مطالعه نقش توالی نشانه HDEL در انتهای کربوکسی پروتئینها با استفاده از نشان‌دار کردن ایمنوسیتوشیمیائی سلولهای تراریخت و وحشی توتون

علی موافقی

دانشگاه تبریز، دانشکده علوم طبیعی، گروه علوم گیاهی

تاریخ دریافت: ۸٤/۱۰/۱۹ تاریخ پذیرش: ۸۵/۰٤/۰٤

چکیده

با گذشت بیش از دو دهه از آغاز تحقیقات در مورد نحوه خروج پروتئینها از شبکه آندوپلاسمی هنوز بطور کامل در این زمینه اتفاق نظر حاصل نشده است. مدل "انتقال توده‌ای "خروج مولکولها از شبکه آندوپلاسمی را بصورت غیر انتخابی در نظر می‌گیرد. در حالیکه مدل "انتقال فعال" گزینش مولکولها و در نتیجه تغلیظ آنها را در زمان خروج از ER پیشنهاد می‌کند. بهر حال نقش تتراپپتید نشانه HDEL در بازگشت دادن پروتئینهای مقیم ER از دستگاه گلژی مورد پذیرش است. از مشکلات تحقیقی موجود در زمینه پروتئینهائی که دارای این توالی نشانه هستند، خروج کم و از طرف دیگر تجزیه سریع بسیاری از آنها در خارج از ER است. برای غلبه بر این مشکل، دو گروه از گیاهان تراریخت توتون مورد استفاده قرار گرفت که سلولهای آنها آلفا- آمیلاز و یا HDEL- آلفا- آمیلاز را بعنوان پروتئین ترشحی تولید می‌کنند. نشان دار کردن ایمنی شناختی برشهای انجمادی سلولهای ریشه این گیاهان با آنتی بادی تهیه شده بر علیه آلفا- آمیلاز وجود این آنزیم را در شبکه آندوپلاسمی، دستگاه گلژی و دیواره سلولی هر دو گروه از آنها مشخص کرد. مقایسه الکترومیکروگرافهای مربوط به سلولهای تراریخت نشان داد که اتصال مولکولهای آلفا- آمیلاز به توالی HDEL باعث تمرکز این آنزیم در قطب نزدیک یا سیس دستگاه گلژی و احتمالاً بازگشت آن به سمت ER می‌گردد. با این حال، وجود تعدادی از نشانها در سایر ساکولهای گلژی و همچنین دیواره‌های سلولی دلیلی بر اشباع احتمالی ماشین بازگشت مولکولهای دارای تتراپپتید HDEL از بخش نزدیک یا سیس بود. بعبارت دیگر، در سلولهای تراریخت بازداری مولکولهای آلفا- آمیلاز بواسطه اتصال به HDEL نمی‌تواند بطور کامل باعث حفظ این مولکولها در ER گردد. نشان دار کردن سلولهای ریشه گیاهان وحشی با استفاده از آنتی‌بادیهای کالرتیکولین و بیپ کمرنگ بودن نقش کم مکانیسم بازگشت بواسطه HDEL را در بازداری رتیکلوپلاسمینهای محلول در ER تأیید نمود.

واژه های کلیدی: شبکه آندوپلاسمی، دستگاه گلژی، توالی HDEL ، نشان دار کردن ایمنی‌شناختی

مقدمه

بخش عمده‌ای از پروتئینها در حین بیوسنتز و یا پس از آن وارد شبکه آندوپلاسمی یا ER می‌گردند و سپس برای انجام وظایف فیزیولوژیک خود، شبکه آندوپلاسمی را به سمت اهداف مشخص ترک می‌کنند. حرکت این مولکولها به سمت اندامکهای هدف بوسیله پپتیدهای نشانه هدایت می‌شود. در زمینه نحوه خروج پروتئینها از ER هنوز بطور کامل اتفاق نظر وجود ندارد (۱۲). در دو دهه اخیر دو مدل اصلی در این مورد ارائه شده است. بر اساس مدل انتقال توده‌ای (bulk flow) خروج مولکولها از شبکه آندوپلاسمی بطور غیر انتخابی صورت می‌گیرد (۱۱). مولکولهای ویژه شبکه آندوپلاسمی نظیر برخی از چاپرونها که آنرا بهمراه سایر مولکولها ترک می‌نمایند و بایستی برای انجام وظایف خود به شبکه بازگردند، در ابتدای مسیر ترشحی یعنی در بخش نزدیک یا سیس دستگاه گلژی گزینش شده و با ورود به داخل وزیکولهای انتقالی از نوع کوپI به شبکه آندوپلاسمی بازگردانده می‌شوند (٤ و ۷ و ۱۳). در گزینش

Archive of SID
www.SID.ir

پروتئینهای غشایی و محلول توسط وزیکولهای کوپI بترتیب توالیهای تراپپتیدی KKXX و K/HDEL در انتهای کربوکسی پروتئینها بعنوان نشانه عمل می‌کنند (۵ و ۱۵) . علی رغم وجود شواهد متعدد در تأئید این نظر، آزمایشهای دیگر نشان دادند که در شرایط بیرون سلولی برخی از چاپرونها در وزیکولهای انتقالی منشا گرفته از ER یا همان وزیکولهای کوپII وجود ندارند و از طرف دیگر غلظت برخی از پروتئینهای ترشحی در این وزیکول‌ها به مراتب بیشتر از ER است (٦ و ١٤). بعبارت دیگر در زمان خروج مولکولها از ER یک انتخاب صورت می‌گیرد. به این صورت مدل دوم بنام مدل انتقال فعال) (active transport پروتئینها مطرح شد که با شناخته شدن توالیهای نشانه خروج از ER نظیر نشانه تری‌پپتیدی DXE در انتهای تعدادی از پروتئینهای ترشحی ER قوت گرفت (۳ و ۸ و ١٦). هر دو مدل ذکر شده بر مبنای دلایل تجربی قوی استوارند که برخی از آنها کاملا متناقض بنظر می‌رسند.

یکی از مشکلات تحقیقاتی موجود در زمینه پروتئینهای مسیر ترشحی مقدار نسبتا کم خروج پروتئینهای مقیم ER و تجزیه سریع بسیاری از آنها پس از خروج است. در نتیجه سنجش انتقال آنها توسط روشهای بیوشیمی و زیست‌شناسی سلولی بسیار دشوار است. برای رفع این مشکل در سالهای اخیر جهت پژوهش در مورد چگونگی انتقال پروتئین، سلولهای تراژن متعددی با استفاده از روشهای مهندسی ژنتیک و زیست فنآوری طراحی شده‌است که پروتئینهای مورد نظر را به مقدار قابل‌توجه تولید می‌کند. در اکثر این آزمایشها با حذف یا افزودن پپتیدهای نشانه در توالی پروتئینهای ترشحی و یا مقیم ER انتقال پروتئینها در سلول مورد بررسی قرار می‌گیرد است. در یکی از این بررسیها به تولید دو گروه از گیاهان تراریخت توتون مبادرت گردیده است که دارای ژن آلفا- آمیلاز و HDEL- آلفا- آمیلاز می‌باشند (۱ و ۱۳). آلفا- آمیلاز یک پروتئین ترشحی کاملا شناخته شده است و انتظار می‌رود که در دو دسته از گیاهان تراریخت این آنزیم ترشحی بدلیل وجود و یا نبود پپتید نشانه سرنوشت متفاوتی در سلول داشته باشد. این آنزیم بایستی در گیاهان دارای آلفا- آمیلاز فاقد نشانه از سلول خارج گردد و در گیاهان دارای فرم واجد نشانه نتواند از دستگاه گلژی عبور کند، و در نتیجه بطور عمده در شبکه آندوپلاسمی یافت شود. در این پژوهش سلولهای هر دو گروه از گیاهان توتون تراریخت و گیاه وحشی با روشهای برش‌گیری انجمادی (cryo-sectioning) و ایمنوسیتوشیمی مورد مطالعه قرار گرفت و انتقال پروتئین در مسیر ترشحی سلولهای آنها بررسی شد.

مواد و روشها

بذر گیاهان تراریخت توتون از آزمایشگاه زیست فنآوری گیاهی دانشگاه لیدز انگلستان تهیه شد. نحوه تولید گیاهان تراریخت و توانایی آنها در بیوسنتز آنزیم آلفا-آمیلاز بهمراه سایر پروتئینهای ترشحی قبلا بطور کامل گزارش شده است (۱ و ۱۳). پس از جوانه‌زنی بذرها بر روی کاغذهای صافی سترون مرطوب در دمای آزمایشگاه، ۲ میلی‌متر از نوک ریشه دانه‌رستها ۷ روزه بطول بریده شد و در درون محلول فیکساتیو اولیه دارای ۱/۵ درصد w/v پارافرم آلدئید و ۰/۲ درصد v /v گلوتارآلدئید در بافر فسفات ۱۰۰ mM (pH=7) بمدت ۱ ساعت در دمای آزمایشگاه و سپس ۱۲ ساعت در دمای ٤ درجه سانتی گراد قرار گرفت. قطعات ریشه تثبیت شده سه بار بمدت ۱۰ دقیقه با بافر فسفات شستشو و سپس بمدت ۱۲ ساعت در دمای ٤ درجه سانتی گراد درمحلول M 2/3 ساکاروز غوطه‌ور گردید. نمونه‌ها سپس بر روی نگهدارنده‌های فلزی نیکل قرار گرفت و در داخل ازت مایع منجمد گردید و تا زمان برش‌گیری در داخل آن نگهداری شد. تهیه برشهای ریشه با استفاده ازاولترامیکروتوم انجمادی Leica UCT +EM SCS در دمای۱۲۰- درجه سانتی گراد انجام شد. نمونه‌های دارای ضخامت ٦٠ نانومتر بر روی گریدهای نیکل دارای یک لایه فرموار پوشش داده شده با کربن، جمع آوری شد و بر

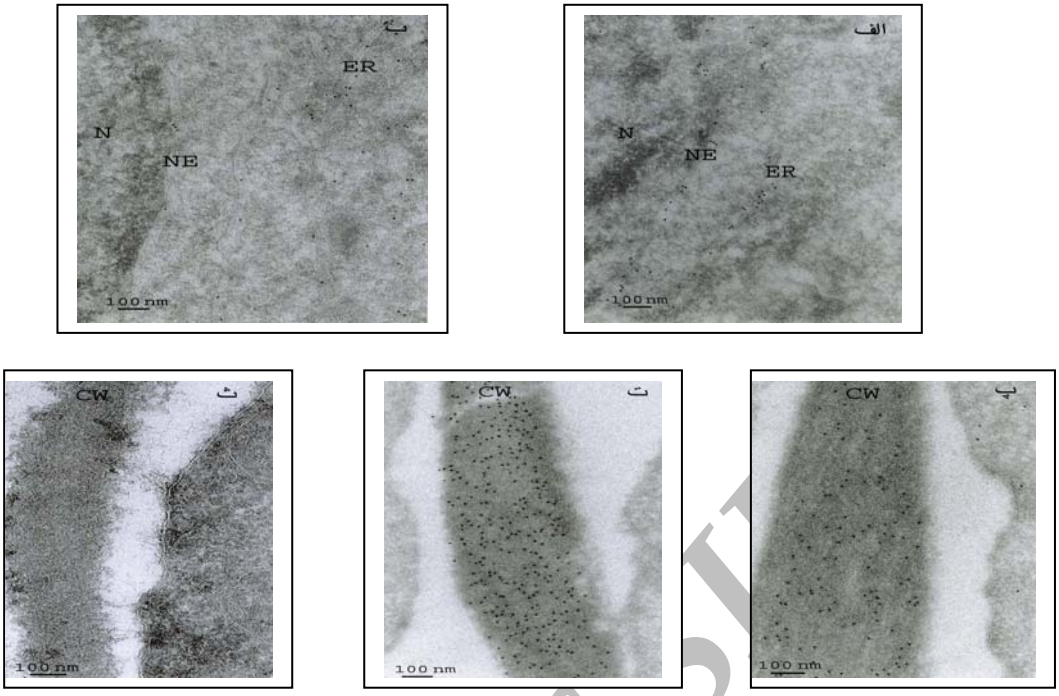
Archive of SID
www.SID.ir

روی صفحات ژلاتین ۲ درصد قرار گرفتند. پس از ذوب کردن ژلاتین در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نمونه‌ها در همین دما سه بار با محلول گلیسین ۲۰ mM شستشو داده شد. برای نشان‌دار کردن نمونه ها از آنتی‌بادی اولیه پلی کلونال تهیه شده بر علیه آلفا-آمیلاز جو در خوکچه هندی با غلظت ۱:۲۰۰، آنتی‌بادی اولیه پلی کلونال تهیه شده بر علیه کالرتیکولین کرچک در خوکچه هندی با غلظت ۱:۲۰۰، آنتی‌بادی اولیه پلی کلونال تهیه شده بر علیه بیپ(BiP: Binding Protein) توتون در خوکچه هندی با غلظت۱:۱۰۰، در بافرPBS استفاده گردید. آنتی‌بادیهای ثانویه متصل به ذرات کلوئیدی طلای ۱۰ نانومتری از کمپانی بیوسل تهیه و با غلظت ۱:۳۰ در بافرPBS مورد استفاده قرار گرفت. برشها پس از نشان دار کردن بمدت ۵ دقیقه با محلول ۲ درصد w/v اورانیل استات (pH٤ =) در اسید اگزالیک ۱۵۰ میلی مول تیمار شد و در نهایت با استفاده از محلول ۰/٤ درصد w/v اورانیل استات (pH=4) و ۱/۸ درصد w/v متیل سلولز لایه‌ای نازک بر روی نمونه‌ها کشیده شد. پس از خشک شدن نمونه‌ها در دمای آزمایشگاه مشاهده آنها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی Phillips CM10 ، تحت 80 kV انجام گرفت.

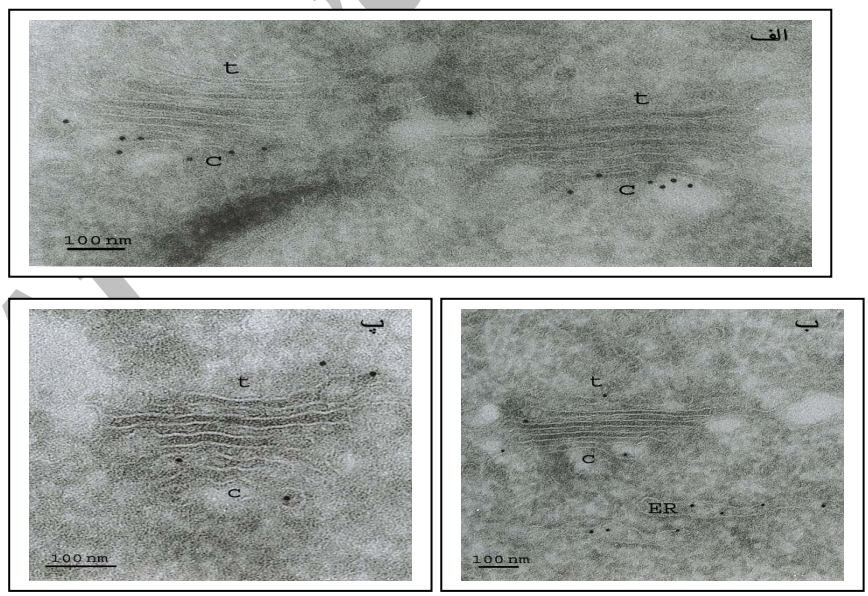
نتایج

نشان‌دار کردن ایمنوسیتوشیمیایی برشهای انجمادی ریشه توتونهای تراریخت با آنتی بادی آلفا-آمیلاز بمنظور مشخص کردن مسیر انتقال این پروتئین ترشحی در درون سلول و کارآیی تراپپتید نشانه HDEL بعنوان توالی نگهداری پروتئینها در شبکه آندوپلاسمی سلولهای تراریخت انجام پذیرفت. با تهیه اولین میکروگرافها مشخص شد که در هر دو نوع گیاه تراریخت مورد مطالعه آنزیم آلفا-آمیلاز در پوشش هسته، شبکه آندوپلاسمی، دستگاه گلژی و دیواره سلولی قابل شناسایی است (شکل ۱- الف تا ۱-ت). استفاده از گیاهان وحشی بعنوان شاهد مشخص کرد که اتصال آنتی بادی اولیه به آلفا-آمیلاز کاملاً اختصاصی است و نشانهای طلا در بخشهای ذکر شده در سلولهای وحشی وجود ندارد (شکل ۱-ث). در مطالعه مسیر ترشحی سلولهای تراریخت یک تفاوت مهم میان دو نوع گیاه مورد استفاده، مشخص گردید. با اینکه در سلولهای گیاهان دارای ژن HDEL- آلفا- آمیلاز نشانها اغلب در بخش نزدیک یا سیس اجسام گلژی دیده می‌شدند (شکل ۲-الف)، اما تمام ساکولهای گلژی سلولهای گیاهان دارای ژن آلفا – آمیلاز، تقریباً بطور یکنواخت در هر دو نیمه سیس و ترانس نشاندار شدند (شکل۲- ب و۲-پ). بمنظور مقایسه دقیق موقعیت مولکولهای آنتی‌ژن مورد مطالعه، در هر دو گیاه تراریخت توتون، بطور تصادفی سی جسم گلژی انتخاب و ذرات طلا در دو نیمه نزدیک و دور آنها شمارش شد. این بررسی کمی، مشاهدات قبلی را تأیید نمود. گرچه در سلولهای گیاهان دارای ژن آلفا-آمیلاز توزیع ذرات طلا در دو نیمه اجسام گلژی تقریبا یکسان بود، اما در سلولهای گیاهان دارای ژن HDEL- آلفا- آمیلاز قریب ۹۰ درصد ذرات طلای متصل به آنتی‌بادی ثانویه در نیمه نزدیک و فقط حدود ۱۰ درصد در نیمه دور دیده می‌شد (جدول ۱). بنابراین بخش عمده‌ای از مولکولهای HDEL- آلفا- آمیلاز بدلیل داشتن پپتید نشانه، اجازه عبور از بخش سیس اجسام گلژی را در مسیر حرکت به سمت اندامکها و غشای پلاسمایی نمی‌یابند و احتمالا به سمت شبکه آندوپلاسمی بازگردانده می‌شوند. از طرف دیگر تشخیص مقدار کمی از مولکولهای آلفا- آمیلاز در سطح دور اجسام گلژی نشان دهنده این مطلب است که توالی نشانه HDEL نمی‌تواند عبور این آنزیم را بطور کامل مهار نماید (شکل۲، جدول ۱). این مطلب با مشاهده ذرات طلا در دیواره های سلولی گیاهان دارای ژن HDEL- آلفا- آمیلاز، تأیید می‌گردد. بعبارت دیگر در این گروه از گیاهان همانند گروه دارای ژن آلفا- آمیلاز ترشح آنزیم وجود دارد.

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۱: برشهای انجمادی سلولهای ریشه گیاهان تراریخت و وحشی نشاندار شده با آنتی‌بادی آلفا- آمیلاز: الف و ب) بترتیب سلولهای دارای ژن HDEL- آلفا- آمیلاز و آلفا- آمیلاز که پوشش هسته و شبکه آندوپلاسمی آنها بطور مشخص نشان‌دار شده است، پ) ذرات طلا با تراکم کم در دیواره سلولی سلولهای تراریخت تولید کننده HDEL- آلفا- آمیلاز، ت) ذرات طلا با تراکم زیاد در دیواره سلولی سلولهای تراریخت تولید کننده آلفا- آمیلاز، ث) سیتوپلاسم و دیواره سلولی سلولهای وحشی بعنوان شاهد که فاقد نشان می‌باشند. N: هسته، NE: پوشش هسته، ER: شبکه آندوپلاسمی، CW: دیواره سلولی.



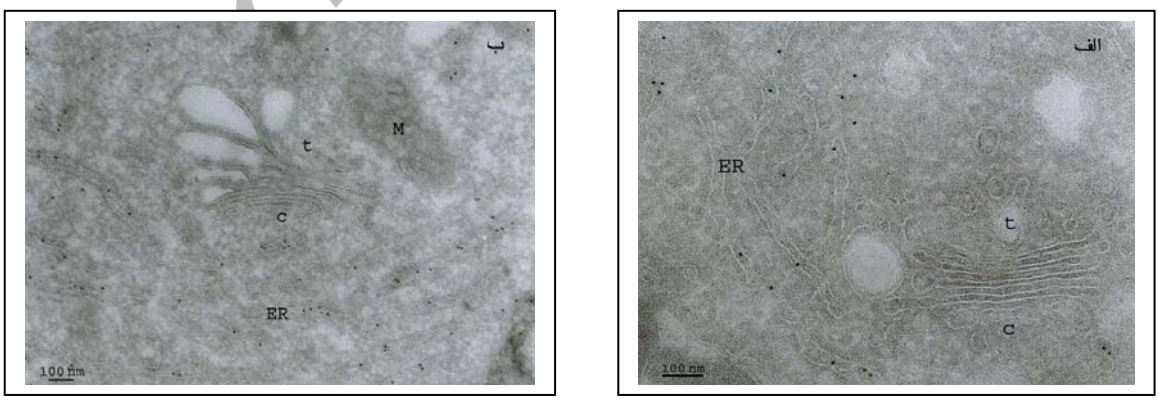
شکل ۲- نشان‌های طلا در اجسام گلژی سلولهای ریشه گیاهان تراریخت دارای ژن HDEL- آلفا- آمیلاز (الف) در سلولهای گیاهان دارای ژن آلفا- آمیلاز (ب و پ). در سلولهای گیاهان تولید کننده HDEL- آلفا- آمیلاز که مولکولهای آنزیم عمدتاً در بخش سیس تجمع دارند، اما در سلولهای تولید کننده آلفا- آمیلاز مولکولهای آنتی‌ژن بطور یکنواخت در میان ساکولها پراکنده‌اند. ER: شبکه آندوپلاسمی، c: سطح سیس، t: سطح ترانس.

www.SID.ir

جدول ۱: پراکندگی نشانهای طلای بدست آمده با استفاده ازآنتی‌بادی آلفا- آمیلاز در اجسام گلژی سلولهای تراریخت توتون. در سلولهای تولید کننده آلفا- آمیلاز نشانها در هر دو نیمه بطور نسبتاً یکسان توزیع شده‌اند، در حالیکه وجود توالی HDEL مانع از حضور آنزیم در نیمه ترانس گردیده است.

نوع ژن انتقال یافته به سلولها	تعداد اجسام گلژی مورد مطالعه	تعداد نشانهای طلا در دو بخش اجسام گلژی		تعداد کل نشانهای طلا	تعداد متوسط نشانها در هر جسم گلژی
		نیمه سیس	نیمه ترانس		
آلفا- آمیلاز	۳۰	٦٨ (٪٤٨/٢)	٧٣ (٪٥١/٨)	١٤١	٤/٧٠
HDEL- آلفا- آمیلاز	۳۰	۹۹ (٪۹۰/۸)	۱۰ (٪۹/۲)	۱۰۹	۳/٦۳

بمنظور مقایسه نتایج بدست آمده با عملکرد پپتید نشانه HDEL در سلولهای غیرتراریخت، وضعیت انتقال دو پروتئین چاپرون شناخته شده شبکه آندوپلاسمی یعنی کالرتیکولین و بیپ (BiP) نیز با استفاده از نشان‌دار کردن ایمنوسیتوشیمیایی سلولهای وحشی بررسی گردید. این دو رتیکلوپلاسمین برای جلوگیری از انتقال در مسیر ترشحی، بطور طبیعی دارای تراپپتید نشانه HDEL می‌باشند. در میکروگرافهای تهیه شده هر دو چاپرون مورد مطالعه بوضوح و بطور کاملا اختصاصی فقط در شبکه آندوپلاسمی قابل تشخیص بودند و در دستگاه گلژی هیچ نشانی از آنها وجود نداشت (شکل ۳). این نتایج متفاوت بودن رفتار پروتئینها را در مسیر ترشحی سلولهای تراریخت و وحشی مورد مطالعه مشخص نمود.



شکل ۳: نشان‌دار کردن ایمنی‌شناختی برشهای انجمادی سلولهای ریشه گیاهان وحشی با استفاده از آنتی‌بادیهای تهیه شده بر علیه بیپ (الف) و کالرتیکولین (ب) موقعیت این پروتئینها را بطور مشخص در شبکه آندوپلاسمی نشان می‌دهد. هر دو رتیکلوپلاسمین در دیکتیوزومها غیر قابل شناسایی هستند.. ER: شبکه آندوپلاسمی، M: میتوکندری، c: سطح سیس، t: سطح ترانس.

www.SID.ir

بحث

پس از شناسایی توالیK/HDEL بعنوان پپتید نگهداری در انتهای کربوکسی پروتئینهای مقیم ER، سویه‌های سلولی تراریخت با ژنهای مسئول تولید پروتئینهای ترشحی برای شناسایی نحوه عمل این توالی تتراپپتیدی طراحی گردید. با تولید سلولهای تراریخت توتون با ژن تولید آلفا- آمیلاز نشان داده شد که این آنزیم همانند سایر پروتینهای ترشحی در ER تولید شده و پس از عبور از دستگاه گلژی از طریق غشای پلاسمایی ترشح می‌شود و در نتیجه فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز در محیطهای کشت دارای سلولهای تراریخت قابل سنجش می‌باشد (۱ و ۱۱). انتظار بر این بود که اتصال تتراپپتید HDEL به انتهای کربوکسی آنزیم مورد مطالعه ترشح آنرا به محیط کشت متوقف نماید. اما بررسی محیطهای کشت تعلیقی حاوی سلولهای تراریخت با ژن HDEL- آلفا- آمیلاز نشان داد که فعالیت آلفا- آمیلاز در محیطهای کشت این سلولها نیز قابل تشخیص است و وجود توالی نگهداری HDEL نمی‌تواند از ترشح این پروتئین ممانعت کند (۱۱). انجام این آزمایشها با انتقادات شدیدی همراه بود (۲) . از طرفی امکان خروج مولکولهای آنزیم از سلولهای مرده در محیطهای کشت وجود داشت که روشهای حساس ایمنی شناختی نظیر وسترن بلاتینگ قادر به تشخیص آنها بود و از طرف دیگر یک تیم تحقیقاتی دیگر با استفاده از روشهای بیوشیمیایی نشان داد که وجود توالی HDEL در انتهای کربوکسی آنزیم اینورتاز دیواره سلولی باعث محافظت و بازگشت آن به سمت ER می‌گردد (۹ و ۱۰). بعلاوه مطالعه رتیکلوپلاسمینهای دارای تتراپپتید HDEL، نظیر کالرتیکولین نشان داد که این مولکولها عمدتاً شبکه آندوپلاسمی را ترک نمی‌کنند، از اینرو تشخیص بیوشیمیایی آنها در دستگاه گلژی بسیار دشوار است (۹). بدلیل تناقضات موجود در نحوه عمل HDEL و فقدان مطالعات سلول‌شناختی در زمینه پروتئینهای سلولهای تراریخت، بکارگیری روشهای نوین ردیابی آنتی‌ژنها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی کاملا ضروری می‌نمود.

نتایج این پژوهش بطور مشخص نشان داد که تتراپپتید نشانه HDEL باعث ایجاد ممانعت نسبی در انتقال آلفا- آمیلاز از طریق دستگاه گلژی می‌گردد و بخش عمده‌ای از مولکولهای این آنزیم قادر به عبور از قطب سیس اجسام گلژی نیستند و احتمالاً به ER بازگردانده می‌شوند. همچنین وجود آلفا-آمیلاز در دیواره سلولی حاکی از ترشح بخشی از آن توسط سلولهای تراریخت با ژن HDEL- آلفا- آمیلاز می‌باشد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که در سلولهای تراریخت مورد مطالعه تتراپپتید HDEL نمی‌تواند نقش خود را بطور کامل ایفا کند. با توجه به اینکه در سلولهای تراریخت بدلیل وجود ژن خارجی غلظت پروتئینهای دارای توالی HDEL بیش از سلولهای وحشی است، یکی از دلایل امر می‌تواند اشباع پذیرنده‌های توالی HDEL در وزیکولهای کوپI باشد. بعبارت دیگر برخی از مولکولهای دارای نشانه نگهداری، بعلت غلظت زیاد پروتئین نمی‌توانند به پذیرنده‌های اختصاصی خود متصل شوند و در نتیجه با بلوغ سیسترنال و وزیکولهای انتقالی از دستگاه گلژی عبور کرده، به سمت غشای پلاسمایی منتقل و ترشح می‌شوند. ترشح چاپرونهای شبکه آندوپلاسمی در زمان بیان بیش از حد معمول ژنها و در نتیجه افزایش در مقدار تولید پروتئین در سلول، نیز قبلا گزارش شده است که با این نتیجه‌گیری همسویی دارد (۱). بررسی رفتار انتقال دو پروتئین کالرتیکولین و بیپ نیز نشان داد که خروج این پروتئینها از شبکه آندوپلاسمی در سلولهای وحشی حتی با روش حساس برشگیری انجمادی قابل تشخیص نیست و از اینرو در صورت وجود می‌تواند فقط به مقدار بسیار ناچیز صورت بگیرد. این نتیجه برخی یافته‌های قبلی را در مورد خروج جزئی کالرتیکولین از شبکه آندوپلاسمی تأیید می‌کند (۹). بنابراین علت نتایج متفاوت بدست آمده توسط گروههای تحقیقاتی مختلف که با استفاده از سلولهای

Archive of SID
www.SID.ir

وحشی و تراریخت بدست آمده است، با توجه به غلظت پروتئینهای تولید شده قابل توجیه می‌باشد.

در کل می‌توان نتیجه گرفت که انتقال پروتئینها در مسیر ترشحی تا حد زیادی به غلظت آنها وابسته است. مشاهدات مربوط به سلولهای تراریخت گرچه اطلاعات قابل ملاحظه‌ای را در این زمینه فراهم می‌نماید، اما با بالارفتن مقدار پروتئینهای تولید شده در سلول مکانیسمهای کنترل انتقال دچار مشکل شده و در نتیجه نمی‌توانند بطور کامل همانند شرایط طبیعی عمل کنند. بنابراین نتایج بدست آمده فقط در شرایطی قابل تعمیم می‌باشند که در سلولهای وحشی نیز در شرایط طبیعی مورد تأیید قرار گیرند.

منابع

1- Crofts, A.J., LeborgneCastel, N., Hillmer, S., Robinson, D.G., Phillipson, B., Carlsson, L., Ashford, D.A., and Denecke, J., (1999). Saturation of the endoplasmic reticulum retention machinery reveals anterograde bulk flow. Plant Cell 11: 2233-2248

2- Gomord, V., and Faye, L., (2000). Glycobiology and the Plant Cell—A World of Information Plant Cell 12: 1519-1521

3- Hanton, S.L., Renna, L., Bortolotti, L.E., Chatre, L., Stefano, G., and Brandizzi, F., (2005). Diacidic motives influence the export of transmembrane proteins from the endoplasmic reticulum in plant cells. Plant Cell 17: 3081-3093

4- Lee, M.C., Miller, E.A., Goldberg, J., Orci, L., and Schekman, R., (2004). Bi-directional protein transport between the ER and Golgi. Annual Review of Cell Developmental Biology 20: 87-123

5- Lord, J.M., and Roberts, L.M., (1997). Retrograde transport: Going against the flow. Curr. Biol. 8: 56–58

6-Malkus, P., Jiang, F., and Schekman, R., (2002). Concentrative sorting of secretory cargo proteins into COPII-coated vesicles. Journal of Cell Biology 159: 915-921

7- Orci, L., Stamnes, M., Ravazzola, M., Amherdt, M., Perrelet, M., Sollner, T.H., Rothman, J.E., (1997). Bidirectional transport by distinct populations of COPI-coated vesicles. Cell 90: 335-349

8- Otte, S., and Barlowe, C., (2004). Sorting signals can direct receptor-mediated export of soluble proteins into COPII vesicles. Nat. Cell Biol. l 6: 1189-1194

9- Pagny, S., Cabanes-Macheteau, M., Gillikin, J.W., Leborgne-Castel, N., Lerouge, P., Boston, R.S., Faye, L., and Gomord, V., (2000). Protein recycling from the Golgi apparatus to the endoplasmic reticulum in plants and its minor contribution to calreticulin retention. Plant Cell 12: 355-739

10- Pagny, S., Denmat-Ouisse, L.A., Gomord, V., and Faye, L., (2003). Fusion with HDEL protects cell wall invertase from early degradation when N-glycosylation is inhibited. Plant Cell Physiology 44: 173-82

11- Phillipson, B.A., Pimpl, P., daSilva, L.L.P., Crofts, A.J., Taylor, J.P., Movafeghi, A., Robinson, D.G., and Denecke, J., (2001). Secretory bulk flow of soluble proteins is efficient and COPII dependent. Plant Cell 13: 2005-2020.

12- Pimpl, P., and Denecke, J., (2000). ER retention of soluble proteins: Retrieval, retention, or both? Plant Cell 12: 1517–1519

13- Pimpl, P., Movafeghi, A., Caughlan, S., Denecke, J., Hillmer, S., and Robinson, D.G., (2000). In situ localization and in Vitro induction of plant

COPI-coated vesicles. Plant Cell 12: 2219-2236

14- Sato, K., (2004). COPII coat assembly and selective export from the endoplasmic reticulum. Journal of Biochemistry 136: 755-760.

15-Tang, B.L, Wang, Y., Ong Y.S., Hong, W., (2005). COPII and exit from the endoplasmic reticulum. Biochimica Biophysica Acta 10: 293-303.

16- Votsmeier, C., and Gallwitz, D., (2001). An acidic sequence of a putative yeast Golgi membrane protein binds COPII and facilitates ER export. EMBO Journal 20: 6742-6750

Archive of SID

www.SID.ir

Study of the role of C-terminal HDEL signal sequence of proteins using immunogoldlabeling of transgenic and wild tobacco cells

Movafeghi A.

Plant Science Dept., Faculty of Natural Science, Tabriz University, Tabriz, I.R. of Iran.

Abstract

Without any doubt, the issue of ER export is far from settled and discussions have been ongoing for almost two decades. Two models are currently competing for general acceptance. One model describes ER export as a non-selective diffusion into anterograde ER-derived transport vesicles (bulk-flow). The second model postulates that proteins are actively selected and enriched during ER export (active transport). However, the retrieval of HDEL-tagged proteins from the Golgi complex is well established in different cells. The secretion of ER residents is very low, and the true level of ER export is masked by degradation in a post-ER. To overcome this problem, we used two transformed tobacco plants, which produce barley alpha-amylase and alpha-amylase-HDEL as soluble cargo molecules. Labeling using cryo-sectioning and alpha-amylase antibodies revealed that in both transgenic plant cells the secreted molecule was distributed in the ER, cisternae of the Golgi apparatus and cell wall. However, tagging alpha-amylase with HDEL led to predominant labeling of the *cis*- and *cis*-most cisternae. Occasional labeling of the compartments distal to the *cis*-Golgi in alpha-amylase-HDEL–producing plants indicated that saturation of ER retention may have occurred. In addition, both alpha-amylase and alpha-amylase-HDEL were detected in the cell wall, confirming that ER retention via HDEL tagging in the transformed cells was incomplete. Labeling of wild root cells with Calreticulin and Bip antibodies showed that this retrieval mechanism in plants has little impact on ER retention of soluble reticuloplasmins.

Key words: ER**,** Golgi complex, HDEL sequence, immunocytochemical labeling

Archive of SID

www.SID.ir