

کانال‌های آبی NtPIP1;1 و NtPIP2;1 توزیع مکانی متفاوتی در سلول‌های گیاه توتون دارند

مجید مهدیه Ph.D.

دانشگاه اراک، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، کد پستی ۳۸۱۵۶-۸-۸۳۴۹
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: m-mahdiyeh@araku.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۹/۲۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱۰/۹

چکیده

هدف: حرکت آب از عرض غشاهای سلولی با حضور پروتئین‌هایی بنام کانال آبی یا آکوپورین تسهیل می‌شود. کانال‌های آبی غشاپلاسمایی گیاهان به دو گروه PIP1s و PIP2s تقسیم می‌شوند که فعالیت انتقال آب متفاوتی را نشان می‌دهند به طوری که PIP1s غیرفعال بوده، در حالیکه PIP2s افزایش قابل توجهی را در ضریب نفوذپذیری آبی اسموتیک غشاء (P_f) موجب می‌شود. این تفاوت در فعالیت انتقال آب آن‌ها می‌تواند ناشی از مکان متفاوت آن‌ها در سلول باشد. هدف از این تحقیق بررسی مکان درون سلولی دو کانال آبی NtPIP1;1 (عضو گروه PIP1s) و NtPIP2;1 (عضو گروه PIP2s) در سلول‌های زنده مزوفیل برگ گیاه توتون است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی توالی cDNA دو کانال آبی به توالی ژن کد کننده پروتئین فلورسانت سبز (GFP) متصل گردید و به طور موقتی در پروتوپلاست‌های تهیه شده از مزوفیل برگ توتون بیان شدند. سپس با استفاده از طول موج برانگیختگی نور آبی مکان درون سلولی این دو کانال آبی در زیر میکروسکوپ فلورسانس بررسی شد.

نتایج: نتایج نشان داد که NtPIP1;1 در ساختارهای غشایی داخل سلول باقی مانده در حالی که NtPIP2;1 به غشا پلاسمایی منتقل می‌شود. بیان همزمان وکتورهای حامل توالی *NtPIP1;1-GFP* و *HDEL-YFP* (نشانه‌گر شبکه اندوپلاسمی متصل به پروتئین با فلورسانس زرد) در پروتوپلاست‌ها نشان داد که NtPIP1;1 در مکان‌هایی مشابه با HDEL (لیزین-آسپارتیک اسید-گلوتامیک اسید-لوسین) در سلول قرار می‌گیرد.

نتیجه گیری: کانال آبی NtPIP2;1 به غشاء پلاسمایی سلول مستقر شده در حالی که NtPIP1;1 در داخل شبکه اندوپلاسمی باقی مانده و به غشا پلاسمایی منتقل نمی‌شود و به همین دلیل فاقد فعالیت انتقال آب است.

واژگان کلیدی: آکوپورین، پروتئین فلورسانت سبز، پروتئین فلورسانت زرد، توتون، کانال آبی

مقدمه

حرکت آب از عرض غشاهای سلولی در اثر حضور کانال‌های آبی به نام آکوپورین‌ها (AQPs) تسهیل می‌شود. این پروتئین‌ها مرکب از شش دومین طی کننده‌ی عرض غشا بوده که توسط ۵ لوپ به یکدیگر متصل شده‌اند بطوری که N و C ترمینال آن‌ها در داخل سیتوسول قرار دارد (۱ و ۲).

آکوپورین‌های گیاهی تنوع ایزوفرمی قابل توجهی را نشان می‌دهند. تعیین توالی ژنوم، تعداد دقیق ژن‌های آکوپورین را تا مرز ۳۵ عدد در گیاه آرابیدوپسیس (۲ و ۳) و ۳۳ عدد در گیاه ذرت (۱ و ۴) تعیین نموده است. بر پایه‌ی شباهت توالی، آکوپورین‌های گیاهی به ۴ زیر گروه که تا حدودی مطابق با مکان آن‌ها در سلول است تقسیم می‌شوند (۱، ۲ و ۵). پروتئین‌های نوع تونوپلاستی (TIPs) و نوع غشا پلاسمایی (PIPs) آکوپورین‌هایی هستند که به ترتیب در غشاهای واکوئلی و پلاسمایی به وفور بیان می‌شوند. سومین زیر گروه شامل پروتئین‌های غشایی شبه نودولین ۲۶ (NIPs) هستند. به عبارتی این زیر گروه همولوگ‌های نزدیک به GmNod26 (آکوپورین فراوان در غشا پری‌باکترئید گرک‌های تثبیت کننده‌ی ازت در ریشه‌های سویا) می‌باشند. NIPs در غیرلگوم‌ها نیز وجود دارند و در این گیاهان در غشاهای پلاسمایی و درون سلولی قرار گرفته‌اند (۲). زیر گروه آخر پروتئین‌های بازی کوچک (SIPs) بوده که غالباً در شبکه‌ی آندوپلاسمی قرار دارند (۲).

آکوپورین‌های غشا پلاسمایی یا PIPs خود به دو گروه فیلوژنتیکی PIP1 و PIP2 تقسیم می‌شوند. اعضای این دو گروه نه تنها از لحاظ طول N و C ترمینال خود متفاوت می‌باشند بلکه فعالیت کانال آب متفاوتی را هنگام بیان در اووسیت‌های زنوپوس نشان می‌دهند (۶). درحالی‌که PIP1s عموماً در این میزبان هترولوگ خاموش می‌باشند، PIP2s فعالیت کانال آب بالایی را نشان می‌دهند. مطالعات دقیق‌تر بر روی مکان درون سلولی آکوپورین‌های نوع PIP1 و PIP2 در پروتوپلاست‌های مزوفیل گیاه ذرت نشان می‌دهد که دلیل پائین بودن فعالیت انتقال آب در آکوپورین‌های نوع PIP1 به خاطر باقی ماندن این آکوپورین‌ها در داخل شبکه آندوپلاسمی و در نتیجه عدم انتقال آن‌ها به داخل غشا پلاسمایی سلول‌های گیاهی می‌باشد (۷). قبلاً ما نشان دادیم که آکوپورین NtPIP1;1 گیاه توتون هنگام بیان در اووسیت‌های زنوپوس، به مقدار زیاد در داخل سیتوپلاسم

اووسیت باقی مانده و کمتر به غشا مهاجرت می‌کند (۸). برای مطالعه دقیق‌تر این مطلب، در این تحقیق محل درون سلولی NtPIP1;1 و NtPIP2;1 در داخل سلول‌های زنده مزوفیل گیاه توتون با استفاده از مارکرهای غشایی مختلف مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه گیاه: گیاه توتون (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun) در شرایط آزمایشگاهی در اتاقک رشد در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد با رژیم نوری ۱۶ ساعت روشنایی ۸ ساعت تاریکی با شدت نور ۱۵۰ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه بر روی محیط کشت جامد موراشیک و اسکوگ (MS) (۹) با قدرت نصف (۰/۸ درصد آگار) حاوی ۱ درصد سوکروز و ۵ میلی‌مولار MES-KOH، pH برابر ۵/۵ به مدت ۳ الی ۴ هفته به منظور تهیه پروتوپلاست رشد داده شد (۸).

اتصال پروتئین فلورسانت سبز (Green Fluorescent Protein, GFP) به C یا N-ترمینال پروتئین آکوپورین: کلیه مراحل مولکولی طبق روش Sambrook و همکاران (۱۰) انجام گرفت. برای اتصال GFP به C-ترمینال آکوپورین‌های NtPIP1;1 و NtPIP2;1، ابتدا cDNA مربوط به آن‌ها توسط PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی جهت اتصال سایت‌های با اثر محدود XhoI و SpeI به ترتیب در انتهای ۵' و ۳' آن‌ها تکثیر شدند. توالی پرایمرها در جدول ۱ ارائه شده است (۸).

محصولات تکثیر برای اطمینان از عدم وجود خطا در توالی پروتئین، در وکتور TOPO کلون و توالی آن‌ها توسط دستگاه توالی‌یاب DNA طبق روش Sanger و همکاران (۱۱) تعیین گردید.

برای اتصال GFP به N-ترمینال آکوپورین‌های فوق، از پرایمرهای اختصاصی جهت اتصال سایت‌های با اثر محدود BamHI و XbaI به ترتیب در انتهای ۳' و ۵' cDNA NtPIP1;1 و NtPIP2;1 استفاده شد. توالی پرایمرها در جدول ۲ ارائه شده است.

قرار دادن cDNA NtPIP1;1 و NtPIP2;1 در کاست بیانی
GFP-JFH: وکتور به کار رفته برای بیان موقتی در پروتوپلاست‌های مزوفیل تنباکو عبارت بود از pUC19 که حاوی کاست بیانی GFP-JFH-1 می‌باشد. شکل ۱ محل آنزیم‌های با

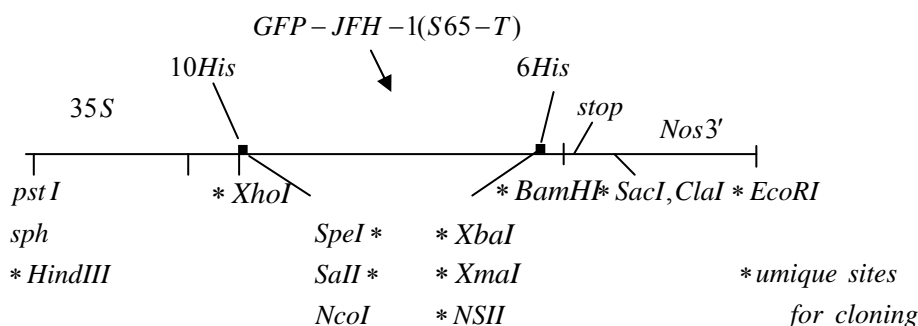
اثر محدود جهت کلون سازی در این کاست بیانی را نشان می‌دهد. این کاست دارای پروموتور قوی 35S از ویروس موزائیک گل کم (CaMV 35S) و خاتمه دهنده‌ی رونویسی نوپالین سنتاز (NOS) از آگروباکتریوم می‌باشد (۱۲). برای اتصال GFP به C-ترمینال یا N-ترمینال آکوپورین‌های NtPIP1;1 و NtPIP2;1، ابتدا کلون‌های cDNA *NtPIP1;1* یا *NtPIP2;1* همراه با وکتور بیانی فوق در معرض هضم آنزیمی مضاعف قرار گرفتند (۱۰).

جدول ۱: توالی پرایمرهای به کار رفته جهت اتصال سایت‌های *XhoI* و *SpeI* به cDNA آکوپورین

ژن	توالی پرایمرهای جلویی (Fw) و معکوس (Rv)	دمای ذوب (°C)
NtPIP1;1	Fw: 5' CGCTCGAGATGGCAGAAAACAAAGAAG 3' XhoI	۶۲
	Rv: 5' CGACTAGTGTCTTGAATGGAATGGC3' SpeI	۶۲/۱
NtPIP2;1	Fw: 5' CGCTCGAGATGTCAAAGGACGTGATTG 3' XhoI	۶۳/۵
	Rv: 5' CGACTAGT GTTGGTTGGTTACTGCG 3' SpeI	۶۳/۶

جدول ۲: توالی پرایمرهای به کار رفته جهت اتصال سایت‌های *XbaI* و *BamHI* به cDNA آکوپورین (۸).

ژن	توالی پرایمرهای جلویی (Fw) و معکوس (Rv)	دمای ذوب (°C)
NtPIP1;1	Fw: 5' CGTCTAGAATGGCAGAAAACAAAGAAG 3' XbaI	۶۱/۹
	Rv: 5' CGGGATCCTTAGCTCTTGAATGGAATG 3' BamHI	۶۲
NtPIP2;1	Fw: 5' CGTCTAGAATGTCAAAGGACGTGATTC 3' XbaI	۶۳/۴
	Rv: 5' CGGGATCCTTAGTTGGTTGGTTACTG 3' BamHI	۶۳/۴



شکل ۱: نقشه‌ی کاست بیانی *GFP-JFH-I* (۱۲).

واکنش اتصال با استفاده از کیت Ligation High (شرکت TOYOBO، ژاپن) در طول شب در دمای ۱۶ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. سپس محصول واکنش اتصال به باکتری سوش JIM109 با استفاده از شوک حرارتی منتقل شد و انتخاب باکترهای ترانسفرم شده بر روی پلیت‌های LB حاوی ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین انجام شد (۱۰). بعد از تایید حضور ژن در وکتور توسط کلنی PCR و هضم

بعد از انجام الکتروفورز ژل آگارز ۲ درصد، باندهای با اندازه‌ی مورد نظر از ژل بریده و توسط کیت استخراج از ژل (Qiagen)، DNA استخراج گردید. برای انجام واکنش اتصال از نسبت مولی ۳ به ۱ (insert:vector) و میزان ۱۰۰ نانوگرم وکتور استفاده شد. میزان insert بر حسب نانوگرم طبق رابطه زیر محاسبه شد:

$$X(\text{ng})\text{Insert} = \frac{V(\text{ng})\text{vector} \times \text{Insert}(\text{bp})}{\text{Vector}(\text{bp})} \times \text{molarratio}$$

آنالیز بیان *GFP*، *YFP* و *FM4-64* در پروتوپلاست‌های ترانسفرم شده توسط میکروسکوپ لیزری فلورسانس: تعیین محل زیر سلولی آکوپورین‌های متصل به *GFP*، پروتئین *HDEL* متصل به پروتئین فلورسانت زرد (*YFP*) و مارکر غشایی *FM4-64* (*Invitrogen*) در پروتوپلاست‌های توتون توسط میکروسکوپ *Biozero laser scanning* (لنزهای آبژکتیو 40، Bz-8000، شرکت KEYENCE، آژاکا، ژاپن) انجام شد. برای گرفتن فلورسانت *GFP*، طول موج برانگیختگی ۴۷۰ نانومتر و طول موج آشکارسازی ۵۳۵ نانومتر استفاده شدند. برای گرفتن فلورسانت *FM4-64* در پروتوپلاست‌هایی که *GFP-NtPIP2;1* یا *NtPIP2;1-GFP* را بیان می‌کنند، طول موج برانگیختگی ۵۴۰ نانومتر و طول موج آشکارسازی ۶۰۵ نانومتر استفاده شدند. برای گرفتن فلورسانت *YFP* در پروتوپلاست‌هایی که *GFP-NtPIP1;1* یا *NtPIP1;1-GFP* را همراه با *YFP:HDEL* بیان می‌کنند، از طول موج برانگیختگی ۵۱۴ نانومتر و طول موج آشکارسازی ۵۳۹-۵۹۰ نانومتر استفاده شد. تصاویر با نرم افزار *Biozero Analyzer* آنالیز شدند. نشان‌دار کردن غشاء پلاسمایی با *FM4-64* از طریق انکوبه کردن پروتوپلاست‌ها بر روی یخ به مدت ۱۰ دقیقه در محیط کشت تکمیل شده با ۵۰ میکرومولار *FM4-64* انجام گرفت (۱۲).

نتایج

به منظور تعیین توزیع آکوپورین‌های *NtPIP1;1* و *NtPIP2;1* در یک سلول گیاهی کامل، سازه‌ی ژنی حاوی اتصال قابل ترجمه میان هر یک از آکوپورین‌ها و پروتئین *GFP* توسط ترانسفرم کردن موقتی به واسطه‌ی *PEG* به داخل پروتوپلاست‌های مزوفیل برگ‌های توتون منتقل شدند و فلورسانت اختصاصی *GFP* رویت شد. *GFP* به *C*-ترمینال یا *N*-ترمینال آکوپورین‌های *NtPIP1;1* و *NtPIP2;1* برای اطمینان از عدم تداخل *GFP* با انتقال آکوپورین به غشا پلاسمایی متصل شد. محل زیر سلولی هر پروتئین *NtPIP* متصل به *GFP* در پروتوپلاست‌های ترانسفرم شده‌ی توتون با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس تعیین شد.

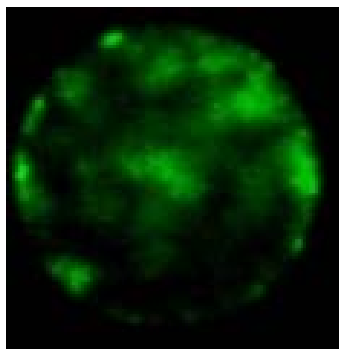
نتایج نشان داد سلول‌هایی که به طور موقتی *NtPIP2;1-GFP* (*GFP* متصل به *C*-ترمینال) یا *GFP-NtPIP2;1* (*GFP* متصل به *N*-ترمینال) را بیان می‌کنند فلورسانت سبز رنگ شدیدی (شکل ۲ b و d) را در غشاء پلاسمایی نسبت به کنترل

آنزیمی، کلنی‌های مثبت در محیط *LB* مایع تکثیر و پلاسمید نوترکیب توسط کیت *Miniprep Plasmid* (*BioRad*) استخراج گردید. از این پلاسمید جهت ترانسفرم کردن پروتوپلاست‌های مزوفیل توتون استفاده شد.

جداسازی پروتوپلاست مزوفیل برگ توتون: جداسازی پروتوپلاست‌های مزوفیل توتون مطابق روش *Hosy* و همکاران (۱۲) انجام شد. به طور خلاصه برگ‌های توتون به طول ۵ سانتی‌متر از گیاهان ۴ هفته‌ای رشد یافته در شرایط آزمایشگاهی در محیط *MS* با قدرت نصف تحت شرایط استریل برداشت شدند و سطح تحتانی آن‌ها با کاغذ سمباده ساییده شدند. سپس برگ‌ها در داخل پتری دیش‌های حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط هضم استریل *EF* به مدت ۱۹ ساعت در تاریکی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

بعد از هضم آنزیمی، قطعات هضم شده‌ی برگ‌های دور ریخته شدند و ۴ میلی‌لیتر محیط شناورسازی *MLO6* به داخل پتری دیش اضافه شد. سپس سوسپانسیون پروتوپلاست از خلال فیلتر نایلونی ۱۰۰ میکرونی فیلتر شد و با سرعت ۱۱۰g به مدت ۷ دقیقه سانتریفیوژ شد. پروتوپلاست‌های قرار گرفته در باند شناور در سطح لوله‌های سانتریفیوژ برداشت شدند و با ۴ حجم از محیط شستشو *W5* اتوکلاو شده رقیق شدند. سپس سلول‌ها در سرعت ۱۱۰g به مدت ۷ دقیقه رسوب داده شدند و رسوب در ۴۰ میلی‌لیتر و سپس ۲۰ میلی‌لیتر محلول مانیتول / *Mg* شستشو داده شد. در پایان، پروتوپلاست‌ها در محلول فوق در غلظت ۱۰^۶ سلول در میلی‌لیتر معلق شدند.

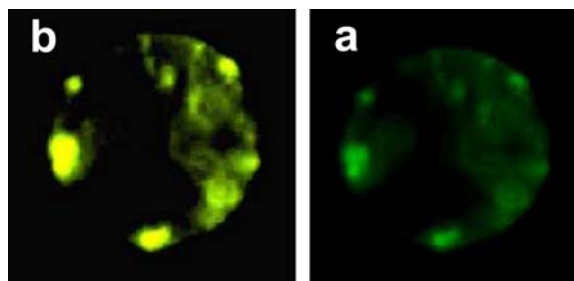
ترانسفرم کردن پروتوپلاست‌ها: در یک لوله اپندروف، ۱۵۰ میکرولیتر از پروتوپلاست‌های غلیظ شده و ۱۵۰ میکرولیتر محلول *PEG* به ۵ الی ۱۰ میکروگرم *DNA* پلاسمیدی مورد نظر اضافه شدند و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. سپس نمونه با ۸ میلی‌لیتر از محیط *K3M* استریل تکمیل شده با ۰/۴۵ مولار گلوکز رقیق شده و به مدت ۷ دقیقه در سرعت ۱۱۰g رسوب داده شدند (۱۲). سرانجام پروتوپلاست‌ها در ۳ میلی‌لیتر محیط *K3M* استریل معلق شده و به مدت ۱۶ الی ۲۴ ساعت در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد در تاریکی قبل از آنالیز انکوبه شدند (۱۲). برای بیان توام *NtPIP1;1-GFP* یا *NtPIP1;1-GFP-NtPIP1;1* با *YFP:HDEL* (مارکر شبکه آندوپلاسمی (۱۳)، هدیه از پروفیسور کریس هاوز از دانشگاه بروکس آکسفورد)، ۵ میکروگرم از هر یک از پلاسمیدها به طور همزمان با هم به پروتوپلاست‌ها انتقال داده شدند (۱۲).



شکل ۴: تعیین مکان درون سلولی NtPIP1;1 متصل به GFP در ناحیه N-ترمینال آکوپورین

برای شناسایی ساختارهای داخلی حاوی پروتئین‌های NtPIP1;1-GFP و یا GFP-NtPIP1;1، پروتئین YFP::HDEL (مارکر شبکه‌ی آندوپلاسمی متصل به پروتئین با فلورسانت زرد) (۱) در پروتوپلاست‌های توتون با هم بیان شدند.

همانگونه که در شکل ۵ (a) و (b) نشان داده شده، NtPIP1;1-GFP مکان درون سلولی مشابه با YFP::HDEL را نشان می‌دهد که ثابت می‌کند NtPIP1;1-GFP احتمالا در داخل شبکه آندوپلاسمی پروتوپلاست‌های توتون باقی می‌ماند.

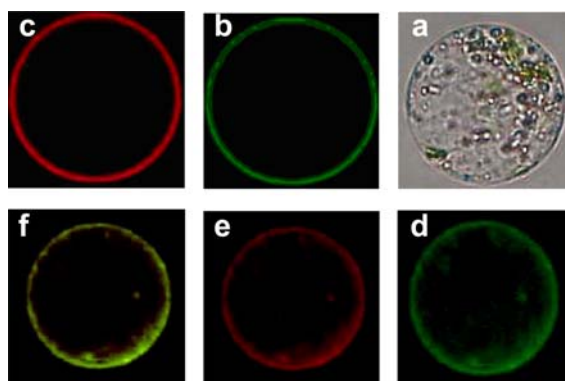


شکل ۵: بیان توام NtPIP1;1-GFP با مارکر شبکه آندوپلاسمی، YFP::HDEL (a) پروتوپلاست مزوفیل که NtPIP1;1-GFP را به طور موقت بیان می‌کند، همان پروتوپلاست که مارکر شبکه آندوپلاسمی را بیان می‌کند. (b)

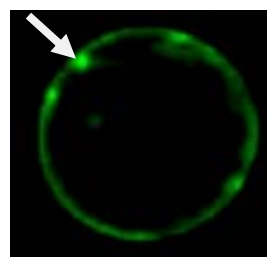
بحث

در گیاهان آکوپورین‌های غشا پلاسمایی یا PIPs به دو گروه وابسته از لحاظ توالی تقسیم می‌شوند: PIP1s و PIP2s. که اعضای آن‌ها نه تنها از لحاظ طول N و C ترمینال خود متفاوت هستند، بلکه فعالیت کانال آب متفاوتی را هنگام بیان در اووسیت‌های زنبوپس نشان می‌دهند (۶). درحالیکه PIP1s عموماً در این میزبان هترولوگ خاموش می‌باشند، PIP2s فعالیت کانال آب بالایی را نشان می‌دهند.

منفی (شکل ۲ a) نشان می‌دهند که توسط مارکر غشاء پلاسمایی FM4-64 تایید شد (شکل ۲ c و e فلورسانت قرمز). این نتیجه نشان می‌دهد که آکوپورین NtPIP2;1 در غشا پلاسمایی قرار می‌گیرد و اتصال GFP به C-ترمینال یا N-ترمینال این پروتئین تاثیری در هدف‌گیری آن به سمت غشا پلاسمایی ندارد. فلورسانت سبز رنگ حاصل از GFP-NtPIP2;1 یا NtPIP2;1-GFP بعضی مواقع در ساختارهای وزیکولی در مجاورت غشا پلاسمایی مشاهده می‌شوند (شکل ۳) که مربوط به پروتئین‌هایی هستند که در مسیر، از محل سنتزشان در داخل شبکه آندوپلاسمی به مکان استقرارشان در غشا پلاسمایی در حال گذر هستند (۷).



شکل ۲: تعیین مکان درون سلولی NtPIP2;1 متصل به پروتئین GFP (a) پروتوپلاست مزوفیل توتون در حالت زمینه روشن. (b) پروتوپلاست مزوفیل که NtPIP2;1-GFP را بیان می‌کند. (c) نشان دار کردن غشاء پلاسمایی پروتوپلاست مزوفیل در شکل (b) با مارکر اختصاصی غشاء پلاسمایی (FM4-64). (d) پروتوپلاست مزوفیل که NtPIP2;1-GFP را بیان می‌کند. (e) نشان دار کردن غشا پلاسمایی پروتوپلاست مزوفیل در شکل (d) با مارکر اختصاصی غشا پلاسمایی (FM4-64). (f) ادغام تصاویر (d) و (e).



شکل ۳: حضور آکوپورین NtPIP2;1 در ساختارهای وزیکولی (فلش) در مجاورت غشا.

بر خلاف NtPIP2;1، پروتئین‌های GFP-NtPIP1;1 یا NtPIP1;1-GFP در غشا پلاسمایی مشاهده نشدند، بلکه درون ساختارهای داخلی در اطراف هسته، سیتوسول و نزدیک غشا پلاسمایی وجود دارند (همانگونه که از فلورسانت سبز حاصل از آن‌ها مشخص می‌باشد) (شکل ۴).

تنظیم نفوذپذیری غشا فراهم می‌نمایند. ترکیب‌های مختلف هترومرهای PIP1-PIP2 در انواع سلولی خاص یا در پاسخ به علائم محیطی مختلف تا حد زیادی تنوع فعالیت کانال در غشاء را افزایش خواهند داد. این مکانیسم ممکن است با دیگر تغییرات پس از ترجمه‌ی آکوپورین‌های گیاهی از جمله فسفریلاسیون، پروتونه شدن، گلیکوزیلاسیون و متیلاسیون که باز و بسته شدن و جابه‌جایی کانال‌ها را در سلول کنترل می‌کنند، در ارتباط باشد. تحقیقات اخیر با استفاده از موتان‌های گیاه آرآیدوپسیس که در آکوپورین AtPIP1;2 نقص دارند نشان داد که هدایت آبی هیدرواستاتیک ریشه گیاه موتان بین ۲۰ تا ۳۰ درصد کاهش می‌یابد در حالی که هدایت آبی اسموتیک ریشه تغییری نمی‌کند (۱۴). این نتایج نشان می‌دهد که ترکیب ایزوفرم‌های مختلف آکوپورین در گیاه نقش مهمی در تعیین میزان هدایت آبی گیاه دارند (۱۴ و ۱۵).

آکوپورین‌های NtPIP1;1 و NtPIP2;1 در بخش‌های مختلف گیاه توتون از جمله ریشه، برگ، گل، بساک و مادگی بیان می‌شوند (۳)، ولی مکان دقیق آن‌ها در سلول و در گیاه کاملاً مشخص نیست. به هر حال با استناد به مطالعات انجام شده حاضر می‌توان بیان داشت که NtPIP1;1 در داخل شبکه‌ی آندوپلاسمی و NtPIP2;1 در داخل غشا پلاسمایی قرار گرفته ولی برهمکنش و ترکیب این دو آکوپورین می‌تواند موجب اصلاح قرارگیری NtPIP1;1 در غشا پلاسمایی شود. همچنین برای بررسی نقش دقیق این دو آکوپورین در توتون نیاز به انجام مطالعات بر روی گیاهان موتان است که در حال حاضر موتانی که در هر یک از این آکوپورین‌ها نقص داشته باشد برای گیاه توتون موجود نیست.

نتیجه‌گیری

از مشاهدات میکروسکوپی بر روی پروتوپلاست‌هایی که پروتئین کانال آبی متصل به GFP را بطور موقت بیان می‌کنند می‌توان چنین نتیجه گرفت که کانال آبی NtPIP2;1 در غشا پلاسمایی سلول مستقر شده در حالیکه NtPIP1;1 در داخل شبکه آندوپلاسمی باقی مانده و به غشا پلاسمایی منتقل نمی‌شود و به همین دلیل فاقد فعالیت انتقال آب است.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه اراک انجام شد. بدین وسیله از معاونت محترم پژوهش و فناوری آن دانشگاه کمال تشکر به عمل می‌آید.

مطالعات قبلی ما نشان داد هنگامی که NtPIP1;1 در اووسیت‌های *Xenopus* بیان شود فاقد فعالیت کانال آبی می‌باشد، در حالی که NtPIP2;1 فعالیت انتقال آب بالایی را در این سیستم نشان می‌دهد (۸). بعلاوه مشاهده شد که NtPIP1;1 متصل به GFP، سیگنال سبز ضعیفی را در غشا اووسیت تولید می‌کند، در حالی که هنگام بیان توام با NtPIP2;1، نه تنها میزان NtPIP1;1 در غشا پلاسمایی افزایش یافته (شدت سیگنال سبز در غشا افزایش می‌یابد)، بلکه نفوذپذیری آبی اسموتیک غشا نیز افزایش می‌یابد (۸). اینطور به نظر می‌رسد که NtPIP1;1 به این دلیل فاقد فعالیت کانال آبی است که در غشا پلاسمایی قرار نمی‌گیرد. در تایید این مطلب ما نشان دادیم هنگامی که NtPIP1;1 متصل به GFP در پروتوپلاست‌های مزوفیل توتون به طور موقت بیان شود، این آکوپورین به غشا پلاسمایی منتقل نشده (شکل ۴) و در داخل شبکه‌ی آندوپلاسمی باقی می‌ماند (شکل ۵). اضافه کردن فلوروکروم GFP به NtPIP1;1 با حرکت آن در سلول تداخل نمی‌کند، زیرا هنگامی که GFP به C ترمینال یا N ترمینال NtPIP1;1 اضافه می‌شود در هر دو حالت، NtPIP1;1 در شبکه‌ی آندوپلاسمی باقی می‌ماند. بر خلاف NtPIP1;1، آکوپورین NtPIP2;1 در غشا پلاسمایی قرار می‌گیرد (شکل ۲).

Zelazny و همکارانش (۷) نیز نشان دادند که تمام ایزوفرم‌های ZmPIP1 ذرت مورد مطالعه نظیر ZmPIP1;1، ZmPIP1;2 و ZmPIP1;6 متصل به mCFP یا mYFP، هنگامی که در پروتوپلاست‌های مزوفیل ذرت بیان شوند، در داخل شبکه‌ی آندوپلاسمی باقی می‌مانند و مکانیسم حفاظت شده‌ای را برای باقی ماندن در ER نشان می‌دهند. این مکان یابی می‌تواند به علت حضور سیگنال‌های حبس در ER، نبود سیگنال‌های خروج و یا نیاز به اجتماع قبلی پروتئین باشد. از طرفی بیان توام ZmPIP1s با ZmPIP2s متصل به YFP و یا CFP، منجر به اصلاح قرار گرفتن ZmPIP1s در غشا پلاسمایی می‌شود. با استفاده از تکنیک تصویربرداری میکروسکوپی FRET/Fluorescence life-time، این محققین نشان دادند که این تغییر مکان ZmPIP1s از شبکه‌ی آندوپلاسمی به غشا پلاسمایی نتیجه‌ای از برهم‌کنش میان ZmPIP1s و ZmPIP2s می‌باشد. این داده‌ها پیشنهاد می‌کنند که برهم‌کنش PIP1-PIP2 برای حرکت PIP1 به غشا پلاسمایی جهت تعدیل نفوذپذیری غشا پلاسمایی در گیاهان نیاز می‌باشند. این برهم‌کنش‌ها، برای سلول‌ها یک مکانیسم اضافی را جهت

13. Batoko H, Zheng HQ, Hawes C, Moore I. A Rab1 GTPase is required for transport between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus and for normal Golgi movement in plants. *Plant Cell* 2000; 12(11): 2201-2218.
14. Postaire O, Tournaire-Roux C, Grondin A, Boursiac Y, et al. A PIP1 Aquaporin Contributes to Hydrostatic Pressure-Induced Water Transport in Both the Root and Rosette of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 2010; 152(3): 1418-1430.
15. Alexandersson E, Danielson J, Rade J, Moparthy VK, et al. Transcriptional regulation of aquaporins in accessions of *Arabidopsis* in response to drought stress. *Plant J.* 2010; 61: 650-660.

منابع

1. Chaumont F, Barrieu F, Wojcik E, Chrispeels MJ, et al. Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize. *Plant Physiol.* 2001; 125: 1206-1215.
2. Johanson U, Gustavsson S. A new subfamily of major intrinsic proteins in plants. *Mol. Biol. Evol.* 2002; 19(4): 456-461.
3. Johanson U, Karlsson M, Johansson I, Gustavsson S, et al. The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in *Arabidopsis* provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants. *Plant Physiol.* 2001; 126(4): 1358-1369.
4. Chaumont F, Barrieu F, Jung R, Chrispeels MJ. Plasma membrane intrinsic proteins from maize cluster in two sequence subgroups with differential aquaporin activity. *Plant Physiol.* 2000; 122: 1025-1034.
5. Luu DT, Maurel C. Aquaporins in a challenging environment: molecular gears for adjusting plant water status. *Plant, Cell Environ.* 2005; 28: 85-96.
6. Fetter K, Van Wilder V, Moshelion M, Chaumont F. Interactions between plasma membrane aquaporins modulate their water channel activity. *Plant Cell* 2004; 16(1): 215-228.
7. Zelazny E, Borst JW, Muylaert M, Batoko H, et al. FRET imaging in living maize cells reveals that plasma membrane aquaporins interact to regulate their subcellular localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2007; 104: 12359-12364.
8. Mahdiah M, Mostajeran A, Horie T, Katsuhara M. Drought stress alters water relations and expression of PIP-type aquaporin genes in *Nicotiana tabacum* plants. *Plant Cell Physiol.* 2008; 49: 801-813.
9. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol.* 1962; 15: 473-479.
10. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1999.
11. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1977; 74(12):5463-5467.
12. Hosy E, Duby G, Very AA, Costa A, et al. A procedure for localization and electrophysiological characterization of ion channels heterologously expressed in a plant context. *Plant Method.* 2005; 1:1-14.

NtPIP1;1 and NtPIP2;1 Aquaporins have Different Localization in *Nicotiana tabacum* Cells

Mahdiyeh M. Ph.D.

Department of Biology, Faculty of Sciences, Arak University, Arak 38156-8-8349, Iran.

* Email corresponding author: m-mahdiyeh@araku.ac.ir

Received: 30 Dec. 2011

Accepted: 11 Dec. 2012

Abstract

Aim: Movement of water across cellular membranes is facilitated by the presence of water channels named aquaporins. Plant plasma membrane intrinsic proteins (PIPs) fall into two groups, PIP1s and PIP2s that exhibit different water channel activities. So PIP1s are inactive, whereas PIP2s induce a marked increase in the membrane osmotic water permeability coefficient, P_f . This difference may be due to their subcellular localization. The aim of this research was to determine the subcellular localization of NtPIP1;1 and NtPIP2;1 in living tobacco cells.

Material and methods: In this experimental study, NtPIPs cDNA sequences were fused to green fluorescent protein gene and expressed transiently in tobacco mesophyll protoplasts. Then, cellular localization of aquaporins was investigated using fluorescent microscope under blue excitation wavelength.

Results: When expressed alone, NtPIP1;1 fusion protein was retained in the internal membrane structures, whereas NtPIP2;1 was found in membrane structure within the cell. To identify the internal structures containing NtPIP1;1 fusion proteins, NtPIP1;1-GFP was co-expressed in tobacco protoplasts with the YFP::HDEL protein, an ER marker. As shown, NtPIP1;1-GFP and YFP::HDEL colocalized.

Conclusion: NtPIP2;1 was transported to plasma membrane, but NtPIP1 was retained in the ER of tobacco protoplasts so showed no water transport activity.

Keywords: Aquaporin, Green Fluorescent Protein, Yellow Fluorescent Protein, Tobacco, Water Channel