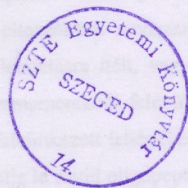


***A Drosophila melanogaster***  
**26S proteaszóma**  
**alegységösszetétele,**  
**alegységszerkezet-változásai**  
**és**  
**O-glikozilációi**

DOKTORI TÉZIS

Sümegei Máté

Témavezető: Dr. Udvardy Andor



Szeged, 2003



## Bevezetés

Az eukarióta sejtek homeosztázisa a sejtet felépítő komponensek állandó lebontásával és újrateremtésével valósul meg. A felépítési és lebontási folyamatok szabályozhatósága alapvető fontosságú, mind a környezet által indukált, mind a genetikai program irányította változásokra adott válaszok kialakulásánál. Az adaptáció, az egyedfejlődés és a reprodukció folyamataihoz a nagy mennyiségben előforduló háztartási fehérjék szintézise és lebontása mellett, a kisebb mennyiségben előforduló, de meghatározó szerepet játszó szabályozó fehérjék mennyiségének nagy pontosságú szabályozására is szükség van. A fehérjék szintézise közben történő hibák, illetve a fehérjék élete során bekövetkező bizonyos kölcsönhatások egyaránt képesek elrontani a kívánatos térszerkezetüket. Bizonyos esetekben ezen átalakulások visszafordíthatatlanok, ezt a sejtnek fel kell ismernie, majd a hibás fehérjéket a lehető leggyorsabban el kell távolítania.

A nagy specifitásiú, szabályozott fehérjebontás az ubiquitin – 26S proteaszóma fehérjedegradációs út által történik. Ennek a többkomponensű citoszolikus rendszernek az ubiquitin ligáz enzimkaszkába tartozó tagjai válogatják ki a lebontásra ítélt, vagy sérült térszerkezetű fehérjéket, amelyekhez egy ubiquitin polipeptid monomerekből felépülő poli-ubiquitin láncot kapcsolnak. Az ubiquitin degradációs szignállal felcímkézett fehérjéket a 26S proteaszóma, egy sok alegységből álló multiprotein komplex bontja le rövid oligopeptiddé és újrahasznosítható ubiquitin monomerekké.

Mivel a 26S proteaszómának általánosságban véve a fehérjék életével kapcsolatos folyamatban, a fehérjék lebontásában van szerepe, könnyen belátható, hogy miért van érintett szinte minden sejttes működés valamely lépésében. Közreműködik például a roszul feltekeredett fehérjék eltávolításában, az endoplazmatikus retikulum minőségellenőrzési folyamataiban, az antigén prezentációban, a sejtciklus szabályozásában, a sejtosztódás mechanizmusában, a transzkripció faktorok, onkogének és tumorszuppresszorok érésében és lebontásában és még sok egyéb más folyamatban.

A 26S proteaszóma minden eukariótában és archeában megtalálható. Több fajban is vizsgálták, de praktikus okokból emberben, élesztőben és muslicában tanulmányozták a legátfogóbban. Az ember 26S proteaszóma vizsgálatainak direkt előnyei mellett magától érthetően nagyon szűkösek a keretei. Az élesztő, mint objektum igen fontos a terület kutatásában, de a strukturális megközelítések egyik nagy hátulütője, hogy nem igazán lehet belőle teljesen homogén preparátumokat készíteni. A csoportunk által használt vizsgálati

alany a *Drosophila melanogaster* 0-12 órák korú embriói azonban igen dús forrása a könnyen tisztítható és aktív 26S proteasómának. Emellett a *Drosophila* genetika közel száz éves múltja alatt olyan genetikai információs és metodikai háttér gyűlelt fel, ami nagyon megkönnyíti ennek a kis lénynek a kísérletes használatát.

Ahhoz azonban, hogy a *Drosophila melanogaster* 26S proteasóma széles körben elfogadott, az egyéb fajokon végzett kutatásokkal jól egyeztethető kísérleti alanná válják, még hiányzott az, hogy elkülönítsük és leírjuk a komplexet felépítő összes fehérjét. Teljessé téve ezáltal az eddig felhalmozódott részeredményeket. Ez a probléma jelentette kutatásaink kiindulási alapját, mely a munkálatok előrehaladtával újabb problémákkal és felvetésekkel egészült ki.

Miután sikerült elválasztani a *Drosophila melanogaster* 26S proteasómáját felépítő alegységeket, megvizsgáltuk, hogy hogyan változik a 26S proteasómában az alegységek egymáshoz viszonyított térszerkezete a 26S proteasóma alkompexeiből való összeszerelődése közben. Ahhoz, hogy nyomon tudjuk követni ezeket a szerkezeti változásokat, szükségünk volt egy sor alegység-specifikus ellenanyagra, melyekről biztosan állíthatjuk, hogy tagjai egy és csakis egy alegységet ismernek fel. Munkám második részében a rendelkezésünkre álló ellenanyagok specificitását bizonyítottuk az általunk elválasztott 26S proteasóma alegységekkel szemben. Ezen munkák során tettünk egy érdekes megfigyelést, amiből arra következtettünk, hogy a 26S proteasóma bizonyos alegységei poszttranszlációan modifikáltak.

A feltételezhető modifikációk egyik típusának az oxigén atomon keresztül kötődő  $\beta$ -N-acetil-glukózamin módosítás jelenlétének kimutatását végeztük kísérleteink harmadik szakaszában.

## A 26S proteaszómát felépítő alkomplexek szerkezete és enzimatisuk sajátságaik

A 26S proteaszóma szerkezetileg és valószínűleg evolúciós eredetét tekintve is két alkomplexre választható szét. Az egyik alkotóeleme a 20S proteaszóma. Ez a csőserű képlet négy darab egyenként hét alegységből álló fehérjegyűrű összetapadásából keletkezik. Az egyes gyűrűket azonos típusba tartozó  $\alpha$  vagy  $\beta$  alegységek alkotják. A gyűrűk úgy szerveződnek, hogy a két középső  $\beta$  gyűrűt egy-egy  $\alpha$  gyűrű fogja közre. Az egyes típusokba egytől hét különböző  $\alpha$  vagy  $\beta$  alegység tartozhat a különböző fajokban. Ezáltal a szerkezetet leíró összegképlet archeáktól eukariótákig az  $\alpha_{1.7}\beta_{1.7}\beta_{1.7}\alpha_{1.7}$  és az  $\alpha_1\beta_1\beta_1\alpha_1$  végletek között változhat. Mivel az alkomplex igen jól kristályosítható és viszonylag egyszerű szimmetriájú, igen jó felbontású képet kaphatunk róla a röntgenkrisztallográfiai vizsgálatok eredményeként. A csőserű képlet közepén egy körülbelül 2 nm átmérőjű központi csatorna húzódik, amin az egyes gyűrűk találkozásánál kiöblösödések találhatók. A  $\beta$  gyűrűk határolta kiöblösödésbe lokalizálhatók az enzimkomplex savas, bázikus, és hidrofób aminosav-maradékok után hasító peptidáz aktivitások centrumai. Ennek a szerkezeti elrendeződésnek nyilvánvalóan az az előnye, hogy az ATP hasítását nem igénylő aspecifikus peptidáz aktivitások a kompartment belsejében, a sejt hasznos fehérjéitől elzárva találhatók. Az izolációt segíti elő az is, hogy a szabad 20S proteaszómában a külső gyűrűket alkotó  $\alpha$  alegységek nyúlvánai lezárják a központi csatorna bementi nyílásait. Tovább növeli a peptidáz aktivitások kompartmentalizációját az a tény, hogy a központi csatornán csak akkor tudnak a lebontandó fehérjék átjutni, ha előtte másodlagos és harmadlagos szerkezetüket elvesztve fonalszerű állapotba tekerednek szét. Ennek a széttekeredésnek a spontán bekövetkezése igen valószínűtlen esemény.

A lebontásra kijelölt szubsztrátfehérjék kiválogatása és a 20S proteaszóma központi csatornája való betáplálása a 19S regulátor komplex feladata. Ez a dinamikus változó szerkezetű és összetételű alkomplex nagyjából 19 alegységből áll. Sajnos nem mutat semmilyen egyszerűen leírható szimmetriát, továbbá szerkezeti és összetételbeli heterogenitása miatt igen nehezen kristályosítható. Ezért nagyfelbontású röntgendiffrakciós szerkezet-meghatározással nem, csak a jóval gyengébb felbontású statisztikus elektronmikroszkópiás képanalízissel lehet róla direkt szerkezeti információkat nyerni. A szerkezeti vizsgálatokat nagymértékben előrelendítette egy élesztő 19S regulátor komplex nullmutáns,

amelyben a 19S regulátor komplex két részkomplexre ejtendő szét. Az egyik részkomplexet alap részkomplexnek nevezik. Ez a részkomplex egyrészt hat darab ATP-áz aktivitású alegység alkotta gyűrűből, másrészt a gyűrűhöz közvetlenül kapcsolódó három nem ATP-áz alegységből áll. A gyűrű a 20S proteaszóma alapkorongjának síkjával párhuzamosan kapcsolódik az ott található  $\alpha$  alegységekhez. Az ATP-áz alegységek feltételezett szerepe az  $\alpha$  alegységek által lezárt központi csatorna felnyitása, és reverz chaperon aktivitásuknál fogva a szubsztrátfehérjék széttekerése, majd ezt követően a 20S proteaszómába való betáplálása.

A 19S regulátor komplex alap részkomplexéből kimaradó alegységek együttesen a fedő elnevezésű részkomplexet alkotják. A fedő részkomplex szerepe valószínűleg az ubiquitinált fehérjék megkötésében és az ubiquitin jelölés eltávolításában áll. Az egyes alegységek a felismert szubsztrátok egy kisebb körével reagál csak, így a 19S regulátor komplex feladatköre az egyes alegységek között megoszlik. Az, hogy melyik alegységnek pontosan mi is a feladata, a nagymérvű erőfeszítések ellenére máig is csak részben ismert.

## Anyagok és módszerek

A 0-12 órás korú petéket homogenizáció után többlépcsős centrifugálási és ultracentrifugálási eljárásnak vetettük alá. A centrifugálási lépésekkel és a közöttük ékelt kisózási reakcióval elértük, hogy megszabaduljunk a táptaljaból bekerült szemcsés szennyeződésektől, a fel nem tárt petéktől, sejtmagoktól, mitokondriumoktól, riboszómáktól, nukleinsavaktól, membrán darabkáktól, és az extraktum fagyasztása és tárolása során aggregálódott fehérjéktől.

Az előzetes durva tisztítást egy többlépcsős kromatográfiás frakcionálás követte. Ennek során a felhasznált hidroxil-apatit kromatográfia segített megszabadulni a kromatográfiás szempontból nehezen kezelhető szikfehérjéktől. Ezt követően Fractogel EMD DEAE (M) ioncserélő oszlopon, majd Fractogel EMD Heparin affinitás oszlopon választottuk el az embrióextraktum komponenseit. A frakciók 26S proteaszóma, 19S regulátor komplex és 20S proteaszóma tartalmát dot-blot eljárással követtük nyomon. Utolsó lépésben Pharmacia Superose 6 Prep Grade tölteten géliszűrtük a preparátumot, így közel homogenitásig tiszta frakciókat nyerve. Az utolsó két kromatográfiás lépésben alkalmazott nagyfelbontású oszlopok használatát a nagy nyomású, precíz folyadék adagolású, számítógép vezérelt és kiválóan reprodukálható eredményeket adó FPLC kromatográfiás rendszeren végeztük.

Ezek után, az alegységeket egy a hagyományos IEF / SDS kétdimenziós gélelektroforéziseknél jobb fehérjeoldó képességű mintafeltárási puffert alkalmazó 16-BAC / SDS kétdimenziós gélelektroforézissel választottuk el.

Az alegységek azonosítására a gél foltjait kivágtuk, és gélen belüli emésztés után kooperációs partnerünk segítségével tömegspektrometriai módszerekkel szekvenáltuk.

Az alegységek végső azonosítását a kapott szekvinca adatok alapján, az NCBI fehérje adatbázisban való kereséssel fejeztük be.

Az egyes alegység-specifikus ellenanyagok alegységekhez való rendelését a kétdimenziós gélelektroforézist követő immunoblot kísérletekkel bizonyítottuk. Hasonló immuno- és lektin-blot kísérleteket végeztünk az alegységek  $\beta$ -N-acetil-glükózamin módosításainak kimutatására.

A tisztított 26S proteaszóma, 19S regulátor komplex és 20S proteaszóma integritását és összeszereltségi állapotát Glickman-féle natív gélelektroforézissel ellenőriztük.

Az adott komponensek aktivitását fluoreszcens felülrétegzési esszével követtük nyomon.

A 26S proteaszóma komponenseiből való összeszerelődését kísérő alegységszerkezet változásokat, az alegységszerkezet bizonyos részleteit rögzítő, bifunkciós keresztkötőszert alkalmazó keresztkötési vizsgálatokkal végeztük. A keresztkötési dimerek azonosítását immunoblot technikával követett egydimenziós gél-elektroforézisekkel végeztük.

Együtműködő partnerünk, a 19S regulátor komplex tömegének meghatározására statisztikus elektron-mikroszkópiai eljárásokat végezt. A p37A alegység elektromikroszkópos elhelyezkedését nanogold jelölési technikával követte. Míg ezen alegység enzimatiságait a rekombinánsan termeltetett alegység fluoreszcenciás vizsgálatával végeztük.

## Eredmények és tárgyalásuk

**A** 26S proteaszóma szerkezetéről és működéséről szerzett ismereteink meglehetősen lassú ütemben gyarapodnak. Bár a 20S proteaszóma összetétele jól ismert, az alegységösszetétel meghatározása a labilis 19S regulátor komplex esetén nem kifejezetten egyszerű feladat.

Korábbi megközelítésekben egydimenziós SDS géleken 12 darab p37-től p110-ig elnevezett alegységet különítettek el. A teljes aminosav-szekvenciát előttünk csak két alegységnél (p54, p42C) írtak le. Munkáink során alapvető célként tűztük ki az alegységösszetétel hiánytalan definiálását.

Ahhoz, hogy megfelelő alapot nyújthassunk a szerkezeti megközelítésű vizsgálatokhoz, két dimenziós gél-elektroforézisek és az azt követő aminosav sorrend meghatározások segítségével, meghatároztuk a tisztított 26S proteaszóma alegység-összetételét. Összeségében azt találtuk, hogy 19 különböző alegység épít fel egy *Drosophila melanogaster* 19S regulátor komplexet. A 19 alegység közül 17 alegységnek ismerjük a humán és az élesztő homológiát. Ezek alapján feltételezhető, hogy az általunk elkülönített 19 alegység közül egyik sem a tisztítás során el nem különülő szennyeződés, hanem mindegyik alegység a 19S regulátor komplex integráns részét képi. A p37A az egyetlen olyan alegység amelynek bár van humán homológiája, de az élesztő homológiája nem ismert. Az emlős S5b, p28 és az élesztő Rpn4 alegységeknek nem találhatóak homológjai más fajokban, így *Drosophila melanogaster* ben sem. Ezt erősíti, hogy *Drosophila* cDNS könyvtárakban sem sikerült fellelni homológjaik nyomát.

Nehéz megítélni azt, hogy az általunk elkülönített 19 alegység valóban teljes mértékben lefedi-e *Drosophila melanogaster* 19S regulátor komplexet, hiszen mind a tisztítás, mind a gél-elektroforézisek során szelektív módon elveszthetünk alegységeket. Ha azonban összeadjuk az egyes alegységek DNS szekvenciákból számított tömegét (932 kDa), akkor a kapott érték igen közel esik a fizikai méréssel kapott 894 kDa-os ösztömeghez. Érdekes megfigyelnünk, hogy míg a 20S proteaszóma esetén a tapasztalt és a tömegmérési módszerből elméletileg adódó szórási értékek igen közel esnek egymáshoz, addig a 26S proteaszóma és az izolált 19S regulátor komplex esetében a várt és a tapasztalt szórás értékek között jelentősebb eltérést tapasztaltunk. Ebből arra lehet következtetni, hogy a 20S proteaszóma sztöchiometriailag jól definiált, míg a 19S regulátor komplex bizonyos mértékig heterogén. Az intakt 19S regulátor komplexnek megfelelő tömegnél nem sikerült egyetlen szerkezeti

jól definiált komplexet kimutatnunk, helyett a méreteloszlást egy 358 kDa-nál csúcsot adó széles görbe írja le.

Az eddig vizsgált élőlényekben a legtöbb, de nem az összes 19S regulátor komplex alegység homológia kimutatható. Ebből arra következtetünk, hogy az alegységeknek van egy nélkülözhetetlen köre, mely szükséges a 26S proteaszóma megfelelő működéséhez, és ezen alegységeken kívül léteznek még az egyes fajokra jellemző járulékos alegységek is. Ezen járulékos alegységek valószínűleg csak szerv, szövet és fejlődés specifikus módon fejeződnek ki. Közülük némelyik talán csak átmenetileg kapcsolódik a 19S regulátor komplexhez, és így a komplex összetétele szempontjából igen fontos, hogy mikor lett izolálva a minta. A Doa4 és az AP-UCH fehérjékről már tudjuk, hogy csak időszakosan kötődnek a 26S proteaszóamához, míg a 19S regulátor komplex integráns részét képző p54-es alegység szabad formában is jelen van a citoszolban. A fentiek miatt úgy tűnik nem lehet egyetlen számmal leírni a 19S regulátor komplex alkotóelemeinek számát.

Azután, hogy a 26S proteaszóma megköti az ubiquitinált fehérjét, az ubiquitin eltávolítódik róla, és újra felhasználhatóvá válik a deubiquitináló enzimek működésének köszönhetően. Miután azonosítottuk, klónoztuk és jellemeztük a humán UCH37 deubiquitináló alegység *Drosophila* homológját a p37A alegységet, azt találtuk, hogy e fehérjecsald többi tagjához hasonlóan, ez a rekombináns alegység is képes ubiquitin-aldehiddel gátolható módon bontani az Ubiquitin-AMC modellszubsztrátot.

Elképzelhető, hogy a p37A alegység rekombinánsan termeltetett szolubilis és a 19S regulátor komplexbe beépült formája eltérő enzimatisuk tulajdonságokat mutat. Míg a szabad p37A képes teljes ubiquitin láncok eltávolítására, addig a beépült forma csak egyesével tudja eltávolítani az ubiquitin monomereket az ubiquitin-lánc szabad végéről.

Miután a szabad p37A alegységhez hasonló enzimatisuk aktivitást tapasztaltunk a natív forrásból származó 26S proteaszóma preparátumokban, feltételezzük, hogy a 26S proteaszóma deubiquitináló képességéért legalábbis részben a p37A alegység felelős. Mivel a p37A alegység homológja nem található meg az élesztő genomban, ez az alegység nem tűnik esszenciálisnak. Lehetséges, hogy hasonló enzimatisuk sajátsággal egyéb 19S regulátor komplex alegységek is rendelkeznek.

Mivel bizonyítottuk, hogy a p37A alegység valóban a 19S regulátor komplex integráns része, megpróbáltuk elektronmikroszkóposan is meghatározni a komplexen belüli fizikai helyzetét. Ehhez kihasználtuk az alegység specifikus ubiquitin-aldehid kötő képességét. Az ubiquitin-aldehidhez 3 nm átmérőjű arany szemcsét kapcsolva az elektronmikroszkópos képeken az Ubiquitin-Al-arany konjugátum az alap és a fedő alkomplexekeket összekötő régióra

térképeződött. Oda, ahova nagy valószínűséggel az ubiquitin lácot kötni képes p54 homológ Rpn10-es alegységet is térképezzük. Ezek alapján úgy tűnik, hogy mind az ubiquitinált szubsztrátok kötése, mind a deubiquitináló enzimaktivitás térben igen közel helyezkedik el egymáshoz, és lehetséges az is, hogy funkcionálisan együttműködnek. Elképzelhető egy mechanizmus, amelyben az ubiquitinált szubsztrát valahol a fedő alkomenen megkötődik, és miközben a 19S regulátor komplex 20S proteasóma bemeneti nyílásába táplálja be, a p54 alegység meggátolja a disszociációját, míg a p37A alegység az újrashasznosítás érdekében eltávolítja róla az ubiquit.

A 26S proteasóma és felépítő komplexeinek szerkezetéről, a szerkezet által meghatározott funkcióról többet árulhat el, ha a 26S proteasóma fiziológiás változásai közben követjük nyomon a szerkezet általunk megfigyelhető aspektusait.

Ahhoz, hogy a térszerkezet változásait keresztkötési kísérletekkel nyomon tudjuk követni, meghatároztuk, hogy a rendelkezésünkre álló ellenanyagok közül melyik ellenanyag melyik alegységet ismeri fel. Elmondhatjuk, hogy ellenanyag könyvtárunkban majdnem minden 19S regulátor komplex alegység ellen található alegység-specifikus ellenanyag.

Keresztkötési és elektronmikroszkópos kísérleteink alapján megállapíthatjuk, hogy a 26S proteasóma ATP-függő összeszerelődése során a 19S regulátor komplexben nagyfokú alegységszerkezet átrendeződés játszódik le. A legérzékenyebbek a 20S proteasómával direkt módon is érintkező ATP-áz alegységek. A keresztkötési mintázat, és annak változásai erősen sugallják, hogy a három ATP-áznak (p48A, p42D, p42C) igen sokrétű kapcsolatban van egymással. Az összeszerelt 26S proteasómán kimutatott keresztkötési mintázatokban mindhárom alegység ellen termeltetett specifikus ellenanyag felismer egy széles sávot, jelezvén, hogy a három alegység bizonyos felszínei olyan közel helyezkednek el egymáshoz, hogy bifunkciós keresztkötőszerekkel összekapcsolhatóak. A 26S proteasóma szétesése ezen alegységek helyzetének megváltozásával jár, és az érintett felszínek annyira eltávolodnak egymástól, hogy már csak igen gyengén keresztkötődőek. Immuno-precipitációs kísérletekkel szintén bizonyítottuk az említett alegységek szoros térbeli közelségét. Rechsteiner, Johnston és munkatársai korábbi in-vitro fehérje felülrétegzési kísérletei, hasonló biokémiai, illetve genetikai eszközökkel végzett kísérletei szintén megerősítik eredményünket. Erős interakciót mutattak ki már az Rpt3/S6b/p48A-Rpt6/S8/p42C és az Rpt4/S10b/p42C-Rpt6/S8/p42D alegységek között. A mi keresztkötési kísérleteink nem csak az érintett alegységek közötti interakciót, hanem ennek az interakciónak a 26S proteasóma összeszerelődése közben létrejövő változását is szemlélítetik.

Az összeszerelődesi reakcióval együttjáró konformációs változások nem csupán az alap alkompexre korlátozódnak. Igen erőteljes változás figyelhető meg a fedő alkompex p42A alegysége esetén is. A p42A alegység keresztkötési mintázatában ATP hatására megjelenő új sáv talán az alegység 20S proteaszómával való direkt kapcsolatának köszönhető. Ez ellentétben áll azzal a feltételezéssel, hogy a fedő alkompex alegységei nem állnak fizikai kapcsolatban a 20S proteaszóma alegységeivel. Ennél azonban valószínűbb, hogy az ATP-áz alegységek elrendeződésének változása felelős az új sáv megjelenéséért. Ami pedig közeli szomszédságot feltételez a p42A alegység és az ATP-áz alegységek gyűrűje között.

A fenti biokémiai eredmények alátámasztására statisztikailag kiértékelt elektronmikroszkopos megfigyeléseket végeztünk. A Fourier-gyűrű kritériumnak megfelelően most először sikerült 25 Å-nál jobb felbontásban bemutatni a 19S regulátor komplex kétdimenziós képét. Az ATP elvonást követő szétesési reakció nem szilárd felületen képződő ammónium-molibdenát jégvártyába való fagyasztásával sikerült egy sor lekapcsolódási átmeneti terméket megörökítenünk. A gyors ATP elvonás és az azt követő gyors fagyasztásos fixálás csökkenti a kísérleti artefaktumok megjelenésének valószínűségét. Habár a kétdimenziós ábrák interpretálását megnehezíti, hogy gyakran nehezen eldönthető milyen vetülete látszik az adott szétszerelődesi fázisban lévő szubkomplexnek, az elkülönített variánsok valószínűleg a szétesési folyamat egyes lépéseit reprezentálják.

A 26S proteaszóma nagy tisztaságú 19S regulátor komplexből és 20S proteaszómaiból való felépülése egyáltalán nem effektív folyamat, mert a tisztítás során elvész egy vagy több, az összeszerelődeshez nélkülözhetetlen faktor. Részlegesen tisztított komponensek esetén azonban az összeszerelődesi-szétesési reakció teljes mértékben reverzibilis. ATP elvonására a komplex szétesik, ami főlegben adott ATP hatására teljes mértékben megfordítható. Ilyen részlegesen tisztított komponensekkel végzett keresztkötési kísérletekből vonhatjuk le azt a következtetést, hogy a fentebb leírt átrendeződések nem a tisztítási folyamat melléktermékei. Az észlelt változások teljesen reverzibilisek, a keresztkötési mintázatok hűen követik a 26S proteaszóma összeszereltségi állapotát. Mindez azt sugallja, hogy a vizsgált folyamat azonos az aktív 26S proteaszóma kialakulásához vezető in-vivo folyamattal.

Mivel még igen keveset tudunk a 26S proteaszóma katalitikus ciklusáról, a szerkezetváltozásból a működésre vetíthető következtetéseink igen hiányosak. A 20S proteaszóma  $\alpha$ -gyűrűjének kimutatható változása talán kapcsolatban van a 20S proteaszóma központi csatornájának nyitását és zárását végző mechanizmussal. Az átrendeződés szerepére nézve a 19S regulátor komplex esetében csak feltételezésekkel élhetünk. Az, hogy a p42C, p42D és p48A alegységek jobban keresztköthetők egymással a 26S proteaszóma

összeszerelődése után, talán a 19S regulátor komplex ATP-áz gyűrűjének összehúzóódásából adódik. Ez a jelenség feltehetően az ATP-áz gyűrű és a 20S proteaszóma  $\alpha$ -gyűrűjének jobb illeszkedéséért felelős. Ennek a változásnak az energizálásához ATP-re van szükség, mivel nem hidrolizálható ATP-analóg adásakor nem emelkedik az említett alegységek keresztköthetősége. A folyamathoz a 20S proteaszóma jelenléte is feltétlenül szükséges. Tisztított, szabad 19S regulátor komplexben ATP hozzáadása után sem növekszik az alegységhármassal keresztköthetősége. Talán épp a fizikai kapcsolódás a 19S regulátor komplex és a 20S proteaszóma között az, ami megteremti az ATP-áz gyűrű összehúzóódásának feltételeit.

A p48A alegység esetében indirekt bizonyítékokkal támasztottuk alá, hogy a poszttranszlációs modifikációknak szerepe lehet az alegység szerkezet meghatározásában. Az alegység magasabbrendű homológjairól (Rpt3/S6) kimutatták, hogy foszforilálódhatnak.

Mostanában került nyilvánosságra, hogy az ATP hidrolízise befolyásolja különböző proteaszómához kötődő fehérjék kötődési sajátosságait. Feltételezhető, hogy minden egyes interakcióhoz a 26S proteaszóma fel kell vennie a kölcsönható partner által megkívánt legoptimálisabb szerkezetet. Ebben az esetben a 26S proteaszóma szerkezetének variabilitása szerkezeti alapot nyújthat a sokféle folyamathoz való kapcsolódási képességéhez. Kísérleteink legátütöbbször közöltnivalója az, hogy a 26S proteaszóma alkotóelemeiből való felépülése nem csupán az alkotóelemek rigid találkozására, hanem nagymértékű szerkezet-átrendeződéssel kísért folyamat. Az összeszerelődési folyamat alatt a kölcsönható komplexek kölcsönös szerkezetváltozása megteremti az összeszerelődéshez és a tökéletes működéshez szükséges alegység szerkezetet.

*Caenorhabditis elegans*-ban és *Saccharomyces cerevisiae*-ben az alegység-alegység interakciókat élesztő kettős hibrid rendszer segítségével vizsgálták. Így néhány eddig még más módszerekkel fel nem ismert alegység-kölcsönhatást is sikerült kimutatni. Az élesztő kettős hibrid rendszerrel készített interakciós térkép azonban csak egy statikus képet ad a lehetséges interakciók halmazáról. Az általunk használt keresztköthetési technika mély betekintést nyújt a 26S proteaszóma összeszerelődési reakciója során történő változásokba. Mindez azt jelenti, hogy több különböző megközelítési mód alkalmazása szükséges a 26S proteaszóma alegység szerkezetének feltáráshoz, mielőtt a partikulum kristályszerkezete leírhatóvá válik.

Mint, ahogy azt a keresztköthetési reakciók és a 16-BAC/SDS gélelektroforézisek immuno-blotjainak vizsgálatából kiderül, indirekt bizonyítékokkal rendelkezünk a 19S

regulátor komplex egyes alegységeinek poszttranszlációs modifikációjáról és a módosításoknak az alegységszerkezetre gyakorolt hatásáról.

A glikoziláció specifikus ellenanyagokkal és a búzacsíra agglutininval végzett kísérletek direkt bizonyítékkal szolgálnak arról, hogy öt 19S regulátor komplex alegység és egy kivételével minden 20S proteaszóma alegység oxigén atomon keresztül kötött N-acetil-glükózamin módosítást hordoz. Eredményeinket alátámasztják az általunk használt ellenanyagok és a lektin kötés specificitását leíró munkák. Tovább erősíti megfigyelésünket egy nemrégiben publikált munka, amely a patkány 20S proteaszóma C2-es alegységének glikoziláltságát bizonyítja kromatográfias és tömegspektrometriás szekvenáláson alapuló technikák használatával.

Az általunk kétdimenziós gélektroforézis segítségével elválasztott nagy tisztaságú 26S proteaszóma preparátumokon végzett immuno- és lektin-blot kísérletek jóval több alegység glikoziláltságát mutatták. A két megközelítési mód által mutatott jelentős eltérésre azonban képesek vagyunk egy lehetséges magyarázatot adni. Az ellenanyagok és a lektin kötési specificitásának bizonyítására moláris feleslegben lévő N-acetil-glükózamin jelenlétében is elvégeztük a kötési kísérleteket. Míg a lektinkötés kiválóan gátolható szabad N-acetil-glükózamin hozzáadásával, addig a szabad N-acetil-glükózamin az ellenanyagok kötését széles koncentráció határok között sem befolyásolja. A fent említett kromatográfias elúciónál használt szabad N-acetil-glükózamin koncentráció nem képes gátolni az általunk kimutatott ellenanyag kötését, így feltételezhető, hogy a kromatográfia során alkalmazott elúciós körülmények nem elég effektívek. Ez lehetséges magyarázattal szolgál arra, hogy a kromatográfias megközelítés során miért nem találtak több 26S proteaszóma alegységet.

Ha figyelembe vesszük annak a lehetőségét, hogy a foszforiláció és az N-acetil-glikoziláció között szoros és egymást kölcsönösen kizáró kapcsolat van, fontos megjegyeznünk, hogy a monoklonális ellenanyagok által erősen felismert p48A és p48B alegységek, illetve a lektin által erősen felismert p56 alegység poszttranszlációs foszforilációja már bizonyítottá vált.

A 20S proteaszóma alegységei közül az  $\alpha_2$ ,  $\alpha_4$  és  $\alpha_7$  alegységek bizonyítottan foszforiláltak. Habár a különböző poszttranszlációs modifikációk a 26S proteaszóma működésére gyakorolt hatása manapság még ismeretlen, a két egymást kizáró, azonos oldalláncokon történő módosítás esetleges finoman hangolható szabályozó szerepe további vizsgálatokért kiált.

