοχή του RNA στόχου που εμφανίζεται σε δίκλινη μορφή. Με βάση την θεωρία αυτή, η νουκλεάση, με καλούπι το δίκλινο 23μερές, επιιλέγει το ομόλογο προς αυτό RNA όπου αντικαθιστά τον ένα κλώνο του ολιγομερούς με το RNA στόχο. Ακολουθεί κόψιμο του στόχου και αναγέννηση του ενζύμου με το δίκλινο 23μερές το οποίο ξεκινάει νέο κύκλο αποδόμησης, με τον τρόπο αυτό ο μηχανισμός δρα αυτοκαταλυτικά.

Μετά την αναγνώριση του δίκλωνου RNA και τον σχηματισμό των δίκλωνων 23μερών γεννάται ένα σήμα -άγνωστης ακόμη ταυτότητας- πιθανόν κάποιο RNA μόριο (σύμφωνα με τον τρόπο μετακίνησης του σήματος στο σύστημα του φυτού), το οποίο επάγει το φαινόμενο της γονιδιακής σίγησης σε όλα τα κύτταρα που περιέχουν αλληλουχίες ομόλογες με τον αναγνωρισμένο στόχο και είναι ικανά να παράγουν το φαινόμενο (Vaucheret *et. al.*, 2001). Το σήμα αυτό είναι ικανό να επάγει το φαινόμενο της γονιδιακής σίγησης σε φυτό, ακόμη και σε απόσταση 30 εκατοστών από το σημείο όπου γίνεται η έναρξη του φαινομένου (αν παρεμβληθεί φυτό που δεν περιέχει τις αλληλουχίες του διαγονιδίου) (Vaucheret *et. al.*, 2001).

Η διατήρηση και συνέχιση του φαινομένου της γονιδιακής σίγησης στα κύτταρα που λαμβάνουν το σήμα για αποδόμηση του συγκεκριμένου RNA εξαρτάται από την θέση και/ ή δομή της διαγενετικής θέσης και απαιτεί δραστηριότητα στον πυρήνα των κυττάρων. Σίγηση για την αναγωγή του αζώτου (Nia2) με εμβολιασμό φυτών άγριου τύπου ή διαγενετικών που υπερεκφράζουν το γονίδιο σε φυτά όπου έχει εγκατασταθεί η σίγηση του RNA της αναγωγής του αζώτου, παρατηρείται μόνο στα μέρη του φυτού που υπάρχει υπερέκφραση είτε από το διαγονίδιο είτε από το ενδογενές λόγω μεταβολικών αναγκών. Στο στάδιο αυτό σημαντικό ρόλο πρέπει να παίζει η μεθυλίωση του DNA των γονιδίων στόχων, το οποίο είτε μεθυλιώνεται κατά την αντιγραφή του DNA και μεταδίδεται έτσι στην επόμενη γενιά κυττάρων, είτε μεθυλιώνεται σε απάντηση του σήματος της γονιδιακής σίγησης στο νέο κύτταρο.

Αρκετοί κυτταρικοί παράγοντες που συμμετέχουν στην διαδικασία του PTGS έχουν απομονωθεί από φυτά μη ικανά να επάγουν τον μηχανισμό της γονιδιακής σίγησης (ανασκόπηση Vaucheret *et. al.*, 2001).

Ενεργοποίηση και καταστολή της γονιδιακής σίγησης από ιούς.

Ένας από τους τρόπους άμυνας των φυτών ενάντια σε ιούς είναι ο μηχανισμός της γονιδιακής καταστολής (VIGS *V*irus *i*nduced *g*ene *s*ilencing). Το φαινόμενο επάγεται από τον σχηματισμό δίκλωνου RNA κατά τον πολλαπλασιασμό των ιών, και αυτός είναι ο λόγος που οι RNA(+) ιοί είναι ισχυροί επαγωγείς του φαινομένου (Voignnet *et. al.*, 1999). Σε μερικές περιπτώσεις, η σίγηση κατά την μόλυνση οδηγεί σε φαινότυπο <ανάρρωσης>, όπου τα νέα φύλλα που παράγονται δεν παρουσιάζουν τα συμπτώματα του ιού και δεν μπορούν να ξαναμολυνθούν (ανοσία) (ανασκόπηση Carrington *et al.*, 2001).

Στο φαινόμενο αυτό οφείλεται και η διασταυρωτή προστασία, δηλαδή η σίγηση ενός ιού καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό άλλων συγγενών (ως προς την αλληλουχία) ιών αποτρέποντας μόλυνση από αυτούς.

Γονιδιακή σίγηση ενάντια σε ιούς που φέρουν αλληλουχίες ενδογενών γονιδίων ή διαγονιδίων προκαλούν αποδόμηση του mRNA των γονιδίων αυτών (Ruiz *et. al.*, 1998, Angell & Baulcombe 1999, Burton *et. al.*, 2000), και αντίστροφα, σίγηση ενδογενούς γονιδίου προκαλεί σίγηση εισερχόμενου ιού αν αυτός φέρει ομόλογες αλληλουχίες προς το γονίδιο αυτό (Angell S., & Baulcombe D., 1997). Δηλαδή οι ιοί αποτελούν επαγωγείς και στόχους του φαινομένου VIGS.

Ο μηχανισμός σίγησης που επάγεται από ιούς είναι παρόμοιος αλλά όχι ίδιος με την γονιδιακή σίγηση διαγονιδίων αφού δεν απαιτεί τουλάχιστον ένα κυτταρικό παράγοντα την SDE1 που είναι απαραίτητη για την PTGS. Πιθανόν ο σχηματισμός δίκλωνου RNA σαν ενδιάμεσο προϊόν του πολλαπλασιασμού του ιού να παρακάμπτει την ανάγκη κυτταρικού παράγοντα για το βήμα αυτό. Οι ιοί σχηματίζουν δίκλινα μόρια RNA με τις ιικές RNA-εξαρτώμενες RNA πολυμεράσες (Dalmay *et. al.*, 2000). Τα επόμενα στάδια, αναγνώριση του δίκλωνου RNA, αποδόμηση προς σχηματισμό δίκλωνων 23μερών, σχηματισμός και μετάδοση του σήματος φαίνεται να είναι ίδια με την PTGS και να χρησιμοποιούν τους ίδιους κυτταρικούς παράγοντες, όπως τις φυτικές πρωτεΐνες SGS2 και SGS3 μεταλλαγές των οποίων αυξάνουν την ευαισθησία σε ιούς (Mourrain *et. al.*, 2000).

Οι ιοί σαν απάντηση στο φαινόμενο αυτό κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην μολυσματικότητα των ιών και είναι καταστολείς του φαινομένου της γονιδιακής σίγησης (ανασκόπηση Carrington *et. al.*, 2001).

Οι ιικές πρωτεΐνες που έχουν μελετηθεί μέχρι τώρα δεν παρουσιάζουν καμία σημαντική ομοιότητα ούτε ως προς την αλληλουχία τους ούτε ως προς την δράση τους:

- Ο βοηθητικός παράγοντας των rotY ιών (HC-Pro) επιδρά στο στάδιο της διατήρησης της γονιδιακής σίγησης. Το φαινόμενο καταστέλλεται πλήρως σε κύτταρα που εκφράζουν την πρωτεΐνη (και όχι απλά μέρος της ακολουθίας της), και δεν ανιχνεύονται 23μερή δίκλινα μόρια RNA του υπο σίγηση γονιδίου. Εκφραση της πρωτεΐνης HC-Pro προκαλεί πολύ βαρύτερα συμπτώματα κατά την μόλυνση των φυτών αυτών με άλλους ιούς όπως π.χ τον PVX (Brigneti *et. al.*, 1998).

- Η πρωτεΐνη 2b του ιού του μωσαϊκού της αγγουριάς (CMV) είναι επίσης ισχυρός καταστολέας της γονιδιακής σίγησης. Όταν φυτό που εκφράζει γονιδιακή σίγηση για διαγονίδιο μολυνθεί με τον ιό CMV, καταστέλλει το φαινόμενο, αλλά μόνο στα νεοεμφανιζόμενα φύλλα και όχι στα ώριμα φύλλα όπως συμβαίνει με τους rotY (PVY). Αυτό πιθανόν συμβαίνει γιατί η 2b επηρεάζει τον σχηματισμό ή την μετάδοση του σήματος αλλά όχι την έναρξη της γονιδιακής σίγησης.

- Η p25 του PVX καταστέλλει την συστηματική μετάδοση του σήματος. Όταν η γονιδιακή σίγηση επάγεται με τοπική χορήγηση του διαγονιδίου (infiltration), η p25 καταστέλλει την σίγηση μόνο τοπικά. Παρουσία ιού PVX που πολλαπλασιάζεται, καταστέλλει την μετάδοση του σήματος. (Voignnet *et. al.*, 2000).

Τα στοιχεία αυτά υποδηλώνουν ότι ο μηχανισμός της γονιδιακής σίγησης μέσω RNA και ειδικά το στάδιο της συστηματικής μετάδοσης σήματος σε όλα τα μέρη του φυτού αποτελούν μέρος της άμυνας των φυτών ενάντια σε ιούς.

Η πρακτική όψη αυτής της διαδικασίας αναλύεται από τον Baulcombe (1999) ο οποίος αναλύει την σημαντικότητα της γονιδιακής καταστολής σαν εργαλείο για την μελέτη γονιδίων σε φυτά. Η μέθοδος που προτείνεται έχει αρκετά πλεονεκτήματα:

- η μελέτη κάποιου γονιδίου απαιτεί την γνώση μέρους μόνο της αλληλουχίας του αφού η γονιδιακή καταστολή επάγεται με μικρό τμήμα. Σίγηση έχει προκληθεί ακόμη και με 22μερή τμήματα γονιδίου (Thomas *et. al.*, 2001).

- Δίνει πολύ γρήγορα αποτελέσματα: Η τεχνική απαιτεί την κλωνοποίηση του τμήματος σε κατάλληλο ιικό φορέα και μόλυνση φυτών με αυτόν. Τα συμπτώματα από την καταστολή του γονιδίου εμφανίζονται σε μόλις 15 ημέρες από την μόλυνση στα επάνω φύλλα του φυτού.

- Με την μέθοδο αυτή μπορεί κανείς να μελετήσει την λειτουργία γονιδίων των οποίων η καταστολή είναι τοξική για το φυτό και συνεπώς δεν μπορούν να μελετηθούν με πλήρη καταστροφή του ενδογενούς γονιδίου. Η γονιδιακή καταστολή μέσω RNA δεν φτάνει στο 100% της μετάφρασης του γονιδίου, γεγονός που επιτρέπει την παρατήρηση στοιχείων του φαινοτύπου -ακόμη και αν αυτός είναι θνησιγόνος- που να υποδηλώνουν την λειτουργία του γονιδίου.

- Η διαδικασία αποδόμησης RNA μέσω VIGS στοχεύει αλληλουχίες που είναι ομόλογες με τα 23μερή που σχηματίζονται κατά την σταδιακή αποδόμηση του δίκλωνου RNA με το οποίο ξεκινά το φαινόμενο. Αυτό σημαίνει ότι ομολογία (100%) σε τμήμα DNA μήκους 23 νουκλεοτιδίων είναι ικανή να προκαλέσει αποδόμηση του RNA μορίου που την περιέχει. Δηλαδή με την τεχνική αυτή καταστέλλονται γονίδια ακόμη και αν ανήκουν σε οικογένεια γονιδίων που μπορεί το ένα να αντικαταστήσει το άλλο.

- Τέλος, μπορεί κανείς να κλωνοποιήσει βιβλιοθήκη από αλληλουχίες με τυχαίο προσανατολισμό σε κατάλληλο ιικό φορέα (αφού και η συμπληρωματική αλληλουχία - antisense-είναι εξίσου αποτελεσματική (Ruiz *et. al.*, 1998), και ακόλουθα να μολύνει φυτά με τις κατασκευές αυτές και να περιμένει 15-20 ημέρες για την εμφάνιση φαινοτύπων στα φυτά αυτά.

Για να είναι εφικτή η μέθοδος απαιτείται η κατασκευή ιικών φορέων για κάθε φυτικό είδος ώστε να υπάρχει ο κατάλληλος φορέας για κάθε ξενιστή, π.χ ο ιός της πατάτας X δεν πολλαπλασιάζεται στο φυτό *Arabidopsis thaliana* για το οποίο πρέπει να εντοπισθεί ιός ο οποίος να χρησιμοποιηθεί σαν φορέας γενετικού υλικού για το φυτό αυτό.

Οι περισσότεροι φυτικοί ιοί δεν περνάνε στο μερίστωμα των φυτών (η ακραία περιοχή του φύλλου από όπου αναπτύσσεται το φυτό) το οποίο διαφέρει μεταβολικά από το υπόλοιπο μέρος του φύλλου. Επίσης, ούτε το σήμα της γονιδιακής σίγησης περνάει στο μερίστωμα, οπότε για να μελετηθούν λειτουργίες γονιδίων που εκφράζονται στην περιοχή αυτή πρέπει να βρεθεί ιός που να περνάει στα κύτταρα αυτά. Επίσης αν ο ιός δεν προκαλούσε κανένα σύμπτωμα στα φυτά που μολύνει θα διευκόλυne πολύ την εκτίμηση των συμπτωμάτων στα πειράματα αυτά. Ένας τέτοιος ιός έχει ήδη απομονωθεί (Ratcliff *et. al.*, 2001) ο TRV (tobacco rattle virus) ο οποίος εισβάλλει στα μεριστωματικά κύτταρα καπνού, δεν προκαλεί κανένα σύμπτωμα και επάγει το φαινόμενο της γονιδιακής σίγησης.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Εισαγωγή

LeMA-1, ή LeRpt5 (*Lycopersicon esculentum* Regulatory Particle Triple-A ATPase 5).

Η πρωτεΐνη LeMA-1 απομονώθηκε σε μια προσπάθεια εντοπισμού φυτικών παραγόντων που αλληλεπιδρούν με το ιοειδές PSTVd, με σάρωση βιβλιοθήκης έκφρασης από καρπό ντομάτας (Prombona *et. al.*, 1995). Η σύγκριση της αλληλουχίας του κλώνου που απομονώθηκε με τις υπάρχουσες αλληλουχίες στις τράπεζες αλληλουχιών έδειξε ότι η LeMA-1 παρουσιάζει υψηλή ομολογία (77.4% αμινοξική ομολογία) με την ανθρώπινη TBP-1 (Ohana *et. al.*, 1993) η οποία απομονώθηκε ως αρνητικός ρυθμιστής της μεταγραφής του ιού HIV-1 μέσω αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη TAT του HIV-1 (βλέπε Rpt5, AAA ATPases Κεφ Α, Παρ 2.2).

Η πιθανή σχέση της με το ιοειδές σε συνάρτηση με τα δεδομένα των Ohana *et. al.*, (1993), οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πιθανόν η LeMA-1 να συμμετέχει σε κάποιο στάδιο της διαδικασίας μεταγραφής στο φυτό και πιθανόν να έχει κάποια σχέση με την παθογένεια του ιοειδούς. Στο γενικό πλαίσιο των ενδιαφερόντων του εργαστηρίου (μελέτη αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης - RNA), η LeMA-1 αποτελούσε ένα πολύ ενδιαφέρον αντικείμενο μελέτης, ειδικά λόγω του γεγονότος ότι ήταν η πρώτη φυτική πρωτεΐνη της οικογένειας AAA που απομονώθηκε.

Η πολύ υψηλή ομολογία των δυο αυτών πρωτεϊνών (της LeMA-1 με την TBP-1, βλέπε AAA ATPases Κεφ Α, Παρ 2.2), οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για παράγοντες της βασικής διαχείρισης των λειτουργιών του κυττάρου κάτι που δικαιολογεί την αυστηρή συντήρηση των πρωτεϊνών αυτών σε οργανισμούς όπως άνθρωπος και φυτά.

Ανίχνευση του γονιδίου της LeMA-1 σε γενωμικό DNA από φύλλο έδειξε ότι υπάρχει ένα αντίγραφο του γονιδίου της στη ντομάτα χωρίς ιντρόνιο. Ανίχνευση του μετάγραφου της LeMA-1 σε εκχύλισμα RNA από διάφορους ιστούς ντομάτας έδειξε ότι η πρωτεΐνη εκφράζεται σε όλους τους ιστούς που ελέγχθηκαν, με εξαίρεση τα σπόρια (Prombona *et. al.*, 1995).

Η πρωτεΐνη κλωνοποιήθηκε σε κατάλληλο φορέα έκφρασης σε βακτήρια και απομονώθηκε από κατάλληλη στήλη χημικής συγγένειας μέσω μιας «ουράς» 6 καταλοίπων ιστιδίνης, που παρέχει ο φορέας, με στόχο την δέσμευση της πρωτεΐνης στην στήλη. Με την μέθοδο αυτή απομονώθηκε ικανή ποσότητα πρωτεΐνης για την παρασκευή αντισώματος σε κουνέλια ώστε να είναι δυνατή η μελέτη της πρωτεΐνης in vivo (Τζωρτζακάκη Σεργία, Emilio Martinez).

Η υψηλή ομολογία της LeMA-1 με έναν ανθρώπινο παράγοντα, το γεγονός ότι ήταν η πρώτη πρωτεΐνη της οικογένειας AAA που εντοπίστηκε σε φυτά, και η πιθανή σχέση της με την μεταγραφική μηχανή δημιούργησαν μια ενδιαφέρουσα προϋπόθεση για να μελετηθεί η λειτουργία της πρωτεΐνης αυτής στα φυτά. Τα στοιχεία αυτά απετέλεσαν την βάση της εργασίας αυτής.

Με στόχο την μελέτη της λειτουργίας της πρωτεΐνης in vivo σε φυτά εξετάστηκαν διάφορες στρατηγικές από τις οποίες τελικά επιλέχθηκε εκείνη της έκφρασης της πρωτεΐνης στο φυτό μέσω του συστήματος του PVX, δηλαδή να υπερεκφραστεί η πρωτεΐνη στο φυτό μέσω ενός ιικού φορέα με την ελπίδα ότι το φαινόμενο αυτό θα προκαλέσει κάποια εμφανή επίδραση στην φυσιολογία του φυτού, τέτοια που να επιτρέπει κάποια συμπεράσματα για την λειτουργία της πρωτεΐνης στο κύτταρο.

1. Παρασκευή, έλεγχος και εμπλουτισμός του ορού σε ειδικά για την LeMA-1 αντισώματα.

Το αντίσωμα παρασκευάστηκε από κουνέλια με αντιγόνο κατάλληλη ποσότητα πρωτεΐνης LeMA-1 (350μg / κουνέλι). Για τον σκοπό αυτό, η πρωτεΐνη εκφράστηκε σε βακτήρια σε σύντηξη με «ουρά» έξι ιστιδινών στο άμινο-τελικό της άκρο, και απομονώθηκε από στήλη χημικής συγγένειας με Ni η οποία δεσμεύει την ακολουθία της «ουράς». Ανοσοποιήθηκαν δυο αρσενικά κουνέλια ίδιας ηλικίας (από το εργαστήριο του Δρ. Κραμποβίτη), τα: R151 και R152. Μετά την αρχική ανοσοποίηση έγιναν τρεις υπενθυμίσεις, 21, 48, και 128 ημέρες μετά τον εμβολιασμό, με την ίδια ποσότητα πρωτεΐνης.

Το σχήμα της ανοσοποίησης έχει ως εξής:
Εμβολιασμός ημέρα 1^η

Υπενθύμιση	ημέρα 21 ^η		
		1 ^η αφαίμαξη:	ημέρα 28 ^η
		2 ^η αφαίμαξη:	ημέρα 35 ^η
Υπενθύμιση	ημέρα 48 ^η		
		3 ^η αφαίμαξη:	ημέρα 56 ^η
		4 ^η αφαίμαξη:	ημέρα 71 ^η
		5 ^η αφαίμαξη:	ημέρα 88 ^η
		6 ^η αφαίμαξη:	ημέρα 100 ^η
Υπενθύμιση	ημέρα 128 ^η		
		7 ^η αφαίμαξη:	ημέρα 136 ^η
		8 ^η αφαίμαξη:	ημέρα 143 ^η

Στα πρώτα τρία δείγματα ορού που συλλέχθηκαν από τα κουνέλια και προσδιορίστηκε ο τίτλος του αντισώματος με την μέθοδο της ELISA. Η τιτλοδότηση έγινε με βάση την απορρόφηση του δείγματος σε μήκος κύματος 280nm και σύμφωνα με την αντιστοιχία: 1mg/ml πρωτεΐνης αντιστοιχεί σε απορρόφηση A=1,4.

Τιτλοδότηση 1^{ης} αφαίμαξης :

R: 151 1,097mg/ml

R: 152 1.9 mg/ml

Τιτλοδότηση 2^{ης} αφαίμαξης :

R: 151 1,91mg/ml

R: 152 1.92 mg/ml

Τιτλοδότηση 3^{ης} αφαίμαξης :

R: 151 2mg/ml

R: 152 2.1 mg/ml

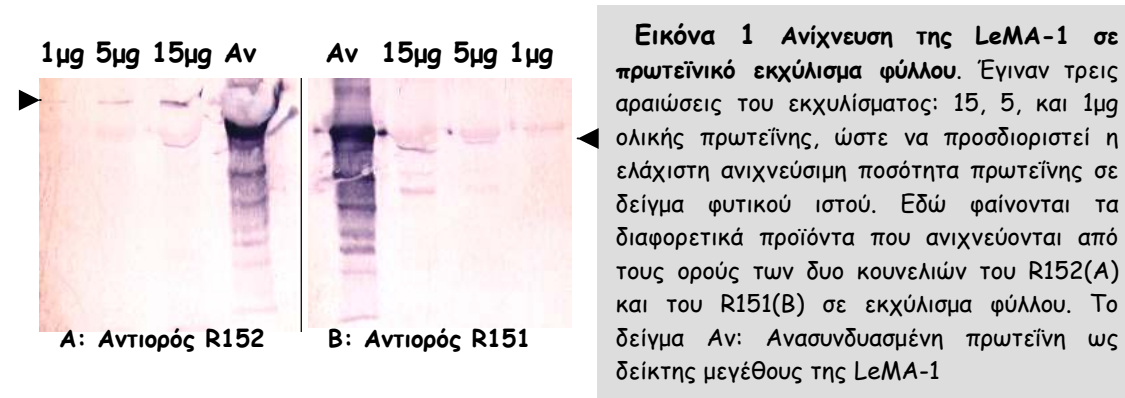
Και στις τρεις περιπτώσεις, ο τίτλος των αντισωμάτων στο κουνέλι R152 ήταν υψηλότερος από τον αντίστοιχο του κουνελιού R151 με μεγαλύτερο αυτόν της 3^{ης} αφαίμαξης, η οποία επιλέχθηκε τελικά για τα επόμενα πειράματα. Συνολικά συλλέχθηκαν οκτώ δείγματα από κάθε κουνέλι, των οποίων ο τίτλος προσδιορίστηκε με ανοσοανίχνευση πρωτεϊνών σε μεμβράνη (Western blot) και όχι με άμεσο προσδιορισμό με την τεχνική της ELISA.

Αρχικά, έγινε μια σειρά από πειράματα με στόχο τον προσδιορισμό των κατάλληλων συνθηκών για την ανίχνευση της πρωτεΐνης με το αντίσωμα με βάση τα οποία επιλέχθηκε η τελική μέθοδος (βλέπε Κεφ. Υλικά και Μέθοδοι). Συνοπτικά, έγινε σειρά πειραμάτων (δεν παρουσιάζονται τα δεδομένα) ώστε να προσδιοριστεί η βέλτιστη σχέση ανάμεσα στο αντιγόνο-αντίσωμα και το αντίσωμα-αντι-αντίσωμα, επίσης δοκιμάστηκαν διάφορες ουσίες σαν

παράγοντες κάλυψης της μεμβράνης (blocking agent). Τα πειράματα αυτά οδήγησαν στην μέθοδο που περιγράφεται στο κεφ. Υλικά και Μέθοδοι.

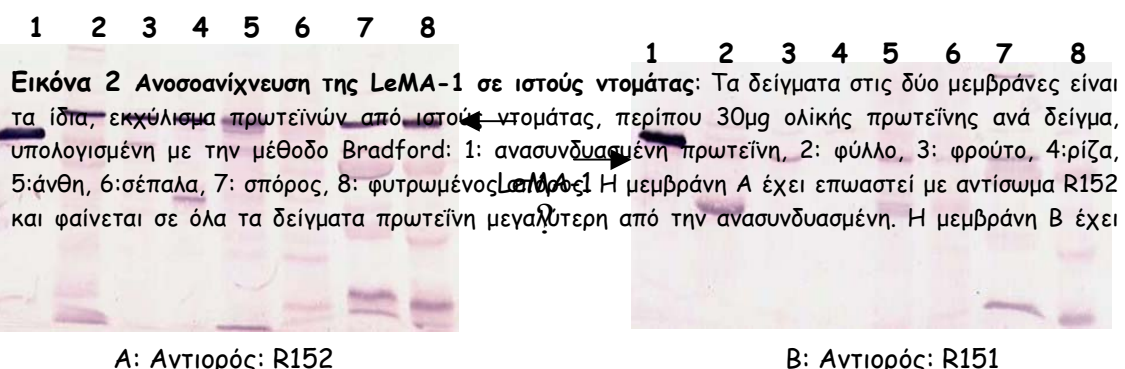
Αρχικά, για την ανίχνευση της ειδικής πρόσδεσης του αντισώματος στην πρωτεΐνη χρησιμοποιήθηκε αντι-αντίσωμα συγκολλημένο με υπεροξειδάση το οποίο αργότερα αντικαταστάθηκε από την αλκαλική φωσφατάση η οποία ανιχνεύει μικρότερες ποσότητες πρωτεΐνης και είναι πιο σταθερή στο χρόνο.

Χρησιμοποιώντας τον αντιορό της 3^{ης} αφαιμάξης του κουνελιού R152 σε πρωτεϊνικό εκχύλισμα φύλλων ντομάτας εντοπίστηκε μια έντονη ζώνη που αντιστοιχεί σε πρωτεΐνη μεγαλύτερη από την ανασυνδρασμένη κατά τουλάχιστον 5-8kDa (εικ. 1A, 2A). Με βάση το υπολογιζόμενο μέγεθος της πρωτεΐνης από την κωδική περιοχή (49.7kDa), το σήμα από την LeMA-1 αναμενόταν χαμηλότερα από την ανασυνδρασμένη δεδομένου ότι το φυτικό προϊόν δεν φέρει την «ουρά» των ιστιδινών.

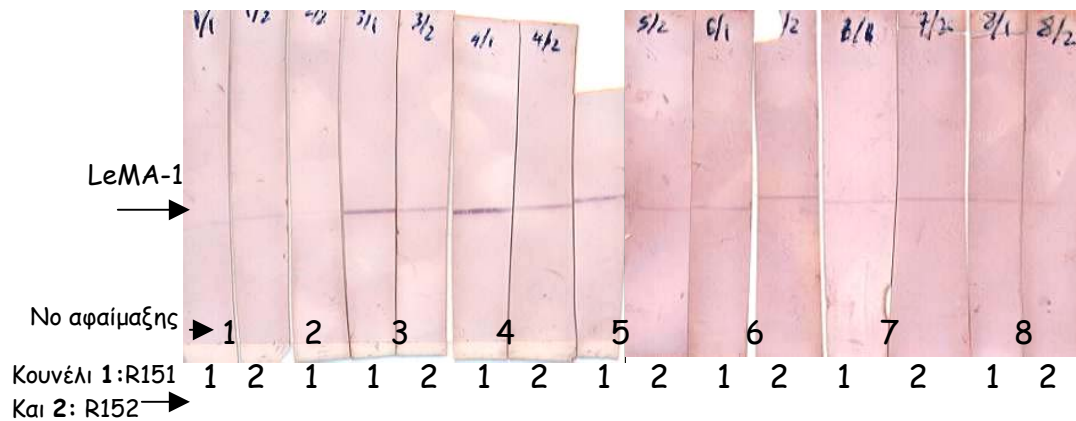


Με τον αντιορό R151 ανιχνεύθηκε μια πρωτεΐνη στο προβλεπόμενο μήκος, χαμηλότερα από την ανασυνδρασμένη (εικ. 1B, 2B). Το σήμα ήταν πολύ ασθενέστερο από αυτό που προέκυψε με τον αντιορό R152 και δεν εμφανιζόταν πάντα σε αντίθεση με την πολύ σταθερή και επαναλήψιμη συμπεριφορά του R152. Αυτό οδήγησε στο εσφαλμένο συμπέρασμα ότι το φυτικό προϊόν (LeMA-1) ανιχνεύεται από τον αντιορό R152 ο οποίος και χρησιμοποιήθηκε στα επόμενα πειράματα, θεωρώντας ότι η φυτική πρωτεΐνη είναι πράγματι μεγαλύτερη από τον απομονωμένο από την βιβλιοθήκη κλώνο (Prombona et al 1995).

Παράλληλα, ολοκληρώθηκε η διαδικασία της ανοσοποίησης και συλλέχθηκαν τα υπόλοιπα δείγματα από τις διαδοχικές αφαιμάξεις των οποίων ο τίτλος ελέγχθηκε με την μέθοδο του Western blot. Όλα τα δείγματα ορού ανίχνευαν το ίδιο προϊόν σε διάλυμα απομονωμένης ανασυνδρασμένης πρωτεΐνης (εικ.,3), παρουσίασαν όμως σημαντικές διαφορές σε φυτικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα (εικ.,4, 5).

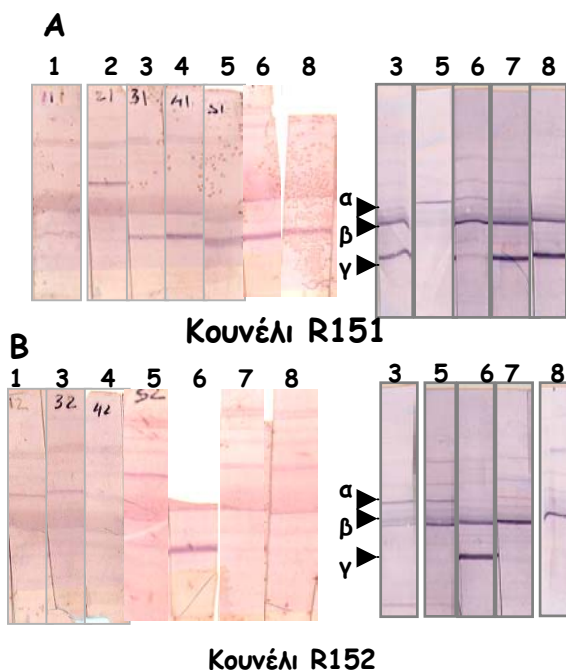


επωαστεί με αντίσωμα R151 όπου ανιχνεύεται πρωτεΐνη στο σωστό μέγεθος αλλά όχι σε όλους τους ιστούς.



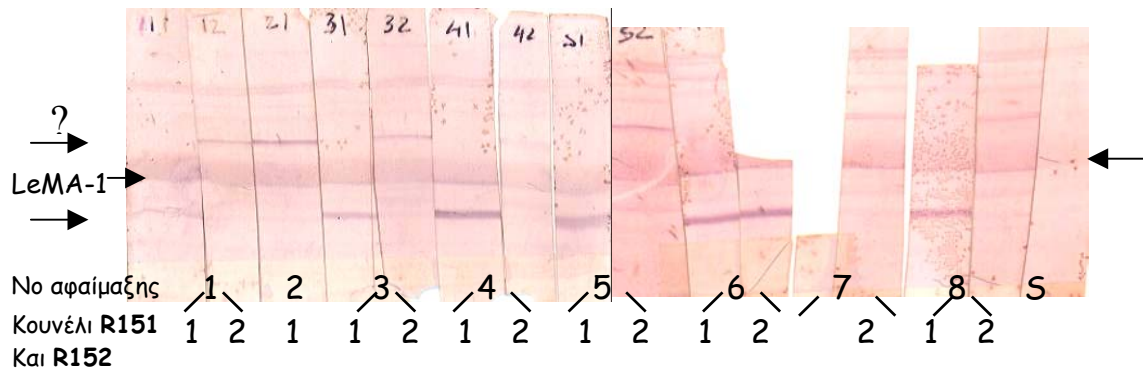
Εικόνα 3: Έλεγχος του τίτλου των αντισωμάτων των οκτώ διαδοχικών αφαιμάξεων που πραγματοποιήθηκαν κατά την διάρκεια της ανοσοποίησης. 100μg ανασυνδυασμένης LeMA-1 αναλύονται σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης 10% χωρίς πηγάδια. Η μεμβράνη, που προκύπτει μετά από ηλεκτρομεταφορά, τεμαχίζεται και κάθε λουρίδα επωάζεται με διαφορετικό δείγμα ορού. Έγιναν οκτώ διαδοχικές αφαιμάξεις από δυο κουνέλια: R151 και R152. Τα δυο αντισώματα αναγνωρίζουν το ίδιο προϊόν με ισχυρότερο τον τίτλο της τέταρτης αφαιμάξης.

Το σήμα του κουνελιού R152 (εικ. 4B δείγματα 1 και 3, ζώνη α), έντονο στις τρεις πρώτες αφαιμάξεις, σταδιακά εξαφανίζεται, και αντιστοιχεί σε πρωτεΐνη μεγαλύτερη της LeMA-1. Στις ίδιες συνθήκες όμως, ο αντιορός R151 δίνει δυο ζώνες, μία αρχικά ασθενέστερη, που αντιστοιχεί σε πρωτεΐνη μικρότερη από την LeMA-1 (εικ. 4A, ζώνη γ), και μια δεύτερη (εικ.4 ζώνη β), που μετά τις δυο υπενθυμίσεις ενισχύεται και αντιστοιχεί στο αναμενόμενο από το cDNA μέγεθος της φυτικής πρωτεΐνης. Η 2^η και 3^η υπενθύμιση έγινε πριν την 3^η και την 7^η αφαιμάξη αντίστοιχα. Μέχρι το σημείο αυτό, τα πειράματα γίνονταν με την 2^η και 3^η αφαιμάξη του κουνελιού 2 τα οποία δίνουν πολύ έντονο σήμα. Το πείραμα αυτό ανέτρεψε τα προηγούμενα πειράματα και κρίθηκε αναγκαίος και απαραίτητος ο ανοσοκαθαρισμός του αντισώματος ώστε να εμπλουτισθεί ο ορός σε ειδικά για την LeMA-1 αντισώματα και να διευκρινιστεί ποιο σήμα από τα δύο αντιστοιχεί τελικά στην πρωτεΐνη LeMA-1 της ντομάτας.



Εικόνα 4 ανοσοανίχνευση της LeMA-1 σε πρωτεϊνικό εκχύλισμα φύλλου **A:** ανίχνευση με το αντίσωμα R151 όλων των αφαιμάξεων. **B:** ανίχνευση με το αντίσωμα R152 όλων των αφαιμάξεων (Τα νούμερα των δειγμάτων αντιστοιχούν στις αφαιμάξεις. Οι υπενθυμίσεις έγιναν πριν την 3^η και την 7^η αφαιμάξη, μετά από αυτές αναμένεται ενίσχυση του τίτλου του ειδικού για την LeMA-1 αντισώματος). Η ζώνη που αντιστοιχεί στην LeMA-1, σύμφωνα με το προβλεπόμενο μέγεθος, είναι η ζώνη β. Ο ορός R151 ανιχνεύει δυο προϊόντα: τη ζώνη β και ένα μικρότερο προϊόν, την ζώνη γ. Ο ορός R152 ανιχνεύει δυο προϊόντα: τη ζώνη β και ένα μεγαλύτερο προϊόν, την ζώνη α. Τα πρώτα πειράματα έγιναν με το αντίσωμα 2 (δείγμα

3, κουνέλι 152) θεωρώντας ότι το πραγματικό σήμα είναι η ζώνη α. Το δείγμα 6 του κουνελιού 2 εμφανίζει την ζώνη γ που εμφανίζεται με τον ορό του κουνελιού 1. Το πείραμα επαναλήφθηκε με το ίδιο αποτέλεσμα, είναι πιθανό να έχουν μπερδευτεί τα δείγματα της αφαιμάξης 6.

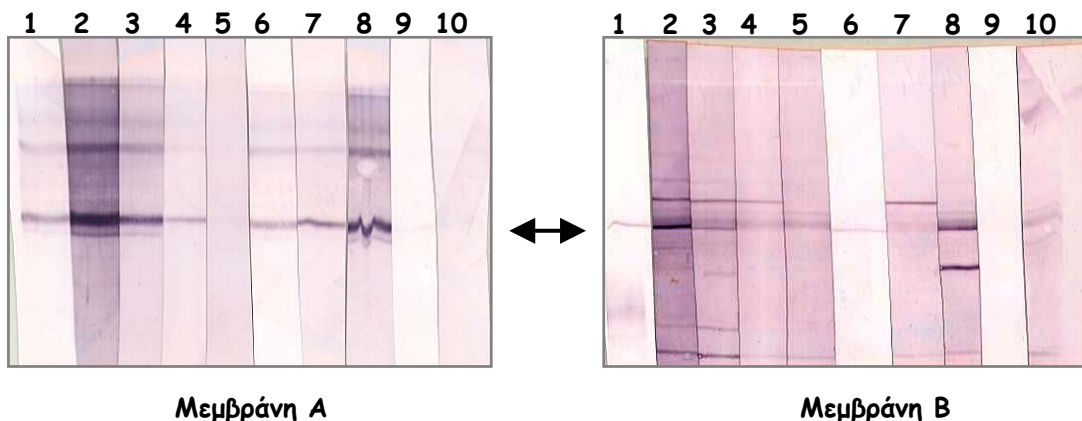


Εικόνα 5 Ανίχνευση της LeMA-1 σε πρωτεϊνικό εκχύλισμα φύλλου, με τις διαδοχικές αφαιμάξεις που πραγματοποιήθηκαν κατά την παραγωγή του αντισώματος για την LeMA-1. S: ορός του κουνελιού R152 πριν την ανοσοποίηση. Σε αποδιατακτικό πήκτωμα χωρίς πηγάδια αναλύεται ποσότητα εκχυλίσματος πρωτεϊνών από φύλλα ντομάτας. Ακολουθεί παρόμοια διαδικασία με εκείνη των μεμβρανών της εικ. 3. Εδώ φαίνεται η διαφορά στα αντισώματα που παράγονται από τα δυο κουνέλια. Ο ορός του κουνελιού R151 αναγνωρίζει διαφορετική πρωτεΐνη από τον αντίστοιχο του κουνελιού R152.

1.1 Καθαρισμός του αντισώματος με στήλη ανοσοσυγγένειας.

Για τον ανοσοκαθαρισμό επιλέχθηκε η 4^η αφαιμάξη της οποίας ο τίτλος ήταν αρκετά υψηλός στους αντιορούς και των δύο κουνελιών (εικ 4A και 4B, δείγμα 4).

Έγιναν συνολικά τέσσερις ανοσοκαθαρισμοί, δυο δείγματα από κάθε αντιορό, από τους οποίους προέκυψαν 5 ml καθαρισμένου αντισώματος για τον καθένα. Το τελικό διάλυμα ελέγχθηκε όσον αφορά την ειδική αναγνώριση της LeMA-1 σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα φύλλου ντομάτας (εικ. 6B), καθώς και σε διάλυμα ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης σε σύγκριση με τον μη καθαρισμένο αντιορό (εικ. 6A). Μετά τον ανοσοκαθαρισμό, τα δύο αντισώματα (R151 και R152) παρουσιάζουν την ίδια εικόνα. Η μεγαλύτερη έντονη ζώνη του ορού 2 εξαφανίστηκε, ενώ παράλληλα και στους δυο αντιορούς ενισχύθηκε η ζώνη που αντιστοιχεί στο υπολογιζόμενο μέγεθος της LeMA-1 στο φυτό.



Εικόνα 6 Σύγκριση των αποτελεσμάτων ανοσοανίχνευσης της LeMA-1 με τους αντιορούς των δυο κουνελιών μετά τον ανοσοκαθαρισμό των ορών. Στην μεμβράνη **A** αναλύονται 100μg ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης σε πήκτωμα χωρίς πηγάδια, ενώ στην μεμβράνη **B** με ανάλογο τρόπο αναλύονται 150μg πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από φύλλα ντομάτας. Οι μεμβράνες τεμαχίζονται σε δέκα λουρίδες και κάθε λουρίδα επωάζεται με κατάλληλο δείγμα ορού. Μετά τον ανοσοκαθαρισμό η εικόνα των δυο ορών είναι όμοια (δείγματα A1, A6, B1, B6), και οι δυο ανιχνεύουν μόνο ένα προϊόν που αντιστοιχεί στην LeMA-1 με βάση το προβλεπόμενο από το cDNA μέγεθος της πρωτεΐνης .

- | | |
|---|---|
| 1: P1 το ανοσοκαθαρισμένο αντίσωμα R151 | 6: P2 το ανοσοκαθαρισμένο αντίσωμα R152 |
| 2: 2 ^η αφαίμαξη του R151 | 7: 2 ^η αφαίμαξη του R152 |
| 3: 3 ^η αφαίμαξη του R151 | 8: 3 ^η αφαίμαξη του R152 |
| 4: 5 ^η αφαίμαξη του R151 | 9: 5 ^η αφαίμαξη του R152 |
| 5: ορός του R151 πριν την ανοσοποίηση | 10: ορός του R152 πριν την ανοσοποίηση |

Ακόλουθα έγινε πείραμα διακριτικότητας του αντισώματος και προσδιορίστηκε η ελάχιστη ποσότητα αντιγόνου που ανιχνεύεται σε αυτές τις συνθήκες σε δείγμα ολικής φυτικής πρωτεΐνης καθώς και σε διάλυμα ανασυνδυασμένης LeMA-1 γνωστής συγκέντρωσης. Στις συνθήκες ρουτίνας του πειράματος (Western blot) και σε αραιώση 1:8000 ανιχνεύεται ποσότητα 0.05μg πρωτεΐνης σε διάλυμα πρωτεΐνης (Εικόνα 7), ενώ η ζώνη εντοπίζεται μέχρι και σε εκχύλισμα 5μg συνολικής πρωτεΐνης από φύλλο ντομάτας (δεν παρουσιάζονται δεδομένα).



Εικόνα 7 Προσδιορισμός ευαισθησίας της ανοσοανίχνευσης της LeMA-1 με τον εμπλουτισμένο αντιορό. Σε αποδιατακτικό πήκτωμα αναλύονται δείγματα ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης σε διαδοχικές αραιώσεις ξεκινώντας από 50μg και αραιώνοντας κάθε φορά στο 1/10. Τα πρώτα τρία δείγματα κάθε μεμβράνης κόπηκαν και απομακρύνθηκαν από το διάλυμα των χρωμογόνων ουσιών (NBT/BCIP) αμέσως μόλις εμφανίστηκαν οι ζώνες, δευτερόλεπτα μετά την εμφάνισή τους στο διάλυμα. Η υπόλοιπη μεμβράνη αφήνεται μέχρι να εμφανιστούν και οι υπόλοιπες ζώνες.

Σε όλα τα επόμενα πειράματα χρησιμοποιήθηκε μόνο ανοσοκαθαρισμένος αντιορός και κυρίως αυτός του κουνελιού 2 (P2), ο οποίος εμφανίζει ενισχυμένο τίτλο σε σχέση με τον P1, σε αραιώση 1:8000 σε TBS.

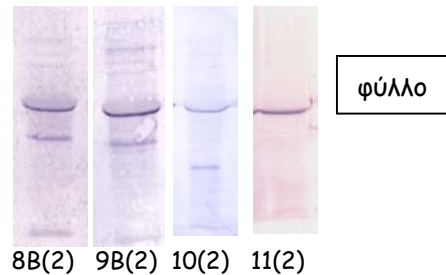
2. Πειράματα ανοσοεντοπισμού της LeMA-1 σε φυτά.

2.1 Η LeMA-1 εντοπίζεται σε όλους τους φυτικούς ιστούς.

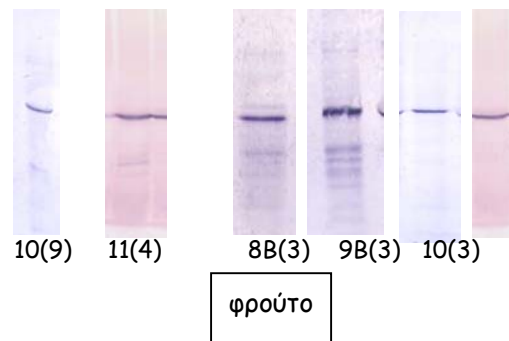
Από τα πρώτα πειράματα με το ανοσοκαθαρισμένο αντίσωμα παρατηρείται ότι σε πρωτεϊνικό εκχύλισμα φύλλων ανιχνεύεται μια αρκετά σημαντική ποσότητα πρωτεΐνης (Εικόνα 1B)

Για να γίνει έλεγχος πιθανής ιστο-ειδίκευσης της πρωτεΐνης παρασκευάστηκαν πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από τα βασικά μέρη του φυτού : φύλλα, άνθη χωρίς τα σέπαλα, σέπαλα, ρίζα, φρούτο (άωρο -πράσινο- και ώριμο) και σπόρια.

Σε πρωτεϊνικό εκχύλισμα φύλλων εντοπίζεται πάντα μια ζώνη στο προβλεπόμενο μήκος (εικ. 8B, 9B, 10 και 11 δείγμα 2).

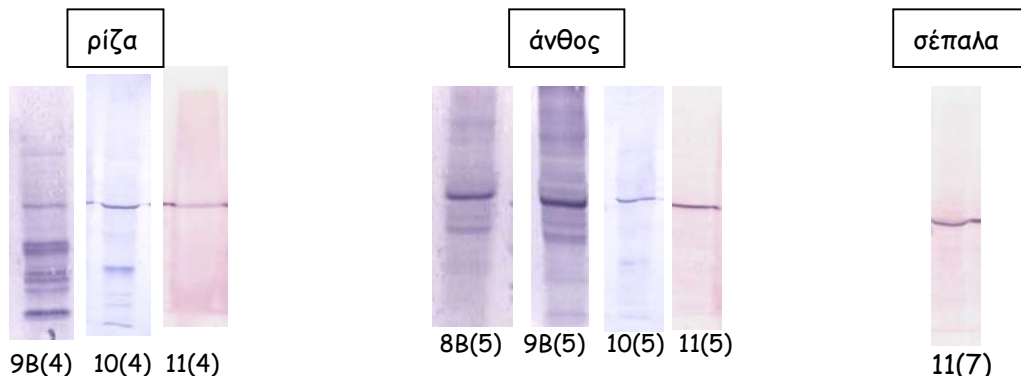


Έγινε έλεγχος της παρουσίας της LeMA-1 σε φρούτο ντομάτας σε τρία διαφορετικά στάδια σχηματισμού του καρπού: άωρο, τις πρώτες ημέρες του σχηματισμού του (εικ. 10 δείγμα 9), σχηματισμένο αλλά πράσινο (εικ. 11 δείγμα 4) και ώριμο φρούτο (κόκκινο) (εικ. 8B δείγμα 3, εικ. 9B δείγμα 3, εικ. 10 δείγμα 3 και εικ. 11 δείγμα 3).

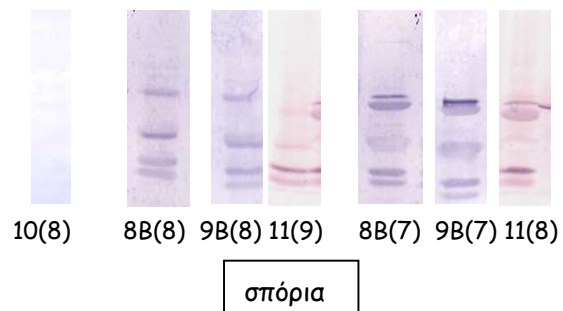


Η πρωτεΐνη εντοπίζεται και στα τρία στάδια σχηματισμού του φρούτου χωρίς να παρατηρούνται αλλαγές στην ποσότητα ή το μέγεθος της πρωτεΐνης στα δείγματα αυτά.

LeMA-1 εντοπίζεται επίσης στις ρίζες (εικ. 9B, 10 και 11 δείγμα 4) και στα άνθη (έχουν αφαιρεθεί τα σέπαλα) (εικ. 8B, 9B, 10 και 11 δείγμα 5) όπως και στα σέπαλα (εικ. 11 δείγμα 7).

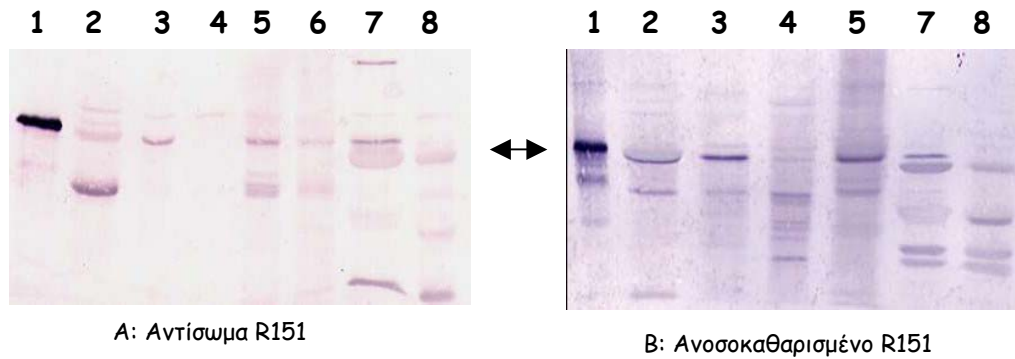


Για να μελετηθεί η παρουσία της πρωτεΐνης σε σπόρια, αναλύθηκαν σπόρια ντομάτας σε τρία στάδια του κύκλου ζωής τους: ανώριμα σπόρια (εικ.10 δείγμα 8) (αφαιρέθηκαν από ανώριμο φρούτο), ώριμα σπόρια (εικ. 8B, 9B δείγμα 7 και 11 δείγμα 8) και σπόρια από σποριόφυτο (αφαιρέθηκε το φυτάριο) (εικ. 8B και 9B δείγμα 7 και εικ. 11 δείγμα 8).



Η πρωτεΐνη εντοπίζεται σε σπόρια, ενώ δεν ανιχνεύεται σε ανώριμα σπόρια. Σε βλαστώνοντα σπόρια ανιχνεύονται μόνο μικρότερα προϊόντα πιθανόν αποτέλεσμα αποδόμησης της πρωτεΐνης κατά την γένεση του νέου φυτού.

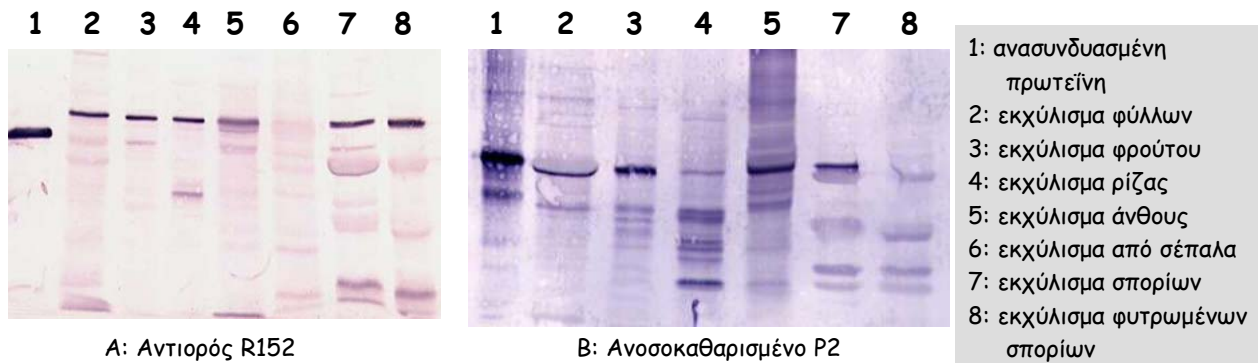
Σε όλες τις περιπτώσεις ανιχνεύεται παρόμοια ποσότητα πρωτεΐνης σε δείγμα ίδιας περιεκτικότητας σε ολική πρωτεΐνη χωρίς να παρατηρείται διαφοροποίηση στην ποσότητα, το μέγεθος ή την ηλεκτροφορητική συμπεριφορά.



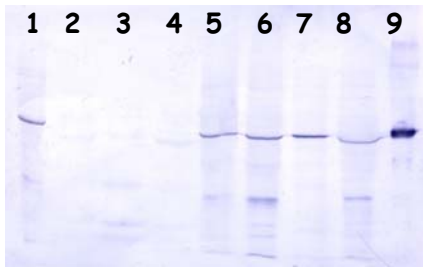
Εικόνα 8 Διαφορές της εικόνας του αντιορού 151 μετά τον ανοσοκαθαρισμό. Σύγκριση της εικόνας του αντιώματος R151 της LeMA-1 σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από ιστούς ντομάτας. Σε κάθε δείγμα υπολογίζεται ποσότητα συνολικής πρωτεΐνης 27-30μg περίπου. Τα δείγματα βρίσκονται με την ίδια σειρά στις δύο μεμβράνες και είναι:

- | | |
|----------------------------|------------------------------------|
| 1: ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη | 5: εκχύλισμα άνθους |
| 2: εκχύλισμα φύλλων | 6: εκχύλισμα από σέπαλα |
| 3: εκχύλισμα φρούτου | 7: εκχύλισμα από σπόρια |
| 4: εκχύλισμα ρίζας | 8: εκχύλισμα από φυτρωμένα σπόρια. |

Η μεμβράνη A έχει επωαστεί με το αντίσωμα R151, ενώ η μεμβράνη B με το αντίσωμα P1(R151) μετά τον ανοσοκαθαρισμό. (Στη μεμβράνη B δεν υπάρχει δείγμα για σέπαλα -No 6-).

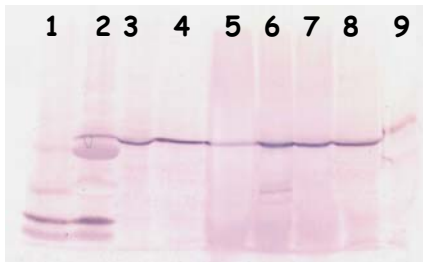


Εικόνα 9 Διαφορές στην εικόνα του αντιορού R152 μετά τον ανοσοκαθαρισμό. Σε κάθε δείγμα υπολογίζεται ποσότητα συνολικής πρωτεΐνης 27-30μg περίπου. Η μεμβράνη A έχει επωαστεί με το αντίσωμα R152, και η μεμβράνη B με το αντίσωμα P2(R152), δηλαδή το δείγμα που προκύπτει μετά τον καθαρισμό. (Στη μεμβράνη B δεν υπάρχει δείγμα για σέπαλα -No 6-).



Εικόνα 10 Ανίχνευση της LeMA-1 σε ιστούς ντομάτας:

- | | |
|---------------------|---------------------------|
| 1: ανώριμο φρούτο | 6: ρίζα |
| 2: ανώριμα σπόρια | 7: ώριμο φρούτο |
| 3: φυτρωμένα σπόρια | 8: φύλλο |
| 4: σπόρια | 9: Ανασυνδασμένη πρωτεΐνη |
| 5: άνθος | |



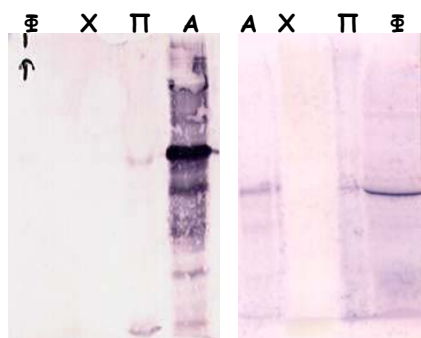
Εικόνα 11 Ανίχνευση της LeMA-1 σε ιστούς ντομάτας:

- | | |
|---------------------|---------------------------|
| 1: φυτρωμένα σπόρια | 6: ανώριμο φρούτο |
| 2: σπόρια | 7: ώριμο φρούτο |
| 3: σέπαλα | 8: φύλλο |
| 4: άνθος | 9: Ανασυνδασμένη πρωτεΐνη |
| 5: ρίζα | |

Με βάση τα βιβλιογραφικά δεδομένα η παρουσία της LeMA-1 σε όλους τους ιστούς του φυτού είναι αναμενόμενη, αφού συμμετέχει στο σχηματισμό του συμπλόκου της 26S πρωτεΐνης η οποία βρίσκεται σε όλα τα κύτταρα ευκαρυωτικών οργανισμών (βλέπε 26S πρωτεΐνη Κεφ Β, παρ 2).

2.2 Η LeMA-1 εντοπίζεται σε πυρήνες αλλά όχι σε χλωροπλάστες.

Παράλληλα έγινε έλεγχος της παρουσίας της πρωτεΐνης στα υποκυτταρικά οργανίδια πυρήνες και χλωροπλάστες. Απομονώθηκαν πυρήνες και χλωροπλάστες των οποίων η καθαρότητα και ομογένεια ελέγχθηκε με παρατήρηση στο μικροσκόπιο. Ακόλουθα, τα διαλύματα τροποποιήθηκαν (συμπυκνώθηκαν ή αραιώθηκαν) ώστε η τελική συγκέντρωση ολικής πρωτεΐνης να είναι 0,5-1μg/μl. Το διάλυμα των πυρήνων συνήθως συμπυκνώθηκε με κατακρήμνιση με τριχλωροξικό οξύ (TCA) και επαναδιάλυση σε κατάλληλο όγκο 0.1 NaOH, ενώ οι χλωροπλάστες συνήθως αραιώθηκαν υπολογισθηκάν με βάση την περιεκτικότητα της χλωροφύλλης του δείγματος (βλέπε Υλικά και Μεθ.). Πρωτεΐνη LeMA-1 ανιχνεύθηκε σε απομονωμένους πυρήνες σε περιεκτικότητα ανάλογη των υπολοίπων ιστών του φυτού, ενώ σε καμία περίπτωση δεν εντοπίσθηκε παρουσία της LeMA-1 σε εκχύλιμα απομονωμένων χλωροπλαστών (εικ. 12).



Αντίσωμα R151

Ανοσοκαθαρισμένο
P2(R152)

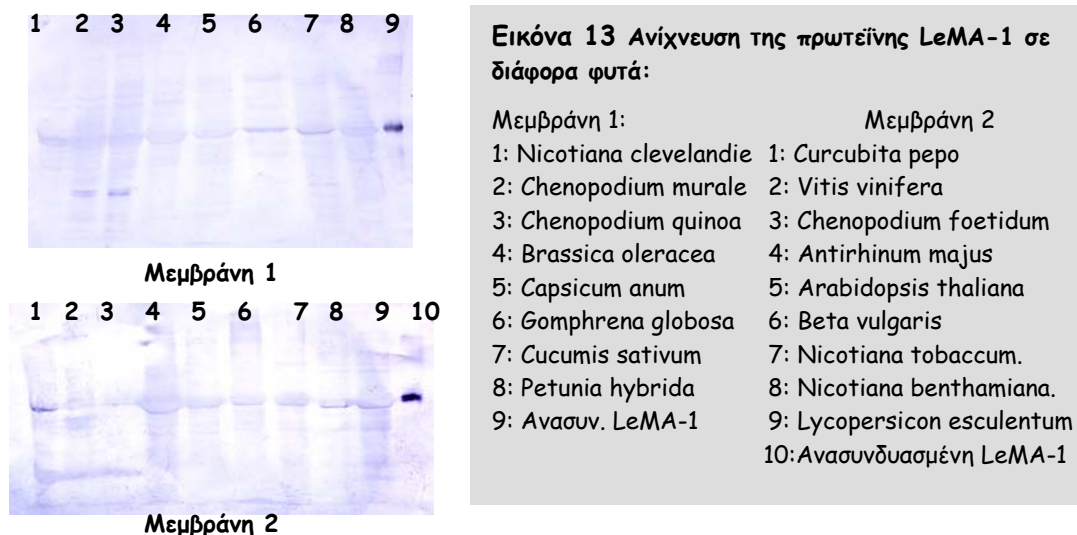
Εικόνα 12 Ανοσοανίχνευση της LeMA-1 σε εκχύλιμα χλωροπλαστών και πυρήνων. Η LeMA-1 ανιχνεύεται σε πυρήνες, όχι όμως και σε χλωροπλάστες.

- | |
|---------------------------|
| A: Ανασυνδασμένη πρωτεΐνη |
| Π: Εκχύλιμα πυρήνων |
| X: Εκχύλιμα χλωροπλαστών |
| Φ: Εκχύλιμα φύλλων |

Η παρουσία της LeMA-1 σε πυρήνες ήταν αναμενόμενη δεδομένου ότι και οι υπόλοιπες πρωτεΐνες της ομάδας βρίσκονται και στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων που ελέγχθηκαν (βλέπε AAA ATPases Κεφ Α, Παρ 2.2), και έχουν σχέση με την μεταγραφική μηχανή. Για την παρουσία της σε χλωροπλάστες δεν υπάρχουν στοιχεία στην βιβλιογραφία. Με βάση τα δεδομένα επανειλημμένων προσπαθειών ανοσοεντοπισμού της σε χλωροπλάστες, η LeMA-1 δεν βρίσκεται στο οργανίδιο αυτό.

2.3 Η LeMA-1 εντοπίζεται σε φύλλα διαφόρων φυτών.

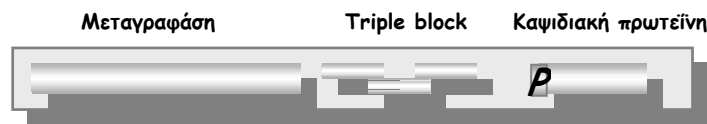
Η LeMA-1 ανήκει σε μια μεγάλη οικογένεια ομόλογων πρωτεϊνών, τις AAA πρωτεΐνες οι οποίες εμφανίζουν υψηλά ποσοστά αμινοξικής ομολογίας ειδικά στην περιοχή πρόσδεσης του ATP. Ειδικότερα, τα μέλη της υποοικογένειας των πρωτεασωμικών ATPασών στην οποία ανήκει παρουσιάζουν εξαιρετικά υψηλά ποσοστά ομολογίας. Με βάση το γεγονός αυτό θεωρήθηκε πιθανό το ειδικό αντι-LeMA-1 αντίσωμα να αναγνωρίζει τις ομόλογες της LeMA-1 σε άλλα φυτά. Με στόχο τον εντοπισμό ομόλογων πρωτεϊνών σε άλλα φυτά συλλέχθηκαν δείγματα φύλλων από πλειάδα φυτών από τα οποία απομονώθηκαν πρωτεΐνες και υποβλήθηκαν σε έλεγχο ανοσοεντοπισμού πρωτεΐνης με το αντίσωμα της LeMA-1. Όπως ήταν αναμενόμενο από τα βιβλιογραφικά δεδομένα, σε όλα τα δείγματα εντοπίστηκε ζώνη ίδιας ηλεκτροφορητικής συμπεριφοράς με την LeMA-1 της ντομάτας (εικ 13) με εξαίρεση τα δείγματα των *chenopodium species* (δείγματα 2,3 στην μεμβράνη 1 και δείγμα 3 στη μεμβράνη 2) και του αμπελιού (δείγμα 2 στη μεμβράνη 2), πιθανόν η αμινοξική ομολογία της πρωτεΐνης να μην είναι τέτοια που να επιτρέπει τον ανοσοεντοπισμό της από το αντίσωμα της LeMA-1.



3. Πειράματα υπερέκφρασης της LeMA-1 σε φυτά με το σύστημα του PVX

3.1 Το σύστημα έκφρασης ξένων γονιδίων σε φυτά μέσω του ιικού φορέα PVX.

Ένα από τα εργαλεία που συνήθως επιλέγεται για την μελέτη της λειτουργίας του προϊόντος ενός γονιδίου είναι η διαταραχή των ποσοτήτων της λειτουργικής πρωτεΐνης στο κύτταρο, στόχος που επιτυγχάνεται είτε με καταστολή της μεταγραφής του γονιδίου είτε με υπερέκφραση. Στην αρχή της εργασίας αυτής, οι Charman *et. al.*, (1992) δημοσίευσαν μια απλή και γρήγορη μέθοδο έκφρασης ξένων γονιδίων σε φυτά μέσω ενός ιού, του ιού της πατάτας X (PVX, Potato Virus X), η οποία φάνηκε να αποτελεί ένα καλό εργαλείο για την μελέτη της LeMA-1 σε φυτά ντομάτας. Ο ιός PVX προσβάλλει τις ντοματιές αλλά δεν τους προκαλεί μεγάλη ζημιά επιτρέποντας έτσι την παρατήρηση φαινομένων που τυχόν προκαλούνται από την έκφραση ξένων γονιδίων μέσω του ιού αυτού.



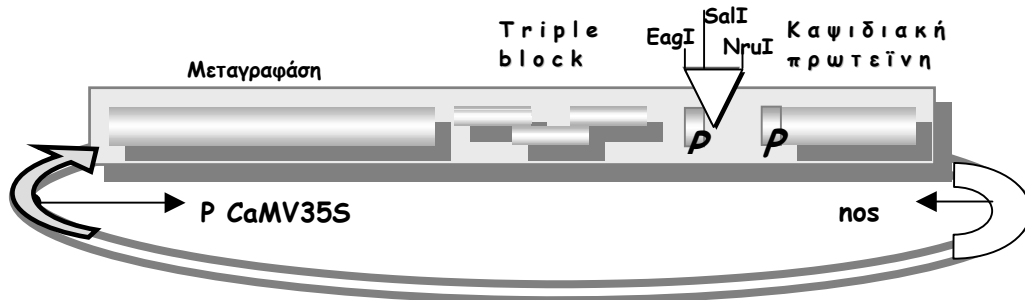
Εικόνα 14 Χάρτης του γενετικού υλικού του ιού της πατάτας X (PVX). Κωδικοποιούνται πέντε πρωτεΐνες: η μεταγραφάση του ιού, τρεις αλληλοεπικαλυπτόμενες πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην μεταφορά του ιού στο σύστημα του φυτού, και η καψιδιακή πρωτεΐνη.

Ο PVX είναι φυτικός RNA ιός 6.4Kb το γένωμα του οποίου κωδικοποιεί για πέντε πρωτεΐνες (εικ. 14): την μεταγραφάση, 166KDa, τρεις πρωτεΐνες 25, 8 και 12KDa με αλληλοεπικαλυπτόμενες κωδικές περιοχές (triple block) που συμμετέχουν στην μεταφορά του ιού από κύτταρο σε κύτταρο, ενώ η μια από αυτές, (η 25K) συμμετέχει και στην παρεμπόδιση του φαινομένου της μετα-μεταγραφικής σίγησης μέσω RNA (RNA silencing), και τέλος την καψιδιακή πρωτεΐνη (33KDa) (εικ. 14).

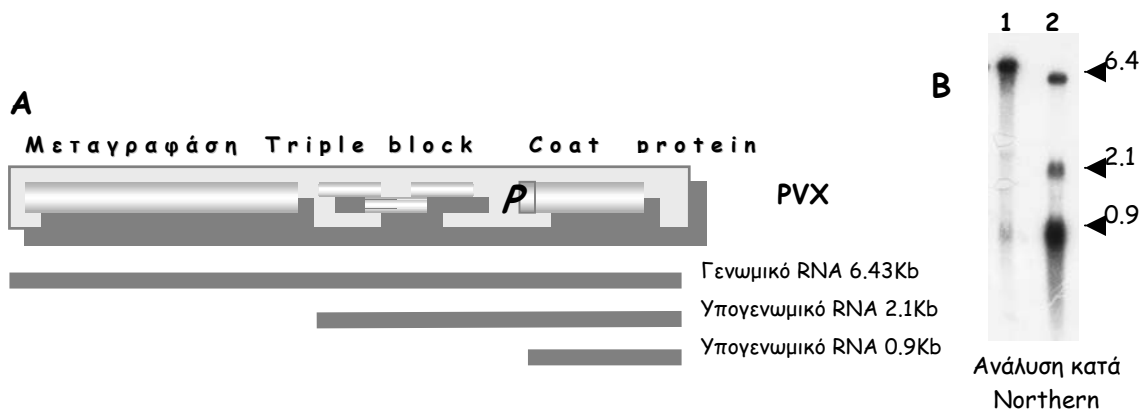
Με αναδιπλασιασμό του υπογενωμικού υποκινητή της καψιδιακής πρωτεΐνης δημιουργείται θέση ένθεσης γονιδίων στο γενετικό υλικό του ιού τα οποία εκφράζονται κάτω από τον έλεγχο του ισχυρού αυτού υποκινητή (εικ. 15). Οι Charman *et. al.*, (1992) παρατήρησαν ότι οι ξένες αλληλουχίες στην περιοχή αυτή δεν παρεμποδίζουν την μολυσματικότητα και κινητικότητα του ανασυνδυσμένου ιού ο οποίος έτσι λειτουργεί σαν φορέας ξένων γονιδίων στα φυτά που μολύνονται με αυτόν, η ένθεση όμως επηρεάζει τα επίπεδα των υπογενωμικών RNA τα οποία εμφανίζονται ελαττωμένα όταν ο ιός φέρει ξένες αλληλουχίες (εικ. 17, και 16B).

Τοποθέτησαν την πλήρη αλληλουχία του ιού κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή της T7 πολυμεράσης του RNA σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα που επιτρέπει την *in vitro* μεταγραφή του ιού ώστε να χρησιμοποιηθεί σαν μολυσματικό υλικό (PVX-GC3).

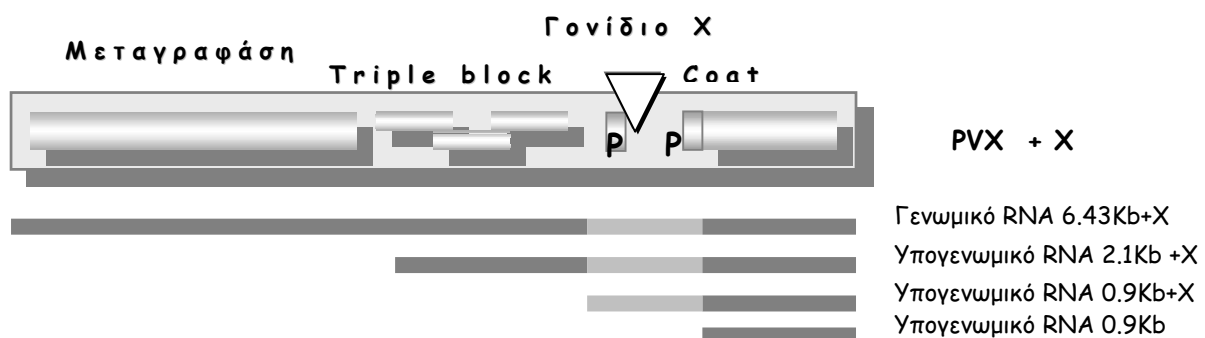
Η κατασκευή βελτιώθηκε με την κλωνοποίηση του τροποποιημένου σε φορέα ιού σε πλασμιδιακό φορέα κάτω από τον έλεγχο του ισχυρού φυτικού υποκινητή CaMV35S και σήμα τερματισμού nos (nopaline synthase) (Sablowski *et. al.*, 1995). Το πλεονέκτημα της κατασκευής αυτής είναι ότι τα φυτά μολύνονται με πλασμιδιακό DNA, το οποίο μέσα στο κύτταρο παράγει το ιικό RNA που οδηγεί σε πολλαπλασιασμό του ιού και εγκατάσταση της μόλυνσης. Παράλληλα όμως με τις ιικές πρωτεΐνες παράγεται και η πρωτεΐνη της ένθεσης που φέρει ο ιός (εικ. 17), η οποία είναι ανιχνεύσιμη (με αντίσωμα) μετά την πάροδο 15 ημερών από την μόλυνση.



Εικόνα 15 Ο ιικός φορέας PVX-202 (Sablowski et al 1995) Το γενετικό υλικό του ιού κλωνοποιείται σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα ενώ παράλληλα έχει δημιουργηθεί περιοχή ένθεσης ξένων γονιδίων κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή της καψιδιακής πρωτεΐνης με κατάλληλο αναδιπλασιασμό της αλληλουχίας του.



Εικόνα 16 A: Σχήμα έκφρασης του ιού της πατάτας X σε φυτά. Οι πρωτεΐνες του ιού παράγονται από τρία RNA: το γενωμικό, 6453 νουκλεοτίδια από το οποίο εκφράζεται η μεταγραφάση, το υπογενωμικό 2.1Kb από το οποίο εκφράζονται οι πρωτεΐνες του triple block και τέλος το υπογενωμικό 0.9Kb από το οποίο παράγεται η καψιδιακή πρωτεΐνη. **B:** αυτοραδιογραφία των ιικών RNA με ανιχνευτή την καψιδιακή πρωτεΐνη του PVX σε 1: φυτό x r2Lema και 2: φυτό x rPVX202.



Εικόνα 17 Σχήμα έκφρασης ξένων γονιδίων μέσω του συστήματος του PVX. Το γονίδιο της ένθεσης εκφράζεται μέσω ενός τρίτου υπογενωμικού RNA.

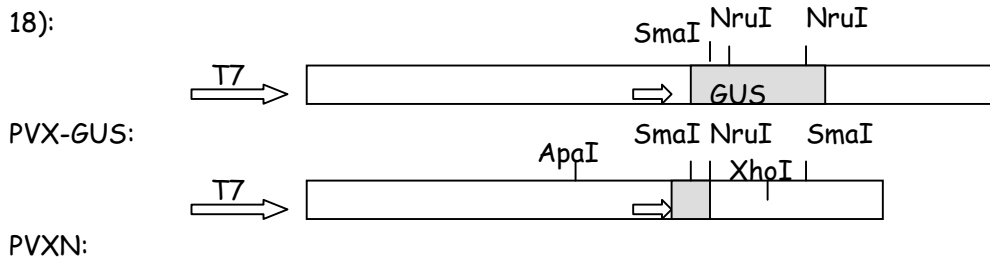
3.2 Κατασκευές

Αρχικά χρησιμοποιήθηκε ο κλώνος GC3 του PVX (Charman et al., 1992), που φέρεται σε πλασμίδιο από το οποίο παράγεται *in vitro* μολυσματικό RNA από την RNA πολυμεράση T7 με το οποίο μολύνονται τα φυτά. Ο κλώνος δεν ήταν σταθερός και μετά από κάποιους κύκλους αναδιπλασιασμού σε φυτά χάνει την ένθεση και η πρωτεΐνη σταματά να παράγεται. Τα πρώτα πειράματα έγιναν με κατασκευές στον GC3 ο οποίος αργότερα αντικαταστάθηκε από τον σταθερότερο pPVX202 όπου το γένωμα του PVX ελέγχεται από τον υποκινητή CaMV35S και η μόλυνση γίνεται με πλασμιδιακό DNA και όχι με RNA.

3.2.1 Κατασκευές σε GC3:

PVX-Lema:

Το πλασμίδιο που μας παραχωρήθηκε από τον Dr. Baulcombe, το **PVX-GC3** περιέχει τις ακολουθίες του γονιδίου της β-γλυκουρονιδάσης (*GUS*). Από αυτό το πλασμίδιο αφαιρέθηκε το μεγαλύτερο μέρος της *Gus* με πέψη με NruI και αυτοσυγκόλληση οπότε προέκυψε το πλασμίδιο **PVXN** το οποίο φέρει ακόμη τα 13 αρχικά αμινοξέα του *GUS* (εικ. 18):

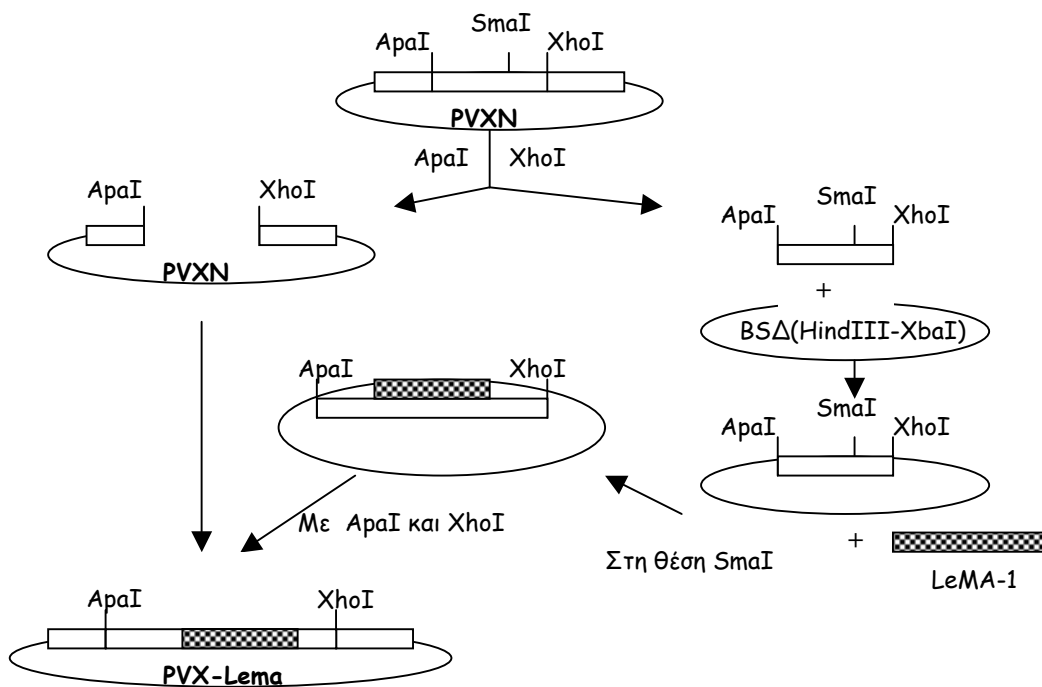


Εικόνα 18 Χάρτης περιοριστικών θέσεων στο πλασμίδιο PVX-GUS. Με περιοριστική πέψη με το ένζυμο NruI και ακόλουθα αυτοσυγκόλληση του πλασμιδίου αφαιρείται το μεγαλύτερο μέρος του γονιδίου *GUS* και προκύπτει το πλασμίδιο PVXN.

Η κωδική περιοχή της LeMA-1 μήκους 1442 νουκλεοτιδίων (το BspEI-HindIII τμήμα του m10a) εισέρχεται στο πλαίσιο διαβάσματος του *GUS* στην θέση SmaI του φορέα, μετά από «γέμισμα» των άκρων με την EcoRI υπομονάδα Kleow. Όλες οι απόπειρες κλωνοποίησης με τον τρόπο αυτό απέτυχαν, είτε απευθείας στον PVX-GC3 (μετά από μερική πέψη με SmaI και ακόλουθα με NruI), είτε στον PVXN μετά από μερική πέψη με SmaI.

Για τις ανάγκες της παραπάνω κλωνοποίησης (εικ. 19), χρησιμοποιήθηκε ο φορέας **Bluescript(KS II)** του οποίου η περιοριστική θέση SmaI αφαιρέθηκε μετά από πέψη με HindIII-XbaI, συμπλήρωση των άκρων με Kleow και αυτοσυγκόλληση οπότε προέκυψε το πλασμίδιο **BSΔ(HindIII-XbaI)**. Στο πλασμίδιο αυτό κλωνοποιήθηκε, στις αντίστοιχες θέσεις, το τμήμα AraI-XhoI του φορέα PVXN, με αποτέλεσμα το πλασμίδιο **BSX** το οποίο περιέχει το AraI-XhoI κομμάτι του PVXN με την θέση κλωνοποίησης SmaI μία μόνο φορά. Ακολούθησε εισαγωγή του BspEI-HindIII τμήματος του m10a (LeMA-1) στην περιοριστική θέση SmaI, οπότε προέκυψε το πλασμίδιο **BSL**, και προσδιορίστηκε η αλληλουχία του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου στην περιοχή της σύνδεσης.

Το τμήμα της LeMA-1 έχει εισαχθεί στο πλαίσιο διαβάσματος του γονιδίου *GUS*, με έλλειψη τριών νουκλεοτιδίων (κυτοσινίων) από τα άκρα, αποτέλεσμα της πρόσμιξης με δραστηριότητα εξωνουκλεάσης της SmaI. Τέλος, απομονώθηκε το τμήμα AraI-XhoI του BSL που περιέχει την LeMA-1 και κλωνοποιήθηκε στις αντίστοιχες θέσεις του PVXN δίνοντας έτσι το τελικό πλασμίδιο **PVX-LeMA-1**, το οποίο περιέχει την LeMA-1 στην θέση έκφρασης ξένων γονιδίων στο γένωμα του ιού PVX.



Εικόνα 19 Σχήμα κλωνοποίησης της LeMA-1 στους φορείς PVX-GC3 και pPVX202

3.2.2 Κατασκευές στον pPVX202.

3.2.2.1 p2Lema

Τα πρώτα πειράματα υπερέκφρασης της LeMA-1 σε φυτά έγιναν με το πλασμίδιο PVX-LeMA-1 με δυο βασικά μειονεκτήματα: πρώτον, η μόλυνση γίνεται με *in vitro* παραγόμενο RNA και δεύτερον, ο φορέας δεν είναι σταθερός στα φυτά, χάνει την ένθεση λίγες μέρες μετά την μόλυνση. Ο φορέας αντικαταστάθηκε από νέο πλασμίδιο το οποίο κατασκευάστηκε από τον Dr. Baulcombe το pPVX202. Στον pPVX202 το γένωμα του ιού βρίσκεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή CaMV35S. Τα φυτά μολύνονται με πλασμιδιακό DNA και οι κατασκευές είναι σταθερότερες.

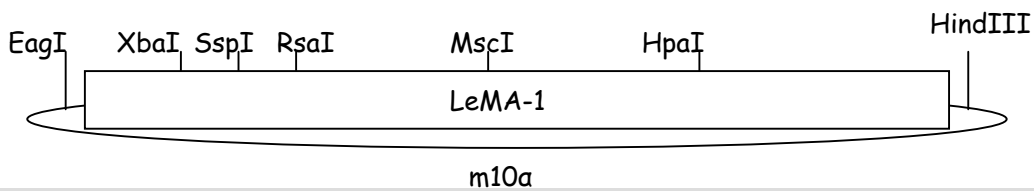
Η LeMA-1 κλωνοποιήθηκε σε pPVX202 (το κομμάτι EagI-HindIII του m10a στις θέσεις EagI-SalI(blunt) του pPVX202, ο κλώνος ονομάστηκε pHind, αλλά δεν ήταν μολυσματικός.

Το γενετικό υλικό του ιού είναι το ίδιο στους φορείς PVX-GC3 και pPVX202, και συνεπώς οι αλληλουχίες που συμπεριλαμβάνονται στο ApaI-XhoI τμήμα του PVX-GC3 διαφέρουν από τις αντίστοιχες του pPVX202, μόνο στην θέση της κλωνοποίησης. Με βάση αυτό, η LeMA-1 κλωνοποιήθηκε στον pPVX202 μεταφέροντας το ApaI-XhoI τμήμα του BSL στις αντίστοιχες θέσεις του pPVX202, το πλασμίδιο ονομάστηκε **p2Lema** και ήταν μολυσματικό. Η πρωτεΐνη εκφράζεται σε σύντηξη με 13 αμινοξέα της πρωτεΐνης Gus στο άμινο-τελικό της άκρο.

3.2.2.2 Κατασκευές ελλείψεων

Με στόχο την δομική μελέτη της πρωτεΐνης αποφασίστηκε να κατασκευαστούν ελλειπτικά τμήματα της πρωτεΐνης τα οποία θα εκφράζονταν μέσω του PVX σε φυτά, ώστε να μελετηθεί η επίδραση της έκφρασης των διαφόρων περιοχών της πρωτεΐνης στην φυσιολογία των φυτών.

Η κλωνοποίηση όλων των ελλειπτικών κομματιών έγινε στις θέσεις EagI-SalI(blunt) του pPVX202. Τα τμήματα της LeMA-1 που κλωνοποιήθηκαν προέκυψαν από διπλές πέψεις του κλώνου m10a με κατάλληλα ένζυμα, μετά από κατάλληλη τροποποίηση των άκρων όπου ήταν απαραίτητο (στα XbaI και HindIII άκρα συμπλήρωση νουκλεοτιδίων με EcoRI υπομονάδα Klenow. Απομονώθηκαν πέντε τμήματα, όλα με ελλείψεις από το 3' άκρο της κωδικής περιοχής της πρωτεΐνης (εικ. 20):



Εικόνα 20 Θέσεις των περιοριστικών ενζύμων που χρησιμοποιήθηκαν στην κατασκευή των ελλείψεων της LeMA-1 στο πλασμίδιο m10a (οι θέσεις είναι σχετικές, όχι σε κλίμακα).

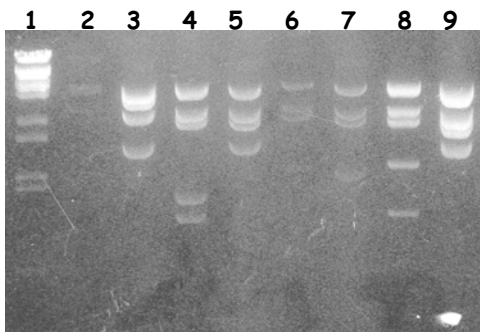
Τα μεγέθη των τμημάτων που απομονώθηκαν από τον κλώνο m10a και κλωνοποιήθηκαν Θέσεις EagI-SalI(blunt) στο pPVX202 είναι:

<u>Πλασμίδιο</u>	<u>τμήμα του m10a</u>	<u>μήκος</u>	<u>πεπτιδίο</u>
1. pXba:	EagI-XbaI	212 νουκλεοτίδια	43 αμινοξέα
2. pSsp:	EagI-SspI	363 νουκλεοτίδια	93 αμινοξέα
3. pRsa:	EagI-RsaI	401 νουκλεοτίδια	106 αμινοξέα
4. pMsc:	EagI-MscI	740 νουκλεοτίδια	220 αμινοξέα
5. pHpa:	EagI-HpaI	1170 νουκλεοτίδια	362 αμινοξέα
6. pHind:	EagI-HindIII	1487 νουκλεοτίδια	425 αμινοξέα.

Τα πλασμίδια που κατασκευάστηκαν από αυτή τη σειρά κλωνοποιήσεων ονομάστηκαν για χάρη ευκολίας με το ένζυμο από το οποίο προέκυψαν: pXba, pSsp, pRsa, pMsc, pHpa, και pHind αντίστοιχα.

Λόγω της αστάθειας του φορέα οι κατασκευές ελέγχονται κάθε φορά που παρασκευάζεται DNA σε βακτήρια. Τα πιάτα αφήνονται στους 37°C για 12-14 ώρες (παραπάνω επώαση έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή πλασμιδίων με ελλείψεις). Οι κατασκευές ελέγχονται με περιοριστική πέψη με το ένζυμο EcoRI το οποίο δίνει ξεκάθαρο σχήμα ζωνών για κάθε κλώνο (εικ. 21). Η ένθεση περιέχει δύο θέσεις αναγνώρισης για το ένζυμο EcoRI, μία στην αρχή (ντ. 2256 του m10a) και μία πριν την HpaI (ντ. 3309 του m10a), ενώ ο φορέας περιέχει τρεις.

Εικόνα 21 Πήκτωμα αгарόζης 1% με βρωμιούχο αιθίδιο όπου αναλύονται τα αποτελέσματα περιοριστικής πέψης με EcoRI των κατασκευών σε pPVX202.:



- 1: δείκτης μεγέθους λBstEI
 2: pPVX202
 3: p2LeMA
 4: pHpa
 5: pMsc
 6: pRsa
 7: pSsp
 8: pHindNF
 9: pMscNF

3.2.2.3 Κατασκευές με κατεστραμμένο πλαίσιο διαβάσματος.

Για να διαπιστωθεί ότι ο παρατηρούμενος θνησιγόνος φαινότυπος, που προκαλείται από την έκφραση της LeMA-1 στα φυτά, οφείλεται στην έκτοπη έκφραση της πρωτεΐνης και όχι στην έκφραση του RNA ή σε επέμβαση στην φυσιολογία του ιού λόγω της κλωνοποίησης, θεωρήθηκε σκόπιμο να εκφραστεί η αλληλουχία της LeMA-1 χωρίς να παράγεται πρωτεΐνη. Αυτό έγινε με διακοπή του πλαισίου διαβάσματος στην θέση XbaI του m10a, μετά από πέψη με XbaI, συμπλήρωση των άκρων με την EcoRI υπομονάδα Kleow, και αυτοσυγκόλληση. Το πλασμίδιο ονομάστηκε **mnf** (m10a no frame) και εκφράζει τα πρώτα 43 αμινοξέα της πρωτεΐνης. (Υπάρχει και δεύτερη θέση XbaI στην περιοχή κλωνοποίησης του φορέα η οποία καταστράφηκε μετά από περιοριστική πέψη με XbaI συμπλήρωση των άκρων με Kleow, αυτοσυγκόλληση και επιλογή του κλώνου **mxu**(m10 XbaI unique), που φέρει μία μόνο θέση XbaI μέσα στην κωδική περιοχή της LeMA-1). Από το πλασμίδιο mnf και ακολουθώντας το σχήμα κλωνοποιήσεων των ελλείψεων κατασκευάστηκε αντίστοιχη σειρά πλασμιδίων που παράγουν RNA που όμως εκφράζει μόνο τα 43 πρώτα αμινοξέα. Απομονώνονται τα ίδια κομμάτια DNA τα οποία κλωνοποιούνται στις θέσεις EagI-SalI(blunt) του pPVX202 και προέκυψαν τα πλασμίδια **NF** (no frame): pSspNF, pRsaNF, pMscNF, pHraNF, και pHindNF αντίστοιχα.

<u>Πλασμίδιο</u>	<u>κομμάτι του m10a</u>	<u>μήκος</u>
7. pSspNF:	EagI-SspI	363 νουκλεοτίδια
8. pRsaNF:	EagI-RsaI	401 νουκλεοτίδια
9. pMscNF:	EagI-MscI	740 νουκλεοτίδια
10. pHraNF:	EagI-HraI	1170 νουκλεοτίδια
11. pHindNF:	EagI-HindIII	1487 νουκλεοτίδια

3.2.2.4 Κλωνοποιήσεις μεταλλαγμάτων της LeMA-1.

12. **LeMut:** Με κατάλληλα εκφυλισμένο εκινητή και την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) το δεύτερο ATG της κωδικής περιοχής της LeMA-1 μετατράπηκε σε TAGC, εισάγεται κωδικόνιο λήξης και προστίθεται μια επιπλέον βάση. Η μεταλλαγή δημιουργεί μια θέση αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου HaeII που επιτρέπει τον έλεγχο της παρουσίας της μεταλλαγής με περιοριστική πέψη με το ένζυμο αυτό. Το κομμάτι DNA που παράχθηκε με PCR κλωνοποιήθηκε στον φορέα pGEM Teasy και προέκυψε το πλασμίδιο pGEL. Από το pGEL το κομμάτι NotI-XhoI που περιέχει την μεταλλαγμένη LeMA-1 κλωνοποιήθηκε στον pPVX202 στις θέσεις EagI-SalI και προέκυψε το πλασμίδιο LeMut.
13. **LES:** το κομμάτι EaeI-SalI από τον m10a μήκους 451 νουκλεοτιδίων κλωνοποιήθηκε στον pPVX202 στις θέσεις EagI-SalI. Το πλασμίδιο αυτό εκφράζει τμήμα του RNA της LeMA-1 χωρίς να μπορεί να παράξει πρωτεΐνη.

3.2.2.5 Κλωνοποιήσεις τμημάτων των υπολοίπων ΑΤΡασών του πρωτεασώματος ντομάτας σε PVX.

Με βάση τις αλληλουχίες των εξι ΑΤΡασών του πρωτεασώματος του φυτού *Arabidopsis thaliana* (Rubin et al 1998), με κατάλληλη σάρωση βιβλιοθήκης αλληλουχιών του Clemson genomics institute: (<http://www.genome.clemson.edu/orders>) εντοπίστηκαν τμήματα DNA από ντομάτα που παρουσιάζουν υψηλή ομολογία προς τις ΑΤΡασες της *Arabidopsis thaliana*. Επιλέχθηκαν αλληλουχίες που αντιστοιχούν στις υπόλοιπες πρωτεΐνες

της ντομάτας και αγοράστηκαν οι αντίστοιχοι κλώνοι (Rpt1: cLED717, Rpt2: GA_Eb0005E01f, Rpt3: cLED5H5, Rpt4: cLEW19J24, Rpt6: cLEB3E9). Οι κλώνοι αυτοί χρησιμοποιήθηκαν για την ένθεση των κομματιών αυτών σε φορέα pPVX202.

14. **Rpt1:** Το κομμάτι EagI-ΧhoI του πλασμιδίου cLED717 στις θέσεις EagI-SalI του pPVX202.
15. **Rpt3:** Το κομμάτι NotI-ΧhoI του πλασμιδίου cLED5H5, στις θέσεις EagI-SalI του pPVX202.
16. **Rpt4:** Το κομμάτι EagI-ΧhoI του πλασμιδίου cLEW19J24 στις θέσεις EagI-SalI του pPVX202. Η κλωνοποίηση αυτή δεν έγινε.
17. **Rpt2:** Το κομμάτι BamHI-ΧhoI του πλασμιδίου GA_Eb0005E01f στις αντίστοιχες θέσεις του bluescript KSII, και από το πλασμίδιο αυτό το κομμάτι NotI-ΧhoI στις θέσεις EagI-SalI του pPVX202 (ο κλώνος αυτός όπως και ο Rpt6 κλωνοποιήθηκαν πρώτα σε bluescript KSII ώστε να βρεθούν με κατάλληλο προσανατολισμό ως προς τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται για τις κλωνοποιήσεις σε pPVX202).
18. **Rpt6:** Το κομμάτι EcoRI-ΧhoI του πλασμιδίου cLEB3E9 στις αντίστοιχες θέσεις του bluescript KSII, και από το πλασμίδιο αυτό το κομμάτι NotI-ΧhoI στις θέσεις EagI-SalI του pPVX202.

3.2.3 Κατασκευές σε bluescript KSII

Παράλληλα με την κλωνοποίηση των τμημάτων της LeMA-1 στον pPVX202 έγινε αντίστοιχη σειρά κλωνοποιήσεων σε bluescript KSII. Τα πλασμίδια που προέκυψαν χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή ραδιοσημασμένων ανιχνευτών με *in vitro* μεταγραφή.

19. **Bs-Msc:** Το EagI-MscI τμήμα του m10a στο EagI-SmaI του bluescript KSII
20. **Bs-Ssp:** Το EagI-SspI τμήμα του m10a στο EagI-SmaI του bluescript KSII
21. **Bs-Rsa:** Το EagI-RsaI τμήμα του m10a στο EagI-SmaI του bluescript KSII
22. **Bs-Hind:** Το EagI-HindIII(blunt) τμήμα του m10a στο EagI-SmaI του bluescript KSII
23. **Bs-Hpa:** Από το Bs-Hind με πέψη με HpaI και EcoRV και αυτοσυγκόλληση.

3.3 Πειράματα υπερέκφρασης της LeMA-1 σε φυτά

3.3.1 Πειράματα έκφρασης της LeMA-1 σε φυτά με τον φορέα GC3

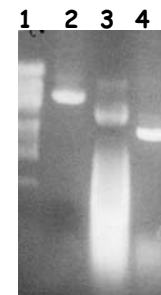
Τα πρώτα πειράματα έγιναν με τον πλασμιδιακό φορέα PVX-GC3. Το πλασμίδιο PVX-GC3 που μας στάλθηκε από τον Dr Baulcombe εκφράζει μέσω του PVX το γονίδιο της β-γλυκουρονιδάσης (GUS) του οποίου τα επίπεδα και η πορεία έκφρασης μελετώνται εύκολα με κατάλληλη χρωμογόνο αντίδραση στα φύλλα.

Στη θέση του GUS τοποθετήθηκε ολόκληρη η κωδική περιοχή της LeMA-1 σε σύντηξη με τα εναπομείναντα 13 αμινοξέα της GUS ώστε να παράγεται η πρωτεΐνη μέσω του ιού σε φυτά. Η κατασκευή αυτή -rPVXLeMA-1- χρησιμοποιήθηκε σαν μολυσματικό υλικό για φυτά ντομάτας.

Τα πειράματα αυτά γίνονται με σκοπό την μελέτη της επίδρασης της υπερέκφρασης του γονιδίου LeMA-1 στη φυσιολογία του φυτού με αποτέλεσμα την εμφάνιση φαινότυπου που να αντανακλά κάποια δυσλειτουργία των κυττάρων λόγω της κατάστασης αυτής. Επειδή όμως η υπερέκφραση γίνεται μέσω της παρουσίας ενός ιού στο σύστημα του φυτού, ο οποίος επιδρά στην φυσιολογία του, η εκτίμηση των συμπτωμάτων γίνεται πάντα σε συνάρτηση με τον φαινότυπο που προκαλεί ο ιός. Είναι λοιπόν απαραίτητο να υπάρχει κατασκευή που να εκφράζει μόνο τον ιό ώστε να μπορεί να γίνει εκτίμηση των συμπτωμάτων που προκαλούνται. Τον σκοπό αυτό εξυπηρετεί η κατασκευή PVXN που εκφράζει μόνο τις αλληλουχίες του ιού PVX (βλέπε κατασκευές, Κεφ. Αποτελέσματα Παρ 3.2).

Το πλασμίδιο αυτό είναι εξαιρετικά ασταθές σε βακτήρια, σε όλα τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για τον πολλαπλασιασμό του (σε DH5a, JM83, BL21) (εικ. 22). Ελαττώνοντας τον χρόνο επώασης των κυττάρων (Ecoli) σε 12-14 ώρες στους 37°C κάποιες απομονώσεις απέδιδαν DNA σωστού μήκους και τα προβλεπόμενα τμήματα μετά από πέψη με περιοριστικά ένζυμα. Τελικά αποδείχθηκε το ίδιο ασταθές και σε φυτά.

Εικόνα 22 Πήκτωμα αгарόζης 1% όπου αναλύονται τρεις διαδοχικές απομονώσεις του πλασμιδίου PVXN (2, 3, 4). Στη θέση 1 δείκτης μεγέθους λBstEII, και 2, 3, 4 πλασμιδιακό DNA της κατασκευής PVXN απομονωμένο με την μέθοδο Qiagen. Το μέγεθος του πλασμιδίου ελαττώνεται σε κάθε «πέραςμα» από βακτήρια.



Έγιναν τρία πειράματα με βάση τον φορέα PVX-GC3. Κάθε φορά μολύνονταν τρία φυτά με κάθε κατασκευή: PVX-GC3, PVXN, rPVXLeMA. Μόνο ο αρχικός κλώνος με το GUS ήταν μολυσματικός.

3.3.2 Η έκφραση της LeMA-1 σε φυτά με τον φορέα pPVX202 προκαλεί θνησιγόνο φαινότυπο.

Τα φυτά που επιλέγονται για μόλυνση είναι νεαρά (2-4 φύλλα), γιατί σε μεγαλύτερη ηλικία οι κατασκευές δεν είναι σταθερές και ο ιός χάνει γρήγορα την ένθεση (στην δεύτερη βδομάδα από την μόλυνση). Στα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν ντομάτες 10-12 ημερών, επειδή όμως το ποσοστό μολυσματικότητας της ντομάτας στις συνθήκες του πειράματος είναι πολύ χαμηλό χρησιμοποιούνται παράλληλα και άλλα φυτά που μολύνονται ευκολότερα όπως η *Nicotiana benthamiana* και η *Nicotiana clevelandie*.

Αρχικά χρησιμοποιήθηκαν 10 φυτά ντομάτας και ένα *Nic. benthamiana* με την κατασκευή p2Lema, και 3 φυτά ντομάτας και ένα *Nic. benthamiana* με την pPVX202 σαν κατασκευή αναφοράς. Από αυτά, μολύνθηκαν πέντε φυτά ντομάτας και το φυτό *Nic. Benthamiana* με την κατασκευή p2Lema και ένα φυτό *Nic. benthamiana* με την pPVX202.

Και τα δύο φυτικά είδη αποτελούν ξενιστή για τον ιό PVX. Τα συμπτώματα της μόλυνσης από τον ιό εμφανίζονται 14-17 ημέρες μετά την μόλυνση και είναι ήπια και για τα δυο είδη. Το μολυσμένο με PVX φυτό είναι ελάχιστα μικρότερο από το υγιές, εμφανίζει ήπιο σκουρόχρωμο μωσαϊκό στα φύλλα (εικ. 23B), αλλά επιβιώνει της μόλυνσης (εικ. 23A) και παράγει άνθη και καρπούς.



Εικόνα 23 Συμπτώματα μόλυνσης της ντομάτας από τον ιό PVX. **A:** Φυτό ντομάτας μολυσμένο με την κατασκευή pPVX202 34 ημέρες μετά την μόλυνση. **B:** φύλλο ντομάτας μολυσμένο με PVX. Τα φύλλα εμφανίζουν ήπιο μωσαϊκό.

B

Η *Nic. benthamiana* όμως, δεν εμφάνισε νέα φύλλα από την μέρα της μόλυνσης, παρουσίασε μαρασμό και τελικά θάνατο (εικ 24 A1), σε αντίθεση με το φυτό με pPVX202 (εικ. 24 A2) το οποίο 49 ημέρες μετά την μόλυνση επιβιώνει.

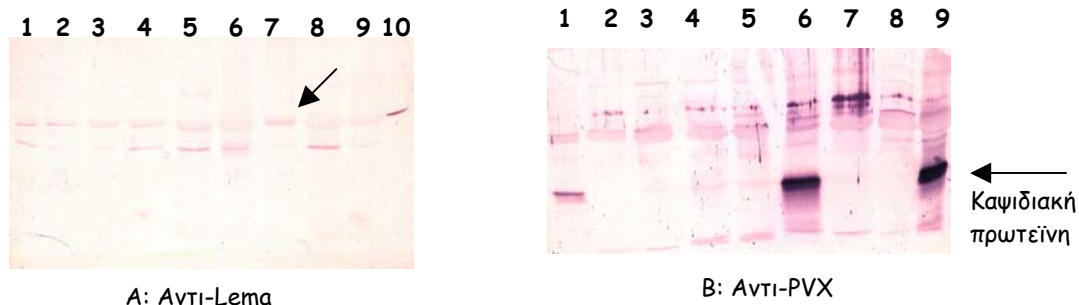
Στις ντομάτες, ο φαινότυπος δεν διέφερε από εκείνον που προκαλεί ο pPVX202 (εικ. 24 B2). Οι ντομάτες, τις πρώτες ημέρες εμφάνισης συμπτωμάτων παρουσιάζουν εικόνα βαρύτερη από εκείνη του PVX με συμπτώματα όπως συρρίκνωση των νεύρων των φύλλων αλλά όχι του ελάσματος με αποτέλεσμα επιναστία («καρούλιασμα») των βλαστών και παραμόρφωση των νέων φύλλων της κορυφής, σταμάτημα της ανάπτυξης του φυτού (εικ. 23 B) το οποίο όμως αναστρέφεται αργότερα και το φυτό αναρρώνει, παράγοντας νέα μη παραμορφωμένα φύλλα με μόνο σύμπτωμα το μωσαϊκό του PVX.

Από το πείραμα αυτό δεν ήταν δυνατόν να εξαχθούν συμπεράσματα ως προς τον φαινότυπο που προκαλεί η έκφραση της LeMA-1 σε φυτά δεδομένου ότι ένα μόνο φυτό μολύνθηκε αποτελεσματικά με την κατασκευή p2Lema, το *Nic. Benthamiana* (εικ. 27A), το οποίο δεν έβγαλε άλλα φύλλα από την ημέρα της μόλυνσης και μαράζωσε χωρίς την εμφάνιση άλλων συμπτωμάτων.



Εικόνα 24 Συμπτώματα μόλυνσης με ιό PVX που φέρει αλληλουχίες της LeMA-1. A1: το πρώτο φυτό *Nic. benthamiana* μολυσμένο με p2Lema και A2: φυτό *Nic. benthamiana* μολυσμένο με pPVX202 49 ημέρες μετά την μόλυνση. Φωτογραφία B1: ντομάτα υγιής και B2: p2Lema 22 ημέρες μετά την μόλυνση.

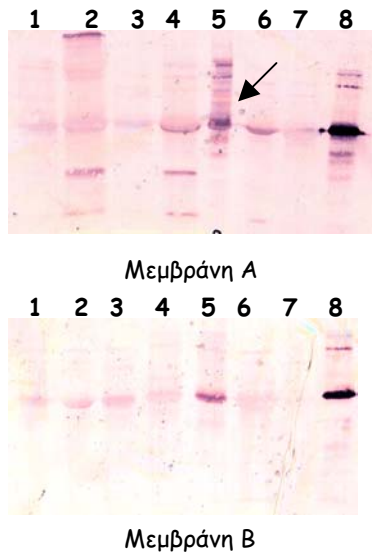
Σε επίπεδο πρωτεΐνης δεν φάνηκε καμιά αύξηση της ποσότητας της πρωτεΐνης με εξαίρεση τα κάπως αυξημένα επίπεδα στο πρώτο φυτό, το *Benthamiana*-Lema (εικ. 25A δείγμα 7, εικ. 26 A και B δείγμα 5). Η πρωτεΐνη που παράγεται από την κατασκευή p2Lema είναι κατά 1.4KDa μεγαλύτερη από την ενδογενή δεδομένου ότι έχει κλωνοποιηθεί σε σύντηξη με 13 aa από το GUS.



Εικόνα 25 Ανίχνευση της LeMA-1 σε σειρά φυτών μολυσμένα με ιό που φέρει την πλήρη αλληλουχία της πρωτεΐνης.

Αντι LeMA		Αντι-PVX	
1: ντομάτα 10	6: ντομάτα υγιής	1: ντομάτα 10	6: <i>Nic. benthamiana</i> lema
2: ντομάτα 7	7: <i>Nic. benthamiana</i> lema	2: ντομάτα 7	7: <i>Nic. benthamiana</i> 202
3: ντομάτα 6	8: <i>Nic. benthamiana</i> 202	3: ντομάτα 6	8: <i>Nic. benthamiana</i> υγιής
4: ντομάτα 4	9: <i>Nic. benthamiana</i> υγιής	4: ντομάτα 4	9: εκχύλισμα PVX
5: ντομάτα pPVX202	10: ανασυνδρασμένη	5: ντομάτα pPVX202	

Τα φυτά που μολύνθηκαν με pPVX202 και p2Lema, 11 ημέρες από την μόλυνση. Το δείγμα 10 που στην αντι-LeMA μεμβράνη είναι ανασυνδρασμένη πρωτεΐνη στην αντι-PVX μεμβράνη έχει αντικατασταθεί από εκχύλισμα φυτού μολυσμένου με PVX-GC3 σαν δείκτης μεγέθους της καψιδιακής πρωτεΐνης, και το δείγμα 6 (υγιής ντομάτα) της μεμβράνης A παραλείπεται στην μεμβράνη B όπου γίνεται έλεγχος της μόλυνσης. Στην αντι-LeMA μεμβράνη ανιχνεύεται η LeMA-1 ενώ στην αντι-PVX η καψιδιακή πρωτεΐνη του PVX με κατάλληλα αντισώματα. Από την εικόνα αυτή φαίνεται ότι τα δείγματα 1 και 6 είναι μολυσμένα αλλά δεν υπάρχει σημαντική υπερέκφραση της LeMA-1.



Εικόνα 26 Ανίχνευση της LeMA-1 σε φυτά μολυσμένα με ιό που φέρει την πλήρη αλληλουχία της LeMA-1 21 ημέρες μετά την μόλυνση. Εδώ φαίνεται ότι το φυτό *Nic. benthamiana*-Lema παράγει κάπως περισσότερη πρωτεΐνη από τα υπόλοιπα. Τα δείγματα :

1, 2, 3, 4 : ντομάτες με συμπτώματα μόλυνσης PVX

5: *Nic. Benthamiana*-Lema

6: *Nic. benthamiana* 202

7: *Nic. benthamiana* υγής

8: ανασυνδυσμένη LeMA-1

Στη μεμβράνη B επαναλήφθηκε πείραμα της μεμβράνης A ελαττώνοντας τις ποσότητες των δειγμάτων στο μισό για να φανεί η διαφορά της έκφρασης του φυτού με τη r2Lema από τα υπόλοιπα.

Παράλληλα με τον έλεγχο της έκφρασης του γονιδίου σε επίπεδο πρωτεϊνών έγινε και έλεγχος της παραγωγής των ιικών RNA στα παραπάνω φυτά.

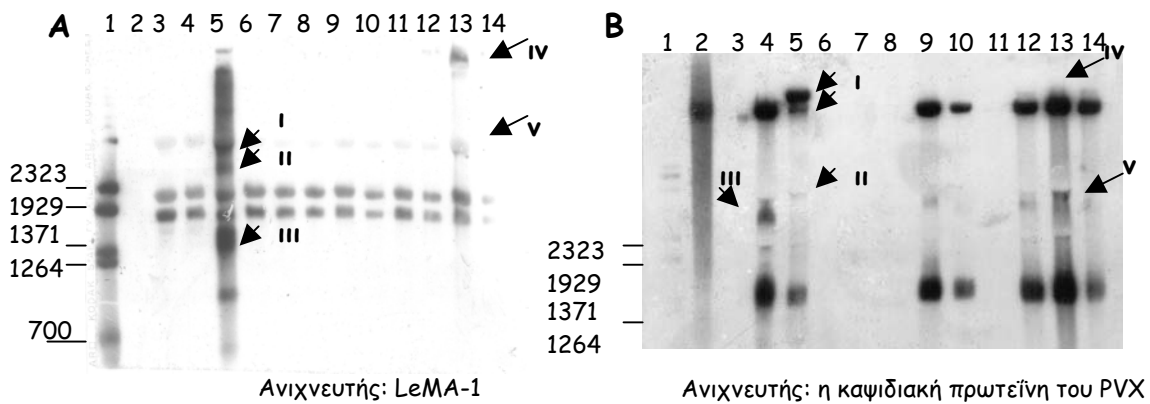
Η ανίχνευση των υπογενωμικών RNA του ιού γίνεται με ανιχνευτή ραδιοσημασμένο RNA(-) της καψιδιακής πρωτεΐνης του PVX, ενώ για την LeMA-1, ο ανιχνευτής είναι RNA(-) από ολόκληρη η αλληλουχία της LeMA-1.

Στην εικόνα 27 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του πειράματος αυτού. Τα δείγματα 9, 10, 12, 13 και 14 είναι τα φυτά της ντομάτας που εμφάνισαν αρχικά συμπτώματα εγκατάστασης της μόλυνσης με PVX και το δείγμα 5 είναι το φυτό *Nic. benthamiana*-Lema που παρουσίασε τον θνησιγόνο φαινότυπο.

Στο φυτό *Nic. benthamiana*-Lema, μέρος της ένθεσης απορρίπτεται με αποτέλεσμα να ανιχνεύονται δυο ζώνες γενωμικού RNA: του ιού PVX και αυτού με την ένθεση (εικ. 27B 5i). Όσο για τα υπογενωμικά RNA (το ένα από τα οποία εκφράζει την LeMA-1) είναι κατά πολύ ελαττωμένα στο φυτό αυτό, (εικ. 27B5ii). Παράλληλα, η εικόνα των υπογενωμικών RNA του φυτού αυτού που περιέχουν LeMA-1 (εικ. 27A δείγμα 5) εμφανίζει πολλαπλές ζώνες: (i και ii το υπογενωμικό του triple block, και iii το υπογενωμικό της LeMA-1) όπου φαίνεται ότι υπάρχουν πληθυσμοί RNA με ποικίλο μέγεθος, αποτέλεσμα της σταδιακής απόρριψης της ένθεσης.

Στα υπόλοιπα φυτά που μολύνθηκαν κατά το πείραμα αυτό η ένθεση έχει απορριφθεί σχεδόν πλήρως. Στο δείγμα 13 (εικ. 27B) φαίνεται να υπάρχουν ακόμη κάποιες αλληλουχίες της LeMA-1 (εικ. 27 δείγμα 13 iv και v). Στα άλλα φυτά (δείγματα 9, 10 12 και 14) δεν ανιχνεύονται καθόλου RNA της LeMA-1, περιέχουν μόνο PVX, όπως φαίνεται από την εικόνα 27A.

Τα φυτά αυτά αρχικά εκφράζουν τις πλήρεις αλληλουχίες της LeMA-1 με αποτέλεσμα την εμφάνιση του χαρακτηριστικού φαινοτύπου (εικ. 24B 2) ο οποίος αργότερα υποχωρεί λόγω του ανασυνδυσμού του ιού και την συνεπαγόμενη απώλεια των αλληλουχιών της LeMA-1 από το γενετικό υλικό των διπλασιαζόμενων ιών. Στο φυτό *Nic. benthamiana*-Lema που η ένθεση δεν έχει απορριφθεί πλήρως εμφανίστηκε ο θνησιγόνος φαινότυπος (εικ. 24A 1).



Εικόνα 27 Αυτοραδιογραφία RNA μολυσμένων φυτών 31 ημέρες μετά την μόλυνση. Στην εικόνα A ανιχνεύεται η παρουσία RNA της LeMA-1 ενώ στη B, στα ίδια δείγματα, ανιχνεύεται η παρουσία RNA του PVX με ανιχνευτή την καψιδιακή πρωτεΐνη οπότε ανιχνεύονται όλα τα RNA του PVX. Το φιλμ της εικόνας A έχει εμφανιστεί μετά από έκθεση 16 ωρών, ενώ το φιλμ B μετά από έκθεση 2 ωρών.

- | | |
|---|---------------------------|
| 1: δείκτης μεγέθους (DNA) λBstEII | 8: ντομάτα χ pPVX202 No 2 |
| 2: ο ανιχνευτής, καψιδιακής πρωτεΐνης του PVX | 9: ντομάτα χ Lema No 3 |
| 3: RNA υγιούς φυτού <i>Nic. benthamiana</i> | 10: ντομάτα χ Lema No 4 |
| 4: <i>Nic. benthamiana</i> 202 | 11: ντομάτα χ Lema No 5 |
| 5: <i>Nic. benthamiana</i> Lema | 12: ντομάτα χ Lema No 6 |
| 6: RNA υγιούς φυτού ντομάτας | 13: ντομάτα χ Lema No 7 |
| 7: ντομάτα χ pPVX202 No 1 | 14: ντομάτα χ Lema No 10 |

Από το πείραμα αυτό, με το ένα -μολυσμένο με την σωστή κατασκευή- φυτό (εικ. 24A 1) εξάχθηκε ένα συμπέρασμα: η έκφραση της LeMA-1 μέσω του PVX επηρεάζει αρνητικά την φυσιολογική ανάπτυξη του φυτού και επιφέρει τον θάνατο, αλλά η κατασκευή δεν είναι σταθερή και η μολυσματικότητα είναι εξαιρετικά χαμηλή ειδικά σε ντομάτες, πιθανόν και λόγω αυτής της αρνητικής επίδρασης.



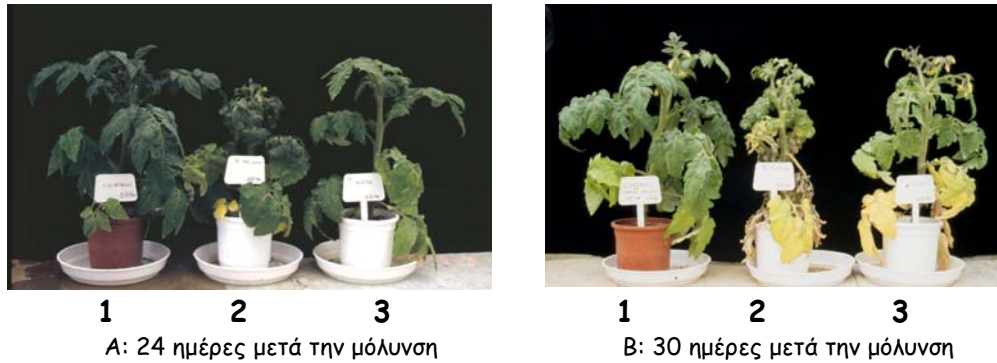
A: pPVX202 B: pP2Lema Γ: Υγιές

Εικόνα 28 Φυτά μολυσμένα με πρωτεϊνικό εκχύλισμα από το φυτό *Nic. benthamiana*-Lema 45 ημέρες μετά την μόλυνση. Στο κέντρο (φυτά B) διακρίνονται τα φυτά μολυσμένα με p2LeMA, αριστερά (φυτά A) τα φυτά μολυσμένα με pPVX202 και δεξιά (φυτό Γ) υγιές φυτό της ίδιας ηλικίας.

Στο πρωτεϊνικό εκχύλισμα των μολυσμένων φυτών περιέχονται ισοωμάτια τα οποία σε αντίθεση με το μολυσματικό DNA μολύνουν αποτελεσματικότερα τα φυτά και τα συμπτώματα εμφανίζονται συντομότερα (σε 6 μόλις ημέρες από την μόλυνση αφού το αρχικό μόλυσμα είναι πολύ αποτελεσματικότερο). Σε μια απόπειρα να φανούν τυχόν επιδράσεις στον φαινότυπο ντομάτας κρίθηκε σκόπιμο να χρησιμοποιηθεί το εκχύλισμα του φυτού *Nic. benthamiana* -Lema σαν μολυσματικό υλικό σε ντομάτες. Στο πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκαν 5 φυτά

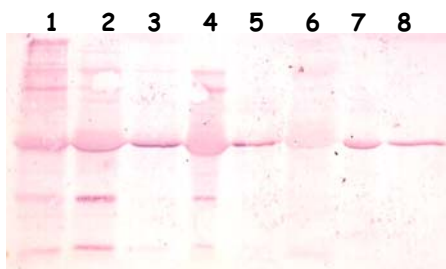
ντομάτας με εκχύλισμα από *Nic. benthamiana*-Lema και άλλα πέντε με εκχύλισμα *Nic. benthamiana*-PVX.

Τα φυτά της σειράς αυτής από την αρχή εμφάνισης των συμπτωμάτων παρουσίασαν βαρύτερη εικόνα (εικ. 28 Β), προοδευτικά όμως ο φαινότυπος υποχώρησε, οι βλαστοί που αρχικά εμφάνισαν τα συμπτώματα μαράθηκαν και έπεσαν (εικ. 29Α και 29Β φυτό 2). Τα φυτά, τελικά, συνήλθαν 2 μήνες μετά την μόλυνση παράγοντας νέα υγιή φύλλα χωρίς άλλο σύμπτωμα πέραν του μωσαϊκού του PVX (εικ. 28 Β).



Εικόνα 29 Εξέλιξη των συμπτωμάτων της έκφρασης της LeMA-1 σε φυτά: Η ντομάτα χρ2Lema No 8 (A2 και B2), A1 και B1 υγιές φυτό και A3 και B3 φυτό μολυσμένο με pPVX202, 24 ημέρες (A) και 30 ημέρες(B) από την μόλυνση. Εδώ φαίνεται η συρρίκνωση των βλαστών και το καρούλιασμα των φύλλων (A2) καθώς και η ανάρρωση του φυτού με τα νέα μη παραμορφωμένα φύλλα στην κορυφή (B2).

Σε επίπεδο πρωτεΐνης δεν φαίνεται καμία μεταβολή στα επίπεδα της LeMA-1 στο φύλλο φυτών με συμπτώματα (εικ. 30) ώστε να αποδοθεί ο φαινότυπος σε υπερέκφραση της πρωτεΐνης, αντίθετα, η πρωτεΐνη ανιχνεύεται σε ποσά συγκρίσιμα με τα φυτά αναφοράς: τα μολυσμένα με pPVX202 και το υγιές.



Εικόνα 30 Ανίχνευση της LeMA-1 σε φυτά μολυσμένα με r2Lema και pPVX202 31 ημέρες μετά την μόλυνση:

1: ντομάτα No 10 χρ2Lema 5: ντομάτα No 6 χρ2Lema
2: ντομάτα No 9 χρPVX202 6: ντομάτα No 5 χρPVX202
3: ντομάτα No 8 χρ2Lema 7: ντομάτα No 4 x r2Lema
4: ντομάτα No 7 χρPVX202 8: *Nic. benthamiana* x r2Lema

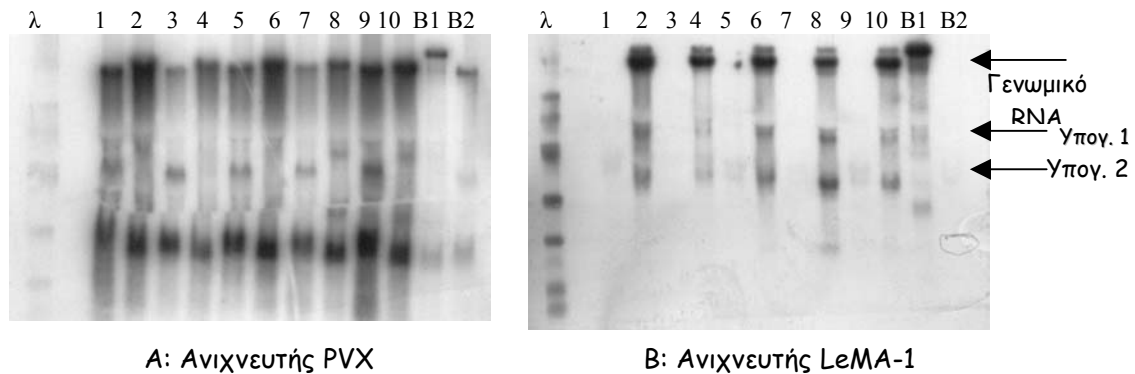
Η ανάλυση του RNA των φυτών αυτών (εικ. 31B) έδειξε ότι ο ιός σε ένα μεγάλο ποσοστό έχει χάσει μεγάλο μέρος της ένθεσης (διπλές ζώνες του γενωμικού RNA). Στην εικόνα 31A (τα ζυγά είναι φυτά με r2Lema) φαίνεται ότι κανένα από τα φυτά αυτά δεν περιέχει την πλήρη ένθεση, όλα εμφανίζουν γενωμικό RNA μικρότερο από το δείγμα B1, το γενωμικό RNA του φυτού *Nic. benthamiana*-Lema με εκχύλισμα του οποίου μολύνθηκαν.

Σε όλα τα r2Lema φυτά δεν έχει απορριφθεί πλήρως η ένθεση αφού εντοπίζεται σήμα με τον ανιχνευτή της LeMA-1 (εικ. 31B), αλλά λείπει ένα μεγάλο μέρος της γεγονός που πιθανόν δικαιολογεί την μη ανίχνευση αύξησης στα επίπεδα της πρωτεΐνης στα μολυσμένα φυτά.

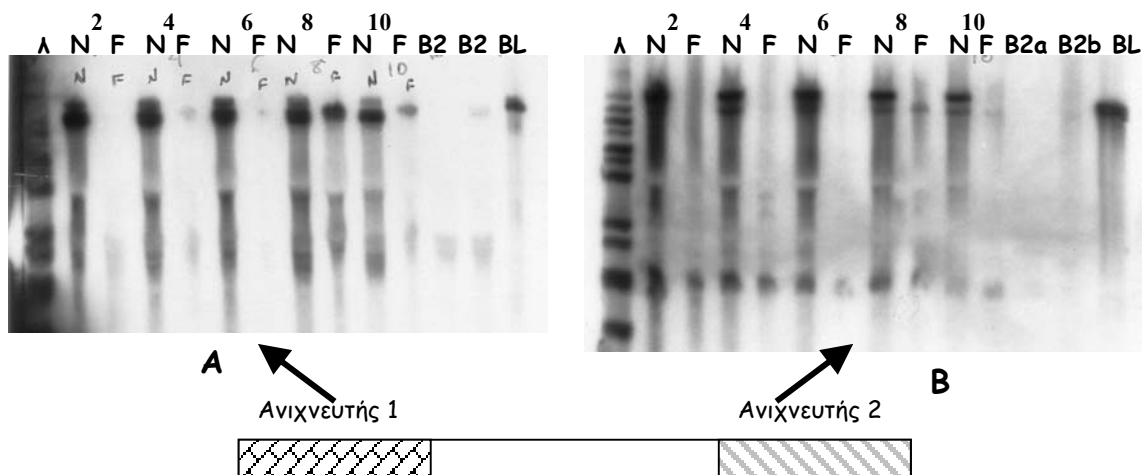
Απώλεια μέρους της αλληλουχίας της LeMA-1 από το 3' άκρο θα οδηγούσε σε παραγωγή πεπτιδίου μικρότερου μήκους που όμως δεν ανιχνεύθηκε (εικ. 30).

Απώλεια όμως από το 5' άκρο θα κατέστρεφε το πλαίσιο διαβάσματος της πρωτεΐνης και επομένως δεν θα μπορούσε να παραχθεί πρωτεΐνη από αυτό το RNA, που θα

δικαιολογούσε το αποτέλεσμα της εικόνας 30. Για να μελετηθεί η υπόθεση αυτή ελέγχθηκε η παρουσία αλληλουχιών της LeMA-1 από τα δύο άκρα (με κατάλληλους ανιχνευτές) στα RNA των φυτών αυτών σε δυο στάδια της μόλυνσης (εικ. 32).



Εικόνα 31 Έλεγχος της σταδιακής απόρριψης της ένθεσης με ανασυνδυασμό του ιού κατά τον πολλαπλασιασμό του σε φυτά. Αυτοραδιογραφία του RNA που απομονώθηκε από τα φυτά που μολύνθηκαν με πρωτεϊνικό εκχύλισμα φυτού μολυσμένου με p2Lema 34 ημέρες μετά την μόλυνση. Ο δείκτης μεγέθους είναι λBstEII, και τα δείγματα B1: *Nic. benthamiana* xLema (εκχύλισμα του οποίου χρησιμοποιήθηκε ως μόλυσμα), και B2: *Nic. benthamiana* x pPVX202, τα 1, 3, 5, 7, 9 είναι φυτά ντομάτας xPVX202, ενώ τα 2, 4, 6, 8, 10 είναι φυτά ντομάτας x p2Lema.



Εικόνα 32 Έλεγχος της περιοχής της ένθεσης που απορρίπτεται από τον ιό στην πορεία της μόλυνσης. Αυτοραδιογραφία του RNA των φυτών που μολύνθηκαν με πρωτεϊνικό εκχύλισμα από το μολυσμένο με p2Lema φυτό. Ο δείκτης μεγέθους είναι λBstEII. Για το πείραμα αυτό έγιναν δυο απομονώσεις RNA: η σειρά N 34 ημέρες από την μόλυνση και η σειρά F 52 ημέρες από την μόλυνση για κάθε φυτό (2, 4, 6, 8, και 10). Τα δείγματα B2 και BL είναι φυτά *Nic. benthamiana* μολυσμένα με PVX202 και p2Lema αντίστοιχα, ενώ B2a και B2b είναι δείγματα διαφορετικών φυτών με PVX202. Παρασκευάστηκαν δυο ραδιενεργοί ανιχνευτές: ο ένας στο 5' άκρο της αλληλουχίας της LeMA-1 από τον κλώνο 0,25:ΧhoI, και ο άλλος από το 3' άκρο από τον κλώνο m10a: MscI.

Στο πείραμα της εικόνας 32 A με τον ανιχνευτή στο 5' άκρο της LeMA-1 φαίνεται ότι από την 34^η ως την 50^η ημέρα οι αλληλουχίες της LeMA-1 εξαφανίζονται τελείως, ενώ, όπως φαίνεται με τον ανιχνευτή στο 3' άκρο (32 B), μέρος του γονιδίου παραμένει στο γονιδίωμα του ιού. Προσδευτικά λοιπόν χάνεται η αρχή του γονιδίου, πράγμα που εξηγεί την μη εμφάνιση υπερέκφρασης σε επίπεδο ανοσοανίχνευσης, δεν εξηγεί όμως τον φαινότυπο και την κατάρρευση του φυτού.

Από τα πειράματα των μολύνσεων αυτών εξάχθηκαν τα παρακάτω συμπεράσματα:

- η κατασκευή δεν είναι σταθερή σε φυτά και ειδικά όταν η μόλυνση γίνεται σε σχετικά μεγάλα φυτά (πέραν των 10-12 ημερών)

- τα φυτά που εκφράζουν αλληλουχίες της *LeMA-1* παρουσιάζουν βαρύτερα συμπτώματα αλλά δεν μπορούμε να μιλήσουμε για εξέλιξη των συμπτωμάτων αυτών αφού σταδιακά ο ιός αποβάλλει την ένθεση και το φυτό συνέρχεται

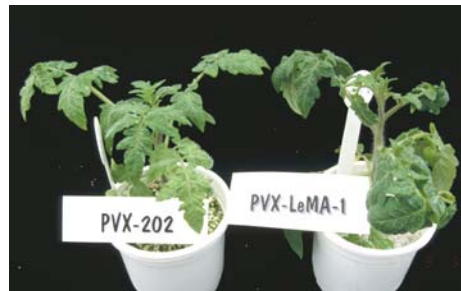
- η αναμόλυνση (με πρωτεϊνικό εκχύλισμα φυτών που έχουν μολυνθεί) δεν είναι όσο αποτελεσματική είχε φανεί στην αρχή δεδομένου ότι τα εκχυλίσματα περιέχουν ανασυνδυασμένο ιό με μικρές ή καθόλου αλληλουχίες του γονιδίου ένθεσης.

Το επόμενο πείραμα έγινε με DNA σαν μολυσματικό υλικό σε πολύ νεαρά φυτά ντομάτας και *Nic. benthamiana*. Αυτό είναι το πρώτο πείραμα όπου εκδηλώνονται τα συμπτώματα από την έκφραση της *LeMA-1* σε φυτά που υποδεικνύουν αναπτυξιακή διαταραχή και είναι σημαντικά διαφορετικά από εκείνα του ιού PVX.

Τα συμπτώματα εμφανίζονται την 11-13 ημέρα από την μόλυνση πριν ακόμη εμφανιστεί το χαρακτηριστικό μωσαϊκό του PVX (εικ. 33). Οι βλαστοί κάμπτονται και τα φύλλα λυγίζουν προς το εσωτερικό του φυτού. Τα συμπτώματα εμφανίζονται μόνο στα νέα φύλλα πάνω από το σημείο της μόλυνσης. Τα νεύρα των φύλλων δεν αναπτύσσονται φυσιολογικά με αποτέλεσμα το έλασμα του φύλλου να συρρικνώνεται.

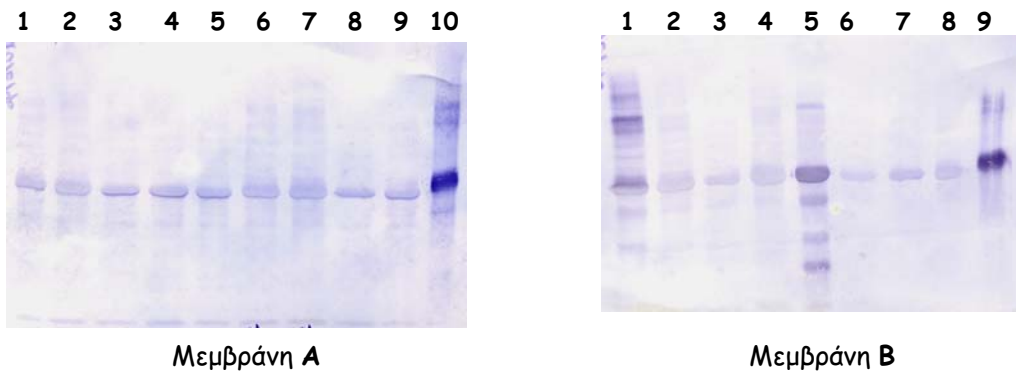
Το φυτό δεν αναπτύσσεται άλλο, παραμένει κοντότερο και τελικά μαραίνεται. Η έκφραση της *LeMA-1* επιδρά γενικά στην ανάπτυξη του φυτού, τα νέα φύλλα είναι μικρότερα, υπάρχει ατροφία του ριζικού συστήματος και οι βλαστοί δεν επιμηκύνονται (εικ. 33).

Εικόνα 33 Συμπτώματα της έκφρασης της *LeMA-1* σε φυτά. *Nic. benthamiana* μολυσμένο με p2Lema 15 ημέρες από τη μόλυνση. Τα νεαρά φύλλα είναι συρρικνωμένα.



Εικόνα 34 Συμπτώματα της έκφρασης της *LeMA-1* σε φυτά. Φυτό ντομάτας μολυσμένο με p2Lema 18 ημέρες από την μόλυνση (αριστερά). Στην εικόνα δεξιά το ίδιο φυτό με φυτό μολυσμένο με pPVX202. Η συρρίκνωση των νεαρών φύλλων είναι αποτέλεσμα της έκφρασης της *LeMA-1* και δεν συνοδεύει ποτέ την μόλυνση από PVX. Επίσης εμφανίζεται πριν την ανάπτυξη του μωσαϊκού που προκαλεί η εγκατάσταση του ιού.

Στη σειρά αυτή χρησιμοποιήθηκαν 8 φυτά *Nic. benthamiana* (1→8) και 10 φυτά ντομάτας (9→18). Από αυτά συμπτώματα εμφάνισαν τα: Νο 3, 5, και 8 (*Nic. benthamiana*), και τα Νο 10 και 17(ντομάτα). Σε επίπεδο πρωτεΐνης τα δυο από αυτά παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα πρωτεΐνης (εικ 35B δείγματα 1 και 5) με καλύτερο το φυτό Νο5 (*Nic. benthamiana*).



Εικόνα 35 Ανίχνευση της LeMA-1 σε φυτά 22 ημέρες μετά την μόλυνση. :

Η μεμβράνη Α

- 1: ντομάτα No 9 x p2Lema
- 2: ντομάτα No 10 x p2Lema
- 3: ντομάτα No 11 x p2Lema
- 4: ντομάτα No 12 x p2Lema
- 5: ντομάτα No 13 x p2Lema
- 6: ντομάτα No 14 x p2Lema
- 7: ντομάτα No 15 x p2Lema
- 8: ντομάτα x pPVX202
- 9: ντομάτα υγιής
- 10: ανασυνδυσασμένη LeMA-1

Η μεμβράνη Β

- 1: ντομάτα No 17 x p2Lema
- 2: ντομάτα No 16 x p2Lema
- 3: *Nic. benthamiana* No 8 x p2Lema
- 4: *Nic. benthamiana* No 7 x p2Lema
- 5: *Nic. benthamiana* No 5 x p2Lema
- 6: *Nic. benthamiana* No 6 x p2Lema
- 7: *Nic. benthamiana* x pPVX202
- 8: *Nic. benthamiana* υγιής
- 9: ανασυνδυσασμένη LeMA-1

Πέντε φυτά της σειράς αυτής εμφάνισαν συμπτώματα: τρεις *Nic. benthamiana* και δυο ντομάτες με φαινότυπο τελείως ίδιο (εικ 36, τα τρία φυτά *Nic. benthamiana*), από αυτές όμως μόνο η No 5 (*Nic. benthamiana*, εικ. 36) και η No 17 (φυτό ντομάτας) έδωσαν αυξημένα ποσοστά παραγόμενης πρωτεΐνης (εικ. 35B δείγματα 1 και 5).



Φυτό No 3

Φυτό No 5

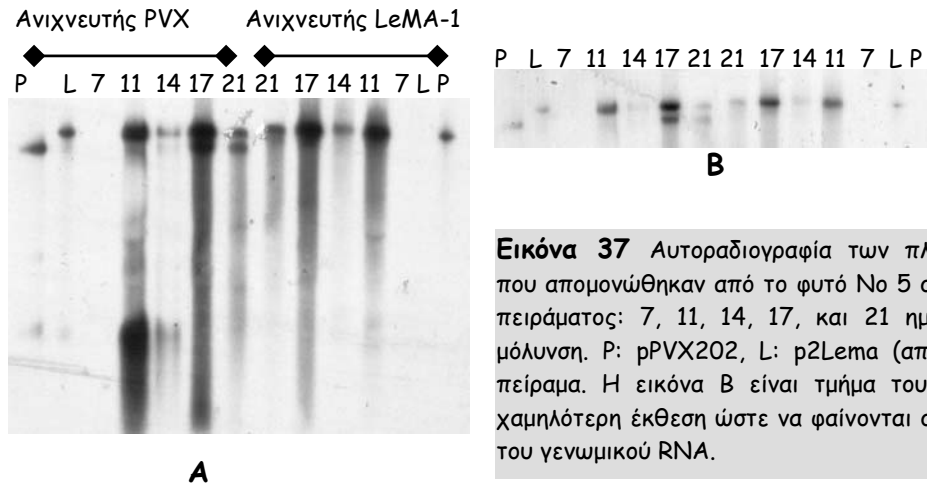
Φυτό No 8

Εικόνα 36 Τα φυτά No 3, 5, και 8 αντίστοιχα που εμφάνισαν συμπτώματα. Από αυτά μόνο το No5 (στο κέντρο) παρουσίασε αυξημένα ποσοστά πρωτεΐνης σε ανάλυση με το αντίσωμα.

Τα πέντε φυτά του πειράματος αυτού είχαν την ίδια πορεία από την εμφάνιση συμπτωμάτων ως τον μαρασμό, όμως μόνο δυο από αυτά εμφάνισαν υπερέκφραση της πρωτεΐνης. Αν λοιπόν ο θνησιγόνος φαινότυπος που παρατηρείται οφείλεται σε αυξημένα επίπεδα πρωτεΐνης τι συμβαίνει με τα άλλα τρία φυτά που παρουσιάζοντας την ίδια εικόνα δεν δείχνουν διαφορές σε επίπεδο LeMA-1;

Από προηγούμενα πειράματα παρατηρήθηκε ότι η κατασκευή p2Lema είναι ασταθής και προοδευτικά απορρίπτεται η ένθεση. Είναι λοιπόν πιθανό ο φαινότυπος να οφείλεται σε μια αρχική αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης ικανή να προκαλέσει μόνιμη διαταραχή της φυσιολογίας του φυτού η οποία παραμένει και μετά την αποκατάσταση των επιπέδων της

LeMA-1 λόγω απόρριψης της ένθεσης. Ακόμη και στο φυτό Νο5, που υπάρχει υπερέκφραση, η ένθεση απορρίπτεται (εικ. 37).



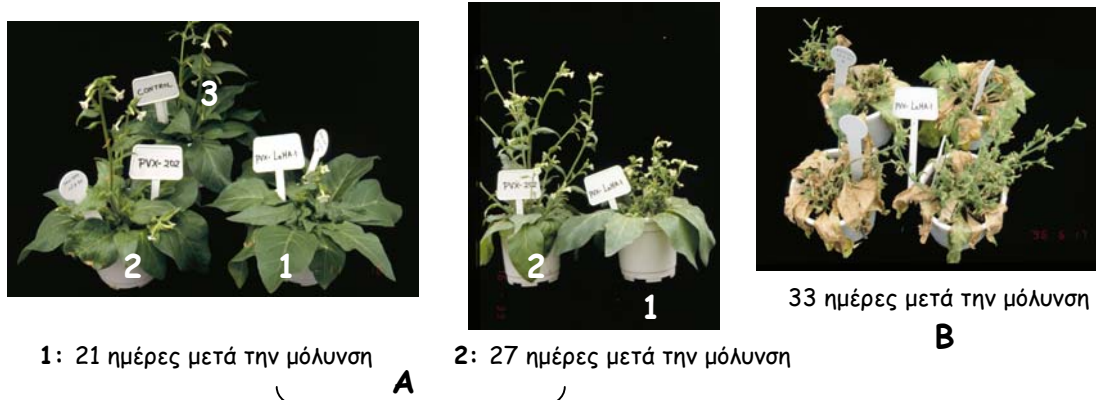
Εικόνα 37 Αυτοραδιογραφία των πληθυσμών RNA που απομονώθηκαν από το φυτό Νο 5 στην πορεία του πειράματος: 7, 11, 14, 17, και 21 ημέρες μετά την μόλυνση. P: pPVX202, L: p2Lema (από προηγούμενο πείραμα. Η εικόνα Β είναι τμήμα του ίδιου φιλμ σε χαμηλότερη έκθεση ώστε να φαίνονται οι διπλές ζώνες του γενωμικού RNA.

Στην εικόνα 37 φαίνεται ότι ενώ αρχικά το γενωμικό RNA του φυτού δίνει μια ζώνη είτε με ανιχνευτή PVX είτε με ανιχνευτή LeMA-1 (δείγματα 11, 14), αργότερα εμφανίζονται δύο ζώνες (17, 21) που σημαίνει ότι υπάρχουν δυο πληθυσμοί ιικού RNA στο φυτό: με και χωρίς την ένθεση, μάλιστα η παρουσία της δεύτερης ζώνης συμπίπτει με την κορύφωση της μόλυνσης (δείγμα 17) όπου η συγκέντρωση του ιού στα κύτταρα είναι μέγιστη (τα δείγματα είναι ίδιας απορρόφησης, ίδιας ποσότητας RNA). Σύγκριση των δειγμάτων 17 και 21 δείχνει ότι σταδιακά αυξάνεται η ποσότητα των μορίων που απορρίπτει πλήρως την ένθεση αφού δεν δίνει σήμα με τον ανιχνευτή της LeMA-1.

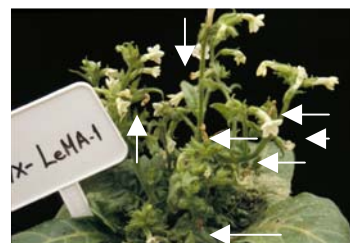
Από το πείραμα της εικόνας 13 παρατηρήθηκε ότι οι ομόλογες πρωτεΐνες της LeMA-1 σε άλλα φυτικά είδη παρουσιάζουν αμινοξικές ομολογίες τέτοιες ώστε να επιτρέπουν την ανίχνευσή τους με το αντίσωμα της LeMA-1 της ντομάτας. Θεωρήθηκε σκόπιμο να ελεγχθεί αν η έκφραση της πρωτεΐνης της ντομάτας μέσω του PVX σε άλλα φυτικά είδη (αφού έχει ήδη παρατηρηθεί και σε ένα ακόμη φυτό την *N. benthamiana*) προκαλεί παρόμοιο φαινότυπο. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε μια σειρά διαφορετικών φυτικών ειδών τα οποία συμπεριλάμβαναν φυτά ντομάτας, φυτά *Nicotiana clevelandie*, φυτά *N. benthamiana*, φυτά πιπεριάς και τεύτλα. Από την σειρά αυτή μολύνθηκαν επιτυχώς τα έξι (από τα έξι) φυτά *Nicotiana clevelandie*, και ένα φυτό *N. benthamiana*. Οι πιπεριές είναι γενικά πολύ ανθεκτικές σε ιούς, όσο για τα τεύτλα μόνο ένα φυτό ήταν διαθέσιμο το οποίο δεν μολύνθηκε τελικά.

Τα φυτά *Nicotiana clevelandie*, 21 ημέρες μετά την μηχανική μόλυνση εμφάνισαν συμπτώματα (εικ. 38 A1), ίδια με αυτά που προκαλούνται από την έκφραση της LeMA-1 και στα άλλα δυο φυτικά είδη, τις ντομάτες και τα *N. benthamiana*, τα οποία εξελίχθηκαν πολύ γρήγορα: τα φυτά δεν αναπτύχθηκαν άλλο, τα νέα φύλλα ήταν πολύ μικρά και παραμορφωμένα (με το γνωστό καρούλιασμα), παρουσίασαν νέκρωση των νεύρων των φύλλων (εικ. 38A2 και 38B). Οι βλαστοί δεν ψήλωσαν περισσότερο από την ημέρα που εμφανίστηκαν τα συμπτώματα σχηματίζοντας ένα είδος θαμνοειδούς ανάπτυξης, και παρήγαγαν πολύ νωρίς πολλά άνθη τα οποία όμως δεν ήταν βιώσιμα (εικ. 39A). Τέλος, τα φυτά μαράθηκαν 33 ημέρες μετά την μηχανική μόλυνση. Ένα μόνο φυτό πέρασε αυτό το στάδιο, το φυτό Νο 2, το οποίο έβγαλε νέα φυλλαράκια χωρίς τα παραπάνω συμπτώματα, μικρότερα αλλά όχι με καρούλιασμα και νεκρώσεις.

Εικόνα 38 A1: 1: Φυτό *N. clevelandie* μολυσμένο με την κατασκευή p2Lema, 2: φυτό *N. clevelandie* μολυσμένο με την κατασκευή pPVX202, 3: φυτό *N. clevelandie* υγιές, 21 ημέρες μετά τη μόλυνση. **A2:** 1: Φυτό *N. clevelandie* μολυσμένο με την κατασκευή p2Lema, 2: φυτό *N. clevelandie* μολυσμένο με την κατασκευή pPVX202, 27 ημέρες μετά τη μόλυνση, **B:** τέσσερα φυτά *N. clevelandie* μολυσμένα με την κατασκευή p2Lema 33 ημέρες μετά την μηχανική μόλυνση.



A



B

Εικόνα 39 A: λεπτομέρεια του φυτού μολυσμένου με την κατασκευή P2Lema **B:** φυτό μολυσμένο με την κατασκευή P2Lema 27 ημέρες μετά την μηχανική μόλυνση. Επισημαίνονται τα παραμορφωμένα και νεκρά άνθη.

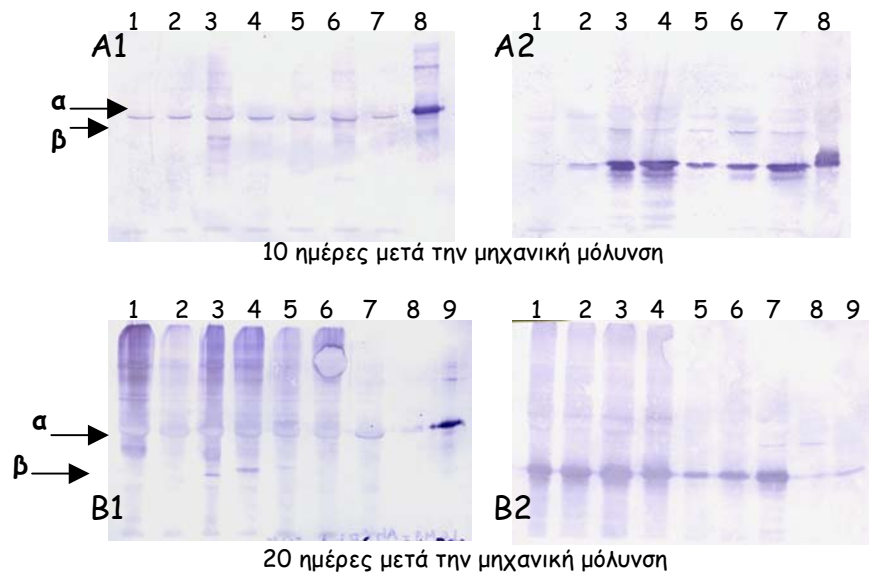
Τα φυτά ελέγχθηκαν για την παραγωγή πρωτεΐνης 10 και 20 ημέρες μετά την μηχανική μόλυνση (μόλις άρχισαν να σχηματίζονται τα συμπτώματα) (εικ. 40 A και B αντίστοιχα).

Την δέκατη ημέρα (εικ. 40 A1 δείγματα 3, 5 και 6) ανιχνεύεται η ενδογενώς παραγόμενη πρωτεΐνη (ζώνη α) και όχι παραγόμενη από τον ιό που είναι κατά 13 αμινοξέα μεγαλύτερη. Στο δείγμα 3 (μείγμα εκχυλίσματος των φυτών *Nicotiana clevelandie*, 5 και 6), όπως και στο δείγμα 6 (τα φυτά 1 και 2) ανιχνεύεται μικρότερο προϊόν (ζώνη β), το οποίο πιθανόν προέρχεται από το γεγονός ότι στα φυτά 1, 2 και 6 ο ιός έχει ανασυνδυαστεί διατηρώντας όμως ακόμη σημαντικό μέρος της ένθεσης τους (εικ. 41 δείγματα 1, 2 και 6).

Την 20η ημέρα, στην εικόνα της ανάλυσης κατά Western των ίδιων φυτών εντοπίζονται ελαττωμένες ποσότητες του ενδογενούς προϊόντος (ζώνη α), σε τρία από αυτά (δείγματα εικ. 40 B1 3, 4 και 5) ανιχνεύονται μικρότερα προϊόντα (ζώνες β), ενώ παράλληλα σε όλα τα φυτά αυτά παρουσιάζεται μια εικόνα μη καλά αποδιαταγμένων πρωτεϊνών που συνήθως συνοδεύει την παρουσία συσσωματωμάτων. Στις μεμβράνες A2 και B2 τα ίδια δείγματα αναλύονται για τα επίπεδα της μόλυνσης από PVX τις ημέρες που συλλέχθηκαν τα δείγματα.

RNA από τα φυτά αυτά εκχυλίσθηκε την 20η ημέρα μετά την μηχανική μόλυνση και υποβλήθηκε σε έλεγχο για την παρουσία γενωμικών και υπογενωμικών RNA των ιών που περιέχουν, με ανιχνευτή τις (-) αλληλουχίες της καψιδιακής πρωτεΐνης του PVX (εικ. 41). Σε όλα τα φυτά ο ιός έχει ανασυνδυαστεί απορρίπτοντας τμήματα της ένθεσης. Στο φυτό No 1 (εικ. 41 δείγμα 1) η ένθεση έχει απορριφθεί σχεδόν πλήρως (και πιθανόν, κρίνοντας από το σχετικό του μέγεθος, έχει χάσει και μέρος ιικών αλληλουχιών), στα φυτά 2 και 5 (δείγματα 2

και 5 αντίστοιχα) λείπει σημαντικό μέρος της ένθεσης (διπλή ζώνη γενωμικού RNA, ζώνη Γ), ενώ στα φυτά 3, 4 και 6 εντοπίζεται σημαντικός πληθυσμός γενωμικού RNA που περιέχει ακόμη την ένθεση. Τα φυτά 1, 3, 4, 5 και 6 τελικά μαράθηκαν ενώ το φυτό No 2 επιβίωσε.



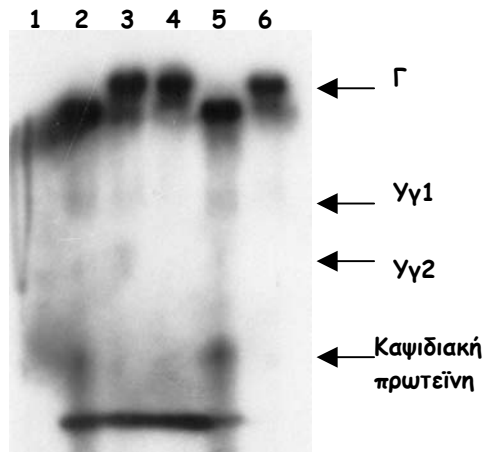
Εικόνα 40 Ανίχνευση της LeMA-1 σε φυτά μολυσμένα με τις κατασκευές p2Lema και pPVX202. Στο A αναλύονται δείγματα πρωτεΐνης την 10η ημέρα της μόλυνσης ενώ στο B αναλύονται τα ίδια φυτά 20 ημέρες μετά την μόλυνση. Στο πρώτο πείραμα της σειράς αυτής (A), επειδή τα δείγματα συλλέγονται πριν την εμφάνιση συμπτωμάτων και τα φυτά ήταν πολλά (36), τα δείγματα συνδυάστηκαν ανά δύο, δηλαδή κάθε δείγμα περιέχει εκχύλισμα από δύο φυτά. Στην επόμενη συλλογή δειγμάτων (B) τα φυτά αναλύονται κανονικά. Οι εικόνες A1 και B1 ανιχνεύουν την πρωτεΐνη LeMA-1 ενώ οι εικόνες A2 και B2 ανιχνεύουν την καψιδιακή πρωτεΐνη του PVX.

Δείγματα των εικόνων A1, A2 :

- 1- φυτά ντομάτας 7, 8 με p2Lema
- 2- φυτά ντομάτας 7, 8 με pPVX202
- 3- φυτά *N. clevelandie* 5 και 6 με p2Lema
- 4- φυτά *N. clevelandie* 4 και 5 με pPVX202
- 5- φυτά *N. clevelandie* 3 και 4 με p2Lema
- 6- φυτά *N. Clevelandie* 1 και 2 με p2Lema
- 7- φυτό *N. clevelandie* 1 με pPVX202
- 8- Ανασυνδασμένη LeMA-1 (A1)
Φυτό με PVX-GC3 στο A2

Δείγματα των εικόνων B1, B2 :

- 1- φυτό *N. clevelandie* No 6 με p2Lema
- 2- φυτό *N. clevelandie* No 5 με p2Lema
- 3- φυτό *N. clevelandie* No 4 με p2Lema
- 4- φυτό *N. clevelandie* No 3 με p2Lema
- 5- φυτό *N. clevelandie* No 2 με p2Lema
- 6- φυτό *N. clevelandie* No 1 με p2Lema
- 7- φυτό *N. clevelandie* με pPVX202
- 8- φυτό *N. clevelandie* υγιές
- 9 -Ανασυνδασμένη LeMA-1.



Εικόνα 41 Ανάλυση του RNA των φυτών *N. clelandiae* μολυσμένων με την κατασκευή p2LeMa 20 ημέρες μετά την μηχανική μόλυνση. Ο ανιχνευτής είναι (-) αλληλουχίες της καψιδιακής πρωτεΐνης του PVX. Στην εικόνα αναλύονται τα RNA των φυτών Νο 1 έως 6. Σε όλα τα φυτά ο ιός έχει ανασυνδυαστεί (διπλή ζώνη γενωμικού RNA, ζώνη Γ) με αποτέλεσμα απόρριψης μέρους της ένθεσης. Στο φυτό 1 έχει σχεδόν απορριφθεί τελείως ενώ στο φυτό 2 και 5 έχει χάσει σημαντικό τμήμα. Στα φυτά 3, 4 και 6 διατηρεί ακόμη σημαντικό τμήμα της LeMA-1. Σε όλα τα δείγματα τα υπογενωμικά RNA είναι σημαντικά ελαττωμένα (δεν ανιχνεύονται παρά μόνο σε πολύ μεγαλύτερη έκθεση). Επίσης, σημαντικό

ελαττωμένο εμφανίζεται και το RNA της καψιδιακής πρωτεΐνης που ανιχνεύεται μόνο στα δείγματα 1, 2 και 5 που έχουν χάσει όμως μεγάλο τμήμα της ένθεσης.

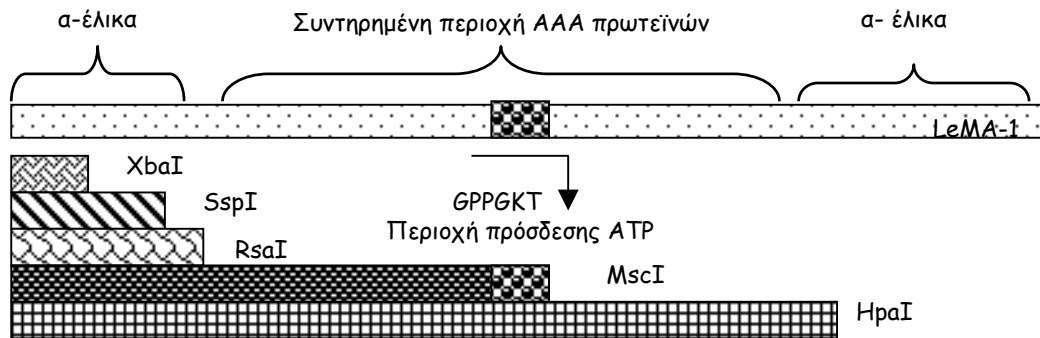
Στο σημείο αυτό θεωρήθηκε ότι ο θνησιγόνος φαινότυπος οφείλεται στην υπερέκφραση της LeMA-1 μέσω του PVX κάτι το οποίο δεν είναι πάντα ανιχνεύσιμο με το αντίσωμα δεδομένου ότι η πρωτεΐνη παράγεται μόνο στα αρχικά στάδια της μόλυνσης ενώ αργότερα, σε διάστημα που ποικίλλει από φυτό σε φυτό, σταματά λόγω ανασυνδυασμού του ιού.

3.3.3 Η έκφραση ελλειπτικών τμημάτων της LeMA-1 σε φυτά προκαλεί θνησιγόνο φαινότυπο παρόμοιο με εκείνο που παρατηρείται με ολόκληρη την πρωτεΐνη .

Η μόλυνση των φυτών με ιό PVX ο οποίος φέρει την αλληλουχία της LeMA-1 έχει σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση θνησιγόνου φαινοτύπου που αναλύθηκε παραπάνω. Αν ο φαινότυπος οφείλεται στην έκφραση της πρωτεΐνης μέσω του ιού τότε αυτό αποτελεί ένα καλό εργαλείο να μελετηθεί η δομή της πρωτεΐνης και να προσδιοριστεί πιθανόν η ελάχιστη περιοχή της που είναι ικανή να προκαλεί τα συμπτώματα αυτά. Για τον σκοπό αυτό έγινε μια αρχική πρόβλεψη της δομής της πρωτεΐνης από τον Δρ. Παλιακάση (βλέπε παράρτημα σελ 123).

Με βάση την πρόβλεψη αυτή και τα τότε βιβλιογραφικά δεδομένα τα πρώτα 65 αμινοξέα σχηματίζουν μια α-έλικα, η οποία θεωρείται ότι αλληλεπιδρά με άλλους πρωτεϊνικούς παράγοντες πιθανούς στόχους της LeMA-1. Η περιοχή αυτή οριοθετείται στη κωδική περιοχή της LeMA-1 από το περιοριστικό ένζυμο RsaI. Την δομή αυτή ακολουθούν 200 περίπου αμινοξέα, η πιο αυστηρά συντηρημένη περιοχή των AAA πρωτεϊνών στο κέντρο της οποίας βρίσκεται η αλληλουχία GPPGKT που θεωρείται υπεύθυνη για την πρόσδεση του νουκλεοτιδίου και του Mg^{2+} , η οποία οριοθετείται με την σειρά της από το περιοριστικό ένζυμο MscI. Τέλος σχηματίζεται μια ακόμη α-έλικα από τα 40 τελευταία αμινοξέα η οποία αποκόπτεται με πέψη με το περιοριστικό ένζυμο HraI. Επίσης θεωρήθηκε σκόπιμο να μελετηθούν και δυο ακόμη ελλειπτικά τμήματα, αυτό που προκύπτει με το ένζυμο SspI και κόβει την πρώτη έλικα στην μέση, και τέλος το κομμάτι που προκύπτει με περιοριστική πέψη με το ένζυμο XbaI το οποίο θα χρησίμευε ως αρνητική κατασκευή αναφοράς δεδομένου ότι περιέχει μόλις 43 αμινοξέα της αλληλουχίας της LeMA-1, τα οποία λόγω της πιθανώς μη σωστής αναδίπλωσης δεν αναμένονταν να παρουσιάσουν φαινότυπο (εικ. 42).

Η τελευταία κατασκευή (pHraI) δεν ήταν μολυσματική σε καμία από τις 5 απόπειρες που έγιναν και δεν χρησιμοποιήθηκε περαιτέρω.



Εικόνα 42 Δομή της LeMA-1. Τα ελλειπτικά τμήματα που κλωνοποιήθηκαν σε pPVX202 και εκφράστηκαν σε φυτά μέσω του συστήματος του PVX.

A. έκφραση τμήματος της LeMA-1 που περιέχει τα αμινοξέα 1-220 (κατασκευή pMsc προκαλεί θνησιγόνο φαινότυπο.

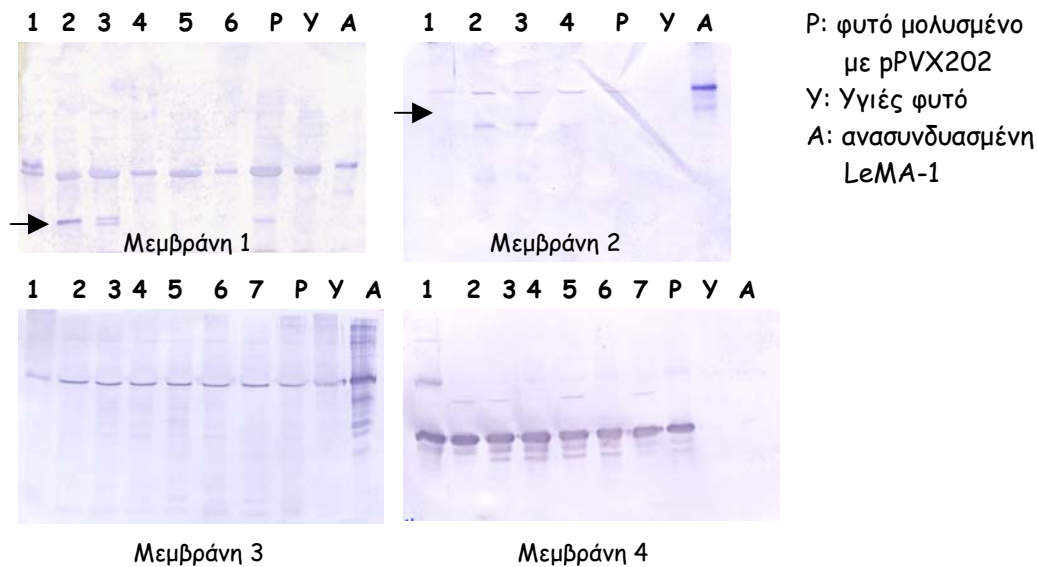
Έγιναν συνολικά εννέα μολύνσεις σε 32 φυτά από τα οποία τα 5 παρουσίασαν τα χαρακτηριστικά συμπτώματα της έκφρασης της LeMA-1. Από αυτά πρωτεΐνη παράγουν μόνο τα δύο, και όσα φυτά μολύνονται με πρωτεϊνικό εκχύλισμα από αυτά.



Εικόνα 43 Φυτά ντομάτας μολυσμένα με την κατασκευή pMsc που εκφράζει τα πρώτα 220 αμινοξέα της LeMA-1.

Παρουσιάζοντας ακριβώς τον ίδιο φαινότυπο τα πέντε μολυσμένα με pMsc φυτά δεν εμφανίζουν πάντα την παραγόμενη πρωτεΐνη (εικ 43, 44). Η κατασκευή pMsc εκφράζει τα πρώτα 220 αμινοξέα της LeMA-1, δηλαδή παράγει πρωτεΐνη μεγέθους 24,5 kDa η οποία εύκολα διαχωρίζεται από την ενδογενώς παραγόμενη και ανιχνεύεται με το αντίσωμα.

Στην εικ. 44 παρουσιάζονται τα πειράματα ανίχνευσης της LeMA-1 των δυο φυτών που παράγουν πρωτεΐνη, καθώς και μια από τις σειρές των φυτών που ενώ μολύνθηκαν με την κατασκευή pMsc δεν εμφανίζουν πρωτεΐνη άλλη εκτός της ενδογενούς. Μόνο τα φυτά που παράγουν πρωτεΐνη έχουν αναλυθεί περαιτέρω. Στην εικ. 44 στην μεμβράνη 1 αναλύεται το πρώτο pMsc φυτό που έδωσε υπερέκφραση, το οποίο παράγει την πρωτεΐνη 16 ακόμη και 19 ημέρες από την μόλυνση ενώ την 26^η δεν φαίνεται να την παράγει. Το γεγονός της εξαφάνισης της πρωτεΐνης αποδόθηκε στην απόρριψη της ένθεσης που συνοδεύει την πορεία αυτή (εικ. 51 δείγματα 1, 2 και 3). Αυτός είναι ο λόγος που στα επόμενα πειράματα μολύνσεων συλλέγονται δείγματα από πολύ νωρίτερα, ακόμη και πριν την εμφάνιση των συμπτωμάτων, με στόχο να εντοπισθεί το χρονικό διάστημα που παράγεται η πρωτεΐνη. Στο δεύτερο φυτό αντίστοιχα (εικ. 44 μεμβράνη 2 δείγματα 2,3,4) παράγεται πρωτεΐνη σε χαμηλότερα όμως επίπεδα. Δεν έγιναν περαιτέρω δειγματοληψίες από το φυτό αυτό αφού είχε δειχθεί το ζητούμενο, δηλαδή η παραγόμενη από τον ιό πρωτεΐνη.

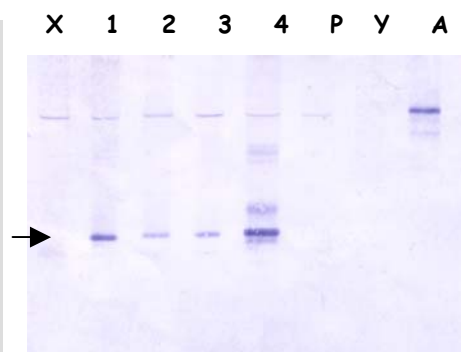


Εικόνα 44 Στην μεμβράνη 1 αναλύεται πρωτεϊνικό εκχύλισμα από φυτό που μολύνθηκε με τις κατασκευές rMsc : δείγματα 1, 2 και 3 (26, 19 και 16 ημέρες μετά την μόλυνση αντίστοιχα) και r2Lema: τα δείγματα 4, 5, και 6 (19, 16 και 11 ημέρες μετά την μόλυνση αντίστοιχα). Στην μεμβράνη αυτή φαίνεται ότι το φυτό παράγει την μικρότερη (24.5kDa) πρωτεΐνη στην αρχή της μόλυνσης και το σήμα εξαφανίζεται στις 26 ημέρες από την μόλυνση δηλαδή στις 15 ημέρες από την εμφάνιση των συμπτωμάτων. Στην μεμβράνη 2 αναλύεται το δεύτερο φυτό που έδωσε υπερέκφραση στα δείγματα 2, 3, και 4 (22, 19 και 15 ημέρες από την μόλυνση και την εμφάνιση των συμπτωμάτων). Το δείγμα 1 είναι φυτό μολυσμένο με rMscNF και σχολιάζεται αργότερα. Οι μεμβράνες 3 και 4 αποτελούν ανάλυση σειράς φυτών που μολύνθηκαν αλλά δεν έδωσαν υπερέκφραση. Στη μεμβράνη 3 ανιχνεύεται η LeMA-1 ενώ στην μεμβράνη 4 η καρδιακή πρωτεΐνη του PVX. Τα δείγματα 2 έως 7 είναι φυτά μολυσμένα με rMsc ενώ το δείγμα 1 είναι μολυσμένο με rMscNF.

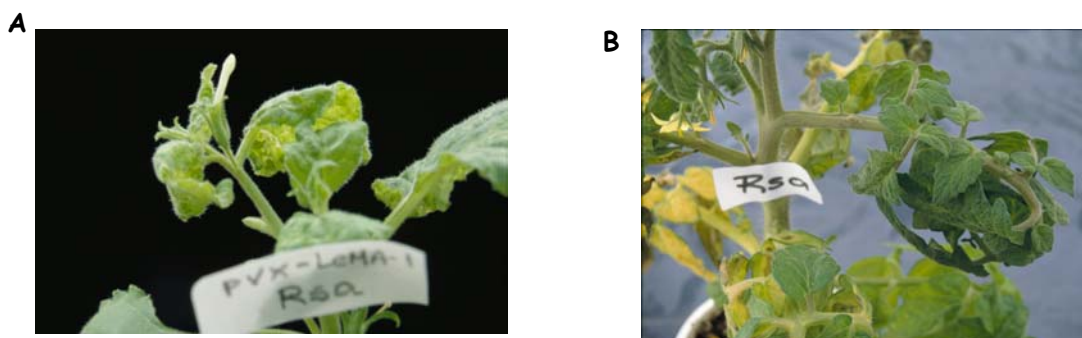
B. έκφραση τμήματος της LeMA-1 που περιέχει τα αμινοξέα 1-106 (κατασκευή rRsa) προκαλεί θνησιγόνο φαινότυπο.

Η κατασκευή αυτή εκφράζει την πρώτη έλικα της LeMA-1, η οποία θεωρητικά επιλέγει τους παράγοντες που συνεργάζονται με την πρωτεΐνη. Η υπερέκφρασή της περιοχής αυτής θα έπρεπε να προκαλεί σοβαρότερα συμπτώματα δεδομένου ότι η προσκόλλησή της στους υποτιθέμενους παράγοντες-συνεργάτες θα δημιουργούσε περισσότερα προβλήματα. Ο φαινότυπος των φυτών αυτών όμως είναι παρόμοιος με όλα τα προηγούμενα, δηλαδή το γνωστό καρούλιασμα. Σε συνολικά εννέα πειράματα μολύνσεων μολύνθηκαν τρία φυτά που όλα παράγουν την 11.6kDa προβλεπόμενη πρωτεΐνη, και αντίθετα από την rMsc η παραγωγή της πρωτεΐνης δεν εξαφανίζεται τελείως, είναι ανιχνεύσιμη μέχρι το τέλος του φυτού, αλλά φαίνεται να ελαττώνεται η ποσότητά της (εικ. 45).

Εικόνα 45 Ανάλυση πρωτεϊνών με αντίσωμα για την LeMA-1 φυτών μολυσμένων με την κατασκευή rRsa. Το πήκτωμα ήταν ακρυλαμίδη 14% για να αναλυθεί η προβλεπόμενη πρωτεΐνη μεγέθους 11.6kDa. Τα δείγματα στην μεμβράνη είναι: X: εκχύλισμα φυτού x XbaI. τα 1, 2, 3, και 4 είναι δείγματα του ίδιου φυτού x rRsa: τα 1 και 2 συλλέχθηκαν 26 ημέρες από την μόλυνση από φύλλο με νεκρωτικές κηλίδες (1) και πράσινο παραμορφωμένο (2)(εικ.41 B και A αντίστοιχα), ενώ τα 3 και 4 έχουν συλλεχθεί 19 και 15 ημέρες από την μόλυνση αντίστοιχα.



Αυτό που ήταν διαφορετικό στα φυτά με την κατασκευή pRsa είναι ότι ενώ στα άλλα δύο (p2Lema και pMsc) τα συμπτώματα εμφανίζονται πάνω από το σημείο της μηχανικής μόλυνσης και καταστρέφουν το φυτό από εκεί και πάνω, η κατασκευή pRsa φάνηκε να έχει επίδραση σε όλο το φυτό επηρεάζοντας και τους βλαστούς κάτω από την μόλυνση εμφανίζοντας νεκρώσεις και χλώρωση που δεν συνοδεύει τα άλλα δυο (εικ. 46B). Παρατηρώντας αυτό το φαινόμενο η pRsa φάνηκε να προκαλεί σοβαρότερες βλάβες στο φυτό από τις άλλες δύο, κάτι που όμως συνοδεύεται και από την έκφραση του προϊόντος της το οποίο σε αντίθεση με το προϊόν του pMsc παράγεται και στα προχωρημένα στάδια της μόλυνσης (εικ. 45 δείγματα 1 και 2).



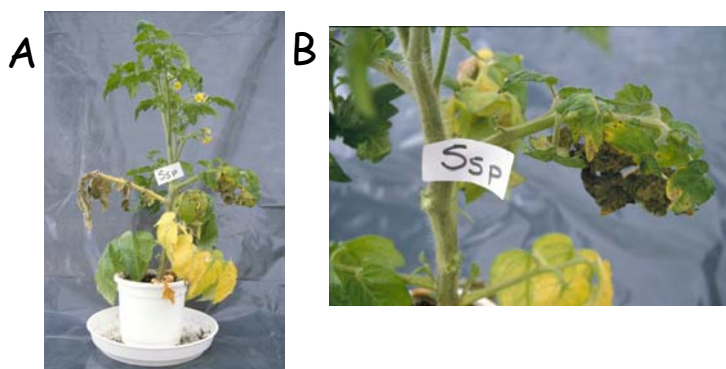
Εικόνα 46 A: Φωτογραφία φυτού μολυσμένου με την κατασκευή pRsa 19 ημέρες από την μόλυνση. Τα συμπτώματα των νέων φύλλων. **B:** Φωτογραφία φυτού μολυσμένου με pRsa 26 ημέρες από την μόλυνση, τα συμπτώματα των βλαστών κάτω από την μόλυνση.

Γ. έκφραση των τμημάτων της LeMA-1 που περιέχουν τα αμινοξέα 1-93 (pSsp) και 1-43 (pXba) δεν προκαλούν τα βαρύτατα συμπτώματα που παρατηρούνται με την έκφραση των μεγαλύτερων τμημάτων της LeMA-1:

Το ένζυμο SspI κόβει την πρώτη έλικα της LeMA-1, αν λοιπόν η έλικα αυτή είναι υπεύθυνη για τα συμπτώματα που παρατηρούνται τότε αυτή η κατασκευή δεν θα έπρεπε να επηρεάζει το φυτό, δεδομένου ότι, με βάση την πρόβλεψη της δομής, το κομμάτι αυτό δεν μπορεί να αναδιπλωθεί σωστά.

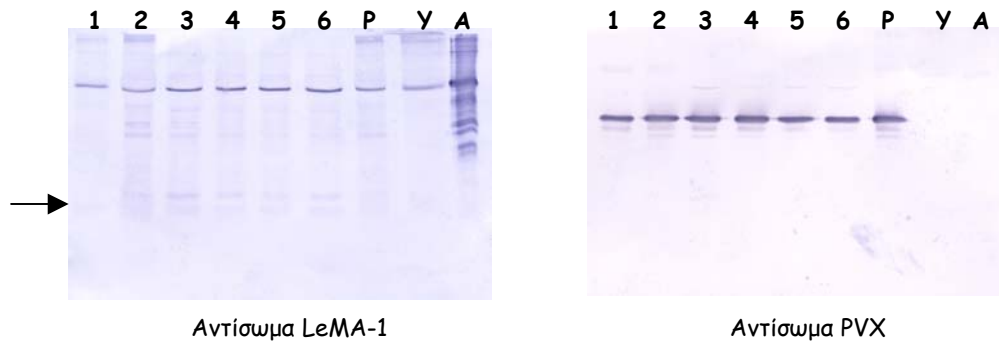
Το ένζυμο XbaI αφήνει μόνο τα πρώτα 43 αμινοξέα της πρωτεΐνης και ουσιαστικά η κατασκευή αυτή επιλέχθηκε σαν αρνητικό σημείο αναφοράς των συμπτωμάτων αφού το τμήμα της LeMA-1 που περιέχει είναι πολύ μικρό και δεν αναμένεται να προκαλεί την εμφάνιση φαινοτύπου που να οφείλεται σε υπερέκφραση της LeMA-1.

Σε επτά πειράματα μολύνσεων χρησιμοποιήθηκαν 20 φυτά με την κατασκευή pSsp, από τα οποία μολύνθηκε το ένα (εικ 47) με πλασμιδιακό DNA και δυο ακόμη με εκχύλισμα από το φυτό αυτό, και αντίστοιχα, σε επτά πειράματα μολύνσεων με pXba και 21 συνολικά φυτά μολύνθηκαν τα έξι.



Εικόνα 47 Φωτογραφίες φυτού μολυσμένου με την κατασκευή pSsp. **A:** ολόκληρο το φυτό, τα νέα φύλλα της κορυφής δεν εμφανίζουν την παραμόρφωση των άλλων κατασκευών. **B:** Λεπτομέρεια της φωτογραφίας A των συμπτωμάτων της κατασκευής. Παραμόρφωση του κάτω βλαστού, χλώρωση και νεκρωτικές κηλίδες.

Οι κατασκευές pXba και pSsp παρουσιάζουν εικόνα βαρύτερη από εκείνη του PVX σε ντομάτα (εικ. 47), αλλά όχι την χαρακτηριστική παραμόρφωση των νεαρών φύλλων που εμφανίζονται στις άλλες κατασκευές. Η πρωτεΐνη που παράγεται είναι πολύ μικρή και στις δυο περιπτώσεις (10KDa για το Ssp και 4.7KDa για το XbaI) για να μπορεί να ανιχνευθεί με το αντίσωμα της LeMA-1 και την μέθοδο που ακολουθείται για όλα τα πρωτεϊνικά δείγματα (εικ. 45 δείγμα X (XbaI) και εικ. 48)



Εικόνα 48 Ανίχνευση της πρωτεΐνης LeMA-1 και έλεγχος της εγκατάστασης της μόλυνσης από PVX σε φυτά μολυσμένα με τις κατασκευές pXba και pRsa. Τα πηκτώματα όπου αναλύονται τα πρωτεϊνικά δείγματα είναι ακρυλαμίδη 14% ώστε να εντοπισθούν μικρές πρωτεΐνες. Τα δείγματα : 1 και 2 φυτά με pXba από δυο ανεξάρτητα πειράματα, 3, 4, 5, και 6 φυτά με pRsa 37 ημέρες μετά την μόλυνση, P: φυτό με pPVX202 Y: υγιές φυτό και A: ανασυνδυασμένη LeMA-1. Τα φυτά είναι μολυσμένα, υπάρχουν ίχνη της πρωτεΐνης που παράγεται από την κατασκευή pRsa στα δείγματα 3, 4, 5, και 6, αλλά δεν υπάρχει καθόλου σήμα στα pXba φυτά, πιθανόν και να χάνεται κατά την ηλεκτροφόρηση.

Στο σημείο αυτό, δεν ήταν δυνατόν να δειχθεί με βεβαιότητα ότι για τον φαινότυπο αυτό ευθύνεται η υπερέκφραση της LeMA-1 μέσω του PVX αφού υπάρχουν φυτά που πάσχουν χωρίς να φαίνεται να παράγουν περισσότερη πρωτεΐνη. Θεωρήθηκε σκόπιμο να δημιουργηθούν κατασκευές οι οποίες δεν θα παράγουν πρωτεΐνη αλλά θα εκφράζουν το ίδιο RNA ώστε να μπορεί να γίνει κάποια σύγκριση των φαινοτύπων και των βιοχημικών δεδομένων για να εξαχθεί κάποιο συμπέρασμα. Είναι η πρωτεΐνη ή το RNA, και επίσης έχουν κάποια ουσιαστική σημασία οι ελλείψεις ή απλά οι κατασκευές περιέχοντας μικρότερες αλληλουχίες είναι σταθερότερες και συνεπώς προκαλούν βαρύτερα συμπτώματα;

Με βάση το γεγονός ότι τα φυτά με pXba εμφανίζουν ηπιότερα συμπτώματα θεωρήθηκε ότι το ένζυμο XbaI οριοθετεί το μικρότερο τμήμα της πρωτεΐνης που δεν προκαλεί θνησιγόνο φαινότυπο και αυτό είναι το σημείο που επιλέχθηκε για διακοπή του πλαισίου διαβάσματος της LeMA-1. Έγινε πέψη του πλασμιδίου m10a με το ένζυμο XbaI, συμπλήρωση των άκρων με Kleow και τέλος αυτοσυγκόλληση οπότε καταστράφηκε το πλαίσιο διαβάσματος. Από το πλασμίδιο αυτό κλωνοποιήθηκαν όλα τα τμήματα των ελλείψεων με τον ίδιο τρόπο σε pPVX202 όπως έγινε για τα άλλα κομμάτια και προέκυψε η σειρά NF (No Frame) (βλέπε Κεφ. Αποτελέσματα Παρ. 3.2). Αυτές οι κατασκευές χρησιμοποιήθηκαν σαν κατασκευές ελέγχου παράλληλα με τις κατασκευές που παράγουν πρωτεΐνη. Όλα τα πλασμίδια NF ήταν μολυσματικά εκτός από το pHraNF το οποίο δεν δοκιμάστηκε δεδομένου ότι ούτε το pHra ήταν μολυσματικό:

Το pHindNF σε δέκα μολύνσεις και συνολικά 29 φυτά μολύνθηκαν τελικά τα τέσσερα από τα οποία κανένα δεν έδωσε συμπτώματα όμοια με το p2Lema.

Το pMscNF σε εννέα μολύνσεις και σε 27 φυτά μόλυνε τελικά τα 4 και κανένα από αυτά δεν παρουσίασε συμπτώματα όμοια με εκείνα του pMsc (εικ. 49).



Εικόνα 49 Φυτά από δυο ανεξάρτητα πειράματα μόλυνσεων με τις κατασκευές *rMsc* και *rMscNF*. Στην εικόνα A: φυτό μολυσμένο με *rMsc*, με *rMscNF* και με *rPVX202*.

Το *rRsaNF* σε επτά πειράματα μόλυνσεων και συνολικά 19 φυτά μόλυνε τα δύο τα οποία εμφάνισαν συμπτώματα όμοια με εκείνα του *rPVX202* (εικ 50).

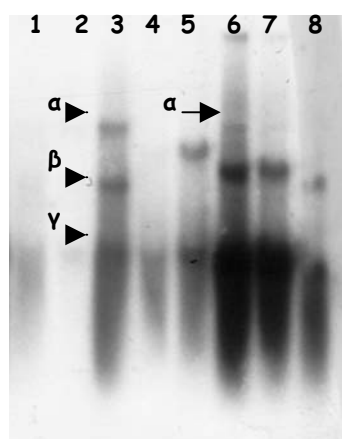


Εικόνα 50 Φυτά μολυσμένα με τις κατασκευές *rRsa* και *rRsaNF*. Το NF φυτό παρουσιάζει συμπτώματα συγκρίσιμα με εκείνα του *PVX*.

Το γεγονός ότι οι κατασκευές που θεωρητικά παράγουν πρωτεΐνη προκαλούν φαινότυπο ενώ αυτές με κατεστραμμένο πλαίσιο διαβάσματος όχι, οδηγεί στο αρχικό συμπέρασμα ότι η παραγωγή της πρωτεΐνης από το σύστημα του *PVX* ευθύνεται για τον φαινότυπο.

Μία απάντηση για το τι συμβαίνει κατά την μόλυνση με την πρωτεΐνη που παράγεται από τον ιό, γιατί άλλοτε ανιχνεύεται και άλλοτε όχι, θα μπορούσε να βρεθεί από την ανάλυση των RNA που παράγονται από τον ιό στα φυτά που περιέχουν τις παραπάνω κατασκευές.

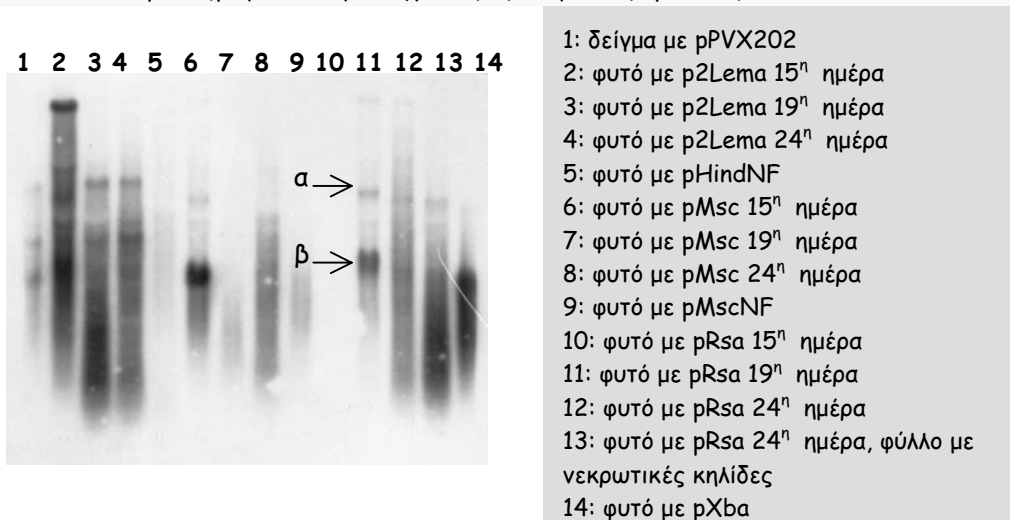
Αυτό που έχει παρατηρηθεί από τα προηγούμενα πειράματα είναι ότι σχεδόν πάντα στα φυτά υπάρχει ένα μίγμα πληθυσμών RNA λόγω της αστάθειας των κατασκευών και επίσης τα υπογενωμικά RNA των ιών που περιέχουν ξένες αλληλουχίες είναι σημαντικά ελαττωμένα. Σε όλα τα πειράματα εντοπισμού των RNA των μολυσμένων φυτών παρατηρήθηκαν σημαντικά προβλήματα και σχεδόν πάντα η εικόνα δεν ήταν ξεκάθαρη όσον αφορά του ποιο RNA παράγεται και από ποιο RNA μεταφράζεται η πρωτεΐνη.



Εικόνα 51 Αυτοραδιογραφία πληθυσμών RNA με ανιχνευτή την καρδιακή πρωτεΐνη του ιού *PVX*. Τα δείγματα είναι: 1,2,3: φυτό *rMsc* (της μεμβράνης 1 της εικόνας 44) 16, 19 και 26 ημέρες μετά την μόλυνση αντίστοιχα, 4 και 5: φυτά *x* *XbaI*, 6,7 φυτό *x* *rMscNF* 16 και 19 ημέρες από την μόλυνση και 8: φυτό *x* *HindNF*.

Στην εικόνα 51 αναλύονται RNA φυτών με συμπτώματα καθώς και φυτών με NF κατασκευές. Τα δείγματα 1, 2, 3, είναι είναι εκχύλισμα RNA φυτού με pMsc που παράγει την πρωτεΐνη 16, 19 και 26 ημέρες μετά την μόλυνση. Στο φυτό αυτό η πρωτεΐνη που ανιχνεύεται με το αντίσωμα (εικ. 48 μεμβράνη 1) πρέπει να παράγεται από κάποιο υπογενωμικό RNA που όμως δεν είναι ανιχνεύσιμο όταν παράγεται η πρωτεΐνη (δείγμα 1 και 2) αλλά όταν αυτή έχει πάψει να παράγεται (δείγμα 3α από την σχετική του θέση από το 3γ που είναι η καψιδιακή πρωτεΐνη). Τα δείγματα 6 και 7 είναι φυτό MscNF χωρίς συμπτώματα όπου φαίνεται ότι το αρχικά σωστό RNA της LeMA-1 (6α) την 16^η ημέρα της μόλυνσης εξαφανίζεται την 19^η ημέρα από την μόλυνση. Το δείγμα 8 είναι μολυσμένο με pHindNF που όμως έχει χάσει την ένθεση και παρουσιάζει υπογενωμικό RNA στο ύψος του πρώτου υπογενωμικού του PVX.

Εικόνα 52 Αυτοραδιογραφία RNA με ανιχνευτή την καψιδιακή πρωτεΐνη του PVX.



Τα δείγματα: 10,11, 12, 13 της εικόνας 52 είναι το φυτό μολυσμένο με pRsa που έδωσε την υπερέκφραση (εικόνα 44). Τα δείγματα 10, 11, 12 και 13 αντιστοιχούν στα δείγματα 4, 3, 2 και 1 της εικόνας 44. Στην αρχή της μόλυνσης, 19^η ημέρα (4 ημέρες μετά την εμφάνιση των συμπτωμάτων) η LeMA-1-Rsa παράγεται από το υπογενωμικό RNA: 11β, το οποίο σταδιακά μικραίνει και ελαττώνεται. Η ζώνη 11α αντιστοιχεί στο υπογενωμικό του triple block. Γενικά, το RNA όλων των δειγμάτων δεν δίνει ξεκάθαρες ζώνες των πληθυσμών RNA που ανιχνεύονται.

3.3.4 Πειράματα ελέγχου της ποιότητας των εκχυλισμάτων RNA των μολυσμένων φυτών.

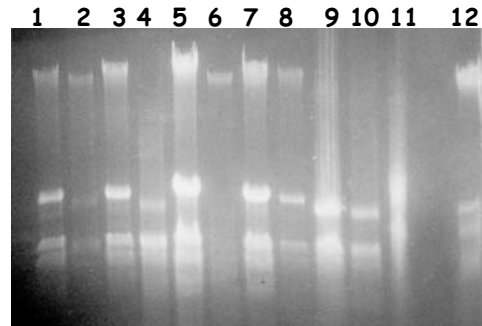
Θεωρώντας ότι η εικόνα του RNA είναι αποτέλεσμα λάθους στην διαδικασία απομόνωσης ή ανάλυσης των δειγμάτων έγιναν κάποιες δοκιμές απομόνωσης RNA με διάφορους τρόπους (εικ 53).

Επίσης, έγινε αποδιάταξη με φορμαλδεΰδη και με ισοθειοκυανικά. Τα δείγματα αναλύθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1% με ισοθειοκυανικά 20mM και πήκτωμα αγαρόζης 1% με φορμαλδεΰδη (εικ. 53 Β, Γ, Δ αντίστοιχα) το οποίο μετά την ηλεκτροφόρηση αφέθηκε να προσροφήσει βρωμιούχο αιθίδιο και φωτογραφήθηκε σε υπεριώδες φως. Στα δείγματα αυτά δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά με εξαίρεση ίσως τα δείγματα που εκχυλίσθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου (53 Β, Γ, Δ 3 και 4) τα οποία αποδιαταγμένα παρουσιάζουν εικόνα συγκρίσιμη με τα υπόλοιπα. Απορρίφθηκε το σύστημα tri-reagent (δείγμα 53Α 4). Δείγματα

από τις δοκιμές αυτές επιλέγηκαν και ακολουθήθηκε η τυπική διαδικασία υβριδοποίησης με ανιχνευτή την αλληλουχία της καψιδιακής πρωτεΐνης του PVX (εικ. 54).

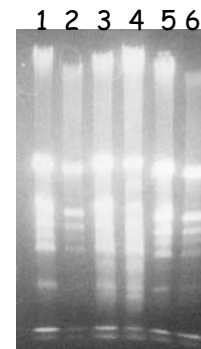
Εικόνα 53 Δοκιμή απομόνωσης RNA με διάφορους τρόπους. Το πήκτωμα είναι αгарόζη-ισοθειοκυανικά 20mM

- 1- PVX (TEMS-SDS 1%)
- 2- PVX με ισοθειοκυανικά 20mM
- 3- ρΧba (TEMS-SDS 1%)
- 4- ρΧba (Tri-reagent)
- 5- ρΧba-TEMS
- 6- ρΧba-TEMS προηγούμενης απομόνωσης 2 μηνών
- 7- ρΧba-ΦOH προηγούμενης απομόνωσης 2 μηνών
- 8- ρΧba-ΦOH προηγούμενης απομόνωσης 1 μήνα
- 9- ρΧba-TEMS-ΦOH
- 10- RNA υγιούς (TEMS-ΦOH)
- 11- RNA (δύο συναδέλφου από πείραμα με καλό σήμα)
- 12- PMscNF (TEMS-ΦOH)



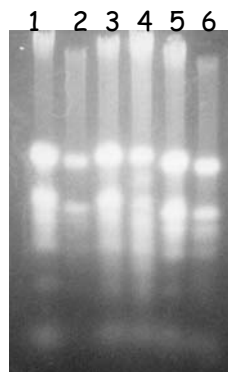
Πείραμα Α

- 1- ομογενοποίηση σε φαινόλη εκχύλιση με TEMS
- 2- ομογενοποίηση σε φαινόλη-SDS 1%, εκχύλιση με TEMS
- 3- ομογενοποίηση σε ΦOH-TEMS σε θερμοκρασία δωματίου
- 4- ομογενοποίηση σε ΦOH-TEMS-SDS 1% σε θερμοκρασία δωματίου
- 5- εκχύλιση με ζεστή φαινόλη-TEMS
- 6- ομογενοποίηση σε υγρό N₂ με φαινόλη, εκχύλιση με TEMS

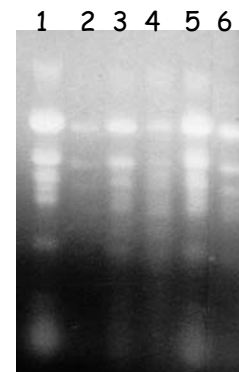


Πείραμα Β

Τα δείγματα του πειράματος Β αποδιατάχθηκαν με επώαση στους 95°C για 5 λεπτά και αναλύθηκαν σε αποδιατακτικά πήκτωμα αгарόζης 1% με ισοκυανικά 20mM (πειράμα Γ) και φορμαλδεΰδη 16% (πειράμα Δ).

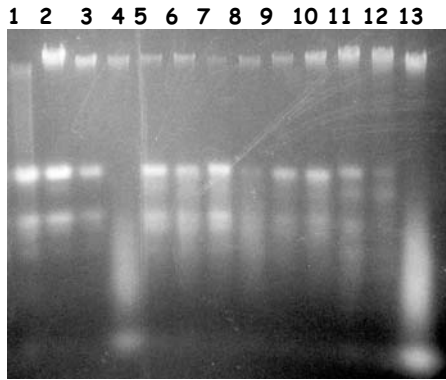


Γ: Αποδιατακτικό πήκτωμα αгарόζης με ισοθειοκυανικά

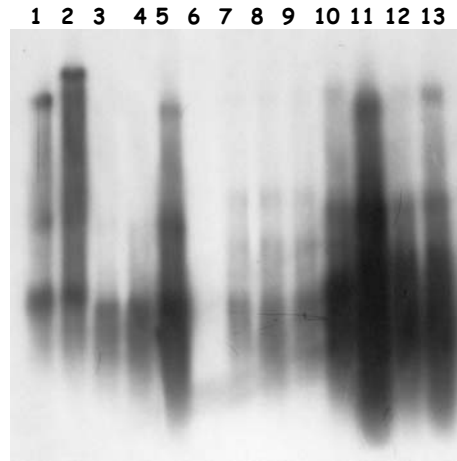


Δ: Αποδιατακτικό πήκτωμα αгарόζης με φορμαλδεΰδη

Ενώ η ποιότητα του RNA κρίνεται ικανοποιητική από την εικόνα των ριβοσωμικών RNA τελικά αποδεικνύεται ότι τα RNA που ανιχνεύονται στα φυτά που περιέχουν τις κατασκευές της LeMA-1 δεν δίνουν διακριτές ζώνες. Υπάρχει το πρόβλημα της απόρριψης της ένθεσης που δημιουργεί πληθυσμούς μορίων ποικίλου μήκους για κάθε είδος RNA (γενωμικά και υπογενωμικά), αλλά και πάλι οι ζώνες δεν είναι διακριτές και δεν είναι δυνατή η εκτίμηση του μεγέθους των RNA που εντοπίζονται σε κάθε φυτό.



A: μη αποδιατακτικό
πήκτωμα αγαρόζης



B: Αυτοραδιογραφία του
A με ανιχνευτή PVX

Εικόνα 54 Αυτοραδιογραφία RNA με ανιχνευτή την κασιδιακή πρωτεΐνη του PVX.

1: δείγμα με pPVX202

2: φυτό *Nic. benthamiana* x r2Lema

3: φυτό με r2Lema 15^η ημέρα

4: φυτό με r2Lema 19^η ημέρα

5: φυτό με r2Lema 24^η ημέρα

6: φυτό με rHindNF

7: φυτό με rMsc 15^η ημέρα

8: φυτό με rMsc 19^η ημέρα

9: φυτό με rMsc 24^η ημέρα

10: φυτό με φυτό με rMscNF

11: φυτό με rRsa 15^η ημέρα

12: φυτό με rRsa 19^η ημέρα

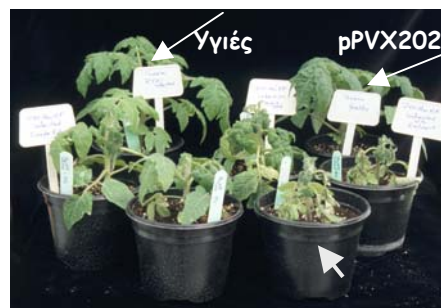
13: φυτό με rRsa 24^η ημέρα

3.3.5 Η έκφραση του τμήματος RNA της LeMA-1 που περιέχει τα πρώτα 740 νουκλεοτίδια (rMscNF), το οποίο περιέχει διακοπή του πλαισίου διαβάσματος μετά το 43^ο αμινοξύ, προκαλεί θνησιγόνο φαινότυπο!

Στο σημείο αυτό, όπου η ανάλυση των RNA δεν επιτρέπει συμπεράσματα για το τι συμβαίνει με την παραγόμενη πρωτεΐνη από τον PVX, τότε παράγεται τότε όχι και ποια η σχέση της με την εκδήλωση του φαινοτύπου, ένα φυτό ανέτρεψε τα μέχρι τότε συμπεράσματα και δημιούργησε μάλλον περισσότερες ερωτήσεις παρά απαντήσεις. Σε μια σειρά μολύνσεων με όλες τις κατασκευές (από τρία φυτά στην καθεμία) μόνο ένα φυτό εκδηλώνει ξεκάθαρα τον φαινότυπο και αυτό είναι φυτό μολυσμένο με MscNF! (εικ. 55A). Για να αποκλειστεί οποιαδήποτε περίπτωση λάθους επαναλήφθηκε το πείραμα σε δεύτερη σειρά μολύνσεων με 10 φυτά αυτή την φορά τα οποία μολύνθηκαν με πρωτεϊνικό εκχύλισμα από αυτό το φυτό και με πλασμιδιακό DNA από τον αρχικό κλώνο rMscNF αφού πρώτα ελέγχθηκε ότι πρόκειται για το σωστό πλασμιδίο. Όλα αυτά τα φυτά εκδήλωσαν τα συμπτώματα (εικ. 55B).



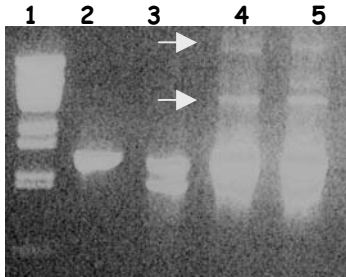
Φωτογραφία A



Φωτογραφία B

Εικόνα 55 Φωτογραφίες φυτών μολυσμένων με την κατασκευή rMscNF. Φωτ. A: το πρώτο φυτό rMscNF που εκδήλωσε τα συμπτώματα της LeMA-1. Φωτ. B: φυτά που μολύνθηκαν με εκχύλισμα από το φυτό της φωτ. A, ενώ στο κέντρο επισημαίνεται φυτό που μολύνθηκε με πλασμιδιακό DNA της ίδιας κατασκευής. Στο βάθος αριστερά διακρίνεται υγιές φυτό, ενώ στο βάθος δεξιά φυτό μολυσμένο με pPVX202(PVX).

Το RNA των φυτών αυτών ελέγχθηκε με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης μετά από αντίστροφη μεταγραφή εκχυλίσματος RNA από τα φυτά αυτά με κατάλληλους εκκινητές (εικ. 56)

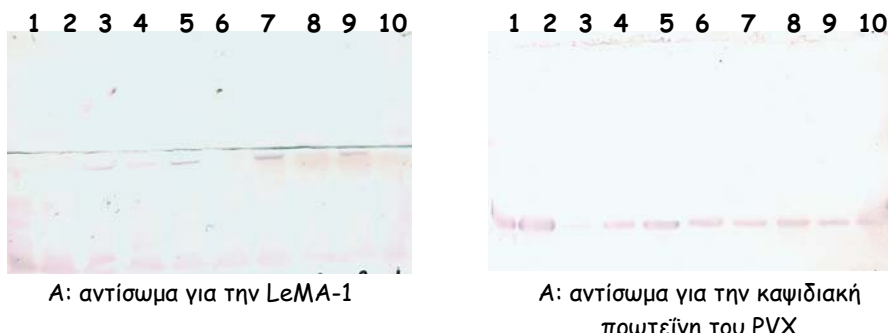


Εικόνα 56 Φωτογραφία πηκτώματος αгарόζης 1% με βρωμιούχο αιθίδιο σε υπεριώδες φώς. Στο πήκτωμα αναλύονται τα προϊόντα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης μετά από αντίστροφη μεταγραφή RNA φυτών μολυσμένων με pMscNF:

- 1- δείκτης μεγέθους λEcoRI/HindIII
- 2- φυτό με pPVX202 (PVX)
- 3- φυτό με MscNF χωρίς συμπτώματα
- 4- φυτό με MscNF με συμπτώματα (μόλυνση με πρωτεϊνικό εκχύλισμα)
- 5- φυτό με MscNF με συμπτώματα (μόλυνση με DNA)

Η κατασκευή pPVX202 με τους εκκινητές που έχουν επιλεγεί παράγει τμήμα DNA μήκους 550 βάσεων (δείγμα 2 εικ. 56), στο κομμάτι αυτό προστίθεται το μήκος που έχει κλωνοποιηθεί κάθε φορά που στην περίπτωση του MscNF είναι 740 νουκλεοτίδια. Δηλαδή στην αντίδραση αυτή αναμένεται κομμάτι μήκους 1290, η επάνω ζώνη στο δείγμα 4 και 5. Ανιχνεύονται και μικρότερα τμήματα προϊόντα αποδόμησης του αρχικού RNA. Η διπλή ζώνη στο δείγμα 3, φυτό με MscNF χωρίς συμπτώματα, είναι αποτέλεσμα απόρριψης της ένθεσης συμπαρασύροντας και τμήμα του PVX, πράγμα που δικαιολογεί και την εικόνα του φυτού.

Σε επίπεδο πρωτεΐνης τα φυτά αυτά δεν παρουσιάζουν ούτε την ίδια εικόνα, ούτε σημαντική ελάττωση ή αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης, τέτοια που να δικαιολογεί τον θνησιγόνο φαινότυπο που παρατηρείται στα φυτά αυτά. Η ανάλυση των πρωτεϊνών των φυτών αυτών φαίνεται στην εικόνα 57.



A: αντίσωμα για την LeMA-1

A: αντίσωμα για την καψιδιακή πρωτεΐνη του PVX

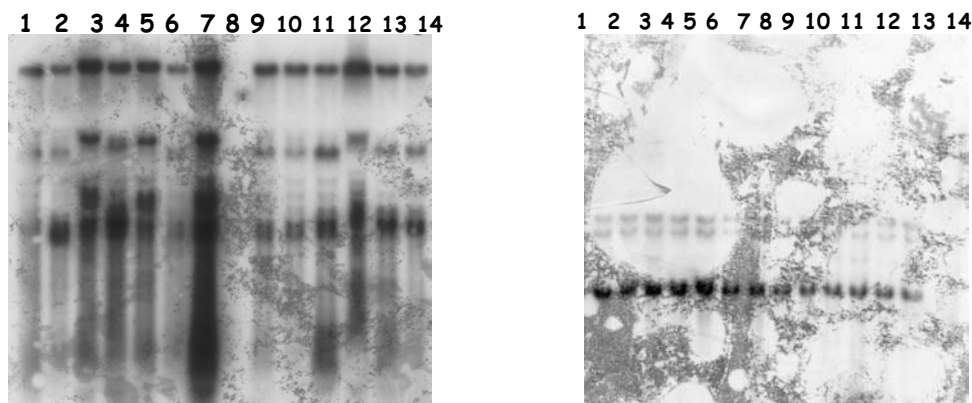
Εικόνα 57 Ανίχνευση πρωτεϊνών σε φυτά μολυσμένα με την κατασκευή pMscNF. Η μεμβράνη A δίνει σήμα για την πρωτεΐνη LeMA-1 ενώ η μεμβράνη B για την καψιδιακή πρωτεΐνη του PVX. Από την μεμβράνη B φαίνονται τα επίπεδα της μόλυνσης σε κάθε φυτό. Τα δείγματα στις δυο μεμβράνες είναι τα ίδια: δείγματα 1, 2, 3: φυτό (20, 18 και 12 ημέρες μετά την μόλυνση αντίστοιχα), μολυσμένο με ακατέργαστο εκχύλισμα (φύλλο από μολυσμένο φυτό ομογενοποιείται σε νερό και ποσότητα του μίγματος χρησιμοποιείται για την αναμόλυνση), τα δείγματα 4, 5 και 6 εκχύλισμα από το φυτό που μολύνθηκε με DNA (20, 18 και 12 ημέρες μετά την μόλυνση αντίστοιχα), 7, 8 εκχύλισμα του πρώτου φυτού που εμφάνισε τα συμπτώματα 26 και 12 ημέρες μετά την μόλυνση, 9: φυτό μολυσμένο με pPVX202 και 10: φυτό υγιές.

Ταυτόχρονα είχαν αρχίσει να εμφανίζονται στη βιβλιογραφία αναφορές για το φαινόμενο της σίγησης γονιδίων σε φυτά μέσω RNA (RNA silencing), θεωρία που αν ισχύει στην περίπτωση αυτή εξηγεί τα μέχρι τώρα αποτελέσματα. Σύμφωνα με το φαινόμενο αυτό το RNA που εκφράζεται μέσω του PVX προκαλεί την έναρξη της αποδόμησης του RNA του ιού

σαν μέρος της άμυνας των φυτών ενάντια σε RNA ιούς. Οι κατασκευές αυτές όμως εκφράζουν RNA που είναι ομόλογο με το ενδογενές RNA της *LeMA-1* που οδηγεί στην αποδόμηση και του ενδογενούς RNA. Αυτό θα είχε ως συνέπεια την καταστολή του ενδογενούς γονιδίου και πιθανόν αυτό να ευθύνεται για τον φαινότυπο που παρατηρείται κατά την έκφραση αλληλουχιών της *LeMA-1* σε φυτά μέσω του PVX.

Στα φυτά με την κατασκευή *pMscNF* δεν παρατηρήθηκε δραματική ελάττωση των επιπέδων της πρωτεΐνης ώστε να μπορεί να αποδοθεί ο φαινότυπος σε έλλειψη του προϊόντος του γονιδίου της *LeMA-1* και απώλεια της λειτουργίας της στα κύτταρα. Από την βιβλιογραφία όμως είναι γνωστό ότι οι πρωτεΐνες της υποοικογένειας της *LeMA-1* έχουν πολύ μεγάλο χρόνο ημιζωής (Tanaka, K., & Ichihara, A., 1989) και είναι πιθανό να μην φαίνεται η επίδραση του φαινομένου σε επίπεδο πρωτεΐνης.

Αν ο φαινότυπος που παρατηρείται οφείλεται σε ειδική αποδόμηση του RNA της *LeMA-1*, τότε, θα πρέπει να παρατηρείται η ίδια εικόνα στο ενδογενές παραγόμενο RNA και ταυτόχρονα να μην επηρεάζονται άλλα RNA του κυττάρου. Για να μελετηθεί η παραπάνω θεωρία έγινε μια σειρά από αναλύσεις RNA φυτών που παρουσιάζουν συμπτώματα *LeMA-1* καθώς και αυτών που εμφανίζουν εικόνα μόλυνσης από τον PVX με ανιχνευτές για την *LeMA-1* κατάλληλους να διαχωρίσουν το ενδογενές RNA από εκείνο που παράγεται από τον ιό. Στο πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκαν φυτά που περιέχουν τα ελλειπτικά τμήματα της *LeMA-1* και παρέχουν την δυνατότητα παρασκευής ανιχνευτών κατάλληλους να διακρίνουν το παραγόμενο από τον ιό RNA της *LeMA-1* από το ενδογενές. Παρασκευάστηκαν δύο ανιχνευτές: ένας στο 5' άκρο της *LeMA-1* που περιέχεται στις ελλειπτικές κατασκευές και ανιχνεύει το παραγόμενο από τον ιό RNA και ένας από το 3' άκρο της που δεν υπάρχει στα πλασμίδια αυτά και ανιχνεύει το ενδογενώς παραγόμενο RNA.



A: Ανιχνευτής PVX

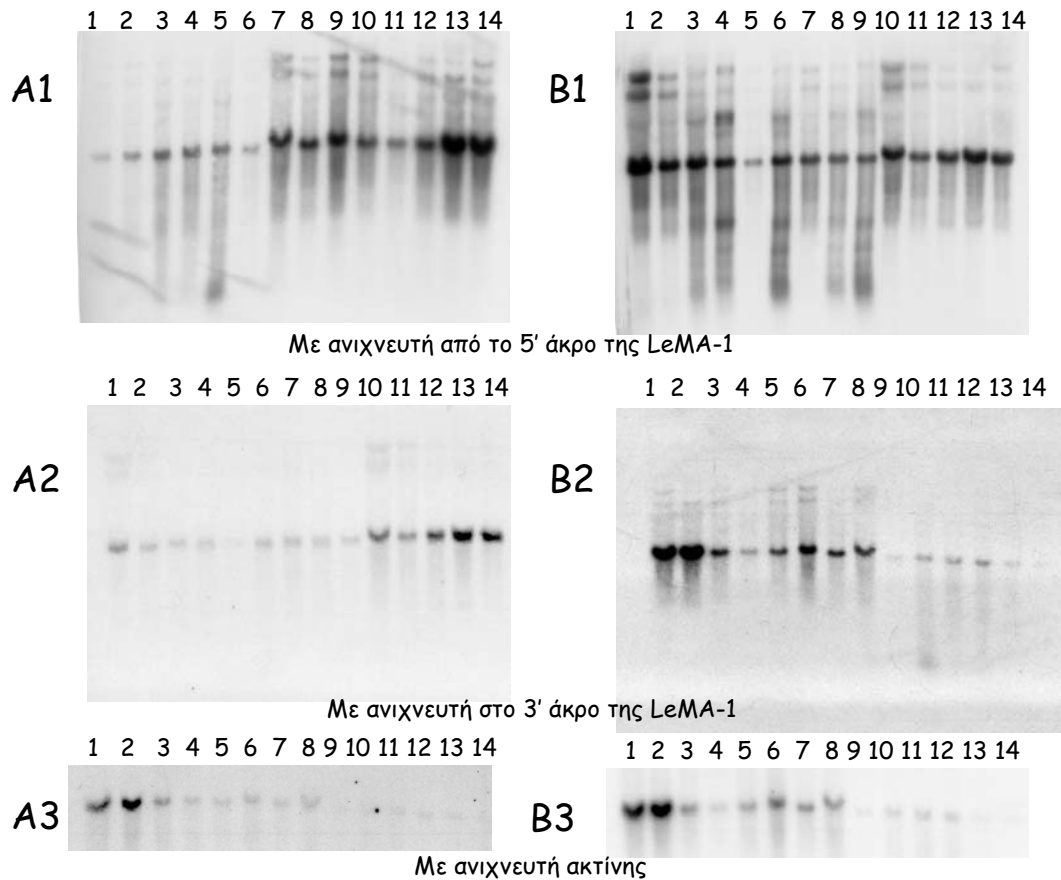
B: Ανιχνευτής *LeMA-1*

Εικόνα 58 Αυτοραδιογραφία RNA με ανιχνευτή A: την καψιδιακή πρωτεΐνη του PVX και B: τις αλληλουχίες της *LeMA-1* από το 3' άκρο του *m10a* ως την θέση πέψης του ενζύμου *HpaI*. Τα δείγματα στις δυο εικόνες είναι τα ίδια:

- | | |
|----------------------------|--------------------------------|
| 1- φυτό με <i>pMsc</i> (1) | 8- υγιές |
| 2- φυτό με <i>pRsa</i> (1) | 9- φυτό με <i>MscNF</i> (2) |
| 3- φυτό με <i>pMsc</i> (2) | 10- φυτό με <i>MscNF</i> (1) |
| 4- φυτό με <i>pXba</i> (2) | 11- φυτό με <i>HindNF</i> (2) |
| 5- φυτό με <i>pXba</i> (1) | 12 - φυτό με <i>HindNF</i> (1) |
| 6- φυτό με <i>pSsp</i> (2) | 13- φυτό με <i>pPVX202</i> (2) |
| 7- φυτό με <i>pSsp</i> (1) | 14- φυτό με <i>pPVX202</i> (1) |

Από τα φυτά της εικόνας 58, τα μόνα που εμφάνισαν τα συμπτώματα της *LeMA-1* είναι το *pMsc2* (δείγμα 3) και το *pRsa1* (δείγμα 2). Επίσης τα δυο φυτά με *pSsp* (δείγματα 6 και 7) εκδήλωσαν το φαινότυπο του προηγούμενου από του οποίου το εκχύλισμα αναμολύνθηκαν, άρα περιέχουν πλήρως την ένθεση. Τα υπόλοιπα εκδήλωσαν συμπτώματα

μόλυνσης με PVX. Σε όλα τα δείγματα φαίνεται να απορρίπτεται η ένθεση όπως συνήθως, ενώ στα δείγματα 3 και 7 που εκδηλώνουν τα συμπτώματα φαίνονται οι τέσσερις ζώνες που προβλέπονται από την έκφραση του υπογενωμικού της ένθεσης. Σε κανένα από αυτά (εικ. 58B) δεν φαίνεται να υπάρχει πρόβλημα στο ενδογενές RNA της LeMA-1.



Εικόνα 59 Οι εικόνες A1, A2, A3 περιέχουν τα ίδια δείγματα με την ίδια σειρά, όπως και τα B1, B2, B3. Στα A1 και B1 παρουσιάζεται η εικόνα των RNA που περιέχουν την LeMA-1 και παράγονται από τον ιό-φορέα. Στα A2 και B2 παρουσιάζεται η εικόνα του ενδογενούς RNA της LeMA-1 και δεν περιέχεται στις κατασκευές με τις οποίες μολύνθηκαν τα φυτά. Τέλος τα A3 και B3 είναι ανίχνευση ακτίνης σαν δείκτη για την ακεραιότητα των RNA που παρουσιάζονται στις παραπάνω εικόνες. Τα δείγματα των ομάδων A και B είναι:

Ομάδα A	Ομάδα B
1. Φυτό MscNF(8) 17 ^η ημέρα	1. Φυτό MscNF με συμπτώματα 12 ^η ημέρα
2. Φυτό MscNF(8) 15 ^η ημέρα	2. Φυτό Xba με συμπτώματα 8 ^η ημέρα
3. Φυτό MscNF(7) 17 ^η ημέρα	3. Φυτό Msc με συμπτώματα
4. Φυτό MscNF(7) 15 ^η ημέρα	4. Φυτό Msc με συμπτώματα 8 ^η ημέρα
5. Φυτό MscNF(4) 17 ^η ημέρα	5. Φυτό MscNF χωρίς συμπτώματα 8 ^η ημέρα
6. Φυτό MscNF(4) 15 ^η ημέρα	6. Φυτό MscNF(11) 17 ^η ημέρα
7. Φυτό MscNF(3) 17 ^η ημέρα	7. Φυτό MscNF(10) 17 ^η ημέρα
8. Φυτό MscNF(3) 15 ^η ημέρα	8. Φυτό MscNF(9) 17 ^η ημέρα
9. Φυτό MscNF(2) 17 ^η ημέρα	9. Φυτό MscNF(9) 15 ^η ημέρα
10. Φυτό MscNF(2) 15 ^η ημέρα	10. Φυτό MscNF(6) 15 ^η ημέρα
11. Φυτό MscNF(1) 17 ^η ημέρα	11. Φυτό MscNF(5) 15 ^η ημέρα
12. Φυτό MscNF(1) 15 ^η ημέρα	12. Φυτό με pPVX202 8 ^η ημέρα
13. Υγιές	13. Υγιές
14. Υγιές	14. Υγιές

Τα φυτά εκείνα που θα έπρεπε να δείξουν τι ακριβώς συμβαίνει με το RNA και αν πράγματι το RNA αποδομείται λόγω του φαινομένου της γονιδιακής καταστολής μέσω RNA είναι τα φυτά της σειράς των *pMscNF* που εκδήλωσαν τα συμπτώματα. Τα φυτά αυτά αναλύθηκαν με τρεις διαφορετικούς ανιχνευτές: στο 5' άκρο της *LeMA-1* που ανιχνεύει το RNA που παράγεται από τον ιό (εικ. 59 A1, B1), στο 3' άκρο της *LeMA-1* που ανιχνεύει το ενδογενές RNA (εικ. 59 A2, B2) και τέλος ανιχνευτή ακτίνης σαν δείκτη της ποιότητα των άλλων RNA του κυττάρου (εικ 59 A3, B3).

Από την εικόνα της ακτίνης (A3, B3) φαίνεται ότι η κατάσταση του RNA που εκχυλίσθηκε είναι ικανοποιητική. Δεν μπορεί όμως να εξαχθεί συμπέρασμα για το αν συμβαίνει ειδική αποδόμηση του RNA της *LeMA-1* λόγω της παρουσίας του ιού στα κύτταρα. Η εικόνα με τον ανιχνευτή του RNA που παράγεται από τον ιό (A1, B1) δίνει περισσότερες ζώνες και αρκετή σκιά σε σχέση με την εικόνα των υγιών φυτών ή αυτών με PVX (δείγματα 12, 13, 14). Ούτε και τα πειράματα αυτά βοήθησαν στο να εξαχθεί κάποιο συμπέρασμα ως προς το τι πραγματικά συμβαίνει με την έκφραση της *LeMA-1* στα φυτά αυτά.

Σε όλα αυτά τα μολυσμένα φυτά που εκδηλώνουν το φαινότυπο, είτε περιέχουν ολόκληρη την πρωτεΐνη, είτε ελλειπτικά κομμάτια από αυτήν είτε τέλος τα NF πλασμίδια, όλα εκφράζουν τα πρώτα 43 αμινοξέα της πρωτεΐνης (όπου έγινε διακοπή του πλαισίου διαβάσματος με το ένζυμο *XbaI*). Δηλαδή σε όλες αυτές τις κατασκευές παράγεται τουλάχιστον ένα πεπτίδιο 43 αμινοξέων το οποίο είναι πιθανό να προκαλεί τον παρατηρούμενο φαινότυπο. Η εικόνα θα ξεκαθάριζε αν υπήρχε μια κατασκευή η οποία θα παράγει RNA της *LeMA-1* το οποίο να μην είναι μεταφράσιμο και να παρατηρηθεί η επίδραση της κατασκευής αυτής σε φυτά.

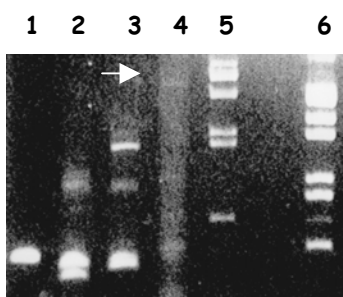
3.3.6 Έκφραση τμημάτων της *LeMA-1* που δεν παράγουν πρωτεΐνη προκαλούν θνησιγόνο φαινότυπο.

Με στόχο την καταστροφή του πλαισίου διαβάσματος της πρωτεΐνης στην αρχή του γονιδίου σχεδιάστηκε εκινητής ο οποίος μετατρέπει το δεύτερο ATG της *LeMA-1* (5^ο αμινοξύ) σε TAGC, εισάγεται δηλαδή κωδικόνιο λήξης και μια ακόμη βάση που να προκαλέσει και μετακίνηση του πλαισίου διαβάσματος κατά ένα νουκλεοτίδιο. Η μεταλλαγή έγινε με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης στον κλώνο *m10a* και όλη η αλληλουχία της *LeMA-1* κλωνοποιήθηκε σε *pPVX202* με αποτέλεσμα το πλασμίδιο *pLeMut*.

Ακολούθησε μόλυνση φυτών με την κατασκευή αυτή. Από τρία φυτά που χρησιμοποιήθηκαν μολύνθηκε το ένα παρουσιάζοντας όμως τον φαινότυπο που παρατηρείται και στις υπόλοιπες κατασκευές της *LeMA-1* (δεν παρουσιάζεται εικόνα.).

Το RNA που περιέχεται στο φυτό αυτό ελέγχθηκε με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης στο DNA που προκύπτει από την αντίστροφη μεταγραφή εκχυλίσματος RNA με κατάλληλο εκινητή ώστε να επιλέγονται τα μόρια RNA που περιέχουν αλληλουχίες του PVX (εικ. 60).

Εικόνα 60 Πήκτωμα αгарόζης 1% όπου αναλύονται τα προϊόντα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε DNA που συντίθεται με αντίστροφη μεταγραφή μορίων RNA που επιλέγονται από εκινητή του PVX:



- 1- RNA από φυτό με *pPVX202*
- 2- RNA από φυτό με *LeMA-1*
- 3- RNA από φυτό με *Msc*
- 4- RNA από φυτό με *LeMut*
- 5- Δείκτης μεγέθους λ BstEII
- 6- Δείκτης μεγέθους λ EcoRI/HindIII

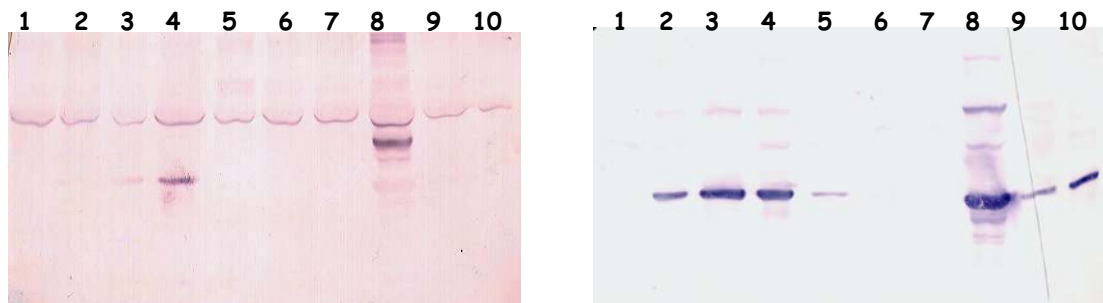
Στην εικόνα 60 φαίνονται το μέγεθος της ένθεσης σε κάθε κατασκευή. Ο ιός με τους εκινητές που έχουν επιλεγεί δίνει κομμάτι μήκους 550 βάσεων. Η κατασκευή p2Lema παράγει κομμάτι μήκους 2109 βάσεων, στο συγκεκριμένο φυτό (δείγμα 2) έχει απορριφθεί το μεγαλύτερο μέρος αφού η πάνω ζώνη είναι περίπου 900 βάσεων. Το δείγμα 3 είναι από φυτό με pMsc που παράγει πρωτεΐνη και πρέπει να δίνει κομμάτι μήκους 1290 βάσεων. Εδώ φαίνονται τρεις ζώνες η πρώτη από τις οποίες είναι στο σωστό προβλεπόμενο μήκος. Το δείγμα 4 είναι το φυτό LeMut το οποίο αναμένεται να δώσει κομμάτι 1990 βάσεων που είναι η πρώτη ζώνη. Στο φυτό αυτό φαίνεται η αποδόμηση του RNA.

Το RNA του φυτού LeMut παρουσιάζει το φαινόμενο της αποδόμησης του RNA, παράγει όμως και πρωτεΐνη!

Έγινε ανίχνευση της LeMA-1 σε αυτήν την σειρά φυτών με στόχο να δειχθεί ότι δεν παράγεται πρωτεΐνη, όμως, με κάποιο τρόπο έχει παρακαμφθεί το κωδικόνιο λήξης και η LeMA-1 παράγεται από την επόμενη μεθειονίνη (εικ. 60). Στο πείραμα αυτό, συμπτώματα LeMA-1 παρουσίασαν τα δυο p2Lema φυτά, τα δυο pMsc, το pMscNF τα οποία μολύνθηκαν από εκχύλισμα φυτών που παρουσίασε τα συμπτώματα σε προηγούμενο πείραμα, και αυτό ίσως δικαιολογεί και την εικόνα του RNA του φυτού p2Lema και pMsc της εικόνας 60 (δείγματα 2 και 3). Το φυτό LeMut μολύνθηκε με DNA.

Στην εικόνα 61 φαίνεται η 24.2KDa πρωτεΐνη που παράγεται από τα pMsc φυτά (δείγματα A3 και A4). Στο δείγμα A8 είναι εκχύλισμα από το φυτό με την κατασκευή pLeMut το οποίο όχι μόνο δεν παράγει πρωτεΐνη αλλά υπερπαράγει τμήμα της πρωτεΐνης από την τρίτη στη σειρά μεθειονίνη της LeMA-1 το 19^ο αμινοξύ της πρωτεΐνης, παράγοντας έτσι πρωτεΐνη μικρότερη κατά 2KDa!

Το φυτό LeMut παράγει πρωτεΐνη και συνεπώς δεν βοηθάει να δοθεί απάντηση στο τι τελικά ευθύνεται για τον φαινότυπο, η υπερέκφραση της LeMA-1 ή η καταστολή του γονιδίου της μέσω RNA:



A: Αντίσωμα LeMA-1

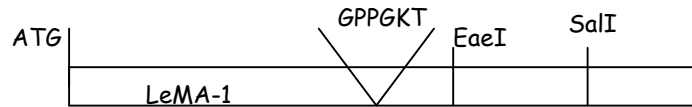
B: Αντίσωμα PVX

Εικόνα 61 Ανίχνευση πρωτεϊνών σε φυτά της σειράς του πειράματος με το Lemut. Στη μεμβράνη A ανιχνεύεται η πρωτεΐνη LeMA-1 ενώ στην μεμβράνη B ανιχνεύεται η καθιδιακή πρωτεΐνη του PVX σαν έλεγχος της μόλυνσης των φυτών. Τα δείγματα στις δυο μεμβράνες είναι ίδια:

- | | |
|-------------------------|-------------------------|
| 1: Υγιές φυτό | 6: φυτό με p2Lema(1) |
| 2: φυτό με pPVX202(PVX) | 7: φυτό με p2Lema(2) |
| 3: φυτό με pMsc(1) | 8: φυτό με pLeMut(2) |
| 4: φυτό με pMsc(2) | 9: φυτό με pHindNF(1) |
| 5: φυτό με MscNF(2) | 10: φυτό με pHindNF (2) |

Μετά από αυτή τη σειρά πειραμάτων αποφασίστηκε η παρασκευή μιας νέας κατασκευής στον pPVX202 που να περιέχει τμήμα της LeMA-1 τέτοιο που να μην παράγεται πρωτεΐνη από αυτό, αλλά να είναι αρκετά μεγάλο να προκαλέσει το φαινόμενο της γονιδιακής καταστολής μέσω RNA. Για την κατασκευή αυτή κλωνοποιήθηκε το τμήμα EaeI-SalI του

κλώνου m10a μήκους 451 νουκλεοτιδίων, το κέντρο της πρωτεΐνης (εικ. 62), στις θέσεις EagI-SalI του φορέα pPVX202. Η κατασκευή αυτή ονομάστηκε rLES και δεν μπορεί να παράγει το πεπτίδιο αφού στην κατασκευή δεν υπάρχει αλληλουχία έναρξης.



Εικόνα 62 Το τμήμα της LeMA-1 που κλωνοποιήθηκε στον pPVX202 με στόχο την κατασκευή που δεν παράγει την πρωτεΐνη: Το EaeI-SalI κομμάτι μήκους 451 νουκλεοτιδίων βρίσκεται αμέσως μετά την αυστηρά συντηρημένη αλληλουχία GPPGKT πρόσδεσης του νουκλεοτιδίου.

Σε πείραμα με τρία φυτά (*Nic. benthamiana* γιατί μολύνονται ευκολότερα), μολύνθηκε τελικά ένα με την κατασκευή rLES και παρουσίασε ξεκάθαρα τον ίδιο φαινότυπο της LeMA-1 την παραμόρφωση των νέων φύλλων και το σταμάτημα της ανάπτυξης του φυτού (εικ 63A).

Πρωτεϊνικό εκχύλισμα από το φυτό αυτό χρησιμοποιήθηκε για την αναμόλυνση φυτών ντομάτας με σκοπό την παρατήρηση των συμπτωμάτων και στο φυτό αυτό. Τα συμπτώματα του rLES δεν διαφέρουν από εκείνα που προκαλούνται από την κατασκευή rMsc (Εικ. 63 B)

Δείγματα συλλέχθηκαν από το φυτό *Nic. Benthamiana*, αμέσως μετά την εμφάνιση των συμπτωμάτων (7 ημέρες από την μόλυνση) και απομονώθηκαν πρωτεΐνες και RNA για να διαπιστωθεί πρώτον ότι δεν παράγει κάποια πρωτεΐνη (εικ 65) και δεύτερον ότι περιέχει το σωστό μήκος ένθεσης (εικ. 64) πριν αρχίσει η διαδικασία της απόρριψης.



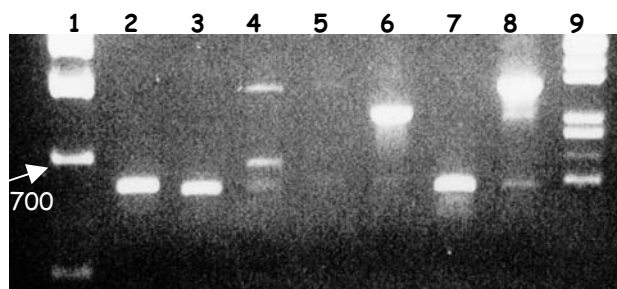
A



B

Εικόνα 63 A: φαίνεται φυτό *Nic. benthamiana* μολυσμένο με rLES 7 ημέρες μετά την μηχανική μόλυνση. B: φυτό ντομάτας μολυσμένο με εκχύλισμα από το φυτό της A, 15 ημέρες μετά την μηχανική μόλυνση.

Ο κλώνος rLES περιέχει 451 νουκλεοτίδια της LeMA-1. Με αντίστροφη μεταγραφή με εκινητή του PVX και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με κατάλληλους εκινητές το RNA του φυτού αυτού πρέπει να δίνει τμήμα DNA μήκους 900 βάσεων



- 1- δείκτης μεγέθους λBstEII
- 2- φυτό με pPVX202
- 3- φυτό με rMsc(1)
- 4- φυτό με rMsc (παλιό)
- 5- φυτό με rMsc(2)
- 6- φυτό με rLES
- 7- φυτό με rMsc (3)
- 8- φυτό με rMscNF με συμπτώματα
- 9- δείκτης μεγέθους λEcoRI/HindIII

Εικόνα 64 Πήκτωμα αγαρόζης 1% όπου αναλύονται τα προϊόντα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης μετά από αντίστροφη μεταγραφή μορίων RNA που επιλέγονται με κατάλληλο εκινητή.

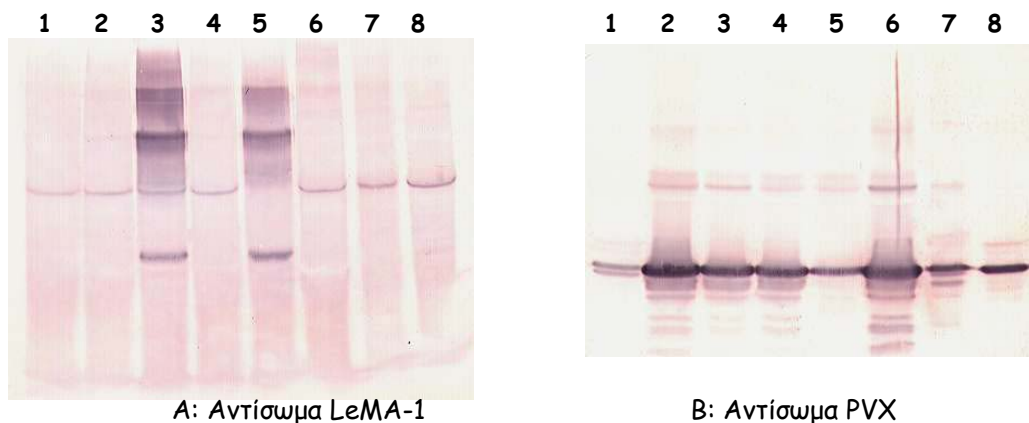
Στην εικόνα 64 αναλύονται τα RNA που απομονώθηκαν από φυτά που μολύνθηκαν με τις κατασκευές *rMsc* και *rLES* (δείγματα 3, 5, 6 και 7) καθώς και RNA φυτών από παλιότερες μολύνσεις όπως το δείγμα 4, φυτό με *rMsc* που παράγει την πρωτεΐνη και το δείγμα 8, φυτό με *rMscNF* με συμπτώματα, των οποίων το RNA έχει ελεγχθεί με την μέθοδο αυτή και χρησιμοποιούνται σαν δείγματα αναφοράς. Τα *rMsc* και *rMscNF* φυτά στην αντίδραση αυτή παράγουν τμήμα DNA μήκους 1290 βάσεων ενώ το *rLES* παράγει τμήμα 900 βάσεων. Το βέλος επισημαίνει την ζώνη του μάρτυρα μήκους 700 βάσεων.

Στο δείγμα 6 της εικόνας 64 φαίνεται ότι το *rLES* περιέχει ένθεση σωστού μήκους, καθώς επίσης φαίνεται ότι υπάρχει ήδη κάποιος πληθυσμός μορίων RNA που δεν περιέχουν την ένθεση.

Από τα φυτά αυτά εκχυλίσθηκαν πρωτεΐνες οι οποίες αναλύθηκαν σε πήκτωμα ακρυλαμίδης 12% και ακολούθησε ανοσοεντοπισμός της *LeMA-1* (εικ. 65A) ώστε να ελεγχθούν τα πεπτίδια που παράγονται σε κάθε φυτό. Έγινε επίσης και ανοσοεντοπισμός της καψιδιακής πρωτεΐνης του PVX (εικ. 65B) για έλεγχο της εγκατάστασης της μόλυνσης στη σειρά αυτή (τα δείγματα έχουν συλλεχθεί την 7^η ημέρα από την μόλυνση, μόλις εμφανίστηκαν τα συμπτώματα του *rLES*, και πριν εμφανιστούν ενδείξεις στα υπόλοιπα φυτά).

Το *rLES* αναλύεται στο δείγμα 6 της εικόνας 65 (και στις δυο μεμβράνες), είναι μολυσμένο και δεν παράγεται κανένα άλλο πεπτίδιο εκτός από ολόκληρη την *LeMA-1* που παράγεται ενδογενώς της οποίας η ποσότητα είναι συγκρίσιμη με αυτή του υγιούς (δείγμα 8) και του φυτού με PVX (δείγμα 7). Αν η κατασκευή αυτή παρήγαγε πεπτίδιο αυτό θα έπρεπε να ήταν περίπου 16.4KDa (451 νουκλεοτίδια) και θα ήταν ανιχνεύσιμο στις συνθήκες του πειράματος (το μέτωπο μετακινείται με τις πρωτεΐνες των 10KDa).

Εικόνα 65 Ανίχνευση πρωτεϊνών με αντισώματα σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα φυτών μολυσμένα με τις κατασκευές: *rPVX202*, *rMsc*, *rMscNF* και *rLES*. Το δείγμα 5 είναι εκχύλισμα φυτού προηγούμενου πειράματος με *rMsc* που παράγει πρωτεΐνη, όπως και το δείγμα 1, επίσης προηγούμενου πειράματος φυτό με *rMscNF* που εκδηλώνει τα συμπτώματα. Το δείγμα 6 είναι το φυτό με *rLES* της φωτογραφίας 63 A.

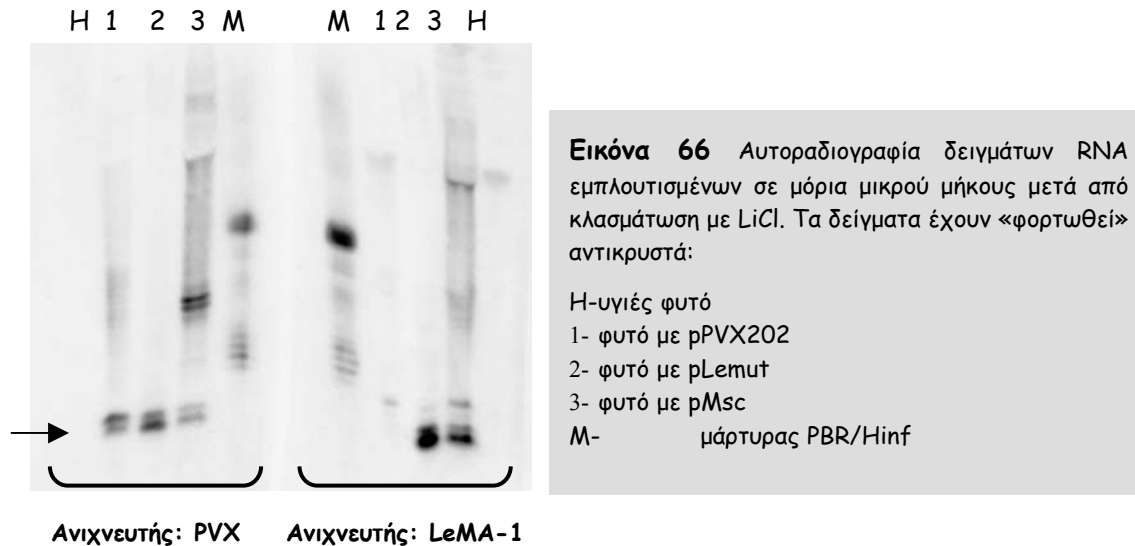


Τα δείγματα στις δυο μεμβράνες είναι ίδια:

- | | |
|---|--------------------------------|
| 1- φυτό με <i>rMscNF</i> | 5- φυτό με <i>rMsc</i> (παλιό) |
| 2- φυτό με <i>rMsc</i> (3) (<i>GFP</i>) | 6- φυτό με <i>rLES</i> |
| 3- φυτό με <i>rMsc</i> (2) | 7- φυτό με <i>rPVX202</i> |
| 4- φυτό με <i>rMsc</i> (1) | 8- φυτό υγιές |

Το φυτό *rLES* έδειξε ότι είναι πιθανό ο θνησιγόνος φαινότυπος που παρατηρείται κατά την έκφραση της *LeMA-1* σε φυτά οφείλεται στο φαινόμενο της γονιδιακής καταστολής μέσω RNA. Από την βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι το φαινόμενο αυτό συνοδεύεται από την παρουσία μικρών μορίων RNA μήκους 25 νουκλεοτιδίων, πιθανόν αποτέλεσμα της ειδικής αποδόμησης του RNA «στόχου».

Σαν πρόσθετη απόδειξη ότι πράγματι στα φυτά με τα παραμορφωμένα νεαρά φύλλα συμβαίνει ειδική αποδόμηση του RNA της *LeMA-1* κρίθηκε σκόπιμο να απομονωθεί RNA από κάποια από αυτά και να υποβληθεί σε έλεγχο της παρουσίας τέτοιων μικρών μορίων RNA. Για το πείραμα αυτό επιλέχθηκαν τα φυτά: ένα με *pMsc* που εκφράζει πρωτεΐνη και το *pLemut* που εκφράζει σχεδόν όλη την πρωτεΐνη σε μεγάλες ποσότητες. Η ανίχνευση των RNA αυτών έγινε με ανιχνευτή όλη την αλληλουχία της *LeMA-1* και την αλληλουχία της καψιδιακής πρωτεΐνης του PVX (εικ. 66)



Στην εικόνα 66 ανιχνεύονται πληθυσμοί μορίων RNA μικρού μήκους (25 νουκλεοτιδίων) (si RNA) που συνήθως συνοδεύουν το φαινόμενο της μετα-μεταγραφικής γονιδιακής σίγησης (PTGS). Τα si RNA δεν παρατηρούνται σε υγιές φυτό (δείγμα H). Με ανιχνευτή την καψιδιακή πρωτεΐνη του PVX ανιχνεύονται ζώνες και στα τρία φυτά, ενώ ο ανιχνευτής *LeMA-1* ανιχνεύει RNA μόνο στα φυτά που περιέχουν αλληλουχίες *LeMA-1*. Δηλαδή τα μόρια αυτά είναι αποτέλεσμα ειδικής αποδόμησης των συγκεκριμένων RNA και όχι τυχαία προϊόντα αποδόμησης των γονιδίων αυτών, και παρουσιάζονται μόνο στα μολυσμένα φυτά.

3.3.7 Η έκφραση τμημάτων των υπόλοιπων AAA ΑΤΡασών του πρωτεασώματος σε φυτά συνοδεύεται από θνησιγόνους φαινοτύπους.

Το φυτό *pLES* και το πείραμα της εικόνας 66 έδειξαν ότι η έκφραση αλληλουχιών της *LeMA-1* σε φυτά μέσω του ιού PVX προκαλεί την ειδική αποδόμηση των RNA του κυττάρου που περιέχουν τις αλληλουχίες αυτές. Δεν μπορεί κανείς να πει ότι η έκφραση πρωτεΐνης ή ελλειπτικών πεπτιδίων της *LeMA-1* δεν συνεισφέρει στην δημιουργία του θνησιγόνου φαινοτύπου, όμως σημαντικό ρόλο στο φαινόμενο αυτό παίζει η μετα-μεταγραφική σίγηση του γονιδίου της *LeMA-1* όταν όλο το γονίδιο ή μέρος αυτού εκφράζεται μέσω του ιού PVX.

Με βάση το δεδομένο αυτό θα μπορούσε κανείς να καταστείλει οποιοδήποτε γονίδιο του φυτού με μόνο την έκφραση τμήματος του γονιδίου μέσω του PVX, με την ελπίδα να παρατηρηθούν αλλαγές στην φυσιολογία του φυτού τέτοιες που να επιτρέπουν υποθέσεις ως προς την λειτουργία του γονιδίου αυτού.

Στην πορεία της συγγραφής της εργασίας αυτής δημοσιεύτηκε στην βιβλιογραφία μια αναφορά για τις έξι AAA πρωτεΐνες του πρωτεασώματος του φυτού *Arabidopsis thaliana*. Στην αναφορά αυτή, οι Fu et al., (1999b) χρησιμοποιώντας σαν δόλωμα τις αλληλουχίες των ομόλογων πρωτεϊνών ζύμης (Rubin et al., 1998) (Rpt1...Rpt6 δεξ AAA πρωτεΐνες) σε βιβλιοθήκη αλληλουχιών του φυτού *Arabidopsis thaliana* εντόπισαν τμήματα DNA με υψηλή ομολογία προς τις πρωτεΐνες αυτές, μέσω των οποίων κατάφεραν να απομονώσουν τις

πλήρεις αλληλουχίες των έξι πρωτεϊνών της *Arabidopsis thaliana*. Μάλιστα, έδειξαν ότι αυτές είναι πράγματι τα λειτουργικά ανάλογα των πρωτεϊνών της ζύμης με αναστροφή του φαινοτύπου στελεχών ζύμης που φέρουν μεταλλαγμένα γονίδια για κάθε μια από αυτές. Οι (Rubin et al., 1998) έδειξαν ότι, ενώ οι έξι αυτές πρωτεΐνες συμμετέχουν στο σχηματισμό ενός συμπλόκου που αποτελείται από τουλάχιστον 36 υπομονάδες και συνεργάζονται, μεταλλαγές στην κάθε μια από αυτές προκαλεί διαφορετικό φαινότυπο σε κύτταρα ζύμης.

Συνδυάζοντας τα παραπάνω βιβλιογραφικά δεδομένα θεωρήθηκε εφικτό να μελετηθεί ο φαινότυπος που θα προκαλούσαν οι υπόλοιπες πέντε πρωτεΐνες της ομάδας της ντομάτας αν εκφράζονταν μέσω του ιού PVX σε φυτά. Με δόλωμα τις αλληλουχίες των Fu et al (1995b) σε βιβλιοθήκη αλληλουχιών εντοπίστηκαν τμήματα DNA της ντομάτας που περιείχαν αλληλουχίες με υψηλή ομολογία προς τις πρωτεΐνες αυτές και προτεινόταν ως αλληλουχίες των πρωτεϊνών αυτών σε ντομάτα. Από τους κλώνους που εντοπίστηκαν (οι περισσότεροι από τους οποίους αλληλοεπικάλυπτονταν και θα μπορούσε κανείς να συγκροτήσει ολόκληρο το γονίδιο), επιλέχθηκαν τελικά αυτοί που περιείχαν ακολουθία με μεγαλύτερο μήκος και αγοράστηκαν. Από τους κλώνους αυτούς, τμήματα (που περικλείονταν σε κατάλληλες θέσεις περιοριστικών ενζύμων) κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pPVX202 και μολύνθηκαν φυτά με τις κατασκευές που προέκυψαν.

Από τους πέντε κλώνους που ήταν διαθέσιμοι τελικά κλωνοποιήθηκαν οι τέσσερις (η Rpt4 αρνήθηκε να κλωνοποιηθεί παρά τις επανειλημμένες προσπάθειες που έγιναν και εγκαταλείφθηκε) και χρησιμοποιήθηκαν για μόλυνση σε φυτά. Σε τρία πειράματα μόλυνσεων (με τρία φυτά ανά κατασκευή), μολύνθηκε μόνο ένα φυτό με την κατασκευή pRpt1 και εκδήλωσε φαινότυπο παρόμοιο με εκείνο της LeMA-1 (εικ. 67 Γ και Δ), με μικρές διαφορές: τα συμπτώματα εμφανίστηκαν την 7^η ημέρα, αρκετά νωρίτερα από τις κατασκευές της LeMA-1 (11-15^η ημέρα από την μόλυνση). Δεν παρουσιάζει τόσο έντονη επινασσία (εικ 67Ε και σύγκριση με Δ), αλλά όλα τα φύλλα είναι κατά πολύ μικρότερα, όπως και όλο το φυτό (εικ. 67 Ζ). Συγκρίνοντας την προχωρημένη εικόνα των συμπτωμάτων που προκαλούνται από τις κατασκευές των δυο πρωτεϊνών (LeMA-1 (Rpt5) και Rpt1) (εικ. 67 Δ) παρατηρούνται διαφορές στην επίδραση της έλλειψης των δυο πρωτεϊνών στα ώριμα φύλλα: η έλλειψη της Rpt1 δεν προκαλεί σημαντική ζημιά σε αντίθεση με την LeMA-1 που προκαλεί πλήρη μαρασμό στην περιοχή αυτή.

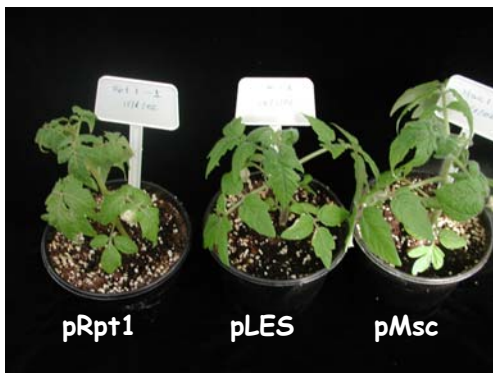
Για την πρωτεΐνη Rpt1 δεν υπάρχει ειδικό αντίσωμα ώστε να ελεγχθούν τα επίπεδά της στο μολυσμένο φυτό. Έγινε όμως έλεγχος του RNA του φυτού αυτού με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε DNA που προκύπτει από την αντίστροφη μεταγραφή RNA του φυτού αυτού με εκινητή PVX, για να διαπιστωθεί ότι η κατασκευή φέρει την ένθεση και έχει το προβλεπόμενο μήκος (εικ. 63). Στην αντίδραση αυτή το pRpt1 πρέπει να δίνει ζώνη 900 βάσεων.



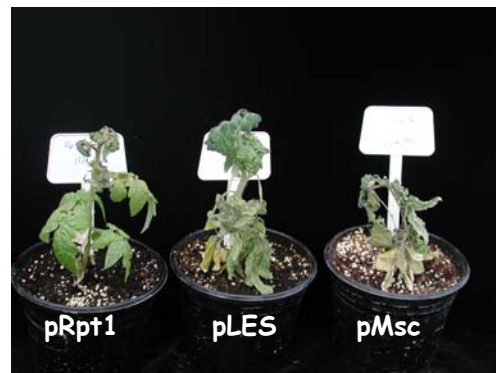
Α: φύλλο κορυφής



Β: φύλλο πλευρικού βλαστού



Γ: 15 ημέρες μετά την μηχανική μόλυνση



Δ: 30 ημέρες μετά την μηχανική μόλυνση



Ε: φυτό με pLES 15 ημέρες μετά την μηχανική μόλυνση



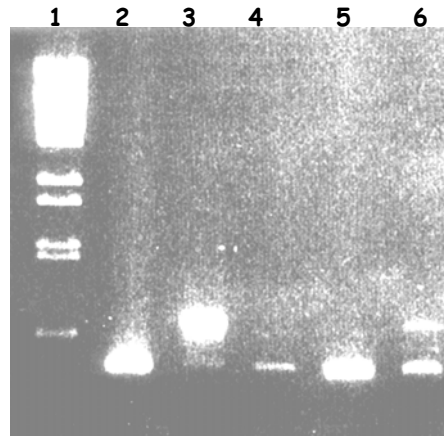
Ζ: φυτό με pRpt1 30 ημέρες μετά την μηχανική μόλυνση

Εικόνα 67 Φυτό *Nic. benthamiana* μολυσμένο με την κατασκευή pRpt1 24 ημέρες μετά την μόλυνση. Φαίνεται η παραμόρφωση των νέων φύλλων σε όλους τους βλαστούς: της κορυφής (εικ. 63Α) και των πλευρικών (εικ. 67Β).

Εικόνα 68 Πήκτωμα αгарόζης όπου αναλύονται τα προϊόντα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης μετά από αντίστροφη μεταγραφή του RNA μολυσμένων φυτών με εκινητή PVX.

Τα δείγματα είναι:

- 1- μάρτυρας λBstEII
- 2- φυτό με pPVX202
- 3- φυτό με pRrt1
- 4- φυτό με pRrt2
- 5- φυτό με pRrt3
- 6- φυτό με pRrt6



Στην εικόνα 68 το δείγμα 3 είναι το φυτό με pRrt1 που εκδήλωσε τα συμπτώματα, και περιέχει την σωστή ένθεση. Στο δείγμα 6 (το φυτό pRrt6) φαίνεται ότι έχει απορριφθεί η ένθεση πολύ νωρίς μετά την μόλυνση, και δεν εκδήλωσε κάποιο φαινότυπο.

4. Περίληψη αποτελεσμάτων

Στόχος της εργασίας αυτής ήταν η μελέτη της λειτουργίας της πρωτεΐνης LeMA-1 της ντομάτας σε φυτά. Ο κλώνος του συμπληρωματικού DNA της πρωτεΐνης απομονώθηκε μετά από σάρωση βιβλιοθήκης έκφρασης καρπού ντομάτας σε αλληλεπίδραση με το ιοειδές PSTVd. Με αντιγόνο την πρωτεΐνη που συντίθεται σε σύστημα βακτηρίων από τον κλώνο αυτό, παρασκευάστηκε αντίσωμα με το οποίο είναι δυνατή η ανίχνευση της πρωτεΐνης σε φυτικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα.

Με το αντίσωμα πιστοποιήθηκε ότι η LeMA-1 εντοπίζεται σε όλους τους ιστούς του φυτού ντομάτας που εξετάστηκαν, σε συγκρίσιμες ποσότητες. Ένα μέρος της πρωτεΐνης εντοπίζεται σε πυρήνες, ενώ δεν ανιχνεύεται σε χλωροπλάστες.

Με το αντίσωμα της LeMA-1 ήταν δυνατή η ανίχνευση πρωτεΐνης ίδιας ηλεκτροφορητικής συμπεριφοράς με την LeMA-1 και σε άλλα φυτά όπως καπνό, πιπεριά κ.α., γεγονός που δηλώνει την ύπαρξη της πρωτεΐνης αυτής στα φυτά αυτά, με ομολογία τέτοια που να επιτρέπει την ανίχνευσή της με το αντίσωμα της LeMA-1, κάτι που συμφωνεί με τα μετέπειτα βιβλιογραφικά δεδομένα. Πρόκειται δηλαδή για πρωτεΐνη αυστηρά συντηρημένη που βρίσκεται σε όλους τους οργανισμούς.

Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε το σύστημα έκφρασης γονιδίων σε φυτά μέσω του ιού της πατάτας PVX (Sablowski *et. al.*, 1995) με στόχο να υπερεκφραστεί η πρωτεΐνη στο φυτό και να παρατηρηθεί ο φαινότυπος που προκαλείται από αυτήν.

Εκφράζοντας ολόκληρη την κωδική περιοχή της πρωτεΐνης μέσω του ιού, παρατηρήθηκε θνησιγόνος φαινότυπος σε φυτά ντομάτας και *Nic. benthamiana*. Τα συμπτώματα, ίδια και στα δύο είδη φυτών, εμφανίζονταν την 11^η-15^η ημέρα της μόλυνσης. Παρατηρήθηκε επιπλοκή (καρούλιασμα) και παραμόρφωση των νέων φύλλων, αναστολή της ανάπτυξης των βλαστών και του ριζικού συστήματος και τελικά μαρασμός. Η έκφραση της LeMA-1 στο φυτό μέσω του ιού επηρέασε την ανάπτυξη των αναπτυσσόμενων μερών του φυτού και κυρίως τα νέα φύλλα.

Στα φυτά αυτά, παρά τα εμφανή συμπτώματα, τα επίπεδα της πρωτεΐνης που ανιχνεύθηκε δεν αυξάνονταν σε επίπεδο που αναμένει κανείς από την έκφραση της LeMA-1 από τον ιό. Επιπρόσθετα, σε όλες σχεδόν τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε αστάθεια της κατασκευής με αποτέλεσμα την απόρριψη της ένθεσης, στο οποίο αρχικά αποδόθηκε το γεγονός ότι δεν παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα πρωτεΐνης.

Παρ' όλα αυτά και θεωρώντας ότι ο θνησιγόνος φαινότυπος προκαλείται από την έκφραση της πρωτεΐνης μέσω του ιού, με στόχο την δομική μελέτη της πρωτεΐνης κατασκευάστηκαν πλασμίδια που περιέχουν ελλειπτικά τμήματα της LeMA-1 ώστε να προσδιοριστεί η ελάχιστη περιοχή της πρωτεΐνης που είναι ικανή να προκαλέσει τον παραπάνω φαινότυπο.

Η LeMA-1 έχει μήκος 425 αμινοξέα. Τα ελλειπτικά τμήματα που κατασκευάστηκαν περιείχαν τα πρώτα 43 (pXba), 93 (pSsp), 106 (pRsa) και 220 (pMsc) αμινοξέα αντίστοιχα. Οι δύο τελευταίες κατασκευές προκάλεσαν τον φαινότυπο που αναφέρεται παραπάνω, ενώ οι δύο πρώτες δεν εμφάνισαν παρόμοια συμπτώματα. Από τα δεδομένα αυτά φάνηκε ότι για να προκληθεί ο φαινότυπος πρέπει να εκφραστούν τουλάχιστον τα πρώτα 106 αμινοξέα της πρωτεΐνης. Οι δύο τελευταίες κατασκευές εκφράζαν τμήμα της LeMA-1 μεγέθους 11,6 και 24.5KDa αντίστοιχα το οποίο διακρίνονταν από το ενδογενές προϊόν του γονιδίου της LeMA-1 (49.7KDa). Και σε αυτά τα φυτά, όπως σε αυτά που εκφράζαν ολόκληρη την LeMA-1 ο φαινότυπος δεν συνοδεύονταν πάντα από υπερέκφραση του κλωνοποιημένου στον ιό τμήματος.

Για να διευκρινιστεί αν τα συμπτώματα οφείλονταν στην παρουσία της πρωτεΐνης (ή των πεπτιδίων) που παράγεται από τον ιό και όχι στην παρουσία του RNA των τμημάτων αυτών, ή και ακόμη στην μετατροπή του ιού σε πιο επιθετικό λόγω της ύπαρξης ξένων αλληλουχιών στο γενετικό υλικό του, αποφασίστηκε να εκφραστούν με το ίδιο σχήμα οι

αλληλουχίες της LeMA-1 χωρίς να παράγεται όμως πρωτεΐνη. Για να γίνει αυτό διακόπηκε το πλαίσιο διαβάσματος της LeMA-1 καταστρέφοντας την θέση XbaI στο γονίδιο, επιτρέποντας την σύνθεση ενός πεπτιδίου 43 αμινοξέων, το οποίο είχε δειχθεί ότι δεν προκαλεί τον θνησιγόνο φαινότυπο. Κατασκευάστηκε σειρά πλασμιδίων που περιείχαν τα ίδια ακριβώς τμήματα της πρωτεΐνης με την σειρά των ελλείψεων (βλέπε κατασκευές Κεφ. Αποτελ. Παρ. 3.2), στα οποία είχε καταστραφεί το πλαίσιο διαβάσματος και ονομάστηκαν NF(ηο frame). Οι κατασκευές αυτές παρουσίασαν την ίδια χαμηλή μολυσματικότητα με τις προηγούμενες, αλλά παράλληλα και μεγάλη αστάθεια: σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις μολύνσεων με αυτά τα πλασμίδια τα RNA του ιού που ανιχνεύθηκαν στα φυτά αυτά περιείχαν πολύ μικρά τμήματα, ή και καθόλου, της αλληλουχίας της LeMA-1, κάτι που όμως συνέβαινε και στις άλλες κατασκευές (που εκφράζαν πρωτεΐνη). Αρχικά, και για αρκετές σειρές μολύνσεων κανένα μολυσμένο με NF τμήμα φυτό δεν παρουσίασε συμπτώματα διαφορετικά από αυτά της μόλυνσης με τον ιό PVX, γεγονός που θεωρήθηκε σαν απόδειξη ότι ο φαινότυπος που παρατηρήθηκε οφείλονταν στην έκφραση της πρωτεΐνης μέσω του ιού. Το πρόβλημα στην παραπάνω θεωρία ήταν ότι η εμφάνιση των συμπτωμάτων δεν συνοδεύονταν από αντίστοιχα επίπεδα πρωτεΐνης (στην περίπτωση των in frame κατασκευών), και η εικόνα του RNA των φυτών αυτών δεν ήταν τέτοια που να στηρίζει την υπόθεση αυτή. Η εικόνα ξεκαθάρισε όταν σε ένα επόμενο πείραμα μολύνσεων μολύνθηκε ένα rMscNF φυτό το οποίο παρουσίασε τον φαινότυπο της LeMA-1 και κατέρριψε την παραπάνω υπόθεση.

Με βάση τον φαινότυπο που προκλήθηκε από το μολυσμένο με την κατασκευή rMscNF φυτό, και σύμφωνα με τα νέα δεδομένα που προέκυψαν στο μεταξύ για το φαινόμενο της γονιδιακής σίγησης, δημιουργήθηκε η πιθανότητα, ο φαινότυπος να οφείλεται στην γονιδιακή καταστολή της LeMA-1 μέσω RNA λόγω της παρουσίας αλληλουχιών της LeMA-1 στο γενετικό υλικό του ιού το οποίο αποτελεί στόχο της σίγησης RNA σαν άμυνα του φυτού στον ιό. (βλέπε Κεφ Γ, VIGS).

Η κατασκευή rMscNF περιείχε 740 νουκλεοτίδια της LeMA-1 (1-740), ικανά να συνθέσουν πεπτίδιο 43 αμινοξέων (μέχρι την θέση XbaI). Στο φυτό που μολύνθηκε με την κατασκευή αυτή, ο φαινότυπος μπορεί να οφείλονταν είτε στην παρουσία του RNA της LeMA-1 είτε στην παρουσία του πεπτιδίου που παράγεται από αυτό. Για να διερευνηθεί η υπόθεση ο φαινότυπος να προκαλείται από το πεπτίδιο αυτό έπρεπε να παρασκευαστεί κατασκευή του ιού PVX που να περιέχει τις αλληλουχίες της LeMA-1 χωρίς να παράγεται πρωτεΐνη από αυτές. Για τον σκοπό αυτό κατασκευάστηκε το πλασμίδιο rLemut (βλέπε Κεφ Αποτελ. Παρ 3.2) το οποίο παρά την μεταλλαγή του δεύτερου ATG της LeMA-1 σε κωδικόνιο λήξης και την εισαγωγή βάσης που μετακίνησε το πλαίσιο διαβάσματος, παράγαγε την πρωτεΐνη από την τρίτη στη σειρά μεθειονίνη και δεν απάντησε στο πρόβλημα.

Η λύση δόθηκε τελικά από την κατασκευή rLES η οποία περιείχε 451 νουκλεοτίδια της αλληλουχίας της LeMA-1 που δεν παράγουν πρωτεΐνη (βλέπε Κεφ Αποτελ. Παρ 3.2), και προκάλεσε τον θνησιγόνο φαινότυπο που παρατηρήθηκε και με τις άλλες κατασκευές. Στην περίπτωση αυτή για τα συμπτώματα ευθύνονταν η παρουσία του RNA της LeMA-1. Στο φυτό που μολύνθηκε με την κατασκευή αυτή, ανιχνεύθηκαν πληθυσμοί RNA που περιείχαν το σωστό μήκος ένθεσης.

Το φαινόμενο της γονιδιακής καταστολής μέσω RNA συνοδεύεται από την παρουσία μικρών RNA μορίων (23-25 νουκλεοτίδια). Η διαδικασία αυτή, όπως έγινε γνωστό από την βιβλιογραφία, οδηγεί σε ειδική αποδόμηση των RNA που βρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες στο κύτταρο και ξεκινά από την παρουσία δίκλωνου RNA που παράγεται από τον ιό κατά την αντιγραφή του. Η μόλυνση με τον PVX συνοδεύεται από την εμφάνιση μικρών μορίων RNA του PVX, προϊόντα αποδόμησης του γενετικού υλικού του. Στα φυτά που περιείχαν κατασκευές με αλληλουχίες της LeMA-1, η αποδόμηση του RNA στόχευσε, εκτός από το ιικό RNA και το ενδογενώς παραγόμενο RNA που ελάττωσε την σύνθεση της πρωτεΐνης στα

μολυσμένα φυτά και προκάλεσε τον θνησιγόνο φαινότυπο λόγω της καταστολής του γονιδίου της LeMA-1.

Επομένως, με την εργασία αυτή δείξαμε ότι η καταστολή του γονιδίου της LeMA-1 μέσω της έκφρασης αλληλουχιών της πρωτεΐνης από τον ιικό φορέα pRVX202 προκάλεσε την εμφάνιση θνησιγόνου φαινοτύπου.

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, και γνωρίζοντας από την βιβλιογραφία ότι η LeMA-1 συνεργάζεται με άλλες πέντε AAA ATPασες για τον σχηματισμό και την λειτουργία συμπλόκου (Rpt1...Rpt6, 26S πρωτεάση, βλέπε Κεφ.Β. Παρ 2), κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθεί η συμπεριφορά της καταστολής των γονιδίων αυτών με τον ίδιο τρόπο σε φυτά. Με την ίδια μέθοδο δείχθηκε επίσης ότι καταστολή του γονιδίου της Rpt1 (μιας ακόμη AAA ATPασης του πρωτεασώματος) προκαλεί επίσης θνησιγόνο φαινότυπο παρόμοιο αλλά όχι ίδιο με αυτόν που προκαλεί η LeMA-1. Το φυτό παρουσιάζει έντονη αναστολή της ανάπτυξης και επινασσία των βλαστών αλλά όχι τόσο έντονη παραμόρφωση των φύλλων.

Η εργασία αυτή αποτελεί το υπόβαθρο τόσο για την μοριακή διερεύνηση του φαινομένου σίγησης RNA, όσο και για την παραπέρα ανάλυση του ρόλου της LeMA-1 και των άλλων πέντε AAA ATPασών του πρωτεασώματος, που φαίνεται να είναι ζωτικής σημασίας στην επιβίωση του φυτού.

Κατασκευές	Μολυσματικές	Μη μολυσματικές	Φαινότυπο LeMA-1	Φαινότυπο PVX	Πεπτίδιο που συντίθεται
p2Lema	(+)		(+)		425+13 αα
pHind		(-)			425 αα
pHpa		(-)			
pMsc	(+)		(+)		220 αα
pRsa	(+)		(+)		106 αα
pSsp	(+)			(+)	
pXba	(+)			(+)	43 αα
pHindNF	(+)			(+)	43 αα
pMscNF	(+)		(+)		43 αα
pRsaNF	(+)			(+)	43 αα
pLeMut	(+)		(+)		407 αα
pLES	(+)		(+)		-

Πίνακας 2 Παρουσιάζονται όλες οι κατασκευές σε pPVX202 που χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία αυτή για την μελέτη της πρωτεΐνης LeMA-1. Στον πίνακα φαίνεται ποιες από αυτές ήταν μολυσματικές, ποιες μη μολυσματικές, ποιες προκαλούν τον θνησιγόνο φαινότυπο και ποιες έδωσαν μόνο συμπτώματα της μόλυνσης από τον PVX. Επίσης αναφέρεται και το μέγεθος του πεπτιδίου που συντίθεται από τις κατασκευές αυτές.

Πίνακας 3: Μολύνσεις φυτών

Ημερομηνία μόλυνσης	Σύνολο	p202		LeMA-1		Msc		Rsa		Xba		MscNF		RsaNF		Ssp		HindNF	
7/3/1996	14 φυτά	3	1/3	6/9	5/6														
2/4/1996	10 φυτά	5	5/5	5/5	5/5														
14/5/1996	34 φυτά	14	14/14	7/16	6/7														
7/6/1996	30 φυτά	12		3/18	0/3														
17/10/1996	9 φυτά	3	0/3	0/3	--														
21/10/1996	9 φυτά	3	1/3	1/3	--														
30/10/1996	21 φυτά	3	2/3	1/3					2/3			3/3							2/3
26/11/1996	18 φυτά	3	0/3	0/3		0/3						0/3							0/3
17/12/1996	6 φυτά	3	0/3	0/3															
20/12/1996	6 φυτά	3	0/3	0/3															
17/1/1997	6 φυτά	3	0/3	0/3															
13/2/1997	27 φυτά	3	3/3	0/6	1/6	1/6		1/3				0/3							0/3
23/4/1997	27 φυτά	3	3/3	0/3		3/3		1/3		2/3		0/3		0/3		0/3		0/3	0/3
8/7/1997	24 φυτά	3	0/3	0/3		0/3		0/3		0/3		0/3				0/3		0/3	0/3
3/9/1997	27 φυτά	3	2/3	0/3		1/3	0/3	1/3		1/3		0/3		1/3		1/3		1/3	0/3
13/10/1997	27 φυτά	3	0/3	0/3		0/3		0/3		0/3		0/3		0/3		0/3		0/3	0/3
4/11/1997	27 φυτά	3	3/3	1/3		0/3		0/3		1/3		1/3		1/3		0/3		0/3	0/3
17/12/1997	27 φυτά	3	0/3	0/1		0/3		0/3		0/3		0/3		0/3		0/3		0/3	0/3
23/5/1998	35 φυτά																		
4/2/1999	20 φυτά	4	0/4	0/4		0/4		0/4				1/4							
18/2/1999	14 φυτά											8/10		0/2					
8/3/1999	14 φυτά	2	2/2									12/12							
16/3/1999	22 φυτά	2	2/2	0/2		2/2		0/2				2/2		0/2		2/2		2/2	2/2
2/6/2000	12 φυτά	2	2/2	2/4															
Σύνολο	464 φυτά	32		2+2		5/1+2		3/1		4		2+22		2		3		4	

***** JOINT PREDICTION RESULTS *****

NOTE:

SMALL LETTERS (h, b, t) INDICATE WEAK PREDICTION

LARGE LETTERS (H, B, T) INDICATE STRONG PREDICTION

Remember: Numbers here are (numbering in lema1.pep)-12

```

          1       2       | 3       4       5       6       7       8       | 9       : 10       11       12
          5       0       5       0       5       | 0       5       0       5       0       5       0       5       0       5       0
MATPMAEDSNFEDDQLHAMSTEDIIRA|SRLLDNEIRI I KEELQRTNLELDSFKKIKENQEKIKLNKQLPYLVGNIVEIILEMPE|EEAEEDGANIDL:DSQRKKGKCVLKTSTRQTIFLPV
J      hhhHHhh hHHHHHHHHhhHHHHHH|HHhHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
J      |
J      |          bbb          BBBBBBBB |          :          BBBBBBBb BBBBBBBB
          tt          |          t tt          tt |          tt          : tttt          tt
          13      14      | 15      16      17      18      19      20      21      22      23      24
          5       0       5       0       5       | 0       5       0       5       0       5       0       5       0       5       0       5       0
VGLVDPDNLKPGDLVGVNKDSYLILDTLPSYDSRVKAMEVDEKPTEDYHDIGGLEKQIQELVEAIVLPMTHQERFQKLGVRPCKGVLLYGPPGTGKTLMARACAAQTNATFLKLAGPQL
J      hHHHHHHHHh          hHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
J      BBBB          bbb          BBBBb          bBBBB          :          bb          b
J      tTTtTTT          tTT          ttTtt          tt t          ttttt          ttttTTT          TTTTtT          T
          25      26      | 27      28      29      30      31      32      33      34 ? 35      36
          5       0       5       0       5       | 0       5       0       5       0       5       0       5       0       5       0       5       0
VQMFIGDGAKLVRDAFQLAKEKSPCIIFIDEIDAIGTKRFDSEVSGDREVQRTMLELLNQLDGFSSDDRIVIAATNRADILDPALMRSGRLDRKIEFPH?TEEARARILQIHSRKMNVN
J      HHHh          HHHHHHHHHHH          hHHHHHHh          HHHHHHHHHHHHHHH          Hhhhhhhh Hh hhh          hHHHHHHHHh          ?HHHHHHHHHHh
J      BBBB          BBBBb          BBBBb          :          BBBBb          :          b
J      ttTtt          tTTt          tt          t tTTTt          tttTTTTt          ttttt t          tttT ?          t          tTT
          37      38      | 39      40      41      42
          5       0       5       0       5       | 0       5       0       5       0
PDVNFEEALARSTDDFNGAQLKAVCVEAGMLALRRDATEVTHEDFNEGI IQVQAKKKASLNYA
J      HHHHHH          hHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHhhhhHh          HHHHHHH
J      |          Bbb          BBB
J      TtT          TTtt          t

```

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ, ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η εργασία αυτή ξεκίνησε με στόχο την μελέτη του ρόλου της πρωτεΐνης LeMA-1 σε φυτά μέσω της υπερέκφρασης της πρωτεΐνης με το σύστημα του ιικού φορέα pPVX202.

Ολόκληρη η κωδική περιοχή της πρωτεΐνης καθώς και ελλειπτικά τμήματα (από το 3' άκρο της πρωτεΐνης) κλωνοποιήθηκαν στον φορέα pPVX202 και οι κατασκευές αυτές χρησιμοποιήθηκαν σαν μολυσματικό υλικό σε φυτά ντομάτας, *Nic. benthamiana*, και *Nic. clevelandie*. Και στα τρία φυτικά είδη η έκφραση των αλληλουχιών της LeMA-1 προκαλεί θνησιγόνο φαινότυπο, ο οποίος εμφανίζεται την 11-15^η ημέρα μετά την μηχανική μόλυνση και διαφέρει σημαντικά από τον φαινότυπο που προκαλείται από την μόλυνση με τον ιό PVX (ήπιο σκουρόχρωμο μωσαϊκό).

Τα συμπτώματα της LeMA-1 ξεκινούν με επινασσία των βλαστών (στρίβουν προς τον κεντρικό βλαστό), σταμάτημα της ανάπτυξης του φυτού (οι βλαστοί δεν επιμηκύνονται άλλο από την ημέρα που παρατηρούνται τα συμπτώματα), ελαττωμένη παραγωγή νέων φύλλων τα οποία είναι παραμορφωμένα με κοντύτερα νεύρα και συρρικνωμένα ελάσματα. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρείται και στο ριζικό σύστημα το οποίο σταματά να αναπτύσσεται. Ακόλουθα, νεκρώνονται ο κεντρικός βλαστός και τα νεύρα των φύλλων. Τα ώριμα φύλλα των πλευρικών βλαστών, κάτω από το σημείο εμφάνισης των αρχικών συμπτωμάτων, παρουσιάζουν χλώρωση και μαρασμό. Τα φύλλα της κορυφής -όσα παράγονται- είναι πολύ μικρότερα και συρρικνωμένα. Το φυτό συνήθως μαραίνεται φέροντας μόνο πολύ λίγα παραμορφωμένα φυλλαράκια στην κορυφή.

Ενώ ο φορέας pPVX202 είχε χρησιμοποιηθεί για την υπερέκφραση γονιδίων σε φυτά είτε ξένων (Charman *et al.*, 1992), είτε ενδογενών -αν και επρόκειτο για γονίδιο που εκφράζεται μόνο στα άνθη-(Sablowski *et al.*, 1995), στην περίπτωση της LeMA-1 δεν παρατηρήθηκε υπερέκφραση της πρωτεΐνης σε βαθμό που να δικαιολογεί τον φαινότυπο. Υπήρχαν περιπτώσεις φυτών που παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα πρωτεΐνης αλλά παράλληλα υπήρχαν φυτά που ενώ εμφάνιζαν πανομοιότυπο φαινότυπο δεν περιείχαν πρωτεΐνη που να παράγεται από τον ιό. Παράλληλα σε όλα σχεδόν τα μολυσμένα φυτά ανιχνεύεται η ενδογενώς παραγόμενη πρωτεΐνη σε επίπεδα που δεν διαφέρουν από τα φυτά αναφοράς (υγιά και μολυσμένα με pPVX202).

Σε όλα τα φυτά που εμφάνισαν τα συμπτώματα παρατηρήθηκε ασάθεια της κατασκευής. Τα γενωμικά RNA των κατασκευών που περιέχουν εμφανίζουν πάντα διπλή ζώνη σαν αποτέλεσμα της παρουσίας ανασυνδυασμένου και μη ανασυνδυασμένου ιού στα φυτά αυτά. Δεν είναι δυνατόν να πούμε αν οι δυο αυτές μορφές συνυπάρχουν στο ίδιο κύτταρο ή υπάρχουν ομάδες κυττάρων που περιέχουν τη μια και όχι την άλλη. Γεγονός είναι ότι πάντα εντοπίζεται ένας πληθυσμός μορίων RNA που έχει απορρίψει την ένθεση.

Είναι πιθανό η πρωτεΐνη να παράγεται στα αρχικά στάδια της μόλυνσης (όταν οι κατασκευές είναι ακόμη ακέραιες), σε επίπεδα ικανά να προκαλέσουν μόνιμη διαταραχή της φυσιολογίας του φυτού ακόμη και αν η πρωτεΐνη παύσει να παράγεται λόγω της απόρριψης της ένθεσης. Συνήθως ανιχνεύεται κάποια ποσότητα πρωτεΐνης (παραγόμενη από τον ιό) στα αρχικά στάδια της μόλυνσης, η οποία αργότερα ελαττώνεται και δεν είναι πλέον ανιχνεύσιμη.

Αρχικά, με βάση το γεγονός ότι οι κατασκευές pXba και pSsp που μπορούν να παράγουν πεπτιδία μήκους 43 και 93 αμινοξέων αντίστοιχα, δεν προκαλούν το φαινότυπο της LeMA-1, η κατάρρευση του φυτού αποδόθηκε στην έκφραση πεπτιδίων της LeMA-1 μέσω του ιού, τα οποία πρέπει να περιέχουν τουλάχιστον τα 106 πρώτα αμινοξέα (η κατασκευή pRsa), ώστε να προκαλούν το φαινότυπο

Όταν όμως, φυτά μολυσμένα με την κατασκευή pMscNF που εκφράζει το ίδιο πεπτιδίο με την κατασκευή pXba, αλλά περιέχει μεγαλύτερο τμήμα της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της LeMA-1, εμφάνισε τα ίδια συμπτώματα, τότε, φάνηκε ότι, πιθανόν η πρωτεΐνη που παράγεται από τον ιό να συνεισφέρει στην εξέλιξη των συμπτωμάτων αλλά, κυρίαρχο ρόλο παίζει η παρουσία του RNA και όχι του πεπτιδίου των 43 αμινοξέων που ούτως ή άλλως μπορεί να παραχθεί και από τις δυο αυτές κατασκευές. Μια τρίτη κατασκευή η pLES η οποία περιέχει 451 νουκλεοτίδια από το μέσο της πρωτεΐνης και δεν περιέχει κωδικόνιο έναρξης που να οδηγεί την μετάφραση του τμήματος (περιέχει μεθειονίνες αλλά όχι ATG που να λειτουργεί σαν κωδικόνιο έναρξης), προκαλεί τον ίδιο φαινότυπο ενώ δεν παράγει ανιχνεύσιμο πεπτιδίο της LeMA-1, υποστηρίζει την παραπάνω υπόθεση: ότι δηλαδή ο φαινότυπος είναι αποτέλεσμα της παρουσίας του RNA της LeMA-1 στα κύτταρα και όχι της πρωτεΐνης που πιθανόν παράγεται από αυτό.

Το φαινόμενο εξηγήθηκε όταν εμφανίστηκαν τα πρώτα αποτελέσματα σχετικά με την γονιδιακή σίγηση μέσω RNA.

Ο ιός PVX επάγει το φαινόμενο της γονιδιακής σίγησης μέσω RNA στα φυτά που προσβάλλει (βλέπε αντίστοιχο Κεφ Γ). Όταν ο ιός περιέχει αλληλουχίες ενδογενούς γονιδίου τότε, το φαινόμενο της σίγησης που επάγεται από τον ιό στρέφεται και εναντίον του ενδογενούς γονιδίου που είναι ομόλογο προς τις αλληλουχίες που φέρει. Στην περίπτωση αυτή το ενδογενές γονίδιο είναι η LeMA-1 και αυτό που συμβαίνει στα φυτά μετά την μόλυνση με τις κατασκευές που περιέχουν αλληλουχίες της LeMA-1 είναι σίγηση του γονιδίου της LeMA-1 όπου οφείλεται και ο παρατηρούμενος θνησιγόνος φαινότυπος.

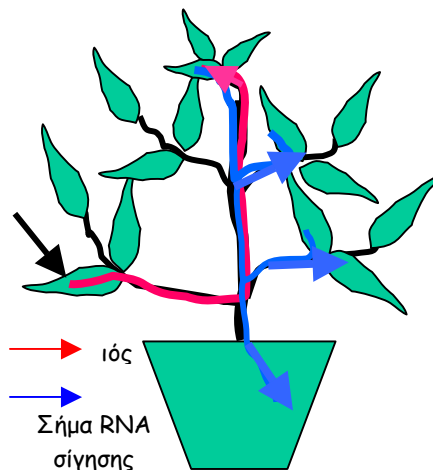
Σε όλα τα φυτά που εκδήλωσαν τον φαινότυπο ανιχνεύθηκε ενδογενώς παραγόμενη πρωτεΐνη. Αν ο φαινότυπος οφείλεται σε καταστολή της έκφρασης της πρωτεΐνης λόγω αποδόμησης του mRNA θα έπρεπε να παρατηρηθεί ελάττωση των επιπέδων της πρωτεΐνης στα κύτταρα αυτά. Υπάρχουν δύο λόγοι για τους οποίους δεν παρατηρήθηκε ελάττωση της πρωτεΐνης:

- Ο πρώτος λόγος είναι ότι όλες οι υπομονάδες της 26S πρωτεάσης χαρακτηρίζονται από μεγάλους χρόνους ημιζωής -15 ημερών- (Tanaka *et al.*, 1997). Τα φυτά που εκδήλωσαν τον φαινότυπο της LeMA-1 σπάνια ξεπέρασαν τις 30 ημέρες από την μηχανική μόλυνση (15 ημέρες μετά την εμφάνιση των συμπτωμάτων) και τότε δεν ήταν σε κατάσταση να ελεγχθούν για την παρουσία πρωτεΐνης (δεν υπήρχαν φύλλα). Τα μόνα φυτά που επιβίωσαν πέραν των 30 ημερών εμφάνισαν αναστροφή του φαινοτύπου λόγω απόρριψης της ένθεσης από την κατασκευή. Επομένως, η ενδογενής πρωτεΐνη που ανιχνεύθηκε πρέπει να προέκυψε πριν την εγκατάσταση της μόλυνσης.

- Ο δεύτερος λόγος είναι ότι η Rpt5 (LeMA-1) συμμετέχει στον σχηματισμό δύο συμπλόκων στα κύτταρα, στην 26S πρωτεάση και στον ρυθμιστή (modulator) (Adams *et al.*, 1997), του οποίου η λειτουργία δεν είναι ακόμη γνωστή, αλλά επηρεάζει θετικά τον σχηματισμό 26S πρωτεάσης με σύνδεση των υποσυμπλόκων από τα οποία αποτελείται, το πρωτεάσωμα (20S) και το καπάκι (19S). Έχει προταθεί ότι είναι πιθανόν το σύμπλοκο αυτό να αποτελεί «αποθήκη» του κυττάρου η οποία ενεργοποιείται όταν υπάρχει ανάγκη για γρήγορο πολλαπλασιασμό των συμπλόκων της 26S πρωτεάσης στα κύτταρα. Δεν είναι γνωστό ποιο ποσοστό της πρωτεΐνης που ανιχνεύεται στα κύτταρα συμμετέχει σε κάθε σύμπλοκο. Αν το μεγαλύτερο ποσοστό της πρωτεΐνης είναι δεσμευμένο στην «αποθήκη» και μικρό μόνο μέρος συμμετέχει ενεργά στην 26S πρωτεάση τότε, ελάχιστη μεταβολή στα επίπεδα παραγωγής της πρωτεΐνης είναι ικανή να επηρεάσει τον ρυθμό σύνθεσης του συμπλόκου 26S και συνεπαγόμενα την ομαλή λειτουργία του με αποτέλεσμα τον παρατηρούμενο φαινότυπο. Επιπρόσθετα, η ενδογενής πρωτεΐνη που ανιχνεύεται στα μολυσμένα με τις κατασκευές της LeMA-1 φυτά είναι πιθανόν αυτή που είναι δεσμευμένη στον ρυθμιστή και της οποίας τα επίπεδα δεν επηρεάζονται από τον ρυθμό σύνθεσης της πρωτεΐνης στην διάρκεια της παρατήρησης του φαινοτύπου.

Τα φυτά που περιέχουν νουκλεοτιδικές αλληλουχίες της LeMA-1 παρουσιάζουν εξέλιξη συμπτωμάτων όμοια με άλλα γονίδια-στόχους γονιδιακής σίγησης επαγόμενης από ιό: ο ιός που μολύνει ένα φυτό, αρχικά μετακινείται από το σημείο εισβολής, μέσω του φλοιώματος, προς την κορυφή όπου αρχίζει να πολλαπλασιάζεται. Το σήμα της γονιδιακής σίγησης σχηματίζεται στο σημείο εισβολής του ιού και ακολουθεί τον ίδιο τρόπο μετακίνησης που ακολουθεί ο ιός, δηλαδή μετακινείται προς την κορυφή όπου αναμένεται η εμφάνιση συμπτωμάτων λόγω γονιδιακής καταστολής. Τα συμπτώματα της LeMA-1 φαίνονται πρώτα στα νέα φύλλα της κορυφής. Ακολουθεί εξάπλωση και μετακίνηση του σήματος και στα ώριμα φύλλα, οπότε τα συμπτώματα εμφανίζονται και στους κάτω βλαστούς.

Στην περίπτωση της LeMA-1 τα συμπτώματα στα επάνω φύλλα χαρακτηρίζονται κυρίως από καταστολή της ανάπτυξης των νεύρων με αποτέλεσμα την συρρίκνωση του ελάσματος, ενώ τα νέα φύλλα που παράγονται μετά την έναρξη των συμπτωμάτων είναι πολύ μικρότερα και παρουσιάζουν την ίδια παραμόρφωση. Τα ώριμα φύλλα τα οποία έχουν ολοκληρώσει σε μεγάλο βαθμό την ανάπτυξή τους δεν παρουσιάζουν συρρίκνωση του ελάσματος, πιθανόν γιατί η καταστολή της ανάπτυξης των νεύρων στα φύλλα αυτά ξεκινάει όταν έχει ήδη ολοκληρωθεί σε βαθμό που δεν προκαλεί έντονες διαφορές.



Τα μολυσμένα με κατασκευές της LeMA-1 φυτά παρουσιάζουν ένα γενικό τοξικό φαινόμενο που επηρεάζει κυρίως τους αναπτυσσόμενους ιστούς του φυτού, όπου δηλαδή γίνεται έντονος πολλαπλασιασμός των κυττάρων.

Η LeMA-1 είναι η μία από τις έξι AAA ATPάσες του πρωτεασώματος οι οποίες θεωρούνται υπεύθυνες για το ATP-εξαρτώμενο ξεδίπλωμα των πρωτεϊνών που πρόκειται να αποδομηθούν από την 26S πρωτεάση (Richmond *et al.*, 1997). Μεταλλαγές στην περιοχή πρόσδεσης του ATP στις πρωτεΐνες αυτές προκαλούν θνησιγόνο φαινότυπο στη ζύμη (Rubin *et al.*, 1998) (βλέπε AAA ATPάσες Κεφ. Α Παρ. 2.2), με διαφορετικά χαρακτηριστικά για την καθεμία. Όλες προκαλούν σημαντική ελάττωση στο ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων με πιο ήπιο φαινότυπο εκείνων των Rpt1 και Rpt5 (LeMA-1).

Με βάση τα στοιχεία αυτά, καταστολή του γονιδίου της LeMA-1 δεν θα ήταν βιώσιμη. Ο τρόπος με τον οποίο επάγεται η καταστολή αυτή (μέσω VIGS) επιτρέπει την παρατήρηση των επιμέρους χαρακτηριστικών ενός θνησιγόνου φαινοτύπου δεδομένου ότι σπάνια η VIGS φτάνει στο 100% της έκφρασης του ιικού γονιδίου.

Η LeMA-1 είναι η Rpt5 AAA ATPάση της 26S πρωτεάσης. Μερική καταστολή του γονιδίου της LeMA-1 θα είχε σαν συνέπεια την ελάττωση των επιπέδων του συμπλόκου της 26S πρωτεάσης.

Το σύστημα της 26S πρωτεάσης αποτελεί σημαντικό παράγοντα ελεγχόμενης πρωτεόλυσης στα κύτταρα (Rock *et al.*, 1994). Υπολειτουργία του συστήματος αυτού θα δικαιολογούσε το τοξικό φαινόμενο που παρατηρείται στα μολυσμένα φυτά.

Το πρωτεάσωμα σε συνεργασία με το σύστημα της ουβικιτίνης (βλέπε Κεφ. Β Παρ. 5), ελέγχει τις διαδικασίες του κυτταρικού κύκλου μέσω της έγκαιρης απομάκρυνσης των κυκλινών, ρυθμίζει την μεταγραφή με πρωτεολυτική απομάκρυνση μεταγραφικών παραγόντων (όπως το σύστημα NF-κΒ, IκΒ), συμμετέχει σε μονοπάτια μετάδοσης σήματος όπως αυτό της αυξίνης μέσω της γρήγορης απομάκρυνσης παραγόντων και γενικά παίζει σημαντικό ρόλο σε βιολογικούς διακόπτες που απαιτούν την γρήγορη και τελειωτική εναλλαγή πρωτεϊνικών

παραγόντων όπως μετά από θερμικό σοκ. Συμμετέχει επίσης στην απομάκρυνση ανώμαλων προϊόντων της μετάφρασης και αποδιαταγμένων πρωτεϊνών.

Όταν το σύστημα της 26S πρωτεάσης δεν λειτουργεί κανονικά τότε, σωρεύονται στο κύτταρο ουβικιτινιλιωμένες πρωτεΐνες καθώς και ανώμαλα προϊόντα μετάφρασης και αποδιαταγμένες πρωτεΐνες, που έχουν τοξική επίδραση στα κύτταρα. Η μη απομάκρυνση των προϊόντων αυτών έχει επίσης σαν συνέπεια την δραματική ελάττωση των επιπέδων της ουβικιτίνης στα κύτταρα, γεγονός που είναι επίσης τοξικό για το κύτταρο (Pickart 2000). Η ουβικιτίνη, εκτός από την σήμανση πρωτεϊνών προς αποδόμηση, συμμετέχει και σε άλλες κυτταρικές λειτουργίες, όπως η μετα-αντιγραφική διόρθωση του DNA, η απάντηση σε στρες, η ενδοκύττωση κάποιων μεμβρανικών πρωτεϊνών, και η λειτουργία των ριβοσωμάτων.

Με βάση τα στοιχεία αυτά, παρεμπόδιση της λειτουργίας της 26S πρωτεάσης προκαλεί θνησιγόνο φαινότυπο για όλους τους παραπάνω λόγους. Όμως, ενώ οι προκαρυωτικές ATP-εξαρτώμενες πρωτεάσες (αντίστοιχες της 26S πρωτεάσης) περιέχουν επίσης εξαμερή δακτύλιο από μια ATPάση, στο ευκαρυωτικό σύστημα έχουν εξελιχθεί έξι διαφορετικές ATPάσες για την ίδια λειτουργία. Από την εργασία των Rubin *et. al.*, 1998 φαίνεται ότι ενώ οι έξι αυτές πρωτεΐνες αποτελούν μέρος ενός μεγαλύτερου συμπλόκου και δρουν συνεργιστικά σε αυτό, δεν έχουν ταυτόσημους ρόλους και προτείνεται ότι συμμετέχουν στην διαδικασία της εξειδικευμένης αναγνώρισης των προϊόντων που προσελκύνονται στην 26S πρωτεάση.

Τα πειράματα που παρουσιάζονται στην εργασία αυτή έχουν στόχο να εντοπίσουν την ειδική δράση της μιας από αυτές της LeMA-1 (Rpt5). Παρατηρώντας τον φαινότυπο που προκαλείται από την μερική καταστολή του γονιδίου της LeMA-1 φαίνεται ότι η έλλειψή της επηρεάζει κυρίως τους αναπτυσσόμενους ιστούς, η επίδρασή της είναι εντονότερη στα μέρη του φυτού που υπάρχει έντονος πολλαπλασιασμός των κυττάρων. Μια τέτοια εικόνα θα μπορούσε να εξηγηθεί από δυσλειτουργία του μονοπατιού της αυξίνης.

Η αυξίνη (ινδολο-3 οξικό οξύ, IAA) είναι φυτική ορμόνη που ελέγχει πλειάδα λειτουργιών στα φυτά όπως ανάπτυξη του εμβρύου, του ριζικού συστήματος, και του άνθους, διαφοροποίηση του αγγειακού συστήματος, επιμήκυνση των μίσχων, κυριαρχία του κεντρικού βλαστού και απαντήσεις όπως γεω- και φωτο-τροπισμός.

Από γενετικές αναλύσεις στο φυτό *A. thaliana* έχουν προκύψει τρεις βασικές κατηγορίες μεταλλαγών με φαινοτύπους που σχετίζονται με την αυξίνη: μια κατηγορία μεταλλαγών αφορά γονίδια που συμμετέχουν στην ενεργοποίηση της πρωτεΐνης RUB η οποία επιδρά στην σταθεροποίηση των συμπλόκων SCF (E3 λιγάσες ουβικιτίνης) (βλέπε αντίστοιχο κεφάλαιο). Μια δεύτερη τάξη μεταλλαγών αφορά γονίδια που συμμετέχουν στην μεταφορά της αυξίνης όπως το AUX1 που πιθανά κωδικοποιεί για πρωτεΐνη απορρόφησης αυξίνης. Μια τρίτη κατηγορία μεταλλαγών αφορά γονίδια που επάγονται από αυξίνη και τους μεταγραφικούς παράγοντες που τα ρυθμίζουν όπως οι AUX/IAAA πρωτεΐνες.

Μια από τις πρώτες απαντήσεις στη χορήγηση αυξίνης είναι η μεταγραφική ενεργοποίηση διαφόρων γονιδίων που με βάση την αμινοξική τους συγγένεια διακρίνονται σε πέντε κατηγορίες: τις AUX/IAA, SAUR (small auxin up-regulated), GH3-like, ACS (συνθάση του αμινοκυκλο-προπανο-1-καρβοξυλικού οξέος) και την μεταφορά της S-γλουταθειόνης (Abel & Theologis, 1996). Οι λειτουργίες των πρωτεϊνών αυτών είναι σε μεγάλο βαθμό άγνωστες.

Οι πρωτεΐνες AUX/IAA είναι μια μεγάλη οικογένεια μικρών πρωτεϊνών (25-30KDa), που επάγονται από την αυξίνη και λειτουργούν ως μεταγραφικοί παράγοντες. Οι πρωτεΐνες αυτές χαρακτηρίζονται από μικρό χρόνο ημιζωής (5-8 λεπτά μετά την επαγωγή από αυξίνη), και η αποδομήσή τους επάγεται από την αυξίνη. Δηλαδή, η αυξίνη ενεργοποιεί τις πρωτεΐνες αυτές των οποίων την λειτουργία ελέγχει επάγοντας την αποδόμησή τους.

Οι πρωτεΐνες αυτές φέρουν περιοχή (περιοχή II), η οποία επάγει την αποδόμησή τους από την 26S πρωτεάση μέσω της ενεργοποίησης της E3 λιγάσης ουβικιτίνης SCF^{TIR1}

(Gray *et al.*, 2001). Ελάχιστη μεταβολή στα επίπεδα των πρωτεϊνών αυτών προκαλεί διαταραχή στο μονοπάτι μετάδοσης σήματος της αυξίνης. Μεταλλαγές στην περιοχή II που ελέγχει την αποδόμησή τους από την 26S πρωτεάση οδηγούν στην συσσώρευση των πρωτεϊνών αυτών με αποτέλεσμα την εμφάνιση χαρακτηριστικών φαινοτύπων που σχετίζονται με αυξίνη, όπως ο *axr3* και ο *shy2* (Worley *et al.*, 2000).

Ειδικά, μεταλλαγές της πρωτεΐνης *shy2*, που έχουν σαν αποτέλεσμα φαινότυπο απώλειας της λειτουργίας της εντοπίζονται στην περιοχή II της πρωτεΐνης και χαρακτηρίζονται από συμπτώματα όπως καρούλιασμα των υποκοτύλων και των φύλλων (Tian & Reed, 1999), συμπτώματα που χαρακτηρίζουν και τον φαινότυπο της έλλειψης της *LeMA-1*.

Είναι πιθανόν ότι η γονιδιακή καταστολή της *LeMA-1* μέσω του PVX προκαλεί διαταραχή της λειτουργίας της 26S πρωτεάσης με άμεσες επιδράσεις στο μονοπάτι μετάδοσης σήματος της αυξίνης.

Οι Ε3 λιγάσες ουβικιτίνης τύπου SCF αλληλεπιδρούν με την 26S πρωτεάση ώστε να προσελκύσουν στο ένζυμο τις πρωτεΐνες που επιλέγουν προς αποδόμηση. Είναι πιθανό ότι τα σύμπλοκα αυτά αλληλεπιδρούν με την πρωτεάση εξειδικευμένα μέσω των AAA ΑΤΡασών του συμπλόκου οι οποίες με την σειρά τους, επιλέγοντας εκλεκτικά μια συγκεκριμένη Ε3 λιγάση ουβικιτίνης, επηρεάζουν την πρωτεόλυση συγκεκριμένης ομάδας πρωτεϊνών, γεγονός από το οποίο απορρέουν οι διαφορές που παρατηρήθηκαν στον φαινότυπο της ζύμης από τις επιλεκτικές μεταλλαγές σε καθεμία από τις έξι AAA ΑΤΡασες του πρωτεασώματος.

Για να διερευνηθεί η υπόθεση αυτή θα πρέπει να συγκριθούν οι φαινότυποι που προκαλούνται από την εκλεκτική καταστολή των γονιδίων των πρωτεϊνών αυτών σε φυτά, (καθεμίας χωριστά και σε συνδυασμούς) ώστε να εντοπισθούν οι πρωτεΐνες-στόχοι της κάθε πρωτεΐνης.

Για να διερευνηθεί η παραπάνω υπόθεση, μέρος της αλληλουχίας της πρωτεΐνης Rpt1 της ντομάτας κλωνοποιήθηκε στον φορέα pPVX202 με στόχο να προκληθεί σίγηση του γονιδίου και να μελετηθεί ο προκαλούμενος φαινότυπος. Τα φυτά που μολύνθηκαν με την κατασκευή pRpt1 παρουσιάζουν φαινότυπο, παρόμοιο αλλά όχι ίδιο, με εκείνον που προκαλούν οι κατασκευές της *LeMA-1*. Το φυτό παρουσιάζει εντονότερη αναστολή της ανάπτυξης -είναι γενικά μικρότερο-, αλλά επιβιώνει περισσότερο από τα φυτά με καταστολή της *LeMA-1*. Εμφανίζει το καρούλιασμα των νέων φύλλων που υποδηλώνει παρόμοια διαταραχή της ανάπτυξης του αγγειακού συστήματος, αλλά, σε αντίθεση με τα φυτά με καταστολή της *LeMA-1*, τα ώριμα φύλλα επηρεάζονται πολύ λιγότερο: δεν παρατηρούνται νεκρώσεις και καρουλιάσματα στα φύλλα που έχουν παραχθεί πριν την εγκατάσταση της γονιδιακής σίγησης.

Ο φαινότυπος που προκύπτει από την καταστολή του γονιδίου Rpt1 είναι ηπιότερος από αυτόν που παρατηρείται από την καταστολή της *LeMA-1*, γεγονός που ήταν αναμενόμενο με βάση τα στοιχεία των Rubin *et al.*, (1998). Αν, όπως προτείνεται από τους ερευνητές αυτούς, η Rpt1 είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση του 19S με το σύμπλοκο του πρωτεασώματος (20S), και ταυτόχρονα παρεμπόδιση της λειτουργίας της 26S πρωτεάσης οδηγεί σε αυξημένη σύνθεση όλων των υπομονάδων της 26S, τότε, η έλλειψη της Rpt1 είναι πιο καλά ανεκτή από τα κύτταρα αν, λόγω υψηλών επιπέδων των υποσυμπλόκων 19S και 20S στα κύτταρα, το σύμπλοκο 26S καταφέρνει να σχηματισθεί και να αποκαταστήσει μερικά την απώλεια.

Αν η έλλειψη των δυο αυτών πρωτεϊνών παρεμποδίζει την απομάκρυνση διαφορετικών παραγόντων από το κύτταρο -με αποτέλεσμα την εμφάνιση διαφορετικού φαινοτύπου- τότε, στα κύτταρα των φυτών αυτών συσσωρεύονται διαφορετικές πολύ-ουβικιτινιλιωμένες πρωτεΐνες. Θα μπορούσε κανείς να εντοπίσει, -με απλή ανίχνευση πολύ-ουβικιτίνης με κατάλληλο αντίσωμα- τις πρωτεΐνες που εμφανίζονται στα κύτταρα των φυτών αυτών και να επικεντρωθεί σε προϊόντα που εμφανίζονται εξειδικευμένα σε έλλειψη

καθεμίας από αυτές. Με τον τρόπο αυτό θα δινόταν απάντηση σε δύο βασικά ερωτήματα ως προς τις λειτουργίες των πρωτεϊνών αυτών:

πρώτον επιδεικνύουν εκλεκτική επιλογή των στόχων που αποδομούνται από την 26S πρωτεάση;

και δεύτερον, αν υπάρχει εκλεκτική επιλογή από τις ΑΤΡασες σε ποιο στάδιο εφαρμόζεται αυτή: στο επίπεδο λιγασών ουβικιτίνης ή σε άμεση επιλογή της προς αποδόμηση πρωτεΐνης;

Απάντηση στο δεύτερο ερώτημα θα βοηθούσε να διευκρινιστεί και ο μηχανισμός δράσης των πρωτεϊνών αυτών στην διαδικασία της πρωτεόλυσης και πιθανά στην λειτουργία τσπερόνης που αποδίδεται στο συποσύμπλοκο 19S (βλέπε Κεφ.Β Παρ 2.2). Αν επιλέγουν εκλεκτικά τις πρωτεΐνες στόχους με βάση κάποιο χαρακτηριστικό τους (όπως ανώμαλες δευτεροταγείς δομές), τότε διευκρινίζεται ένα βασικό ερώτημα σε σχέση με τις λειτουργίες της 26S πρωτεάσης, δηλαδή πότε και πως αποφασίζεται αν μια πρωτεΐνη θα αναδιπλωθεί σωστά ή θα αποδομηθεί.

Με έκφραση αλληλουχιών της LeMA-1 της ντομάτας παρατηρήθηκε ο ίδιος φαινότυπος σε τρία φυτικά είδη: την ντομάτα που φέρει το ίδιο γονίδιο, αλλά και σε φυτά *N. benthamiana* και *N. clevelandie*, και με τμήμα της αλληλουχίας της Rpt1 της ντομάτας σε φυτά ντομάτας και *N. benthamiana*, λόγω της υψηλής ομολογίας των γονιδίων αυτών σε αυτά τα φυτά. Το γεγονός αυτό επιτρέπει την μελέτη των γονιδίων αυτών σε διαφορετικά φυτά, γεγονός που παρέχει την δυνατότητα επιλογών άλλου ιικού φορέα που να επάγει την γονιδιακή σίγηση αλλά να είναι σταθερότερος σε φυτά, όπως ο TRV (βλέπε γονιδιακή σίγηση Κεφ Γ), ο οποίος επιπρόσθετα δεν επηρεάζει την φυσιολογία του φυτού και πολλαπλασιάζεται στα μεριστωματικά κύτταρα.

Είναι πιθανό, η θέση τους στον εξαμελή δακτύλιο της 26S πρωτεάσης να μην είναι τυχαία, δηλαδή πρωτεΐνες που βρίσκονται σε άμεση γειτονία πιθανόν συνεργάζονται προς σχηματισμό περιοχής αναγνώρισης των πρωτεϊνών στόχων του συμπλόκου. Με την τεχνική της γονιδιακής καταστολής μέσω ιών θα μπορούσε κανείς να καταστείλει επιλεκτικά και συνδυασμούς των έξι γονιδίων των πρωτεϊνών αυτών κλωνοποιώντας αλληλουχίες από διαφορετικές περιοχές των γονιδίων αυτών (εκτός της συντηρημένης περιοχής) στην ίδια κατασκευή, με στόχο να μελετήσει τις μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις. Αν οι πρωτεΐνες που βρίσκονται σε άμεση γειτονία στον εξαμελή δακτύλιο του 19S συνεργάζονται προς σχηματισμό της περιοχής αναγνώρισης συγκεκριμένης ομάδας πρωτεϊνών θα περίμενε κανείς ότι η καταστολή της καθεμίας θα προκαλούσε παρόμοια συμπτώματα με αυτά που παρατηρούνται από την καταστολή και των δύο.

Σχόλιο: Στην αρχή της εργασίας αυτής δεν ήταν ακόμη ξεκάθαρο αν η TBP-1 (LeMA-1, Rpt5) αποτελεί υπομονάδα του συμπλόκου 19S κάτι το οποίο σήμερα έχει δειχθεί πέρα από κάθε αμφιβολία (βλέπε AAA ΑΤΡασες πρωτεώματος Κεφ. Β Παρ 2.2.1). Για τις υπομονάδες της 26S πρωτεάσης έχει προταθεί συγκεκριμένη ονοματολογία για να αποφευχθεί η σύγχυση που επικρατούσε με τις πολλαπλές ονομασίες που εμφανίζονταν για κάθε υπομονάδα (Finley *et al.*, 1998). Σύμφωνα με την παραπάνω πρόταση η LeMA-1 μετονομάζεται σε: **LeRpt5**: *Lycopersicon esculentum* Regulatory particle triple-A ATPase 5.

ΥΛΙΚΑ και ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Το αντίσωμα

1.1 Παρασκευή αντισώματος για την LeMA-1

Ειδικά πολυκλωνικά αντισώματα για την LeMA-1 παρασκευάστηκαν με εμβολιασμό κουνελιών με 350mg πρωτεΐνης LeMA-1 ανά κουνέλι, απομονωμένης από στήλη χημικής συγγένειας Ni-NTA. Η παρασκευή του αντισώματος έγινε από το εργαστήριο του Δρ. Η. Κραμποβίτη (IMBB- FORTH, Ηράκλειο, Ελλάδα)

1.2 Τιτλοδότηση αντισώματος με την τεχνική ELISA

Τα αντισώματα που παράχθηκαν τιτλοδοτήθηκαν με την τεχνική της ELISA :

Ειδικές πλάκες επικαλύπτονται με 100-200 ng καθαρής πρωτεΐνης ανά πηγάδι σε διάλυμα NaHCO_3 0.05M, Na_2CO_3 0.05 M pH = 9.6, και επωάζονται O/N στους 4°C , εκπλένονται 4x PBS -0.2%BSA. Προστίθενται 200μl 1%BSA σε PBS (PB- K_2HPO_4 - KH_2PO_4 pH 7,4 , 0.9% NaCl) /ανά πηγάδι (blocking buffer), επωάζονται για 1h σε θερμοκρασία δωματίου, εκπλένονται με 4x PBS -0.2%BSA. Προστίθεται ο ορός (το αντίσωμα) σε αραιώσεις 1:1000 →1: 60000, και οι πλάκες επωάζονται για 1h σε θερμοκρασία δωματίου, εκπλένονται με 4x PBS -0.2%BSA. Ακολουθεί επώαση με το αντι-αντίσωμα που φέρει ένζυμο με χρωμογόνο αντίδραση (anti-IgG conjugated horse-radish peroxidase) σε αραιώση 1:10000 για 1h σε θερμοκρασία δωματίου, εκπλένονται με 4x PBS -0.2%BSA. Κατόπιν επωάζονται με κατάλληλο υπόστρωμα, στην περίπτωση αυτή: τετραμεθυλβενζιδίνη, TMB, για 20min 1h σε θερμοκρασία δωματίου, στο σκοτάδι, όπου αναπτύσσεται το χρώμα. Η αντίδραση αναστέλλεται με H_2SO_4 και η απορρόφηση μετράται σε φωτόμετρο σε 504nm.

Ο τίτλος του αντισώματος είναι ανάλογος της απορρόφησης και υπολογίζεται με βάση τον τύπο :

$$A=1.4 =1\text{mg/ml.}$$

Όπου, 1mg/ml πρωτεΐνης δίνει απορρόφηση 1.4.

1.3 Καθαρισμός αντισώματος με θειικό αμμώνιο (NH_4SO_4)

Ο ορός επεξεργάζεται με NH_4SO_4 έτσι ώστε να απομακρυνθούν τρoσφερρίνες και φερίτίνες από το δείγμα και να εμπλουτισθεί σε αντισώματα. Στον ορό προστίθεται NH_4SO_4 (22.6gr/100ml) μέχρι τελικής συγκέντρωσης 1,7M (κορεσμένο). Το δείγμα επωάζεται σε πάγο για 30min και φυγοκεντρείται 20 min σε 10000 rpm, 4°C . Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 1,7 M NH_4SO_4 σε όγκο ίδιο με τον αρχικό και επαναλαμβάνεται η επώαση και η φυγοκέντρωση. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε PBS pH=7.4 στον μισό όγκο από τον αρχικό και

ακολουθεί διάλυση (dialysis) του δείγματος σε PBS με τουλάχιστον 4 αλλαγές και όγκο 10πλάσιο.

1.4 Καθαρισμός αντισώματος από στήλη ανοσοσυγγένειας

1.4.1 Κατασκευή της στήλης ανοσοσυγγένειας

Για περαιτέρω καθαρισμό του αντισώματος χρησιμοποιήθηκε στήλη ανοσοσυγγένειας με το αντιγόνο. Η στήλη αποτελείται από κόκκους σεφαρόζης με CN-Br (Pharmacia) και για την κατασκευή της ακολουθήθηκαν οι οδηγίες του κατασκευαστή. 1g σκόνης δίνει περίπου 3.5ml πηκτώματος, και δεσμεύει 1-2mg πρωτεΐνης/ml. Εδώ, 0.5gr CN-Br σεφαρόζης αφήνεται να «φουσκώσει» σε 5ml 1mM HCl για 10min και το πήκτωμα που δημιουργείται συλλέγεται σε εσφυρισμένο ηθμό όπου και εκπλένεται με 300ml 1mM HCl (200ml/gr σκόνης) για 15min (το διάλυμα περνάει σιγά-σιγά). Το πήκτωμα διασπείρεται σε διάλυμα NaHCO₃ 0.1M, NaCl 0.5M pH=8.3 που περιέχει κατάλληλη ποσότητα της πρωτεΐνης που θα ακινητοποιηθεί στο πήκτωμα (2mg πρωτεΐνης / ml σεφαρόζης) και επώαζεται για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με ήπια ανάδευση (χωρίς μαγνήτη, με κίνηση). Στην προκειμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν 2 mg πρωτεΐνης LeMA-1 που παράγεται από βακτήρια μετά από κατάλληλη κλωνοποίηση του cDNA κλώνου της σε κατάλληλο φορέα, και καθαρισμό της παραγόμενης πρωτεΐνης από στήλη Ni-NTA. Το πήκτωμα συλλέγεται σε εσφυρισμένο ηθμό όπου και εκπλένεται με 0.1M Tris - HCl pH=8.0 ή 0.1 M τριαιθανολαμίνης pH=9.0, για 1h, ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια της αδέσμευτης πρωτεΐνης και να απενεργοποιηθούν τυχόν ελεύθερες ενεργές ομάδες. Τελικά το πήκτωμα εκπλένεται σε τρεις διαφορετικούς κύκλους εναλλασσόμενου pH : α) CH₃COONa (0.1M, pH=4.0) - NaCl 0.5M β) Tris-HCl (0.1M pH=8.0) - NaCl 0.5M. Ακολουθεί το πακετάρισμα του πηκτώματος σε στήλη. Η τοποθέτηση του πηκτώματος γίνεται με 5ml διαλύματος Tris-HCl pH=8.0. Τέλος η στήλη εκπλένεται με διάλυμα NaCl 0.5M-NaN₃ 0.02% και φυλάσσεται σε ξηρό μέρος στους 4°C

Πριν την χρήση της η στήλη υποβάλλεται σε πλασματικό καθαρισμό για να «ωριμάσει» χρησιμοποιώντας την διαδικασία πραγματικού καθαρισμού χωρίς πραγματικό δείγμα (baby run). Με αυτήν την διαδικασία απομακρύνονται από την στήλη πρωτεΐνες που δεν έχουν προσδεθεί σταθερά και θα εκλούονταν μαζί με το προς καθαρισμό δείγμα.

Η στήλη που προκύπτει περιέχει το αντιγόνο με το οποίο ανοσοποιήθηκαν τα κουνέλια για την παρασκευή του αντισώματος και χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό και εμπλουτισμό του αντιορού σε αντισώματα ειδικά για την LeMA-1.

1.4.2 Καθαρισμός του αντισώματος από στήλη ανοσοσυγγένειας.

Η στήλη ανοσοσυγγένειας συνδέεται με αντλία ρυθμιζόμενης ροής και συνδέεται με φωτόμετρο, που στόχο έχει να μετράει και να καταγράφει, με κατάλληλο καταγραφέα, το διάγραμμα ροής πρωτεϊνών από τη στήλη, μετρώντας την απορρόφηση του εξερχόμενου διαλύματος στα 280nm. Από το διάγραμμα ροής υπολογίζεται η ποσότητα της συλλεγόμενης πρωτεΐνης στα διάφορα κλάσματα.

Αρχικά η στήλη εκπλένεται (με μέτρια ροή) με 20x τον όγκο της στήλης (bed volume) με 50mM TBS pH=7.5 (50mM tris-borate pH=7,5, saline 0.5M NaCl) μέχρι να σταθεροποιηθεί η βασική γραμμή του καταγραφέα, (κάποιες φορές αυτό πρέπει να γίνει O/N), σε 4° C.

Οι πρωτεΐνες του ορού κατακρημνίζονται με NH₄SO₄, το οποίο απομακρύνει μεγάλο μέρος των φερριτινών του ορού, και συμπυκνώνεται με επαναδιάλυση σε PBS στο 1/10 του αρχικού όγκου.

Υπολογίζεται η ποσότητα του ορού που θα καθαριστεί από την στήλη (1ml) και αραιώνεται σε τελικό όγκο 10ml με 10mM Tris pH=7,5 (1:10). Το διάλυμα που προκύπτει αφήνεται να ανακυκλώνεται μέσα από την στήλη O/N σε 4° C, με πολύ αργή ροή, έτσι ώστε να δεσμευτεί το αντίσωμα στην στήλη. Ακολούθως η στήλη εκπλένεται με διάλυμα 20x τον όγκο της στήλης με Tris - HCl pH=7.5, και στη συνέχεια με διάλυμα 20x τον όγκο της στήλης με Tris - HCl pH=7.5 - NaCl 0,5M. Εδώ απομακρύνονται από την στήλη τα μη δεσμευμένα προϊόντα. Τα επόμενα βήματα γίνονται σε γρήγορη ροή και για όσο το δυνατόν λιγότερο χρόνο, λόγω της έκθεσης της στήλης σε πολύ χαμηλό pH που την καταστρέφει (διασπά τον δεσμό στήλης-πρωτεΐνης). Η έκπλυση των δεσμευμένων πρωτεϊνών γίνεται με 10x τον όγκο της στήλης διάλυμα γλυκίνης - HCl 0.2M pH=2.8, και η εκροή της στήλης συλλέγεται σε σωληνάριο που περιέχει 1x τον όγκο της στήλης 100mM τριαιθανολαμίνης, ή 1M Tris-HCl pH=8.0 ώστε να εξουδετερώνεται το διάλυμα αμέσως. Το κλάσμα αυτό περιέχει τα αντισώματα. Κατόπιν η στήλη εκπλένεται με 10x τον όγκο της στήλης διάλυμα Γλυκίνης - HCl 0.2M pH=2.2, ώστε να απομακρυνθούν προϊόντα που προσκολλώνται στην στήλη μη εξειδικευμένα, μέχρι να σταθεροποιηθεί η βασική γραμμή του καταγραφέα. Ακολουθεί εξουδετέρωση της στήλης με 10x τον όγκο της στήλης 10mM Tris - HCl pH=8.0, ή 100mM τριαιθανολαμίνης pH=11.5(παρακολουθείται το pH της εκροής), ακολουθεί διόρθωση του pH με έκπλυση της στήλης με διάλυμα 10mM Tris-HCl pH=7.5, και τέλος η στήλη εκπλένεται με διάλυμα NaCl 0.5M-NaN₃ 0.02% και φυλάσσεται σε ξηρό μέρος στους 4°C για επόμενη χρήση.

Με τον τρόπο αυτό συλλέγονται από τον ορό τα αντισώματα που εξειδικευμένα αναγνωρίζουν την LeMA-1. Το διάλυμα που προκύπτει φυλάσσεται σε -80°C. Προαιρετικά

προστίθενται στο διάλυμα των αντισωμάτων αντιπρωτεασικοί παράγοντες όπως 5μM απροτινίνης.

2. Βακτήρια

2.1 Βακτηριακά στελέχη

Τα *Escherichia coli* βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν σαν ξενιστές για τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια είναι τα: DH5α, τα JM83 και τα JM101 (Sambrook *et al.*, 1989).

2.2 Παρασκευή κυττάρων επιδεκτικών σε μετασχηματισμό.

Για τον μετασχηματισμό βακτηρίων τα επιλεγόμενα στελέχη επεξεργάζονται, ώστε να προσλαμβάνουν νουκλεϊκά οξέα από το περιβάλλον, με μια διαδικασία που περιγράφεται από τους Sambrook *et al.*, 1989 και έχει ως εξής :

Χρησιμοποιώντας αποστειρωμένη θηλιά από σύρμα αλουμινίου, κύτταρα από παγωμένη καλλιέργεια βακτηρίων του επιθυμητού στελέχους μεταφέρονται σε πιάτο επιστρωμένο με LB (Luria - Bertani) (1% bacto-tryptone, 0.5% bacto-yeast extract, 1% NaCl and 1.5% bacto-agar) και επωάζονται O/N στους 37°C. Μία αποικία ενός κυττάρου επιλέγεται, μεταφέρεται σε καλλιέργεια 2ml υγρού LB (1% bacto-tryptose, 0.5% bacto-yeast extract, and 1% NaCl) και επωάζεται O/N στους 37°C. 1ml της καλλιέργειας αυτής χρησιμοποιείται για μόλυνση 100ml LB σε φλάσκα των 2lt και ακολουθεί επώαση της καλλιέργειας με έντονη ανάδευση σε 37 °C μέχρις ότου η καλλιέργεια φτάσει σε λογαριθμική φάση ανάπτυξης, πράγμα που προσδιορίζεται από την πυκνότητα των κυττάρων και μετριέται με απορρόφηση στα 600nm (από 0.2-0.45 ανάλογα με το στέλεχος). Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση σε 3500rpm για 10 min στους 4°C. Το υγρό απομακρύνεται τελείως και το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε 20ml TFB I (30 mM KAc, 50 mM MnCl₂, 100 mM KCl, 10 mM CaCl₂ and 15% glycerol) με ήπια ανάδευση σε πάγο. Τα κύτταρα επωάζονται σε πάγο για τουλάχιστον 15 min και ακολούθως συλλέγονται με φυγοκέντρηση σε 3500rpm για 10 min στους 4°C. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 4ml TFB II (10 mM MOPS, pH 7.0, 75 mM CaCl₂, 10 mM KCl and 15% glycerol) και μοιράζεται σε σωληνάρια των 1.5ml σε κλάσματα των 100 - 200μl, τα οποία καταψύχονται αμέσως σε υγρό N₂, και φυλάσσονται στους -80°C. Η απόδοση των κυττάρων ελέγχεται με μετασχηματισμό 100 μl κυττάρων με γνωστή συγκέντρωση υπερελικωμένου πλασμιδιακού DNA. Απόδοση της τάξης των 5x10⁷ μετασχηματισμένα βακτήρια ανά 1μg DNA θεωρείται ικανοποιητική για τους συνθέεις μετασχηματισμούς.

2.3 Μετασχηματισμός Βακτηρίων

Για τον μετασχηματισμό βακτηρίων ακολουθείται η μέθοδος θερμικού σοκ που περιγράφεται από τους Sambrook *et al.*, 1989 : 100μl επιδεκτικών βακτηρίων αφήνονται να ξεπαγώσουν σε πάγο. 20-100ng DNA (υπερελικωμένο πλασμιδιακό DNA ή ανασυνδυασμένο πλασμίδιο) προστίθενται στην καλλιέργεια και το όλο επωάζεται στον πάγο για 30min. Κατόπιν το μείγμα μεταφέρεται σε υδατόλουτρο 42°C για 90 sec και κατόπιν σε πάγο για 2min. Στη συνέχεια προστίθενται 400μl LB και τα κύτταρα επωάζονται στους 37°C για 50min -1h ώστε να αναρρώσουν και να συνθέσουν παράγοντες απαραίτητους για την ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά. Τέλος η καλλιέργεια απλώνεται σε πιάτο επιστρωμένο με LB που περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό και επωάζεται O/N στους 37°C. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα επιλέγονται ανάλογα με την ικανότητά τους να πολλαπλασιάζονται παρουσία του κατάλληλου αντιβιοτικού.

2.4 Καλλιέργεια βακτηρίων

Τα βακτήρια επωάζονται επωάζεται O/N στους 37°C σε πιάτα επιστρωμένα με LB που περιέχει το/τα κατάλληλα αντιβιοτικά. Συνήθως χρησιμοποιείται αμπικικλίνη σε συγκέντρωση 100 mg/ml καλλιέργειας. Αποικία ενός κυττάρου επιλέγεται και μεταφέρεται σε 10ml για 5-10μg DNA, ή σε 100ml LB για 100μg DNA ανάλογα (δες παρακάτω), με τα κατάλληλα αντιβιοτικά και επωάζεται O/N στους 37°C.

2.5 Αποθήκευση στελεχών με γλυκερόλη

Τα ανασυνδυσμένα βακτήρια καθώς και τα «άγριου τύπου» φυλάσσονται στους -80°C με γλυκερόλη. 2ml LB μολύνονται με ποσότητα βακτηρίων (αποικία ενός κυττάρου, ή mini-prep μετά από ανασυνδυασμό βακτηρίου) και επωάζονται O/N στους 37°C υπό ανάδευση. Κατόπιν αναμιγνύονται σε αναλογία 1:1 με αποστειρωμένη γλυκερόλη 87%. Το μείγμα ανακινείται έντονα ώστε να αναμιχθεί η γλυκερόλη με την καλλιέργεια και % και καταψύχονται με υγρό N₂. Αποθηκεύονται στους -80°C. Η καλλιέργεια αναγεννάται μεταφέροντας με αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα μέρος της καλλιέργειας (από την παγωμένη επιφάνεια) σε πιάτο ή σε υγρή καλλιέργεια, προσθέτοντας τα κατάλληλα αντιβιοτικά..

3. Απομόνωση υποκυτταρικών οργανιδίων από φύλλα φυτών

3.1 Απομόνωση πυρήνων

Η απομόνωση πυρήνων ακολουθεί την μέθοδο που περιγράφεται από τους Schumacher *et al.*, 1983 :

Για την απομόνωση πυρήνων από φύλλα ντομάτας συλλέγονται 150gr νεαρά φύλλα 4 περίπου εβδομάδων χωρίς μίσχο. Τα φύλλα πλένονται με παγωμένο νερό, μετά, γρήγορα, με αιθανόλη και πάλι με παγωμένο νερό. Αφού απομακρυνθεί το νερό με τίναγμα, εμβραπίζονται σε 1.5lt διαλύματος **A** (25 mM MES/NaOH, pH 6.5, 10 mM KCl, 5 mM MgCL₂, 0.1% BSA-bovine serum albumin, 1 mM DTT και 600mM Manittol) υπό κενό, το οποίο διακόπτεται απότομα ανα 5min για 2ή 3 φορές μέχρι να διαποτιστούν τα φύλλα (γίνονται σκουρότερα), και αφήνονται για 30min σε πάγο στους 4°C. Τα φύλλα συλλέγονται με δίκτυ και τοποθετούνται σε παγωμένο μεταλλικό μηχανικό αναμείκτη (blender) όπου προστίθενται 450ml παγωμένου διαλύματος **B** (25 mM MES/NaOH, pH 6.5, 10 mM KCl, 5 mM MgCL₂, 0.1% BSA and 1 mM DTT600 mM Saccharose, 40% Glycerol). Τα φύλλα ομογενοποιούνται 3x10sec με 15sec διαλείμματα. Το μείγμα φιλτράρεται σε ηθμό από διπλό Miracloth (Hoechst Bohring Diagnostics, La Jolla, USA) και συλλέγεται το διήθημα. Στο διήθημα προστίθεται αργά NP-40 (Nonidet P40) μέχρι τελικής συγκέντρωσης 1%. Το μείγμα ανακινείται ήπια για 10min σε

0°C, όπου διαλύονται οι μεμβράνες των χλωροπλαστών. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10min σε 4°C, στα 5000 rpm (Minifuge II, Heraeus-Christ, Osterode, Germany), και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 5ml διαλύματος **D** (25 mM MES/NaOH, pH 6.5, 10 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.1% BSA, 1 mM DTT, 250 mM mannitol, 95% Percoll, 1% Nonidet P40). Στο μείγμα προστίθενται 380ml διαλύματος **C** (25 mM MES/NaOH, pH 6.5, 10 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.1% BSA, 1 mM DTT, 600 mM saccharose, 40% glycerol, 1% Nonidet P40) και το διάλυμα φυγοκεντρείται για 10min σε 4°C, στα 5000 rpm. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 3ml διαλύματος **D**, προστίθενται 150ml διαλύματος **C**) και το διάλυμα φυγοκεντρείται για 10min σε 4°C, στα 5000 rpm. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 45ml διαλύματος **D**, και το διάλυμα φυγοκεντρείται για 10min σε 4°C, στα 5000 rpm χωρίς φρένο. Οι πυρήνες επιπλέουν στο percoll σαν μια γκριζα ζώνη. Συλλέγεται η ζώνη που περιέχει τους πυρήνες σε λίγα ml διαλύματος **D**. στο μείγμα προστίθενται 28ml διαλύματος **E** (, 25 mM MES/NaOH, pH 6.5, 10 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.1BSA and 1 mM DTT, 250 mM mannitol) το οποίο συμπληρώνεται με διάλυμα **D** σε τελικό όγκο 45ml, έτσι ώστε το percoll να έχει τελική συγκέντρωση 36%. Το μείγμα φυγοκεντρείται φυγοκεντρείται για 5min σε 4°C, στα 2500 rpm και οι πυρήνες καθιζάνουν σαν ίζημα. Η φυγοκέντρηση επαναλαμβάνεται 2-3 φορές ώσπου δεν καθιζάνει άλλο ίζημα, και άρα έχουν συλλεχθεί όλοι οι πυρήνες. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 10-12ml διαλύματος **E** με 50% γλυκερόλη και αποθηκεύεται στους -20°C. Όλη η παραπάνω διαδικασία διεξάγεται στο ψυχρό δωμάτιο στους 4°C. Συνήθως συλλέγονται 1-3x10⁸ πυρήνες από 150gr φύλλα.

3.2 Απομόνωση χλωροπλαστών

Για την απομόνωση χλωροπλαστών από φύλλα ντομάτας τροποποιήθηκε μέθοδος για απομόνωση από φύλλα καλαμποκιού :

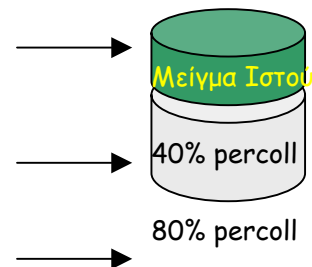
Συλλέγονται 20gr νεαρά φύλλα ντομάτας και πλένονται με κρύο νερό, γρήγορα με αιθανόλη και κατόπιν πάλι με νερό. Όλη η επόμενη διαδικασία γίνεται στο ψυχρό δωμάτιο, σε χαμηλό φωτισμό (χρειάζεται πράσινο φως) και σε πάγο. Τα διαλύματα είναι όλα παγωμένα και σε πάγο.

Τα φύλλα ομογενοποιούνται σε μεταλλικό αναμείκτη (blender) σε 450ml παγωμένο Grinding Medium (2mM EDTA pH=8.0, 1mM MgCl₂, 1mM MnCl₂, 50mM HEPES-KOH pH=7.5, 350mM sorbitol, 0.1% w/v Ascorbic acid - το τελευταίο προστίθεται αμέσως πριν τη χρήση-), σε χαμηλή ταχύτητα 5x5sec με 15sec διαλείμματα ενδιάμεσα. Ο ομογενοποιημένος

ιστός φιλτράρεται μέσα από miracloth και το διήθημα φυγοκεντρείται για 4min σε 2500g στους 4°C.

Τα ιζήματα επαναδιαλύονται πολύ προσεκτικά (με πινέλο) σε 8-10ml gradient mix -GM- (6.27ml MMHS { 0.5ml 1M $MgCl_2$, 0,5ml 1M $MnCl_2$, 25ml 1M HEPES-KOH pH=7.5, 94.3ml 1.75M Sorbitol}, 0.116ml 0.5M EDTA pH=8.0, 25mg L-ascorbic acid, 10mg Glutathione reduced form) και το μείγμα τοποθετείται προσεκτικά με πιπέτα Pasteur στην επιφάνεια του δυο ζωνών διαφορετικής συγκέντρωσης Percoll : παρασκευάζονται δύο διαλύματα :

Percoll	40%	80%
Gradient mix	4.42ml	1.38ml
PBF-Percoll	8ml	5ml
H ₂ O	7.58ml	—



Όπου PBF - Percoll (450 mg PEG3350, 150mg BSA , 150mg Ficoll type 400, 15ml percoll P1644)

Το μείγμα με τις τρεις φάσεις φυγοκεντρείται για 30min στις 7500rpm (HB-4 swing rotor Sorval) στους 4°C χωρίς φρένο. Οι χλωροπλάστες δεν διαπερνούν το φράγμα του 80% percoll και συναθροίζονται ανάμεσα στις δυο κάτω φάσεις σε αντίθεση με τις μεμβράνες και τους σπασμένους χλωροπλάστες που επιπλέουν στην επιφάνεια του 40%. Οπότε σχηματίζονται δύο ζώνες, η κάτω είναι οι ακέραιοι χλωροπλάστες οι οποίοι συλλέγονται και αναμιγνύονται με 30ml GM. Η επάνω ζώνη αποτελείται κυρίως από θυλακοειδή και συλλέγεται και αυτή αν είναι επιθυμητό. Το τελικό διάλυμα φυγοκεντρείται για 5 min στις 3.500 rpm, στους 4°C, και οι χλωροπλάστες συλλέγονται σαν ίζημα το οποίο επαναδιαλύεται πολύ ήπια σε 30ml 1xHSM (για 100ml διαλύματος 5xHSM : 25ml 1M HEPES-KOH pH=8.0, 30gr Sorbitol, 0.62gr methionine) και επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρωση για 5 min στις 3.500 rpm, στους 4°C οπότε και επαναδιαλύεται το ίζημα των χλωροπλαστών σε 1ml 1xHSM.

Η ποσότητα των χλωροπλαστών υπολογίζεται έμμεσα από την συγκέντρωση της χλωροφύλλης στο δείγμα η οποία υπολογίζεται ως εξής:

20ml του διαλύματος των χλωροπλαστών αναμιγνύεται με 80ml ακετόνη όπου προστίθενται 2ml ακετόνης 80%. Το μείγμα αναδεύεται έντονα ώστε να σπάσουν οι χλωροπλάστες και να εκχυλιστεί η χλωροφύλλη. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 13000rpm για 10min και συλλέγεται

το διαυγές υπερκείμενο το οποίο ακόλουθα φωτομετράται στα 645nm και στα 663nm. Καταγράφονται οι δύο τιμές και η συγκέντρωση της χλωροφύλλης υπολογίζεται με βάση τον τύπο του Jagendorff, 1982 :

$$[(A_{645} \times 202) + (A_{663} \times 80.2)] \times 10.5 = \mu\text{g chlorophyll} / \text{ml}$$

4. Επεξεργασία, ανάλυση πρωτεϊνών

4.1 Εκχύλιση πρωτεϊνών από φυτικούς ιστούς

Συλλέγονται φυτικοί ιστοί, ξεπλένονται με νερό, στεγνώνονται με απορροφητικό χαρτί και καταψύχονται με υγρό N₂, με το οποίο και ομογενοποιούνται σε γουδί. Η σκόνη που προκύπτει ζυγίζεται και διασπείρεται σε 4-5ml διαλύματος/gr ιστού για εκχύλιση πρωτεϊνών (100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 3 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.5 mM, 10 μM Leupeptin, 10 μM Aprotinin, 10 μM Pepstatin 10% glycerol, 1% polyvinylpyrrolidone PVP, and some crystals phenyl-thio-carbamide PTC). Το μείγμα αναδεύεται έντονα, επωάζεται στον πάγο για 30min και φυγοκεντρείται στις 13000rpm, 20min, 4°C. Το διήθημα μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο, και, αν απαιτείται, φυγοκεντρείται ξανά. Το εκχύλισμα καταψύχεται με υγρό N₂, και φυλάσσεται στους -80°C.

Ειδικά για το φρούτο της ντομάτας που είναι πάρα πολύ όξινο, το παραπάνω διάλυμα τροποποιείται ως προς την συγκέντρωση του Tris από 100mM σε 500. Φρούτο συλλέχθηκε σε τρία στάδια ανάπτυξης: μόλις σχηματίσθηκε, λίγο πριν ωριμάσει (πράσινο) και ώριμο (κόκκινο).

Πρωτεϊνικό εκχύλισμα από σπόρια παρασκευάστηκε σε τρία στάδια του κύκλου ζωής τους: ανώριμα, τα οποία συλλέχθηκαν από ανώριμο φρούτο και ώριμα (ξηρά). Επίσης, σπόρια επεξεργάστηκαν με 0.1mM HCl για 2 ώρες, ξεπλύθηκαν με νερό για περίπου 16 ώρες και αφέθηκαν να φυτρώσουν ώστε να ελεγχθεί η παρουσία της πρωτεΐνης στα βλαστώντα σπόρια. Το εκχύλισμα έγινε αφού αφαιρέθηκε το φυτάριο και μόλις αυτό εμφανίστηκε.

Η συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης στο εκχύλισμα προσδιορίζεται με τις μεθόδους Bradford και Lowry (παρακάτω), καθώς και με ανάλυση των δειγμάτων σε πηκτώματα ακρυλαμίδης και μετέπειτα χρώση του πηκτώματος με χρωστική Coomassie.

4.2 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνών σε διαλύματα

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνικών διαλυμάτων έγινε με την μέθοδο Bradford. Το αντιδραστήριο Bradford παρασκευάζεται με ανάμιξη 65mg χρωστικής Coomassie brilliant blue G (G-250) διαλυμένα σε 50ml 95% αιθανόλης με 100 ml φωσφορικού οξέος 85% w/v. Παρασκευάζεται τυφλό διάλυμα με το διάλυμα εκχύλισης των πρωτεϊνών.

Αναμιγνύονται 780μl του αντιδραστηρίου Bradford με 20μl δείγματος (διαλύματος πρωτεϊνών) και μετράται η απορρόφηση του δείγματος σε 595nm. Από την τιμή απορρόφησης του δείγματος αφαιρείται η τιμή απορρόφησης του τυφλού. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης υπολογίζεται με βάση πρότυπη καμπύλη απορρόφησης διαλυμάτων BSA γνωστών συγκεντρώσεων.

4.3 Συμπύκνωση πρωτεϊνικών διαλυμάτων με τριχλωροξικό οξύ (TCA)

Σε διάλυμα πρωτεΐνης προστίθεται ποσότητα τριχλωροξικού οξέως (100% σε νερό), ώστε η τελική συγκέντρωση TCA να είναι 10%. Το μείγμα αφήνεται σε πάγο για 10-20 λεπτά και φυγοκεντρείται σε 14000rpm για 5 λεπτά. Το ίζημα των πρωτεϊνών εκπλένεται με H₂O τρεις φορές και επαναδιαλύεται σε κατάλληλο όγκο NaOH 0.1N.

4.5 Ανάλυση πρωτεϊνών σε πήκτωμα ακρυλαμίδης.

4.5.1 Αποδιατακτικά πηκτώματα ακρυλαμίδης

Οι πρωτεΐνες αναλύονται σε αποδιατακτικά πηκτώματα ακρυλαμίδης (SDS-PAGE) που παρασκευάζονται και πολυμερίζονται στην συσκευή για μικρο-πηκτώματα της BioRad. Σε όλες τις περιπτώσεις η ανάλυση γίνεται μέσα από ένα διπλό πήκτωμα : το «συσσωρευτικό» που στόχο έχει την συσσώρευση των πρωτεϊνών σε κοινό μέτωπο και το διαχωριστικό όπου γίνεται η ανάλυση των πρωτεϊνών κατά μέγεθος. Το πρώτο είναι το 1/5 του όγκου του δεύτερου.

Το συσσωρευτικό είναι κοινό για όλες τις ηλεκτροφορήσεις : (για 13ml πηκτώματος :1.4ml Acrylamide 30% (29AA-0.75Bis), 1.5ml Tris-HCl pH=6.8, 60μl 20%SDS, 9.47 H₂O, 110μl 10% APS, 11 μl TEMED).

Το διαχωριστικό πήκτωμα ποικίλει σε συγκέντρωση ακρυλαμίδης ανάλογα με το μέγεθος της πρωτεΐνης που μελετάται κάθε φορά. Συνήθως είναι 10%, 12%, και 14%, με το τελευταίο να είναι σε θέση να διαχωρίσει πρωτεΐνες μέχρι και 14kDa. Για μικρότερες πρωτεΐνες τα δείγματα αναλύονται σε πηκτώματα ακρυλαμίδης -τρισίνης (παρακάτω). (Για 30ml πηκτώματος :10ml, 12ml, 14ml ακρυλαμίδης30% (29AA-0.75Bis), -ανάλογα με την

επιθυμητή πυκνότητα- 11.25ml Tris-HCl pH=8.8, 150μl 20%SDS, 8.3ml-6.3, 4.3- H₂O, 300μl 10% APS, 12 μl TEMED.

Τα δείγματα αναμιγνύονται σε αναλογία 1:1 με διάλυμα «φορτώματος»(2xSDS loading buffer : 100mM Tris-HCl pH=6.8, 200mM DTT, 4%SDS, 1%Bromophenol blue, 20%Glycerol), βράζονται για 5min, και αφήνονται σε πάγο μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε διάλυμα Towbin : 25 mM Tris, 200 mM glycine, 1%SDS, με σταθερή τάση 80V για το συσσωρευτικό και 150V για το διαχωριστικό.

4.5.2 Αποδιατακτικά Πηκτώματα Τρισίνης για πρωτείνες <10kDa

Για πολύ μικρές πρωτείνες, χρησιμοποιείται η μεσαία συσκευή της Biorad (midigel) και παρασκευάζονται τρεις ζώνες πηκτώματος :

A) το συσσωρευτικό (stacking gel) (για 13ml πηκτώματος) 1ml acrylamide (48AA-1.5Bis), 3,1ml gel buffer(3M Tris-HCl pH=8.45, 0.3%SDS), 8.4ml H₂O.

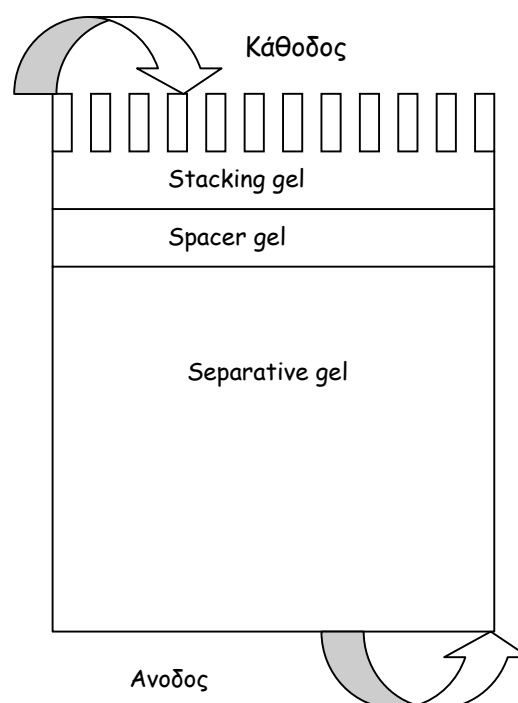
B) το ενδιάμεσο (spacer gel) : (για 30ml πηκτώματος 6.1ml acrylamide (48AA-1.5Bis), 10ml gel buffer(3M Tris-HCl pH=8.45, 0.3%SDS), 13.9ml H₂O

Γ) το διαχωριστικό (separative gel) : (για 30ml πηκτώματος 6.1ml acrylamide (48AA-1.5Bis), 10ml gel buffer(3M Tris-HCl pH=8.45, 0.3%SDS), 9.9ml H₂O, 4g glycerol.

Και στις τρεις περιπτώσεις τα πηκτώματα πολυμερίζονται με APS/TEMED.

Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιούνται δύο διαφορετικά διαλύματα:

1. Διάλυμα ανόδου :200mM Tris-HCl pH=8.9
2. Διάλυμα καθόδου : (100mM Trizma base, 100mM tricine(tris-hydroxymethyl-amino-glycine), 0.1%SDS), pH=8.25.



4.5.3 Επεξεργασία των πηκτωμάτων

Μετά την ηλεκτροφόρηση τα πηκτώματα επεξεργάζονται με τρεις διαφορετικούς τρόπους ανάλογα με την συνέχεια του πειράματος :

A) Χρώση με Coomassie:

Το πήκτωμα εμβαπτίζεται σε διάλυμα με 45% μεθανόλη, 10% οξικό οξύ, και 0.25% Coomassie Brilliant Blue, υπό ανακίνηση για 10min-1h. Μετά εμβαπτίζεται σε διάλυμα 15% μεθανόλη (ή αιθανόλη), 10% οξικό οξύ, υπό συνεχή ανακίνηση μέχρι να φαίνονται ικανοποιητικά οι ζώνες των πρωτεϊνών.

Β) Στέγνωμα και έκθεση

Το πήκτωμα στεγνώνεται σε αντλία κενού με θέρμανση και εκτίθεται ή απλά φυλάσσεται.

Γ) ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη.

Γίνεται ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Protan Nitrocellulose, Schleicher & Schuell) σε 25 mM Tris, 200 mM glycine, 20% methanol με σταθερό ρεύμα 100mA και τάση περίπου 30 V στους 4°C για 16h στη συσκευή TransBlot της (BioRad).

4.6 Προσδιορισμός πρωτεϊνών με αντίσωμα (western)

Σε αυτή την μελέτη χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα που αναγνωρίζουν την φυτική πρωτεΐνη LeMA-1, και χρησιμοποιούνται για ανίχνευση είτε του ενδογενούς παραγόμενου προϊόντος είτε των ελλειπτικών μεταλλαγμάτων της πρωτεΐνης που εκφράζονται μέσω του PVX σε φυτά, καθώς και αντίσωμα που αναγνωρίζει την καψιδιακή πρωτεΐνη του PVX και χρησιμοποιείται για πιστοποίηση της μόλυνσης των φυτών που αναλύονται.

4.6.1 Αναλύσεις της πρωτεΐνης LeMA-1.

Εκχύλισμα πρωτεϊνών από φυτικούς ιστούς μετά από κατάλληλη επεξεργασία αναλύεται σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης και στη συνέχεια οι πρωτεΐνες μεταφέρονται με ηλεκτροφόρηση σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης. Οι μεμβράνες αυτές εμβαπτίζονται σε διάλυμα TBS +3%BSA(50mM Tris-HCl pH=7.5, 150mM NaCl) υπο ανακίνηση για 1h σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να επικαλυφθούν με πρωτεΐνη (BSA) περιοχές της μεμβράνης που δεν καλύπτονται από τις πρωτεΐνες που μεταφέρθηκαν κατά την ηλεκτροφόρηση. Κατόπιν οι μεμβράνες πλένονται 3x5min με TBS +0.3%BSA και εμβαπτίζονται σε κατάλληλη αραιώση του αντισώματος σε TBS +0.3%BSA, (για το anti-LeMA-1, σε αραιώση 1:8000), και επωάζονται υπό ανακίνηση για 1h σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από 3 5λεπτα πλυσίματα με TBS-BSA, οι μεμβράνες εμβαπτίζονται σε κατάλληλη αραιώση του αντι-αντισώματος το οποίο φέρει το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση (anti-rabbit IgG alkaline phosphatase-conjugate (Promega)), σε αραιώση 1:20000 σε TBS-BSA, και επωάζονται υπό ανακίνηση για 1h σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν 5 5λεπτα πλυσίματα με TBS-BSA, μετά τα οποία οι μεμβράνες πλένονται σύντομα στο διάλυμα

στο οποίο θα ακολουθήσει χρώση της μεμβράνης (Alkaline phosphatase buffer : 100mM NaCl, 5mM MgCl₂, 100mM Tris-HCL pH=8.8). Τέλος οι μεμβράνες εμβαπτίζονται σε διάλυμα αλκαλικής φωσφατάσης που περιέχει τα υποστρώματα του ενζύμου για την χρωμογόνο αντίδραση : 66μl NBT, 33μl BCIP/10ml διαλύματος (Promega), μέχρις ότου εμφανιστεί το/τα σήμα. Η αντίδραση σταματά με εμβάπτισμα της μεμβράνης με νερό. Οι μεμβράνες στεγνώνονται στον αέρα και αποθηκεύονται σε σκοτάδι.

4.6.2 Αναλύσεις της καψιδιακής πρωτεΐνης του PVX

Η μέθοδος είναι η ίδια μόνο που αντί της BSA εδώ χρησιμοποιείται άπαχο γάλα σε σκόνη (Regilait) σαν παράγοντας επικάλυψης της μεμβράνης και όλα τα βήματα, αραιώσεις, και πλυσίματα γίνονται σε TBS+5%Γάλα.

Το αντι-PVX αντίσωμα χρησιμοποιείται σε αραιώση 1:10000.

5 Επεξεργασία ανάλυση νουκλεϊκών οξέων

5.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA.

5.1.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (από 1-6μg DNA)

5.1.1.1 Αλκαλική λύση για 1-1.5μg DNA (Sambrook *et al.*, 1989)

1.5ml υγρής καλλιέργειας LB μολύνεται με βακτήρια που περιέχουν το επιθυμητό πλασμίδιο, προστίθενται τα κατάλληλα αντιβιοτικά και επωάζεται O/N σε 37°C, υπο έντονη ανακίνηση. Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 14000rpm, 2min, 4 °C, και απομακρύνεται τελείως το υπερκείμενο. Τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 100μl διαλύματος I (Solution I) (I (25 mM Tris-HCl, pH 8, 10 mM EDTA, pH 8, and 150 mM glucose) και επωάζονται στον πάγο για 5min. Κατόπιν προσθέτουμε 200μl διαλύματος II (Solution II), (0.2 N NaOH, 1% SDS), το οποίο παρασκευάζεται πάντα πριν τη χρήση, αναμιγνύεται καλά και επωάζεται στον πάγο 30min όπου λύνονται τα βακτήρια και απελευθερώνονται τα πλασμίδια. Κατόπιν προστίθενται 150μl διαλύματος III (Solution III) (3M potassium acetate pH 5.2), αναμιγνύονται καλά και επωάζονται στον πάγο για 30min όπου καθιζάνουν το χρωμοσωμικό υλικό και τα υπολείμματα μεμβρανών. Το μείγμα φυγοκεντρείται σε 13000rpm, 10min, 4°C, και συλλέγεται το υπερκείμενο. Ακολουθεί εκχύλιση με φαινόλη, φαινόλη-χλωροφόρμιο, χλωροφόρμιο (το χλωροφόρμιο :1:24 χλωρ.:ισοαμυλική αλκοόλη). Τέλος προστίθεται 0.5-1 όγκος ισοπροπανόλης και το μείγμα φυγοκεντρείται για 30min σε 13000rpm, 4°C, όπου καθιζάνει το πλασμιδιακό DNA. Το ίζημα εκπλένεται με παγωμένη 70% αιθανόλη και φυγοκέντρηση για 10min σε 13000rpm, 4°C.

Απομακρύνεται τελείως το υπερκείμενο και τα ίζηματα στεγνώνονται υπό κενό. Τέλος επαναδιαλύουμε σε 30-50μl TE (10mM Tris-HCl pH=8.0, 1mM EDTA pH=8.0). Η ποιότητα του DNA ελέγχεται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτώματα αгарόζης και χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο.

5.1.1.2. Λύση με βρασμό για 5-10μg DNA

10ml υγρής καλλιέργειας LB μολύνεται με βακτήρια που περιέχουν το επιθυμητό πλασμίδιο, προστίθενται τα κατάλληλα αντιβιοτικά και επωάζεται O/N σε 37°C, υπο έντονη ανακίνηση. Τα 6ml κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 14000rpm, 2min, 4 °C, και απομακρύνεται τελείως το υπερκείμενο. Τα κύτταρα διασπείρονται σε 750μl διάλυμα TM(10mM Tris-HCl pH=8.0, 10mM MgCl₂) και συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 14000rpm, 1min, 4 °C, απομακρύνεται τελείως το υπερκείμενο και προστίθενται 75μl διαλύματος 1(S 1) (8% sucrose, 50mM EDTA, 50mM Tris-HCl pH= 8.0), στο οποίο έχει προστεθεί 2mg/ml λυσοζύμη. Το μείγμα επωάζεται για 5min υπο έντονη ανάδευση (shaker) στους 4 °C. Κατόπιν προσθέτουμε 75μl διαλύματος 2(S 2) (8% sucrose, 50mM EDTA, 50mM Tris-HCl pH=8.0, 10% TritonX 100), και το μείγμα βράζεται για ακριβώς 45sec και μεταφέρεται σε πάγο για λίγα λεπτά. Προσθέτουμε 750μl διαλύματος 3(S 3) (500mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH=8.0), ανακινείται ήπια και φυγοκεντρείται αμέσως για 15min στους 4 °C στις 14000rpm. Το διαυγές υπερκείμενο μεταφέρεται σε καθαρό σωληνάριο. Προσθέτουμε 700μl ισοπροπανόλη και φυγοκεντρούμε για 20min στους 4 °C στις 14000rpm. Απομακρύνεται τελείως το υπερκείμενο, και το ίζημα πλένεται με παγωμένη 70% αιθανόλη, φυγοκεντρείται για 10min στους 4 °C στις 14000rpm, και το ίζημα στεγνώνεται υπό κενό για λίγα λεπτά. Τέλος επαναδιαλύουμε σε 50-80μl H₂O ή TE.

Με την δεύτερη μέθοδο το DNA είναι καθαρότερο και περισσότερο όμως δεν συνιστάται για κάποια στελέχη με πολλούς πολυσακχαρίτες στην κάψα (όπως π.χ HB) γιατί μετά το βρασμό προκύπτει ζελατινώδες ίζημα και το DNA παραμένει εγκλωβισμένο εκεί.

5.1.2 Απομόνωση DNA για >100μg DNA (midi-prep)

Σε αυτή την μέθοδο το DNA καθαρίζεται από στήλη χημικής συγγένειας (Qiagen) και ακολουθείται η μέθοδος που προτείνεται από τον κατασκευαστή.

100ml υγρής καλλιέργειας LB μολύνεται με βακτήρια που περιέχουν το επιθυμητό πλασμίδιο, προστίθενται τα κατάλληλα αντιβιοτικά και επωάζεται O/N σε 37°C, υπό έντονη ανακίνηση. Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση για 10min στους 4 °C στις 3500rpm. Το ίζημα διασπείρεται σε 4ml διαλύματος P1 (50 mM Tris-HCl, pH 8, 10 mM EDTA and 100 μg/ml Rnase A) και επωάζονται στον πάγο για 5min. Στο διάλυμα προστίθεται 4ml διαλύματος P2 (200 mM NaOH, 1% SDS) το οποίο φτιάχνεται πάντα φρέσκο, και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για

τουλάχιστον 15min ώστε να γίνει λύση των κυττάρων. Μετά προστίθενται 4ml διαλύματος P3 (3M potassium acetate pH 5.2) ώστε να καθιζάνουν οι μεμβράνες και αμέσως φυγοκεντρούμε 30min στους 4 °C στις 11-14000rpm. Συλλέγουμε το διαυγές υπερκείμενο και αν είναι απαραίτητο επαναλαμβάνουμε την φυγοκέντρηση. Στο μεταξύ, κατάλληλη στήλη της Qiagen (tip-100) ενεργοποιείται με 3 ml διαλύματος QBT (750 mM NaCl, 50 mM MOPS, pH 7.0, 15% ethanol and 0.15% Triton X-100). Το διαυγές υπερκείμενο τοποθετείται στην στήλη και αφήνεται να περάσει με την βαρύτητα. Αφού περάσει το δείγμα, η στήλη πλένεται 2x 10 ml διαλύματος QC (1.0 M NaCl, 50 mM MOPS, pH 7.0, and 15% ethanol) που απομακρύνει πρωτεΐνες και κυρίως RNA από την στήλη. Κατόπιν γίνεται έκλουση του δεσμευμένου DNA με 5ml διαλύματος QF (1.25 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.5, and 15% ethanol). Προσθέτουμε 0.7 όγκους ισοπροπανόλη και φυγοκεντρούμε 30min στους 4 °C στις 13000rpm. Το ίζημα πλένεται με 10ml 70% αιθανόλη, φυγοκεντρείται 30min στους 4 °C στις 13000rpm, στεγνώνεται υπό κενό, και επαναδιαλύεται σε 100μl H₂O, ή TE. 1μl του τελικού διαλύματος ελέγχεται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης και χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο.

5.2 Πέψη με περιοριστικά ένζυμα

Οι πέψεις γίνονται σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα και σε όγκο πάντα μεγαλύτερο του δεκαπλάσιου του όγκου του ενζύμου που χρησιμοποιείται. Η επώαση γίνεται 1-2h ή ακόμα και O/N ανάλογα με τις ιδιότητες του ενζύμου.

Το αποτέλεσμα της πέψης αναλύεται σε πήκτωμα αγαρόζης συνήθως 1% και ηλεκτροφόρηση σε 0.5xTBE (50 mM Trisbase, 50mM boric acid and 1 mM EDTA, pH 8.3).

5.3 Διαχωρισμός Ν.Ο. σε πήκτωμα αγαρόζης

5.3.1 Διαχωρισμός τμημάτων DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.

Απομονωμένα πλασμίδια, τα προϊόντα της πέψης και τα προϊόντα της PCR ελέγχονται με διαχωρισμό σε πηκτώματα αγαρόζης 1-1,5% και ηλεκτροφόρηση σε 0.5xTBE (50 mM Trisbase, 50mM boric acid and 1 mM EDTA, pH 8.3), το οποίο περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο με σταθερή τάση of 4.5 V/cm. Σαν δείκτης μοριακού βάρους χρησιμοποιείται λDNA μετά από πέψη με BstEII. Το αποτέλεσμα είναι ορατό κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία.

5.3.2 Διαχωρισμός RNA σε πήκτωμα αγαρόζης

5.3.2.1 Διαχωρισμός RNA σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα αγαρόζης

Μετά την απομόνωση RNA από ιστό, ή την in vitro σύνθεση RNA (transcription), το αποτέλεσμα ελέγχεται με ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα αγαρόζης 0.9% σε 0.5xTBE (50 mM Trisbase, 50mM boric acid and 1 mM EDTA, pH

8.3) με σταθερή τάση of 4.5 V/cm. Το πήκτωμα μετά την ηλεκτροφόρηση εμβαπτίζεται σε αραιό διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (5×10^{-4} mg/ml), το οποίο προσροφάται από τα Ν.Ο τα οποία γίνονται ορατά σε υπεριώδη ακτινοβολία. Σε αντίθεση με τα DNA πήκτωμα που το περιέχουν από την αρχή, εδώ το βρωμιούχο αιθίδιο προστίθεται μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης γιατί επηρεάζει την κινητικότητα των RNA μορίων κατά την ηλεκτροφόρηση (φαίνονται πιο μικρά απ' ότι είναι).

5.3.2.2 Διαχωρισμός RNA σε αποδιατακτικό πήκτωμα αγαρόζης.

Αυτή η ανάλυση γίνεται ώστε να διαχωριστούν RNA τμήματα με βάση το μέγεθος, οπότε είναι απαραίτητο να καταστραφούν οι δευτεροταγείς δομές, ειδικά αν πρόκειται να μεταφερθούν σε μεμβράνη και να ακολουθήσει προσδιορισμός με ραδιενεργό ανιχνευτή που προσκολλάται λόγω συμπληρωματικότητας των βάσεων σε συγκεκριμένα RNA (Northern).

Σε αυτή την περίπτωση παρασκευάζεται 1% πήκτωμα αγαρόζης το οποίο περιέχει κάποιο αποδιατακτικό παράγοντα, εδώ φορμαλδεΐδη. (1% αγαρόζη, 16% φορμαλδεΐδη σε 1xMOPS (για 10xMOPS 41.8g MOPS, 4.1g CH_3COONa , 3.3g EDTA, σε 800ml H_2O , διαλύουμε τα άλατα, προσθέτουμε 0.8ml DEPC και αποστειρώνουμε. Μετά την αποστείρωση προσθέτουμε το MOPS, το οποίο δεν αποστειρώνεται, διορθώνουμε το pH = 7.0, και συμπληρώνουμε τον όγκο στο 1lt με H_2O - DEPC.)) Τα δείγματα αναμιγνύονται 1:1 με διάλυμα «φορτώματος» RNA (2xMOPS, 50% formamide, 8% formaldehyde, 0.1% bromophenolblue) και επωάζονται στους 65°C για 5min, και αφήνονται στον πάγο μέχρι να φορτωθούν στο πήκτωμα. Το πήκτωμα ηλεκτροφορείται σε 1xMOPS, 16% φορμαλδεΐδη, με τάση 100V για 2-3h. Επειδή η ρυθμιστική ικανότητα του MOPS δεν είναι πολύ μεγάλη απαιτείται η παρακολούθηση του pH των πόλων και αν χρειαστεί τους αλλάζουμε 2-3 φορές κατά την ηλεκτροφόρηση. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα ξεπλένεται με H_2O - DEPC, ώστε να απομακρυνθεί η φορμαλδεΐδη (εμβαπτίζεται για λίγα λεπτά).

5.4 Διαχωρισμός Ν.Ο. σε πήκτωμα ακρυλαμίδης

5.4.1 Πήκτωμα ακρυλαμίδης για ανάλυση μικρών RNA (<50 βάσεις)

Συνολικό εκχύλισμα RNA από φυτικούς ιστούς κλασμάτνεται με LiCl 8M ώστε να εμπλουτιστεί σε μικρά RNA, περίπου 25 βάσεων, και το δείγμα αναλύεται με κάθετη ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακρυλαμίδης 12% (11.4% acrylamide/0.6% bisacrylamide), με 8M ουρία, σε 0.5mM TBE. (Tabler *et al.*, 1989). Τα δείγματα αναμιγνύονται 1:1 με με διάλυμα «φορτώματος» RNA (2xMOPS, 50% formamide, 8% formaldehyde, 0.1% bromophenolblue) και επωάζονται στους 65°C για 5min, και αφήνονται στον πάγο μέχρι να

φορτωθούν στο πήκτωμα. Πριν να φορτωθούν τα δείγματα αφήνεται να γίνει ηλεκτροφόρηση μέχρις ότου η θερμοκρασία του πηκτώματος φτάσει τους 45°C. Μετά την ηλεκτροφόρηση τα RNA μεταφέρονται σε μεμβράνη nylon (membrane (Nytran membrane, Schleicher & Schuell) με ηλεκτροφόρηση στα 40 mA και 4°C για 16h στην αντίστοιχη συσκευή για ηλεκτρομεταφορά (TransBlot apparatus).

5.5 Εκχύλιση τμημάτων DNA από πηκτώματα αгарόζης

Μετά από πέψη με περιοριστικά ένζυμα, ή μετά από (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)) απαιτείται ο καθαρισμός και η απομόνωση ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA από τα υπόλοιπα με τα οποία συνυπάρχει, συνήθως για να επακολουθήσει κλωνοποίηση του τμήματος αυτού σε κατάλληλο φορέα. Για να γίνει αυτό το δείγμα αναλύεται σε πήκτωμα αгарόζης κατάλληλης περιεκτικότητας (0.9% για 1000 βάσεις, 1.2-1.5% για <1000 βάσεις) ώστε να διαχωριστεί το επιθυμητό τμήμα από τα άλλα και να μπορεί να απομονωθεί . Μετά την ηλεκτροφόρηση επιλέγεται η ζώνη με βάση το μέγεθος του DNA (σε λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας) και κόβεται το τμήμα της αгарόζης που την περιέχει έτσι ώστε να περιέχει όσο το δυνατόν λιγότερη αгарόζη. Ο καθαρισμός του γίνεται είτε με ηλεκτροέκλυση, είτε με κατάλληλη ρητίνη από στήλη χημικής συγγένειας (GENECLEAN III kit).

5.5.1 Ηλεκτροέκλυση

Μετά την ανάλυση του DNA σε πήκτωμα αгарόζης, επιλέγεται η επιθυμητή ζώνη, πάνω σε λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας, κόβεται με νυστέρι και τοποθετείται μέσα σε μεμβράνη με όσο το δυνατόν λιγότερο αποστειρωμένο νερό, έτσι ώστε να καλύπτεται η αгарόζη αλλά να μην υπάρχουν φυσαλίδες αέρος. Κλείνεται με κατάλληλα μανταλάκια και ηλεκτροφορείται . Το DNA μεταφέρεται έξω από την μεμβράνη και η πορεία του παρακολουθείται με την μετακίνηση του βρωμιούχου αιθιδίου με υπεριώδη ακτινοβολία. Όταν έχει βγει όλο το DNA από την αгарόζη, αντιστρέφονται οι πόλοι και ακολουθεί αντίστροφα η ηλεκτροφόρηση για 20sec ώστε να απομακρυνθεί το DNA από την μεμβράνη. Συλλέγεται το νερό με το DNA, εκχυλίζεται (σε αναλογία 1:5) με φαινόλη , φαινόλη χλωροφόρμιο, και χλωροφόρμιο και κάθε φορά συλλέγεται η υδατική φάση. Τέλος προστίθεται 1/10 του όγκου CH₃COONa 3M, και 0.7 όγκοι ισοπροπανόλης. Το μείγμα αφήνεται σε πάγο για 20min και μετά φυγοκεντρείται για 30min σε 13000rpm, σε 4°C. το ίζημα ξεπλένεται με 70% αιθανόλη και επαναδιαλύεται σε κατάλληλη ποσότητα αποστειρωμένου νερού. Το ποσοστό ανάκτησης του DNA ελέγχεται με ανάλυση 1μl του τελικού προϊόντος σε πήκτωμα αгарόζης.

5.5.2 Με στήλη χημικής συγγένειας (GENECLEAN III kit)

Εδώ, για την απομόνωση του DNA χρησιμοποιείται το πακέτο GENECLEAN III kit και ακολουθούνται οι οδηγίες του κατασκευαστή. Το τμήμα της αγαρόζης που περιέχει το DNA ζυγίζεται και τοποθετείται σε σωληνάριο των 1.5ml. Επειδή η ηλεκτροφόρηση γίνεται με TBE, απαιτείται διόρθωση των αλάτων, η οποία γίνεται με προσθήκη 4.5 όγκων (4.5x το βάρος της ζώνης) TBE Modifier και 4.5 όγκων NaI (από το kit) και το μείγμα επωάζεται σε 50°C για 10 min, στη διάρκεια των οποίων λιώνει η αγαρόζη, και απαιτείται ανάδευση με αναστροφή του σωληναρίου 2-3 φορές για να διευκολυνθεί η διάλυση της αγαρόζης στο διαλυμα. Αφού διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη, προστίθενται στο μείγμα 5ml EZ-GLASSMILK (ρητίνης) (ποσότητα που εξαρτάται από την ποσότητα του DNA που απομονώνουμε), και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5min, όπου γίνεται η πρόσδεση του DNA στα σφαιρίδια της ρητίνης. Τα σφαιρίδια συλλέγονται με φυγοκέντρηση, 13000rpm, 5sec, και το υπερκείμενο απομακρύνεται πλήρως. Τα σφαιρίδια επαναδιασπείρονται σε 0.3 ml NEW Wash buffer και επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρηση. Αυτή η έκπλυση επαναλαμβάνεται 3 φορές. Τέλος το DNA εκλούεται από την ρητίνη με 50μl TE (10mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA), φυγοκέντρηση 13000rpm, 5sec, και συλλογή του υπερκείμενου (που περιέχει τώρα το DNA) σε νέο σωληνάριο.

Το ποσοστό ανάκτησης του DNA ελέγχεται με ανάλυση 1μl του τελικού προϊόντος σε πήκτωμα αγαρόζης.

5.6 Εκχύλιση RNA από φυτικούς ιστούς

Η απομόνωση RNA από φυτικούς ιστούς ακολουθεί την μέθοδο που περιγράφεται από τους Tabler et al., 1989 και έχει ως εξής: Συλλέγονται 0.2-1gr φυτικός ιστός (φύλλα και ρίζες) πλένονται με νερό, στεγνώνονται και καταψύχονται με υγρό N₂. Ομογενοποιούνται με υγρό N₂ σε γουδί ή σε σωληνάριο, και η σκόνη ζυγίζεται. Στην παγωμένη σκόνη προστίθενται 10ml TEMS (100mM Tris pH 7.5, 100mM sodium chloride, 10mM EDTA, pH 8.0, and 10 mM β-mercaptoethanol) και 7ml φαινόλης (1kg φαινόλη λιώνει σε 65°C και εκχυλίζεται με 0.1M Tris-HCl pH 8.0 2-3 φορές μέχρι να διορθωθεί το pH της φαινόλης, και μετά προστίθενται 300 ml TEMS buffer, 1 g 8-hydroxyquinoline) /gr παγωμένης σκόνης. Το μείγμα αναδεύεται έντονα μέχρι να ξεπαγώσει και να αναμειχθεί πλήρως η σκόνη με το μείγμα TEMS-φαινόλη, και φυγοκεντρείται σε 13000rpm, 4°C, 10min, συλλέγεται η υδατική φάση και εκχυλίζεται διαδοχικά με 1:0.5v/v με φαινόλη, φαινόλη χλωροφόρμιο (1:24 CH₃Cl : ισοαμλική αλκοόλη), χλωροφόρμιο. Πάντα προσέχουμε να μην «ενοχλήσουμε» την μεσόφαση, η οποία περιέχει αποδιαταγμένες πρωτεΐνες και υπολείμματα κυττάρων. Στην τελική υδατική φάση προστίθεται 1/10 του όγκου CH₃COONa 3M και 2.5 όγκοι αιθανόλης. Το μείγμα επωάζεται στους -20°C για 30λεπτά και

φυγοκεντρείται σε 13000rpm, 4°C, 30min. Το ίζημα περιέχει το RNA, πλένεται με 70% παγωμένη αιθανόλη, επαναφυγοκεντρείται στις ίδιες συνθήκες, απομακρύνεται το υπερκείμενο, και αφήνεται λίγα λεπτά σε πάγο να στεγνώσει. Τελικά επαναδιαλύεται σε κατάλληλο όγκο (50-100μl)ΤΕ. Η ποσότητα και η ποιότητα του RNA ελέγχεται με ηλεκτροφόρηση 5μl του τελικού διαλύματος σε πήκτωμα αγαρόζης 1%, χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο και υπεριώδες φως. Από 0.2gr φύλλων απομονώνονται 50-100μg RNA.

5.7 Κλασμάτωση RNA με χλωριούχο λίθιο (LiCl).

Για την ανάλυση μικρών κομματιών RNA σε φυτικούς ιστούς απαιτείται εμπλουτισμός του δείγματος σε μικρά RNA <50βάσεις και απομάκρυνση των μεγάλων. Αυτό γίνεται με κλασμάτωση του συνολικού εκχυλίσματος του RNA με χλωριούχο λίθιο 8M (κορεσμένο).

Εδώ, απαιτείται πολύ μεγαλύτερη ποσότητα RNA και άρα ιστού. Για την απομόνωση ακολουθούμε την παραπάνω μέθοδο, μόνο που ξεκινάμε με 2-10gr φυτικού ιστού. Μετά την απομόνωση και την κατακρήμιση του RNA, το ίζημα επαναδιαλύεται όχι σε ΤΕ αλλά σε 1ml χλωριούχο λίθιο 8M και αφήνεται υπο ανάδευση για 24h σε 4°C ώστε να διαχυθούν τα μικρά RNA στο διάλυμα ενώ τα μεγάλα παραμένουν στο ίζημα. Το μείγμα φυγοκεντρείται στα 3500rpm, για 45 λεπτά, συλλέγεται το υπερκείμενο με τα μικρά RNA και φυλάσσεται σε -20°C, ενώ στο ίζημα προστίθεται άλλο σε 1ml χλωριούχο λίθιο 8M και αφήνεται υπο ανάδευση για 24h σε 4°C. Επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρωση και συλλέγεται και το δεύτερο υπερκείμενο, αναμιγνύεται με το προηγούμενο και ακολουθεί κατακρήμιση του RNA με 2.5 όγκους αιθανόλης. Το ίζημα που προκύπτει συλλέγεται με φυγοκέντρωση στις 13000rpm, 4°C, πλένεται με παγωμένη αιθανόλη 70%, αφήνεται να στεγνώσει στον αέρα, και επαναδιαλύεται σε 50-100μl H₂O-DEPC.

5.8 Ανασυνδυασμός τμημάτων DNA (cloning)

Ο ανασυνδυασμός του DNA γίνεται όπως περιγράφεται από τους Sambrook *et al.* 1989. Επιλέγεται η στρατηγική και τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα. Ο πλασμιδιακός φορέας πέπτεται και πάντα απομονώνεται από πήκτωμα αγαρόζης πριν την αντίδραση συγκόλλησης στο ξένο DNA. Συνήθως επιλέγονται δύο διαφορετικά περιοριστικά ένζυμα έτσι ώστε φορέας και ένθεση να φέρουν δύο διαφορετικά άκρα και να γίνεται η συγκόλληση κατευθυνόμενα, και τελικά τα μόνα πλασμίδια να είναι αυτά που προκύπτουν από την συγκόλληση φορέα-ένθεσης. Αν η πέψη γίνεται με ένα ένζυμο, οπότε ο φορέας φέρει συμπληρωματικά άκρα, ή τυφλα άκρα, τότε γίνεται επεξεργασία του φορέα με αλκαλική

φωσφατάση (CIP)) (New England Biolabs; 10 units/μl), η οποία απομακρύνει την τελική ομάδα φωσφορικού από το 5' άκρο του DNA και αποτρέπει έτσι την αυτοσυγκόλληση του φορέα. Ο φορέας επεξεργάζεται με 1u CIP, στο ρυθμιστικό διάλυμα που έγινε η πέψη, για 1h στους 37°C, το ένζυμο αδρανοποιείται θερμικά για 10 min στους 65°C και ο φορέας καθαρίζεται από πήκτωμα αгарόζης. Όταν για τον ανασυνδυασμό επιλέγονται περιοριστικά ένζυμα με θέση κοπής 5' προεξέχοντα, ασύμβατα μεταξύ τους, (του φορέα και της ένθεσης) τότε γίνεται επεξεργασία των άκρων με DNA πολυμεράση την υπομονάδα Klenow η οποία προσθέτει νουκλεοτίδια και μετατρέπει το προεξέχον άκρο σε τυφλό, το οποίο είναι πλέον συμβατό με όποιο τυφλό άκρο. Η αντίδραση γίνεται με επώαση του DNA με 1u Klenow (New England Biolabs; 10 units/μl), 1mM dNTPs, στο ρυθμιστικό διάλυμα της πέψης, για 10min σε θερμοκρασία δωματίου, θερμική αδρανοποίηση του ενζύμου για 10 min στους 65°C, και απομόνωση του DNA από πήκτωμα αгарόζης.

Η αντίδραση της συγκόλλησης γίνεται με επώαση των τμημάτων φορέα και ένθεσης με 1u T4 DNA λιγάσης (New England Biolabs; 1 unit/μl) σε θερμοκρασία και χρόνο που εξαρτάται από την φύση των άκρων που πρόκειται να συγκολληθούν : για προεξέχοντα 16-20°C, 2-4h, για τυφλά 4-16 °C από 4h-O/N. Η αντίδραση γίνεται σε ρυθμιστικό διάλυμα προτεινόμενο από τον κατασκευαστή του ενζύμου (T4 DNA ligase buffer, New England Biolabs) Η λιγάση συγκολλά προεξέχοντα συμβατά άκρα, ή τυφλά δίκλινα άκρα και διορθώνει κοψίματα στον ένα πλο τους δύο κλώνους (nicks) δίκλωνου DNA που διαθέτει 3' υδροξύλι και 5' φωσφορικές ομάδες. Η αναλογίες φορέα ένθεσης υπολογίζονται με βάση την αναλογία μεγέθους και την δυσκολία της συγκόλλησης, συνήθως σε μοριακή αναλογία 1:1 ή 1:2 φορέας:ένθεση .

Η συγκόλληση προϊόντων αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) γίνεται μετά από απομόνωση του προϊόντος από πήκτωμα αгарόζης και απευθείας συγκόλληση του DNA στον φορέα pGEM®-T Easy, (Promega), ο οποίος διαθέτει μια 3' προεξέχουσα θυμίνη η οποία είναι συμπληρωματική στην 5' προεξέχουσα αδενίνη που αφήνει η *Taq* DNA πολυμεράση κατά την σύνθεση του DNA, ενώ ταυτόχρονα δεν επιτρέπει την αυτοσυγκόλληση του φορέα. Τα PCR προϊόντα συγκολλώνονται με 50 ng pGEM®-T Easy με 3u T4 DNA Ligase (Promega) σε ρυθμιστικό διάλυμα : 30mM Tris-HCl, pH 7.8, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, σε θερμοκρασία δωματίου για 1h.

5.9 In vitro σύνθεση RNA μετάγραφων

Για την σύνθεση RNA μετάγραφων απαιτείται φορέας στον οποίο είναι κλωνοποιημένο το τμήμα του DNA που θα μεταγραφεί κάτω από τον έλεγχο υποκινητή κάποιας RNA πολυμεράσης. Στην εργασία αυτή μεταγραφές γίνονται από τους φορείς pBluescript KSII και SKII, με τις T3 και T7RNA πολυμεράσες ανάλογα με τις εκάστοτε ανάγκες του πειράματος.

5.9.1 Κρύα μεταγραφή

Κρύα μεταγραφή απαιτείται για την παρασκευή μεταγράφου το οποίο θα μεταφραστεί σε πρωτεΐνη in vitro, η οποία είναι πιο αποδοτική αν το μετάγραφο που χρησιμοποιείται αρχίζει με capped γουανιδίνη. Για παρασκευή ικανής ποσότητας RNA απαιτούνται 2-5μg DNA. Σε όλες τις περιπτώσεις κατάλληλο πλασμίδιο επιλέγεται και υποβάλλεται σε πέψη με κατάλληλο περιοριστικό ένζυμο που καθορίζει και το μήκος του μετάγραφου. Μετά την πέψη γίνεται επεξεργασία με RNάση (1μl Rnase H 10mg/ml, 37°C, 15min) ώστε να απομακρυνθούν τυχόν RNA υπολείμματα από την απομόνωση του πλασμιδίου, τα οποία ενοχλούν την ακόλουθη μετάφραση. Το μείγμα επεξεργάζεται με Πρωτεϊνάση K (προσθέτουμε στην αντίδραση : 2μl 250mM EDTA pH=8.0, 1 μl 1M Tris-HCl pH=8.0, 5 μl 10%SDS και H₂O-DEPC σε τελικό όγκο 100 μl, 0.5 μl 50 μg/ml Πρωτεϊνάση K) ώστε να απομακρυνθεί η Rnάση, επωάζεται στους 50°C για 30 min, ακολουθεί θερμική αδρανοποίηση του ενζύμου για 10min στους 68°C και ακολουθεί καθαρισμός του DNA με διαδοχικές εκχυλίσεις με φαινόλη, φαινόλη-χλωροφόρμιο, χλωροφόρμιο, και τέλος κατακρήμνιση με 1/10 του τελικού όγκου της υδατικής φάσης οξικού νατρίου 3M και 2.5 όγκους αιθανόλης. Το κατακρημνισμένο DNA επαναδιαλύεται σε 5-10μl H₂O-DEPC, μετά απο δύο πλυσίματα με 70% αιθανόλη και φυγοκέντρηση στις 13000rpm, 4°C, 30min. Η ποσότητα του DNA επαναπροσδιορίζεται με ανάλυση 1μl του τελικού δείγματος σε πήκτωμα αγαρόζης.

2-5μg DNA χρησιμοποιείται για την μεταγραφή και ετοιμάζεται το ακόλουθο μείγμα αντίδρασης : 5μg DNA, 2.5 μl 10x polymerase buffer (New English Biolabs), 2.5μl A,C,U 10mM mix, 2.5μl GTP 1mM, 2.5μl cappedGTP 10mM, 1.3μl Rnase inhibitor 40u/l (human placenta ribonuclease inhibitor), H₂O to final volume 50μl, 1μl DNA dependent RNA polymerase 20u/l. Το μείγμα επωάζεται στους 37°C για 20min, μετά το τέλος των οποίων προστίθενται 2.5 μl GTP 10mM, και συνεχίζεται η επώαση στους 37°C για ακόμη 1h και 10min. Η ποσότητα και η ποιότητα του RNA ελέγχονται με ανάλυση του δείγματος σε πήκτωμα αγαρόζης 1% και χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο. Το μέγεθος ελέγχεται με χρήση δείκτη μοριακού βάρους DNA λ/BstEII.

5.9.2 Ραδιενεργός μεταγραφή

Ραδιενεργός μεταγραφή απαιτείται για την παρασκευή ραδιενεργών ανιχνευτών. Εδώ, απαιτούνται 1-2μg DNA πλασμιδίου το οποίο υποβάλλεται σε πέψη με κατάλληλο περιοριστικό ένζυμο που καθορίζει το μέγεθος του τελικού προϊόντος. Μετά την πέψη το DNA καθαρίζεται με εκχυλίσεις με φαινόλη και κατακρημνίζεται με αιθανόλη. Τελικά το ίζημα επαναδιαλύεται σε 5-10μl H₂O-DEPC. 1-2μg DNA προστίθενται στο ακόλουθο μείγμα αντίδρασης : 40 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM DTT, 6 mM MgCl₂, 500 μM από τα ATP, CTP, GTP και 5 μM UTP συν 1μl [α -³²P]UTP (specific activity 800Ci/mmol, Amersham), 20 units human placenta ribonuclease inhibitor, Rnasin, και 50 units of DNA dependent RNA πολυμεράση. Η αντίδραση γίνεται για 1.5h στους 37°C και τελικό όγκο 20 μl. Κατά την διάρκεια της αντίδρασης ετοιμάζεται στήλη καθαρισμού του RNA με μοριακό κόσκινο σεφαρόζης Biogel A 0.5 m (BioRad), το οποίο διαχωρίζει τα μη ενσωματωμένα νουκλεοτίδια. Για την στήλη χρησιμοποιείται πιπέτα Pasteur των 2.5ml στην οποία πακεττάρεται η σεφαρόζη με διάλυμα TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH, 8.0). Μετά το τέλος της αντίδρασης στα 20μl αντίδρασης προστίθενται 80 μl TE, και εκχυλίζονται με 80 μl φαινόλης. Μετά από φυγοκέντρηση σε 13000rpm, για 2min, συλλέγεται η υδατική φάση και τοποθετείται στην κορυφή της στήλης που ετοιμάστηκε. Αφήνεται να περάσει το δείγμα και η στήλη πλένεται με 600μl TE τα οποία συλλέγονται σε σωληνάριο. Ακολουθεί έκπλυση της στήλης με 10x 100μl TE καθένα από τα οποία συλλέγεται σε άλλο σωληνάριο σαν δέκα διαφορετικά κλάσματα (2-10). Ανάλογα με το μέγεθος, το μετάγραφο εκλύεται από την στήλη στα κλάσματα 2-5, ενώ τα αδέσμευτα νουκλεοτίδια εκλύονται στα κλάσματα 5-10. Οσο μικρότερα είναι τα μόρια που περνάνε από την στήλη τόσο περισσότερο όγκο απαιτούν για να βγούν από αυτήν. Συλλέγονται τα κατάλληλα κλάσματα και μετρώνται οι κρούσεις/λεπτό/μl. Η ακεραιότητα και η ποσότητα του μετάγραφου ελέγχεται με ανάλυση σε πήκτωμα ακρυλαμίδης 5% με ουρία.

Ο ανιχνευτής της καψιδιακής πρωτεΐνης του PVX παρασκευάζεται με *in vitro* μεταγραφή από το πλασμίδιο BSX μετά από πέψη με το περιοριστικό ένζυμο NheI και την RNA πολυμεράση T7.

Ο ανιχνευτής της LeMA-1 (ολόκληρη η κωδική περιοχή), παρασκευάζεται με *in vitro* μεταγραφή από το πλασμίδιο m10a μετά από πέψη με το περιοριστικό ένζυμο EagI και την RNA πολυμεράση T7.

Ο ανιχνευτής για την 5' περιοχή της LeMA-1 παρασκευάζεται με *in vitro* μεταγραφή από το πλασμίδιο BS-Rsa μετά από πέψη με το περιοριστικό ένζυμο EagI και την RNA πολυμεράση T3.

Ο ανιχνευτής για την 3' περιοχή της LeMA-1 παρασκευάζεται με *in vitro* μεταγραφή από το πλασμίδιο BS-Hra μετά από πέψη με το περιοριστικό ένζυμο MscI και την RNA πολυμεράση T3

5.10 Μεταφορά RNA σε μεμβράνες και προσδιορισμός με ραδιοσημασμένο ανιχνευτή (Northern blot)

5.10.1 Μεταφορά RNA σε μεμβράνη

Μετά την απομόνωση RNA από ιστούς ακολουθεί ανάλυση των δειγμάτων με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης με φορμαλδεύδη. Μετά τον διαχωρισμό στο πήκτωμα τα RNA μεταφέρονται σε nylon μεμβράνες (Nytran membrane, Schleicher & Schuell) ώστε να ακολουθήσει ανίχνευση των ειδικών RNA με ραδιενεργούς ανιχνευτές. Η διαδικασία γίνεται με βάση την αντίστοιχη των Sambrook *et al.* (1989). Για την μεταφορά χρησιμοποιείται γυάλινο σκεύος (pyrex) πάνω στο οποίο τοποθετείται γυάλινη πλάκα σαν γέφυρα. Το σκεύος γεμίζεται με 2xSSC (για 1lt 20xSSC 175.3gr NaCl, 88.2gr Na-citrate). Πάνω στην γυάλινη πλάκα τοποθετούνται τρία φύλλα χαρτιού Whatman 3MM (Kontron, Heidelberg, Germany) σαν γέφυρα, έτσι ώστε περνώντας πάνω από την γυάλινη πλάκα να ακουμπούν στο υγρό από κάτω. Τα φύλλα αυτά έχουν σαν σκοπό την μεταφορά του διαλύματος από το δοχείο στο πήκτωμα το οποίο τοποθετείται πάνω στις γέφυρες. Το πήκτωμα επικαλύπτεται πλήρως με μεμβράνη (Nytran membrane, Schleicher & Schuell) κομμένη ακριβώς στο μέγεθος του πηκτώματος και καλύπτεται με τρία φύλλα χαρτιού Whatman, επίσης κομμένα ακριβώς στο μέγεθος του πηκτώματος. Εδώ προσέχουμε να μην εγκλωβιστούν φυσαλίδες αέρα ανάμεσα στο πήκτωμα και την μεμβράνη γιατί δεν θα γίνει μεταφορά στα σημεία αυτά. Ο αέρας εκδιώχνεται με κύλιση γυάλινης ράβδου πάνω από κάθε επιφάνεια που προσθέτουμε. Με πλαστική μεμβράνη (Saran Wrap (Down Chemical Company, Midland, USA)) καλύπτονται τα περιθώρια του πηκτώματος πάνω στην πλάκα έτσι ώστε η μόνη διόδος του διαλύματος από το δοχείο προς τα πάνω να είναι μόνο δια μέσου του πηκτώματος. Πάνω από το πήκτωμα προσθέτουμε αρκετά φύλλα απορροφητικού χαρτιού και κάποιο βαρύ αντικείμενο (συνήθως χρησιμοποιείται ο κατάλογος της SIGMA) για να διευκολυνθεί η μεταφορά. Με τον τρόπο αυτό και δια μέσου των τριχοειδών σωληναρίων του διηθητικού χαρτιού το 2xSSC μεταφέρεται από το δοχείο προς τα απορροφητικά χαρτιά συμπαρασύροντας και τα RNA από το πήκτωμα προς τα πάνω, τα οποία μπλοκάρονται και ακινητοποιούνται στην μεμβράνη. Η διαδικασία αυτή

αφήνεται να γίνει για περίπου 16h. Μετά το τέλος της μεταφοράς τα RNA μονιμοποιούνται πάνω στην μεμβράνη με έκθεση της μεμβράνης σε υπεριώδη ακτινοβολία σε κατάλληλη συσκευή (Stratalinker UV crosslinker ,Stratagene, La Jolla, USA). Με την υπεριώδη ακτινοβολία σχηματίζονται ομοιοπολικοί δεσμοί ανάμεσα στα νουκλεϊικά οξέα και τις ενεργές ομάδες της μεμβράνης ακινητοποιώντας τα μόρια όπου προσκολλήθηκαν. Η μεμβράνη αφήνεται να στεγνώσει στον αέρα και φυλάσσεται σε φάκελο από χαρτί Whatman μέχρι την χρήση της.

5.10.2 Ανίχνευση RNA με ραδιοσημασμένο ανιχνευτή.

Μετά την μεταφορά και την ακινητοποίηση του RNA, η μεμβράνη τοποθετείται σε 5ml διαλύματος υβριδοποίησης (50% Formamide, 5X SSC, 1% SDS, 250 µg/ml tRNA, 0.02% Ficoll, 0.02% Polyvinyl Pyrrolidone, 0.02% Bovine Serum Albumine) και επωάζεται για 2h υπο συνεχή περιστροφή σε κατάλληλους φούρνους υβριδοποίησης, σε θερμοκρασίες που επιλέγονται με βάση την ομολογία του ανιχνευτή προς τον στόχο, συνήθως 65°C. Μετά το τέλος της προυβριδοποίησης, προστίθεται κατάλληλη ποσότητα [α -³²P]-ραδιενεργού ανιχνευτή, αφού έχει αναμιχθεί σε αναλογία 1:1 με φορμαμίδη και θερμανθεί στους 95°C για 5min. Αφήνεται να γίνει υβριδοποίηση για τουλάχιστον 16h, στις ίδιες συνθήκες με την προ-υβριδοποίηση. Μετά το τέλος της υβριδοποίησης η περίσσεια του ανιχνευτή απομακρύνεται με 2x5min πλυσίματα με 2xSSC σε θερμοκρασία δωματίου, και ακολουθούν 2x30min πλυσίματα με 2xSSC, 0.5%SDS στη θερμοκρασία που έγινε η υβριδοποίηση, με στόχο την απομάκρυνση ανιχνευτή που έχει προσδεθεί μη εξειδικευμένα, και τέλος 2x30min πλυσίματα με 0.1xSSC σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά τα πλυσίματα η μεμβράνη αφήνεται να στεγνώσει στον αέρα και εκτίθεται με X-ray film στους -80°C με οθόνη ενίσχυσης του σήματος, συνήθως O/N.

5.11 Προσδιορισμός συγκεκριμένων RNA με RT-PCR

Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται για ανίχνευση και προσδιορισμό ειδικών RNA πληθυσμών σε ιστούς. Απομονώνεται RNA από ιστούς. Από το σύνολο των RNA μορίων που απομονώνονται επιλέγονται εκλεκτικά με κατάλληλους εναρκτές και με αντίστροφη μεταγραφή τα επιθυμητά RNA μόρια, τα οποία μετατρέπονται έτσι σε cDNA, που όμως για να γίνουν ορατά με κάποια μέθοδο πολλαπλασιάζονται με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και τους ίδιους ειδικούς εναρκτές. Το αποτέλεσμα της αντίδρασης είναι τμήμα DNA που στη συνέχεια μπορεί να απομονωθεί από πήκτωμα αγαρόζης, και να προσδιοριστεί η αλληλουχία του, ή απλά να δώσει απάντηση στο ερώτημα του πειράματος και μόνο με το μέγεθός του. Η μέθοδος ακολουθεί την διαδικασία που προτείνει ο

κατασκευαστής του αντίστοιχου πακέτου για RT-PCR (Gibco-BRL, Life technologies.) και είναι η ακόλουθη :

Απομονώνεται RNA από φυτικούς ιστούς όπως αναφέρεται παραπάνω, και 2μl από αυτά χρησιμοποιούνται για την σύνθεση του cDNA, στην παρακάτω αντίδραση: 2μl RNA αναμιγνύονται με 2.5μM εναρκτή, σε τελικό όγκο 10 μl και επωάζονται στους 65°C, για 5min, και μεταφέρονται σε πάγο. Σε 2 μl του παραπάνω μίγματος προστίθενται 10 μl αντίδρασης (4 μl 5x cDNA buffer, 1μl DTT 0.1M, 1 μl RNaseOUT, 1 μl H₂O-DEPC, 2 μl dNTPs 10mM, 1 μl Thermoscript, όλα από το πακέτο για RT-PCR) το μείγμα επωάζεται σε στους 50°C, για 60min και ακολουθα σε στους 85°C, για 5min, ώστε να αδρανοποιηθεί το ένζυμο. Προσθέτουμε 1 μl RnaseH (10mg/ml) και επωάζουμε στους 37°C, για 20min. Εδώ έχει ολοκληρωθεί η σύνθεση του cDNA. Τα δείγματα φυλάσσονται σε -20°C.

2μl της παραπάνω αντίδρασης χρησιμοποιούνται για πολλαπλασιασμό του DNA που συντέθηκε με PCR στην ακόλουθη αντίδραση :προσθέτουμε : 5 μl 10x PCR buffer, (GIBCO-BRL, 1x buffer 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM KCl), 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 2.5 μM εναρκτές (sense και antisense) και 1 unit *Taq* polimerase (GIBCO-BRL), σε τελική συγκέντρωση 50μl. Η αντίδραση γίνεται στο MJ PCT-150™ thermal controller με τα ακόλουθα βήματα : αποδιάταξη στους 94°C, 2min, επανασύνδεση στους 50 °C, για 30 κύκλους : αποδιάταξη 94°C, 30sec, επανασύνδεση 50 °C, 30sec, αντίδραση πολυμερισμού 72 °C, 2min, και ολοκλήρωση της αντίδρασης μετά τους 30 κύκλους στους 72 °C, 10min. Μετά το τέλος της αντίδρασης τα δείγματα ελέγχονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% και χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο. Στις αντιδράσεις αυτές χρησιμοποιήθηκαν οι εναρκτές: Fw: 5'ATTGCCGATCTCAAGCCAC3' νουκλ. :5593-5611 του pPVX202 και Rev: 5'TCCATACCACTGGAGCATAC3' νουκλ. 6124-6143.

5.12 Ραδιοσήμανση μάρτυρα μεγέθους.

Ο μάρτυρας μεγέθους που χρησιμοποιείται στις αυτοραδιογραφίες είναι DNA του φάγου λ το οποίο έχει επωαστεί με το περιοριστικό ένζυμο BstEII σε 60°C για 2ώρες. Το ένζυμο αυτό κόβει στην αλληλουχία: G↓ GTNAC↓C αφήνοντας στο 5' άκρο τα νουκλεοτίδια GTNAC. Ο μάρτυρας ραδιοσημαίνεται με την προσθήκη ραδιενεργών νουκλεοτιδίων (A, και C) με το ένζυμο Klenow. 1 μg DNA λBstEII επωάζεται σε συνολικό όγκο 10μl με 1μl α-ATP*, 1μl α-CTP*, 2.5μl dGTP 10mM, 2.5μl dTTP 10mM και 1μl Klenow για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Προστίθενται 90μl TE, εκχυλίζεται με φαινόλη, φυγοκεντρείται για 2 λεπτά, και το υδατικό υπερκείμενο αφήνεται να περάσει από μοριακό κόσκινο σεφαρόζης

Biogel A 0.5 m (BioRad), το οποίο διαχωρίζει τα μη ενσωματωμένα νουκλεοτίδια. Η διαδικασία είναι η ίδια με εκείνη διαχωρισμού των νουκλεοτιδίων από το προϊόν της *in vitro* μεταγραφής. Συλλέγονται τα κατάλληλα κλάσματα και μετράται η εκπομπή ραδιενέργειας ανά μικρόλιτρο (βλέπε ραδιοσήμανση ανιχνευτών).

6. Προσωρινή έκφραση γονιδίων σε φυτά

6.1 Σύνθεση των φορέων έκφρασης μέσω του PVX

Η προσωρινή έκφραση σε φυτά γίνεται μέσω ενός ιού της πατάτας, του PVX ο οποίος έχει μετατραπεί σε φορέα έκφρασης γονιδίων από το εργαστήριο του Dr. Baulcombe.

Τα πρώτα πειράματα έγιναν με τον πλασμιδιακό φορέα PVX-GC3. Το πλασμίδιο PVX-GC3 που μας στάλθηκε από τον Dr. Baulcombe εκφράζει μέσω του PVX το γονίδιο της β-γλυκουρονιδάσης (GUS) του οποίου τα επίπεδα και η πορεία έκφρασης μελετώνται εύκολα με κατάλληλη χρωμογόνο αντίδραση στα φύλλα.

Η πλήρης αλληλουχία του ιού φορέα έχει κλωνοποιηθεί κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή της T7 RNA πολυμεράσης (Charman *et. al.*, 1992). Ο ιός παράγεται με *in vitro* μεταγραφή του φορέα αυτού από την T7 πολυμεράση μετά από πέψη των πλασμιδίων με το ένζυμο SreI. Το προϊόν της μετάφρασης ελέγχεται με ανάλυση σε πήκτωμα αγαρόζης και χρησιμοποιείται για μηχανική μόλυνση φύλλων ντομάτας 8-12 ημερών.

Οι τροποποιήσεις του πλασμιδίου PVX-GC3 αποδείχθηκαν εξαιρετικά δύσκολες. Αρχικά έπρεπε να αφαιρεθούν οι αλληλουχίες του γονιδίου GUS ώστε να υπάρχει πλασμίδιο αναφοράς που να εκφράζει μόνο τον ιό. Το πλασμίδιο αυτό είναι εξαιρετικά ασταθές σε βακτήρια, σε όλα τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για τον πολλαπλασιασμό του (σε DH5α, JM83, BL21). Ελαττώνοντας τον χρόνο επώασης των κυττάρων (*E. coli*) σε 12-14 ώρες στους 37°C κάποιες απομονώσεις απέδιδαν DNA σωστού μήκους και τα προβλεπόμενα τμήματα μετά από πέψη με περιοριστικά ένζυμα. Τελικά αποδείχθηκε το ίδιο ασταθές και σε φυτά.

Οι κατασκευές αυτές δεν ήταν σταθερές και αντικαταστάθηκαν από τον βελτιωμένο φορέα pPVX202.

Όλες οι κατασκευές που χρησιμοποιήθηκαν για την έκφραση της LeMA-1 ή των ελλειπτικών προϊόντων της και των μεταλλαγμάτων της έγιναν πάνω στον φορέα pPVX202 ο οποίος φέρει ολόκληρο το γένωμα του PVX και παράλληλα διαθέτει και θέση ένθεσης ξένων γονιδίων. Λεπτομέρειες για την στρατηγική κλωνοποίησης αναφέρονται στο ανάλογο κεφάλαιο όπου περιγράφονται οι κατασκευές που χρησιμοποιήθηκαν.

6.2 Μόλυνση φυτών με πλασμιδιακό DNA.

Η μόλυνση των φυτών γίνεται με 10μg πλασμιδιακού DNA ανά φυτό σε διάλυμα 50mM PB (φωσφορικών) pH 8.0. Μολύνονται φυτά 2 εβδομάδων με μηχανική μόλυνση: ήπιο

τραυματισμό και επάλειψη του φύλλου με το διάλυμα του DNA. Δύο φύλλα ανά φυτό ψεκάζονται με carbogundum (σφαιρίδια γυαλιού). Πάνω στα φύλλα τοποθετούνται 50μl διαλύματος DNA και ακολουθεί ήπια τριβή του φύλλου, χωρίς να καταστραφεί η επιφάνεια. 2-3 λεπτά αργότερα ξεπλένεται με νερό. Βιοχημικά η μόλυνση ανιχνεύεται την 10-11 ημέρα από την μόλυνση ενώ τα ορατά συμπτώματα καθυστερούν 2-3 ημέρες περισσότερο.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1) Abel S., Theologis A., (1996): Early genes in auxin action. *Plant Physiol.* **111**, 9-17.
- 2) Adams M., Falke S., Goldberg A. L., Slaughter C. A., DeMartino G. N., Gogol E. P., Structural and functional effects of PA700 and modulator protein on proteasomes (1997): *J Mol. Biol.*: **273**,646-657
- 3) Akiyama Y., Ogura T., Ito K., I(1994a): Involvement of FtsH in protein Assembly into and through the membrane. *JBC*: **269**, 5218-5224.
- 4) Akiyama Y. Shirai Y., Ito K., II(1994b): Involvement of FtsH in protein Assembly into and through the membrane. *JBC*: **269**, 5225-5229 *JBC*
- 5) Akiyama A., Akiyama Y., Ito., . (1999): Dislocation of membrane proteins in FtsH-mediated proteolysis. *EMBO J.*: **18**, 2970-2981.
- 6) Akiyama K.,Yokota K., Kagawa S., Shimbara N., Tamura T., Akioka A., Northwang HG., Noda C., Tanaka K., & Ichihara A., (1994): *Science*: **265**, 1231-1234
- 7) Akiyama K., Yokota K., Kagawa S., Shimbara N., DeMartino G., Slaughter C., Noda C., Tanaka K., (1995):cDNA cloning of a new putative ATPase subunit p45 of the human 26S proteasome, a homolog of yeast transcriptional factor Sug1p. *FEBS Lett.*: **363**, 151-156.
- 8) Amsterdam A., Pitzer F., Baumeister W., (1993): Changes in intracellular localization of proteasomew in immortalized ovarian granulosa cells during mitosis associated with a role in cell cycle control. *PNAS*: **90**, 99-103
- 9) Anand G., Yin X., Shahidi A. K., Grove L., Prochownik E. V., (1997): Novel regulation of the helix-loop-helix protein Id1 by S5a, a subunit of the 26S proteasome. *JBC*: **272**, 19140-19151.
- 10) Angell S., Baulcombe D., (1997): Consistent gene silencing in transgenic plants expressing a replicating potato virus X RNA. *The EMBO J.*, **16**, 3675-3684.
- 11) Angell S., Baulcombe D., (1999): Potato virus X amplicon-mediated silencing of nuclear genes. *The Plant Journal* **20**, 357-362.
- 12) Aravind L. & Ponting C. P., (1998): Homologues of 26S proteasome subunits are regulators of transcription and translations *Protein Sci.*: **7**, 1250-1254
- 13) Arendt C. and Hochstrasser M., (1997): Identification of the yeast 20S proteasome catalytic centers and subunit interactions required for active-site formation. *PNAS*: **94**, 7156-7161.
- 14) Arlt H., Tauer R., Feldmann H., Neupert W., Langer T., (1996): The YTA10-12 complex, an AAA protease with chaperone-like activity in the inner membrane of mitochondria. *Cell*: **85**, 875-876.
- 15) Asano K., Vornlocher H. P., Richter-Cook N. J., Merrick W. C., Hinnebusch A. J., Hershey J.W.B., (1997): Structure of cDNAs encoding human eukaryotic initiation factor 3 subunits *JBC*: **272**, 27042-27052.
- 16) Babst M Sato T., Banta L., Emr S., (1997): Endosomal transport function in yeast requires a novel AAA-type ATPase, Vps4p. *EMBO J.*: **16**, 1820-1831.
- 17) Bass B., (2000): Double-stranded RNA as a template for gene silencing. *Cell* **101**, 235-238.
- 18) Baulcombe D., (1999): Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. *Current Opinion in Plant Biology* **2**, 109-113.
- 19) Baumeister W., & Lupas A., (1997): The proteasome. *Current Opinion in Structural Biology*: **7**, 273-278

- 20) Baumeister W., Walz J., Zühl F., Seemüller E., (1998): The proteasome: Paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell*: **92**,367-380
- 21) Beal R. Devereaux Q., Xia G., Rechsteiner M., Pickart C., (1996): Surface hydrophobic residues of multiubiquitin chains essential for proteolytic targeting *PNAS*: **93**, 861-866
- 22) Becker J., Kampf R., Jeblick W., Kauss H., (2000): Induction of competence for elicitation of defense responses in cucumber hypocotyls requires proteasome activity. *The Plant J.* **21**(3), 311-316
- 23) Bernstein E., Caudy A., Hammond S., Hannon G., (2001): Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, **409**,295-296.
- 24) Beuron F., Maurizi M., Benlap D., Kocsis E., Booy F., Kessel M., Steven A., (1998): At sixes and sevens: characterization of the symmetry mismatch of the ClpAP chaperone -assisted protease. *J. Struct. Biol.*: **123**, 248-259.
- 25) Block M., Glick B., Wilcox C., Wieland F., Rothman J., (1988): Purification of an N-ethylmaleimide-sensitive protein catalyzing vesicular transport. *PNAS*: **85**, 7852-7856.
- 26) Bochtler M., Hartmann C., Song H., Bourkenov G., Bartunik H., Hubert R., (2000): The structures of HslU and the ATR-dependent protease Hslu-HslV. *Nature*: **403**, 800-805.
- 27) Braun B.C., Glickman M., Kraft R., Dahlmann B., Kloetzel P.M., Finley D., Schmidt M., (1999): The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. *Nat. Cell. Biol.*: **1** 221-226
- 28) Brigneti G., Voinnet O., Wan-Xiang L., Ding S., Baulcombe D., (1998): Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing. *EMBO J.* **17**, 6739-6746.
- 29) Burton R., Gibeaut D., Basic A., Findlay K., Roberts K., Hamilton A., Baulcombe D., Fincher G., (2000): Virus-induced silencing of a plant cellulose synthase gene. *The plant cell* **12**, 691-705.
- 30) Callis J., and Vierstra R.D., (2000): Protein degradation in signaling. *Current Opinion. In Plant Biol*: **3**, 381-386.
- 31) Carrington J., Kasschau K., Johansen L., (2001): Activation and suppression of RNA silencing by plant viruses. *Virology* **281**, 1-5.
- 32) Chapman S., Kavanagh T., Baulcombe D., (1992): Potato Virus X as a vector for gene expression in plants. *Plant J.*, **2**(4): 549-57.
- 33) Chu-Ping M., Vu J. H., Proske R. J., Slaughter C. A., Demartino G. M., (1994): Identification, purification and characterization of a high molecular weight, ATP-dependent activator (PA700) of the 20S proteasome. *JBC*: **269**, 3539-3547
- 34) Ciechanover A., & Schwartz A. L., (1998): The ubiquitin-proteasome pathway: the complexity and myriad functions of proteins death, *PNAS*: **95**, 2727-2730.
- 35) Clark-Maguire S., & Mains P., (1994): Localization of the mei-1 gene product of *Caenorhabditis elegans*, a meiotic-specific spindle component. *JCB*: **126**, 199-209.
- 36) Confalonieri F., Marsault J., Duguet M., (1994): SAV, an archaeobacterial gene with extensive homology to a family of highly conserved eukaryotic ATPases. *J. Mol. Biol.*: **235**, 396-401.
- 37) Confalonieri F., & Duguet M., (1995): A 200-amino acid ATPase module in search of a basic function. *BioEssays*: **17**, 639-650.
- 38) Coux, O., Tanaka, K., Goldberg, A.,L., (1996) : Structure and Functions of the 20S and 26S Proteases. *Annu. Rev. Biochem.*: **65**, 801-847
- 39) Dahlmann B., Kuhen L., Rutschmann M., Reinauer H., (1985): Purification and characterization of a multicatalytic high-molecular-mass proteinase from rat skeletal muscle. *Biochem. J.*: **228**, 161-170.

- 40) Dahlmann, B., Kopp, F., Niedel, B., Pfeifer, G., Hegerl, R., Baumeister, W., (1989): The multicatalytic proteinase (prosome) is ubiquitous from eukaryotes to archaeobacteria. *FEBS Lett.*: **251**, 125-131
- 41) Dai R. Chen E., Longo D. L., Gorbea C. M., Li C. H., (1998): Involvement of valocin-containing protein, an ATPase co-purified with I κ B α and 26S proteasome, in ubiquitin-proteasome-mediated degradation of I κ B α . *JBC*: **273**, 3562-3573.
- 42) Dalal S. and Hanson P. (2001): Membrane traffic: What drives the AAA motor? *Cell*: **104**, 5-8.
- 43) Dalmay T., Hamilton A., Rudd S., Angell S., Baulcombe D., (2000): An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell*, **101**, 543-553.
- 44) Dawson S., Arnold J., Mayer N., Reynolds S., Billet M., Gordon C., Colleaux L., Kloetzel P., Tanaka K., Mayer J., (1995): Developmental changes of the 26S proteasome in abdominal intersegmental muscles of *Manduca sexta* during programmed cell death. *JBC*: **270**, 1850-1858.
- 45) del Pozo J. C., & Estelle M., (1999a): Function of the ubiquitin-proteasome pathway in auxin response. *Trends in Plant Science*: **4**, 1360-1385
- 46) del Pozo J. C., & Estelle M., (1999b): The *Arabidopsis* cullin AtCUL1 is modified by the ubiquitin-related protein RUB1. *PNAS*: **96**, 15342-15347.
- 47) DeMartino G., Moomaw C. R., Zagnikto O. P., Proske R. J., Chu-Ping M., Afendis S. J., Swaffield C. J., Slaughter C. A., (1994): PA700, an ATP-dependent activator of the 20S proteasome, is an ATPase containing multiple members of a nucleotide-binding protein family. *JBC*: **269**, 20878-20884.
- 48) DeMartino G. N., Proske R. J., Moomaw C. R. Strong A., Song X., Hisamatsu H., Tanaka K., Slaughter C. A., (1996): Identification, purification and characterization of PA700-dependent activator of the proteasome. *JBC*: **271**, 3112-3118.
- 49) DeMartino G. N., & Slaughter C. A., (1999): The proteasome, a novel protease regulated by multiple mechanisms. *JBC*: **274**, 22123-22126.
- 50) De Mot R., Nagy I., Walz J., Baumeister W., (1999): Proteasomes and other self-compartmentalizing proteases in prokaryotes *Trends in Microbiol.*, **7**, 88-92.
- 51) Devereaux Q., Ustrell V., Pickart C., Rechsteiner M., (1994): A 26S protease subunit that binds ubiquitin conjugates *JBC*: **269**, 7059-7061
- 52) Devereaux Q., van Nocker S., Mahaffey D., Vierstra R., Rechsteiner M., (1995a): Inhibition of ubiquitin-mediated proteolysis by the *Arabidopsis* 26S protease subunit S5a. *JBC*: **270**, 29660-29663.
- 53) Devereaux Q., Jensen C., Rechsteiner M., (1995b): Molecular cloning and expression of 26S protease subunit enriched in dileucine repeats. *JBC*: **270**, 23726-23729.
- 54) Driscoll, J., and Goldberg, A. L., (1990) :The proteasome (multicatalytic protease) is a component of the 1500kDa proteolytic complex which degrades ubiquitin-conjugated proteins. *J. Biol. Chem.*: **265**, 4789-4792.
- 55) Driscoll, J., Brown, M., Finley, D., & Monaco, J., (1993) : MHC-linked LMP gene products specifically alter peptidase activities of the proteasome. *Nature (London)*: **365**, 262-264.
- 56) Dubiel W., Pratt G., Ferrell K., Rechsteiner M., (1992 a): Purification of an 11S regulator of the multicatalytic protease *JBC*: **267**, 22369-22377.
- 57) Dubiel W., Ferrell K., Pratt G., Rechsteiner M., (1992)b: Subunit 4 of the 26S protease is a member of a novel eukaryotic ATPase family. *JBC*: **267**, 22699-22702.
- 58) Dubiel W., Ferrell K., Rechsteiner M., (1993): Peptide sequencing identifies MSS1, a modulator of HIV Tat-mediated transactivation, as subunit 7 of the 26S protease. *FEBS Lett.*: **323**, 276-278.

- 59) Eakle K., Bernstein M., Emr S., (1988): Characterization of a component of the yeast secretion machinery: identification of the SEC18 gene product. *MCB*: **8**, 4098-4109.
- 60) Egerton M., Ashe O., Chen D., Druker B., Burgess W., Samelson L., (1992): VCP, the mammalian homologue of cdc48, is tyrosine phosphorylated in response to T cell antigen receptor activation. *EMBO J.*: **11**, 3533-3540.
- 61) Emori Y., Tsukahara T., Kawasaki H., Ishiura S., Sugita H., Suzuki K., (1991): Molecular cloning and functional analysis of three subunits of yeast proteasome. *Mol. Cel.Biol.*: **11**, 344-353.
- 62) Enenkel C., Lehmann A., Kloetzel P., (1998): Subcellular distribution of proteasomes implicates a major location of protein degradation in the nuclear envelope-ER network in yeast. *EMBO J.* **17**, 6144-6154.
- 63) Erdmann R., Wiebel F., Flessau A., Rytka J., Beyer A., Frolich K., Kunau W., (1991): PAS1, a yeast gene required for peroxisome biogenesis, encodes a member of a novel family of putative ATPases. *Cell*: **64**, 499-510.
- 64) Ferrell K., Wilkinson C., Dubiel w., Gordon C., (2000): Regulatory subunit interactions of the 26S proteasome, a complex problem. *TIBS*: **25**, 83-87.
- 65) Finley D., [Tanaka K, Mann C, Feldmann H, Hochstrasser M, Vierstra R, Johnston S, Hampton R, Haber J, Mccusker J, Silver P, Frontali L, Thorsness P, Varshavsky A, Byers B, Madura K, Reed SI, Wolf D, Jentsch S, Sommer T, Baumeister W, Goldberg A, Fried V, Rubin DM, Toh-e A, et al.](#) (1998): Unified nomenclature for subunits of the *S. cerevisiae* proteasome regulatory particle. *TIBS*: **23**, 244-245.
- 66) Fischer M., Hilt W., Richter-Ruoff B., Gonen H., Ciechanover A., Wolf D., (1994): The 26S proteasome of the yeast *S. cerevisiae*. *FEBS Lett.*: **355**, 69-75.
- 67) Fraser R., Rossignol M., Heard D., Egly J., Chambon P., (1997): *SUG1*, a putative transcriptional mediator and subunit of the PA700 proteasome regulatory complex, is a DNA helicase. *JBC*: **272**, 7122-7126.
- 68) Frentzel S., Pesol-Hurt B., Seelig A., Kloetzel P., (1994): 20S proteasomes assembled via distinct precursor complexes processing of LMP2 and LMP7 pro-proteins takes place in 13-16S pre-proteasome complexes. *J.Mol.Biol.*: **236**, 975-981.
- 69) Frölich K., Fries H., Rüdinger M., Erdmann R., Botstein D., Mecke D., (1991): Yeast cell cycle protein CDC48p shows full-length homology to the mammalian protein VCP and is a member of a protein family involved in secretion, peroxisome formation and gene expression. *JCB*: **114**, 443-453.
- 70) Fruh K., Gossen M., Wang K., Bujard H., Peterson P., Yang Y., (1994): Displacement of housekeeping proteasome subunits by MHC-encoded LMPs: a newly discovered mechanism for modulating the multicatalytic proteinase complex. *EMBO J.*: **13**, 3236-3244.
- 71) Fu HY., Doelling J., Arendt C., Hochstrasser M., Viersra R., (1998): Molecular organization of the 20S proteasome gene family from *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*: **149**, 677-692.
- 72) Fu HY ., Girod P., Doelling J., van Nocker S., Hochstrasser M., Finley D., Viersra R., (1999): Structure and functional analysis of the 26S proteasome subunits from plants. *Mol. Biol. Rep.*: **26**, 137-146.
- 73) Fu HY., Doelling J., Rubin D., Viersra R., (1999b): Structure and functional analysis of the six regulatory particle triple-A ATPase subunits from the *Arabidopsis* 26S proteasome. *The Plant J.*: **18**(5) 529-539
- 74) Genschik P., Parmentier Y., Durr A., Marbach J., Criqui M., Jamet E., Fleck J., (1992): Ubiquitin genes are differentially regulated in protoplast derived cultures of *Nicotiana sylvestris* and in response to various stresses. *Plant Mol. Biol.*: **20**, 897-910.

- 75) Ghee M., Fournier A., Mallet J., (2000): Rat α -Synuclein interacts with Tat binding protein 1, a component of the 26S proteasomal complex. *J. of Neurochemistry*: **75**, 2221-2224.
- 76) Ghislain M., Udvardy A., Mann C., (1993): *S. cerevisiae* 26S protease mutants arrest cell division in G2/metaphase. *Nature*: **366**, 358-362.
- 77) Girod P., Fu HY., Zryd J., Vierstra R., (1999): Multiubiquitin chain binding sumunit MCB1(Rpn10) of the 26S proteasome is essential for developmental progression in *physcomitrella patens*. *The Plant Cell*: **11**, 1457-1471.
- 78) Glickman M., Rubin D., Fried V., Finley D., (1998a): The regulatory particle of the *S. cerevisiae* proteasome. *Mol. and Cell. Biol.*: **18**, 3149-3162.
- 79) Glickman M., Rubin D., Coux O., Wefes I., Pfeifer G., Cjeka Z., Baumeister W., Fried V., Finley D., (1998b): A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell*: **94**, 615-623.
- 80) Glickman M., Rubin D., Fu HY., Larsen C., Coux O., Wefes I., Pfeifer G., Cjeka Z., Vierstra R., Baumeister W., Fried V., Finley D., (1999): Functional analysis of the proteasome regulatory particle. *Mol. Biol. Rep.*: **26**, 21-28.
- 81) Glickman M., (2000): Getting in and out of the proteasome. *Seminars in Cell & Developmental Biology*: **11**, 149-158.
- 82) Glynnne, R.S.H., Powis, S., Beck, A., Kelly L.A., Kerr, & Trowsdale J., (1991) : A proteasome related gene between the two ABC transporter loci in the class II region of the human MHC. *Nature (London)*: **353**, 357-360.
- 83) Goldberg A., (1992): The mechanism and functions of ATP-dependent proteases in bacterial and animal cells. *Eur. J. Biochem.*: **203**, 9-23
- 84) Goldberg A., (1995) *Science*
- 85) Gorbea C., Taillandier D., Rechsteiner M., (2000): Mapping subunit contacts in the regulatory complex of the 26S proteasome. *JBC*: **275**, 875-882.
- 86) Gordon C., McGurk G., Dillon P., Rosen C., Hastle N., (1993): Defective mitosis due to a mutation in the gene for a fission yeast 26S protease subunit. *Nature*: **366**, 355-357.
- 87) Gottesman S., & Maurizi M., (1992): Regulation by proteolysis: Energy-dependent proteases and their targets. *Microbiological Reviews*: **56**, 592-621.
- 88) Gottesman S., Wickner S., Maurizi M., (1997): Protein control: triage by chaperones and proteases. *Genes and Develop.*: **11**, 815-823.
- 89) Gottesman S., (1999): Regulation by proteolysis: developmental switches. *Current opinion in Microbiology*: **2**, 142-147.
- 90) Goyer C., Lee H., Malo D., Sonenberg N., (1992): Isolation of a yeast gene encoding a protein homologous to the human Tat-binding protein TBP-1. *DNA and Cell Biol.*: **11**, 579- 585.
- 91) Grant S., (1999): Dissecting the mechanisms of posttranscriptional gene silencing: Divide and conquer. *Cell* **96**, 303-306.
- 92) Gray W., del Pozo C., Walker L., Hobbie L., Risseuw E., Banks T., Crosby W., Yang M., Ma H., Estelle M., (1999): Identification of an SCF ubiquitin-ligase complex required for auxin response in *Arabidopsis thaliana*. *Genes and Development*: **13**, 1678-1691.
- 93) Gray W., Kepinski S., Rouse D., Leyser O., Estelle M., (2001): Auxin regulates SCF^{Tir1}-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature* **414**, 271-276.
- 94) Groettrup M., Standera S., Stohwasser R., Kloetzel P., (1997): The subunits MECL-1 and LMP2 are mutually required for incorporation into the 20S proteasome. *PNAS*: **94**, 8970-8975.

- 95) Groll, M., Ditzel, L., Löwe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H.D., Huber, R., (1997): Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature*: **386**, 463-471
- 96) Groll M., Heinemeyer W., Jäger S., Ullrich T., Bochtler M., Wolf D., Huber R., (1999): The catalytic sites of 20S proteasomes and their role in subunit maturation: a mutational and crystallographic study. *PNAS*: **96**, 10976-10983.
- 97) Grziwa A., Baumeister, W., Dahlmann, B., Kopp, F., (1991) : Localization of subunits in proteasomes from *Thermoplasma Acidophilum* by immunoelectron microscopy. *FEBS Lett.*: **290**, 186-190
- 98) Guelin E., rep m., Grivell L., (1994): Sequence of the AFG3 gene encoding a new member of the Ftsh/ Yme1/ Tma subfamily of the AAA-protein family. *Yeast*: **10**, 1389-1394.
- 99) Hamilton A., Baulcombe D., (1999): A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, **286**, 950-952.
- 100) Haracska L., and Udvardy A., (1995): Cloning and sequencing a non-ATPase subunit of the regulatory complex of the *Drosophila* 26S protease. *Eur. J. Biochem.*: **231**, 720-725.
- 101) Hartmann-Petersen R., Tanaka K., Hendil K., (2001): Quaternary structure of the ATRase complex of human 26S proteasomes determined by chemical cross-linking. *Arch. Bioch. Biophys.*: **386**, 89-94.
- 102) Hastings R., Eychevalde I., Dawson S., Walker G., Reynolds S., Billet M., Mayer J., (1999): A 220-kDa activator complex of the 26S proteasome in insects and humans. *JBC*: **274**, 25691-25700.
- 103) Heinemeyer W., Kleinschmidt J., Saidowski J., Escher C., Wolf D., (1991): Proteinase yscE, the yeast proteasome/multicatalytic- multifunctional proteinase: mutants unravel its function in stress induced proteolysis and uncover its necessity for cell survival. *EMBO J.*: **10**, 555-562.
- 104) Heinemeyer W., Gruhler a., Mohrle V., Mahe Y., Wolf D., (1993): PRE2, highly homologous to the human major histocompatibility complex-linked RING10 gene, codes for a yeast proteasome subunit necessary for chymotryptic activity and degradation of ubiquitinated proteins. *JBC*: **268**, 5115-5120.
- 105) Heinemeyer, W., Fisher, M., Krimmer, T., Stachon, U., and Wolf, D. H., (1997) : The active sites of the eukaryotic 20S proteasome and their involvement in subunit precursor processing *J. Biol. Chem.*: **272**, 25200-25209
- 106) Hendil K., Kristensen P., Uerkvitz W., (1995): Human proteasomes analysed with monoclonal antibodies. *Biochem. J.*: **305**, 245-252.
- 107) Henke W., Ferrell K., Bech-Otschir D., Seeger M., Schade R., Naumann M dubiel W., (1999): Comparison of human COP9 signalosome and 26S proteasome "lid". *Mol. Biol. Rep.*: **26**, 29-34.
- 108) Herman, C., and D'Ari R., (1998): Proteolysis and chaperones: the destruction/reconstruction dilemma. *Curr. Opin. In Microbiology*: **1**, 204-209.
- 109) Hershko, A., and Ciechanover, A., (1998) : The Ubiquitin ststem. *Annu. Rev. Biochem.*: **67**, 425-480.
- 110) Hoffman L., Pratt, G., , M., (1992) : Multiple forms of the 20S multicatalytic and the 26S ubiquitin /ATP-dependent proteases from rabbit reticulolysate. *J. Biol. Chem.*: **267**, 22362-22368
- 111) Hoffman L. and Rechsteiner M., (1996): Nucleotidase activities of the 26S proteasome and its regulatory complex. *JBC*: **271**, 32538-32545.
- 112) Hoffman L. and Bucher P., (1998): The PCI domain: a common theme in three multiprotein complexes. *TIBS*: **23**, 204-205.

- 113) Hoffman L., and Pickart C., (1999): Noncanonical MMS2-encoded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair. *Cell*: **96**, 645-653.
- 114) Hough, R., Pratt, G., , M., (1987): Purification of two high molecular weight proteases from rabbit reticulocyte lysate. *J. Biol. Chem.*: **262** 8303-8313
- 115) Hölzl H., Kapelari B., Kellermann J., Seemüller E., Sümegi M., Udvardy A., Medalia O., Sperling J., Müller S., Engel A., Baumeister W., (2000): The regulatory complex of *Drosophila melanogaster* 26S proteasomes: subunit composition and localization of a deubiquitylating enzyme. *JCB*: **150**, 119-129.
- 116) Ito N., Seo S., Ohtsubo N., Nakagawa H., Ohashi Y., (1999): Involvement of proteasome-Ubiquitin system in wound-signalling in Tobacco plants. *Plant Cell Physiol.*, **40(3)**, 355-360.
- 117) Jacobsen S., Running M., Meyerowitz E., (1999): Disruption of an RNA helicase/RNaseIII gene in *Arabidopsis* causes unregulated cell division in floral meristems. *Development* **126**, 5231-5243.
- 118) [Jentsch S.](#), [Schlenker S.](#) (1995): Selective protein degradation: a journey's end within the proteasome. *Cell*. **82**, 881-4.
- 119) Jentsch S., and Pyrowolakis G., (2000): Ubiquitin and its kin: how close are the family ties? *Trends in Cell Biology*: **10**, 335-342.
- 120) Kapelari B., Bech-Otchir D., Hegerl R., Schade R., Dumdey R., Dubiel W., (2000): Electron microscopy and subunit-subunit interaction studies reveal a first architecture of COP9 signalosome. *JMB*: **300**, 1169-1178.
- 121) Karniol B., and Chamovitz D., (2000): The COP9 signalosome: from light signalling to general developmental regulation and back. *Curr. Opin. In Plant Biol.*: **3**, 387-393.
- 122) Kawahara H., Kasahara M., Nishiyama A., Oshumi K., Goto T., Kishimoto T., Saeki Y., Yokosawa H., Shimbara N., Mutrata S., Chiba T., Suzuki K., Tanaka K., (2000): Developmentally regulated, alternative splicing of the Rpn10 gene generates multiple forms of the 26S proteasomes. *EMBO J.*: **19**, 4144-4153.
- 123) Kelly, A., Powis, S. H., Glynn, R., Radley, E., Beck, S., & Trowsdale J., (1991) : A second proteasome related gene in human MHC class II region. *Nature (London)*: **353**, 667-668
- 124) Kim Y., Björklund S., Li Y., Sayre M., Kornberg R., (1994): A multiprotein mediator of transcriptional activation and its interaction with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II. *Cell*: **77**, 599-608.
- 125) Kisselev A., Akopian T., Woo K., Goldberg A., (1999): The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20S proteasomes. *JBC*: **274**, 3363-3371.
- 126) Kisselev A., Songyang Z., Goldberg A., (2000): Why does threonine, and not serine, function as the active site nucleophile in proteasomes? *JBC*: **275**, 14831-14837.
- 127) Knowlton R., Johnston S., Whitby F., Realini C., Zhang Z., Rechsteiner M., Hill C., (1997): Structure of the proteasome activator REGa (PA28a). *Nature*: **390**, 639-643.
- 128) Koegl, M., Hoppe T., Schlenker S., Ulrich H., Mayer T., Jentsch S., (1999): A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multi ubiquitination chain assembly. *Cell*: **96**, 635-644
- 129) Koller K., & Brownstein M., (1987): Use of a cDNA clone to identify a supposed precursor protein containing valosin. *Nature*: **325**, 542-545.

- 130) Kominami K., DeMartino G., Moomaw C., Slaughter C., Shimbara n., Fujimuro M., Yokosawa H., Hisamatsu H., Tanahashi N., Shimizu Y., Tanaka K., Toh-e A., (1995): Nin1p, a regulatory subunit of the 26S proteasome, is necessary for activation of Cdc28p kinase of *Saccharomyces cerevisiae*. EMBO J.: **14**, 3105-3115.
- 131) Kwok SF., Staub J., Deng X., (1999): Characterization of two subunits of *Arabidopsis* 19S proteasome regulatory complex and its possible interaction with the COP9 complex. JMB: **285**, 85-95.
- 132) Lam A., DeMartino G., Pickart C., Cohen R., (1997): Specificity of the ubiquitin isopeptidase in the PA700 regulatory complex of 26S proteasomes. JBC: **272**, 28438-28446.
- 133) Laney J. D., and Hochstrasser M., (1999): Substrate targetting in the ubiquitin system. Cell: **97**, 427-430.
- 134) Langer T. (2000): AAA proteases: cellular machines for degrading membrane proteins TIBS: **25**, 247-251.
- 135) Larsen C., & Finley D., (1997): Protein translocation channels in the proteasome and other proteases. Cell: **91**, 431-434
- 136) Lee J., Ryan F., Swaffield J., Johnston S., Moore D., (1995): Interaction of thyroid-hormone receptor with a conserved transcriptional mediator. Nature: **374**, 91-93.
- 137) Leonard K., Hermann J., Stuart R., Manhaupt G., Neupert W., Langer T., (1996): AAA proteases with catalytic sites on opposite membrane surfaces comprise a proteolytic system for the ATP-dependent degradation of inner membrane proteins in mitochondria. EMBO J.: **15**, 4218-4229.
- 138) Leonard K., Stiegler A., Neupert W., Langer T., (1999): Chaperone-like activity of the AAA domain of the yeast Yme1 AAA protease. Nature: **398**, 348-351.
- 139) Liberzon A., Shpungin S., Bangio H., Yona E., Katcoff D., (1996): Association of yeast SAP1, a novel member of the "AAA" ATPase family of proteins, with the chromatin protein SIN1. FEBS Lett.: **388**, 5-10.
- 140) Lindahl M., Tabak S., Cseke L., Pichersky E., Andersson B., Adam Zach., (1996): Identification, Characterization, and molecular cloning of a homologue of the bacterial FtsH protease in chloroplasts of higher plants. JBC: **271**, 29329-29334.
- 141) Lommel L., Chen L., Madura K., Kevin S., (2000): The 26S proteasome negatively regulates the level of overall genomic nucleotide excision repair. NAR: **28**, 4839-4845.
- 142) Löwe J., Stock D., Jap B., Zwickl P., Baumeister W., Huber R., (1995): Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. Science: **268**, 533-539.
- 143) Lucero H., Chojnicki E., Mandiyan S., Nelson H., Nelson N., (1995): Cloning and expresion of a yeast gene encoding a protein with ATPase activity and high identity to the subunit 4 of the human 26S protease. JBC: **270**, 9178-9184.
- 144) Luders J., Demand J., Höhfeld J. (2000): The ubiquitin-related BAG-1 provides a link between the molecular chaperones Hsc70/Hsp70 and the proteasome. JBC: **275**, 4613-4617.
- 145) Lupas A., Zühl F., Tamura T., Wolf S., Nagy I., De Mot R., Baumeister W., (1997): Eubacterial Proteasomes. Mol. Biol. Rep.: **24**, 125-131.
- 146) Makino Y., Yamano K., Kanemaki M., Morikawa K., Kishimoto T., Shimbara N., Tanaka K., Tamura T., (1997): SUG1, a component of the 26S proteasome, is an ATPase stimulated by specific RNAs. JBC: **272**, 23201-23205.

- 147) McCutchen-Malony S., Matsuda K., Shimbara N., Binns D., Tanaka K., Slaughter N., DeMartino G., (2000): cDNA cloning, expression, and functional characterization of PI31, a proline-rich inhibitor of the proteasome. *JBC*: **275**, 18557-18565.
- 148) McGuire, M., J., McCullough, M., L., Croall, D., E., DeMartino, G., N., (1989) *Biochim. Biophys. Acta*: **995**, 181-186
- 149) Martinez, C. K., & Monaco J. J., (1991) : Homology of proteasome subunits to a major histocompatibility complex linked LMP gene. *Nature (London)*: **353**, 664-667
- 150) Matzke M., Matzke A., Eggleston W., (1996): Paramutation and transgene silencing: a common response to invasive DNA? *Trends in plant science* **1**, 382-388.
- 151) Michalek M., Grant e., Gramm C., Goldberg A., Rock K., (1993): A role for the ubiquitin-dependent proteolytic pathway in MHC class I-restricted antigen presentation. *Nature*: **363**, 552-554.
- 152) Mott J., Pramanik B., Moomaw C., Afendis S., DeMartino G., Slaughter C., (1994): PA28, an activator of the 20S proteasome, is composed of two nonidentical but homologous subunits. *JBC*: **269**, 31466-31471.
- 153) Mourrain P., Beclin C., Elmayan T., Feuerbach F., Godon C., Morel J., Jouette D., Lacombe A., Nikic S., Picault N., Remoue K., Sanial M., Vo T., Vaucheret H., (2000): *Arabidopsis* *SGS2* and *SGS3* genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell* **101**, 533-542.
- 154) Murakami Y., Matsufuji S., Hayashi S., Tanahashi N., Tanaka K., (2000): Degradation of ornithine decarboxylase by the 26S proteasome. *Bioch Biophys. Res. Comm.*: **267**, 1-6.
- 155) Nakai T., Endo T., Hase T., Matsubara H., (1993): Intramitochondrial protein sorting *JBC*: **268**, 24262-24269.
- 156) Nakai T., Yasuhara T., Fujiki Y., Ohashi A., (1995): Multiple genes, including a member of the AAA family, are essential for degradation of unassembled subunit 2 of cytochrome c oxidase in yeast mitochondria. *Mol. Cel. Biol.*: **15**, 4441-4452.
- 157) Nakamura T., Tanaka T., Takagi H., Sato M., (1998): Cloning and heterogeneous in vivo expression of Tat binding protein-1 (TBP-1) in the mouse. *BBA*: **1399**, 93-100.
- 158) Nelbock P., Dillon P., Perkins A., Rosen G., (1990): A cDNA for a protein that interacts with the human Immunodeficiency Virus Tat transactivator. *Science*: **248**, 1650-1653.
- 159) [Neuwald AF, Aravind L, Spouge JL, Koonin EV.](#) (1999): AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res* **9** 27-43
- 160) Nuttley W., Brade A., Eitzen G., Veenhuis M., Aitchinson J., Szilard R., Glover J., Rachubinski R., (1993): PAY4, a gene required for peroxisome assembly in the yeast *Yarrowia lipolytica*, encodes a novel member of the family of putative ATPases. *JBC*, **269**: 556-566.
- 161) Ogura T., Tomoyasu T., Yuki T., Morimura S., Begg K., Donachie W., Mori H., Niki H., Hiraga S., (1991): Structure and function of the *ftsH* gene in *Esterichia coli*. *Plant pathology* **142**: 279-282.
- 162) Ohana B., Moore S., Ruben S., Southgate C., Green M., Rosen G., (1993): The type 1 human immunodeficiency virus Tat binding protein is a transcriptional activator belonging to an additional family of evolutionarily conserved genes. *PNAS*: **90**, 138-142.

- 163) Orian A., Gonen H., Bercovich B., Fajerman I., Eytan E., Israel A., Mercurio F., Iwai K., Schwartz A., Ciechanover A., (2000): SCF^{β-TrCP} ubiquitin ligase-mediated processing of NF-κB p105 requires phosphorylation of its C-terminus by IκB kinase. *EMBO J.*: **19**, 2580-2591.
- 164) Orłowski M., and Wilk S., (2000): Catalytic activities of the 20S proteasome, a multicatalytic proteinase complex. *Arch Biochem Biophys.*: **383**, 1-16.
- 165) Ortiz-Navarrete V., Seelig, A., Gernold, M., Frentzel, S., Kloetzel, P.M., & Hammerling, G. J., (1991) : Subunit of the 20s proteasome (multicatalytic proteinase) encoded by the major histocompatibility complex. *Nature (London)*: **353**, 662-664
- 166) Osmulski, P.A., and Gaczynska, M., (2000) : Atomic force microscopy reveals two conformations of the 20S proteasome from fission yeast. *J. Biol. Chem.*: **18**, 13171-13174
- 167) Osterlund M., Hardtle C., Wei N., Deng W., (2000): Targetted destabilization of HY5 during light-regulated development of *Arabidopsis*. *Nature*: **405**, 462-466.
- 168) Ozaki M., Fujinami K., Tanaka K., Amemiya Y., Sato T., Ogura N., Nakagawa H., (1992): Purification and initial characterization of the proteasome from the higher plant *Spinacia oleracea*. *JBC*: **267**, 21678-21684.
- 169) Pak M., Hoskins J., Singh S., Maurizi M., Wickner S., (1999): Concurrent chaperone and ATPase activities on ClpAP and the requirement for the N-terminal ClpA ATP binding site for chaperone activity. *JBC*: **274**, 19316-19322.
- 170) Palmer A., Rivett J., Thomson S., Hendil k., Bucher G., Fuertes G., Knecht E., (1996): Subpopulations in rat liver nuclei, microsomes and cytosol. *Biochem. J.*: **316**, 401-4017.
- 171) Pando M., and Verma I., (2000): Signal-dependent and -independent degradation of free and NF-κB-bound IκBa. *JBC*: **275**, 21278,21286.
- 172) Park B., O'Rourke D., Wang Q., Davis J., Post A., Qian X., Greene M., (1999): Induction of the Tat-binding protein 1 gene accompanies the diasabling of oncogenic erbB receptor tyrosine kinases. *PNAS*: **96**, 6434-6438.
- 173) Patel S., Monaco J., McDevitt H., (1994): Delineation of the subunit composition of human proteasomes using antisera against the major histocompatibility complex-encoded LMP2 and LMP7 subunits. *PNAS*: **91**, 296-300.
- 174) Patel S., Latterich M., (1998): The AAA team: related ATPases with diverse functions. *Trends in Cell Biol.*: **8**, 65-71.
- 175) Peng Z., Staub j., Serino G., Kwok SF., Kurepa J., Bruce B., Vierstra R., Wei N., Deng X., (2001): The cellular level of PR500, a protein complex related to the 19S Regulatory particle of the proteasome, is regulated in response to stresses in plants. *Mol. Biol. of the Cell*: **12**, 383-392.
- 176) Peters J., Walsh M., Franke W., (1990): An abundant and ubiquitous homo-oligomeric ring-shaped ATPase particle related to the putative vesicle fusion transport proteins Sec18p and NSF. *EMBO J.*: **9**, 1757-1767
- 177) Peters J., Harris J., Lustig A., Müller S., Engel A., Volker S., Franke W., (1992): Ubiquitous soluble Mg²⁺-ATPase complex. A structural study. *J. Mol. Biol.*: **223**, 557-571.
- 178) Peters J., Cejka Z., Harris R., Kleinschmidt J., Baumeister W., (1993): Structural features of the 26S proteasome complex. *J.Mol. Biol.*, **234**, 932-937.
- 179) Peters J., Franke W., Kleinschmidt J., (1994): Distinct 19S and 20S subcomplexes of the 26S proteasome and their distribution in the nucleus and the cytoplasm. *JBC*: **269**, 7709-7718.
- 180) Pickart C., (2000): Ubiquitin in chains. *TIBS*: **25**, 544-548

- 181) Pirkkala L., Alastalo T., Zuo X., Benjamin I., Sistonen L., (2000): Disruption of heat shock factor 1 reveals an essential role in the ubiquitin proteolytic pathway. *Mol. Cell. Biol.*: **20**, 2670-2675.
- 182) Pleasure I., Black M., Keen J., (1994): Valosin-containing protein, VCP, is a ubiquitous clathrin-binding protein. *Nature*, **365**, 459-462.
- 183) Pouch M., Petit F., Buri J., Briand Y., Schmid H., (1995): Identification and initial characterization of a specific proteasome (prosome) associated Rnase activity. *JBC*: **270**, 22023-22028.
- 184) Prombona A., Tabler M., Providaki M., Tsagris M., (1995): Structure and expression of LeMA-1, a tomato protein belonging to the SEC18-PAS1-CDC48-TBP-1 protein family of putative Mg²⁺-dependent ATPases. *Plant Molecular Biology* **27**, 1109-1118.
- 185) Puhler G., Pitzer F., Zwickl P., Baumeister W., (1994): Proteasomes: multisubunit proteinases common to *Thermoplasma* and eukaryotes. *System. Appl. Microbiol.*: **16**, 734-741.
- 186) Ratcliff F., Martin-Hernandez A., Baulcombe D., (2001): Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *The Plant Journal* **25**, 237-245.
- 187) Realini C., Jensen C., Zhang Z., Johnston S., Knowlton R., Hill C., Rechsteiner M., (1997): Characterization of recombinant REG α , REG β , and REG γ proteasome activators. *JBC*: **272**, 25483-25492.
- 188) Rechsteiner M., Hoffman L., Dubiel W., (1993): The multicatalytic and 26S proteases. *JBC*: **268**, 6065-6068.
- 189) Richmond C., Gorbea C., Rechsteiner M., (1997): Specific interactions between ATPase subunits of the 26S protease. *JBC*: **272**, 13403-13411.
- 190) Rock K., Gramm C., Rothstein L., Clark K., Stein R., Dick L., Hwang D., Goldberg A., (1994): Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell*: **78**, 761-771.
- 191) Rowe T., Balch W., (1997): Bridging the gap by AAA ATPases. *Nature*: **388**, 20-21.
- 192) Rubin D., Coux O., Wefes I., Hengartner C., Yang R., Goldberg A., Finley D., (1996): Identification of the gal4 suppressor *SUG1* as a subunit of the yeast 26S proteasome. *Nature*: **379**, 655-657.
- 193) Rubin D., van Nocker S., Glickman M., Coux O., Wefes I., Sadis S., Fu H., Goldberg A., Vierstra R., Finley D., (1997): ATPase and ubiquitin-binding proteins of the yeast proteasome. *Mol. Biol. Rep.*: **24**, 17-26.
- 194) Rubin D., Glickman M., Larsen C., Dhruvakumar S., Finley D., (1998): Active site mutants in the ix regulatory particle ATPases reveal multiple roles for ATP in the proteasome. *EMBO J.*: **17**, 4909-4919.
- 195) Rueger M., Dewey E., Gray W., Hobbie L., Turner J., Estelle M., (1998): The TIR1 protein of *Arabidopsis* functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast *Grr1p*. *Genes Dev.*: **12**, 198-207.
- 196) Ruiz M., Voinnet O., Baulcombe D., (1998): Initiation and maintenance of virus-induced gene-silencing. *Plant Cell* **10**, 937-946.
- 197) Russel S., Sathyanarayana U., Johnston A., (1996): Isolation and characterization of *SUG2*. *JBC*: **271**, 32810-32817.
- 198) Russel S., and Johnston S., (2001): Evidence that proteolysis of Gal4 cannot explain the transcriptional effects of proteasome ATPase mutations. *JBC*: manuscript Jan 4. 2001.

- 199) Sablowski, R., Baulcombe, D., Bevan M., (1995): Expression of a flower-specific Myb protein in leaf cells using a viral vector causes ectopic activation of a target promoter. PNAS: **92**, 6901-6905.
- 200) Salzmann, U., Kral, S., Braun, B., Standera, S., Schmidt, M., Kloetzel, P.M., and Sijts, A., (1999) FEBS Lett.: **454**, 11-15
- 201) Sawada H., Muto K., Fujimuro M., Akaishi T., Takagi-Sawada M., Yokosawa H., Goldberg A., (1993): Different ratios in 20S proteasomes and regulatory subunit complexes in two isoforms of the 26S proteasome purified from rabbit skeletal muscle. FEBS Lett.: **335**, 207-212.
- 202) Schaubert C., Chen L., Tongaonkar P., Vega I., Lambertson D., Potts W., Madura K., (1998): Rad23 links DNA repair to the ubiquitin/proteasome pathway. Nature: **391**, 715-718.
- 203) Schmidt M & Kloetzel P.-M., (1997) : Biogenesis of eukaryotic 20S proteasomes : the complex maturation pathway of a complex enzyme. FASEB J.: **11**, 1235-43
- 204) Schmidt M., Lupas A., Finley D., (1999): Structure and mechanism of ATP-dependent proteases. Curr. Opin. Chem. Biol.: **3**, 584-591.
- 205) Schubert U., Ott D., Chertova E., Walker R., Tessmer U., Princiotta M., Bannink J., Krausslich H., Yewdel J., (2000a): Proteasome inhibition interferes with gag polyprotein processing, release, and maturation of HIV-1 and HIV-2. PNAS: **97**, 13057-13062.
- 206) Schubert U., Anton L., C., Gibbs J., Nobury C.C., Yewdell J.W., Bannink J. R., (2000b): Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. Nature: **404** 770-774
- 207) Seeger M., Ferrell K., Dubiel W., (1997): The 26S proteasome: a dynamic structure. Mol. Biol. Rep.: **24**, 83-88.
- 208) Seeger M., Ferrell K., Frank R., Dubiel W., (1997b): HIV-1 Tat inhibits the 20S proteasome and its 11S regulator-mediated activation. JBC: **272**, 8145-8148.
- 209) Seeger M., Kraft R., Ferrell K., Bech-Otchir D., Dumdey R., Schade R., Gordon C., Nauman M., Dubiel W., (1998): A novel protein complex involved in signal transduction possessing similarities to 26S proteasome subunits. FASEB J: **12**, 469-478.
- 210) Seemüller E., Lupas A., Stock D., Löwe J., Huber R., Baumeister W., (1995): Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: A threonine protease. Science: **268**, 579-582.
- 211) Selker E., (1999): Gene silencing: Repeats that count. Cell **97**, 157-160.
- 212) Seufert W and Jentsch S., (1992): In vivo function of the proteasome in the ubiquitin pathway. EMBO J.: **11**, 3077-3080.
- 213) Shaw D., Ennis h., (1993): Molecular cloning and developmental regulation of *Dictyostelium discoideum* homologues of the human and yeast HIV1 Tat-binding protein. Bioch. Biophys. Res. Comm.: **193**, 1291-1296.
- 214) Shibuya H., Irie K., Ninimiya-Tsuji J., Goebel M., Taniguchi T., Matsumoto K., (1992): New human gene encoding a positive modulator of HIV Tat-mediated transactivation. Nature: **357**, 700-702.
- 215) Skoda B., Malek L., (1992): Dry pea seed proteasome, purification and enzymic activities. Plant Physiol.: **99**, 1515-1519.
- 216) Söllner T., Whitehart S., Brunner M., Erdjument H., Geromanos S., Tempst P., Rothman J., (1993): SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. Nature: **362**, 318-324.

- 217) Sousa M., Trame C., Tsuruta H., Wilbanks S., Reddy V., McKay D., (2000): Crystal and solution structures of an HslUV protease-chaperone complex. *Cell*: **103**, 633-644.
- 218) Strickland E., Hakala K., Thomas P., DeMartino G., (2000): Recognition of misfolding proteins by PA700, the regulatory subcomplex of the 26S proteasome. *JBC*: **275**, 5565-5572.
- 219) Suzuka I., Koga-Ban Y., Sasaki T., Minobe Y., Hashimoto J., (1994): Identification of cDNA clones for rice homologs of the human immunodeficiency virus-1 Tat binding protein and subunit 4 of human 26S proteasome subunits. *Plant Sci.*: **103**, 33-40
- 220) Suzuka I., Yanagawa Y., Yamazaki K., Ueda T., Nakagawa H., Hashimoto J., (1998): Biochemical and immunological characterization of rice homologues of the human immunodeficiency virus-1 Tat binding protein and subunit 4 of human 26S proteasome subunits. *Plant Mol. Biol.*: **37**, 495-504.
- 221) Suzuki C., Rep M., van Dijl J., Suda K., Grivell L., Schatz G., (1997): ATP-dependent proteases that also chaperone protein biogenesis. *TIBS*: **22**, 118-123.
- 222) Swaffield J., Bromberg J., Johnston S., (1992): Alterations in a yeast protein resembling HIV Tat-binding protein relieve requirement for an acidic activation domain in GAL4. *Nature*: **357**, 698-699.
- 223) Swaffield J., Melcher K., Johnston S., (1995): A highly conserved ATPase protein as a mediator between acidic activation domains and the TATA-binding protein. *Nature*: **374**, 88-90.
- 224) Swaffield J., & Purugganan M., (1997): The evolution of the conserved ATPase domain (CAD): reconstructing the history of an ancient protein module. *J Mol. Evol.*: **45**, 549-563.
- 225) Takeuchi J., Fujimuro M., Yokosawa H., Tanaka K., Toh-e A., (1999): Rpn9 is required for efficient assembly of the yeast 26S proteasome. *Mol Cell Biol*: 6575-6584.
- 226) Tanahashi N., Murakami Y., Minami Y., Shimbara N., Hendil K., Tanaka K., (2000): Hybrid Proteasomes *JBC*: **275**, 14336-14345.
- 227) Tanaka, K., & Ichihra, A., (1989): Half life of proteasomes (multi protease complex) in rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*: **159**, 1309-1315.
- 228) Tanaka K., Tsurumi C., (1997)a: The 26S proteasome: subunits and functions. *Mol. Biol. Rep.*: **24**, 3-11.
- 229) Tanaka T., Nakamura T., Takagi H., Sato M., (1997)b Molecular Cloning and Characterization of a Novel TBP-1 Interacting Protein (TBPIP): Enhancement of TBP-1 Action on Tat by TBPIP. *Bioch. Biophys. Res. Com.* **239**, 176-181
- 230) Tanaka K., (1998): Molecular biology of the proteasome. *Bioch. Biophys. Res. Com.*: **247**, 537-541.
- 231) Tanaka K., and Chiba T., (1998): The proteasome: a protein-destroying machine. *Genes to Cells*: **3**, 499-510.
- 232) Tanaka E., Takagi-Sawada M., Morinaga C., Yokosawa H., Sawada H., (2000): Isolation and characterization of a novel 530-kDa protein complex (PC530) capable of associating with the 20S proteasome from starfish oocytes. *Arch. Bioch and Biophys.*: **374**, 181-188.
- 233) Tian Q., Reed J., (1999): Control of auxin-regulated root-development by the *Arabidopsis thaliana* SHY2/IAA3 gene. *Development* **126**, 711-721.
- 234) Thomas C., Jones L., Baulcombe D., Maule A., (2001): Size constraints for targetting post-transcriptional gene silencing and for RNA-directed methylation in *Nicotiana benthamiana* using a potato virus X vector. *The Plant Journal* **25**, 417-425.

- 235) Thorsness P., White K., Fox T., (1993): Inactivation of YME1, a member of the ftsH - SEC18 - PAS1 - CDC48 family of putative ATRase-encoding genes, causes increased escape of DNA from mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*: **13**,5418-5426
- 236) Thrower J., Hoffman L., Rechsteiner M., Pickart C., (2000): Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J.*: **19**, 94-102.
- 237) Tomoyasu T., Gamer J., Bukau B., Kanemori M., Hirotsada M., Rutman A., Oppenheim A., Yura T., Yamanaka K., Niki H., Hiraga S., Ogura T., (1995): *Escherichia coli* FtsH is a membrane-bound, ATP-dependent protease which degrades the heat-shock transcription factor σ^{32} . *EMBO J.*: **14**, 2551-2560.
- 238) Tongaokar P., Chen I., Lambertson D., Ko B., Madura K., (2000): Evidence for an interaction between ubiquitin-conjugating enzymes and the 26S proteasome. *Mol. Cell. Biol.*: **20**, 4691-4698.
- 239) Udvardy A., (1993): Purification and characterization of a multiprotein component of the *Drosophila* 26S (1500 kDa) proteolytic complex. *JBC*: **268**, 9055-9062.
- 240) Vale R., (2000): AAA proteins: Lords of the ring. *JBC*, **150**, F13-F19.
- 241) van nocker S., Devereaux Q., Rechsteiner M., Vierstra R., (1996a): *Arabidopsis* MBP1 gene encodes a conserved ubiquitin recognition component of the 26S proteasome. *Biochemistry*: **93**, 856-860.
- 242) van nocker S., Walker J., Vierstra R., (1996b): The *Arabidopsis thaliana* UBC7/13/14 genes encode a family of multiubiquitin chain-forming E2 enzymes. *JBC*: **271**, 12150-12158.
- 243) Vaucheret H., Beclin C., Elmayan T., Feuerbach F., Godon C., Morel j., Mourrain P., Palaqui J., Vemhettes S., (1998): Transgene induced gene silencing in plants. *Plant J.* **16**, 651-659.
- 244) Vaucheret H., Beclin C., Fagard M., (2001): Post-transcriptional gene silencing in plants. *Journal of cell science* **114**, 3083-3091.
- 245) Verma R., and Deshaies R.J., (2000): A proteasome howdunit: the case of the missing signal. *Cell*: **101**, 341-344.
- 246) Verma R., Chen S., Feldman R., Schieltz D., Yates J., Dohmen J., Deshaies R.J., (2000): Proteasomal proteomics: Identification of nucleotide-sensitive proteasome-interacting proteins by mass spectrometric analysis of affinity-purified proteasomes. *Mol. Biol. of the Cell*: **11**, 3425-3439.
- 247) Vierstra R., Callis J., (1999): polypeptide tags, ubiquitous modifiers for plant protein regulation. *Plant Mol. Biol.*: **41**,435-442.
- 248) Voinnet O., Vain P., Angell S., Baulcombe D., (1998): Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. *Cell* **95**, 177-87
- 249) Voinnet O., Pinto Y., Baulcombe D., (1999): Suppression of gene silencing: A general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *PNAS* **96**, 14147-14152.
- 250) Voinnet O., Lederer C., Baulcombe D.,(2000): A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *N. benthamiana*. *Cell* **103**, 157-167.
- 251) Vom Baur E., Zechel C., Heery D., Heine M., Garnier J., Vivat V., Le Douarin B., Gronemeyer H., Chambon B., Losson R., (1996): Differential ligand-dependent interactions between the AF-2 activating domain of nuclear receptors and the putative transcriptional intermediary factors mSUG1 and TIF1. *EMBO J.*: **15**, 110-124.

- 252) Voorn-Brouwer T., van der Leij I., Hemrika W., Distel B., Tabak H., (1993): Sequence of the PAS8 gene, the product of which is essential for biogenesis of peroxisomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *BBA*, **1216**, 325-328.
- 253) Wang W., Chevray P., Nathans D., (1996): Mammalian Sug1 and c-Fos in the nuclear 26S proteasome. *PNAS*: **93**, 8236-8240.
- 254) Watanabe T., Saito A., Suzuki M., Fujiwara t., Takahashi E., Slaughter C., DeMartino G., Hendil K., Chung C., Tanahashi N., Tanaka k., (1998): cDNA cloning and characterization of a human proteasomal modulator subunit, p27 (PSMD9) *Genomics*: **50**, 241-250.
- 255) Watkins, J.F. et al (1993) : The *Saccharomyces cerevisiae* DNA repair gene RAD23 encodes a nuclear protein containing a ubiquitin-like domain required for biological function. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 7757-7765.
- 256) Weber-Ban E., Reid G., Miranker A., Horwich A., (1999): Global unfolding of a substrate protein by the Hsp100 chaperone ClpA. *Nature*, **401**, 90-93.
- 257) Wei Ning, Deng X., (1999): Making sense of the COP9 signalosome. *TIG*: **15**, 98-103.
- 258) Weissman J., Sigler P., Horwich A., (1995): From the cradle to the grave: ring complexes in the life of a protein. *Science*: **268**, 523-524.
- 259) Whitby F., Masters E., Kramer L., Knowlton R., Yao Y., Wang C., Hill C., (2000): Structural basis for the activation of the 26S proteasomes by 11S regulators. *Nature*: **408**, 115-120.
- 260) Wickner S., Gottesman S., Skowyra D., Hoskins J., McKenney K., Maurizi M., (1994): A molecular chaperone, ClpA functions like DnaK and DnaJ. *PNAS*: **91**, 12218-12222.
- 261) Wilkinson C., Wallace M., Seeger M., Dubiel W., Gordon C., (1997): Mts4, a non-ATPase subunit of the 26S protease in fission yeast is essential for mitosis and interacts directly with the ATPase subunit Mts2. *JBC*: **272**, 25768-25777.
- 262) Wilson D., Whiteheart S., Wiedmann M., Brunner M., Rothman J., (1992): A multisubunit particle implicated in membrane fusion. *JCB*: **117**, 531-538.
- 263) Wolf S., Nagy I., Lupas A., Pfeifer G., Cejka Z., Muller S., Engel A., De Mot R., Baumeister W., (1998): Characterization of ARC, a divergent member of the AAA ATPase family from *Rhodococcus erythropolis*. *J. Mol. Biol.* **277**, 13-25.
- 264) Worley C., Zenser N., Ramos J., Rouse D., Leyser O., Theologis A., Callis J., (2000): Degradation of Aux/IAA proteins is essential for normal auxin signalling. *The Plant Journal* **21**, 553-562.
- 265) Xie D., Feys B., James S., Nieto-Rostro M., Turner J., (1998): Col1: an *arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science*: **280**, 1091-1094.
- 266) Xie Y., Varshavsky A., (2000): Physical association of ubiquitin ligases and the 26S proteasome. *PNAS*: **97**, 2497-2502.
- 267) Xu Q., Singer R., Johnston G., (1995): Sug1 modulates yeast transcription activation by Cdc68. *Mol. Cel. Biol.*: **15**, 6025-6035.
- 268) Yahraus T., Braveman N., Dodt G., Kalish J., Morell J., Moser H., Valle D., Gould S., (1996): The peroxisome biogenesis disorder group 4 gene, PXAAA1, encodes a cytoplasmic ATPase required for stability of the PTS1 receptor. *EMBO J.*: **15**, 2914-2923.
- 269) Yanagi S., Shimbara N., Tamura T., (2000): Tissue and cell distribution of a mammalian proteasomal ATPase, MSS1, and its complex formation with the basal transcription factors. *Bioch. Bioph. Res. Comm.*: **279**, 568-573.

- 270) Yang Y., Waters J., Fruh K., Peterson P., (1992): Proteasomes are regulated by interferon γ : Implications for antigen processing. PNAS: **89**, 4928-4932.
- 271) Yao Y., Huang L., Krutchinsky A., Wong M., Standing K., Burlingame A., Wang C., (1999): Structural and functional characterizations of the proteasome-activating protein PA26 from *Trypanosoma brucei*. JBC: **274**, 33921-33930.
- 272) Yao T., Cohen R., (1999b) : Giant Proteases: Beyond the Proteasome. Current Biology: **9**, 551-553.
- 273) Yewdell J., Bennick J., (2001): Cut and trim: generating MHC class I peptide ligands. Curr. Opin. In Immunology: **13**, 13-18.
- 274) Zhang Z., Clawson A., Rechsteiner M., (1998): The proteasome activator 11S regulator or PA28. JBC: **273**, 30660-30668.
- 275) Zwickl P., Ng D., Woo K., Klenk H., Goldberg A., (1999): An Archaeobacterial ATRase, homologue to ATRases in the eukaryotic 26S proteasome, activates protein breakdown by 20S proteasomes. J.B.C. **274**, 26008-26014.
- 276) Zwickl P., Baumeister W., Steven A., (2000): Dis-assembly lines: the proteasome and related ATPases. Curr. Opi. Struc. Biol. **10**, 242-250.