

## 6. DISCUSSION GENERALE

### 6.1 CARACTERISATION DU PROTEASOME DE LA BRYOPHYTE *PHYSCOMITRELLA PATENS*

Dans la première étape de ce travail, nous avons mis au point un protocole de purification du protéasome 20S de la bryophyte *P. patens*. Les premières analyses comparatives ont montré que le niveau de complexité du protéasome de *P. patens* était semblable à celui des complexes eucaryotiques de la levure, d'*A. thaliana* et de l'homme.

Nous avons isolé un complexe de 700 kDa possédant des activités protéolytiques multiples; celui-ci a une structure quaternaire formée de quatre anneaux empilés, composé chacun de sept sous-unités caractérisées par une masse moléculaire et un point isoélectrique distincts. Les dimensions de la structure sont de 14 x 11 nm, avec un canal central d'un diamètre de 3 nm. Nous avons démontré, pour la première fois, qu'il est possible de séparer les sous-unités des familles  $\alpha$  et  $\beta$  d'un protéasome eucaryotique 20S. Les sous-unités  $\alpha$  du complexe sont organisées en anneau ainsi que nous avons pu l'observer en microscopie électronique alors que les sous-unités  $\beta$  sont probablement associées sous forme d'agrégats. Ces résultats confirment le fait que, lors de la biogenèse du complexe, l'anneau  $\alpha$  se forme en premier lieu puisqu'il est plus stable thermodynamiquement que les anneaux  $\beta$ . L'expérience de reconstitution du protéasome de mousse a permis de confirmer que son assemblage est régi par des processus plus complexes que dans le cas du protéasome de l'archéobactérie *T. acidophilum* (Zwickl et al., 1992, 1994). Toutes ces caractéristiques indiquent que le protéasome de *P. patens* est évolutivement proche des protéasomes eucaryotiques d'organismes supérieurs et renforcent l'intérêt que l'on peut porter à son étude fonctionnelle. Nous n'avons pas pu mettre en évidence le protéasome 26S, tel qu'il a été isolé par plusieurs chercheurs. Plusieurs approches ont été utilisées pour tenter de démontrer la présence du complexe 26S. Non seulement, nous avons reproduit les conditions de purification exigées pour isoler ce type de structures, mais nous avons utilisé des anticorps spécifiques envers des protéines additionnelles constituant le complexe régulateur 19S. Aucune structure ni aucun complexe de grande taille dans lesquels le protéasome 20S soit incorporé n'a été mis en évidence.

Nos observations et l'état actuel des connaissances de la structure du 26S nous ont conduit aux réflexions suivantes:

- a) les conditions d'extraction que sa purification in vitro exige ne permettent pas d'éliminer totalement les contaminants et provoquent sans doute des associations non-spécifiques.
- c) le nombre de sous-unités du complexe régulateur 19S n'est pas en relation stœchiométrique avec le nombre de sous-unités du complexe 20S.
- d) la composition en sous-unités des complexes 19S purifiés diffère fortement selon l'organisme, aussi bien qualitativement que quantitativement,.
- e) la structure 26S est fragile et très instable; en outre, plusieurs complexes régulateurs cohabitent dans la cellule avec le 19S. On peut citer comme exemple le complexe PA28, qui possède une plus grande affinité pour le 20S que le complexe régulateur 19S; on peut aussi se demander ici comment se règle la cohabitation entre ces structures?

f) un complexe 26S pseudo-symétrique permettrait l'approche des substrats par les deux extrémités, l'accessibilité des substrats aux sites catalytiques internes serait compromise, voire impossible.

e) les photographies en microscopie électronique de préparations de protéasomes 26S montrent systématiquement une forte concentration d'agrégats non structurés sur grand bruit de fond; ceci confirme non seulement la fragilité de la structure 26S, mais également les problèmes de contaminations inhérents à la méthodologie de purification.

g) la mousse *P. patens* n'est pas le seul eucaryote d'où le complexe 26S soit absent. Le protozoaire parasite *Trypanosoma brucei* possède également cette particularité.

Toutes ces réflexions nous poussent à postuler que le modèle du protéasome 26S tel que la plupart des chercheurs le conçoivent aujourd'hui ne reflète pas fidèlement ce qui se passe in vivo !

## **6.2 L'ACTIVITE ISOPEPTIDASIQUE ET LA SPECIFICITE DE LA RECONNAISSANCE DES CHAINES DE POLYUBIQUITINE PAR LE PROTEASOME DE *P. PATENS***

Les chaînes de polyubiquitine liées à un substrat constituent très souvent le signal impliquant sa dégradation (Callis, 1995; Deshaies, 1995; Jentsch et Schlenker, 1995). Selon de nombreux chercheurs seul le protéasome 26S possède la propriété de dégrader ces conjugués puisque ses spécificités fonctionnelles sont la reconnaissance des chaînes de polyubiquitine, leur hydrolyse pour qu'elles puissent être recyclées et enfin la dénaturation de la protéine qui peut dès lors être dégradée par le 20S. Nous nous sommes proposé d'examiner si le protéasome avait la capacité de dégrader à lui seul des chaînes de polyubiquitine.

Notre premier travail dans ce domaine a été d'améliorer l'une des méthodes de synthèse des chaînes de polyubiquitine. En effet, les faibles quantités de chaînes d'ubiquitine obtenues par des méthodes déjà publiées constituaient un obstacle important dans la réalisation d'un grand nombre d'expériences (van Nocker et al., 1996).

Les expériences que nous avons réalisées ont révélé qu'une véritable activité isopeptidasique est étroitement associée au protéasome 20S de *P. patens*. Nous avons démontré que les monomères d'ubiquitine libérés par l'isopeptidase sont encore actifs ou autrement dit réutilisables pour un nouveau processus de synthèse. Cette expérience qui met en évidence la notion de recyclage des molécules d'ubiquitine n'avait jamais été réalisée auparavant. De plus cette fonction avait été attribuée au protéasome 26S. Or, cette activité isopeptidasique ne peut se manifester qu'en présence de protéines fortement associées à la structure 20S, sans pour autant que l'ensemble ne forme un complexe 26S. De plus, nous avons confirmé, par immuno-localisation sur gel non dénaturant et par microscopie électronique, qu'il existe un complexe protéasome-chaînes d'ubiquitine lors du processus de dégradation. Plus précisément, nous avons montré qu'une sous-unité alpha (PPZETA) présente la propriété de s'associer avec les chaînes de polyubiquitine. Toutefois, la protéine recombinante que nous avons produite a perdu les propriétés de la protéine native. Probablement, parce qu'elle n'a pas subi les modifications post-traductionnelles nécessaires à sa fonctionnalité.

Plusieurs isopeptidasases ont été isolées (la protéine Ubp14, l'isopeptidase T, la Doa4 et

l'isopeptidase du PA700) (Papa et Hochstrasser, 1993; Wilkinson et al., 1995; Amerik et al., 1997; Lam et al., 1997). Seule l'isopeptidase du PA700 est spécifiquement associée au protéasome 26S. Toutefois, selon les auteurs, elle n'aurait pas le rôle principal dans le recyclage des chaînes de polyubiquitine. Alors que cette activité isopeptidasique est capitale dans ce processus, on peut se demander pourquoi il est si difficile de l'isoler et pourquoi nous semblons être les seuls à l'avoir mise en évidence, et qui plus est, associée à une structure ne ressemblant en rien à un protéasome 26S?

Plusieurs hypothèses sont envisageables.

a) Les complexes 19S ou PA700 ne seraient dus qu'à l'association non-spécifique de protéines obtenue à la suite d'une méthode de purification que nous jugeons inadéquate. Dès lors, il se peut que les protéines viennent se placer aux extrémités du protéasome 20S avec lesquelles elles forment une superstructure masquant les sites catalytiques ou de reconnaissance de la (ou des) protéine(s) responsable(s) de l'activité isopeptidasique. Il existerait donc bel et bien une activité isopeptidasique chez d'autres eucaryotes, mais qui ne pourrait être mise en évidence facilement puisqu'elle serait, en quelque sorte, noyée dans un agrégat pseudo-structuré de protéines, résultant de contraintes de purification arbitraires. De ce fait, l'accessibilité des chaînes de polyubiquitine se trouverait compromise.

b) La bryophyte *P. patens* est un cas particulier et ce qui s'y passe en matière de dégradation des protéines ne peut être transposé à d'autres organismes eucaryotiques. Jusqu'ici, il n'y a pas de fait qui le démontre. Nous savons que *P. patens* possède une voie de l'ubiquitine et un protéasome 20S complexe. Il n'y a donc rien qui puisse laisser penser que la voie de dégradation des protéines par l'ubiquitine chez *P. patens* ne soit pas la même que chez la plupart des eucaryotes et ce d'autant plus que *P. patens* se trouve être un organisme évolué.

c) La plupart des groupes de recherche utilisent les chaînes d'ubiquitine marquées au <sup>125</sup>I pour la mesure de l'activité isopeptidasique. Ce type de chaînes sont de très mauvais substrats pour mettre en évidence l'activité isopeptidasique. Le marquage de protéines à l'iode radioactif, largement utilisé pour tracer une protéine ou ses produits de dégradation, a l'avantage de la sensibilité et permet de quantifier l'évolution d'une réaction enzymatique. Toutefois, il a été observé que le marquage au <sup>125</sup>I de protéines s'accompagne souvent de modifications moléculaires comme l'oxydation du substrat. Ceci a été observé pour les chaînes d'ubiquitine qui se trouvaient nettement moins sensibles à l'hydrolyse une fois marquées au iode (Jennissen, 1994). Pour notre part, nous avons constaté que lorsque nous avons marqué à la biotine des chaînes de polyubiquitine, il n'était plus possible de les dégrader par une préparation de protéasome de *P. patens*. Il n'est donc pas étonnant que l'isolation d'isopeptidasases spécifiques soit difficile, voire impossible, lorsqu'on utilise des substrats altérés.

Nous avons isolé le cDNA codant pour la sous-unité PPZETA du protéasome de *P. patens*, dans le but de caractériser biochimiquement cette dernière, de façon à comprendre son rôle éventuel dans le processus de reconnaissance des chaînes de polyubiquitine.

Le cDNA complet que nous avons obtenu code pour une protéine de 237 acides aminés, dont la séquence possède une forte homologie avec d'autres sous-unités alpha d'organismes eucaryotiques, à savoir les sous-unités DOA5 de la levure, ZETA de l'homme, PROSMA5 de la drosophile et PAE1 d'*A. thaliana* (Chen et Hochstrasser, 1995; Belote, 1997; Fu et al., 1998). Ces sous-unités constituent en fait une sous-famille dont la caractéristique commune et remarquable se situe au niveau d'une séquence de quelques acides aminés surnuméraires. Celle-ci est absente de la séquence primaire des autres sous-unités alpha voisines composant le même anneau. Bien qu'elle ne soit que peu conservée chez les différentes familles d'eucaryotes du point de vue de sa séquence primaire, cette séquence possède un caractère acide chez *P. patens* et *A. thaliana*; elle constitue une acquisition évolutive indéniable. Des observations faites sur la structure cristalline du protéasome de la levure montrent que cette séquence provoque la formation d'une boucle se positionnant à l'intérieur du canal central du protéasome (Groll et al., 1997).

Alors qu'il est parfois difficile de déterminer les domaines essentiels d'une protéine, dans le cas de cette boucle, nous avons probablement mis en évidence une région essentielle à la fonction la sous-unité PPZETA. Il nous restera à démontrer la fonction de cette boucle. Si sa présence est indispensable à la survie de l'organisme, il s'agira de savoir si cette boucle a un rôle, soit actif en interagissant spécifiquement avec d'autres protéines ou substrats, soit plus passif ou mécanique dans lequel la boucle ne constituerait qu'une structure permettant l'accrochage ou le pilotage de protéines ou de substrats destinés aux sites catalytiques du complexe 20S.

Les micrographies obtenues par la méthode dite de *cryo-negative staining* (coloration négative d'éléments vitrifiés) nous ont permis de modéliser fidèlement la structure du complexe 20S ainsi qu'un anneau alpha désolidarisé de ce même complexe sans avoir recours à la cristallisation de la protéine. De plus, cette technique nous a permis de compléter les informations sur la position des extrémités N-terminales des sous-unités alpha. Celles-ci forment probablement une barrière physique empêchant l'accessibilité des protéines cytosoliques qui ne sont pas destinées à être dégradées. Notre modélisation montre, pour la première fois, que le protéasome 20S possède une polarité structurelle et, par-là même, une polarité fonctionnelle. Or, dans le cas du 26S cette polarité n'est plus respectée puisque les substrats ont la possibilité d'accéder aux sites catalytiques du 20S par ses deux extrémités. L'incohérence du modèle du protéasome 26S est une nouvelle fois démontrée.

### **6.3 REFLEXIONS GENERALES SUR LA DEGRADATION DES PROTEINES PAR LE PROTEASOME 20S/26S**

L'objectif ambitieux de tenter d'élucider le mécanisme de dégradation des conjugués ubiquitinés par le protéasome n'est que partiellement atteint. Certains de nos résultats paraissent contredire un modèle considéré comme généralement acquis. Cette divergence avec la plupart des publications a constitué pour nous une difficulté majeure. De nombreux points fondamentaux restent encore obscurs. Quelles sont ces zones d'ombre?

La protéine MCB1 est connue pour être impliquée dans le processus de reconnaissance des protéines conjuguées. Pourtant, elle n'est pas indispensable à la survie de la levure (van

Nocker et al., 1996) ni à celle de la mousse ainsi que l'indiquent les expériences de *knock-out*. Les travaux récemment entrepris dans notre laboratoire et dans celui de R.D.Vierstra (Girod et al., 1998) ont montré que la rupture du gène codant pour MCB1 provoque une altération développementale chez la mousse et l'accumulation de conjugués ubiquitinés! La protéine n'est donc pas indispensable, mais paraît tout de même impliquée dans le processus de reconnaissance des protéines ubiquitinées puisqu'il y a accumulation de ces conjugués! Le problème de la reconnaissance est-il pour autant clos?

L'expérience où l'on a provoqué la rupture du gène peut être interprétée de manière différente. En effet, l'augmentation de la concentration des conjugués ubiquitinés dans le mutant ne correspond pas forcément à leur accumulation dans la cellule, mais pourrait correspondre à une accélération du processus d'ubiquitination des protéines. Il est donc probable que la protéine MCB1 ou S5a est plutôt un facteur de régulation important dans la cellule. Cette dernière hypothèse serait fortement confirmée par Anand et al. (1997) qui ont démontré que MCB1 interagirait fortement avec Id1, une protéine impliquée dans la régulation de l'expression de certaines familles de gènes.

On peut également se demander s'il est nécessaire que le protéasome possède une ou des protéines de reconnaissance de conjugués ubiquitinés? La sélectivité des protéines destinées à être dégradées n'est-elle pas déjà assurée par l'action, dans la voie de l'ubiquitine, des E2 et E3 spécifiques? A priori, il ne semble pas nécessaire d'opérer un tri supplémentaire après le processus d'ubiquitination. D'ailleurs, comment peut-on imaginer une nouvelle étape de sélection sur la base des chaînes de polyubiquitine? En effet, de multiples chaînes de polyubiquitine, de longueurs variables, sont rattachées à une même protéine. Si ces chaînes constituent un critère de discrimination, on est en droit de se demander comment se règle l'approche, puis l'association de la protéine ubiquitinée avec le protéasome. N'y aurait-il pas des problèmes de compétitivité entre les différentes chaînes de polyubiquitine d'une même protéine?

De plus, l'ubiquitination n'est pas un signal indispensable pour provoquer la dégradation d'une protéine par le protéasome. Ainsi, l'ornithine décarboxylase (Murakami et al., 1992), la sous-unité I $\kappa$ B $\alpha$  (la sous-unité inhibitrice du facteur de transcription NF- $\kappa$ B), (Chen et al., 1995) et le facteur de transcription c-Jun (Jariel-Encontre et al., 1995) ne nécessitent pas obligatoirement d'ubiquitination pour être dégradés. En outre, de récentes recherches montrent que l'ubiquitination peut cibler des protéines membranaires vers les lysosomes de cellules de mammifères ou vers les vacuoles des cellules de levures (Strous et al., 1996; Hicke et Riezman, 1996; Hicke, 1997). La question se pose donc ici de savoir comment la cellule peut opérer un tri entre ces conjugués ubiquitinés de façon à les diriger soit vers la dégradation soit vers certains compartiments cellulaires. Le nombre, la longueur ou la topologie des chaînes de polyubiquitine liées au substrat pourraient justement être ces autres facteurs de discrimination.

Si l'on accepte le concept actuel du protéasome 26S, on peut se demander comment le parcours de la protéine multi-ubiquitinée est possible dans le complexe 19S. En effet, plusieurs problèmes se posent. Ainsi que nous l'avons déjà évoqué plus haut, la protéine ubiquitinée possède plusieurs chaînes de polyubiquitine de longueurs variables et attachées à différentes positions sur la protéine. Quelle est la chaîne qui se lie préférentiellement à la protéine de reconnaissance MCB1? S'il s'agit de la chaîne branchée à un résidu se situant dans la séquence, et non pas à l'extrémité N-terminale de la protéine, comment la protéine qui lui est rattachée peut-elle être entraînée au travers de la structure 19S sans être clivée (les ATPases se trouvent à l'autre extrémité du 19S, c'est-à-dire en contact direct avec l'anneau

alpha)? Ne doit-il pas déjà y avoir une action dénaturante auparavant? Ou alors une activité peptidasique clivant la protéine près du site de fixation de la chaîne de polyubiquitine ? Aucune activité de ce type n'a été mise en évidence dans le complexe 19S. On peut tenter de résoudre ce problème en considérant que la protéine pénètre dans le 19S par son extrémité N-terminale et qu'elle perd ses chaînes de polyubiquitine par action d'une isopeptidase, au fur et à mesure de sa pénétration dans la structure. Dans ce cas de figure, les ATPases n'auraient pas à intervenir puisque le travail de dénaturation aurait déjà été accompli. Leur fonction ne consisterait donc qu'à assurer la fixation du complexe 19S au protéasome 20S.

Un autre fait est troublant. Chez la levure, l'isopeptidase DOA4 est considérée comme étant l'enzyme qui débranche les chaînes de polyubiquitine de la protéine cible lors de la dégradation par le protéasome 26S. Les chaînes ainsi libérées peuvent être prises en charge par l'action d'isopeptidases, telles que l'isopeptidase T ou UBP14. Ces dernières libèrent séquentiellement les molécules d'ubiquitine à partir de leur extrémité proximale devenue accessible. Le rôle de DOA4 (Papa et al., 1993) a été précisé quand on a constaté que, lors de la délétion du gène codant pour cette protéine, la cellule accumule des peptides auxquels des chaînes de polyubiquitine se trouvent encore rattachées! Ce qui veut dire que la dégradation de la protéine précède l'élimination de la chaîne! On peut se demander comment cela serait possible avec les contraintes mécaniques qu'impose une structure telle que le 26S?

Nous constatons que le protéasome 26S représente une sorte de boîte noire dans la voie de l'ubiquitine, où une protéine, ubiquitinée ou non, entre et d'où elle ressort dégradée. Les fonctions spécifiques que l'on attribue aujourd'hui au complexe 26S, c'est-à-dire la reconnaissance et le recyclage des chaînes de polyubiquitine, ainsi que les propriétés de dénaturation des protéines par les sous-unités ATPasiques, ne sont de loin pas démontrées.

Il est sans doute prématuré de proposer un autre modèle pour la dégradation des conjugués ubiquitinés que celui qui est admis à l'heure actuelle. D'autant plus que nous n'avons pas effectué suffisamment d'expériences, nous en avons conscience, pour l'étayer de manière convaincante. Toutefois, on constate que la dégradation d'une protéine par la voie de l'ubiquitine est un processus complexe et coûteux en énergie. Deux étapes principales caractérisent cette voie: l'ubiquitination de la protéine, par une cascade de réactions biochimiques dépendant de l'ATP, et sa dégradation par le protéasome dépendant également de l'ATP.

N'y a-t-il pas là une mobilisation énergétique trop importante? Pour notre part, nous pensons que l'ubiquitination d'une protéine implique sans doute un changement profond de sa conformation. Ce changement de conformation peut avoir deux conséquences différentes.

a) Une accessibilité facilitée de certains domaines ou une dénaturation partielle de la protéine. Dans ce cas, la protéine ubiquitinée pourrait exposer des sites protéolytiques sensibles à l'action de protéases du cytoplasme qui généreraient des peptides "bruts" pris en charge par le protéasome qui – ainsi qu'il a déjà été démontré dans la présentation des peptides par le MHC I chez les mammifères (Realini et al., 1994; Belich et Trowsdale, 1995) – façonnerait des peptides impliqués dans des processus de signalisation d'événements cellulaires. Ce modèle s'oppose à celui qui est admis aujourd'hui, et considère que le protéasome 26S dégrade des protéines en libérant des peptides, à leur tour hydrolysés en acides aminés par des exopeptidases cytosoliques. Il n'est pas exclu non plus que l'action protéolytique du protéasome puisse se manifester sur la partie N-terminale rendue accessible par

l'ubiquitination. L'élimination graduelle de peptides et des chaînes de polyubiquitine au cours du temps entraînerait une déstabilisation progressive de la protéine (action dénaturante). Si ce processus est cohérent, il ne nécessiterait pas une machinerie aussi lourde que le 26S mais une structure plus simple, telle que la préparation de protéasome isolée de *P. patens*.

b) Un remodelage de la protéine, qui, dans sa nouvelle conformation, serait apte à interagir avec une autre protéine. Ce complexe, tel un ligand avec son récepteur, pourrait être impliqué dans une nouvelle voie biochimique, par exemple avec un transporteur qui dirigerait la protéine ubiquitinée vers un nouveau compartiment cellulaire.

A l'origine, l'ubiquitination semblait avoir pour rôle de diriger les substrats vers le protéasome 26S. Toutefois, il est clair aujourd'hui que l'ubiquitination peut servir à d'autres fonctions qu'à celle de la dégradation. En effet, il est fort possible que la fonction des chaînes de polyubiquitine ne soit pas de constituer un simple signal de dégradation des protéines ciblées. Ces chaînes ne pourraient-elles pas fonctionner en tant que molécules chaperonnes remodelant, en quelque sorte, la protéine de façon à la dénaturer partiellement ou totalement? Cette présentation des domaines dépendrait du nombre et/ou de la topologie des chaînes de polyubiquitine liées de manière covalente sur la protéine et elle rendrait ainsi possible l'hydrolyse ou d'autres modifications post-traductionnelles de la protéine.

Le sens réel de l'ubiquitination et de ses conséquences présente encore de nombreux points à éclaircir. Nous avons tenté de répondre à certaines questions sans pour autant toujours apporter la preuve irréfutable de nos dires. Toutefois, nos expériences nous ont poussé à remettre sérieusement en question certains concepts ancrés dans l'esprit de nombreux chercheurs travaillant sur le même sujet.

## 6.4 PERSPECTIVES

Certaines expériences complémentaires de celles que nous avons déjà décrites précédemment doivent encore être envisagées si l'on veut enrichir les informations et étayer les résultats que nous avons obtenus tout au long de ce travail.

a) A l'aide de différents anticorps spécifiques, lors de nos essais sur gradient de glycérol, nous n'avons pu mettre en évidence ni des structures de haut poids moléculaire telles que le 26S ni un complexe régulateur 19S. Seule la protéine MCB1 a été révélée dans une fraction éloignée de celle du protéasome. L'éventuelle association de protéines (par exemple MCB1) avec le protéasome peut être démontrée par des expériences de coprécipitation au moyen d'anticorps spécifiques soit contre le protéasome 20S de *P. patens* soit contre des protéines spécifiques du complexe régulateur 19S, et ce, avec ou sans la présence d'ATP et de magnésium. De plus, le passage d'extrait brut de *P. patens*, en présence ou non d'ATP et de magnésium, sur une colonne d'affinité à la matrice de laquelle est fixé du protéasome 20S, permettrait probablement d'isoler des protéines interagissant *in vivo* avec le 20S. Dans ce cas, on pourrait s'attendre à trouver des substrats potentiels, des protéines impliquées dans le mécanisme de reconnaissance ou des isopeptidases.

b) Nous avons suggéré que le protéasome 26S pourrait être un artefact et que l'association des protéines du complexe 19S avec le 20S ne serait pas spécifique notamment pour des questions de conditions de purification et de symétrie de la structure. Si c'est le cas, il nous semble intéressant de démontrer cette non-spécificité en tentant d'associer le protéasome de l'archéobactérie *T. acidophilum* avec le complexe régulateur 19S. Ceci pourrait se faire en ajoutant, à un extrait brut de levure, du protéasome de *T. acidophilum* et en appliquant le procédé de purification qui permet d'isoler le protéasome 26S. Il restera à déterminer si, parmi les particules isolées de grande taille et semblables au 26S, on trouve la structure 20S de *T. acidophilum*, en particulier par des techniques d'immunoprécipitation et d'immunolocalisation.

c) L'isolement et la caractérisation de la (ou des) protéine(s) responsable(s) de l'activité isopeptidasique constituent une étape importante dans la compréhension du processus de dégradation des conjugués ubiquitinés. Un certain nombre de protéines (fig.3.6) associées au protéasome 20S ont été identifiées sur SDS-PAGE. L'une ou l'autre d'entre elles pourrait être l'isopeptidase recherchée. Dans un premier temps, il s'agit de l'isoler, puis d'en étudier la fonction.

d) Bien que l'on connaisse déjà la conformation des chaînes d'ubiquitine à quatre molécules, nous ne savons pas si toutes les sortes de chaînes de polyubiquitine affichent la même conformation générale dans l'espace. Sont-elles linéaires avec un motif de base répété? Ou chaque espèce de chaînes possède-t-elle sa propre structure tertiaire?

Vu la relative abondance de chaînes d'ubiquitine que nous avons synthétisées, il serait possible, après la cristallisation et l'analyse des cristaux par diffraction R-X, de procéder à la modélisation des structures. Ces renseignements pourraient nous être utiles pour évaluer l'importance de l'ubiquitination suivant la nature et le nombre de chaînes fixées à une protéine. Autrement dit, pour comprendre l'effet de l'ubiquitination sur la conformation d'une protéine.

e) Les techniques de microscopie électronique nous ont permis de modéliser le protéasome 20S de *Physcomitrella patens*. L'étape suivante consistera à obtenir de nouvelles préparations pures de protéasomes liés avec des chaînes de polyubiquitine, puis à appliquer le même protocole de modélisation. Les informations que nous pourrions dégager de ce modèle nous renseigneront peut-être sur le mode d'interaction protéasome-chaînes de polyubiquitine.

f) La caractérisation fonctionnelle de la sous-unité PPZETA sera effectuée par des techniques de transformation génétique couramment utilisées sur la mousse *P. patens* avec des vecteurs permettant soit la surexpression soit la rupture du gène codant pour la sous-unité.

De plus, l'importance de la boucle Z de la sous-unité PPZETA sera étudiée par des techniques soit de remplacement de gène chez *P. patens* soit de complémentation chez la levure avec des constructions dans lesquelles on aura ôté la séquence des acides aminés provoquant la formation de la boucle et /ou des extrémités N-terminale et/ou C-terminale.

## 7. MATERIEL ET METHODES

### 7.1 CHAPITRE 2: PURIFICATION

**Matériel biologique-** Nous avons utilisé une lignée sauvage de *P. patens*. Le milieu et les conditions de propagation ont été décrites par Schaefer et Zryd (1997) (Schaefer, 1994). Le matériel est récolté après 6 à 8 jours de culture avant le développement de gamétophores et est congelé dans l'azote, puis stocké à -80 °C.

**Mesures d'activité du protéasome-** Trois peptides fluorogéniques ont été utilisés soit: Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA (activité chymotrypsique), Boc-Phe-Ser-Arg-MCA (act. trypsique), Cbz-Leu-Leu-Glu-βNA (act.V8-protéase). Les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission pour la mesure de l'activité sont respectivement 380 nm et 460 nm pour le MCA (méthyl amino coumarine) et 335nm et 410nm pour β-NA (naphtyl amide). La concentration des peptides est de 0,1 mM dans 50 mM Tris pH:7.5 sans DTT. Toutes les mesures sont effectuées sur des plaques de type ELISA lues par un fluorimètre (Biolabs) automatique. La mesure des activités est effectuée sur 5 ou 10 µl de la fraction à laquelle on ajoute 100 µl de substrat que l'on incube à 37 °C durant 1h à 2h.

**Préparation de l'extrait brut-** Toutes les étapes de purification ont été effectuées à 4 °C. Nous avons broyé la mousse en poudre très fine au mortier et pilon dans de l'azote. En fin d'opération, 2,5 % de polyclar AT (sigma) sont ajoutés et mélangés soigneusement. Le matériel est mis en suspension dans du tampon MCP (50mM Tris pH: 7,5, 20% glycérol, 2mM DTT), tampon standard utilisé pour toutes les étapes de purification. Le tout est centrifugé à 10'000.g. Le surnageant obtenu constitue l'extrait brut. Nous avons utilisé un système basse pression (ASCO, Instrument-Gesellschaft, Genève) pour l'utilisation des colonnes de purification suivantes (écoulement par gravité) s'il n'y a pas de spécifications particulières.

**1ère colonne échangeuse d'anions-** Le surnageant est chargé sur colonne échangeuse d'anions de type "Macroprep-Q" de Biorad (longueur 30 cm, diam. 2,5 cm) équilibrée dans du tampon MCP. Ce type de colonne possède des groupes -N+(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> sur sa matrice qui est fortement chargée positivement. L'élution est effectuée au moyen d'un gradient de 100 ml de 0 à 500 mM NaCl. Des fractions de 3 ml ont été récoltées.

**1ère colonne à tamis moléculaire-** Les fractions actives de l'échangeuse d'anions précédente (total: 15ml ) sont chargées sur une colonne BioGel A1.5m, (Biorad, *coarse grade*) (80 x 2,5 cm) équilibrée dans le tampon MCP + 150 mM de NaCl à un débit de 50 ml/h. Des fractions de 6 ml ont été collectées. Les standards de masse moléculaire utilisés pour étalonner la colonne sont le dextran bleu (2'000'000 kDa), la thyroglobuline (669'000 kDa) et la catalase (240'000 kDa).

**2ème colonne échangeuse d'anions-** Les fractions actives du tamis moléculaire sont appliquées à une nouvelle colonne "Macroprep-Q" (Biorad) du même type que la première mais plus petite (15 x 1 cm) de façon à obtenir une meilleure résolution. Des fractions de 1,5 ml ont été collectées.

**2ème colonne à tamis moléculaire-** Les fractions actives de l'échangeuse d'anions env. 16 ml sont chargées sur une colonne BioGel A5.0m (Biorad, *coarse grade*) (80 x 2,5 cm) équilibrée

dans le tampon MCP + 150 mM NaCl à un débit de 36 ml/h. Des fractions de 6ml ont été collectées.

**Colonne hydroxyapatite-** Les fractions actives de la colonne à tamis moléculaire biogel A-5.0m sont appliquées sur une colonne Bio-Gel HTP hydroxyapatite (10 x 1 cm) équilibrée dans le tampon MCP. L'élution a été opérée par application d'un gradient de 0 à 330 mM de NaPO<sub>4</sub> pH: 8,0. Des fractions de 1ml ont été collectées.

**3ème colonne à tamis moléculaire-** Les fractions actives précédentes ont été concentrées sur Centricon-10 (Amicon) à un volume de 400 µl, puis chargées sur une colonne HPLC à tamis moléculaire de type TSK-gel 3000W (Supelco) équilibrée dans le tampon MCP + 150 mM NaCl (débit 0,8 ml/min.). Les fractions ont été collectées toutes les minutes.

**3ème échangeuse d'anions-** Les fractions actives de la colonne précédente sont appliquées sur une colonne échangeuse d'anions Mono Q HR5/5 (Pharmacia) qui possède des groupes ammonium quaternaires fortement chargés. Cette colonne a été montée sur un système HPLC (Waters). L'élution des protéines s'est faite au moyen d'un gradient de 0 à 700 mM NaCl dans du tampon MCP. Débit: 0,8 ml/min. pendant 30 min.

**Electrophorèse: Gels non dénaturant, SDS-PAGE et en deux dimensions-** Les gels non dénaturant dans ce travail de thèse sont tous à 5% final d'acrylamide et contiennent 20 % de glycérol, sans SDS, pour le reste, ils suivent la recette du catalogue Hoeffler Scientific soit pour le gel de concentration 1,2 ml acrylamide 30%, 2ml tampon de conc. Laemmli, 4,8 ml H<sub>2</sub>O, 1,2 ml glycérol, 40 µl ammonium persulfate d'ammonium 10%, 7 µl TEMED, et pour le gel de séparation 2 ml acrylamide 40%, 4 ml tampon de séparation Laemmli, 8 ml H<sub>2</sub>O, 2 ml glycérol, 120 µl ammonium persulfate, 12 µl TEMED. Ces gels sont coulés dans le minisystème de Biorad. Les gels SDS-PAGE ont été réalisés selon la méthode Laemmli dans des systèmes Biorad (mini ou maxi gels). Les gels en deux dimensions ont nécessité une mise au point: soit 1ère dimension (IEF). Mélanger 1,44g urée, 0,575 ml Acrylamide-PDA 20% (biorad), 0,6 ml de Triton 10%, 0,98 ml H<sub>2</sub>O, 2,5 µl TEMED (Biorad). Prendre 750 µl de ce mélange et ajouter 30 µl de biolytes 3-10, 15 µl de biolytes 5-8, 10 µl de biolytes 9-11, et 1,35 µl de persulfate d'ammonium 10%. Mélanger et couler dans des tubes fournis par le système de Biorad minisystem IEF gels tubes de 1 mm de diam. et 10 cm de long. Laisser polymériser 1h. Préparer le tampon d'échantillon comme suit: 1,0 g urée, 800 µl de glycérol, 400 µl de Triton X-100, 40 µl mercaptoéthanol, 40 µl de bleu de bromophénol 0,2 %, 600 µl H<sub>2</sub>O. On ajoute ensuite 3% de biolytes 3-10, 2% de biolytes 5-8 et 1% de biolytes 9-11. Mélanger. A 20 µl de protéasome pur (5 µg), on ajoute une volume égal de tampon d'échantillon. Le mélange est déposé sur la surface du gel d'un tube préalablement coulé. Les tubes sont montés dans le système de migration avec comme tampon cathode 20mM NaOH, et anode 40 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Le système est mis sous une tension de 500 V durant 10 min., puis à 750 V durant 3h. à température ambiante. Le gel est ensuite extrait, puis équilibré 15 min. à température ambiante dans le tampon d'équilibration (0,5 ml SDS 10%, 0,625 ml "Stackingbuffer Laemmli ", 0,25 ml mercaptoéthanol, 0,15 ml Bleu de bromophénol 0,2 %, 3,5 ml H<sub>2</sub>O. Il est ensuite déposé pour la deuxième dimension à la surface d'un gel SDS-PAGE, scellé avec de l'agarose 0,8% (100 V constant). Une fois séparé, le gel est incubé pour fixation dans 10 % d'acide trichloracétique (TCA), rapidement rincé à l'eau et plongé dans la solution de coloration (0,25% bleu de Coomassie R250, 8% acide acétique, 45% éthanol).

**Microscopie électronique-** voir article:Adrian et al., Micron 24: 65-67 (1998).

**Gradient de glycérol**- Le gradient est effectué sur une ultracentrifugeuse "Kontron" possédant des tubes de 22 ml. La centrifugation est effectuée à 24'000 rpm soit 100'000 x g sur cet appareillage à 4 °C durant 22h. Un gradient de glycérol de 20 % à 40 % est préparé au moyen d'un *gradient former* de Pharmacia, puis coulé dans les tubes à centrifuger. Un extrait brut de mousse (7ml) est déposé sur le gradient. Le gradient et l'extrait brut traité à l'ATP contient: 2mM ATP, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM créatine phosphate et 10 µg créatine kinase. Après centrifugation, le gradient est récolté (en perçant le fond) par fraction de 1 ml. L'activité de dégradation de la caséine des fractions est mesurée sur 50 µl au moyen du kit de Boehringer-Mannheim *Universal Protease Substrate* qui contient de la caséine marquée à la résorufine. La mesure se fait spectrophotométriquement.

**Expérience de dissociation**- 50 µl tampon de dissociation (282 mg d'urée, 300 µl de 100 mM Tris.HCl pH: 7.5, 100 µl 1M Tris.HCl pH:7.5) est mélangé à 50 µl de protéasome (0.5mg/ml), puis incubé 2h à temp. ambiante et injecté sur une colonne HPLC TSK 4000 équilibrée dans le tampon TEU (4M urée, 100mM Tris.HCl pH: 7,5 filtré sur 0.2µ). Débit: 0.8 ml/min. Les fractions ont été collectées chaque minute et concentrées sur Centricon C-10 (Amicon) et analysées par gel 2-D.

**Immunologie**- Les analyses *western blots* comporte trois étapes: a) gel dénaturant, non dénaturant ou 2D b) Transfert des protéines du gel sur membrane PVDF ou nitrocellulose c) révélation des protéines spécifiques à l'aide d'anticorps.

Le transfert des gels sur membrane PVDF s'est fait en milieu liquide dans le système Biorad *Trans blot cell*. Le gel est déposé sur une membrane PVDF (Millipore). Le tout est pris en sandwich dans quelques feuilles de papiers buvard et inséré dans la cassette de transfert plongée dans la cuve contenant le tampon de transfert (25 mM Tris, 190 mM glycine, 20% Méthanol). La tension est de 100 mA, constante durant 12h. à 4 °C. Après le transfert, les membranes ont été bloquées dans un tampon TBST (1xTBS, 20 mM Tris pH:7.5, 500 mM NaCl, 0,1% Tween 20) durant 30 min. Incubées dans une solution HST (1xTBS, 0,5 mM NaCl, 0,5% Tween20) contenant les anticorps primaires antiprotéasome (dilué 1:4'000) durant 1 h. Suivent successivement les lavages suivants: 2 lav. TBST 5 min.. 1 lav. HST 5min., 2 lav. TBST 5min.. La membrane a été incubée dans une solution HST, contenant les anticorps secondaires antilapin marqués à la phosphatase dilués 1:10'000, durant 1 h à température ambiante. Les anticorps peuvent être révélés après une série de lavages identiques à ceux effectués précédemment.

Les méthodes d'étalement de la banque d'expression λgt11, la marche à suivre du criblage au moyen d'anticorps antiprotéasomes afin d'isoler des clones codant pour ses sous-unités ainsi que les essais de désensibilisation des membranes ont été suivis tels qu'ils sont décrits par Sambrook et al. (1989). Tous les séquençages se sont effectués à l'aide du kit *sequenase version 2.0 de USB*. Les séquences finales ont été confirmées par la maison Microsynth.

## 7.2 CHAPITRE 3: LE PROTEASOME ET LES CHAINES D'UBIQUITINE

**Synthèse des chaînes d'ubiquitine**- La synthèse de ces chaînes s'est basée sur les publications van Nocker et al. (1996) dont nous avons amélioré le rendement en changeant les proportions et en rajoutant à intervalles réguliers certains constituants. Le tableau suivant résume notre expérience de synthèse de chaînes de polyubiquitine.

Temps (h)	0	20	29	43.5	47.5	52.5	68	77.5	92	99	114	126
UBQ	25 mg											
H <sub>2</sub> O	1,6 ml											
1M Tris.HCl	250											
Emix 20x (µl)	125	62.5	62.5	62.5		62.5	62.5	60	60	60	60	60
PCK (1u/µl)	25	12.5	12.5			10		5		5		5
UBA1 (1µg/µl)	3	1.5	3	1.5	1.5	3	3	3	3	3	3	3
UBC7 (5µg /µl)	5	2.5	5	2.5	2.5	5	5	7	5	7	7	7
PMSF	2	1						2			2	2

Les quantités, si elles ne sont pas spécifiées, sont en microlitres (µl) UBQ: ubiquitine. PCK: phosphocréatine kinase. PMSF: stock à 500mM dans EtOH. L'*energy mix* (Emix 20x) est composé de: 200mM phosphocréatine, 40 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM ATP, 40 mM DTT.

Les chaînes de polyubiquitine sont purifiées sur une colonne échangeuse d'anions de type MonoQ HR5/5 dans du tampon pipérazine pH:10, débit: 0,8 ml/min., gradient de NaCl de 0 à 500 mM (dans du tampon pipérazine) sur 50 min. (10 mM NaCl/ min.). Chaque pic est récolté dans un eppendorf, puis analysé (5 µl + 15 µl tampon d'échantillon) sur gel SDS-PAGE 14% coloré au bleu de Coomassie.

Une fois analysées, les fractions contenant encore des "contaminants" de longueurs de chaînes supérieures ou inférieures à la longueur purifiée, sont à nouveau séparées sur MonoQ et ce jusqu'à obtention d'une longueur de chaînes de multi-ubiquitine donnée. Le nombre de cycles ou de passages sur la même colonne augmente avec la longueur des chaînes. Cela dépend du pouvoir de résolution de la colonne. Les espèces de plus de huit molécules d'ubiquitine sont très difficiles à séparer. Plus les molécules sont longues, plus elles sont basiques et plus les charges nettes entre chaînes sont proches.

**Dégradation des chaînes de polyubiquitine par le protéasome**- Le mélange réactionnel (62 µl) contient: 0,25 µg de protéasome, 1,0 µg de chaînes de polyubiquitine, 50 mM HEPES pH: 8,0, 10 % glycérol. La réaction est effectuée à 37 °C. Des aliquots du mélange (10 µl) sont prélevés aux intervalles désirés. La réaction est stoppée en ajoutant (15 µl) de tampon

d'échantillon et analysée sur gel SDS-PAGE 14 %. Celui-ci est transféré sur membrane PVDF et révélé aux anticorps antiubiquitine.

***Evaluation de l'affinité du protéasome en fonction de la longueur des chaînes-*** Les immunoblots sont analysés et quantifiés par analyse densitométrique des signaux à l'aide du programme *Imagemaster 2D elite software* (Pharmacia). Seules les cinétiques de disparition (diminution de l'intensité) des signaux correspondant à la chaîne de départ sont analysées au cours du temps.

***Fonctionnalité des molécules d'ubiquitine relâchées par l'action du protéasome-*** 10 µg de chaînes composées de six molécules d'ubiquitine (UBQ6) sont dégradées par 5 µg de protéasome selon les conditions de réaction décrites plus haut et jusqu'à complétion (24H). Le mélange réactionnel est ensuite filtré sur filtre centricon C-10 (Amicon). Ce type de cartouche permet de laisser passer les molécules inférieures à 10 kDa, les molécules comme le protéasome et les chaînes égales ou supérieures à deux molécules d'ubiquitine qui n'auraient pas été hydrolysées par l'isopeptidase ainsi que le protéasome sont retenues sur le filtre. Le filtrat est ensuite lyophilisé, puis utilisé pour resynthèse aux conditions identiques à la synthèse à partir d'ubiquitine pure. Le mélange réactionnel est analysé après 48 h.

***Isolation de l'activité isopeptidasique liée au protéasome-*** L'activité isopeptidasique des fractions du tamis moléculaire et de l'échangeuse d'anions est mesurée en prélevant 10 µl de chacune des fractions collectées auxquelles on ajoute 0,5 µg de chaînes de polyubiquitine (UBQ3), dans 50 mM tampon HEPES pH: 8,0, 10 % glycérol. Volume final 20 µl. Température de réaction 37 °C. Les échantillons sont analysés après 4h, sur gel SDS-PAGE 16 %, que l'on a transféré sur membrane PVDF et révélé aux anticorps antiubiquitine.

***Essai de compétition chaînes d'ubiquitine (UBQ5)-protéasome-*** Une quantité constante de protéasome de mousse est ajoutée à une dilution sérielle de chaînes d'ubiquitine (UBQ5) dans un rapport moléculaire UBQ5/protéasome de 1:10, 5:10, 25:10, 125:10. En tenant compte que la masse moléculaire d'UBQ5 est de 56 kDa et 700 kDa pour le protéasome. Le mélange (vol. final 10 µl) est incubé 30 min à 37 °C, puis ajouté à 100 µl de peptides fluorogéniques à 0,1mM. Les activités spécifiques relatives sont mesurées sur 100 min.

***"Crosslinking " protéasome-UBQ5-*** 20 µl de protéasome (1 µg/ µl) dans 10mM de NaPO<sub>4</sub> pH:8,0, 10 % glycérol) et 20 µl de chaîne d'ubiquitine (0,05 µg / µl H<sub>2</sub>O) sont mélangés, puis incubés durant 1h30.

On ajoute ensuite 40 µl de glutaraldéhyde (0.1% dans 50 mM de NaPO<sub>4</sub>, pH:8.0). Incuber 1h30. On ajoute pour le blocage 40 µl de NH<sub>4</sub>Cl 2M. Incuber 3h. Au volume total de 120 µl, on ajoute 380 µl d'eau. Appliquer le mélange sur filtre Microcon C-100 (Amicon) (*cut-off* de 100 kDa). Centrifuger 15 min. à 5'000 rpm dans un tube microfuge. Ajouter 500 µl, agiter brièvement (dil. de 500x). Centrifuger à 5'000 rpm pour 15 min. dans un microfuge. Ajouter 10 µl sur le filtre, agiter brièvement. Récupérer le liquide en inversant le filtre dans un eppendorf. Centrifuger à 500 rpm pendant 2 min. Le volume généralement récupéré est de l'ordre de 12 µl. Le mélange *cross-linké* est analysé sur gel non dénaturant et en microscopie électronique. En parallèle, et comme contrôle, on analyse des chaînes d'ubiquitine et du

protéasome traités de la même manière. Le gel ND est transféré sur membrane PVDF et révélé aux anticorps antiubiquitine selon méthode décrite au chapitre 2

**Mise en évidence de l'interaction chaînes d'ubiquitine avec une sous-unité du protéasome de mousse-** 10 µg de protéasome sont séparés sur gel en deux dimensions selon la méthode du chapitre 2. Le gel est ensuite transféré sur une membrane nitrocellulose (Schleicher et Schuell) dans système de transfert Biorad totalement immergé dans un tampon de transfert (Laemmeli dilué 2x, sans SDS!, 10% méthanol ). Le potentiomètre est réglé sur 250mA (env. 65V). Le transfert est opéré sur 10h à 4 °C.

Après le transfert, le filtre est bloqué dans une solution de 3% de BSA (Sigma, fraction V) durant 2h. Il faut éviter l'utilisation de poudre de lait qui peut réagir avec les anticorps anti-ubiquitine. Le filtre est rincé 2x avec du tampon PBS, inséré dans un sachet plastifié que l'on remplit d'une solution de 20 ml de tampon NaPO<sub>4</sub> 50mM pH:8,0 contenant 100 µg d'un mélange de chaînes d'ubiquitine (de deux à 8 molécules). Laisser incubé 3h à température ambiante sous très faible agitation orbitale. Eliminer la solution contenant les chaînes et sans rincer! Ajouter 20 ml de tampon NaPO<sub>4</sub> 50mM pH:8.0 contenant 50 µl de glutaraldéhyde 24% pour 30 min. à température ambiante. Eliminer le *cross-linker* et effectuer le blocage en incubant le filtre dans 1M Tris pH 7.6. Le *western blot* est révélé aux anticorps antiubiquitine selon procédé décrit au chapitre 2.

### **7.3 CHAPITRE 4: ISOLATION ET EXPRESSION DU CLONE cDNA CODANT POUR LA SOUS-UNITE ZETA DE LA MOUSSE**

**Isolation de la sous-unité zéta du protéasome de la mousse-** 150 µg de protéasome de mousse ont été dénaturés avec de l'urée (8M final) dans 100 µl vol. final. Nous avons ensuite ajouté: 2 µl de Nonidet NP-40, 3 µl de bêta-mercaptoéthanol, 2 µl de biolytes 3-10, 4 µl de biolytes 5-8, 5 µl de glycérol 87 %. Mélanger et laisser à température ambiante durant 30 min. Le gel I.E.F composé de 1,65g urée, 0,98 ml H<sub>2</sub>O, 0,6 ml Nonidet NP-40 10 %, 0,575 ml acrylamide-PDA 20 % (Biorad). Dissoudre à température ambiante. Pour 500 µl de mélange du mélange précédent, ajouter: 10 µl de biolytes 3-10, 20 µl de biolytes 5-8, 2 µl de biolytes 9-11 (Biorad). et 1,5 µl de persulfate d'ammonium 10%. Les tubes IEF de 1 mm de diamètre et de 15 cm de long sont remplis jusqu'à une hauteur de 13 cm. Laisser polymériser 1h30. Une fois les tubes installés dans le support (système Biorad), rincer le sommet du gel avec de l'eau et charger l'échantillon de protéasome dans le tube. Le tampon cathode est composé de 2,8 g de NaOH dans 700 ml H<sub>2</sub>O, d'anode de 3,1 ml H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> dans 4,5 l H<sub>2</sub>O. Les conditions de séparation sont les suivantes: 15 min. à 200 V, 25 min. à 300 V, 1h à 400 V, 20 h à 500 V, 1h à 800 V, 1h à 1000 V. Le gel IEF est extrait du tube, puis équilibré 15 min. à température ambiante dans le tampon d'équilibration (3,5 ml glycérol 85%, 4 ml tampon de concentration Laemmeli, 3 ml SDS 4%, le tout est complété à 15 ml avec de l'eau) et ensuite déposé sur un gel SDS-PAGE 16% (100 V constant). Après séparation en deuxième dimension, le gel est rincé à l'eau déionisée, puis développé dans une solution de 0,3 M de CuCl<sub>2</sub> jusqu'à l'apparition des spots correspondant aux sous-unités du protéasome. Découper ceux-ci à l'aide d'un scalpel, les plonger dans du tampon Laemmeli, et introduire le tout dans un sac à dialyse avec un *cut-off* de 8000 kDa. On électroélue les sous-unités des pastilles dans une solution Laemmeli ne contenant que 0,1 % de SDS à 30 mA durant 8h. Le tampon du sac de

dialyse est concentré sur filtre centricon C-10 (Amicon). 10% de l'échantillon sont analysés sur gel SDS-PAGE 14 % et colorés au bleu de Coomassie.

La digestion à l'endolysine-C, la séparation des peptides générés, et leur séquençage ont été effectués par le Dr Christoph Eckerskorn du Max Plank Institut., Martinsried.

**Southern blot du DNA de *P. patens* et *A. thaliana***- Nous avons pu obtenir l'EST de l'*Arabidopsis Biological Resource Center, DNA Stock Center*, l'OHIO State University, Columbus, OH 43210-1002, clone 153C19T7, numéro d'accèsion: AC: R90613. Trois amorces ont été synthétisées atz1:5'atgtttctcactaggactgagtatga3' atz2:5'tttggtgaaggagaggaagagctcaa3' atz3:5'acattgactcttctctctccttcaccaa3'. Le couple atz1-Sp6 permet d'amplifier la séquence codante totale de l'ATG au promoteur Sp6 sur le vecteur de type λZiplox. Les amorces atz1, atz2, atz3 et Sp6 ont servi au séquençage du cDNA codant pour la sous-unité PAE1 d'*A. thaliana* avec le kit *Sequenase version 2.0* de USB. Cette séquence a été confirmée par la suite par la maison Mycosynth, Balgach CH. Les conditions de PCR pour l'amplification de la sonde atz1-sp6 sont: 5' à 95 °C, 40 cycles de: 30'' à 94 °C, 30'' à 52 °C, 30'' à 72 °C, puis une élongation de 3' à 68 °C. Nous avons utilisé de la taq pol de Promega et 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>.

Une fois amplifiée, la sonde est précipitée à l'éthanol ajouté dans le tube. La sonde atz1-Sp6 est digérée avec BamH1 (Biolabs) pour éliminer le site de multiclonaage existant du 3' de la séquence codante au promoteur Sp6.

60 ng de la sonde sont marqués par la méthode *random priming* au moyen du kit Pharmacia et marquée au <sup>32</sup>P-dCTP. Après purification, on récupère la sonde dans 100 µl de tampon 0,2x SSPE. L'activité spécifique est de 1,5.10<sup>6</sup> cps/µl.

Les DNA de *P. patens* et d'*A. thaliana* (feuilles) sont isolés à partir de matériel frais par la méthode au CTAB développée par Rogers and Bendich, 1988. Le rendement de cette méthode se situe aux environs de 1 à 3 µg DNA/g de poids frais. Ces DNA ne présentent aucune difficulté à être digérés par les enzymes de restriction. Une fois digéré, le DNA est séparé sur gel d'agarose 0,8% (P/V), dénaturé, et transféré par capillarité sur membrane zêta probe (Biorad) selon la procédure de Sambrook, et al. (1989).

La membrane est incubée dans le tampon de préhybridation (8xSSC, 5x denhardt's, 0,5% SDS, 5 mg de tRNA) durant 3h à 50 °C, puis dans le tampon d'hybridation (identique au tampon de préhybridation) contenant la sonde marquée (activité finale env. 1.10<sup>6</sup> cps/ml) durant 12h. Les conditions d'hybridation sur le DNA de mousse avec la sonde hétérologue sont les suivantes: Incubation à 45 °C et 6xSSC, puis 2 lavages successifs à 6xSSC 50 °C, et enfin 2 lavages à 3xSSC 50 °C. A plus forte stringence la sonde se décroche. Concernant l'hybridation avec la sonde homologue Ppzeta, la membrane est incubée à 45 °C 6x SSC, puis lavée à 50 °C avec 3x SSC, puis 0,2xSSC 60 °C et enfin 0,1xSSC 65 °C.

**Isolation du clone cDNA codant pour la sous-unité Zêta**- Une banque de cDNA de mousse clonée dans le vecteur λgt11 est étalée à 30'000 pfu/plaque de 150mm de diam. pour le premier screening. Le second criblage est effectué à raison de 500 pfu par boîte de 90 mm de diam. et finalement un troisième criblage à env.10 phage par boîte de 90 mm de diam. Les méthodes utilisées sont décrites par Sambrook et al., (1989). Le transfert du DNA des plaques de lyse sur les membranes (Hybond, Amersham) humidifiées dure 1 min.. La membrane est déposée sur la surface du liquide du tampon de dénaturation (0,1 N NaOH) 5 à 7 min., puis neutralisée 2x3 min. dans 100 mM Tris pH 7,5, et enfin lavée 1h dans 2xSSC. Les filtres sont

ensuite séchés 2h à 80 °C. Les plaques de lyse positives sont prélevées et incubées dans du tampon SM.

Les clones révélés positifs par hybridation (10 µl du clone isolé dans le tampon SM) sont analysés par PCR avec les amorces λgt11R et λgt11F (Promega) qui permettent d'amplifier les inserts clonés dans le site de restriction NotI. Les conditions de réaction sont les suivantes: 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, Taq polymérase de Promega 0,5u, 2 µM d'amorces, 0,2 mM de dNTPs, 5 µl tampon PCR dans un volume final de 50 µl. Programme: 5 min. à 95 °C, 40 cycles de 30'' à 94 °C, 30'' à 58 °C, 1'30'' à 72 °C, élongation 3' à 68 °C. Pour que la réaction PCR fonctionne les phages doivent avoir moins de 1 jour!

Le DNA phagique des clones positifs est obtenu par la méthode décrite par Sambrook et al. (1989) (culture des phages sur boîtes), puis par purification du DNA au moyen du *Qiagen DNA Phage Isolation Kit*. Le DNA est ensuite digéré par NotI et séparé sur gel d'agarose 1%. L'insert est récupéré et du gel au moyen de papier DEAE placé dans le gel devant le fragment. L'insert purifié est cloné dans pBluescript dans le site NotI. Le mélange de ligation contenait 50 ηg de pBluescript, 20 ηg de fragment ZETA 1 µl de T4 ligase (NEB) volume total de réaction 20 µl. Les bactéries *E. coli* BL 21 compétentes sont transformées en ajoutant 2 µl de mélange de ligation. Mélanger et laisser incubé 15 min. sur la glace. Procéder au *heat shock* 2 min. à 42 °C. Remettre sur la glace le tube 2 min. et ajouter 1 ml de milieu LB agiter 30 min. à 37 °C et étaler sur boîte LB-ampicillin. Incuber la boîte O/N. Les colonies résistantes sont analysées par PCR, avec les amorces des promoteurs T3 et T7, en les piquant avec une pointe de pipetman que l'on plonge dans 20 µl H<sub>2</sub>O. Chauffer à ébullition et prélever 5 µl pour la PCR aux conditions décrites plus haut pour les phages. Le séquençage des clones positifs est effectué au moyen du *Kit sequenase version 2.0*, puis confirmé par la maison Microsynth, Balgach Suisse.

**Clonage dans Pet5a et expression de Ppzeta-** Le vecteur d'expression Pet5a (Promega) a été digéré par les enzymes de restrictions BamHI et NdeI et traité à la SAP durant 1h. Cette digestion permet de sous-cloner le cDNA Ppzeta dans la bonne orientation. Par PCR sur le clone pBluescriptPpzeta, nous avons ajouté aux extrémités 5' et 3' du cDNA Ppzeta respectivement les sites de restrictions NdeI et BamHI à l'aide des amorces ppz3nde1:5'gggAATTCCATATgTTCCTCACCaggAgTgAgTATg3' et ppz4bamh1:5'CgCggATCCTTACAATCgTTgTATAACAACCTC3'. Les conditions de réaction sont les suivantes: 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, Expand High Fidelity Taq polymerase (Boehringer Mannheim) 1 unité, 2 µM d'amorces, 0,2 mM de dNTPs., 10 µl tampon PCR dans un volume final de 100 µl. Programme: 5 min. à 95 °C, 40 cycles de 30'' à 94 °C, 30'' à 55 °C, 1'30'' à 72 °C, élongation 3' à 68 °C. Le produit PCR a été purifié à l'aide du *Qiagen PCR Purification kit*, puis digéré avec les enzymes de restriction BamHI et NdeI. Le mélange de ligation contenait 300η g dans le vecteur Pet5a, 100 ηg de fragment PPZETA 1 µl de T4 ligase (NEB) volume total de réaction 20 µl. Une fois transformées, les bactéries BL21(DE3)pLysS sont étalées sur milieu LB-Ampicillin.

Les colonies résistantes sont analysées par PCR. On utilise une pointe de pipetman avec laquelle on pique une colonie et que l'on plonge dans 20 µl H<sub>2</sub>O. Chauffer à ébullition, prélever 5 µl et effectuer la PCR avec les amorces ppz3nde1 et ppz4bamh1 aux conditions décrites plus haut.

Les colonies contenant l'insert sont cultivées durant la nuit (phase stationnaire) dans un milieu LB+ampicillin (100 µg/ml). 100 µl sont prélevés, puis ajoutés dans 3 ml de milieu

LB+ ampicillin. Mettre sous agitation à 37 °C. Dès que l'OD<sub>600</sub>=0,65, 30 µl d'IPTG 100mM sont ajoutés pour l'induction. Centrifuger les cultures après 3h. Prélever un aliquot des surnageants et analyser par SDS-PAGE, puis par *western blot* (révélation aux anticorps anti-protéasome).

Pour l'obtention de plus grande quantité de Ppzeta recombinant à partir des culots (contenant les *inclusions bodies*), nous avons effectué des cultures de 1l et ajouté lorsque l'OD était atteinte, 238 mg d'IPTG pour l'induction. Après centrifugation, le culot a été resuspendu dans 50 ml de tampon de lyse (50 mM Tris pH:8,0, 1mM EDTA, 100 mM NaCl, 100 µl PMSF (100mM), 1ml de lysozyme (10mg/ml)). Incuber 1h à 37 C. Ajouter de la guanidine (4M final) de façon à solubiliser le culot. Centrifuger à 10'000g. Eliminer le culot. Dialyser le surnageant progressivement contre des solutions contenant des concentrations de guanidine (tamponnées au Tris pH:7.5) de plus en plus faible (4.5M, 4M, 3M, 2M, 1M) et terminer contre une solution de NaCl 1M. Centrifuger le précipitat et charger le surnageant sur une colonne hydroxyapatite (Biorad). Les protéines sont éluées par application d'un gradient de 60 ml de 0 à 700 mM de NaPO<sub>4</sub> pH:7,8. Des fractions de 2 ml sont collectées, puis analysées sur gel SDS-PAGE. Les conditions de travail pour l'échangeuse MonoQ sont: gradient de 30 ml de 0 à 700 mM de NaCl Tris.HCl pH: 7;5, débit: 0,8ml/min., fractions collectées: 1 ml et pour le tamis moléculaire (TDSK 4000): tampon: 50 mM Tris.HCl pH:7,5 + 150 mM NaCl, débit: 0,8ml, temps: 25min.

## 8. BIBLIOGRAPHIE

- Adams, G. M., Falke, S., Goldberg, A.L., Slaughter, C.A., DeMatino, G.N., & Gogol, E.P.**1997.Structural and functional effects of PA700 and modulator protein on proteasomes.*J. Mol. Biol.* 273:646-657
- Adrian, M., Dubochet, J., Fuller, S.D., & Harris, J.R.**1998.Cryo-negative staining.*Micron* 29: 145-160
- Ameisen, J. C.**1996.The origin of programmed cell death.*Science* 272:1278-1279
- Amerik, A. Y., Swaminathan, S., Krantz, B.A., Wilkinson, K.D., & Hochstrasser, M.**1997.In vivo disassembly of free polyubiquitin chains by yeast Ubp14 modulates rates of protein degradation by the proteasome.*The EMBO Journal* 16:4826-4838
- Amsterdam, A. P., F., & Baumeister, W.**1993.Changes in intracellular localization of proteasomes in immortalized ovarian granulosa cells during mitosis associated with a role in cell cycle control.*Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:99-103
- Anand, G., Yin, X., Shahidi, A.K., Grove, L., & Prochownik, E.V.**1997.Novel regulation of the helix-loop-helix protein Id1 by S5a, a subunit of the 26S proteasome.*J. Biol. Chem.* 272:19140-19151
- Aravind, L., & Ponting, C. P.**1998.Homologues of 26S proteasome subunits are regulators of transcription and translation.*Protein Science* 7: 1250- 1254
- Armon, T., Ganoth, D., & Hershko, A.**1990.Assembly of the 26S complex that degrades proteins ligated to ubiquitin is accompanied by the formation of ATPase activity.*J. Biol. Chem.* 265:20878-20884
- Arribas, J., Arizti, P., & Castano, J.P.**1994.Antibodies against the C2 COOH-terminal region discriminate the active and latent forms of the multicatalytic proteinase complex.*J. Biol. Chem.* 269:12858-12864
- Atrin, S., & Bradshaw, R.**1988.Cotranslational processing and protein turnover in eucaryotic cell.*Biochemistry* 27:7979-7990
- Azem, A., Shaked,I., Rosenbusch, J.P., & Daniel, E.**1995.Cross-linking of porin with glutaraldehyde: a test for the adequacy of premises of cross-linking theory.*Biochimica Biophysica Acta* 1243:151-156
- Bachmair, A., Finley, D., & Varshavsky, A.**1986.In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue.*Science* 234:179-186
- Barhite, S., Thibault, C., & Miles, M. F.**1998.Phosducin-like protein (PhLP), a regulator of G beta gamma function, interacts with the proteasomal protein SUG1.*Biochim. Biophys. Act.* 1402: 95-101

- Beal, R., Deveraux, Q., Xia, G., Rechsteiner, M., & Pickart, C.**1996.Surface hydrophobic residues of multiubiquitin chains essential for proteolytic targeting.(1996) *Proc. Natl. Acad.* 93:861-866
- Beal, R. E., Toscano-Cantaffa, D., Young, P., Rechsteiner, M., & Pickart, C.M.**1998.The hydrophobic effect contributes to polyubiquitin chain recognition.*Biochemistry* 37:2925-2934
- Belich, M. P., Glynn, R.J., Senger, G., Sheer, D., & Trowsdale, J.**1994.Proteasome components with reciprocal expression to that of the MHC-encoded LMP proteins.*Curr. Biology* 4:769-776
- Belich, M. P., & Trowsdale, J.**1995.Proteasome and class I antigen processing and presentation.*Mol. Biol. Rep.* 21:53-56
- Belknap, W. R., & Garbarino, J.E.**1996.The role of ubiquitin in plant senescence and stress responses.*Trends in Plant Sci.* 1:331-335
- Belote, J. M.**1997.Molecular cloning of the *Drosophila melanogaster* gene *alpha5:dm* encoding a 20S proteasome alpha-type subunit.*gene* 201:99-105
- Callis, J.**1995.Regulation of protein degradation.*The Plant Cell* 7:845-857
- Capecchi, M. R.**1989.Altering the genome by homologous recombination.*Science* 244:1288-1292
- Cardozo, C., Eleuteris A. M., & Orlowski M.**1995.Differences in Catalytic Activities and Subunit Pattern of Multicatalytic Proteinase Complexes (Proteasomes) Isolated from Bovine Pituitary, Lung, and Liver.*J. Biol. Chem.* 270: 22645-22651
- Chasan, R.**1993.Seeing the light.*The plant Cell* 5:137-140
- Chen, H., Roseman, A.M., Hunter, A.S., Wood, S.P., Burston, S.G., Ranson, N.A., Clarke, A.R., & Saibil, H.R.**1994.Location of a folding protein and shape changes in GroEL-groES complexes imaged by cryo-electron microscopy.*Nature* 371:261-264
- Chen, P. H., & Hochstrasser, M.**1995.Biogenesis, structure and function of the yeast 20S proteasome.*The EMBO Journal* 14:2620-2630
- Chen, Z. J., Hagler, J., Palombella, V. J., Melandri, F., Scherer, D., Ballard, D., & Maniatis, T.**1995.Signal-induced site-specific phosphorylation targets I $\kappa$ B $\alpha$  to the ubiquitin-proteasome pathway.*Genes & Dev.* 9: 1586-1597
- Chen, P. & Hochstrasser, M.**1996.Autocatalytic subunit processing couples active site formation in the 20S proteasome to completion of assembly.*Cell* 86:961-972
- Chen, P, Johnson, P., Sommer. T., Jentsch, S., & Hochstrasser, M.** 1993. Multiple conjugating enzymes participate in the in vitro degradation of the yeast MAT $\alpha$ 2 repressor. *Cell.* 74:357-369

- Chu-Ping, M., Slaughter, C.A., & DeMartino, G.N.**1992.Identification, purification, and characterization of a protein activator (PA28) of the 20S proteasome (macropain).*J. Biol. Chem.* 267:10515-10523
- Ciechanover, A.**1994.The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway.*Cell* 79:13-21
- Corey, E. J., Reichard, G.A., & Kania, R.**1993.Studies on the total synthesis of lactacystin, an improved aldol coupling reaction and a beta-lactone intermediate in thiol ester formation.*Tetrahedron Letters* 34:6977-6980
- Cove, D. J., Knight, C.D., & Lamparter, T.**1997.Mosses as model systems.*Trends Plant Sci* 2:99-105
- Cradozo, C., Eleuteri, A.M., & Orłowski, M.**1995.Differences in catalytic activities and subunit pattern of multicatalytic proteinase complexes (proteasomes) isolated from bovine pituitary, lung, and liver.*J. Biol. Chem.* 270:22645-22651
- Croall, D. E., & Demartino, G.N.**1991.Calcium-activated neutral protease (calpain) system: structure, function, and regulation.*Physiol. Rev.* 71:813-847
- Dalling, M. J., & Nettleton, A.M.**1986.Chloroplast senescence and proteolytic enzymes.*In: Dalling M.J. (ed) Plant proteolytic enzymes pp. 125-153*
- Davies, D. D.**1982.Physiological aspects of protein turnover.*In: Springer Verlag Encyclopedia of plant physiology 14A: 189-228*
- Deshaies, R.**1995.Make it or break it: the role of ubiquitin-dependent proteolysis in cellular regulation.*Trends in Cell Biol.* 5:428-434
- Deveraux, Q., Ustrell, V., Pickart, C., & Rechsteiner, M.**1994.A 26S protease subunit that binds ubiquitin conjugates.*J. Biol. Chem.* 269:7059-7061
- Deveraux, Q., Van Nocker, S., Mahaffey, D. Vierstra, R.D. & Rechsteiner, M.**1995.Inhibition of ubiquitin-mediated proteolysis by the arabidopsis 26S protease subunit S5a.*J. Biol. Chem.* 270:29960-29963
- Egner, R., Thumm, M., Straub, M., Simeon, A., Schüller, H.J., & Wolf, D.H.**1993.Tracing intracellular proteolytic pathway.*J. Biol. Chem.* 268: 27269-27276
- Elias, S., Bercovich, B., Kahana, C., Coffino, P., Fischer, M., Hilt, W., Wolf, D.H., & Ciechanover, A.**1995.Degradation of ornithine decarboxylase by the mammalian and yeast 26S proteasome complexes requires all the components of the protease.*Eur. J. Biochem.* 229:276-283
- Ellis, R. E., Yuan, J., & Horwitz, H.R.**1991.Mechanisms and functions of cell death.*Ann. Rev. Cell. Biol.* 7:663-698
- Falquet, L., Paquet, N., Frutiger, S., Hugues, G.J., Hoang-Van, K., & Jaton, J-C.**1995.A human de-ubiquitinating enzyme with both isopeptidase and peptidase activities in vitro.*FEBS* 359:73-77

- Fraser, R. A., Rossignol, M., Heard, D. j., Egly, J. M., & Chambon P.**1997.SUG1, a putative transcriptional mediator and subunit of the PA700 proteasome regulatory complex, is a DNA helicase.*J. Biol. Chem* 272: 7122-7126
- Fu, H., Doelling, J.H., Cassandra, S.A., Hochstrasser, M., & Vierstra, R.D.**1998.Molecular organisation of the 20S proteasome gene family from *Arabidopsis thaliana*.*Genetics* 149:677-692
- Fu, H., Sadis, S., Rubin, D.M., Glickman, M., van Nocker, S., Finley, D., & Vierstra, R.D.**1998.Multiubiquitin chain binding and protein degradation are mediated by distinct domains within the 20S proteasome subunit Mcb1.1998) *J. Biol. Chem.* 273:1970-1981
- Fujinami, K., Tanahashi, N., Tanaka, K., Ichihara, A., Cejka, Z., Baumeister, W., Miyawaki, M., Sato, T., & Nakagawa, H.**1994.Purification and characterization of the 26S proteasome from spinach leaves.*J. Biol. Chem.* 269:25905-25910
- Garbarino, J. E., Rockhold, D.R., & Belknap, W.R.**1992.Expression of stress-responsive ubiquitin genes in potato tubers.*Plant Mol. Biol.* 20:235-244
- Gatenby, A. A., & Viitanen, P.V.**1994.Structural and functional aspects of chaperonin-mediated protein folding.*Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 45:469-491
- Genschik, P., Philipps, G., Gigot, C., & Fleck, J.**1992.Cloning and sequence analysis of a cDNA clone from *Arabidopsis thaliana* homologous to a proteasome alpha subunit from *Drosophila*.*FEBS* 309:311-315
- Genschik, P., Parmentier, Y., Durr, A., Marbach, J., Criqui, M.C., Jamet, E., & Fleck, J.**1992.Ubiquitin genes are differentially regulated in protoplast-derived cultures of *Nicotiana sylvestris* and in response to various stresses.*Plant Mol. Biol.* 20:897-910
- Gerards, W. L., Enzlin, J., Häner, M., Hendricks, I.L.M., Aebi, U., Bloemendal, H., & Boelens, W.**1997.The human alpha-type proteasomal subunit HsC8 forms a double ringlike structure, but does not assemble into proteasome-like particles with the beta-type subunits HsDelta or HsBPROS26.*J. Biol. Chem.* 272:10080-10086
- Gerards, W. L., Jong, W.W., Bloemendal, H., & Boelens, W.**1998.The human proteasomal subunit HsC8 induces ring formation of other alpha-type subunits.*J.Mol. Biol.* 275:113-121
- Gianazza, E.**1995.Isoelectric focusing as a tool for the investigation of post-translational processing and chemical modifications of proteins.*J. Chromatography* 705:67-87
- Gindin, E., & Borochoy, A.**1992.Ubiquitin conjugation to protein increases following chilling of *Clerodendrum* leaves.*PLant Physiol.* 100:1392-1395
- Girod, P. A., Fu, H., Schaefer, D.G., Zryd, J.P., & Vierstra, R.D.**June 24-28, 1998.Targeted disruption of MCB1 lead to inhibition of gametophores development in the moss *Physcomitrella patens*.*9th international conference on Arabidopsis research.*

- Glickman, M. H., Rubin, D.M., Croux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Baumeister, W., Fried, V.A., & Finley, D.**1998.A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-Signalosome and eIF3.*Cell. 94: 615-623*
- Golberg, A. L. S.-J., A.C.**1976.Intracellular protein degradation in mammalian and bacterial cells: part 2.*Ann. Rev. Biochem. 45:747-803*
- Goldberg, A. L., & Rock, K.L.**1992.Proteolysis, proteasomes and antigen presentation.*Nature 357:375-379*
- Goldberg, A.**1995.Functions of the proteasome: the lysis at the end of the tunnel.*Science 268:522-524*
- Gregori, I., Hainfeld, J.F., Simon, M.N., & Goldgaber, D.**1997.Binding of Amiloid  $\beta$  protein to the 20S proteasome.*J. Biol. Chem. 272: 58-62*
- Groll, m., Ditzel, I., Lowe, J., Stock, D., Botchler., M., Bartunik, H.D., & Huber, R.**1997.Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution.*Nature 386:463-471*
- Grziwa, A., Maack, S., Pühler, G., Baumeister, W., & Jaenicke, R.**1994.Dissociation and reconstitution of the Thermoplasma proteasome.*Eur. J. Biochem. 223: 1061-1067*
- Guo, G. G., Gu, M., & Etlinger, J.D.**1994.240-kDa proteasome inhibitor (CF-2) is identical to  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase.*J. Biol. Chem. 269:12399-12402*
- Haas, A. L., & Siepmann, T.J.**1997.Pathways of ubiquitin conjugation.*FASEB J. 11:1257-1268*
- Haracska, L., & Udvardy, A.**1997.Mapping the ubiquitin-binding domains in the p54 regulatory complex subunit of the *Drosophila* 26S protease.*FEBS 412:331-336*
- Hendil, K. B., Kristensen, P., & Uerkwitz, W.**1995.Human proteasomes analysed with monoclonal antibodies.*Biochem. J. 305:245-252*
- Hicke, L. R., H.**1996.Ubiquitination of yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis.*Cell 84:277-287*
- Hicke, L.**1997.Ubiquitin-dependent internalization and down-regulation of plasma membrane proteins.*FASEB J. 11:1215-1226*
- Hilt, W., & Wolf, D.H.**1995.Proteasome of the yeast *S.cerevisiae*: genes, structures, and functions.*Mol. Biol. Rep. 21:3-10*
- Hochstrasser, M.**1995.Ubiquitin, proteasomes, and the regulation of intracellular protein degradation.*Curr. Biol. 7:215-223*
- Hoffman, L., & Rechsteiner, M.**1994.Activation of the multicatalytic protease.*J. Biol. Chem. 269:16890-16895*

- Hough, R., Pratt, G., & Rechsteiner, M.**1987.Purification of two high molecular weight proteases from rabbit reticulocyte lysate.*J. Biol.Chem.* 262:8303-8313
- Huang, Y., Baker, R.T., & Fischer-Vize, J.A.**1995.Control of cell fate by a deubiquitinating enzyme encoded by the fat facets gene.*Science* 270:1828-1831
- Huang, J., Kwong, J., Sun, E.C., & Liang, T.J.**1996.Proteasome complex as a potential cellular target of hepatitis B virus X protein.*J. Virology* 70:5582-5591
- Hughes, A. L.**1997.Evolution of the proteasome components.*Immunogenetics* 46:82-92
- Ikai, A., Nishigai, M., Tanaka, K., & Ichihara, A.**1991.Electron microscopy of 26S complex containing 20S proteasome.*FEBS Letters* 292:21-24
- Jacobs, T. W.**1995.Cell cycle control.*Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 46:317-339
- Jariel-Encontre, I., Pariat, M., Martin, F., Carillo, S., Salvat, C., & Piechaczyk, M.**1995.Ubiquitylation is not an absolute requirement for degradation of e-Jun protein by the 26S proteasome.*J. Biol.Chem.* 270: 16623-16627
- Jentsch, S.**1992.The ubiquitin-conjugation system.*Ann. Rev. Genet.* 26:179-207
- Jentsch, S., & Schlenker, S.**1995.Selective protein degradation: a journey's end within the proteasome.*Cell* 82:881-884
- Johnsson, E. S., Ma, P.C.M., Ota. O.I.M., & Varshavsky, A.**1995.A proteolytic pathway that recognizes ubiquitin as a degradation signal.*The journal of biological chemistry* 270:17442-17456
- Jones, A. M., & Dangl, J.L.**1996.Logjam at the Styx: Programmed cell death in plants.*Trends in Plant Science* 1:114-119
- Joshi, C. P.**1987.Putative polyadenylation signals in nuclear genes of higher plants: a compilation and analysis.*Nuc. Ac. Res.* 15:9627-9640
- Kalderon, D.**1996.Protein degradation: De-ubiquitinate to decide your fate.*Curr. Biol.* 6:662-665
- Kampen, J., Wettren, M., & Schulz, M.**1996.The ubiquitin system in plants.*Phys. Plant.* 97:618-624
- Kania, M. A., DeMartino, G.N., Baumeister, W., & Goldberg, A.L.**1996.The proteasome subunit C2, contains an important site for binding of the PA28 (11S) activator.*Eur. J. Biochem.* 236:510-516
- Katayama, T., Kubota, T., Takata, M., Akimitsu, N., & Sekimizu, K.**1996.Disruption of the hs1U gene, which encodes an ATPase subunit of the eukaryotic 26S proteasome homolog in *Escherichia coli*, suppresses the temperature-sensitive dnaA46 mutation.*Biochem. Biophys. Research Comm.* 229: 219-224
- Klausner, R. D. S., R.**1990.Protein degradation in the endoplasmic reticulum.*Cell* 62:611-614

- Kopp, F., Hendil, K.B., Dahmann, B., Kristensen, P., Sobek, A., & UerKwitz, W.**1997.Subunit arrangement in the human 20S proteasome.*Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:2939-2944
- Kristensen, P., Johnsen, A.H., Uerkvitz, W., Tanaka, K., & Hendil, K.B.**1994.Human proteasome subunits from 2-dimensional gels identified by partial sequencing.*Biochem. Biophys. Res. Com.* 205:1785-1789
- Lam, Y. A., DeMartino, G.N., Pickart, C.M., & Cohen, R.**1997.Specificity of the ubiquitin isopeptidase in the PA700 regulatory complex of 26S proteasomes.*J. Biol. Chem.* 272:28438-28446
- Lam, Y. A., Xu, W., Demartino, G.N., & Cohen, R.E.**1997.Editing of ubiquitin conjugates by an isopeptidase in the 26S proteasome.*Nature* 385:737:740
- Li, X., Gu, M., & Etlinger, J.D.**1991.Isolation and characterization of a novel endogenous inhibitor of the proteasome.*Biochemistry* 30:9709-9715
- Li, X. S., & Etlinger, J.D.**1992.Ubiquitinated proteasome inhibitor is a component of the 26S proteasome complex.*Biochemistry* 31:11963-11967
- Liljegren, S. J. Y., M.F.**1998...response: targeting *Arabidopsis*.*trends Plant sci* 3:79-80
- Lilley, K. S., Davison, M.D., & Rivett, A.J.**1990.N-terminal sequence similarities between components of the multicatalytic proteinase complex.*FEBS Letters* 262:327-329
- Lord, J. M.**1996.Protein degradation: Go outside and see the proteasome.*Curr.Biol.* 6:1067-1069
- Löwe, J., Stock, D., Jap, B., Zwickl, P., Baumeister, W., & Huber, R.**1995.Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *Thermolasma acidophilum* at 3,4 Å resolution.*Science* 268:533-539
- Lupas, A., Koster, A.J., Walz, J., & Baumeister, W.**1994.Predicted secondary structure of the 20S proteasome and model structure of the putative peptide channel.*FEBS Letters* 354:45-49
- Makino, y., Yamano, K., Kanemaki, M., Morikawa, K., Kishimoto, T., Shimbara, N., Tanaka, K., & Tamura, T.**1997.SUG1, a component of the 26 S proteasome, is an ATPase stimulated by specific RNAs.*Biological Chemistry* 272: 23201-23205
- Mamroud-Kidron, E., & Kahana, C.**1994.The 26S proteasome degrades mouse and yeast ornithine decarboxylase in yeast cells.*FEBS Letters* 356:162-164
- Mason, G. G., Hendil, K.B., & Rivett, A.J.**1996.Phosphorylation of proteasomes in mammalian cells. Identification of two phosphorylated subunits and the effect of phosphorylation on activity.*Eur. J. Biochem.* 238(2): 453-462
- Maurizi, M. R., Thompson, M.W., Singh, S.K. & Kim, S.H.**1994.Endopeptidase Clp: ATP-dependent Clp protease from E.Coli.*Methods Enzymol.* 244:314-331

- Menon, A. S., & Goldberg, A.L.**1987.Protein substrates activate the ATP-dependent protease La by promoting nucleotide binding and release of bound ATP.*J. Biol. Chem.* 262:14929-14934
- Michalek, M. T., Grant, E.P., Gramm, C., Goldberg, A., & Rock, K.L.**1993.A role for the ubiquitin-dependent proteolytic pathway in MHC class I-restricted antigen presentation.*Nature* 363:552-554
- Morimoto, Y., Mizushima, T., Yagi, A., Tanahashi, N., Tanaka, K., Ishihara, A., & Tsukihara, T.**1995.Ordered structure of the crystallized bovine 20S proteasome.*J. Biochem.* 117:471-474
- Mott, J. D., Pramanik, B.C., Moomaw, C.R., Afendis, S.J., DeMartino, G.N., & Slaughter, C.A.**1994.PA28, an activator of the 20S proteasome, is composed of two nonidentical but homologous subunits.*J. Biol. Chem.* 269:31466-31471
- Muller, S. S., L.M.**1995.Ubiquitin in homeostasis, development and disease.*BioEssays* 17:677-684
- Murakami, Y., Matsufuji, S., Kameji, T., Hayashi, S-I., Igarashi, K., Tamura, T., Tanaka, K., & Ichihara, A.**1992.Ornithine decarboxylase is degraded by the 26S proteasome without ubiquitination.*Nature* 360:597-599
- Murray, A.**1995.Cyclin ubiquitination: the destructive end of mitosis.*Cell* 81:149-152
- Nocker, S., Deveraux, Q., Rechsteiner, M., & Vierstra, R.D.**1995.Arabidopsis MBP1 gene encodes a conserved ubiquitin recognition component of the 26S proteasome.*Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:856-860
- Olink-Coux, M., Arcangeletti, C., Pinaridi, F., Minisini, R., Huesca, M., Chezzi, C., & Scherrer, K.**1994.Cytolocation of prosome antigens on intermediate filament subnetworks of cytokeratin, vimentin, and desmin type.*J. Cell Sci.* 107:353-366
- Orlowski, M.**1993.The multicatalytic proteinase complex (proteasome) and intracellular protein degradation: Diverse functions of an intracellular particle.*J. Lab. Clin. Med.* 121:187-189
- Ozaki, M., Fujinami, K., Tanaka, K., Amemiya, Y., Sato, T., Ogura, N., & Nakagawa, H.**1992.Purification and initial characterization of the proteasome from the higher plant *Spinacia oleracea*.*J. Biol. Chem.* 267:21678-21684
- Pagano, M.**1997.Cell cycle regulation by the ubiquitin pathway.*FASEB J.* 11:1067-1075
- Papa, F. R., & Hochstrasser, M.**1993.The yeast DOA4 gene encodes a deubiquitinating enzyme related to a product of the human *tre-2* oncogene.*Nature* 366:316-319
- Parmentier, Y., Bouchez, D., Fleck, C., & Genschik, P.**1997.The 20S proteasome gene family in *Arabidopsis thaliana*.*FEBS* 416:281-285
- Patel, S., & Latterich, M.**1998.The AAA team: related ATPases with diverse functions.*Trends cell Biol.* 8:65-71

- Peters, J.-M.**1994.Proteasomes:protein degradation machines of the cell.*TIBS 19*:377-382
- Peters, J.M., Cejka, Z., Harris, J.R., Kleinschmidt, J.A., & Baumeister, W.** 1993. Structural features of the 26S proteasome complex. *J. Mol. Biol.* 234: 932-937
- Petit, F., Jarrousse, A.S., Dahlmann, B., Sobek, A., Hendil, K.B., Buri, J., Briand, Y., & Schmid, H.P.**1997.Involvement of proteasomal subunits zeta and iota in RNA degradation.*Biochem. J.* 15:93-98
- Pickart, C. M.**1997.Targeting of substrates to the 26S proteasome.*FASEB J.* 11:1055-1066
- Pouch, M. N., Petit, F., Buri, J., Briand, Y., & Schmid, H.P.**1995.Identification and initial characterization of a specific proteasome (prosome) associated RNase activity.*J. Biol. Chem.* 270:22023-22028
- Prendergast, J. A., Ptak, C., Arnason, T.G., & Ellison, M.J.**1995.Increased ubiquitin expression suppresses the cell cycle defect associated with the yeast ubiquitin conjugating enzyme, CDC34 (UBC3).*J. Biol. Chem.* 270:9347-9352
- Puchta, H., & Hohn, B.**1996.From centimorgans to base pairs-homologous recombination in plants.*Trends Plant Sci.* 1:340-348
- Puchta, H.**1998.Towards targeted transformation in plants.*Trends Plant Sci.* 3:77-78
- Puchta, H., Liljegren, S.J., & Yanofsky, M.F.**1998.Towards targeted transformation in plants.*Trends in Plant Sci.* 3:77-80
- Pühler, G., Weinkauff, S., Bachmann, L., Müller, S., Engel, A., Hegerl, R., & Baumeister, W.**1992.Subunit stoichiometry and three-dimensional arrangement in proteasomes from *Thermoplasma acidophilum*.*The EMBO J.* 11:1607-1616
- Realini, C., Rogers,S.W., & Rechsteiner, M.**1994.Proposed roles in protein-protein association and presentation of peptides by MHC Class I receptors.*FEBS Letters* 348:109-113
- Reski, R.**1997.Development, genetics and molecular biology of mosses.*Bot. Acta.* 111:1-15
- Reski, R., Reynolds, S., Wehe, M., Kleber-janke, T., & Kruse, S.**1997.Moss (*Physcomitrella patens*) expressed sequence tags include several sequences which are novel for plants.*Bot. Acta.* 111:143-149
- Reski, R.**1998.*Physcomitrella* and Arabidopsis: the David and Goliath of reverse genetics.*Trends Plant Sci.* 3:209-210
- Reski, R.**1998.Development, genetics and molecular biology of mosses.*Bot. Acta* 111:1-15
- Richter-Ruoff, B., Wolf, D.H., & Hochstrasser, M.**1994.Degradation of the yeast MAT alpha2 transcriptional regulator is mediated by the proteasome.*FEBS Letters* 354:50-52

- Rousset, R., Desbois, C., Bantignies, F., & Jalinot, P.**1996.Effects on NF- $\kappa$ B1/p105 processing of the interaction between the HTLV-1 transactivator Tax and the proteasome.*Nature* 381:328-331
- Sambrook, j., Fritsch, E.F., & Maniatis, T.**1989.Molecular cloning, a laboratory manual.
- Sanchez, J. J., Folco, E.J., Busconi, L., Martone, C.B., Studdert, C. & Casalongue, C.A.**1995.Multicatalytic proteinase in fish muscle.*Mol. Biol. Rep.* 21:63-69
- Sawada, H., Akaishi, T., Katsu, M., & Yokosawa, H.**1997.Difference between PA700-like proteasome activator complex and the regulatory complex dissociated from the 26S proteasome implies the involvement of modulating factors in the 26S proteasome assembly.*FEBS Letters* 412:521-525
- Schaefer, D.**1994.Molecular genetic approaches to the biology of the moss *Physcomitrella patens*.*Thèse de doctorat: Université de Lausanne*
- Schaefer, D. G. Z., J.P.**1997.Efficient gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*.*Plant J.* 11:1195-1206
- Schatz, G., & Dobberstein, B.**1996.Common principles of protein translocation across membranes.*Science* 271:1519-1526
- Schmidt, M., & Kloetzel, P.M.**1997.Biogenesis of eucaryotic 20S proteasomes: the complex maturation pathway of a complex enzyme.*The FASEB Journal* 11:1235-1243
- Schliephacke, M., Kremp, A., Schmid, H.P., Köhler, K., & Kull, U.**1991.Prosomes of higher plants.*Eur. J. Cell. Biol.* 55:114-121
- Schork, S. M., Bee, G., Thumm, M., & Wolf, D.H.**1994.Catabolite inactivation of fructose-1,6-bisphosphate in yeast is mediated by the proteasome.*FEBS Letters* 349:270-274
- Schulz, M., Klockenbring, T., Hunte, C., & Schnabl, H.**1993.Involvement of ubiquitin in phosphoenolpyruvate carboxylase degradation.*Bot. Acta* 106:143-145
- Seemüller, E., Lupas, A., Stock, D., Löwe, J., Hubert, R., & Baumeister, W.**1995.Proteasome from *thermoplasma acidophilum*: A threonine protease.*Science* 268:579-582
- Seemüller, E., Lupas, A., & Baumeister, W.**1996.Autocatalytic processing of the 20S proteasome.*Nature* 382: 468-470
- Seufert, W., Futcher, B., & Jentsch, S.**1995.Role of a ubiquitin conjugating enzyme in degradation of S- and M-phase cyclins.*Nature* 373:78-81
- Sibille, C., Gould, K.G., Willard-Gallo, K., Thomson, S., Rivett, A.J., Powis, S., Butcher, G.W., & de Baetselier, P.**1995.LMP2+ proteasomes are required for the presentation of specific antigens to cytotoxic T lymphocytes.*Curr. Biol.* 5:923-930
- Sommer, T., & Wolf, D.**1997.Endoplasmic reticulum degradation: reverse protein flow of no return.*FASEB J.* 11:1227-1233

- Song, X., Kampen, J., Slaughter, C.A., & DeMartino, G.N.**1997.Relative functions of the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of the proteasome activator, PA28.*J. Biol. Chem.* 272:27994-28000
- Staswick, P. E.**1994.Storage proteins of vegetative plant tissues.*Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45:303-322
- Stock, D., Nederlof, P.M., Seemüller, E., Baumeister, W., Huber, R. & Löwe, J.**1996.Proteasome: from structure to function.*Curr. Op. Biotech.* 7:376-385
- Strous, G. J., van Kerkhof, P., Govers, R., Ciechanover, A., & Schwartz, A. L.**1996.The ubiquitin conjugation system is required for ligand-induced endocytosis and degradation of the growth hormone receptor.*EMBO J.* 15: 3806-3812
- Tanaka, K., & Ichihara, A., Waxman, L., & Goldberg, A.**1986.A high molecular weight protease in the cytosol of rat liver.*J. Biol. Chem.* 261:15197-15203
- Tanaka, K., Yoshimura, T., Kumatori, A., & Ichihara, A., Ikai, A., & Nishigai, M., & Kameyama, K., & Takagi, T.**1988.Proteasomes (multi-protease complexes) as 20S ring-shaped particles in a variety of eukaryotic cells.*J. Biol. Chem.* 263:16209-16217
- Thomas, H. S., J.L.**1980.Leaf senescence.*Annu Rev Plant Physiol.* 31:83-111
- To, W.-Y., & Wang, C.C.**1997.Identification and characterization of an activated 20S proteasome in *Trypanosoma brucei*.*FEBS Letters* 404:253-262
- Tokunaga, f., Aruga, R., Iwanaga, S., Tanaka, K., Ichihara, A., Takao, T., & Shimonishi, Y.**1990.The NH<sub>2</sub>-terminal residues of rat liver proteasome (multicatalytic proteinase complex) subunit, C2, C3 and C8, are N-acetylated.*FEBS* 263:373-375
- Udvardy, A.**1993.Purification and characterization of a multiprotein component of the *Drosophila* 26S (1500 kDa) proteolytic complex.*J. Biol. Chem.* 268:9055-9062
- Ugai, S. I., Tamura, T., Tanahashi, N., Takai, S., Komi, N., Chung, C.H., Tanaka, K., & Ichihara, A.**1993.Purification and characterization of the 26S proteasome complex catalyzing ATP-dependent breakdown of ubiquitin-ligated proteins from rat liver.*J. Biochem.* 118:754-768
- Vallon, U., & Kull, U.**1994.Localization of proteasomes in plant cells.*Protoplasma* 182:15-18
- van Nocker, S., Walker, J.M., & Vierstra, R.D.**1996.The *Arabidopsis thaliana* UBC7/13/14 genes encode a family of multiubiquitin chain-forming E2 enzymes.*J. Biol. Chem.* 271:12150-12158
- van Nocker, S., Sadis, S., Rubin, D.M., Glickman, M., Fu, H., Coux, O., Wefes, I., Finley, D., & Vierstra, R.D.**1996.The multiubiquitin-chain-binding protein Mub1 is a component of the 26S proteasome in *Saccharomyces cerevisiae* and plays a nonessential, substrate-specific role in protein turnover.*Mol. Cell. Biol.* 16:6020-6028

- Van Nocker, S. D., Q., Rechsteiner, M., & Vierstra, R.D.**1996.Arabidopsis MBP1 gene encodes a conserved ubiquitin recognition component of the 26S proteasome.*Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:856-860
- Varshavsky, A.**1992.The N-end rule.*Cell* 69:725-735
- Vierstra, R. D.**1993.Protein degradation in plants.*Annu Rev. Plant physiol. Plant Mol. Biol.* 44:385-410
- Walz, J., Erdmann, A., Kania, M., Typke, D., Koster, A.J., & Baumeister, W.**1998.26S proteasome structure revealed by three-dimensional electron microscopy.*Journal of structural Biology* 121: 19-29
- Wei, N., Tsuge, T., Serino, G., Dohmae, N., Takio, K., Matsui, M., & Deng, X.W.**1998.The COP9 complex is conserved between plants and mammals and is related to the 26S proteasome regulatory complex.*Curr. Biol.* 8:919-922
- Wenzel, T., & Baumeister, W.**1993.*Thermoplasma acidophilum* proteasomes degrade partially unfolded and ubiquitin-associated proteins.*FEBS Letters* 326:215-218
- Wenzel, T., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., & Baumeister, W.**1994.Existence of a molecular ruler in proteasomes suggested by analysis of degradation products.*FEBS Letters* 349:205-209
- Wenzel, T., & Baumeister, W.**1995.Conformational constraints in protein degradation by the 20S proteasome.*Struc. Biol.* 2:199-204
- Wilkinson, K. D., Tashayev, V.L., O'Connor, L.B., Larsen, C.N., Kasperek, E., & Pickart, C.M.**1995.Metabolism of the polyubiquitin degradation signal: structure, mechanism, and role of isopeptidase T.*Biochem.* 34:14535-14546
- Wilkinson, K. D.**1997.Regulation of ubiquitin-dependent processes by deubiquitinating enzymes.*FASEB J.* 1:1245-1256
- Wolf, S., Lottspeich, F. & Baumeister, W.**1993.Ubiquitin found in the archaebacteria *Thermoplasma acidophilum*.*FEBS* 326:42-44
- Yang, J. F., & Malek, L.**1991.Purification of a dry pea seed proteinolytic enzyme complex.*Phytochemistry* 30:2487-2491
- Yoshimura, T., Kameyama, K., Takagi, T., Ikal, A., Tokunaga, F., Koide, T., Tanahashi, N., Tamura, T., Cejka, Z., Baumeister, W., Tanaka, K., & Ichihara, A.**1993.Molecular characterization of the 26S proteasome complex from rat liver.*J. Struc. Biol.* 111:200-211
- Yoshizawa, T., Sorimachi, H., Tomioka, S., Ishiura, S., & Suzuki, K.**1995.Calpain dissociates into subunits in the presence of calcium ions.*Biochem. Biophys. Res. Com.* 208:376-383
- Zeidler, M., Gatz, C., Hartmann, E., & Hughes, J.**1996.Tetracycline-regulated reporter gene expression in the moss *Physcomitrella patens*.*Plant Mol. Biol.* 30:199-205

- Zhu, X., & Craft, C. M.**1998.Interaction of phosducin and phosducin isoforms with a 26S.*Mol. Vis. 11: 4-13*
- Zühl, F., Seemüller, E., Golbik, R., & Baumeister, W.**1997.Dissecting the assembly pathway of the 20S proteasome.*FEBS Letters 418:189-194*
- Zwickl, P., Grziwa, A., Pühler, G., Dahlmann, B., Lottspeich, F., & Baumeister, W.**1992.Primary structure of the thermoplasma Proteasome and its implication for the structure, function, and evolution of the multicatalytic proteinase.*Biochemistry 31:964-972*
- Zwickl, P., Lottspeich, F., & Baumeister, W.**1992.Expression of functional *Thermoplasma acidophilum* proteasomes in *Escherichia coli*.*FEBS Letters 312:157-160*
- Zwickl, P., Klein, J., & Baumeister, W.**1994.Critical elements in proteasome assembly.*Struc. Biol. 1:765-770*