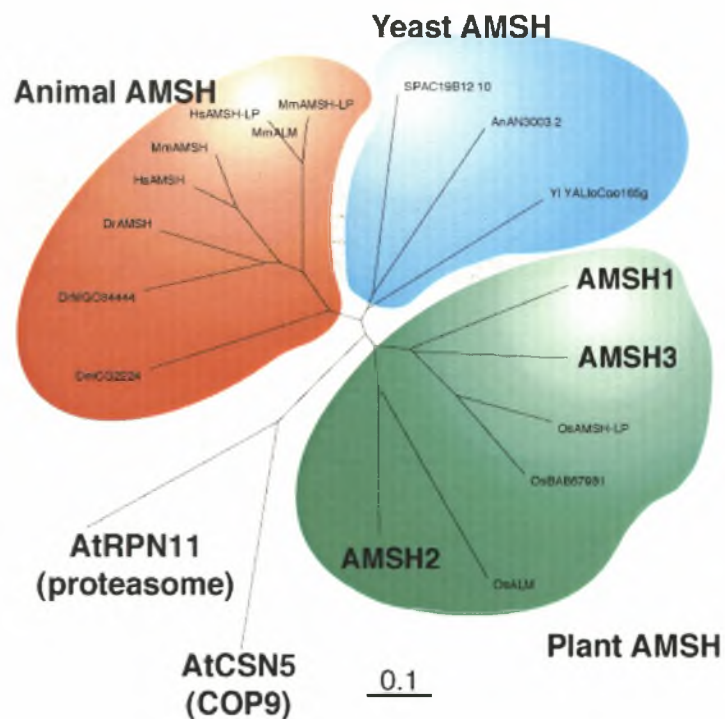


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Διπλωματική εργασία

Η AMSH2 πρωτεΐνη, ένα ένζυμο  
αποουβικουιτινυλίωσης



Ανθή Κατσαρίμπα

Λάρισα 2007



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ**  
**ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 5876/1  
Ημερ. Εισ.: 02-06-2009  
Δωρεά: Π.Θ.  
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ  
2007  
ΚΑΤ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087224

## Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στην εργαστηριακή ομάδα του Dr.Claus Schwechheimer, στο Κέντρο Μοριακής Βιολογίας Φυτών του τμήματος Αναπτυξιακής Γενετικής του Πανεπιστημίου Tübingen της Γερμανίας, στα πλαίσια του προγράμματος Erasmus υπό την επίβλεψη του καθηγητή Claus Schwechheimer που πραγματοποιήθηκε στο χρονικό διάστημα από αρχές Μαρτίου μέχρι τέλος Μαΐου κατά το έτος 2007.

Θα ήθελα αρχικά να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον καθηγητή Κων/νο Σταθόπουλο, ο οποίος με προώθησε για την συμμετοχή στο συγκεκριμένο πρόγραμμα και για τη μεσολάβησή του στον καθηγητή Claus Schwechheimer, ώστε να γίνει δεκτή η αίτησή μου για την πραγματοποίηση της διπλωματικής μου εργασίας στο εργαστήριό του.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον καθηγητή Claus Schwechheimer για την επιστημονική καθοδήγηση, την βοήθεια και την συμπαράσταση κατά την διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας και στην μεταδιδάκτορα Erika Isono για την καθημερινή της καθοδήγηση, τις συμβουλές της τόσο σε θεωρητικά όσο και σε τεχνικά θέματα, την βοήθεια της, την αμέριστη συμπαράστασή της και για την ψυχολογική της στήριξη.

Επίσης θέλω να ευχαριστήσω την καθηγήτρια Marie-Theres Hauser του τμήματος Εφαρμοσμένης Επιστήμης και Βιοτεχνολογίας Φυτών του Πανεπιστημίου Βιέννης για τους κλώνους των ESCRT III πρωτεϊνών.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την βοήθεια τους, την συμπαράσταση και την συνεργασία τους.

### Τριμελής επιτροπή

Claus Schwechheimer	(Επίκουρος καθηγητής Πανεπιστημίου Tübingen)
Κων/νος Σταθόπουλος	(Επίκουρος καθηγητής Τμήματος Β.Β. )
Καλλιόπη Παπαδοπούλου	(Επίκουρος καθηγήτρια Τμήματος Β.Β.)

## Περίληψη

Το σήμα για πολλά κυτταρικά μονοπάτια προέρχεται από την ουβικουϊτινλίωση υποστρωμάτων που συμμετέχουν σε αυτά. Το σήμα αυτό αναστέλλεται από τη δράση των DUB (deubiquitinating) ενζύμων. Τα DUB ένζυμα αποουβικουϊτινυλιώνουν τα ουβικουϊτινυλιωμένα υποστρώματα και αναγεννούν μόρια ουβικουϊτίνης. Μια κατηγορία από DUB ένζυμα περιέχει την MPN καταλυτική περιοχή. Έχει προταθεί ότι η MPN περιοχή προσδίδει ενεργότητα μεταλλοπρωτεάσης. Η AMSH (associated molecule with the SH3 domain of STAM) πρωτεΐνη περιέχει την καταλυτική περιοχή MPN. Η AMSH αλληλεπιδρά με την STAM πρωτεΐνη, η οποία συμμετέχει στο μονοπάτι ενδοκυττάρωσης μεμβρανικών υποδοχέων. Το γονιδίωμα των φυτών *Arabidopsis* κωδικοποιεί τρεις AMSH πρωτεΐνες, τις AMSH1, AMSH2 και AMSH3.

Η καταστολή της έκφρασης του γονιδίου της AMSH2 πρωτεΐνης δεν επηρεάζει το φαινότυπο των φυτών. Η επαγωγή του γονιδίου AMSH2 από τον 35S προαγωγέα οδηγεί στη συσσώρευση της πρωτεΐνης στο κυτταρόπλασμα. Η AMSH2 πρωτεΐνη αναγεννά μονομερή και διμερή μόρια ουβικουϊτίνης από τις K48- και K63 αλυσίδες τετραουβικουϊτίνης. Σύμφωνα με τα δεδομένα από τα θηλαστικά υποθέτουμε ότι οι AMSH πρωτεΐνες των φυτών είναι ένζυμα αποουβικουϊτινυλίωσης, που ρυθμίζουν αρνητικά την εξαρτώμενη από ουβικουϊτινίωση ενδοκύτωση μεμβρανικών υποδοχέων.

## Abstract

The ubiquitination of different substrates is the signal for many cellular pathways. This signal is opposed by the action of deubiquitinating enzymes. The MPN family is a class of deubiquitinating enzymes, which contain the MPN domain. The MPN domain has been proposed to provide the active site for metalloprotease activity. AMSH (associated with the SH3 domain of STAM) is a protein, which contain a MPN catalytic domain. AMSH protein associates with the SH3-domain of STAM, a protein, which regulates receptor sorting to the endosomes. The genome of *Arabidopsis* plants encode three AMSH proteins, AMSH1, AMSH2 and AMSH3 but does not encode the STAM protein.

The loss of AMSH2 protein has no obvious effect on the phenotype of *Arabidopsis thaliana*. When overexpressed, AMSH2 accumulates in the cytosol. Deubiquitinating activity of AMSH2 against K48-linked and K63-linked tetraubiquitin chains is demonstrated, in order to generate di-ubiquitin and free ubiquity. According to the data's from the mammalian we propose that AMSH is a deubiquitinating enzyme, which oppose the ubiquitin-dependent sorting of receptors to lysosomes by interacting with members of the ESCRT III complex.

# Περιεχόμενα

<b>1. Εισαγωγή</b>	6
1.1 Ουβικουιτίνη και DUB ένζυμα	6
1.2 Οι πρωτεΐνες AMSH και το μονοπάτι ενδुकύτωσης μεμβρανικών υποδοχέων	7
1.3 AMSH πρωτεΐνες στα φυτά	10
1.4 Το ESCRT III σύμπλοκο	12
1.5 Δοκιμή διπλού υβριδίου	12
<b>2. Σκοπός πειραματικής διαδικασίας</b>	14
<b>3. Υλικά και μέθοδοι</b>	15
3.1 Ανάπτυξη φυτών	15
3.1.1 Υλικά	16
3.2 Κυτταρικός εντοπισμός πρωτεΐνης με μικροσκόπιο συνεστίασης	16
3.3 Βακτηριακή έκφραση και καθαρισμός ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών	17
3.3.1 Εξισορρόπηση των σφαιριδίων G-σεφαρόζης	19
3.3.2 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμιδίου	20
3.3.3 Υλικά	21
3.4 Προσδιορισμός αποουβικουιτινυλίωσης	22
3.4.1 Αποτύπωση Western και ECL ανοσοανίχνευση μορίων ουβικουιτίνης	22
3.4.2 Χρωματομετρική ανίχνευση των πρωτεϊνών με αλκαλική φωσφατάση	23
3.4.3 Υλικά	24
3.5 Προσδιορισμός αποουβικουιτινυλίωσης με αναστολείς πρωτεασών	25
3.6 Σύστημα δοκιμής διπλού υβριδίου	26
3.6.1 Κατασκευές για την δοκιμή του διπλού υβριδίου	26
3.6.1.1 Ενίσχυση γονιδιακού τύπου με PCR με εξειδικευμένους εκκινητές	29
3.6.1.2 Επεξεργασία των ενισχυμένων γονιδίων με περιοριστικά ένζυμα	29
3.6.1.3 Απομόνωση ζώνης DNA από πήκτωμα αγαρόζης	30
3.6.1.4 Αντίδραση λιγάσης	30
3.6.1.5 Μετασχηματισμός σε επιδεκτικά κύτταρα	31
3.6.1.6 PCR αποικιών	32
3.6.1.7 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας με αλκαλική λύση (minpreps)	33
3.6.1.8 Προσδιορισμός αλληλουχίας	34
3.6.2 Επιδιόρθωση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων	35
3.6.3 Μετασχηματισμός των κατασκευών σε ζύμες	38

3.6.4	Διασταύρωση ζυμών	38
3.6.5	Δοκιμή διπλού υβριδίου	39
3.6.6	Υλικά και διαλύματα	39
<b>4.</b>	<b>Αποτελέσματα</b>	41
4.1	Η επιρροή της απώλειας της πρωτεΐνης AMSH2 στον φαινότυπο των φυτών	41
4.2	Κυτταρικός εντοπισμός της πρωτεΐνης AMSH2	42
4.3	Προσδιορισμός αποουβικουιτινυλίωσης	43
4.4	Προσδιορισμός αποουβικουιτινυλίωσης με αναστολείς	45
4.5	Εμπλοκή των AMSH πρωτεϊνών στο μονοπάτι ενδοκύτωσης υποδοχέων της πλασματικής μεμβράνης	46
<b>5.</b>	<b>Συζήτηση</b>	54
	Παράρτημα	56
<b>6.</b>	<b>Βιβλιογραφία</b>	58

# 1. Εισαγωγή

## 1.1 Ουβικουιτίνη και DUB ένζυμα

Μια σημαντική παράμετρος πολλών κυτταρικών μηχανισμών είναι η σύνδεση ουβικουιτίνης σε πρωτεΐνες. Η ουβικουιτίνη είναι ένα εξελικτικά σταθερό πολυπεπίδιο αποτελούμενο από 76 αμινοξέα που βρίσκεται μόνο στα ευκαρυωτικά κύτταρα και έχει τη μοναδική ικανότητα να ενώνεται αντιστρεπτά με άλλες κυτταρικές πρωτεΐνες. Η σύζευξη αυτή συμβάλλει σε πολλές βιολογικές διεργασίες, όπως την εμβρυϊκή ανάπτυξη, τον κυτταρικό κύκλο, τον έλεγχο της ανάπτυξης και την παρεμπόδιση του εκφυλισμού των νευρώνων. Ωστόσο, ο πιο διαδεδομένος μηχανισμός της δραστηριότητας της ουβικουιτίνης είναι συνδεδεμένος με την αποικοδόμηση πρωτεϊνών. Η σύνδεση πολλών μορίων ουβικουιτίνης οδηγεί ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες στο πρωτεάσωμα για αποικοδόμηση, ενώ η σύνδεση ενός μορίου ουβικουιτίνης, προκαλεί την ενδοκυττάρωση πρωτεϊνών της πλασματικής μεμβράνης.

Η ουβικουιτινυλίωση αναφέρεται στη μετά-μεταφραστική τροποποίηση μιας πρωτεΐνης, που προκαλείται από την ομοιοπολική σύνδεσή της με ένα ή περισσότερα μόρια ουβικουιτίνης. Συγκεκριμένα, ουβικουιτινυλίωση είναι ο σχηματισμός ενός ισοπεπτιδικού δεσμού μεταξύ της ομάδας λυσίνης ενός υποστρώματος και της COOH-ομάδας του καρβοξυτελικού άκρου της γλυκίνης της ουβικουιτίνης. Η προσθήκη ενός μορίου ουβικουιτίνης ονομάζεται μόνο-ουβικουιτινυλίωση. Επειδή το μόριο της ουβικουιτίνης έχει επτά λυσίνες, οι οποίες μπορούν να αποτελέσουν υπόστρωμα για έναν ισοπεπτιδικό δεσμό, μπορεί να σχηματιστεί μια πολύ-ουβικουιτινική αλυσίδα. Η πολύ-ουβικουιτινυλίωση μπορεί να έχει διάφορες μορφές ανάλογα με ποιες λυσίνες έχουν συμβάλλει στην δημιουργία ισοπεπτιδικού δεσμού. Όλες οι λυσίνες (K6, 11, 27, 29, 33, 48 και 66) μπορούν να αποτελέσουν υπόστρωμα για αλυσίδα ουβικουιτίνης, αλλά οι πιο συχνοί σύνδεσμοι που δημιουργούνται στις αλυσίδες χρησιμοποιούν τις λυσίνες K48 και K63. Η K48 αλυσίδα, αποτελεί το σήμα για την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών από το πρωτεάσωμα, ενώ η K63 αλυσίδα εμπλέκεται στο μονοπάτι ενδοκύτωσης πρωτεϊνών της πλασματικής μεμβράνης και στην επιδιόρθωση του DNA.

Αν και υπάρχουν μια σειρά από ένζυμα που κατευθύνουν τη σύνδεση μορίων ουβικουιτίνης σε υποστρώματα, υπάρχουν και πολλά άλλα που αντιστρέφουν αυτή τη διαδικασία. Τα ένζυμα αυτά ονομάζονται DUB (deubiquitinating enzymes) και ανήκουν στην υπερκογένεια των πρωτεασών. Τα DUB είναι υπεύθυνα για την αρνητική ρύθμιση της αποικοδόμησης πρωτεϊνών και για τη διατήρηση της πρωτεόλυσης σε φυσιολογικά επίπεδα συμβάλλοντας στην αναγέννηση ελεύθερων μορίων ουβικουιτίνης μέσα στο



κύτταρο. Τα DUB ένζυμα είναι επίσης υπεύθυνα για την επεξεργασία ανενεργών πρόδρομων μορίων ουβικουιτίνης και για τη διατήρηση του 26S πρωτεασώματος ελεύθερο από μη αγκυροβολημένες αλυσίδες ουβικουιτίνης.

Μία κατηγορία των DUB ενζύμων είναι η οικογένεια των πρωτεϊνών με την MPN+ περιοχή (Mpr/Pad1/N-terminal). Η MPN περιοχή είναι μια καταλυτική περιοχή που προσδίδει ιδιότητα μεταλλοπρωτεάσης. Περιέχει δύο συντηρημένα κατάλοιπα ιστιδίνης και ένα κατάλοιπο ασπαρτικού οξέος, τα οποία δεσμεύουν ένα ιόν ψευδαργύρου, σημαντικό για την πρωτεολυτική δραστηριότητα. Η οικογένεια αποτελείται από τρία μέλη, τις CSN5, RPN11 και AMSH πρωτεΐνες. Η CSN5 είναι υπομονάδα του COP9 σώματος σηματοδότησης (signalosome) και είναι υπεύθυνη για τη αποσύζευξη του όμοιου με ουβικουιτίνη μορίου Nedd8 από την SCF λιγάση ουβικουιτίνης. Η RPN11 είναι μία υπομονάδα του 26S πρωτεασώματος και είναι υπεύθυνη για την αποσύζευξη μορίων ουβικουιτίνης από υποστρώματα του πρωτεασώματος. Η δραστηριότητα αποσύζευξης του μορίου Nedd8 και αποουβικουιτινυλίωσης των CSN5 και RPN11 αντίστοιχα έχουν μελετηθεί εκτεταμένα. Σε αντίθεση, οι AMSH πρωτεΐνες (Associated Molecule of the SH3 domain of STAM) είναι μία άγνωστη πρωτεΐνη με δράση ενζύμου DUB που έχει εντοπιστεί στα θηλαστικά (McCullough *et al.* 2004). Παρόλα αυτά, η πρωτεΐνη AMSH είναι το μοναδικό μέλος ανάμεσα στις πρωτεΐνες της MPN οικογένειας με αυτοτελή εκδήλωση μετρήσιμης δραστηριότητας ισοπεπτιδάσης. Οι CSN5 και RPN11 πρέπει να είναι ενσωματωμένες στα πολυπρωτεϊνικά τους σύμπλοκα για να εκδηλώσουν οποιαδήποτε δραστηριότητα.

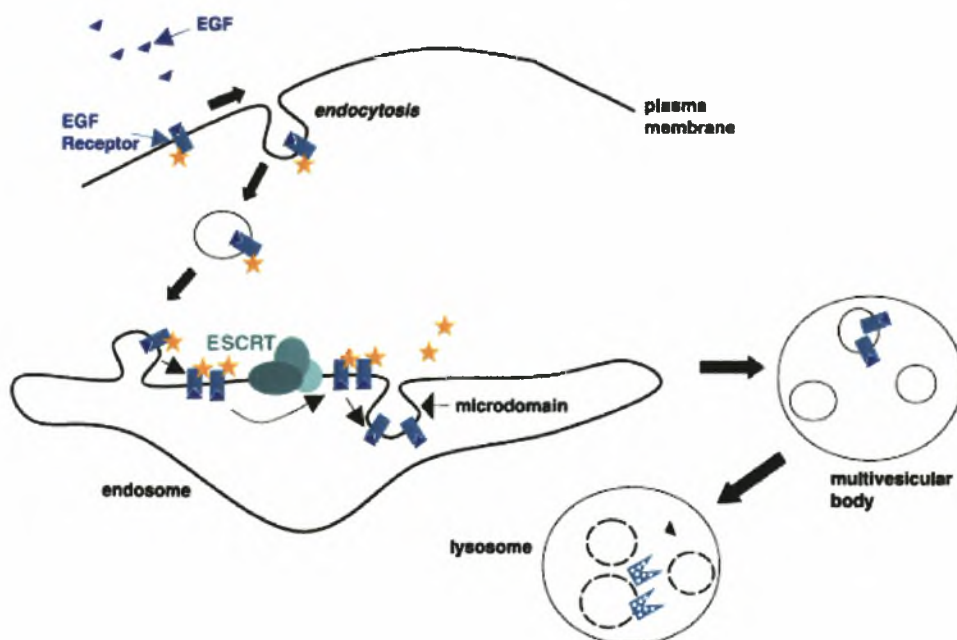
## 1.2 Οι πρωτεΐνες AMSH και το μονοπάτι ενδοκύτωσης μεμβρανικών υποδοχέων

Στα θηλαστικά οι πρωτεΐνες AMSH, αναγνωρισμένες ως DUB ένζυμα, εντοπίζονται στα ενδοσώματα και εμπλέκονται στην ενδοκύτωση υποδοχέων της πλασματικής μεμβράνης που καταλήγουν στα λυσοσώματα για αποικοδόμηση.

Το μονοπάτι ενδοκύτωσης αρχίζει με την εσωτερίκευση των πρωτεϊνών της πλασματικής μεμβράνης μέσα σε κυστίδια και ακολουθούν πολλαπλά γεγονότα ταξινόμησης των πρωτεϊνών στα πρόδρομα ενδοσώματα. Έπειτα, οι πρωτεΐνες είτε θα ανακυκλωθούν και θα επιστρέψουν στη μεμβράνη ή θα οδηγηθούν στα λυσοσώματα για αποικοδόμηση, με τη συλλογή των κυστιδίων στο πολύ-κυστιδιακό σωματίο MVB (multivesicular body). Η ενδοκύτωση των περισσότερων μεμβρανικών υποδοχέων των θηλαστικών και των ζυμών εξαρτάται από τη δράση της ουβικουιτίνης. Η μονοουβικουιτινυλίωση των υποδοχέων, καθοδηγούμενη από μια E3 λιγάση, αποτελεί σήμα

συναρμολόγησης που αλληλεπιδρά με πολλούς παράγοντες στα πρώιμα ενδοσώματα, στοχεύοντας τους υποδοχείς στο εσωτερικό του MVB σωματίου, το οποίο είναι το πρώτο βήμα για την καθοδήγηση των πρωτεϊνών στα λυσοσώματα. Η συναρμολόγηση των κυστιδίων στο MVB απαιτεί συντηρημένα μόρια, τα οποία είναι γνωστά ως τάξη των E Vps (vacuolar protein sorting) πρωτεϊνών. Αυτές οι Vps πρωτεΐνες είναι διαχωρισμένες σε τρία ετερομερικά σύμπλοκα που ονομάζονται ESCRT I, ESCRT II και ESCRT III (Endosomal Sorting Complex Required for transport).

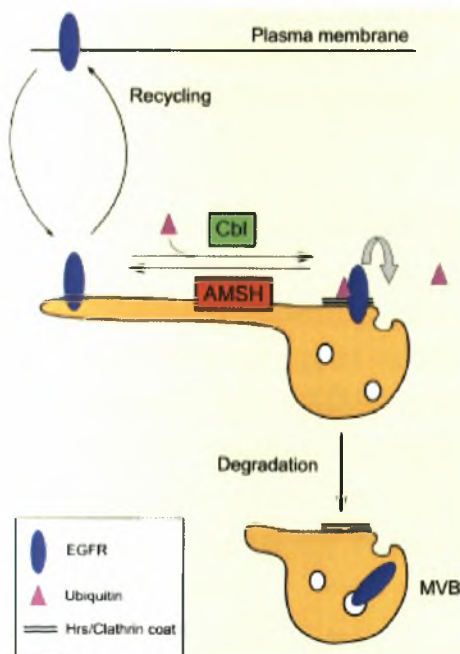
Τα μόρια ουβικουιτίνης στους υποδοχείς ή στα κυστίδια αναγνωρίζονται από το σύμπλοκο Vps 27 συνδεδεμένο με κενωτοπική πρωτεΐνη συναρμολόγησης και το συναρμολογούμενο σύμπλοκο αγκυροβολεί σε πρώιμα ενδοσώματα. Το Vps27 σύμπλοκο και τα ουβικουιτινυλιωμένα υποστρώματα αλληλεπιδρούν αρχικά με το ESCRT I σύμπλοκο στη συνέχεια μεταβιβάζονται στο ESCRT II σύμπλοκο και τελικά στο ESCRT III σύμπλοκο, το οποίο συγκεντρώνει τα κυστίδια στα ώριμα ενδοσώματα (MVB). Τέλος, μια επιπρόσθετη ομάδα από E VPS πρωτεΐνες αποσυνδέουν το ESCRT σύμπλοκο από τη μεμβράνη των ενδοσωμάτων, επιτρέποντας στα κυστίδια να απελευθερώσουν τους υποδοχείς μέσα στο MVB σώμα. (εικ.1).



**Εικόνα 1:** Μονοπάτι ενδοκύτωσης του EGF μεμβρανικού υποδοχέα. Ο αστερίσκος αντιστοιχεί σε μόριο ουβικουιτίνης.

Τα DUB ένζυμα μπορεί να δράουν στο επίπεδο των ενδοσωμάτων για να αντικρούσουν την δράση της E3 λιγάσης ή για να ανακυκλώσουν τα μόρια ουβικουιτίνης, που έχουν συνδεθεί στους υποδοχείς. Έχει προταθεί ότι οι AMSH πρωτεΐνες ρυθμίζουν αρνητικά την ενδοκύτωση των πλασματικών υποδοχέων.

Οι AMSH αλληλεπιδρούν με την SH3 περιοχή της STAM, συστατικό του MVB μονοπατιού, που είναι συνδεδεμένη με την Hrs. Το Hrs-STAM σύμπλοκο παρέχει την πρώτη ένδειξη της εμπλοκής της ουβικουιτινυλίωσης των υποδοχέων στην ενδοκύτωσή τους και μέσω σύνδεση της Hrs σε κλαθρίνη μπορεί να προωθεί τη συγκέντρωση των υποδοχέων στα ειδικά ενδοσωμικά κυστίδια κλαθρίνης. Η Hrs είναι υπεύθυνη για τη στρατολόγηση των υπόλοιπων συστατικών του MVB σωματίου και κυρίως του ESCRT I συμπλέγματος. Οι AMSH επηρεάζουν αρνητικά τη ρύθμιση της ενδοκύτωσης μέσω αποουβικουιτινυλίωσης. Το προτεινόμενο μοντέλο της επιρροής των AMSH στην ενδοκύτωση του EGFR υποδοχέα απεικονίζεται στην εικόνα 2. Η E3 λιγάση Cbl προωθεί την αποικοδόμηση των EGFR υποδοχέων μέσω ουβικουιτινυλίωσης των υποδοχέων. Ενδοσωμικά DUB ένζυμα, όπως τα AMSH, αντιστρέφουν αυτή την πορεία και εμποδίζουν τη συσσώρευση των υποδοχέων στα λυσοσώματα.



**Εικόνα 2:** Προτεινόμενο μοντέλο για τη λειτουργία των AMSH: AMSH προωθεί την ανακύκλωση των EGFR υποδοχέων αντιτιθέμενος στη δραστηριότητα της Cbl E3-λιγάσης. Το μοντέλο επεξηγεί τον προτεινόμενο φυσιολογικό ρόλο της AMSH πρωτεΐνης στα ενδοσώματα: φωσφορυλιωμένοι EGFR υποδοχείς στρατολογούν την E3-λιγάση c-Cbl, που διευθετεί την ουβικουιτινυλίωσή τους. Οι ουβικουιτινυλιωμένοι EGFR διαχωρίζονται από το στρώμα κλαθρίνης, στο οποίο έχουν προσηλωθεί χάρη στην Hrs πρωτεΐνη, και τελικά μετατοπίζονται στα εσωτερικά κυστίδια του MVB σώματος. Οι AMSH πρωτεΐνες εξισορροπούν τη δράση της Cbl μέσω αποουβικουιτινυλίωσης των υποδοχέων και ως αποτέλεσμα την αφαίρεση και την ανακύκλωση της ουβικουιτίνης.

### 1.3 AMSH πρωτεΐνες στα φυτά

Το φυτό *Arabidopsis* περιέχει 3 πρωτεΐνες ομόλογες με τις DUB πρωτεΐνες AMSH των θηλαστικών. Αυτές οι πρωτεΐνες έχουν ονομαστεί AMSH1, AMSH2 και AMSH3 και παρουσιάζουν μεγάλο βαθμό ομολογίας στην καταλυτική τους MPN περιοχή, χάρη στην οποία έχουν χαρακτηριστεί και ως DUB ένζυμα.

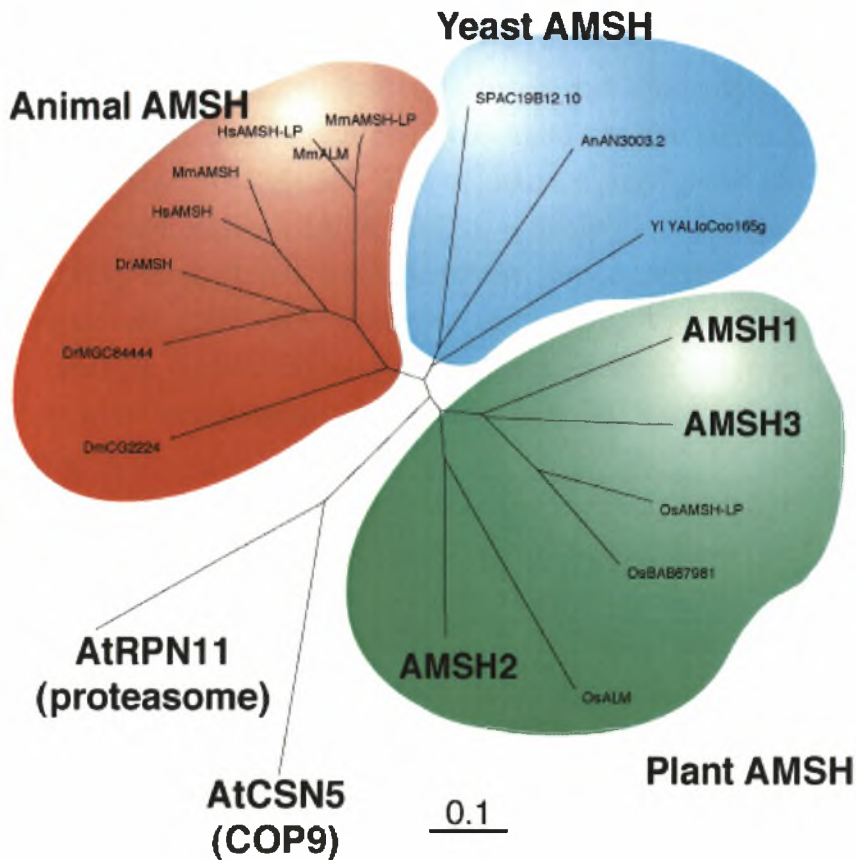
Παρόλο που είναι αρκετά συντηρημένες μεταξύ τους, η AMSH2 πρωτεΐνη είναι μικρότερη σε μέγεθος. Οι AMSH1 και AMSH3 είναι περίπου 1,5 kb ενώ η AMSH2 περίπου 0,67 kb. Η πρωτεΐνη AMSH2 έχει μικρότερη αμινοτελική περιοχή από τις άλλες δύο AMSH πρωτεΐνες (εικ.3).

Σύμφωνα με τη φυλογενετική ανάλυση (εικ. 4) των πρωτεϊνών AMSH στα φυτά, στα ζώα και στις ζύμες, οι AMSH των φυτών είναι πολύ πιο συντηρημένες μεταξύ τους από ότι με αυτές των θηλαστικών και των ζυμών. Η ανάλυση δείχνει επίσης ότι τα ένζυμα AMSH και τα άλλα δύο μέλη της MPN οικογένειας, οι RPN 11 και COP9 πρωτεΐνες, προέρχονται από έναν κοινό πρόγονο.



Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση των ακολουθιών των τριών AMSH πρωτεϊνών

Στα φυτά δεν υπάρχουν οι συντηρημένες πρωτεΐνες STAM και Hrs με τις οποίες αλληλεπιδρούν οι AMSH πρωτεΐνες των θηλαστικών. Αυτό σημαίνει ότι το προτεινόμενο μοντέλο της εμπλοκής των AMSH στην ενδοκύτωση πλασματικών υποδοχέων δεν μπορεί να αναχθεί και στα φυτά. Θα πρέπει να υπάρχουν άλλες πρωτεΐνες, με τις οποίες θα αλληλεπιδρούν, αν οι πρωτεΐνες AMSH συμμετέχουν σε αυτό το μονοπάτι.



**Εικόνα 4:** Φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των πρωτεϊνών AMSH των φυτών, των ζώων και των ζυμών και των CSN5 και RPN11 πρωτεϊνών.

Τα αποτελέσματα της τεχνικής σάρωσης με δοκιμή διπλού υβριδίου προτείνουν ότι η ομόλογη της AMSH πρωτεΐνης στη *Drosophila* μπορεί να αλληλεπιδρά με συστατικά του ESCRT III συμπλόκου. Επίσης έχει βρεθεί ότι η AMSH των θηλαστικών αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη Vps24, μέλος του ESCRT III συμπλόκου. Σύμφωνα με αυτά τα δεδομένα, οι πιθανές πρωτεΐνες αλληλεπίδρασης με τις πρωτεΐνες AMSH των φυτών είναι τα μέλη του ESCRT III συμπλόκου. Η αλληλεπίδραση μπορεί να ερευνηθεί με δοκιμή διπλού υβριδίου.

## 1.4 Το ESCRT III σύμπλοκο

Το ESCRT III σύμπλοκο αποτελείται το λιγότερο από τέσσερις συντηρημένες, μικρές coiled coil πρωτεΐνες με ένα βασικό N-τελικό άκρο και ένα όξινο C-τελικό άκρο. Τα μέλη που απαρτίζουν το ESCRT III σύμπλοκο περιέχουν μία SNF7 (sucrose nonfermenting) περιοχή περίπου 160 αμινοξέα, η οποία είναι μια διαδοχή από διακριτές περιοχές αλληλεπίδρασης coiled coil πρωτεϊνών. Φυλογενετικές αναλύσεις οδήγησαν στην ταξινόμηση των SNF7 πρωτεϊνών σε έξι ομάδες Vps2, Vps20, SNF7, Vps24, Vps46 και Vps60, οι οποίες έχουν χαρακτηριστεί έτσι βάσει της κύριας τους Vps πρωτεΐνης. Στα φυτά *Arabidopsis* κάθε ομάδα των SNF7 πρωτεϊνών αποτελείται από τουλάχιστον τρία μέλη.

Οι VPS20 και SNF7 είναι γνωστές ως σύμπλοκο “πυρήνας” και οι VPS2 και VPS24 ως σύμπλοκο “στρώμα”. Τα σύμπλοκα αυτά είναι συνδεδεμένα με την ενδοσωμική μεμβράνη. Οι πρωτεΐνες VPS46 και VPS60 αλληλεπιδρούν με την VPS4. Η VPS4 πρωτεΐνη είναι μια ΑΤΡαση, συνδεδεμένη με μια ποικιλία από κυτταρικές δραστηριότητες (AAA-type). Η πρωτεΐνη αυτή είναι ένας από τους τελευταίους παράγοντες που στρατολογούνται από τις ESCRT III πρωτεΐνες. Η VPS4 πρωτεΐνη δρα στη σύνδεση, στην καταλυτική δράση και στην πυροδότηση της αποσυναρμολόγησης του ESCRT III συμπλόκου και στην απελευθέρωση της συνδεδεμένης με την μεμβράνη SNF7 πρωτεΐνης στο κυτταρόπλασμα για περαιτέρω κύκλους συναρμολόγησης.

## 1.5 Δοκιμή διπλού υβριδίου

Η εμπλοκή των πρωτεϊνών AMSH στην ενδοκυττάρωση μεμβρανικών υποδοχέων εξετάζεται με την εύρεση πρωτεϊνών αυτού του μονοπατιού που αλληλεπιδρούν με τις AMSH πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες του ESCRT III συμπλόκου είναι υποψήφιες για αλληλεπίδραση, σύμφωνα με τα δεδομένα ότι οι AMSH των θηλαστικών και της *Drosophila* αλληλεπιδρούν με VPS πρωτεΐνες αυτού του συμπλόκου.

Η αλληλεπίδραση μεταξύ των μελών του ESCRT III συμπλόκου και των πρωτεϊνών AMSH εξετάζεται με την δοκιμή του διπλού υβριδίου. Το σύστημα της δοκιμής αυτής ερευνά την αλληλεπίδραση μεταξύ δύο πρωτεϊνών, σχηματίζοντας δύο υβριδικές πρωτεΐνες, από τις οποίες η μία φέρει μια περιοχή σύνδεσης στο DNA και η άλλη μία περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής. Αυτό επιτυγχάνεται με τη συγχώνευση των κατάλληλων σε κάθε περίπτωση κωδικών αλληλουχιών της πρωτεΐνης με την κάθε περιοχή, κλωνοποιώντας τα γονίδια των πρωτεϊνών που μελετούνται για αλληλεπίδραση στον κατάλληλο φορέα και επάγοντας στη συνέχεια την έκφραση των χιμαιρικών

γονιδίων που προκύπτουν. Αν οι δύο πρωτεΐνες φυσιολογικά αλληλεπιδρούν τότε θα αλληλεπιδράσουν και οι υβριδικές πρωτεΐνες. Οι υβριδικές πρωτεΐνες με την περιοχή πρόσδεσης στο DNA συνδέονται σε ένα γονίδιο αναφοράς, το οποίο έχει έναν υποκινητή. Αυτό το γονίδιο εκφράζεται αν η δεύτερη υβριδική πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με την πρώτη, έτσι ώστε η περιοχή ενεργοποίησης να έρθει κοντά στον υποκινητή, να συνδεθεί με την RNA πολυμεράση και να ξεκινήσει η μεταγραφή του γονιδίου αναφοράς. Είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί οποιοδήποτε γονίδιο ως γονίδιο αναφοράς, αρκεί το προϊόν του να ανιχνεύεται εύκολα.

## 2. Σκοπός της πειραματικής εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να χαρακτηριστεί ο ρόλος και η λειτουργία των DUB ενζύμων στα φυτά, και συγκεκριμένα των AMSH πρωτεϊνών. Για το λόγο αυτό, θα εξεταστεί η επίδραση της απώλειάς τους στο φαινότυπο, ο εντοπισμός τους, η ενζυμική τους δραστηριότητα και η αλληλεπίδρασή τους με άλλα μόρια.

Είναι ενδιαφέρον να εξετασθεί ο ρόλος αυτών των AMSH πρωτεϊνών στα φυτά, επειδή σε αντίθεση με τα θηλαστικά και τις ζύμες, τα φυτά δεν περιέχουν τις πρωτεΐνες STAM και Hrs και η εμπλοκή της ουβικουτινίωσης/αποουβικουτινίωσης στο μονοπάτι της ενδοκύτωσης μεμβρανικών υποδοχέων δεν έχει μελετηθεί ακόμα. Αυτό σημαίνει ότι το προτεινόμενο μοντέλο της εμπλοκής των AMSH στην ενδοκύτωση πλασματικών υποδοχέων δεν μπορεί να αναχθεί και στα φυτά. Θα πρέπει να υπάρχουν άλλες πρωτεΐνες, με τις οποίες θα αλληλεπιδρούν, αν οι πρωτεΐνες AMSH συμμετέχουν σε αυτό το μονοπάτι. Για να μπορέσει να προταθεί ένα μοντέλο για το μονοπάτι της ενδοκύτωσης με τη συμμετοχή των AMSH στα φυτά, θα πρέπει να εξεταστεί η ενζυμική τους δραστηριότητα καθώς και να εντοπιστούν οι πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρούν.

Τα πειράματα θα διεξαχθούν για την πρωτεΐνη AMSH2. Η AMSH2 είναι μικρότερη σε μέγεθος από τις άλλες δύο πρωτεΐνες. Παρόλο που περιέχει την καταλυτική MPN περιοχή και θα πρέπει να συμπεριφέρεται ως DUB ένζυμο, η λειτουργία του μπορεί να διαφέρει από τα άλλα DUB ένζυμα, λόγω της έλλειψης κάποιων αλληλουχιών της αμινοτελικής περιοχής. Οι αλληλουχίες αυτές μπορεί να περιέχουν σημαντικές καταλυτικές περιοχές. Η απουσία αυτών των καταλυτικών περιοχών από την πρωτεΐνη AMSH2 μπορεί να είναι η αιτία για την διαφορετική της συμπεριφορά από τις άλλες δύο AMSH πρωτεΐνες.



### 3. Υλικά και μέθοδοι

- Όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από την εταιρία SIGMA.
- BamHI, SalI, NdeI, NcoI, Sma (Fermentas)
- T<sub>4</sub> DNA πολυμεράση (Fermentas)
- T<sub>4</sub> λιγάση (Fermentas)
- Klenow Fragment (Fermentas)
- G-sepharose (Amersham Biosciences)
- Prescission protease (GE Healthcare)
- Αλυσίδες τετραουβικουϊνής (Bost on Biochemistry)
- NEM, 1.10 Penanthroline (SIGMA)
- NuPAGE 12% SDS Page (Invitrogen)
- ECL αντιδραστήρια (GE Healthcare)
- AP αντίσωμα (SIGMA)
- BCIP και NBT (Fermentas)
- PVDF μεμβράνη (Millipore)
- Χαρτιά Whatmann (Whatmann)
- pGEX6P1 φορέας (GE Healthcare)
- pGBKT7, pGADT7 φορείς (Clontech)
- Όλοι οι εκκινητές (Invitrogen)

#### 3.1 Ανάπτυξη φυτών

Για να ελέγξουμε την επίδραση της απώλειας της πρωτεΐνης AMSH2, ελέγχουμε τον φαινότυπο μεταλλαγμένων φυτών ως προς την πρωτεΐνη, συγκρίνοντας τον με αυτόν ενός άγριου τύπου. Τα φυτά που εξετάστηκαν ήταν 3<sup>ης</sup> γενιάς, όπου τα γονίδια βρίσκονται σε ομόζυγη κατάσταση. Ο οικότυπος είναι Lansberg. Για την άριστη ανάπτυξη των φυτών, θα πρέπει οι σπόροι που συλλέγονται να αποστειρωθούν επιφανειακά. Η αποστείρωση θα μειώσει την πιθανότητα ανάπτυξης μυκήτων και άλλων μικροοργανισμών.

Οι σπόροι αποστειρώνονται με μια σειρά από πλύσεις. Αρχικά εμβαπτίζονται σε 1 ml KOCl με 0.5 ml Silvet και αναδεύονται για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την ανάδευση οι σπόροι αφήνονται να καθιζάνουν, αφαιρείται το KOCl και προστίθεται 1 ml 70% EtOH. Μετά από 1 min ανακίνηση αφαιρείται η αιθανόλη και οι σπόροι

ξεπλένονται 4 με 5 φορές με 1 ml αποστειρωμένο νερό. Στη συνέχεια οι σπόροι αφήνονται να καθιζάνουν.

Οι αποστειρωμένοι σπόροι επαναδιαλύονται σε 1 ml αποστειρωμένο νερό και επιστρώνονται σε τριβλύα με GM θρεπτικό μέσο. Τα τρυβλία διατηρούνται για 2 μέρες στους 4°C και κατόπιν μεταφέρονται σε θάλαμο ανάπτυξης υπό συνεχές φως για 7-10 μέρες. Τα φυτά που αναπτύσσονται ως πράσινα φυτάρια μεταφέρονται σε καλά διαβρεγμένο κατάλληλο οργανικό υπόστρωμα (έδαφος) όπου συνεχίζουν να αναπτύσσονται.

### 3.1.1 Υλικά

#### GM θρεπτικό μέσο

Murashige & Skoog Medium	4.2g
MES	0.5g
Sucrose	10g

- διάλυση σε 1 liter H<sub>2</sub>O
- ρύθμιση pH σε 5.7 με KOH
- προσθήκη 8g Bacto Agar

## 3.2 Κυτταρικός εντοπισμός της πρωτεΐνης με μικροσκοπία συνεστίασης

Για τον κυτταρικό εντοπισμό των AMSH2 πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν μετασχηματισμένοι πρωτοπλάστες από *Arabidopsis thaliana* με τον ανασυνδυασμένο με το γονίδιο AMSH2 pEI32 φορέα και με το γονίδιο AMSH2axa pEI35 φορέα.

15 ml LB θρεπτικού μέσου εμβολιάζονται με μετασχηματισμένα με τους ανασυνδυασμένους φορείς βακτήρια, επωάζονται στους 37°C υπό ανάδευση στα 250rpm για 12-16 ώρες. Η καλλιέργεια χρησιμοποιήθηκε για πλασμιδιακή απομόνωση μεσαίας κλίμακας σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Jet star kit (Genomed). Το πλασμιδιακό DNA χρησιμοποιείται για μετασχηματισμό σε πρωτοπλάστες.

### 3.3 Έκφραση των ανασυνδυασμένων γονιδίων AMSH2 και AMSH2axa σε βακτήρια και ο καθαρισμός των πρωτεϊνών

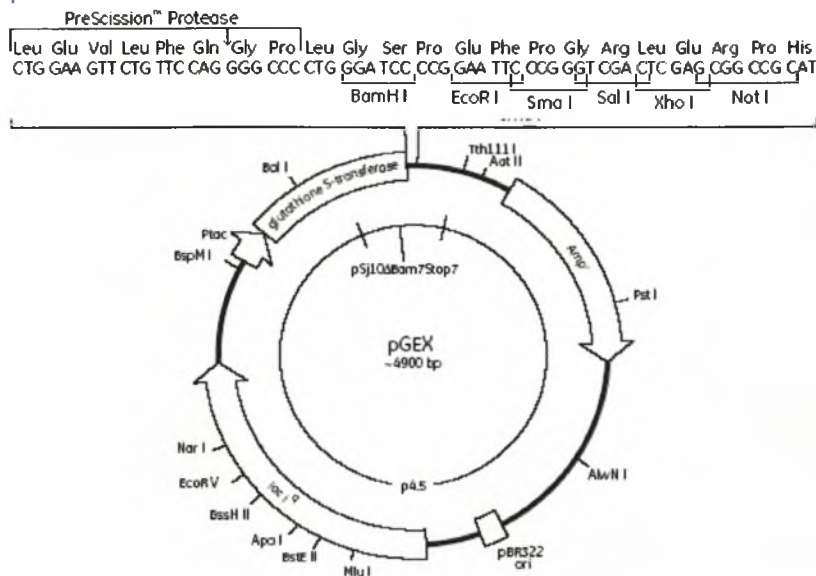
Οι GST-AMSH2 και GST-AMSH2axa εκφράστηκαν σε Rosetta *E. coli* και καθαρίστηκαν με G-Sepharose σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή.

Οι ASMSH2 και AMSH2axa πρωτεΐνες συντήχθηκαν με γλουταθειόνη-θειο-τρανσφεράση (GST) κλωνοποιώντας τα γονίδια των πρωτεϊνών στο φορέα pGEX6P1 (εικ.5). Ο φορέας φέρει μετά την GST μία θέση prescission protease, η οποία μετά την κλωνοποίηση θα βρίσκεται ενδιάμεσα στην πρωτεΐνη AMSH και την GST. Η έκφραση της πρωτεΐνης από το pGEX πλασμίδιο βρίσκεται υπό τον έλεγχο του *tac* υποκινητή, ο οποίος επάγεται από το ανάλογο της λακτόζης ισοπρόπυλο β-γαλακτοσιδάση, IPTG (isopropyl b-D-thiogalactoside).

Οι συντηγμένες εκφραζόμενες πρωτεΐνες απομονώνονται με χρωματογραφία συγγένειας με τη χρήση σφαιριδίων G-Sepharose. Για την απομόνωση της καθαρής πρωτεΐνης AMSH στο διάλυμα πρέπει να προστεθεί μια prescission protease. Η prescission protease θα αποκόψει την πρωτεΐνη AMSH από την GST και η AMSH πρωτεΐνη μπορεί στη συνέχεια να εκλουστεί. Στο διάλυμα έκλυσης εκτός από την καθαρή πρωτεΐνη θα υπάρχει και η πρωτεάση, η οποία μπορεί να διαπεράσει το φίλτρο λόγω του μικρού μεγέθους. Η παρουσία της πρωτεάσης θα παρεμποδίσει τη δράση της πρωτεΐνης καθώς και άλλων μορίων κατά τη διάρκεια μιας αντίδρασης. Γι αυτό το λόγο, η πρωτεάση είναι επίσης συντηγμένη με ένα μόριο GST. Η GST-πρωτεάση θα συνδεθεί λόγω συγγένειας με σφαιρίδια G-Sepharose, εφόσον έχει αποκόψει την πρωτεΐνη AMSH, και θα συγκρατηθεί από το φίλτρο. Τα σφαιρίδια λόγω του μεγάλου μεγέθους δεν διαπερνούν το φίλτρο και ότι έχει συνδεθεί σε αυτές λόγω αχιστείας θα παραμείνει στη στήλη. Έτσι στο διάλυμα έκλυσης θα υπάρχει μόνο η AMSH πρωτεΐνη.

Μια προκαλλιέργεια 10 ml μετασχηματισμένων βακτηρίων με τα πλασμίδια με τα ανασυνδυασμένα γονίδια GST-AMSH2 και GST-AMSH2axa μεταγγίζονται σε 1 l LB θρεπτικού μέσου με αμπικιλίνη (50 μg/l) και χλωραμφενικόλη (25μg/l) επωάζονται στους 37°C υπό ανάδευση (250 rpm) για 3 ώρες.

**pGEX-6P-1** (27-4597-01)

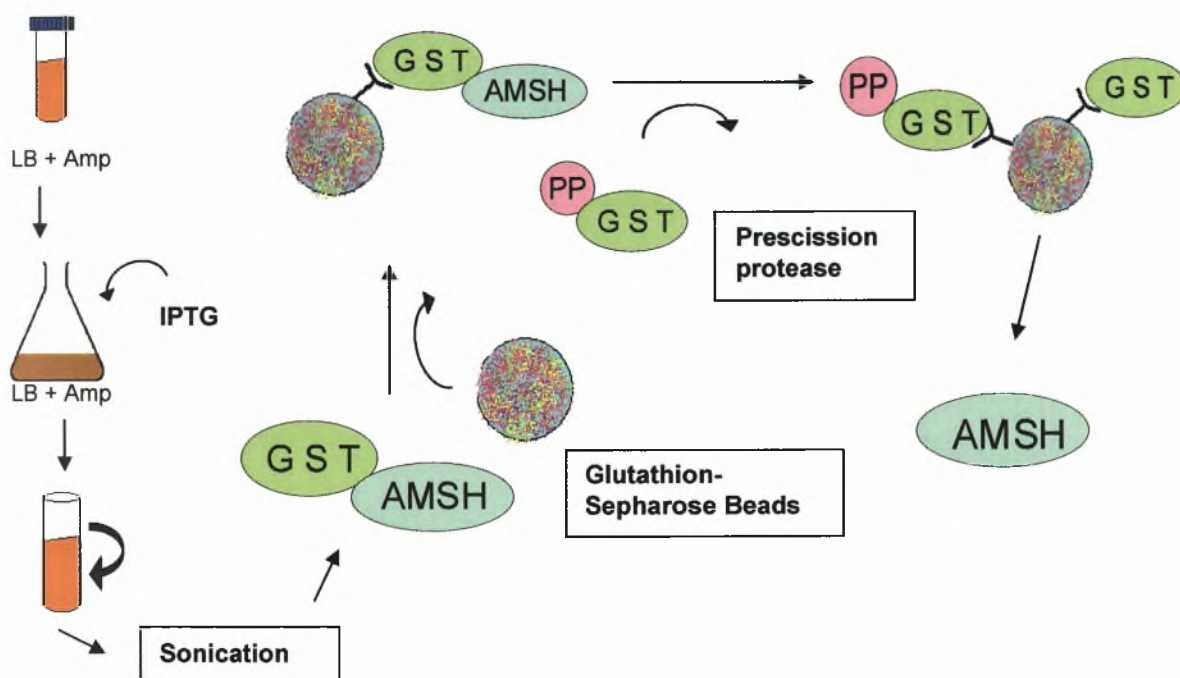


Εικόνα 5: Ο φορέας pGEX6P1, με ένα GST γονίδιο σύζευξης και μια θέση κοπής από pre-scission protease.

Έπειτα προστίθενται 0,2 ml IPTG 0,2 mM και η καλλιέργεια επωάζεται για άλλες 2 ώρες στις ίδιες συνθήκες. Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στα 7.500 rpm για 5 min, 4°C, επαναδιαλύονται σε 1xPBS και κυτταρολύονται με τη χρήση υπερήχων. Σε 1,6 mg κύτταρα προστίθεται 1x αναστολέας που περιέχει 1xPBS πρωτεάσης (stock: 1 ταμπλέτα/1 ml 1xPBS = 50x) και η κυτταρική μεμβράνη διασπάται με την εφαρμογή υπερήχων για 2x15min, σε 5 κύκλους με 20% ενέργεια. Η διαδικασία αυτή γίνεται στον πάγο. Μετά την επεξεργασία με υπερήχους, προστίθεται 1ml 1% Triton και το διάλυμα επωάζεται υπό ήπια ανακίνηση στους 4°C για 1 ώρα. Το βακτηριακό κυτταρόλυμα καθαρίζεται από κυτταρικές μεμβράνες, μεγάλα θραύσματα και αδιάσπαστα κύτταρα με φυγοκέντρηση στους 4°C στα 10.000 rpm για 10 min. Στο καθαρισμένο κυτταρόλυμα, που περιέχει και τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες, εφαρμόζεται 50% καθαρού διαλύματος σφαιριδίων G-Sepharose.

Για κάθε 5 ml καθαρισμένου κυτταρολύματος προστίθενται 100 μl 50% καθαρού διαλύματος G-Sepharose 4B και επωάζεται υπό ήπια ανακίνηση για 2 ώρες στους 4°C. Το εναιώρημα φυγοκεντρείται στα 2.500 rpm για 3 min και το gel των σφαιριδίων καθιζάνει. Το υπερκείμενο αποχύνεται και το ίζημα ξεπλένεται 3 φορές με 1xPBS. Το gel μεταφέρεται στη συνέχεια σε μια μικρή στήλη όπου ξεπλένεται επιπλέον 3 φορές με 500 μl κρύο (4°C) 1xPBS, μία φορά με 500μl κρύου (4°C) 1xPBS που περιέχει 0,2% Triton, άλλες 2 φορές με 500μl cold 1xPBS και τέλος ξεπλένεται με 200μl ρυθμιστικό

διάλυμα DUB, με σύντομη φυγοκέντρηση, ώστε να μην προλαβαίνει να στεγνώσει η στήλη. Στη συνέχεια προστίθενται 60μl DUB buffer και 0,7μl prescission protease και το διάλυμα αναδεύεται για 16 hours στους 4°C. Μετά από αυτήν την επώαση οι πρωτεΐνες AMSH2 και AMSH2axa συλλέγονται σε νέο erpendorf με σύντομο spin down της στήλης. Οι πρωτεΐνες αποθηκεύονται σε -80°C.



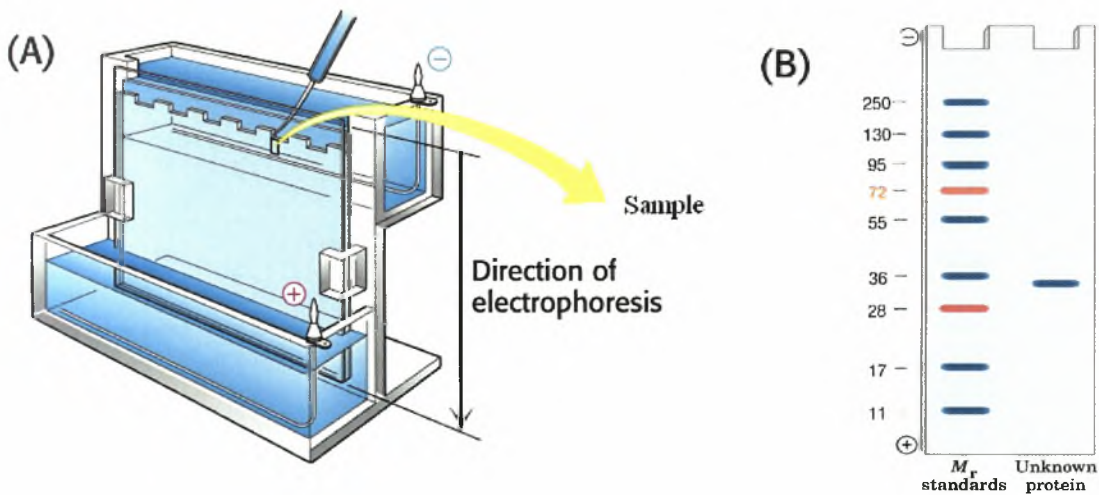
Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση του καθαρισμού της GST-AMSH πρωτεΐνης.

### 3.3.1 Εξισορρόπηση των σφαιριδίων G-Sepharose

Το διάλυμα των σφαιριδίων G-Sepharose (G-Sepharose 4B) υπό μορφή gel όπως προμηθεύεται, είναι 75 % μη καθαρό. Η ακόλουθη διαδικασία οδηγεί σε διάλυμα 50%καθαρό: 120 ml ακάθαρτου διαλύματος μεταφέρονται σε 1,5 ml erpendorf tube και φυγοκεντρούνται στα 3.000 rpm για 30 sec. Αποχύνουμε το υπερκείμενο και ξεπλένουμε το ίζημα 3 φορές με 500 μl κρού (4°C) 1xPBS για να αφαιρέσουμε το 20% της αιθανόλης, απαραίτητη για την αποθήκευση του διαλύματος. Μετά την τελευταία πλύση προστίθεται για κάθε 1 ml από το αρχικό διάλυμα G-Sepharose 4B που έχει απομείνει, 1 ml κρού (4°C) 1xPBS. Αυτό οδηγεί σε ένα 50% μη καθαρό διάλυμα.

### 3.3.2 Ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικό πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμιδίου

Δέκα μl από το διάλυμα έκλουσης διαλύονται σε 2.5 μl 5xSDS (δωδεκακυλοθειικό νάτριο), επωάζονται για 5 min στους 98°C, ηλεκτροφορούνται μαζί με μάρτυρα (PageRuler™ Prestained protein Ladder Plus) σε 12.5% πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (SDS PAGE) αρχικά από το πήκτωμα συσσώρευσης και μετά από πήκτωμα διαχωρισμού σε 20 mA για 45 min, για να εξεταστεί αν πραγματικά έχει καθαριστεί η πρωτεΐνη AMSH2. Αν η πρωτεΐνη έχει εκφραστεί και απομονωθεί σωστά, θα πρέπει να εμφανίζεται στο πήκτωμα αποδιάταξης μια ζώνη που αντιστοιχεί στο μοριακό της βάρος (εικ.7) Το πήκτωμα ακρυλαμιδίου τοποθετείται αμέσως μετά την περάτωση της ηλεκτροφόρησης σε χρωστική Coomassie Blue (CBB) και επωάζεται για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου υπό ήπια ανάδευση. Η χρωστική απομακρύνεται στη συνέχεια με διάλυμα αποχρωματισμού DBB. Το πήκτωμα εμβαπτίζεται σε DBB, βράζεται για 2 min και επωάζεται υπό ήπια ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min. Οι πρωτεΐνες διακρίνονται πλέον λόγω του χαρακτηριστικού μπλε χρώματος.



Εικόνα 7: (A) Συσκευή ηλεκτροφόρησης αποδιατακτικού πηκτώματος ακρυλαμιδίου. (B) Πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Στην πρώτη στήλη είναι ο μάρτυρας (PageRuler™ Prestained protein Ladder Plus), αυτός που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα και στη δεύτερη στήλη μια πρωτεΐνη που έχει ηλεκτροφορηθεί

### 3.3.3 Υλικά και αντιδραστήρια

#### **LB θρεπτικό μέσο**

Yeast extract	2,5 g
Bacto tryptone	5 g
NaCl	2,5 g

Τα συστατικά διαλύονται σε αποστειρωμένο νερό σε τελικό όγκο 500 ml. Το μέσο αποστειρώνεται και εφόσον έχει κρυώσει προστίθεται ασηπτικά διάλυμα αμπικιλίνης σε τελική συγκέντρωση 50 mg/ml.

#### **1xPBS**

NaCl	140 mM
KCl	2,7 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,8 mM

Ρύθμιση pH σε 7.3

#### **DUB Buffer**

Tris-HCl (pH 7.2)	1 M
KCl	2.5 M
MgCl <sub>2</sub>	1 M
DTT	0,1 M

### **12.5 % Πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμιδίου**

Το πήκτωμα αποτελείται από δύο φάσεις, τη συσσωρευτική και τη διαχωριστική.

Πήκτωμα συσσώρευσης: 1.4 ml H<sub>2</sub>O, 1.0 ml Ρυθμιστικό διάλυμα συσσώρευσης, 1.6 ml AC (ακρυλαμίδιο, 4°C), 25 ml APS, 3 μl Temmed

Πήκτωμα διαχωρισμού: 1.2 ml H<sub>2</sub>O, 0.5 ml Ρυθμιστικό διάλυμα διαχωρισμού, 0.3 ml AC, 25 μl APS, 3 μl Temmed

- Ρυθμιστικό διάλυμα συσσώρευσης : 1.5 M Tris-HCl, 0.4% (w/v) SDS, pH 8.8
- Ρυθμιστικό διάλυμα διαχωρισμού: 0.5 M Tris-HCl, 0.5% (w/v) SDS, pH 6.8
- APS: 10% υπερθειικό αμμώνιο, 4°C
- Temed: N,N,N',N' Tetramethylendiamin, 4°C

### **10x Διάλυμα ηλεκτροφόρησης**

Tris	250 mM
Γλυκίνη	1.92 M
SDS	1%

### **CBB χρωστική**

CBB	2.5 g/l
Μεθανόλη	500 ml
Οξικό οξύ	100 ml
H <sub>2</sub> O	400 ml

### **DBB ρυθμιστικό διάλυμα**

Μεθανόλη	500 ml
Οξικό οξύ	100 ml
H <sub>2</sub> O	400 ml

## **3.4 Προσδιορισμός αποουβικουιτινυλίωσης (Deubiquitinating assay)**

250 ng K48-διασυνδεδεμένη ή K63- διασυνδεδεμένη αλυσίδα τετραουβικουιτίνη επωάζονται με 1 pmol καθαρισμένης πρωτεΐνης AMSH2 και AMSH2*axa* σε DUB ρυθμιστικό διάλυμα, με τελικό όγκο 10 μl στους 30°C για διαφορετικά χρονικά διαστήματα, συγκεκριμένα για 0, 10, 30 και 120 min. Η καθαρισμένη πρωτεΐνη προεπώζεται αρχικά στο ρυθμιστικό διάλυμα DUB στους 30°C για 5 min και έπειτα προστίθεται η αλυσίδα τετραουβικουιτίνης. Η αντίδραση διακόπτεται με την προσθήκη 2,5 μl of 4xNuPAGE ρυθμιστικού διαλύματος δείγματος (sample buffer) και την ακόλουθη επώαση στους 70°C για 10 min.

### **3.4.1 Αποτύπωση Western και ECL ανίχνευση μορίων ουβικουιτίνης**

Το μείγμα του deubiquitinating assay ηλεκτροφορεύεται σε 12% SDS PAGE (NuPAGE<sup>R</sup> Novex Bis-Tris Gel) σε 800 ml of 1x MES SDS Running Buffer στα 200V, 500 mA για 35 min.

Οι διαχωρισμένες στο πήκτωμα πρωτεΐνες μεταφέρονται σε PVDF μεμβράνη. Για τη μεταφορά συναρμολογείται το «σάντουιτς» μεταφοράς πρωτεϊνών εμβαπίζοντας τη



μεμβράνη για 30 sec σε μεθανόλη και για 1 min σε 1x NuPAGE διάλυμα μεταφοράς, το πήκτωμα για 1-5 min σε 1x NuPAGE διάλυμα μεταφοράς και τα χαρτιά Whatmann επίσης σε 1x NuPAGE διάλυμα μεταφοράς. Η μεταφορά γίνεται σε 15V για 15-30 min. Μετά τη μεταφορά, η μεμβράνη επωάζεται σε διάλυμα απομάκρυνσης θορύβου (blocking solution), 10% σκόνη γάλακτος σε TBST, για 1 hour. Στη συνέχεια επωάζεται για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου ή για 12-16 ώρες στους 4°C υπό ήπια ανάδευση στο διάλυμα πρωτογενούς αντισώματος (διάλυμα αντισώματος: blocking solution, 1:2000), με πρωτογενές αντίσωμα, αντίσωμα κατά της ουβικουιτίνης P4D1. Η μεμβράνη ξεπλένεται 3 φορές με 1xTBST για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό ήπια ανάδευση. Η μεμβράνη επωάζεται έπειτα για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου ή για 12-16 ώρες στους 4°C υπό ήπια ανάδευση σε διάλυμα δευτερογενούς αντισώματος (διάλυμα αντισώματος: 1xTBST, 1:2000), με δευτερογενές αντίσωμα, αντίσωμα κατά ανοσοσφαιρινών ποντικίου συζευγμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση (anti-rabbit-HRP) και μετά ξεπλένεται 3 φορές με 1xTBST για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό ήπια ανάδευση. Τα μόρια ουβικουιτίνης ανιχνεύονται με kit ανοσοφθορισμού (ECL).

Αναμιγνύουμε ίσους όγκους από τα ECL αντιδραστήρια και τα αφήνουμε για εξισορρόπηση για 2 min σε θερμοκρασία δωματίου. Προσθέτουμε το μίγμα στη μεμβράνη από την πλευρά, που έχουν μεταφερθεί οι πρωτεΐνες και επωάζεται για 1 min υπό ήπια ανάδευση. Εισάγουμε την μεμβράνη σε πλαστική θήκη και την εκθέτουμε σε X-ray φιλμ.

### 3.4.2 Χρωματομετρική ανίχνευση των πρωτεϊνών AMSH2 και AMSH2αα με αλκαλική φωσφατάση

Μετά την ECL ανίχνευση η μεμβράνη επωάζεται πάλι σε blocking solution (10% σκόνη γάλακτος σε 1xTBST) για 1 ώρα. Στη συνέχεια επωάζεται για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου ή για 12-16 ώρες στους 4°C υπό ήπια ανάδευση στο διάλυμα πρωτογενούς αντισώματος (διάλυμα αντισώματος: blocking solution, 1:1000), με πρωτογενές αντίσωμα, αντίσωμα κατά την πρωτεΐνη AMSH2, και μετά ξεπλένεται 3 φορές με 1xTBST για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό ήπια ανάδευση. Η μεμβράνη επωάζεται έπειτα για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου ή για 12-16 ώρες στους 4°C υπό ήπια ανάδευση σε διάλυμα δευτερογενούς αντισώματος (διάλυμα αντισώματος: 1xTBST, 1:4000), με δευτερογενές αντίσωμα, αντίσωμα κατά ανοσοσφαιρινών κουνελιού συζευγμένο με αλκαλική φωσφατάση (AP), και ξεπλένεται 3 φορές με 1xTBST για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό ήπια ανάδευση. Τέλος η

μεμβράνη επεξεργάζεται με το κατάλληλο ενζυμικό υπόστρωμα για το χρωματομετρικό εντοπισμό των πρωτεϊνών AMSH2 και AMSH2αα.

Η μεμβράνη επωάζεται σε 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος, όπου έχουν διαλυθεί 33 μl BCIP + 66 μl NBT σε θερμοκρασία δωματίου υπό ήπια ανάδευση. Μετά από 15-30 min ανάδευσης τα σήματα για τις πρωτεΐνες γίνονται ορατά. Η αντίδραση σταματά ξεπλένοντας την μεμβράνη με H<sub>2</sub>O.

### 3.4.3 Υλικά και αντιδραστήρια

#### Αλυσίδες τετραουβικουιτίνης

Η K48-διασυνδεδεμένη και η K63- διασυνδεδεμένη αλυσίδα τετραουβικουιτίνη (25 μg) διαλύονται σε 200 μl DUB buffer (125 ng/μl stock)

#### 4x LDS NuPAGE ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων

Tris-HCl	0.666 g
Tris Base	0.682 g
LDS	0.800 g
EDTA	0.006 g
Γλυκερόλη	4 g

διαλύονται σε αποστειρωμένο H<sub>2</sub>O με τελικό όγκο 10 ml

#### 20x MES SDS διάλυμα ηλεκτροφόρησης

MES	39,04 g
Tris Base	24,24 g
SDS	4 g
EDTA	1,2 g

διαλύονται σε αποστειρωμένο H<sub>2</sub>O με τελικό όγκο 200 ml

Σημείωση: Το pH του 1x διαλύματος θα πρέπει να είναι 7.3. Το pH δεν ρυθμίζεται με οξύ ή βάση.

### **20x Διάλυμα μεταφοράς , 4°C**

Bicine	10.2 g
Bis-Tris	13.1 g
EDTA	0.75 g

διαλύονται σε αποστειρωμένο H<sub>2</sub>O με τελικό όγκο 120 ml

Σημείωση: Το pH του 1x διαλύματος θα πρέπει να είναι 7.2. Το pH δεν ρυθμίζεται με οξύ ή βάση.

### **AP ρυθμιστικό διάλυμα**

Tris-HCl (pH 9.5)	100 mM
NaCl	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM

### **NBT**

50 mg/ml NBT (nitroblue-tetrazolium salt) 70% Dimethylformamid

### **BCIP**

50 mg/ml BCIP (5-βρωμο-4-χλωρο-3-indolyl phosphate) σε Dimethylformamid

## **3.5 Προσδιορισμός αποουβικουιτινυλίωσης με αναστολείς πρωτεασών**

250 ng K63-συνδεδεμένης αλυσίδας τετραουβικουιτίνης με 1,5 μl καθαρισμένης AMSH2 πρωτεΐνης, που αντιστοιχεί σε 1 pmol σε ρυθμιστικό διάλυμα DUB με τελικό όγκο 10 μl, επωάζονται στους 30°C για 2 ώρες. Η καθαρισμένη πρωτεΐνη προεπωάζεται στο ρυθμιστικό διάλυμα DUB για 5 min στους 30°C. Κατά την διάρκεια αυτής της προεπόασης προστίθενται 0.1 μl αναστολέα ή 0.1 μl διαλύτη του αναστολέα που χρησιμοποιείται ως μάρτυρας. Η αντίδραση διακόπτεται με την προσθήκη 2,5 μl of 4xNuPAGE sample buffer και την ακόλουθη επώαση στους 70°C για 10 min.

Η ανίχνευση των μορίων της ουβικουιτίνης και της πρωτεΐνης AMSH2 ανιχνεύονται με όμοιο τρόπο όπως αναφέρθηκε προηγουμένως.

## Αναστολείς

### **1.10 Φαινανθρολίνη (1.10 Pt)**

0.0199 g / 1 ml MeOH (100x)

### **N-αιθυλομηλεϊμίδιο (NEM)**

0.0625 g / 1 ml EtOH (100x)

## **3.6 Σύστημα δοκιμής διπλού υβριδίου**

Η πιθανή αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών AMSH και των μελών της ESCRT III οικογένειας μελετάται με τη δοκιμή διπλού υβριδίου. Το σύστημα που χρησιμοποιείται είναι το GAL4. Ο GAL4 είναι ένας μεταγραφικός ενεργοποιητής που αποτελείται από μία περιοχή πρόσδεσης στο DNA, που αναγνωρίζει ένα στοιχείο UAS, και μία περιοχή ενεργοποίησης, που διεγείρει την έναρξη στον υποκινητή-στόχο. Αυτές οι περιοχές είναι διαχωρισμένες και όταν συνδεθούν, επάγουν τη μεταγραφή του γονιδίου αναφοράς HIS3 από τον υποκινητή GAL4. Οι AMSH πρωτεΐνες συνδέονται με την περιοχή πρόσδεσης στο DNA και τα μέλη του ESCRT III συμπλόκου με την περιοχή ενεργοποίησης. Αν οι πρωτεΐνες που φέρουν τις δύο αυτές περιοχές αλληλεπιδράσουν, τότε θα σχηματιστεί ο μεταγραφικός ενεργοποιητής και θα επαχθεί η έκφραση του γονιδίου HIS3. Το προϊόν του γονιδίου, εκφραζόμενο σε κύτταρα ζύμης που περιέχει τις δύο αλληλεπιδρόμενες πρωτεΐνες, επιτρέπει την ανάπτυξη της ζύμης σε θρεπτικό μέσο χωρίς ιστιδίνη.

### **3.6.1 Κατασκευές για την δοκιμή του διπλού υβριδίου**

Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια για τη δοκιμή του διπλού υβριδίου σχηματίζονται μετά την κλωνοποίηση των γονιδίων των AMSH και των ESCRT III πρωτεϊνών στους pGBKT7 και pGADT7 φορείς αντίστοιχα.

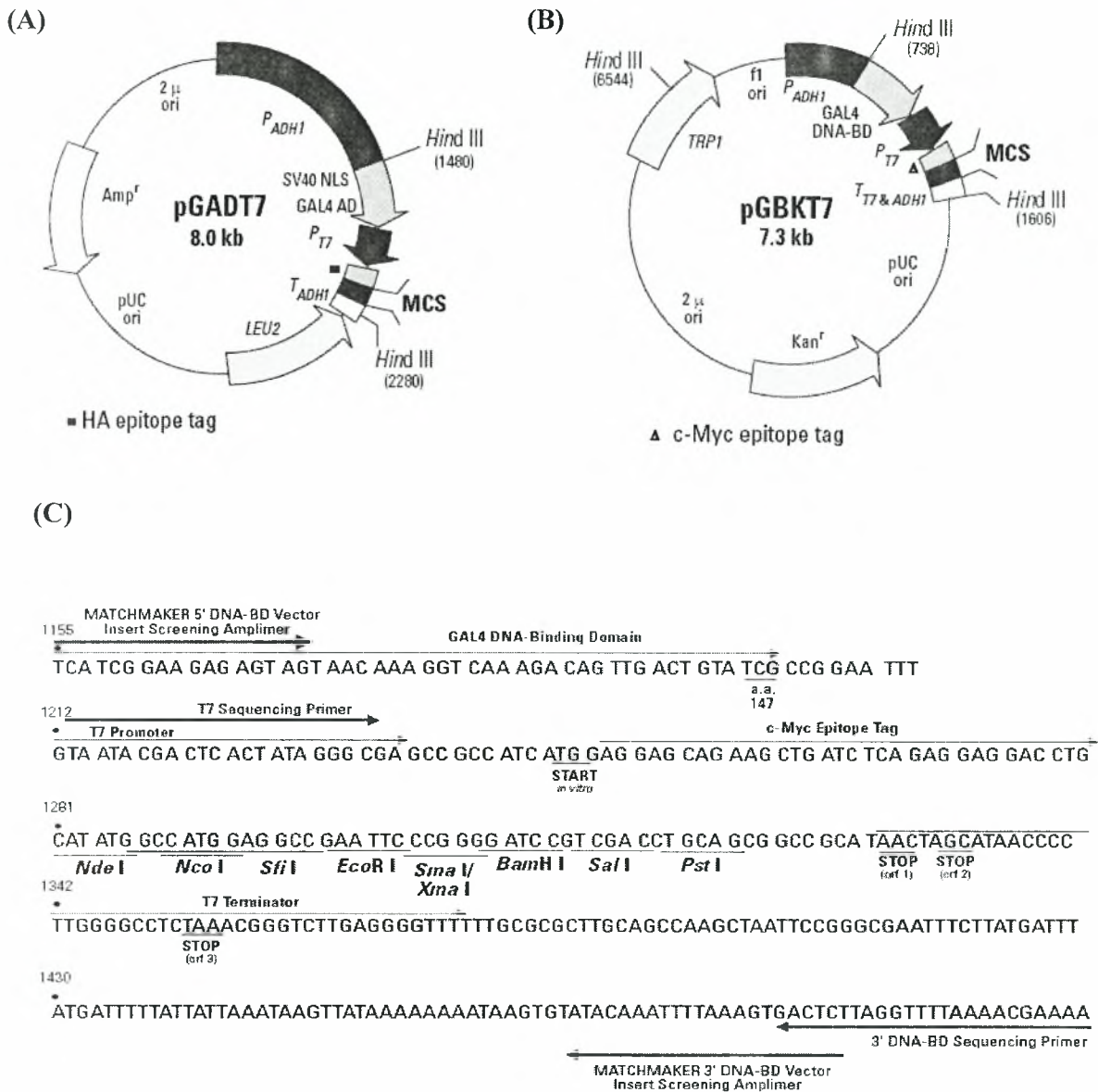
Ο pGBKT7 DNA-BD (Binding domain, περιοχή σύνδεσης) φορέας εκφράζει πρωτεΐνες που συνδέονται στα αμινοξέα 1–147 της GAL4 περιοχής σύνδεσης στο DNA. Στις ζύμες, οι συζευγμένες πρωτεΐνες εκφράζονται υπό τον έλεγχο του ιδιοστατικού ADH1 υποκινητή (PADH1). Ο φορέας περιέχει επίσης και έναν T7 υποκινητή, ένα c-Myc epitope tag, και MCS. Ο φορέας φέρει το γονίδιο ανθεκτικότητας Kan<sup>r</sup> για επιλογή σε *E. coli* και το θρεπτικό δείκτη TRP1 για την επιλογή σε σακχαρομύκητες. Τα στελέχη ζυμών που περιέχουν τον pGBKT7 φορέα εκδηλώνουν μεγαλύτερη αποδοτικότητα

μετασχηματισμού από ότι στελέχη που φέρουν άλλους φορείς με περιοχή πρόσδεσης στο DNA-BD (εικ.8b).

Ο pGADT7 AD (Activation domain, περιοχή ενεργοποίησης) φορέας εκφράζει πρωτεΐνες που συνδέονται στα αμινοξέα της 768–881 GAL4 περιοχή ενεργοποίησης. Στις ζύμες, οι συζευγμένες πρωτεΐνες εκφράζονται υπό τον έλεγχο του ιδιοστατικού ADH1 υποκινητή (PADH1). Οι συζευγμένες πρωτεΐνες μεταφέρονται στον πυρήνα των ζυμών από τις SV40 αλληλουχίες πυρηνικού εντοπισμού, οι οποίες έχουν προστεθεί στις αλληλουχίες της επικράτειας ενεργοποίησης. Ο φορέας περιέχει επίσης και έναν T7 υποκινητή, ένα HA epitope tag, και MCS. Ο φορέας φέρει το γονίδιο ανθεκτικότητας Amp<sup>r</sup> για επιλογή σε *E. coli* και το θρεπτικό δείκτη *LEU2* για την επιλογή σε σακχαρομύκητες (εικ.8a).

Τα βήματα για την κατασκευή των πλασμιδίων είναι:

1. Ενίσχυση γονιδιακού τόπου με PCR με προσχεδιασμένους εκκινητές
2. Επεξεργασία DNA με ένζυμα περιορισμού
3. Απομόνωση ζώνης DNA από πήκτωμα αγαρόζης
4. Αντίδραση λιγάσης
5. Μετασχηματισμός σε επιδεκτικά κύτταρα
6. PCR αποικιών
7. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας με αλκαλική λύση (minpreps)
8. Προσδιορισμός αλληλουχίας



Εικόνα 8: Α) Χάρτης του pGCAD T7 φορέα Β) Χάρτης του pGBKT7 φορέα , C) Αλληλουχίες του pGBKT7 φορέα στην περιοχή GAL4-DNA-BD και στην περιοχή ένθεσης των γονιδίων

### 3.6.1.1 Ενίσχυση γονιδιακού τόπου με PCR με εξειδικευμένους εκκινητές

#### Αντίδραση ενίσχυσης PCR

##### Buffer

(Expand High Fidelity

PCR buffer 10x + MgCl<sub>2</sub>) 5 μl

dNTPs (2.5 mM) 4 μl

Εκκινητής fwd (10pmol/μl) 2 μl

Εκκινητής rev (10pmol/μl) 2 μl

DNA (puni 1/50) 4 μl

##### Enzyme

(Expand High Fidelity) 0.5 μl

H<sub>2</sub>O 0.5 μl

Τελικός όγκος 50.5 μl

Πίνακας 1: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε πρωτεΐνη

#### AMSH1

Forward εκκινητής 5'-AAGGGGATCCATGGGGTCGTCTTTTGAGAC-3'

Reverse εκκινητής 5'-AAGGGTCGACCTATCTGAGATCAATGACAT-3'

#### AMSH2

Forward εκκινητής 5'-AAGGGGATCCATGGTAACGCTCTCGTCTCC-3'

Reverse εκκινητής 5'-AAGGGTCGACTTAACGTAGATCAAAAATCT-3'

#### AMSH3

Forward εκκινητής 5'-AAGGGGATCCATGAAGATTGATCTGAACAA-3'

Reverse εκκινητής 5'-AAGGGTCGACTTAGCGGAGATCGAGGACTT-3'

### 3.6.1.2 Επεξεργασία των ενισχυμένων γονιδίων με περιοριστικά ένζυμα

Από το χάρτη του φορέα pGBKT7 επιλέγεται ότι η περιοχή των γονιδίων των πρωτεϊνών θα γίνει ανάμεσα στις περιοριστικές θέσεις κοπής, BamHI και Sall (ευκ.8).

Τα ενισχυμένα γονίδια καθώς και ο φορέας επεξεργάζονται με τα αντίστοιχα περιοριστικά ένζυμα για να πραγματοποιηθεί στη συνέχεια η αντίδραση σύνδεσης μεταξύ τους. Στην αντίδραση πέψης προστίθενται τα παρακάτω αντιδραστήρια.

#### Αντίδραση πέψης

H <sub>2</sub> O	26 μl
10xTango Buffer	10 μl
DNA	10 μl
BamHI (10 unit/μl)	2 μl
SalI (10 unit/μl)	2 μl

Τελικός όγκος 50 μl

Η αντίδραση της πέψης πραγματοποιείται στους 37°C για 1 hour.

#### 3.6.1.3 Απομόνωση ζώνης DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Στο προϊόν της πέψης προστίθεται 10 μl 6x ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης και ηλεκτροφορεύεται σε 0.8 % πήκτωμα αγαρόζης. Το πήκτωμα ηλεκτροφορεύεται σε 1xTAE διάλυμα ηλεκτροφόρησης με βρωμιούχο αιθίδιο (20 μl/l), εφαρμόζοντας 120 V για 35 min. Ο διαχωρισμός των ζωνών DNA παρατηρείται με λάμπα υπεριώδους φωτός. Οι ζώνες που αντιστοιχούν στις επεξεργασμένες με τα ένζυμα AMSH πρωτεΐνες, είναι στα 1.5 kb για τις AMSH1 και AMSH3 και στα 0.7 kb η AMSH2. Ο καθαρισμός του DNA από τις αποκομμένες ζώνες πηκτώματος αγαρόζης γίνεται με το Promega kit (Promega) σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή. Το DNA διατηρείται στους -20°C.

#### 3.6.1.4 Αντίδραση λιγάσης

Για την αντίδραση της σύνδεσης θα πρέπει να βρεθεί η αναλογία ένθετου:φορέα. Η αναλογία αυτή βρίσκεται με βάση την αναλογία του μεγέθους τους και της ποσότητας τους στο διάλυμα έκλουσης. Η ποσότητα είναι ανάλογη της έντασης των ζωνών σε πήκτωμα αγαρόζης. 4 μl εκχειλισμένης πρωτεΐνης ή φορέα με 2 μl 6x διάλυμα φόρτωσης και 6 μl αποστειρωμένο νερό ηλεκτροφορούνται σε 0.8% πήκτωμα αγαρόζης.

Βάση του μήκους και της έντασης των ζωνών στο πήκτωμα (εικ.9), μεταξύ ενθέτου και φορέα υπολογίζεται η αναλογία που θα χρησιμοποιηθεί στην αντίδραση λιγάσης.





#### Υπολογισμός της αναλογίας ένθετο:φορέας

	Μήκος	Ένταση
φορέας	7.3 kb (5)	10
ένθετο	1,5 kb (1)	1

$$1 \cdot 5 = 1 \cdot 10x \quad x = 2$$

$$\text{ένθετο:φορέας} = 2:1$$

Για AMSH1, AMSH3 και τα μεταλλάγματά τους

AMSH2 δεν είναι εμφανής, επειδή η ποσότητα είναι πολύ μικρή

Εικόνα 9: 4  $\mu$ l DNA σε 0.8% πήκτωμα αγαρόζης. Στην T7 1,2 στήλη pGBKT7 φορέας, στη 2<sup>η</sup> AMSH2, 3<sup>η</sup> AMSH3, 4<sup>η</sup> AMSH1 $\alpha$ xa, 5<sup>η</sup> AMSH2 $\alpha$ xa, 6<sup>η</sup> AMSH3 $\alpha$ xa.

#### Αντίδραση λιγάσης

	AMSH1, AMSH3	AMSH2
10x ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l
pGBKT7	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
Ένθετο	10 $\mu$ l	16 $\mu$ l
T <sub>4</sub> λιγάση	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	6 $\mu$ l	0 $\mu$ l
Τελικός όγκος	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l

Εφόσον προστεθούν όλα τα αντιδραστήρια, το διάλυμα ανακινείται και επωάζεται για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.

#### 3.6.1.5 Μετασηματισμός σε επιδεκτικά κύτταρα

Το προϊόν από την αντίδραση της λιγάσης χρησιμοποιείται για μετασηματισμό σε χημικά δεκτικά κύτταρα. Ο μετασηματισμός γίνεται με θερμικό σοκ. Καθώς τα κύτταρα υποβάλλονται σε θερμικό σοκ δημιουργούνται πόροι στη μεμβράνη που επιτρέπουν την εισροή των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων σε αυτά.

1. Για κάθε 10  $\mu$ l προϊόν της αντίδρασης λιγάσης προστίθενται 80  $\mu$ l DH5 $\alpha$  δεκτικά κύτταρα του βακτηριακού στελέχους *Escherichia coli*. Άρα στα 20  $\mu$ l

- προστίθενται 160  $\mu$ l DH5a κύτταρα. Το μίγμα επωάζεται για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Πραγματοποιείται θερμικό σοκ στους 42°C για 30-50 sec και στη συνέχεια το διάλυμα αφήνεται στον πάγο για 1-2 min, ώστε τα κύτταρα να συνέλθουν από το θερμικό σοκ
  3. 1 ml υγρού LB θρεπτικού μέσου προστίθεται στο μίγμα, το οποίο επωάζεται στους 37°C υπό γρήγορη ανάδευση (250 rpm) για 60 min.
  4. Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στα 10.000 rpm για 30 sec. Αφαιρείται το υπερκείμενο και τα κύτταρα διαλύονται σε 200  $\mu$ l LB υγρό θρεπτικό μέσο.
  5. Τα κύτταρα επιστρώνονται σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό μέσο LB medium που περιέχει καναμυκίνη (Kan) σε τελική συγκέντρωση 50 mg/ml, επειδή ο φορέας φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη, και τα τρυβλία επωάζονται για 1 μέρα στους 37°C.

#### 3.6.1.6 PCR αποικιών

Τα κύτταρα που έχουν αναπτυχθεί στα τριβλύα με LB+Kan, περιέχουν τον φορέα με ή χωρίς το γονίδιο των AMSH πρωτεϊνών. Για να βρεθούν ποια από αυτά τα κύτταρα είναι θετικοί κλώνοι πραγματοποιείται PCR αποικιών.

Επιλέγουμε κύτταρα από τα τριβλύα και τοποθετούνται σε δύο νέα τρυβλία σε συγκεκριμένες αριθμημένες θέσεις. Δημιουργούμε δύο αντίγραφα από κάθε αποικία. Το ένα θα χρησιμοποιηθεί για την PCR αποικιών και το άλλο για παραπέρα χειρισμό μετά τον προσδιορισμό των θετικών κλώνων.

#### Αντίδραση PCR αποικιών

10xBuffer	
(10xPCR Buffer + $MgCl_2$ )	3 $\mu$ l
dNTPs (2.5 mM)	1.5 $\mu$ l
Εκκινητής fwd (10pmol/ $\mu$ l)	1.5 $\mu$ l
Εκκινητής rev (10pmol/ $\mu$ l)	1.5 $\mu$ l
DNA	1 colony
Tag Polymerase	0.6 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	21.9 $\mu$ l
Τελικός όγκος	30 $\mu$ l

Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται είναι οι ίδιοι από τον **πίνακα 1**.

Η αντίδραση γίνεται στις εξής συνθήκες

94°C	20 sec	→	30 cycles
54°C	1 min		
70°C	1 min		

Το προϊόν της PCR αποικιών ηλεκτροφορείται σε 0.8 % πήκτωμα αγαρόζης. Αν ο φορέας περιέχει το ένθετο, τότε θα εμφανιστεί μια ζώνη στο σωστό μέγεθος για κάθε AMSH πρωτεΐνη. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι να αποκτηθούν θετικοί κλώνοι για κάθε AMSH πρωτεΐνη.

#### 3.6.1.7 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας με αλκαλική λύση (minpreps)

3 ml υγρό θρεπτικό μέσο LB με καναμυκίνη εμβολιάζεται με ένα αντίγραφο από κάθε θετικό κλώνο. Οι καλλιέργειες επωάζονται στους 37°C υπό γρήγορη ανάδευση (250 rpm) για 12-16 ώρες.

1. Συλλέγονται τα αναπτυγμένα κύτταρα με φυγοκέντρηση 2 ml καλλιέργειας στα 13.000 rpm για 1 min.
2. Τα κύτταρα διαλύονται σε 300 μl P<sub>1</sub> διαλύματος που περιέχει RNAση.
3. Προστίθενται 300 μl P<sub>2</sub> διαλύματος και το μίγμα ανακινείται ελαφρά μέχρι να γίνει διαυγές.
4. Προστίθενται 300 μl P<sub>3</sub> διαλύματος και το μίγμα ανακινείται καλά
5. Προστίθενται 100 μl χλωροφόρμιο/ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24) και το μίγμα φυγοκεντρείται στα 13.000 rpm για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου
6. Συλλέγεται το υπερκείμενο και μεταφέρεται σε νέα eppendorfs, στα οποία ήδη έχει προστεθεί 750 μl 100% ισοπροπανόλη
7. Το μίγμα φυγοκεντρείται στα 13.000 rpm για 1 min και ξεπλένεται με 70% αιθανόλη. Το υπερκείμενο αποχύνεται και το ίζημα, το DNA αφήνεται να στεγνώσει
8. Τέλος προστίθενται 60 μl DW-RNase (1 ml H<sub>2</sub>O + 10 μl RNase) και επωάζεται στους 37°C για 30 min.

### **P<sub>1</sub> solution**

Glucose	50 mM
Tris-HCl (pH 8.0)	25 mM
EDTA (pH 8.0)	10 mM

### **P<sub>2</sub> solution**

NaOH	0,2 M
SDS	1%

### **P<sub>3</sub> solution**

3 M Sodium acetate (pH 4.8)

#### 3.6.1.8 Προσδιορισμός αλληλουχίας

5  $\mu$ l απομονωμένου πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας με kit (PEQ Lab Kit), αναμιγνύονται με 4  $\mu$ l 1:6 Big Dye Mix και 1  $\mu$ l GAL4 DBD πρόσθιος εκκινητής για την αντίδραση PCR. Ο εκκινητής χρησιμοποιείται για να ενισχύσει το αμινοτελικό άκρο της περιοχής σύζευξης του φορέα pGBKT7 με DNA περιοχή σύνδεσης.

**GAL 4 Forward primer** 5'-TCATCGGAAGAGAGTA-3'

#### PCR αντίδραση αλληλούχισης

95°C for 1 min  
96°C for 30 sec  
53°C for 30 sec  $\longrightarrow$  36 cycles  
60°C for 4 min

10  $\mu$ l H<sub>2</sub>O, 2  $\mu$ l 3M NaOAc και 50  $\mu$ l 100% EtOH προστίθενται στο PCR προϊόν και μετά από 5 min επώασης σε θερμοκρασία δωματίου, το μίγμα φυγοκεντρείται στα 13.000 rpm στους 4°C για 30 min, για την συλλογή του DNA. Το υπερκείμενο αποχύνεται και το DNA ξεπλένεται με 70  $\mu$ l 70% EtOH. Μετά από φυγοκέντρηση στα 13.000 rpm για 2 min σε θερμοκρασία δωματίου η EtOH αποχύνεται και το DNA αφήνεται να στεγνώσει. Έπειτα προστίθεται 20  $\mu$ l HiDi, επωάζεται για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου έπειτα

στους 96°C για 5 min, αφήνεται να κρυώσει για 1-2 min σε πάγο και το μίγμα είναι έτοιμο για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας.

### 3.6.2 Επιδιόρθωση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων

Μετά τον προσδιορισμό της αλληλουχίας των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων βρέθηκε ότι τα γονίδια των AMSH πρωτεϊνών ήταν εκτός πλαισίου ανάγνωσης.

Για την επαναφορά των AMSH2 και AMSH2αχα έγινε με την αφαίρεση ενός τμήματος 25 βάσεων πριν από το γονίδιο που ορίζεται από δύο θέσης κοπής από το περιοριστικό ένζυμο NcoI.

Τα βήματα που ακολουθήθηκαν:

1. Πέψη με το ένζυμο NcoI
2. Απομάκρυνση του ενζύμου
3. Επανασύνδεση με αντίδραση λιγάσης
4. Μετασχηματισμός σε επιδεικτικά κύτταρα, PCR αποικιών
5. Kit miniprep
6. Προσδιορισμός αλληλουχίας

#### 1. Πέψη με το ένζυμο NcoI

10xTango Buffer	1 μl
NcoI (10 unit/μl)	0.5 μl
Ανασυνδυασμένος	1.5 μl
pGBKT7	
H <sub>2</sub> O	7 μl

Τελικός όγκος 10 μl  
επώαση στους 37°C ολονύκτια

## 2. Απομάκρυνση του ενζύμου

Διάλυμα πέψης	10 $\mu$ l
100 % EtOH	300 $\mu$ l
3 M NaAc	40 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	90 $\mu$ l

Τελικός όγκος 1 ml

Εφόσον προστεθούν όλα τα αντιδραστήρια σε ένα 1.5 ml eppendorf, το μίγμα ανακινείται και φυγοκεντρείται στα 13.000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min. Αφαιρείται το υπερκείμενο το ίζημα ξεπλένεται με 70% EtOH και το DNA αφήνεται να στεγνώσει και μετά διαλύεται σε 8  $\mu$ l αποστειρωμένο νερό.

## 7. Επανασύνδεση με αντίδραση λιγάσης

DNA	8 $\mu$ l
T <sub>4</sub> λιγάση	1 $\mu$ l
10xBuffer	1 $\mu$ l

Τελικός όγκος 10  $\mu$ l

επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 12 ώρες

Τα υπόλοιπα βήματα έχουν περιγραφεί προηγουμένως.

Στην περίπτωση των γονιδίων *AMSH1*, *AMSH1axa*, *AMSH3* και *AMSH3axa* δεν υπήρχαν δύο θέσεις κοπής από το *Nco I* ένζυμο, γι αυτό για την επαναφορά τους στο πλαίσιο ανάγνωσης του φορέα ακολουθήθηκε άλλη διαδικασία. Η σύνδεση αλληλουχίας ζυγού αριθμού αμινοξέων μπορούσε να ενσωματώσει το γονίδιο σωστά στο πλαίσιο ανάγνωσης. Γι αυτό το σκοπό επιλέχθηκε η θέση κοπής από το *NdeI* που αφήνει κενό δύο αμινοξέων στα κολλώδη άκρα και μία από το *SmaI* που αφήνει τυφλά άκρα. οι φορείς επεξεργάστηκαν με αυτά τα ένζυμα στη συνέχεια επώαστηκαν με το ένζυμο *Klenow fragment*, το οποίο συμπληρώνει με βάση συμπληρωματικότητας τα κολλώδη άκρα.

Τα βήματα που ακολουθήθηκαν:

1. Πέψη με το ένζυμο SmaI
2. Πέψη με το ένζυμο NdeI
3. Επεξεργασία με Klenow fragment
4. Απομάκρυνση των ενζύμων
5. Επανασύνδεση με αντίδραση λιγάσης
6. Μετασχηματισμός σε επιδεικτικά κύτταρα, PCR αποικιών
7. Kit miniprep
8. Προσδιορισμός αλληλουχίας

#### 1. Πέψη με το ένζυμο SmaI

1xTango Buffer	3 μl
SmaI (10 unit/μl)	1 μl
Ανασυνδυασμένος pGBKT7	6 μl
H <sub>2</sub> O	20 μl

Τελικός όγκος 30 μl

- Επώαση στους 30°C για 1.5 hour
- Επώαση στους 65°C για 20 min (για την απενεργοποίηση του ενζύμου)

#### 2. Πέψη με το ένζυμο NdeI

2xTango Buffer	3.5 μl
NdeI (10 unit/μl)	1 μl
Μίγμα από την πέψη με SmaI	30 μl

Τελικός όγκος 33.5 μl

- Επώαση στους 37°C για 1.5 hour
- Επώαση στους 65°C για 20 min (για την απενεργοποίηση του ενζύμου)

### 3. Επεξεργασία με Klenow fragment

Επεξεργασμένο με SmaI και NdeI DNA (1 µg)	13 µl
5x buffer για Klenow	2 µl
dNTPs (2.5 mM)	0.5 µl
Klenow fragment	0.5 µl
H <sub>2</sub> O	4 µl

Τελικός όγκος 20 µl

- Επώαση στους 37°C για 10 min
- Επώαση στους 75°C για 10 min (για την αναστολή της αντίδρασης)

Τα υπόλοιπα βήματα έχουν περιγραφεί.

#### 3.6.3 Μετασηµατισµός των κατασκευών σε ζύµες

Οι AMSH κατασκευές μετασηµατίστηκαν στο στέλεχος Y190 των ζυμών (α κύτταρο) ενώ τα ESCRT III κατασκευάσματα στο στέλεχος Y187 (α κύτταρο).

Ζύμες από καλλιέργεια σε στερεό θρεπτικό YPD μέσο επωασμένη για 12/16 ώρες στους 30°C, διαλύονται σε 90 µl 1xLiAc/1xTE και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min. 15 µl από το πλασµίδιο και 5 µl από βρασµένο DNA από σπέρµα σολωµού προστίθενται στις διαλυµένες ζύµες και το µίγµα επωάζεται για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστίθενται 240 µl PEG 4000 (50%, 50 w/v πολυαιθυλενικής γλυκόλης) και το µίγµα επωάζεται στους 30°C για 30 min υπό ανάδευση στα 200-250 rpm. Τα κύτταρα συλλέγονται µε φυγοκέντρηση στα 3.000 rpm για 5 min και διαλύονται σε 1 ml 1xTE. Τα κύτταρα επανασυλλέγονται µε φυγοκέντρηση στα 3.000 rpm για 2 min, επαναδιαλύονται σε 200 µl 1xTE και επιστρώνονται σε τρυβλία µε SD στερεό θρεπτικό μέσο, τα οποία επωάζονται στους 30°C. Τα AMSH κατασκευάσματα σε SD χωρίς τρυπτοφάνη ενώ τα ESCRT III κατασκευάσματα σε SD χωρίς λευκίνη. Οι αποικίες θα είναι ορατές µετά από 2 µέρες επώασης.

#### 3.6.4 Διασταύρωση ζυμών

Μοναδιαίες μετασηµατισµένες αποικίες που αναπτύχθηκαν επιστρώνονται σε νέα κατάλληλα SD τρυβλία, σε SD/-Trp τα AMSH κατασκευάσματα και σε SD/-Leu τα



ESCRT III κατασκευάσματα. Μετά από μία μέρα επώασης στους 30 °C, όλοι οι δυνατοί συνδυασμοί μεταξύ των AMSH και των ESCRT III κατασκευών επιστρώνονται μαζί σε μορφή ενός κύκλου σε YEPD τρυβλίο. Τα τρυβλία επωάζονται στους 30°C ολονύκτια. Οι αποικίες που αναπτύσσονται επιστρώνονται εκ νέου σε κατάλληλο επιλεκτικό SD θρεπτικό μέσο χωρίς λευκίνη και τρυπτοφάνη και τα τρυβλία επωάζονται στους 30°C για 2 μέρες. Οι αποικίες που είναι ορατές μετά από 2 μέρες επώασης αντιπροσωπεύουν διπλοειδή κύτταρα, που περιέχουν και τα δύο πλασμίδια. Οι αποικίες αυτές επιστρώνονται σε στερεό YPD μέσο και επωάζονται στους 30°C ολονύκτια.

### 3.6.5 Δοκιμή διπλού υβριδίου

Οι διπλοειδής αποικίες επιστρώνονται σε στερεό SD μέσο που δεν περιέχει λευκίνη, τρυπτοφάνη και ιστιδίνη (SD/-Leu/-Trp/-His) και είναι εμπλουτισμένο με την κατάλληλη συγκέντρωση 3-AT (αμινοτριαζόλης). Οι αποικίες οι οποίες αναπτύσσονται σε αυτό το μέσο εκφράζουν το γονίδιο της ιστιδίνης αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών AMSH και ESCRT III. Για την μείωση των ψευδο-θετικών αλληλεπιδράσεων, προστίθεται 3-AT στο εκλεκτικό μέσο. Η συγκέντρωση της 3-AT δεν πρέπει να είναι πολύ υψηλή για να μην παρεμποδίζει την ανάπτυξη των πραγματικά θετικών αποικιών.

### 3.6.6 Υλικά και διαλύματα

#### 0.8% πήκτωμα αγαρόζης

0.8 g σκόνη αγαρόζης σε 100 ml 1xTAE. Προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου σε τελική συγκέντρωση 0.5μg/μl μετά τη θέρμανση του διαλύματος.

#### 50xTAE

Tris	242 g
Acetic acid	50.1 ml
0.5 M EDTA (pH 8.0)	100 ml
διαλύονται σε milli-Q νερό με τελικό όγκο 1 l	

### LB θρεπτικό μέσο

Υγρό θρεπτικό μέσο		Στερεό θρεπτικό μέσο	
LB broth	30 g/l	Καζεΐνη	10%
NaCl	10 g/l	Yeast extract	5 %
		NaCl	10%

### YPD θρεπτικό μέσο

Yeast extract	10 g
Bacto-trypton	20 g
Glucose (2% glucose)	20 g
Bacto-agar (only for plates)	20 gr

διαλύονται σε milli-Q νερό με τελικό όγκο 1

### Συνθετικό drop-out (SD) θρεπτικό μέσο γλυκόζης

Yeast nitrogen base without amino acids	6.7 gr
Amino acid drop out solution	1.4 gr
Glucose (2% glucose)	20 gr
Bacto agar (only for plates)	20 gr

Προσθήκη εκείνων των αμινοξέων που καθορίζονται από τα κριτήρια επιλογής κάθε πλασμιδιακού φορέα

Ουρακίλη	0.02 gr
Λευκίνη	0.1 gr
Τρυπτοφάνη	0.02 gr
Ιστιδίνη	0.02 gr

διαλύονται σε milli-Q νερό με τελικό όγκο 1 l

### 10xTE

Tris-HCl	100 mM
EDTA	10 mM

Ρύθμιση pH στο 8.0

### 10xLiA

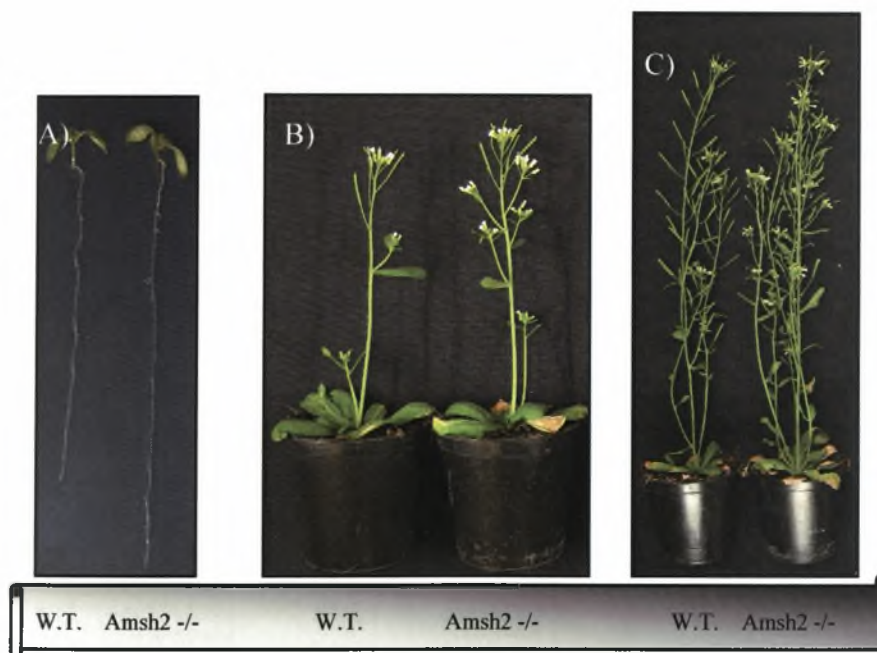
1 M lithium acetate, pH 7.5

## 4. Αποτελέσματα

### 4.1 Η επίδραση της απώλειας της πρωτεΐνης AMSH2 στον φαινότυπο των φυτών

Πρωτεΐνες που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην λειτουργία και την ανάπτυξη του φυτού προκαλούν αλλαγές στον φαινότυπο αγρίου τύπου όταν καταστέλλεται η έκφρασή τους. Οι συνέπειες στο φαινότυπο ποικίλουν, ανάλογα με το ρόλο της πρωτεΐνης. Για να μελετηθούν οι συνέπειες της απώλειας της πρωτεΐνης AMSH2 στο φαινότυπο των φυτών, εισήχθηκε ένα T-DNA (Cold Spring Harbor Lininen) στο γονίδιο AMSH2 στα φυτά *Arabidopsis thaliana*, το οποίο θεωρείται ότι καταστέλλει την έκφραση του γονιδίου.

Τα φυτά της 3<sup>ης</sup> γενιάς που εξετάστηκαν περιέχουν το ένθετο T-DNA στο γονίδιο AMSH2 σε ομοζυγωτία και αναμένεται να καταστέλλεται πλήρως η έκφραση του. Αυτά τα φυτά χαρακτηρίζονται ως AMSH2<sup>-/-</sup>.



Εικόνα 10: Φαινότυπος αγρίου τύπου και μεταλλαγμένων AMSH2<sup>-/-</sup> *Arabidopsis thaliana* (Ler) μετά από a) 1 εβδομάδα, b) 3 εβδομάδες και c) 4 εβδομάδες ανάπτυξης.

Τα φυτά AMSH2<sup>-/-</sup> έχουν τον ίδιο φαινότυπο με αυτά του άγριου τύπου. Μετά από 1, 3 και 4 εβδομάδες ανάπτυξης δεν παρατηρείται καμία διαφορά στο φαινότυπο (εικ.10). Η απώλεια δηλαδή της AMSH2 δεν έχει εμφανείς συνέπειες στο φαινότυπο του φυτού.

Η έκφραση του γονιδίου AMSH2 μπορεί να μην καταστέλλεται πλήρως από το T-DNA, επειδή η θέση ένθεσής του είναι πριν το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης (εικ.11). Η πρωτεΐνη δηλαδή μπορεί να εκφράζεται μέχρι ένα επίπεδο, που είναι αρκετό ώστε να επιτελέσει τη λειτουργία της και να μην υπάρχει καμία αρνητική επίπτωση στο φαινότυπο του φυτού. Μια άλλη πιθανή εξήγηση για τη φυσιολογική ανάπτυξη των μεταλλαγμένων φυτών είναι ότι η λειτουργία της πρωτεΐνης AMSH2 επικαλύπτεται από τις λειτουργίες των άλλων δυο AMSH πρωτεϊνών.

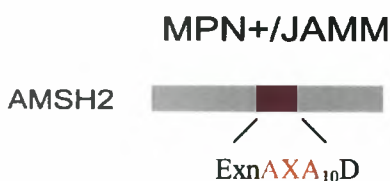


Εικόνα 11: Σημείο ένθεσης του T-DNA , CSHL\_ET4018 στο γονίδιο AMSH2

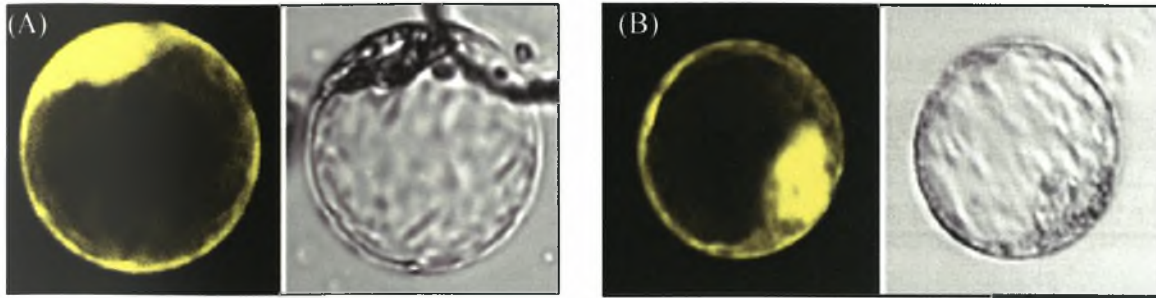
## 4.2 Κυτταρικός εντοπισμός της πρωτεΐνης AMSH2

Ο κυτταρικός εντοπισμός της AMSH2 εξετάστηκε σε πρωτόπλαστες, απομονωμένους από ρίζες του *Arabidopsis thaliana*. Η παροδική έκφραση των γονιδίων AMSH2 μελετήθηκε σε πρωτοπλάστες, που έχουν την ικανότητα να προσλαμβάνουν DNA, λόγω της απώλειας του κυτταρικού τοιχώματος, το οποίο δρα ανασταλτικά στην πρόσληψη μακρομορίων.

Η AMSH2 είναι σημασμένη με YFP στο N-τελικό άκρο. Η φυσιολογική έκφραση του γονιδίου AMSH2 δεν επαρκεί για να δώσει ένα σήμα που μπορεί να ανιχνευθεί, γι' αυτό υπερεκφράζεται επαγόμενο από τον CaMV 35S προαγωγέα.



Εικόνα 12: Η ανενεργής μετάλλαξη *axa* της AMSH2 πρωτεΐνης στην καταλυτική περιοχή MPN.



**Εικόνα 13:** (A) Απομονωμένοι πρωτοπλάστες από *Arabidopsis thaliana*, στους οποίους εκφράζεται η 35S-YFP-AMSH2. (B) Απομονωμένοι πρωτοπλάστες από *Arabidopsis thaliana*, στους οποίους εκφράζεται η 35S-YFP-AMSH2axa. Οι εικόνες έχουν ληφθεί με μικροσκόπιο συνενστίαισης, στο αριστερό πλαίσιο πρωτοπλάστες όπου η YFP φθορίζουσα ουσία των σημασμένων πρωτεϊνών διεγείρεται από 488 nm Ar/Kr laser και στο δεξί πλαίσιο οι ίδιοι πρωτοπλάστες κάτω από λευκό φως.

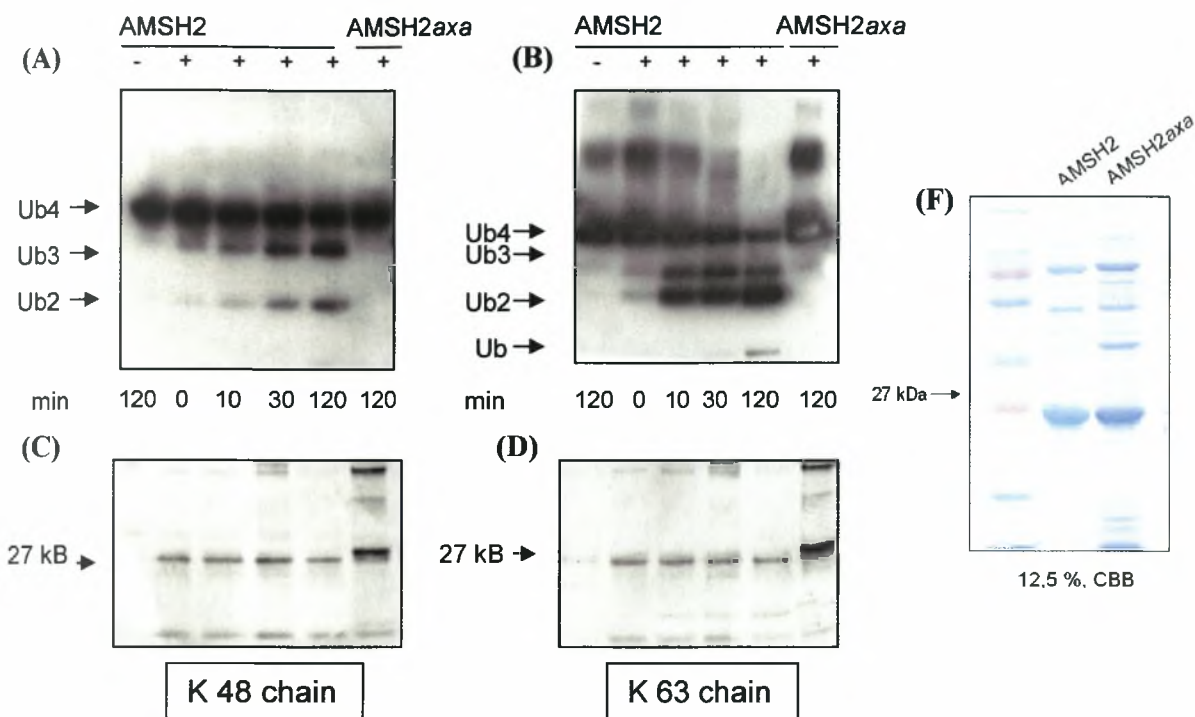
Για τον κυτταρικό εντοπισμό χρησιμοποιήθηκε και μια μη ενεργή μορφή της AMSH2 πρωτεΐνης. Η έλλειψη ενεργότητας οφείλεται σε μια μετάλλαξη στην περιοχή MPN (εικ.12). Η μη ενεργή πρωτεΐνη AMSH2 ονομάζεται AMSH2axa.

Οι εκφρασμένες πρωτεΐνες AMSH2 και AMSH2axa, επαγόμενες από τον 35S προαγωγέα εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα (εικ13).

### 4.3 Προσδιορισμός αποουβικουιτινυλίωσης

Πραγματοποιείται προσδιορισμός αποουβικουιτινυλίωσης για να αποδειχθεί ότι η AMSH2 πρωτεΐνη έχει δραστηριότητα αποουβικουιτινυλίωσης. Οι GST-AMSH2 και GST-AMSH2axa, καθαρισμένες από *E. coli* (εικ.14f), επώαστηκαν με K48- και K63-αλυσίδα τετρα-ουβικουιτίνης για να ελεγχθεί αν έχουν δραστηριότητα αποουβικουιτινυλίωσης. Αν έχουν δραστηριότητα αποουβικουιτινυλίωσης θα διασπάσουν τον ισοπεπτιδικό δεσμό μεταξύ της K48 ή K63 λυσίνης και του COOH-άκρου της γλυκίνης μιας συνδεδεμένης ουβικουιτίνης και θα αναγεννηθούν μόρια ουβικουιτίνης μικρότερης οργάνωσης (μονο-, δι-, ή τρι-ουβικουιτίνη).

Η πρωτεΐνη AMSH2 επώαστηκε με αλυσίδες τετρα-ουβικουιτίνης για 0, 10, 30 και 120 min και η πρωτεΐνη AMSH2axa για 120 min (εικ.14a). Στην περίπτωση του μάρτυρα (απουσία πρωτεΐνης) και της επώασης για 0 min με τις K48- και K63-αλυσίδες, ανιχνεύθηκαν μόνο μόρια τετρα-ουβικουιτίνης, το οποίο αποδεικνύει την παρουσία των αλυσίδων και την μη δραστηριότητα της πρωτεΐνης σε 0 min χρόνο επώασης. Στην



**Εικόνα 14:** (A) K48-αλυσίδα τετρα-ουβικουιτίνης επώαστηκε χωρίς AMSH2 για 120 min, με AMSH2 για 0, 10, 30 και 120 min και με AMSH2axa για 120 min στους 30° C. (B) K63 τετρα-ουβικουιτίνης επώαστηκε χωρίς AMSH2 για 120 min, με AMSH2 για 0, 10, 30 και 120 min και με AMSH2axa για 120 min στους 30° C. Οι εικόνες (A) και (B) είναι απεικονίσεις από Western blots όπου τα μόρια ουβικουιτίνης ανιχνεύονται με ECL με την χρήση ενός πρωτογενούς αντισώματος κατά της ουβικουιτίνης. Οι εικόνες (C) και (D) είναι απεικονίσεις από Western blots όπου οι πρωτεΐνες AMSH2 και AMSH2axa ανιχνεύονται στη ζώνη των 27 kb, με τη χρήση ενός πρωτογενούς αντισώματος κατά την AMSH2 πρωτεΐνη. (E) Οι AMSH2 και AMSH2axa πρωτεΐνες μετά την ηλεκτροφόρηση σε 12.5% πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου, το οποίο χρωματίστηκε με CBB χρωστική.

περίπτωση της K48-αλυσίδας, η AMSH2 πρωτεΐνη έδειξε δραστικότητα αποουβικουιτινυλίσωσης στην αλυσίδα τετρα-ουβικουιτίνης αναγεννώντας αλυσίδες τρι- και δι-ουβικουιτίνης. Τρι-ουβικουιτίνη ήταν ανιχνεύσιμη ήδη από τα 10 min ενώ η δι-ουβικουιτίνη μετά από 30 min χρόνο επώασης. Η δι-ουβικουιτίνη είναι αποτέλεσμα της κοπής της τετρα-ουβικουιτίνης σε μία θέση. Η πρωτεΐνη AMSH2axa δεν έδειξε καμία δραστικότητα, επιβεβαιώνοντας την απώλεια δραστικότητας που προκαλείται από τη μετάλλαξη μέσα στην περιοχή MPN.

Στην περίπτωση της αλυσίδας K63, η AMSH2 έδειξε παρόμοια DUB δραστικότητα, με τη διαφορά ότι μετά από 120 min χρόνο επώασης, η K63-τετρα-ουβικουιτίνη, κόπηκε σε

τρι-, δι-ουβικουιτίνη και σε μονο-ουβικουιτίνη. Η AMSH2αχα δεν εμφάνισε καμία DUB δραστηριότητα ακόμη και μετά από 120 min επώασης.

Η παρουσία των πρωτεϊνών ASMH2 και AMSH2αχα επιβεβαιώθηκε με χρωματομετρικό προσδιορισμό με τη χρήση ενός δευτερογενούς αντισώματος συζευγμένου με αλκαλική φωσφατάση το οποίο προσδένεται στο πρωτογενές αντίσωμα κατά της πρωτεΐνης AMSH2. Όπως φαίνεται στην **εικόνα 14**, η πρωτεΐνη AMSH2 ήταν παρούσα σε όλες τις επώσεις.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του προσδιορισμού αποουβικουιτινυλίωσης, η AMSH2 πρωτεΐνη είναι ένα ενεργό ένζυμο με δράση αποουβικουιτινυλίωσης με προτίμηση για την K-63 αλυσίδα, η οποία συμμετέχει στους μηχανισμούς για την επιδιόρθωση του DNA και στην ενδοκυττάρωση μεμβρανικών υποδοχέων.

#### **4.4 Προσδιορισμός αποουβικουιτινυλίωσης με αναστολείς πρωτεασών**

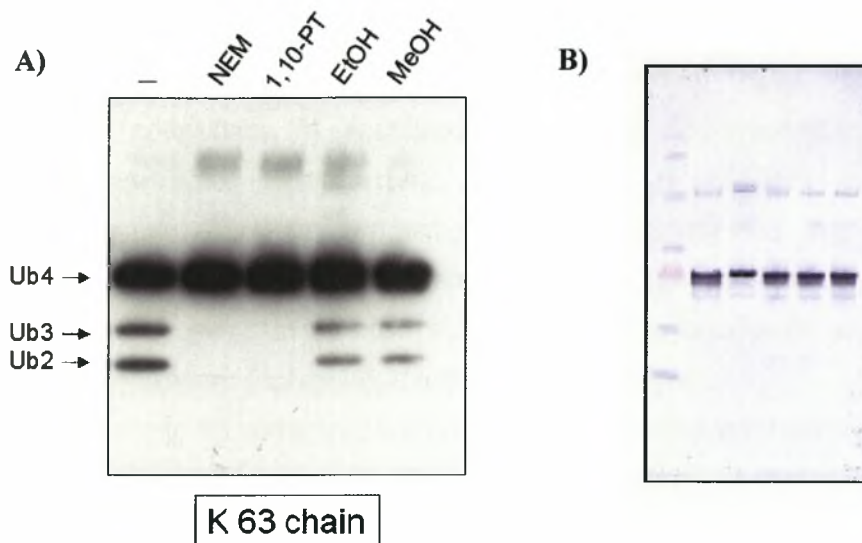
Υπάρχουν οικογένειες DUB ενζύμων που είναι πρωτεάσες κυστεΐνης και η δράση τους αναστέλλεται από τον παράγοντα N-αιθυλομηλεϊμίδιο (NEM), ο οποίος είναι ένας αναστολέας πρωτεασών κυστεΐνης.

Οι πρωτεΐνες AMSH, οι οποίες είναι μεταλλοπρωτεάσες, θα πρέπει να είναι ευαίσθητες στον χειλικό παράγοντα μεταλλικών ιόντων 1.10-Φαινανθρολίνη (1.10-PT).

Γι' αυτό το λόγο επαναλαμβάνεται ο προσδιορισμός αποουβικουιτινυλίωσης, αλλά κατά την διάρκεια της επώασης της πρωτεΐνης AMSH2 με την K63 αλυσίδα προστίθεται και ο αναστολέας και το μίγμα επωάζεται τελικά για 120 min .

Ο αναστολέας 1.10-PT είναι διαλυμένος σε μεθανόλη ενώ ο NEM αναστολέας σε αιθανόλη, για αυτό το λόγο οι διαλύτες αυτοί χρησιμοποιούνται ως μάρτυρες. Αυτό σημαίνει ότι στην περίπτωση των μαρτύρων η αλυσίδα της K63-τετρα-ουβικουιτίνης δε θα πρέπει να αποουβικουιτινυλιώνεται σε μικρότερες υπομονάδες ουβικουιτίνης, διότι η AMSH2 δείχνει φυσιολογική δραστηριότητα DUB, όπως αποδείχθηκε στην **εικόνα 14**.

Στην περίπτωση της επώασης της AMSH2 με την K63 αλυσίδα και τον 1.10 Pt ή τον NEM αναστολέα, δεν υπήρχαν ανιχνεύσιμα μόρια τρι-, δι- ή μονο-ουβικουιτίνης. Αυτό σημαίνει ότι οι ουσίες 1.10 Pt και NEM ανέστειλαν την ενζυμική δράση της AMSH2 πρωτεΐνης. Η AMSH2 παρουσία των αναστολέων αδυνατεί να κόψει την αλυσίδα τετρα-ουβικουιτίνης σε τρι- και δι-ουβικουιτίνη.



**Εικόνα 15:** Απεικονίσεις από Western blots. (A) ECL ανίχνευση μορίων ουβικουιτίνης από ντο προϊόν της επώασης της K63-αλυσίδα τετρα-ουβικουιτίνης χωρίς AMSH2 για 120 min, με AMSH2 και NEM ή 1.10 Pt ή EtOH ή MeOH για 120 min στους 30° C. (B) Ανίχνευση της πρωτεΐνης AMSH2 με αλκαλική φωσφατάση.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα από τον προσδιορισμό αποουβικουιτινυλίωσης με αναστολείς πρωτεασών, αποδεικνύεται πρώτον ότι η AMSH2 πρωτεΐνη είναι πρωτεάση κυστεΐνης επειδή η δραστηκότητά της αναστέλλεται από τον αναστολέα NEM και δεύτερον ότι είναι μια μεταλλοπρωτεάση εφόσον αναστέλλεται από τον παράγοντα 1.10 Pt.

#### 4.5 Εμπλοκή των AMSH πρωτεϊνών στο μονοπάτι ενδοκύτωσης υποδοχέων της πλασματικής μεμβράνης

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η ουβικουιτινίωση εμπλέκεται στο μονοπάτι της ενδοκύτωσης στα θηλαστικά και στους σακχαρομύκητες. Η μονο-ουβικουιτινίωση πρωτεϊνών της πλασματικής μεμβράνης δρα σαν ένα επαρκές σήμα ενδοκύτωσης και οι Ub<sup>K63</sup> διακλαδώσεις διευκολύνουν την ενδοκύτωση των πρωτεϊνών. Στα φυτά, η συμμετοχή της ουβικουιτινυλίωσης / αποουβικουιτινυλίωσης στο μονοπάτι αυτό δεν έχει μελετηθεί ακόμα.

Στο *in vitro* προσδιορισμό αποουβικουιτινυλίωσης, η δράση της ανασυνδυασμένης AMSH2 πρωτεΐνης αναγέννησε μονομερή ουβικουιτίνης από την K63-αλυσίδα τετρα-



ουβικουιτίνης αλλά όχι από την K48-αλυσίδα. Εφόσον η K63 ουβικουιτίνη, όπως η μόνο-ουβικουιτίνη, συνδέεται με την συναρμολόγηση των κυστιδίων των εσωτερικευμένων πρωτεϊνών, η προτίμηση της DUB δραστηριότητας της AMSH2 πρωτεΐνης για την K63 ουβικουιτίνης, δείχνει ότι η AMSH2 εμπλέκεται στη συναρμολόγηση αυτή. Για το χαρακτηρισμό της λειτουργίας της AMSH2 στο σχηματισμό του MVB και / ή στην εσωτερικευση των πρωτεϊνών, μελετήθηκαν πρωτεΐνες αυτού του μονοπατιού που πιθανώς να αλληλεπιδρούν με την AMSH2 πρωτεΐνη, με τη δοκιμή του διπλού υβριδίου σε κύτταρα ζύμης.

Τα αποτελέσματα της σάρωσης της δοκιμής διπλού υβριδίου προτείνουν ότι η ομόλογη της AMSH πρωτεΐνης στη *Drosophila* μπορεί να αλληλεπιδρά με συστατικά του ESCRT III συμπλόκου. Επίσης έχει βρεθεί ότι η AMSH των θηλαστικών αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη Vps24, μέλος του ESCRT III συμπλόκου. Σύμφωνα με αυτά τα δεδομένα, οι πιθανές πρωτεΐνες αλληλεπίδρασης με τις πρωτεΐνες AMSH των φυτών είναι τα μέλη του ESCRT III συμπλόκου. Οι πρωτεΐνες του ESCRT III συμπλόκου που εξετάστηκαν για πιθανή αλληλεπίδραση με τις πρωτεΐνες AMSH αναγράφονται στον **πίνακα 2**.

Η αλληλεπίδραση μεταξύ των AMSH και των ESCRT III πρωτεϊνών εξετάστηκε με τη δοκιμή του διπλού υβριδίου. Το σύστημα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το GAL4. Σε αυτό το σύστημα το γονίδιο αναφοράς είναι το γονίδιο His3 με υποκινητή τον GAL4. Το γονίδιο HIS3 αντιστοιχεί σε ένζυμο που συμβάλει στην βιοσύνθεση της ιστιδίνης, επιτρέποντας τα κύτταρα να αναπτυχθούν σε μέσο χωρίς ιστιδίνη. Λειτουργεί δηλαδή σαν ένας αυξοτροφικός δείκτης.

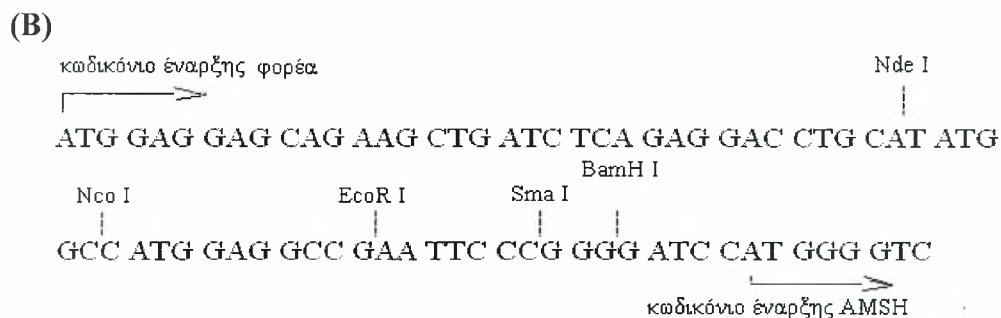
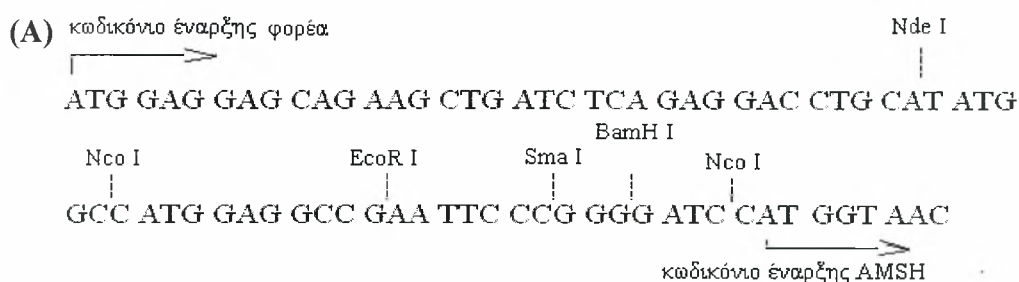
Οι πρωτεΐνες AMSH και οι αντίστοιχες *axa* μεταλλάξεις κλωνοποιήθηκαν στον pGBKT7 DNA-BD φορέα και τα μέλη του ESCRT III συμπλόκου στον pGADT7 AD φορέα.

**Πίνακας 2:** Μέλη του ESCRT III συμπλόκου που μελετήθηκαν με το σύστημα διπλού υβριδίου

Class	Members
SNF7	SNF7
VPS20	vps 20.1
VPS2	vps 2.1 vps 2.2, vps 2.3
VPS24	vps 24.1
VPS46	vps 46.1, vps 46.2
VPS60	vps 60.1
	vps4

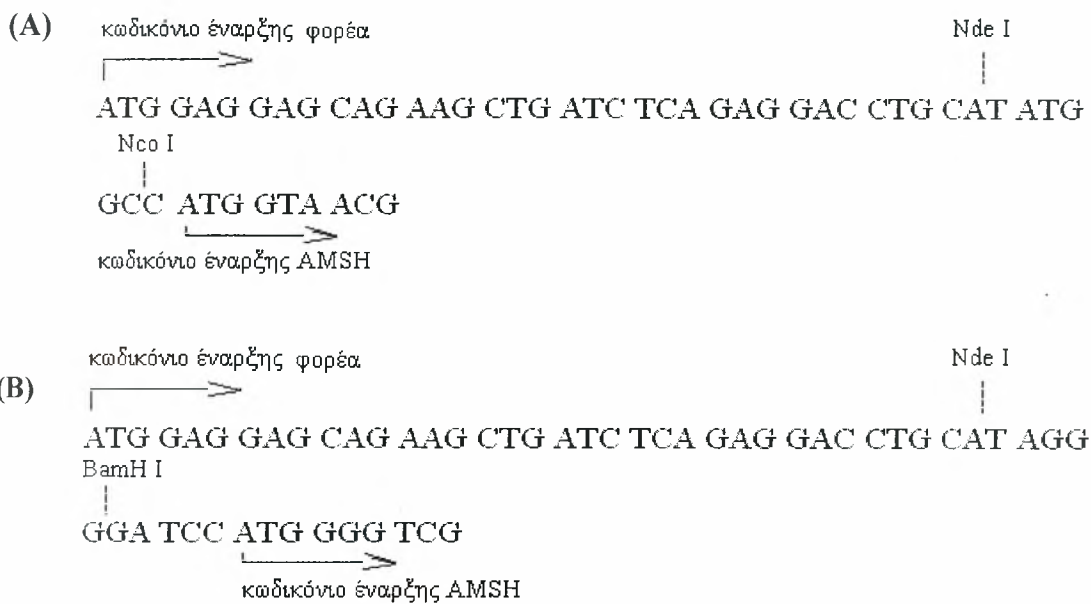
Μετά τον προσδιορισμό της αλληλουχίας των ανασυνδυασμένων φορέων (εικ.16) βρέθηκε ότι τα γονίδια των πρωτεϊνών AMSH ήταν εκτός πλαισίου ανάγνωσης. Αυτό ήταν αποτέλεσμα του σχεδιασμού λανθασμένων εκκινητών.

Για την επιδιόρθωση των φορέων στην περίπτωση των γονιδίων AMSH2 και AMSH2axa, οι φορείς επεξεργάστηκαν με το περιοριστικό ένζυμο Nco I, για την απομάκρυνση του τμήματος των 25 βάσεων μεταξύ των δύο Nco I θέσεων κοπής πριν το γονίδιο της πρωτεΐνης. Η απαλοιφή αυτού του τμήματος και η επανασύνδεση του φορέα έχει ως αποτέλεσμα την επαναφορά του γονιδίου στο πλαίσιο ανάγνωσης του φορέα και τη σωστή έκφραση της πρωτεΐνης (εικ.17α). Αυτό έγινε δυνατόν από τη στιγμή που ο φορέας καθώς και το γονίδιο της πρωτεΐνης δεν περιείχαν άλλες θέσεις κοπής από αυτό το ένζυμο.

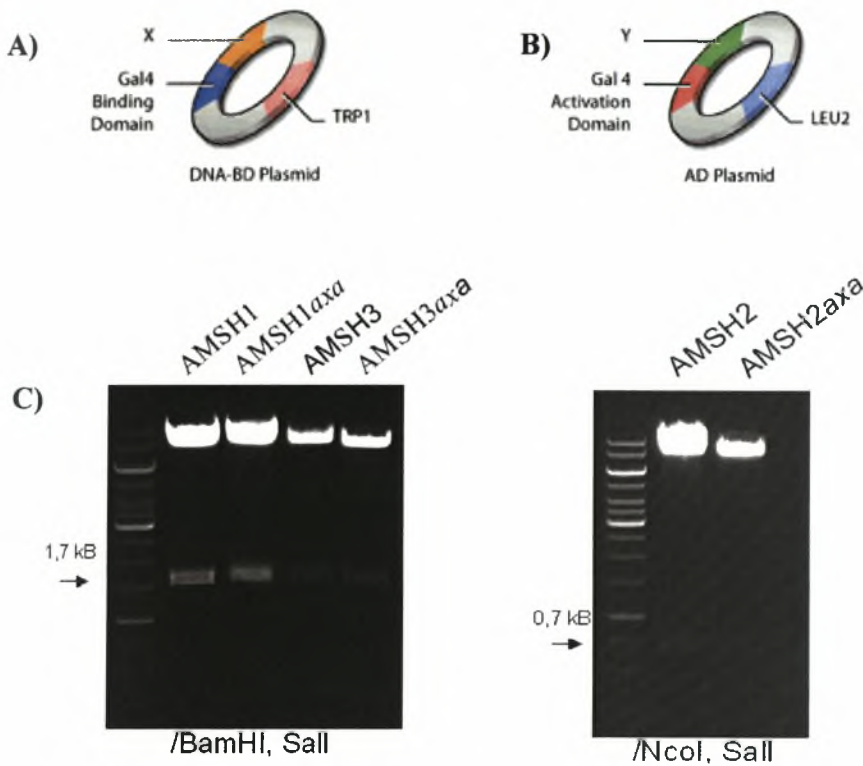


Εικόνα 16: Αποτελέσματα του προσδιορισμού αλληλουχίας των AMSH κατασκευών για την δοκιμή διπλού υβριδίου. (A) Αλληλουχία της περιοχής σύνδεσης του φορέα με το γονίδιο AMSH2, ομοίως και για το γονίδιο AMSH2axa. (B) Αλληλουχία της περιοχής σύνδεσης του φορέα με το AMSH1 γονίδιο

Στην περίπτωση των γονιδίων *AMSH1*, *AMSH1axa*, *AMSH3* και *AMSH3axa* δεν υπήρχαν δύο θέσεις κοπής από το *Nco I* ένζυμο, γι' αυτό για την επαναφορά τους ακολουθήθηκε άλλη διαδικασία. Η επαναφορά των γονιδίων στο πλαίσιο ανάγνωσης μπορεί να γίνει με τη προσθήκη ή την αφαίρεση ζυγού αριθμού βάσεων πριν από την αρχή του γονιδίου. Για αυτό το λόγο, επιλέχθηκε μία θέση κοπής που να δημιουργεί κολλώδη άκρα με κενό δύο βάσεων και μία άλλη που να δημιουργεί τυφλά άκρα. Αυτές οι προϋποθέσεις πληρούνται από τα περιοριστικά ένζυμα *NdeI* και *SmaI* αντίστοιχα. Εφόσον οι φορείς επεξεργάστηκαν με αυτά τα ένζυμα στην συνέχεια επώαστηκαν με το ένζυμο *Klenow fragment*, το οποίο συμπληρώνει με βάση συμπληρωματικότητας τα κολλώδη άκρα. Οι φορείς αποτελούνται τώρα από τυφλά άκρα τα οποία επανασυνδέονται με αποτέλεσμα την επιδιόρθωση των γονιδίων (**εικ. 17β**)



Εικόνα 17: Επαναφορά των γονιδίων στο ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης του φορέα. (A) Αλληλουχία της περιοχής σύνδεσης του φορέα με το γονίδιο *AMSH2*, ομοίως και για το γονίδιο *AMSH2axa*. (B) Αλληλουχία της περιοχής σύνδεσης του φορέα με το *AMSH1* γονίδιο



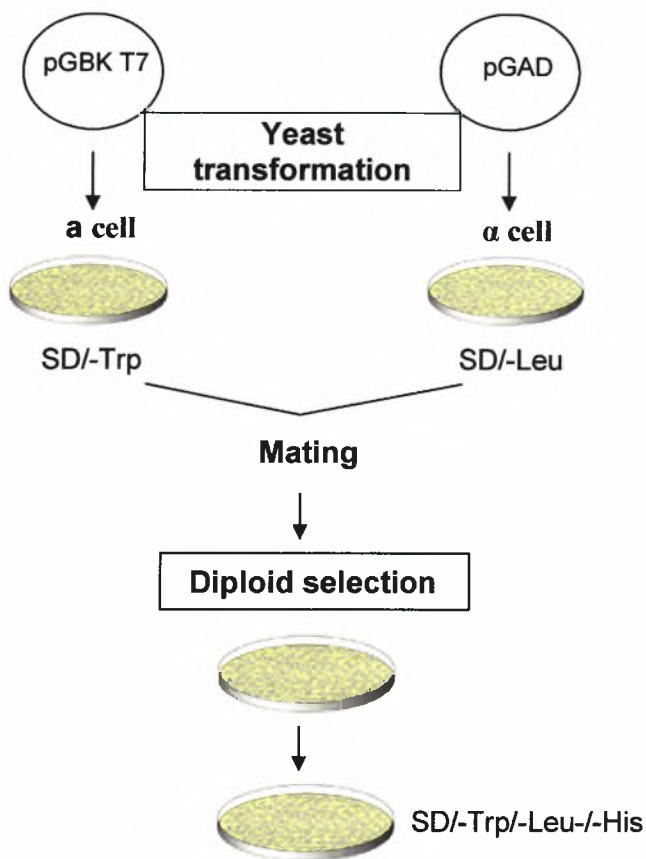
**Εικόνα 18:** (A) Σχηματική αναπαράσταση των pGBKT7 φορέων μετά την ένθεση των γονιδίων των πρωτεϊνών AMSH (x). (B) Σχηματική αναπαράσταση των pGADT7 φορέων μετά την ένθεση των γονιδίων των πρωτεϊνών ESCRT III. (C) Ηλεκτροφόρηση των επεξεργασμένων κατασκευών AMSH1, AMSH1axa, AMSH3 και AMSH3axa με τα ένζυμα BamHI και SalI και των AMSH2 και AMSH2axa με NcoI και SalI, για την επιβεβαίωση της ύπαρξης των γονιδίων στους φορείς. Τα γονίδια των πρωτεϊνών AMSH1 και AMSH3 αντιστοιχούν στις ζώνες των 1.7 kB ενώ του AMSH2 στην ζώνη των 0.7 kB.

Για την εκτέλεση της δοκιμής του διπλού υβριδίου οι κατασκευές των AMSH και των ESCRT III εισάγονται σε κατάλληλα στελέχη κυττάρων σακχαρομύκητα. Οι AMSH κατασκευές σε α κύτταρα ενώ οι κατασκευές των ESCRT III πρωτεϊνών σε a κύτταρα και τα μετασηματισμένα κύτταρα αναπτύσσονται στο κατάλληλο θρεπτικό μέσο (εικ.19).

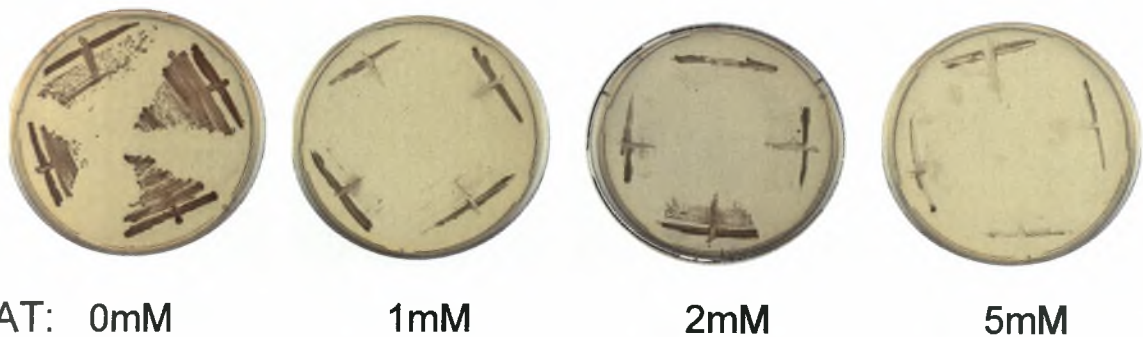
Τα κύτταρα που αναπτύχθηκαν μετά από 2 μέρες επώασης στους 30°C, περιέχουν και εκφράζουν τα υβριδικά γονίδια. Τα δύο είδη κυττάρων διασταυρώνονται μεταξύ τους με σκοπό τη δημιουργία όλων των δυνατών συνδυασμών μεταξύ των AMSH πρωτεϊνών και των μελών του ESCRT III συμπλόκου. Οι διασταυρώσεις οδηγούν στον σχηματισμό διπλοειδών κυττάρων. Τα διπλοειδή κύτταρα επιλέγονται σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο που δεν περιέχει λευκίνη και τρυπτοφάνη. Τα κύτταρα που αναπτύχθηκαν είναι

διπλοειδή και περιέχουν δυο πρωτεΐνες, η μία συνδεδεμένη με μία περιοχή πρόσδεσης και η άλλη με μια περιοχή ενεργοποίησης .

Η αλληλεπίδραση των AMSH πρωτεϊνών και των ESCRT III μελών γίνεται ορατή μετά την επίστρωση των διπλοειδών σε θρεπτικό μέσο απουσίας λευκίνης, τρυπτοφάνης και ιστιδίνης και εμπλουτισμένο με 5mM AT. Η κατάλληλη συγκέντρωση AT επιλέγεται ύστερα από την ανάπτυξη διπλοειδών σε SD/-Leu/-Trp με διαφορετικές συγκεντρώσεις AT (εικ.20).



Εικόνα 19: Σχηματική αναπαράσταση της δοκιμής του διπλού υβριδίου με το GAL4 σύστημα

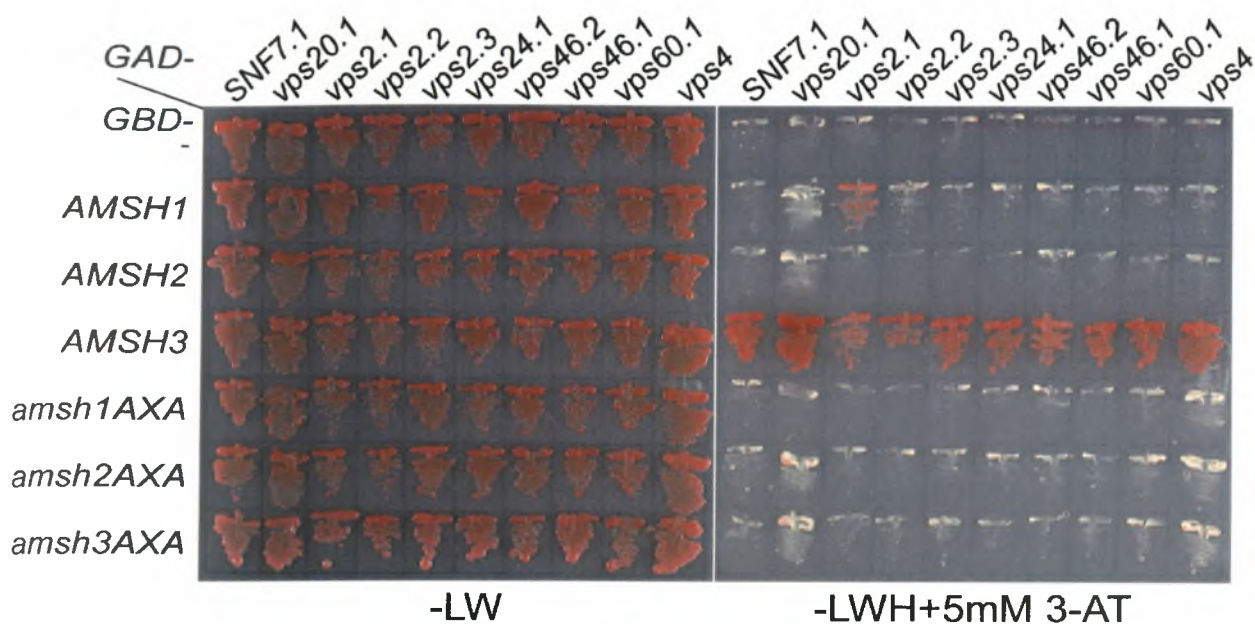


Εικόνα 20: Επιλογή της κατάλληλης 3-AT συγκέντρωσης. Διπλοειδή κύτταρα ζυμών σε SD/-Leu/-Trp + διάφορες συγκεντρώσεις 3-AT.

Σε 5 mM AT τα κύτταρα αναπτύχθηκαν όπως επίσης και σε 0 και 1 mM AT, στα οποία όμως το υπόβαθρο των ψευδών διπλοειδών είναι αρκετά υψηλό. Σε 2 mM AT το υπόβαθρο είναι αρκετά μειωμένο αλλά όχι τόσο ώστε να χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη των διπλοειδών για τον έλεγχο της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών. Σύμφωνα με αυτά τα δεδομένα για την ανάπτυξη των διπλοειδών επιλέγεται η συγκέντρωση των 5 mM.

Οι πρωτεΐνες, οι οποίες θα αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, θα οδηγήσουν μετά από 2 μέρες επώασης των διπλοειδών ξενιστών τους σε SD/-Trp/-Leu/-His/+5 mM AT, στην ανάπτυξή τους. Τα υγιή κύτταρα θα έχουν ένα χαρακτηριστικό κόκκινο χρώμα.

Στην εικόνα 21 στο αριστερό πλαίσιο απεικονίζονται οι αναπτυγμένες διπλοειδής ζύμες. Παρατηρείται ότι τα όλα τα διπλοειδή κύτταρα που φέρουν την πρωτεΐνη AMSH3 με τα αντίστοιχα μέλη του ESCRT III συμπλόκου έχουν αναπτυχθεί φυσιολογικά και έχουν το χαρακτηριστικό κόκκινο χρώμα. Ένα επιπλέον υγιές κύτταρο ζύμης είναι αυτό που περιέχει τις πρωτεΐνες AMSH1 και vps2.1. Άρα η AMSH3 αλληλεπιδρά με όλες τις πρωτεΐνες του συμπλόκου, αλλά η μεταλλαγμένη AMSH3 $\alpha$  δεν αλληλεπιδρά με καμία από αυτές τις πρωτεΐνες. Μια πιθανή εξήγηση γι' αυτό το φαινόμενο είναι ότι η μετάλλαξη βρίσκεται στην περιοχή που είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση με τις ESCRT III πρωτεΐνες. Επειδή η μετάλλαξη είναι στην MPN περιοχή, οι περιοχές υπεύθυνες για την αλληλεπίδραση είναι μέσα σε αυτήν την περιοχή. Μια πιθανότερη ερμηνεία είναι ότι τα διπλοειδή κύτταρα με την AMSH3 πρωτεΐνη αυτοενεργοποιούνται, μεταγράφουν το γονίδιο αναφοράς της και ως αποτέλεσμα αναπτύσσονται φυσιολογικά στο επιλεκτικό μέσο.



**Εικόνα 21:** Αποτελέσματα της δοκιμής του διπλού υβριδίου. Στο δεξί πλαίσιο, απεικονίζονται διπλοειδή κύτταρα επωασμένα για 2 μέρες σε SD/-Trp/-Leu (-LW) στους 30°C. Στο αριστερό πλάνο τα διπλοειδή κύτταρα που από το μέσο SD/-Trp/-Leu (-LW) μεταφέρθηκαν σε SD/-Trp/-Leu/-His/+5 mM 3-AT (-LWH+5 mM 3-AT) και επώαστηκαν για 2 μέρες στους 30°C.

Η πρωτεΐνη AMSH1 φαίνεται να αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη vps2.1, μέλος του συμπλόκου του στρώματος, αλλά η AMSH1*axa* δεν αλληλεπιδρά με την vps2.1. Αυτό σημαίνει ότι η περιοχή στο γονίδιο της AMSH1, που είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση μπορεί να βρίσκεται στην axa μετάλλαξη. Η πρωτεΐνη AMSH2 δεν αλληλεπιδρά με καμία πρωτεΐνη και συνεπακόλουθα δεν γίνεται να αλληλεπιδρά η AMSH2*axa*, όπως και δεν παρατηρείται. Οι περιοχές που οδηγούν τις άλλες δύο AMSH πρωτεΐνες σε αλληλεπίδραση απουσιάζουν από το γονίδιο της AMSH2, επειδή πιθανώς να εντοπίζονται στις αρχικές αλληλουχίες που απουσιάζουν από αυτό το γονίδιο. Οι ζύμες στην πρώτη στήλη της εικόνας αποτελούν μάρτυρες. Περιέχουν έναν μη ανασυνδυασμένο pGBKT7 φορέα, και παρατηρείται ότι δεν αναπτύσσονται στο επιλεκτικό μέσο, εφόσον δεν υπάρχει πρωτεΐνη συζευγμένη με περιοχή σύνδεσης στο DNA για να αλληλεπιδράσει με μία από τις ESCRT III πρωτεΐνες.

Σύμφωνα με αυτά τα δεδομένα οι πρωτεΐνες AMSH1 και AMSH3 συμμετέχουν στο μονοπάτι της ενδοκύτωσης εφόσον αλληλεπιδρούν με τουλάχιστον έναν από τους παράγοντες που συμμετέχουν σε αυτό ενώ η πρωτεΐνη AMSH2 δεν συμμετέχει τουλάχιστον στο επίπεδο του ESCRT III συμπλόκου.

## 5. Συζήτηση

Τα DUB ένζυμα είναι ένζυμα με δραστικότητα ισοπεπτιδάσης που αποκόβουν μόρια ουβικουιτίνης από ουβικουιτινυλιωμένα υποστρώματα. Τα ένζυμα αυτά διαχωρίζονται σε ομάδες. Η MPN οικογένεια είναι μια ομάδα DUB ενζύμων που αποτελείται συνολικά από τρεις πρωτεΐνες. Μια από αυτές είναι η AMSH πρωτεΐνη. Στα φυτά έχουν αναγνωριστεί συνολικά τρεις AMSH πρωτεΐνες, οι AMSH1, AMSH2 και AMSH3 και όλες περιέχουν την MPN καταλυτική περιοχή, η οποία τους προσδίδει της ιδιότητα της μετταλοπρωτεάσης.

Η απώλεια της πρωτεΐνης AMSH2 δεν επηρεάζει το φαινότυπο των φυτών. Τα φυτά παρουσιάζουν το ίδιο πρότυπο ανάπτυξης με αυτά του άγριου τύπου. Η απώλεια δηλαδή του ενζύμου δεν προκαλεί καμία διαταραχή στη λειτουργία του φυτού. Αυτό ίσως να οφείλεται στην επικάλυψη της δραστικότητας της από άλλα ένζυμα ή επειδή γενικώς η δραστικότητά του είναι περιορισμένη στα αγρίου τύπου φυτά.

Όταν το γονίδιο της AMSH2 υπερεκφράζεται επαγόμενο από τον 35S υποκινητή εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα. Η ίδια συμπεριφορά παρατηρείται και από μία ανενεργή μορφή της πρωτεΐνης που ονομάζεται *AMSH2axa*. Η πρωτεΐνη απενεργοποιείται από μια ενσωματωμένη μετάλλαξη εντός της MPN περιοχής που ονομάζεται *axa*.

Θεωρητικά λόγω της MPN περιοχής αναμένεται ότι η AMSH2 έχει δραστικότητα μεταλλοπρωτεάσης και ειδικότερα δραστικότητα DUB ενζύμου. Αυτό αποδείχθηκε και πειραματικά με το προσδιορισμό αποουβικουιτινυλίωσης. Σε αυτόν τον προσδιορισμό η AMSH2 πρωτεΐνη αποουβικουιτινυλίωσε αλυσίδα τετραουβικουιτίνης σε μόρια ουβικουιτίνης μικρότερης οργάνωσης, αποδεικνύοντας ότι πρόκειται για ένα ενεργό DUB ένζυμο. Μια μετάλλαξη στην MPN περιοχή εμπόδισε την πρωτεΐνη υπό τις ίδιες συνθήκες να αναγεννήσει ελεύθερα μόρια ουβικουιτίνης. Άρα υπεύθυνη για τη δραστικότητα της πρωτεΐνης είναι η MPN περιοχή. Οι αναστολείς πρωτεασών NEM και 1.10 Pt ανέστειλαν την ενεργότητα της πρωτεΐνης AMSH2.

Στα θηλαστικά οι AMSH πρωτεΐνες συνδέονται στην STAM πρωτεΐνη η οποία με τη σειρά της συνδέεται στην Hrs. Αυτές οι δύο πρωτεΐνες συμμετέχουν στο μονοπάτι της ενδοκύτωσης μεμβρανικών υποδοχέων που θα καταλήξουν τελικά στα λυσοσώματα για αποικοδόμηση. Με αυτήν την παραδοχή έχει προταθεί ένα μοντέλο εμπλοκής των AMSH πρωτεϊνών στο μονοπάτι ενδοκύτωσης στο επίπεδο των πρωτεϊνών STAM/Hrs. Επειδή όμως τα φυτά δεν κωδικοποιούν αυτές τις πρωτεΐνες η πιθανή εμπλοκή των AMSH σε αυτό το μονοπάτι θα πρέπει να γίνεται σε άλλο επίπεδο. Η πρώτη ένδειξη ότι οι AMSH των φυτών συμμετέχουν στην ενδοκύτωση προήλθε από την ικανότητα της AMSH2 να αποουβικουιτινυλιώνει την K63 αλυσίδα ουβικουιτίνης



σε μονομερή μόρια ουβικουιτίνης, η οποία δίνει το σήμα για την έναρξη της ενδοκύτωσης. Η δεύτερη ένδειξη προήλθε από την μελέτη της αλληλεπίδρασης των AMSH πρωτεϊνών με τις πρωτεΐνες που αποτελούν το ESCRT III σύμπλοκο, που συμμετέχει στο τελευταίο βήμα συναρμολόγησης των εσωτερικευμένων υποδοχέων πριν εισέλθουν στο MVB σωματίο και έπειτα στα λυσοσώματα. Η αλληλεπίδραση μελετήθηκε με τη δοκιμή του διπλού υβριδίου σε κύτταρα σακχαρομύκητα. Η πρωτεΐνη AMSH2 δεν αλληλεπιδρά με κανέναν παράγοντα αυτού του συμπλόκου. Δηλαδή η ρύθμιση του μονοπατιού από την πρωτεΐνη δεν συμβαίνει στο επίπεδο των ESCRT III πρωτεϊνών.

Σύμφωνα με τα αυτά τα δεδομένα αποδεικνύουμε ότι η AMSH2 πρωτεΐνη των φυτών είναι μία ενεργή πρωτεάση και συγκεκριμένα μια υδρολάση ουβικουιτίνης καθώς διασπά την αλυσίδα ουβικουιτίνης. Η δράση της AMSH2 παρουσιάζει προτίμηση για την αλυσίδα K63 ουβικουιτίνης, εφόσον την διασπά σε μονομερή μόρια ουβικουιτίνης, κάτι που δεν συμβαίνει στην περίπτωση της K48 αλυσίδας ουβικουιτίνης. Ειδικότερα η AMSH2 είναι μια πρωτεάση κυστεΐνης εφόσον αναστέλλεται από τον αναστολέα πρωτεασών κυστεΐνης και επειδή αναστέλλεται και από τον αναστολέα 1.10 Pt, η AMSH2 είναι μια μεταλλοπρωτεάση.

Για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της δοκιμής του διπλού υβριδίου, πρέπει να γίνει ποσοτικός και ποιοτικός έλεγχος της έκφρασης των πρωτεϊνών στα μετασχηματισμένα κύτταρα των ζυμών.

Για τον καλύτερο χαρακτηρισμό της AMSH2 πρωτεΐνης θα πρέπει να ελεγχθεί αν η ενεργότητά της επικαλύπτεται από τις άλλες AMSH πρωτεΐνες ελέγχοντας τον φαινότυπο διαφόρων μεταλλαγμένων φυτών για τις AMSH πρωτεΐνες και θα πρέπει να επαναληφθούν τα πειράματα του κυτταρικού της εντοπισμού, όπου η πρωτεΐνη θα επάγεται από τον δικό της προαγωγέα. Θα πρέπει να ελεγχθεί αν ανήκει σε κάποιο σύμπλοκο ή αν είναι μονομερής με τη μέθοδο FPLC. Τέλος θα πρέπει να γίνει μελέτη για την εύρεση πρωτεϊνών, εκτός των ESCRT III, που να αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη, για την απόδειξη της αρνητικής ρύθμισης του μονοπατιού της ενδοκύτωσης μεμβρανικών υποδοχέων από την AMSH2 πρωτεΐνη και μέσω μεταλλαξιγένεσης να βρεθούν οι περιοχές που είναι υπεύθυνες για αυτήν την αλληλεπίδραση.

# Παράρτημα

	10	20	30	40	50	60
AMSH1aa	-----MGSSFETIDIATSARRIGVDNRISLKFYFRIADNILKQANI	FRAEKNVIDLY				
AMSH3aa	-----MKIDLNKVAREIEVDNRIPLRNYRIADNLLRQASI	YREEKNVVDLY				
AMSH2aa	-----					
HumanAMSH	MSDHGDVSLPPEDRVRALSQLGSAVEVNEDI	PPRRYFRSGVEI	IRMASIYSEEGNIEHAF			
MammalianAMSH	MSDHGDVSLPPQDRVRILSQLGSAVELNEDI	PPRRYYRSGVEI	IRMASVYSEEGNIEHAF			
AMSH1aa	VLLRFSSLALETIPSHRDYRTSLKSNKEYLRMRLLDVLT-	ELEKLPVVQQRIDELY-P				
AMSH3aa	IMLLRYSSLISETIPFHRDYQASLPQERLGSRERLRVIN-	ELESLKPEFNQLVDKLNRV				
AMSH2aa	-----					
HumanAMSH	I LYNKYITL FIEKLPKHRDYKSAVI	PEKKD TVKKLKEIAFPKAEELKAELLKRYTKEYTE				
MammalianAMSH	I LYNKYITL FIEKLPKHRDYKSAI	IPEKKDAVKKLKSVAFPKAEELKTELLRRYTKEYEQ				
AMSH1aa	KLKPRYNVQAH PAN----	GSLGWSSAVKPSFN SYDHAKVRNPPGHNSGYMGRGQQLNA				
AMSH3aa	EDES RQDGS DLPVVS YSSDAVEWPPAHKASYSRPDINKP-	LPTSQPSW TYNNNL TSSSNR				
AMSH2aa	-----					
HumanAMSH	YNEEKKKEAEELAR----	NMAIQOEELEKEKORVAQOKQ-----				
MammalianAMSH	YKERKKKEEEELAR----	NIAIQOEELEKEKORVAQOKQ-----				
AMSH1aa	APLEERFRKMSVNF RP-	NEETLSKHSILGPGGLSAQWQPPKYD TKVQYPSNIDFSPVVIP				
AMSH3aa	TQIDQQFQKLSFD FLPPNQATLSRHSFLGPNGLKRQWVAPKSEI	KVQYPSNTDWG----	SA			
AMSH2aa	-----					
HumanAMSH	-----	QQLEQEQFHAF EEMIRNQELEKERLKI VQEF GKVDP----				
MammalianAMSH	-----	KQLEQEQFHAF EEMIQRQELEKERLKI VQEF GKVDP----				
AMSH1aa	SFQQLVDSKPMITNGSN--	DEPEKPIVEPSVASNEKI QKNYTEELSSMISFEEPESVNEN				
AMSH3aa	DNSGLIEAGPSSSSASLN GDSQEVSTLNSVLSLDDGRWQRHSEAVNSQ	FISDATEDPFQF				
AMSH2aa	-----	MVTLSSP---SPSLSCVENVTCK-----	SSHVSRVLISG-TDNINH G			
HumanAMSH	----GL-GGPLVPDLEK----	PSLDVFP TLT VSSI Q-----	PSDCHTTVRPAKPPVVD RS			
MammalianAMSH	----GP-CGPLLPDLEK----	PCVDVAPSSPFSPTQ-----	TPDCNTGMRPAKPPVVD RS			
AMSH1aa	NLIRQPSPPPVLAEVQDLVPALCP-	EVREPECMIENSLPDES LRSESPLELH IATSMMDT				
AMSH3aa	VGMKQPSPPPVL AQVHQELAQICPSKVADPRPGPAI	PSLEGKEGSNSYQHLHVPVRIMDD				
AMSH2aa	----ESSEAKILRDV-----	-----	HISERILED			
HumanAMSH	LKPGALSNSESIPTIDG-----	-----	LRHVVPGRICPQ			
MammalianAMSH	LKPGALSVIENVPTIEG-----	-----	LRHIVVPRNLCS E			
AMSH1aa	FMRLAKSNTKKNLETCGILAGSLKNRKFI	ITALIIPKQESTSDSCQATNEEEIFEVQDKQ				
AMSH3aa	FLRLARSNTERNLETCGVLGASLKNRVFHI	TTLIIPKQESTSDSCQTLNEEEIFEVQDRL				
AMSH2aa	FTELARENTEKDLETCGTLAFLERGI	FYVTTLIIPKQESTSNSCQAMNEVEVFSIQNER				
HumanAMSH	FLQLASANTARGVETCGILCGKLMRNEFT	ITHVLIIPKQSAGSDYCNTENEEEFLIQDQQ				
MammalianAMSH	FLQLASANTAKGIETCGVLCGKLMRNEFT	ITHVLIIPRQNGGPDYCHTENEEEIFFMQDDL				
AMSH1aa	SLFPLGWIHTHTPTQSCFMSSIDVH	THYSYQIMLPEAVAIIVMAPQDSSRNHGIFRLTTPGG				
AMSH3aa	SLFPLGWIHTHTPTQTCFMSSVDLH	THYSYQIMLPEAVAIIVMAPTDESTPHGIFHLSDP SG				
AMSH2aa	ELYPVGWIHTHTPSQGCFMSSVDLH	THYSYQVMVPEAFAIIVVAPTSSKSYGIFKLTDPGG				
HumanAMSH	GLITLGWIHTHTPTQTAFLSSVDLH	THCSYQMMLPESVAIVCSP--KFQETGFFKLT DHG-				
MammalianAMSH	GLITLGWIHTHTPTQTAFLSSVDLH	THCSYQMMLPESIAIVCSP--KFQETGFFKLT DYG-				

	490	500	510	520
AMSH1aa	MTVIRNCDRRG <b>GFH</b> AHSSPEDGGPIYNT <b>CKE</b> VYMNPNLKFDVIDLR			
AMSH3aa	VSVIRNC <b>QQR</b> G <b>GFH</b> PHEESEDGNPIYEH <b>CSH</b> VFLNAKLYEVL <b>DLR</b>			
AMSH2aa	MEVLRGCSE <b>TGFH</b> PHKEPEDGNPVYEH <b>CSN</b> VYKNSNLRFEIF <b>DLR</b>			
HumanAMSH	LEEISSCR <b>QKGFH</b> PHSKDP---PL <b>FC</b> SHVTVV-DRAV <b>TITDLR</b>			
MammalianAMSH	LQEISTCR <b>QKGFH</b> PHGRDP---PL <b>FC</b> D <b>CSH</b> VTVK-DRIV <b>TITDLR</b>			
	: : * . ***.*	*:: *..*	. . . : ***	

Οι αμινοξικές αλληλουχίες των πρωτεϊνών αποτελούν αρχεία από την πρωτεϊνική τράπεζα ta1r και με την βοήθεια του προγράμματος CLUSTALW έγινε πολλαπλή ομοπαράθεση αυτών των ακολουθιών. Οι τελευταίες αμινοξικές αλληλουχίες, αντιστοιχούν στην MPN περιοχή και είναι αρκετά συντηρημένες τόσο μεταξύ των AMSH πρωτεϊνών των φυτών όσο και με τις AMSH των θηλαστικών και του ανθρώπου.

## 6. Βιβλιογραφία

- John McCullough, Michael J. Clague, and Sylvie Urbé. 2004. AMSH is an endosome-associated ubiquitin isopeptidase. *J. Cell Biol.* 166:487-492
- John McCullough, Paula E. Row, Oscar Lorenzo, Mary Doherty, Robert Beynon, Michael J. Clague, Sylvie Urbé. 2006. Activation of the Endosome-Associated Ubiquitin Isopeptidase AMSH by STAM, a Component of the Multivesicular Body-Sorting Machinery. *Curr. Biol.* 16: 160–165
- Masano Kyuuma, Kazu Kikuchi, Katsuhiko Kojima, Yuriko Sugawara, Mariko Sato, Nariyasu Mano, Junichi Goto, Toshikazu Takeshita, Akitsugu Yamamoto, Kazuo Sugamara, Nobuyuki Tanaka. 2006. AMSH, an ESCRT III Associated Enzyme, Deubiquitinates Cargo on MVB/Late Endosomes, *Cell Biol.* 31:159-172
- Yu May Ma, Emmanuel Boucrot, Judit Villén, El Bachir Affar, Steven P. Gygi, Heinrich G. Göttlinger<sup>||</sup>, and Tomas Kirchhausen. 2007. Targeting of AMSH to Endosomes Is Required for Epidermal Growth Factor Receptor Degradation. *J. Biol. Chem.* 282: 9805-9812
- Michihiko Nakamura, Nobuyuki Tanaka, Naomi Kitamura and Masayuki Komada. 2006. Clathrin anchors deubiquitinating enzymes, AMSH and AMSH-like protein, on early endosomes. *Genes Cells.* 11, 593-606
- Verena Winter and Marie-Theres Hauser. 2006. Exploring the ESCRTing machinery in eukaryotes. *Trends Plant science.* 11:115-123
- Vered Maytal-Kivity, Noa Reis, Kay Hofmann, and Michael H Glickman. 2002. MPN+, a putative catalytic motif found in a subset of MPN domain proteins from eukaryotes and prokaryotes, is critical for Rpn11 function. *BMC Biochem.* 3: 28.
- Debdyuti Mukhopadhyay and Howard Riezman. 2007. Proteasome-Independent Functions of Ubiquitin in Endocytosis and Signaling. *Science.* 315:201-205
- Susan M. Millard and Stephen A. Wood. 2006. Riding the DUBway: regulation of protein trafficking by deubiquitylating enzymes. *J. Cell Biol.* 173:463-468
- Alexander Y. Amerik, Mark Hochstrasser. 2004. Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* 1695: 189-207
- S. Nijman, M. Luna-Vargas, A. Velds, T. Brummelkamp, A. Dirac, T. Sixma, R. Bernards. 2005. A Genomic and Functional Inventory of Deubiquitinating Enzymes. *Cell.* 123:773-786
- Philip James, John Halladay and Elisabeth A. Craig. 1996. Genomic Libraries and a Host Strain Designed for Highly Efficient Two-Hybrid Selection in Yeast. *Genetics* 144:1425-1436
- Claus Schwechheimer and Xing-Wang Deng. 2002. Studying protein-protein interaction with the yeast two-hybrid system. *Molecular Plant Biology* . 2: 173-197. Edited by Philip M. Gilmartin and Chris Bowler. Oxford University Press.

Solmaz Sobhanifar. 2003. The Yeast Two-Hybrid Assay: An Exercise In Experimental Eloquence. The Science Creative Quarterly. Issue 3