

## مکانیسم انتخاب حمل و نقل در سیتوپلاسم برای مسیر هدف یابی واکوئل (گودال کوچک) در سیتوپلاسم سلول که با مایعات پر می شود

### خلاصه

عملکرد مناسب اندامکهای یوکاریوتی تا حد زیادی وابسته به بسته بندی خاص پروتئین های حمل و نقل در داخل کیسه های کوچک تحویل گذرا است. مسیر هدف یابی سیتوپلاسم به واکوئل (CVT)، مسیر ترافیک مربوط به اتوفاژی (مکانیزم اصلی کاتابولیک شامل تخریب سلول یا اجزای سلولی بدون وظیفه) است که پروتئین ها،  $\alpha$  mannosidase و I aminopeptidase را حمل و نقل می کند، به طور انتخابی از سیتوپلاسم به واکوئل شبه-لیزوزوم مخمر حمل و نقل می شود. این مطالعه، یک مکانیسم مولکولی برای حمل و نقل ویژگی در این مسیر شامل چهار مرحله مجزا را روشن می کند. گیرنده Cvt19، نقش مرکزی را در این فرایند ایفا می کند: حوزه های مجزا در Cvt19، پروتئین محموله چندپاره شده را شناسایی می کند و آنها را به ماشین آلات تشکیل کیسه های کوچک از طریق تعامل با Cvt9 و Aut7 ارتباط می دهد. از آنجا که اتوفاژی (مکانیزم اصلی کاتابولیک شامل تخریب سلول یا اجزای سلولی بدون وظیفه)، مکانیسم اولیه برای گردش ارگان سلولی است، این نتایج، بینشی را به فرایندهای فیزیولوژیکی در هموستاز سلولی، از جمله بسته بندی خاص اندامکهای آسیب دیده و یا اضافی برای تحویل لیزوزومی و تجزیه بحرانی ارائه می دهد.

مسیر اصلی برای نابودی سلول آسیب دیده یا ارگان سلولی، یک فرایند سلولی مسئول تخریب بخش عمده ای از اجزای سیتوپلاسمی در سلول های یوکاریوتی است. در این فرایند، مواد سیتوپلاسمی به طور غیرانتخابی توسط وزیکول های غشا، دو اتوفاگوزوم به لیزوزوم / واکوئل حمل و نقل می شود که باید تخریب شود (Klionsky و Ohsumi، 1999) اتوفاژی (مکانیزم اصلی کاتابولیک شامل تخریب سلول یا اجزای سلولی بدون وظیفه) (APG) از شرایط گرسنگی ناشی می شود. اندامکها نیز توسط اتوفاژی (مکانیزم اصلی کاتابولیک شامل تخریب سلول یا اجزای سلولی بدون وظیفه) زمانی که آنها آسیب می بینند و یا دیگر مورد نیاز نیستند دستخوش حذف انتخابی می شوند (Klionsky و EMR، 2000). علاوه بر این، آنزیم های مقیم حفره از یک فرایند مربوط به اتوفاژی (مکانیزم اصلی کاتابولیک شامل تخریب سلول یا اجزای سلولی بدون وظیفه) به نام مسیر هدف یابی سیتوپلاسم به واکوئل (CVT) بهره برداری می کنند (Klionsky و Ohsumi، 1999). Ape1 Aminopeptidase i، محموله مسیر CVT (CVT)، در سیتوپلاسم به عنوان یک فرم پیشرو (prApe1) تولید می شود. prApe1 حاوی اطلاعات هدف یابی حفره می شود (ODA و همکاران، 1996؛ Segui واقعی و همکاران، 1995). پس از سنتز، prApe1 به dodecamer مونتاژ می شود (Kim و همکاران، 1997) که بیشتر در یک ساختار منحصر به فرد به نام کمپلکس CVT (Baba و همکاران، 1997) بسته بندی می شود. این کمپلکس متعاقبا توسط یک غشاء دابل به شکل وزیکول CVT احاطه می شود. این وزیکول سپس با واکوئل برای انتشار تک وزیکول غشای داخلی، بدنه CVT، ترکیب می شود (Baba و همکاران، 1997؛ Scott و همکاران، 1997). در دهه گذشته، مطالعات مورفولوژیکی، ژنتیکی و بیوشیمیایی در مخمر *Saccharomyces cerevisiae* نشان داده است که اتوفاژی (مکانیزم اصلی کاتابولیک شامل تخریب سلول یا اجزای سلولی بدون وظیفه)، تخریب پراکسیزوم (pexophagy) و مسیر CVT (CVT) یک مکانیزم رایج را برای پیدایش حیات وزیکول های دو غشایی به اشتراک می گذارد که جدا کننده محموله از سیتوپلاسم است (Klionsky و Ohsumi، 1999؛ Reggiori و Klionsky، 2002). با این حال، مکانیزم مورد استفاده برای ترکیب انتخابی محموله به این وزیکول نامشخص است.

به تازگی، یک پروتئین جدید، به نام Cvt19، شناسایی شده است و به عنوان یک گیرنده برای محموله های CVT، prApe1 و  $\alpha$  mannosidase (Ams1) مشخص می شود (Hutchins Klionsky، 2001، Scott و همکاران، 2001). Cvt19 یک پروتئین غشای محیطی است. بر خلاف گیرنده های نوع گذرنده از غشاء معمولی که چند دور اتصال و آزادی را به دست می آورند، Cvt19 همراه با محموله خود به واکوئل منتقل و توسط پروتئیناز حفره ای تخریب می شود. تجزیه و تحلیل بیوشیمی و میکروسکوپ فلورسانس نشان می دهد که Cvt19 در درجه اول در یک ساختار پیش حفره ای (PAS) preautophagosomal، یک محل پیش بینی برای تشکیل وزیکول واقع می شود که در آن بسیاری از اجزای مورد نیاز برای اتوفاژی (مکانیزم اصلی کاتابولیک شامل تخریب سلول یا اجزای سلولی بدون وظیفه) و مسیر CVT واقع می شوند (Scott و همکاران، 2001، Suzuki، 2001 و همکاران، 2001، Kim و همکاران، 2002؛ Noda و همکاران، 2002). از این نتایج، Cvt19 برای عمل نمودن در مرحله ای پیشنهاد می شود که در آن کمپلکس CVT به PAS هدف یابی می کند. با این حال، روشن نیست چگونه Cvt19 در به این محل موقعیت یابی می شود. اگرچه اجزاء خاص برای CVT و مسیرهای pexophagy، مانند Cvt9، شناسایی شده اند (Scott و همکاران، 2000؛ Kim و همکاران، 2001؛ nice و همکاران، 2002)، رابطه بین Cvt19 و این پروتئین ها هنوز نامعلوم است.

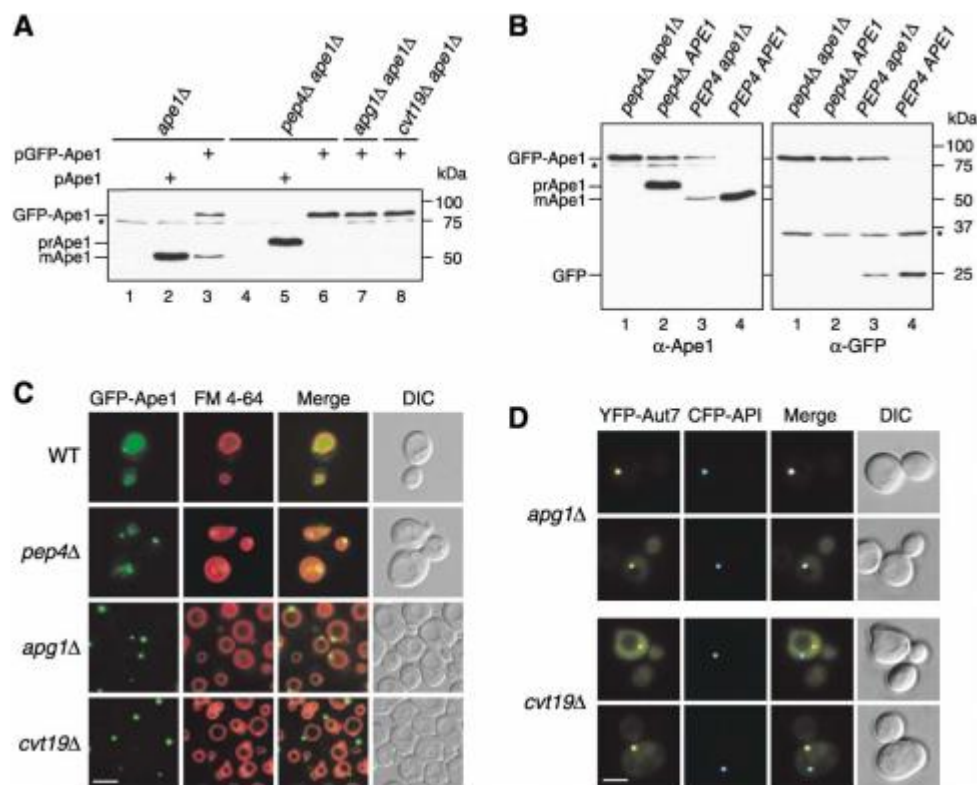
در این مطالعه، ما به مکانیزم مولکولی حمل و نقل انتخابی محموله های CVT به واکوئل پرداخته ایم. نقشه برداری از حوزه های عملکردی در Cvt19، محل های اتصال جداگانه را برای تعامل با دو پروتئین حمل و نقل شناسایی نموده است (prApe1 و Ams1)، Cvt (CVT) مسیر/عامل pexophagy خاص Cvt9 و Cvt (CVT) وزیکول / جزء اتوفاگوزوم. با استفاده از این، همراه با تجزیه و تحلیل میکروسکوپ فلورسانس و جداسازی پیوستگی، ما نتیجه گیری کردیم که روند هدف یابی محموله های انتخابی به PAS شامل زیرکمپلکس های خاص از پروتئین های APG / CVT می شود که در یک نظم زمانی خاص عمل می کنند و اجازه می دهد تا شکل گیری کمپلکس CVT (Ams1 Cvt19 Ape1)) و الحاق آن به جداکننده وزیکول ها صورت گیرد.

## نتایج

### GFP-Ape1 توسط مسیرهای CVT و اتوفاژی (مکانیزم اصلی کاتابولیک شامل تخریب سلول یا اجزای

سلولی بدون وظیفه) به واکوئل منتقل می شود

۱) Amino-peptidase (Ape1) هیدرولاز ساکنی است که از طریق مسیر هدفیابی سیتوپلاسم به واکوئل (CVT) به واکوئل حرکت می کند. N-propeptide-ترمینال حاوی اطلاعات هدف یابی حفره است و به روش وابسته به پروتئیناز حفره ای (Pep4) پس از تحویل شکافته می شود (شکل a1، خطوط 2 و 5، Klionsky و همکاران، 1992؛ ODA 1996 و همکاران). تا به امروز، بسیاری از مطالعات اتوفاژی (مکانیزم اصلی کاتابولیک شامل تخریب سلول یا اجزای سلولی بدون وظیفه) روی تجزیه و تحلیل دستگاه های تشکیل دهنده وایکول متمرکز شده است. برای کسب اطلاعات بیشتر در مورد CVT (CVT) و معابر APG، ما تصمیم به بررسی واردات محموله پیش ساز پروتئین Ape1 (prApe1) در داخل بدن گرفتیم.



شکل 1. GFP - Ape1 سفر به واکوئل از طریق مسیر CVT (CVT)

(A) عصاره های سلولی از  $\alpha$  ape1 (خطوط 1-3) ،  $\alpha$  ape1 pep4 $\Delta$  (خطوط 4-6) ،  $\alpha$  ape1 apg1 $\Delta$  (خط 7) و  $\alpha$  ape1  $\alpha$  cvt19 (خط 8) کشش های حاوی هر دو بردار خالی ( pRS414 ؛ خطوط 1 و 4 ) ، pApe1 (خطوط 2 و 5) ، یا pGFP Ape1 (خطوط 3 ، 6 ، 7 و 8) با روش SDS-PAGE حل و فصل می شوند.

Western blots با آنتی سرم ضد Ape1 انجام شد.

(B) نابودی وسترن از عصاره سلولی از  $\alpha$  ape1 pep4 $\Delta$  (خط 1) ، pep4 $\Delta$  (خط 2) ،  $\alpha$  ape1 (خط 3) ، و نوع وحشی (خط 4) گونه های از حاوی pGFP Ape1 با ضد Ape1 (پنل سمت چپ) و ضد GFP (پنل سمت راست) (آنتی سرم . ستاره (\*) باندهای غیر اختصاصی را نشان می دهد.

(C) موقعیت یابی Ape1 بوسیله میکروسکوپ فلورسانس از نوع وحشی ، pep4 $\Delta$  ، apg1 ، و  $\alpha$  cvt19 کشش های بیان GFP Ape1 . سلول به فاز midlog رشد کرده و با FM 4-64 در محیط SCD نشاندار شد. نوار، 5 میکرومتر.

(D) CFP - Ape1 با YFP - Aut7 در مجاورت سلول های apg1 $\Delta$  قرار می گیرد، اما نه در  $\alpha$  cvt19 سلول.  $\alpha$  cvt19 apg1 $\Delta$  سلول های CFP - Ape1 و coexpressing YFP - Aut7 در رسانه SCD رشد داده شدند به مرحله midlog و با میکروسکوپ فلورسانس و DIC مورد بررسی قرار گرفت . نوار، 5 میکرومتر است.

بر این اساس، ما یک همجوشی پروتئین فلورسنت سبز (GFP) N-ترمینال را با prApe1 ساختیم. GFP حاصل، Ape1 تحت کنترل پروموتور APE1 درونزاد از یک پلاسمید تک نسخه بیان می شود. به منظور تایید این مورد که این ساختار منعکس کننده ترافیک پروتئین بومی prApe1 است، ما ابتدا فرآوری GFP-Ape1 را در پس زمینه ape1 مورد بررسی قرار دادیم. Western blots نشان داد که حدود 50٪ GFP-Ape1، توسط برش prApe1 propeptide فرآوری می شود و نتیجه، تولید فرم بالغ Ape1 (mApe1) و GFP (شکل a1 و b1، خط 3) است. تحت شرایط مشابه، prApe1 معتبر به طور کامل فرآوری می شود (شکل A1، خط 2). در سلول های  $\alpha$  ape1 pep4 $\Delta$  ، هیچ فرآوری GFP-Ape1 مشاهده نشد (شکل A1، 6 و شکل B1، کوچه 1). این نتایج نشان

داد که GFP-Ape1 به mApe1 در یک روش وابسته به پروتئیناز حفره و کارآمد به عنوان پروتئین بومی فرآوری می شود.

برای تایید بیشتر این مورد که آیا فرآوری GFP-Ape1، وابسته به مسیر CVT است یا خیر، ما GFP-Ape1 را در کشش های  $\alpha$   $\text{apg1}\alpha$  و  $\text{cvt19}\Delta \text{ape1}\alpha$  بیان نمودیم.  $\text{Apg1}$  سرین / ترئونین کیناز پروتئین ضروری برای تشکیل وزیکول / اتوفاگوزوم CVT است (Kamada و همکاران، Scott 2000 و همکاران، 2000). Cvt19 اخیراً به عنوان یک گیرنده برای پروتئین باری نشان داده شده است که از مسیر CVt (CVT) (Leber و همکاران، 2001 Scott و همکاران، 2001) برای عملکرد خود استفاده می کند. در هر دو کشش، GFP-Ape1 به شکل فرآوری نشده (شکل a1، خطوط 7 و 8) باقی می ماند که نشان می دهد GFP-Ape1 از طریق مسیر CVt (CVT) به واکوئل تحویل داده می شود. Ape1 پیشرو در dodecamer در سیتوزول مونتاژ می شود (Kim و همکاران، 1997). از آنجا که به نظر می رسد GFP-Ape1 به طور ناکارآمدتر از prApe1 معتبر در سلول های  $\text{ape1}$  فرآوری می شود، اثر حضور prApe1 درون فرآوری GFP-Ape1 را مورد بررسی قرار می دهیم. GFP Ape1 در نوع وحشی و سلول های  $\text{pep4}\Delta$  بیان شد و توسط Western blots با هر دو ضد Ape1 و آنتی سرم ضد GFP تجزیه و تحلیل شد. در سلول های  $\text{pep4}\Delta$ ، فرآوری هر دو GFP-Ape1 و prApe1 درونزا مهار شد (شکل B1، خط 2)، در حالی که بیش از 95٪ GFP-Ape1، در سلول های نوع وحشی (شکل B1، خط 4) به mApe1 تبدیل شد. این نتایج نشان داد که حضور درونزاد prApe1 فرآوری GFP-Ape1 را تسهیل می کند. از GFP مجاور به prApe1 ممکن است روی برخی از عملکردهای propeptide تاثیر می گذارد، به عنوان مثال، در تعامل با پروتئین های دیگر (پابین را ببینید. Scott و همکاران، 2001)، که می تواند با تشکیل یک چندپارهنج با prApe1 بومی ترمیم شود.

سپس ما به بررسی محل GFP - Ape1 در کشش های جهش یافته نوع وحشی و APG / aut / CVt (CVT) پرداختیم. ظهور سلول GFP Ape1 با FM 4-64 رنگی برای تجسم غشاء واکوئل برچسب زده شد و بوسیله میکروسکوپ فلورسانس مورد بررسی قرار گرفت. در سلول های نوع وحشی، سیگنال GFP به طور یکنواخت در

واکوئل با یک یا چند سیگنال نقطه کوچک در منطقه پیش حفره ای (شکل C1)، در توافق با فرآوری کارآمد - GFP Ape1 (شکل B1) پراکنده شد. ما بیشتر واردات GFP - Ape1 را در سلول های  $\Delta pep4$  تایید کردیم که بدنه های CVT در لومن حفره تجمع می یابد. در این فشار، چندین نقطه GFP در حال حرکت در داخل واکوئل دیده شد که نشان می دهد GFP - Ape1 در داخل بدن CVT (شکل C1) حاضر است. در مقابل، در کشش  $\Delta apg1$ ، یک نقطه بزرگتر GFP - Ape1، در منطقه پیش حفره ای، به جای داخل حفره لومن به نظر می رسد (شکل C1). از آنجا که GFP - Ape1 به شکل یک نقطه بزرگ در جهش های CVT / aut / APG ( داده ها نشان داده نشده است) است، احتمال دارد که prApe1 به عنوان یک ساختار بزرگ در خارج از واکوئل وقتی مسیر CVT مسدود می شود، تجمع یابد. این مشاهدات با تجزیه و تحلیل های میکروسکوپ immunoelectron موافق است که نشان می دهد که prApe1 به واکوئل به عنوان بخشی از این کمپلکس CVT سفر می کند (Baba و همکاران، 1997) بودند. با در نظر گرفتن همه موارد، این نتایج نشان می دهد که محل حفره GFP - Ape1، Cvt (CVT) وابسته به مسیر است و GFP - Ape1 به عنوان یک شاخص معتبر به دنبال واردات محموله از طریق مسیر CVT به کار گرفته می شود.

گزارش شده است که بسیاری از پروتئین های مورد نیاز برای Cvt و/یا مسیر autophagic حداقل به صورت گذرا به ساختار perivacuolar preautophagosomal (PAS) موقعیت یابی می شود، که تصور می شود یک محل از تشکیل وزیکول است (Kim و همکاران، 2001؛ Suzuki و همکاران، 2001؛ Noda و همکاران، 2002؛ خوب و همکاران، 2002). بسیاری از پروتئین های CVT / Aut / APG (CVT) در PAS در کشش های جهش یافته APG جمع می شوند. ما به بررسی  $\Delta apg1$  سلولهای بیان CFP - Ape1 و YFP برچسب گذاشته شده توسط Aut7، بوسیله میکروسکوپ فلورسانس، یکی از اجزای PAS پرداختیم (Kim و همکاران، 2001؛ Suzuki و همکاران، 2001). همانطور که در شکل 1 D نشان داده شده است، CFP - Ape1 موضع یافته در PAS به گونه ای بود که با YFP - Aut7 در  $\alpha apg1$  نشاندار شد. به علت اینکه امتداد Cvt19 پروتئین گیرنده در PAS (Kim و همکاران، 2002) موقعیت یابی می شوند، ما فرض کردیم که Cvt19 با prApe1 dodecamer در PAS تعامل

دارد که منجر به تشکیل کمپلکس CVT می شود. برای آزمایش این ایده، ما محل Ape1 - GFP را در کشش  $\alpha$  cvt19 توسط میکروسکوپ فلورسانس مورد بررسی قرار دادیم. بطور غیر منتظره، Ape1 - GFP هنوز هم به عنوان یک نقطه واحد بزرگ انباشته شد، اما یک مشاهده دقیق نشان داد که طور مداوم در منطقه پیش حفره ای (شکل C1) منتقل و موقعیت یابی می شود. برای تعیین اینکه آیا Ape1 - GFP در یک محل دیگر از کشش  $\alpha$  cvt19 متمرکز می شود یا خیر، این کشش را با CFP - Ape1 و YFP - Aut7، تبدیل نمودیم. همانطور که در شکل D1 نشان داده شده است، CFP - Ape1 در PAS که با YFP - Aut7 در کرنش  $\alpha$  cvt19 برچسب زده شده دیده نشد. این مکان یابی جداگانه نیز در کشش  $\alpha$  cvt19  $\alpha$  apg1 مشاهده شد (داده ها نشان داده نشده است) که نشان می دهد که cvt19 به اختفای نژاد apg1 در کنترل موقعیت یابی prApe1 به PAS مرتبط است. این نتایج نشان می دهد که prApe1 با تشکیل یک کمپلکس بزرگ (به صورت کمپلکس Ape1) مستقل از Cvt19 است. هرچند، پروتئین Cvt19 برای استخدام کمپلکس Ape1 به PAS مورد نیاز است، با نقش احتمالی آن به عنوان یک گیرنده در توافق است.

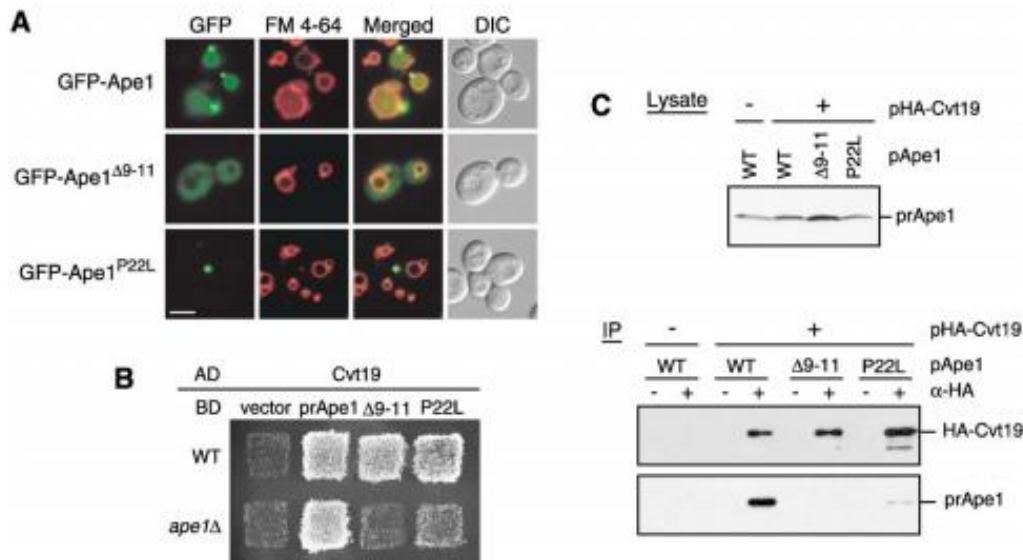
### **Propeptide prApe1 برای موقعیت یابی مناسب آن و تعامل با یک پروتئین گیرنده مورد نیاز است**

propeptide prApe1 برای واردات prApe1 به واکوئل ضروری است، اما برای اولیگومریزاسیون آن لازم نیست (ODA و همکاران، 1996؛ Kim 1997 و همکاران). یک پیش بینی ثانویه ساختار پیشنهاد داد که در که propeptide prApe1 به شکل یک ساختار مارپیچ-دور-مارپیچ است و اینکه اولین مارپیچ (باقیمانده 1-18) نمایشگر ویژگی های  $\alpha$  amphipathic مارپیچ است که برای ارتباط غشاء و فرآیندهای غشایی (ODA و همکاران، 1996) مهم است. جهش در این منطقه (به عنوان مثال، حذف باقی مانده های 9-11، 9-11) از ارتباط prApe1 با غشاء جلوگیری می کند و در نتیجه حمل و نقل آن به واکوئل را مهار می کند. از سوی دیگر، جایگزینی پرولین با لوسین در موقعیت 22 (P22L) باعث تجمع prApe1 در ساختار غشاء غیرحفره ای می شود، اما واردات prApe1 را به واکوئل مسدود می کند (ODA 1997 و همکاران، Scott، 1996 و همکاران) است. بنابراین ما



سعی کردیم مرحله ای را در مسیر Cvt (CVT) تعیین کنیم که از این جهش ها در prApe1 propeptide تحت تاثیر قرار می گیرد. ما بوسیله میکروسکوپ فلورسانس برای اولین بار تصمیم به بررسی موقعیت یابی prApe1 از جهش propeptide با استفاده از ساختار GFP در کشش  $\alpha$  ape1 گرفتیم. GFP - Ape1 نوع وحشی، یک رنگ آمیزی luminal حفره ای قابل توجه را با سیگنال های خال خال کوچک اضافی در منطقه پیش حفره ای (شکل A2) ارائه می دهد. در مقابل، GFP - Ape1  $\alpha$  11-9 به طور یکنواخت در سیتوزول (شکل A2) توزیع می شود که موافق با تجزیه و تحلیل های بیوشیمیایی قبلی است. این نتیجه نشان می دهد که اولین مارپیچ  $\alpha$  amphipathic در تشکیل کمپلکس Ape1 درگیر است. در مقابل، GFP - Ape1P22L یک سیگنال بزرگ تک خال خال را دور از واکوئل (شکل A2) ارائه داد که نشان می دهد که Ape1P22L هنوز قادر به تشکیل Ape1 پیچیده است، اما در موقعیت یابی PAS نقص دارد.

محل GFP-Ape1، در کرنش  $\Delta$ cvt19 نسبتاً مشابه با محل GFP-Ape1P22L است. این مشاهدات نشان می دهد که جهس P22L روی تعامل بین prApe1 و Cvt19 تاثیر می گذارد. در حالی که داده های قبلی نشان داده اند که جهش در prApe1 propeptide بر واردات تاثیر می گذارد، هیچ مطالعه ای تایید نکرده اند که این نقص با توجه به یک مسدودیت در تعامل با Cvt19 نیست. برای آزمایش این فرضیه، ما تعامل بین جهش های prApe1 و Cvt19 را با تجزیه و تحلیل دو هیبریدی و مصون از رسوب همزمان مورد بررسی قرار گرفت. به علت تشکیل prApe1 homooligomer، ما از کرنش ape1 (YTS110) به عنوان یک کشش تست برای تجزیه و تحلیل دو هیبرید استفاده نمودیم. سلول های  $\alpha$ ape1 حامل پلاسمیدهای Cvt19 و Ape1 نوع وحشی، رشد در یک صفحه منفی آدنین را به نمایش گذاشت که نشان می دهد که این دو پروتئین می توانند تعامل داشته باشند (شکل B2).



شکل 2. پیشرو Ape1 Propeptide برای تشکیل کمپلکس Ape1 و تعامل با Cvt19 مورد نیاز است (A) موقعیت یابی جهش GFP - Ape1 propeptide ، ، میکروسکوپ فلورسانس و  $\alpha$  DIC سلول پناه pGFP Ape1 9-11 ، pGFP Ape1 P22L به midlog فاز رشد کرده و با FM 4-64 در محیط SCD نشاندار شد . نوار، 5 میکرومتر است.

(b) تجزیه و تحلیل دو ترکیبی از تعامل فیزیکی بین Ape1 جهش و Cvt19. نوع وحشی ( PJ69 -4A ) و  $\alpha$  isogenic ape1 ( YTS110 ) کشش های آزمون با دامنه فعال (AD) پلاسمید حاوی CVT19 و اتصال دامنه (BD) نوع وحشی پلاسمید حاوی یا APE1 جهش یافته تبدیل شد. ترانسفورم شده بر روی SC LEU - URA بشقاب و المثنی کشت داده شده بر روی یک صفحه SC - ADE - LEU - URA به ارزیابی فعال تعامل وابسته به این ژن ADE2 را رشد داده شدند. سلول های نشان داده شده در اینجا در 30 درجه سانتیگراد به مدت 2 روز رشد داده شدند .

(C) تعامل بین prApe1 و Cvt19 توسط واسطه prApe1 propeptide. عصاره ها از  $\alpha$  ape1  $\Delta$  بیان سلول HACvt19 و یا نوع وحشی prApe1 یا جهش پلاسمیدهای تک کپی تحت کنترل مروج خود برای مصونیت از رسول با آنتی بادی ضد HA مورد استفاده قرار گرفت ، و روش Western blots با آنتی سرم ضد Ape1 و ضد

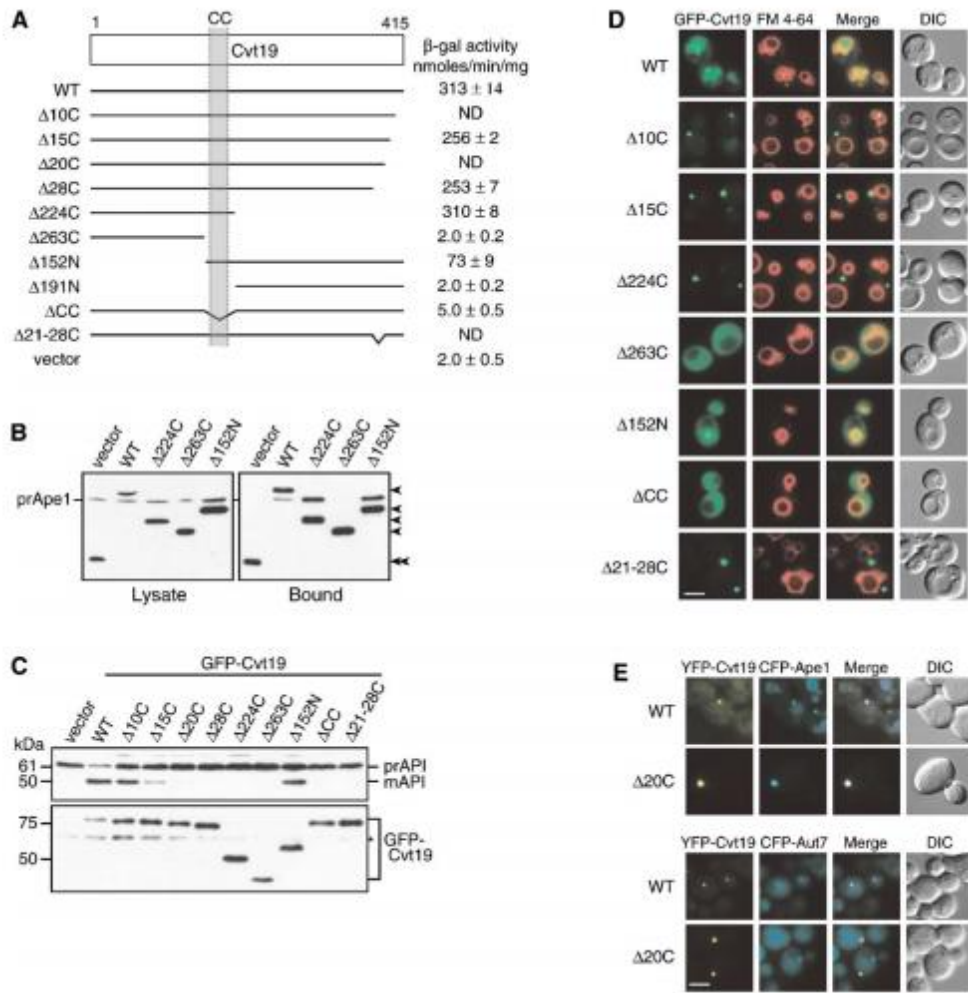
HA مورد بررسی قرار گرفت (IP). پانل بالا (عصاره) نشان دهنده لکه پروتئین از کل عصاره سلول جستجو کرده با

آنتی سرم ضد Ape1 است.

در مقابل، Ape1  $\alpha$  9-11 هیچ فعالیت اتصال را با Cvt19 در کشش ape1 نمایش نداده، با وجود آن که فشار آزمون نوع وحشی ( PJ69-4A ) را برای رشد بر روی یک صفحه منفی آدنین (شکل B2) میسر ساخت. این نتیجه نشان دهنده ( 1 ) تعامل بین prApe1 و Cvt19، وابسته به propeptide است و (2) تعامل آشکار بین Ape1 9-11 و Cvt19 در کشش نوع وحشی را نشان می دهد و ممکن است به واسطه prApe1 درونزاد باشد. Ape1P22L، رشد بسیار آهسته تری را از Ape1 نوع وحشی در یک کشش  $\alpha$  ape1 ارائه نمود که نشان می دهد که جهش P22L به شدت آسیب دیده است، اما به طور کامل، تعامل بین prApe1 و Cvt19 را مسدود ننمود (شکل B2). ما این نتایج را توسط مصونیت از رسوب تحت شرایط بومی تأیید نمودیم. در این آزمایش ، ما از یک فشار  $\Delta$ apg1 برای جلوگیری از مسیر CVT (CVT) استفاده نمودیم؛ و یک کمپلکس Ape1 Cvt19 در یک کشش از نوع وحشی و به عنوان یک نتیجه از واردات آن به واکوئل تخریب شد ( Scott و همکاران، 2001؛ شکل A5) خواهد بود. سلول های  $\alpha$  ape1  $\Delta$ apg1 با Cvt19 برچسب زده شده-HA و پلاسمیدهای نوع وحشی و جهش prApe1 تبدیل شدند و عصاره های آنها با آنتی بادی ضد HA عصاره آنها برای مصونیت از رسوب مورد استفاده قرار گرفتند. prApe1 نوع وحشی به طور موثر با HA Cvt19 از رسوب مصون شد. در مقابل ، هیچ  $\alpha$  prApe1 9-11 و تنها مقدار کمی Ape1P22L با Cvt19 (شکل C2) در حال رسوب همزمان یافت شد که که تعامل prApe1 و Cvt19 توسط prApe1 propeptide تأیید می کند. کاهش این ارتباط prApe1 با Cvt19 ناشی از جهش P22L به محل مناسب از این کمپلکس به PAS مختل است و فنوتیپ GFP Ape1P22L (شکل A2) را توضیح می دهد.

## کمپلکس Ape1-Cvt19 توسط Cvt9 تا PAS هدفمند است.

اتوفاژی (مکانیزم اصلی کاتابولیک شامل تخریب سلول یا اجزای سلولی بدون وظیفه) یک فرایند غیرانتخابی است و سیتوپلاسم غیر اختصاصی را محصور می کند. در مقابل، مسیر Cvt (CVT) و واردات prApe1 توسط اتوفاژی (مکانیزم اصلی کاتابولیک شامل تخریب سلول یا اجزای سلولی بدون وظیفه) خاص، احتمالاً به دلیل تعامل بین prApe1 و Cvt19 است. با این حال، این حوزه درون Cvt19 که به prApe1 متصل می شود، شناخته شده نیست. علاوه بر این، محل دقیق Cvt19 در PAS به عنوان یک رویداد مهم برای هدف یابی انتخابی prApe1 به نظر می رسد که به ما اجازه می دهد تا فرض کنیم که یک دامنه در Cvt19 برای تعیین موقعیت یابی آن در PAS وجود دارد. به این دلایل، ما برای شناسایی عمل PAS تلاش نمودیم. به این دلایل، ما برای شناسایی حوزه های عملکردی در پروتئین Cvt19 تلاش نمودیم. Cvt1، یک پروتئین اسید آمینه 415 حاوی دامنه مارپیچ پیش بینی شده از سیم پیچ بین اسیدهای آمینه 160 و 187 (شکل A3) است. ما چند حذف Cvt19 N و C-ترمینال حذف را ایجاد نمودیم، به عنوان مثال Cvt19 15C نشان دهنده جهش فاقد C-ترمینال 15 اسید آمینه است. از آنجا که شکل مارپیچ اغلب واسطه تعامل پروتئین-پروتئین است، ما همچنین جهش CC Cvt19 را ساختم که فاقد منطقه 39 اسید آمینه از باقی مانده های 153 تا 191 است که حاوی یک دامنه مارپیچ از سیم پیچ می شود (شکل A3). حوزه اتصال prApe1 برای اولین بار توسط مخمر سیستم دو هیبریدی مورد بررسی قرار گرفت. فشار آزمون  $\Delta cvt19$  با ژن LacZ تحت کنترل یک پروموتور وابسته به GAL4 با prApe1 و جهش Cvt19 پلاسمیدها تبدیل شد، و فعالیت  $\alpha$ -گالاکتوزیداز به بررسی تعامل اندازه گیری شد. تمام پروتئین های Cvt19 حاوی دامنه مارپیچ به طور موثر با prApe1 تعامل نمود، در حالی که آنهایی که فاقد این دامنه بودند هیچ تعاملی را (شکل A3) نشان ندادند.



شکل 3. نقشه برداری دامنه کاربردی در Cvt19

(A) نقشه برداری دامنه های اتصال prApe1 توسط مخمر سیستم دو هیبریدی. فشار تست  $\Delta$ cvt19 (YTS111) با دامنه اتصال پلاسمید حاوی تمام APE1 ORF و دامنه فعال سازی پلاسمید حاوی جهش Cvt19، تبدیل شد. تعامل با اندازه گیری القای وابسته به تعامل فعالیت گالاکتوزیداز مورد بررسی قرار گرفت. CC، به صورت طومار سیم پیچ، ND، تعیین نشده است.

(B) مجموع lysates از  $\Delta$ cvt19 apg1 $\alpha$  سلول های در بیان یا Cvt19 نوع وحشی یا جهش یافته با پروتئین ترکیب (ProtA-Cvt19) به منظور رسوب ProtA-Cvt19 پروتئین با IgG سفاروز مورد استفاده قرار گرفت. پانل سمت چپ و راست نشان می دهد که نابودی پروتئین از عصاره در کل سلول (عصاره) و روش IgG رسوب (موظف)، به ترتیب، که با ضد Ape1 آنتی سرم جستوجو کرد. arrowheads تنها نشان می دهد ProtA-Cvt19 مشتقات،

و یک نوک پیکان دوگانه پروتئین بدون همجوشی را نشان می دهد. اگرچه Cvt19 جهش حاوی دامنه مارپیچ از سیم پیچ (C10، C20 15Cαα، 28C، 21-28C، 224C، 152N) قادر به رسوب prApe1، تنها نتایج α C224 بودند و N152 جهش در این شکل نشان داده شده است.

(C) نابودی پروتئین از کل α lysates cvt19 سلولهای بیان Cvt19 جهش حذف ذوب شده با GFP با ضد Ape1 (پانل های فوقانی) و ضد GFP (قسمت پایین) آنتی سرم جستجو کرد. ستاره (\*) باندهای غیر اختصاصی را نشان می دهد است.

(D) موقعیت یابی نوع وحشی و جهش یافته پروتئین Cvt19 توسط میکروسکوپ فلورسانس و DIC از Δcvt19 کشت ابراز وحشی و نوع و یا جهش GFP-Cvt19 را. سلول به فاز midlog رشد کرده و با FM 4-64 در محیط SCD نشاندار شد. نوار، 5 میکرومتر است.

(E) Colocalization YFP-Cvt19 و YFP-Cvt19 را ارتباط α C20 با CFP-Ape1 و CFP-Aut7 است در

Δcvt19 فشار توسط میکروسکوپ فلورسانس و DIC. نوار، 5 میکرومتر است

ما توسط تعیین عملکرد و موقعیت یابی بریده های Cvt19 تصمیم به گسترش تجزیه و تحلیل گرفتیم. بر این اساس، ما همجوشی های N-ترمینال GFP را به Cvt19 ساختیم و آنها را تحت کنترل پروموتور درونزاد Cvt19 از یک تک نسخه پلاسمید در سلول αcvt19 بیان نمودیم. تست Western blots از عصاره های همراه با ضد بدن GFP تایید شد که جهش های مختلف GFP - Cvt19 دارای سطوح بیان مشابه بودند (شکل C3). میزان پروتئین حالت پایدار GFP - Cvt19، به پایین تر از میزان جهش های حذف به نظر می رسید (شکل C3، پانل کمتر)، که احتمالاً به دلیل حمل و نقل موثر GFP - Cvt19 برای تخریب واکوئل بود. علاوه بر این، GFP - Cvt19 فعالیت کافی را برای بلوغ prApe1 (شکل C3، پانل بالا) به نمایش گذاشت که تایید نمود که GFP - Cvt19 در ساختار برای این تجزیه و تحلیل مناسب است. حدود 40٪ از prApe1 به mApe1 در بیان سلول GFP - Cvt19 را به α C10 تبدیل شد، و تنها مقدار کمی از mApe1 در بیان سلول GFP - Cvt19 یا C15 α GFP - Cvt19 را α C20 (شکل C3، پانل بالا) یافت شد. در مقابل، GFP - Cvt19 α C28، GFP - Cvt19 α C224، GFP

Cvt19  $\alpha$  C263 ، و GFP - Cvt19 را  $\alpha$  CC در تکمیل نقص در بلوغ prApe1 در سلول Cvt19  $\alpha$  (شکل C3 ، پانل بالا ) موفق نشد. با کمال تعجب، GFP - Cvt19  $\alpha$  N152 هنوز تا حدی در بلوغ prApe1 (شکل C3 ، پانل بالا) کاربردی بود که نشان می دهد که یک بخش N- ترمینال بزرگ حداقل برای prApe1 حمل و نقل از Cvt19 غیر ضروری است. حتی با اینکه وجود جهش های متعدد شامل Cvt19 28C ، یک تداخل مهم با prApe1 (شکل A3 و B3 ) را به نمایش گذاشت، حمل و نقل prApe1 (حمل و نقل) به طور کامل در این کشش از دست رفته بود، از جمله بیان سلولهای Cvt19  $\alpha$  C28. این نتایج نشان می دهد که C- ترمینال 28 اسید آمینه Cvt19 ، ممکن است برخی از وظایف را در حمل و نقل prApe1 غیر از ارتباط با prApe1 propeptide داشته باشد.

سپس ما موقعیت جهش های GFP - Cvt19 را تعیین نمودیم. سلولهای Cvt19  $\alpha$  بیان کننده نوع وحشی یا جهش پروتئین GFP - Cvt19 با FM 4-64 برچسب گذاری و بوسیله میکروسکوپ فلورسانس مشاهده شد . همانطور که از داده های ارائه شده در شکل C3 انتظار می رود، حفره GFP - Cvt19 همراه با یک یا چند نقطه ریز در منطقه پیش حفره ای (شکل D3) نمایش داده شد. علاوه بر این، همانطور که قبلا نشان داده شده است (Kim و همکاران، 2002) ، موقعیت یابی همزمان YFP - Cvt19 با CFP - Aut7 را تایید کرد که Cvt19 در PAS (شکل E3 ، پانل پایین) موقعیت یابی می شود. حذف APG1 منجر به غلظت GFP - Cvt19 در PAS شد، همانطور که با GFP - Ape1 در کشش  $\alpha$  apg1 دیده می شود (شکل B5). این نتیجه نشان می دهد که Cvt19 ممکن است همراه با prApe1 از طریق PAS حمل و نقل مرتبط شود. محل Cvt19  $\alpha$  GFP N152 کاملا شبیه به نوع وحشی GFP - Cvt19 بود که سازگار با فعالیت های قابل توجه ان برای واردات prApe1 (شکل D3) بود. در مقابل بیان سلول Cvt19  $\alpha$  GFP N152، دو جمعیت در بیان سلول Cvt19  $\alpha$  GFP C10 مشاهده شد، اگر چه فعالیت ها برای واردات prApe1 بین این دو جهش قابل مقایسه شدند. در حدود نیمی از بیان سلول Cvt19  $\alpha$  GFP C10 دارای کمی واکوئل GFP رنگ آمیزی شده، با یک نقطه برجسته مجاور به واکوئل بود و بقیه آن یک نقطه تک GFP دور از واکوئل بود (شکل D3). پروتئین های C15 ،  $\alpha$  20C ، و C224 ، حاوی امتداد مارپیچ پیچ به پیچ، یک دامنه مارپیچ از سیم پیچ قادر به رسوب prApe1 (شکل D3) را تشکیل داد. در مقابل، Cvt19  $\alpha$  GFP 263 و - GFP

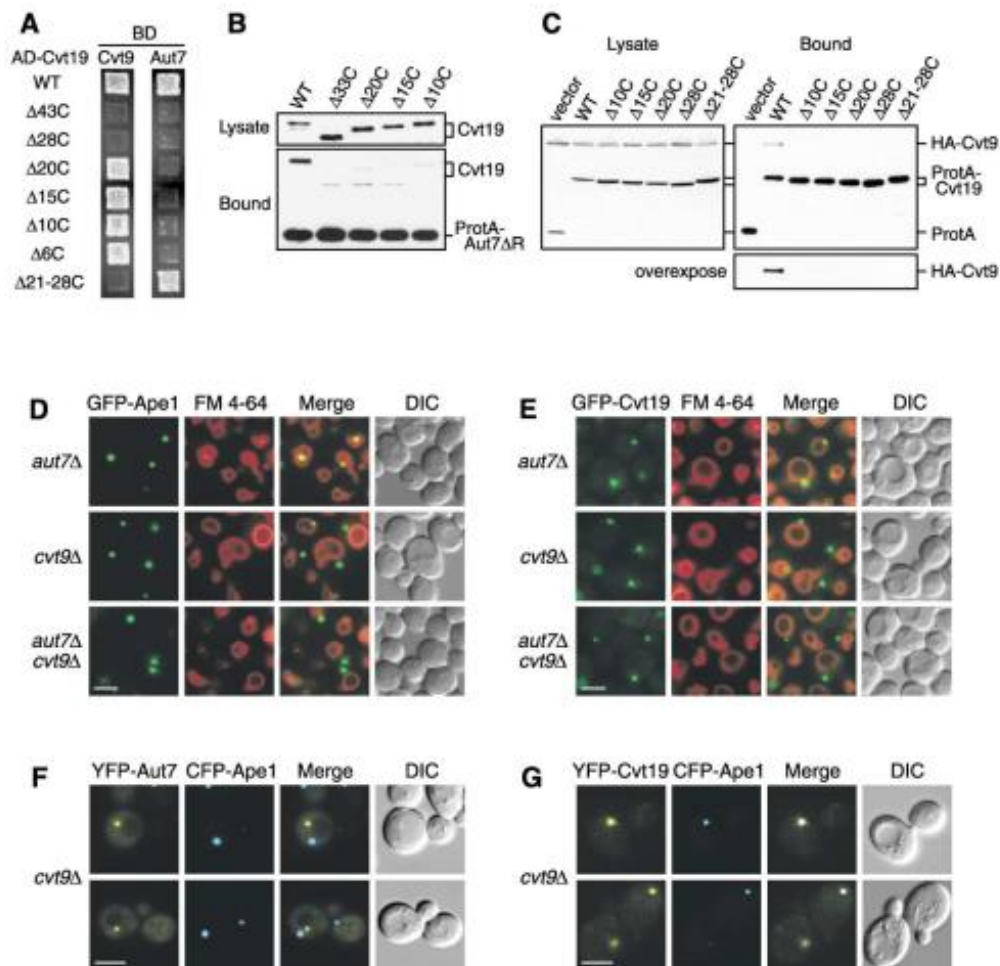
CC  $\alpha$  Cvt19 نمایشگر موقعیت یابی سیتوزولی پراکنده بود که نشان می دهد که موقعیت یابی خال خال از Cvt19 به تعامل با prApe1 (شکل D3) بستگی دارد. مطابق با داده های ارائه شده در شکل A3 و B3 ، جهش نوع وحشی و YFP - Cvt19 ، شامل دامنه مارپیچ از سیم پیچ، مانند YFP - Cvt19  $\alpha$  های C 20 ، CFP Ape1 موقعیت یابی نمی شود (شکل E3 ، پانل بالا) . با این حال ، بر خلاف YFP - Cvt19 20C ، CFP با Aut7 - نقطه (شکل E3 ، پانل کمتر ) به طور همزمان موقعیت یابی نمی شوند. این نتایج نشان می دهد که prApe1 و Cvt19 یک کمپلکس را قبل از به کارگیری برای PAS تشکیل می دهد. علاوه بر این، ناحیه C - ترمینال Cvt19 برای محل مناسب پیچیده PAS حیاتی است.

به تازگی ، گزارش شده است که Aut7 از نظر فیزیکی با Cvt19 (Kim و همکاران، 2002) تعامل دارد. ما تصور کردیم که این تداخل می تواند نقش مهمی در موقعیت یابی prApe1، PAS و واردات حفره متعاقب آن ایفا نماید. بنابراین ما دامنه اتصال Aut7 را درون Cvt19 توسط هر دو مخمر سیستم دو هیبریدی و یک آزمایش پروتئین پیوستگی نگاشتیم. در تجزیه و تحلیل دو هیبریدی، Aut7 یک تداخل مهم با تمام طول Cvt19 را بر اساس فعالسازی ژن ADE2 نمایش داد، اما تعامل معنی دار با هر یک از بریده های Cvt19 - C (شکل A4) را نشان نمی دهد. یک آزمایش جداسازی پیوستگی نیز نشان داد که پروتئین Aut7 - A قادر به رسوب همزمان تمام طول Cvt19 است، اما بازده ها برای پروتئین های کوتاه Cvt19 به شدت کاهش یافته بود، از جمله  $\alpha$  Cvt19 C10 (شکل B4) . این نتایج پیشنهاد می دهد که دامنه اتصال Aut7 برای Cvt19 ممکن است در واقع موقعیت یابی شود یا شامل آخرین 10 اسید آمینه C - ترمینال باشد. کیمرازهای C - کوتاه GFP - Cvt19 به PAS (شکل D3) موقعیت یابی نمی شود. اگر این مکان ناشی از دست دادن تعامل بین Aut7 و Cvt19 باشد، این کمپلکس Cvt19 - Ape1 نباید در PASaut7  $\alpha$  موقعیتی یابی شود. با این حال ، میکروسکوپ فلورسانس سلول های بیان کننده  $\alpha$  Ape1 - GFP یا GFP Cvt19 ، نشان داد که کمپلکس Cvt19 Ape1، هنوز هم در PAS (شکل D4) و E4 ( به صورت موقعیت یابی شده به نظر می رسد که نشان دهنده وجود شریک (ها) اتصال دیگر Cvt19 است.



حذف AUT7 منجر به از دست دادن کامل حمل و نقل prApe1 در طول رشد رویشی می شود، اما گرسنگی تا حدی می تواند این نقص را بازگرداند، حتی اگر گردش پروتئین وابسته به اتوفاژی (مکانیزم اصلی کاتابولیک شامل تخریب سلول یا اجزای سلولی بدون وظیفه) هنوز هم معیوب باشد. برگشت از نقص واردات prApe1 می تواند از تشکیل وزیکول های کوچک و / یا نابجا، به جای اتوفاگوزوم طبیعی، در شرایط گرسنگی حاصل شود (Abeliovich و همکاران، 2000 Kirisako و همکاران، 1999). این داده ها نشان می دهد که واردات خاص prApe1، هنوز در گرسنگی سلول aut7  $\alpha$  رخ می دهد. در مقابل، فشار cvt9  $\alpha$  نشان می دهد تنزل پروتئین autophagic نسبتاً طبیعی است، در حالی که تنها حمل و نقل جزئی prApe1 توسط گرسنگی ترمیم می شود که نشان می دهد که Cvt9، نقش مهمی در انتخاب محموله در اتوفاژی (مکانیزم اصلی کاتابولیک شامل تخریب سلول یا اجزای سلولی بدون وظیفه) (Kim و همکاران، 2001 b) انتخابی دارد. به همین دلیل، ما فرض نمودیم که Cvt9 می تواند یکی دیگر از شریک های اتصال Cvt19 باشد. برای آزمایش این امکان، ما تعامل بین Cvt9 و Cvt19 را توسط مخمر سیستم دو هیبریدی و یک آزمایش جداسازی پروتئین پیوستگی مورد بررسی قرار دادیم. تجزیه و تحلیل دو ترکیبی، ارتباط معنی داری بین Cvt9 و تمام طول Cvt19 (شکل A4) را نشان داد. علاوه بر این، Cvt19  $\alpha$  CC هنوز یک تداخل مهم را نمایش می دهد که نشان می دهد که مارپیچ از سیم پیچ برای تعامل با Cvt9 (داده ها نشان داده نشده است) لازم نیست. بنابراین ما چندین C- جهش حذف ترمینال- C را برای Cvt19 تحت تجزیه و تحلیل دو ترکیبی قرار دادیم و متوجه شدیم که Cvt19 10C، Cvt19 15C، و Cvt19 20C قادر به تعامل با Cvt9 است، در حالی که Cvt19 28C این تعامل را به نمایش گذاشت (شکل A4).

این نتیجه ما را به آزمون در جهش Cvt19 فاقد منطقه 8 اسید آمینه از باقیمانده های اسید آمینه 388 تا 395 (Cvt19 21 - 28C) هدایت می کند. همانطور که انتظار می رود، Cvt19 21 - 28C، هر تعاملی که نشان دهد دامنه اتصال ممکن است در این هر 8 آمینه واقع شود (شکل A4) را نشان نمی دهد. از آنجا که Aut7 قادر به ارتباط با Cvt19 21 - 28C (شکل A4) بود، حوزه های اتصال برای Aut7 و Cvt9 می توانند از هم جدا شوند (شکل A6).



شکل 4. Cvt9 موقعیت یابی کمپلکس Ape1 Cvt19 را در ساختار Preautophagosomal تسهیل می کند (A) نقشه برداری از Aut7 و Cvt9 حوزه های الزام آور در Cvt19 توسط مخمر سیستم دو هیبریدی  $\alpha$  cvt19. فشار تست (WHY4) با دامنه اتصال پلاسمید حاوی تمام Cvt9 یا AUT7 ORF (pGBD Cvt9 یا Cvt9) یا pGBD - Aut7، به ترتیب) و که دامنه فعال سازی پلاسمید حاوی نوع وحشی یا جهش Cvt19 تبدیل شد. ترانسفورم شده بر روی صفحات SC -LEU - URA (داده ها نشان داده نشده است) انتخاب شده و به صفحات SCade تکرار شد. آمار نشان می دهد که سلول در 30 C به مدت 2 روز افزایش یافته است.

(B) یک پروتئین R  $\alpha$  - Aut7 میل آزمایش جداسازی در lysates app1 انجام شد  $\alpha$  cvt19  $\alpha$  فشار ابراز Cvt19 تمام طول یا کوتاه نشان داد. حذف C- ترمینال Cvt19 به جداسازی همزمان خود را با Aut7 به خطر می اندازد.

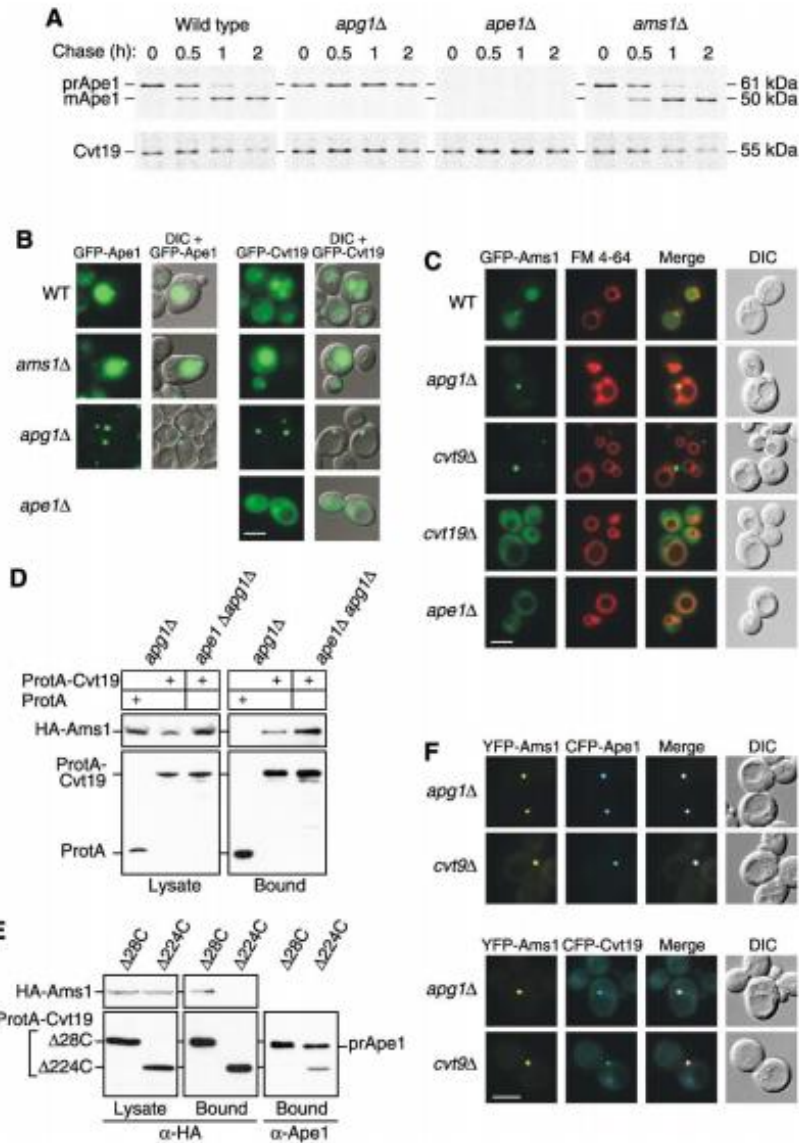
(C) Cvt9 با انتهای C Cvt19 تعامل پیدا می کند. کمپلکس  $\Delta$ apg1 lysates cvt19  $\alpha$  سلول های بیان HA- Cvt9 و یا نوع وحشی یا جهش Cvt19 با پروتئین ذوب (ProtA - Cvt19) به منظور رسوب ProtA - Cvt19 پروتئین با IgG سفاروز مورد استفاده قرار گرفت. پانل سمت چپ و راست نشان دهنده نابودی پروتئین کل cell lysate به (عصاره) و IgG ضد رسوب (موظف)، به ترتیب با آنتی بادی ضد HA بود.

(D و E) موقعیت یابی GFP - Ape1 (D) یا GFP Cvt19 (E) در  $\alpha$  aut7 ، cvt9 ، و  $\alpha$  cvt9  $\alpha$  aut7

کشش های میکروسکوپ فلورسانس و DIC . نوار، 5 میکرومتر است.

(F و G) Colocalization CFP - Ape1 ( F با G ) (YFP - Aut7) و یا ( G ) (YFP - Cvt19) در  $\alpha$  cvt9 فشار توسط

میکروسکوپ فلورسانس و DIC . نوار، 5 میکرومتر است.



شکل 5. پیشرو Ape1 برای حمل و نقل کارآمد Cvt19 و Cargo Ams1 و پروتئین مورد نیاز است

(A) سلول های نوع وحشی *apg1*، *ape1*، و *ams1α* به مدت 10 دقیقه در محیط SMD برچسب زده شد و تعقیب برای زمان نشان داده شده در محیط SMD تعقیب شد. *Ape1* و *Cvt19* از عصاره سلول مصون از رسوب شدند و توسط SDS-PAGE مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

برای گسترش تجزیه و تحلیل، ما آزمایش های جداسازی پیوستگی از *apg1* lysates را برای سلول های  $\alpha$  *cvt19* بیان کننده هر یک از پروتئین های A- ترکیبی مشتق شده *Cvt19* و HA- برچسب گذاشته شده توسط *Cvt9* انجام دادیم. در مقابل داده ها از تجزیه و تحلیل دو هیبرید، ما توانستیم یک تعامل فیزیکی بین هر جهش و

HA- Cvt9 را تشخیص دهیم، در حالی که Cvt19 نوع وحشی قادر به رسوب همزمان HA- Cvt9 (شکل C4) بود. این اختلاف بین تجزیه و تحلیل های دو ترکیبی و جداسازی پیوستگی می تواند از تفاوت در حساسیت از تستها حاصل شود؛ بهبود HA- Cvt9 کاملاً ضعیف بود، حتی از Cvt19 گونه وحشی. میکروسکوپ  $\alpha$  cvt9 سلولهای بیان کننده GFP - Ape1 یا GFP - Cvt19 نشان دادند که هر دو پروتئین بسیار دور از واکوئل (شکل D4 و E4) متمرکز شده اند. به طور مشابه،  $\alpha$  GFP Cvt19 - 21 - C28 به دور از واکوئل (شکل D3) انباشته شد. این نتایج به شدت پیشنهاد می دهد که از دست دادن محل PAS از جهش حذف Cvt19 ناشی از اختلال تعامل های فیزیکی بین Cvt19 و Cvt9 است. علاوه بر این، ما تایید کردیم که CFP - Ape1 با YFP - Cvt19، اما نه با YFP - Cvt19، در کشش  $\alpha$  cvt9 (شکل F4 و G4) به طور همزمان موقعیت می یابد. این نتایج نشان می دهد که در کشش  $\alpha$  cvt9، prApe1 و Cvt19 یک کمپلکس پروتئین تشکیل می دهند که قادر به رسیدن به PAS است. در نتیجه، ما به این نتیجه رسیدیم که اختلال در ارتباط بین Cvt19 و Cvt9 مانع از این می شود که کمپلکس Cvt19 prApe1 در PAS موقعیت یابد. از آنجا که GFP - Ape1 و GFP-Cvt19 یک موقعیت را در سلول های  $cvt9$   $aut7$  با موقعیت ها در سلول های Cvt9 به نمایش گذاشتند، Cvt9 می تواند در مرحله ای زودتر نسبت به Aut7 در به کارگیری این کمپلکس برای PAS عمل نماید.

### **Cvt9، Cargo Ams1 PreApe1 و دیگر Arms1 پروتئین محموله به سمت گنجاندن های وزیکول های**

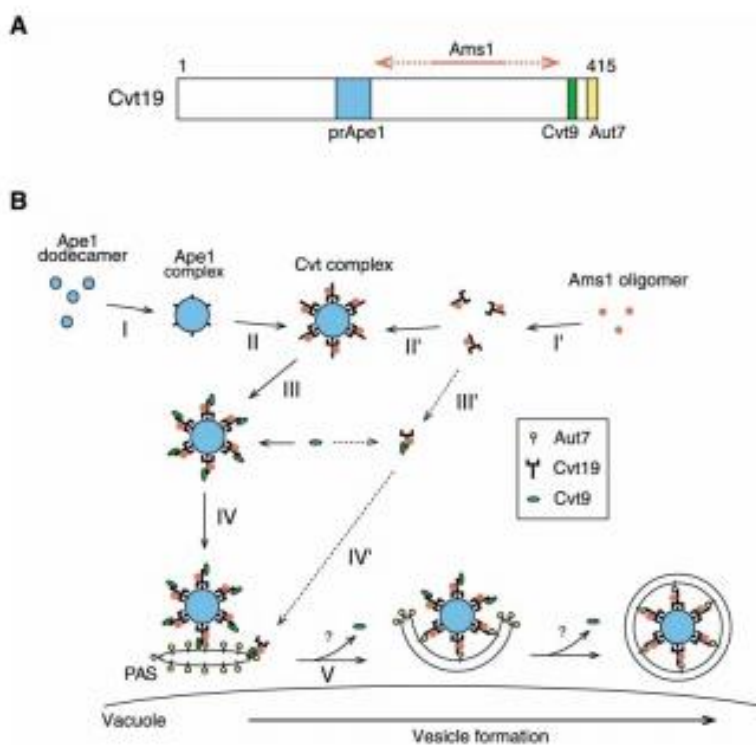
#### **Cvt هدایت می کند**

Cvt19 به عنوان یک نتیجه از واردات به واکوئل تخریب می شود، و نیمه عمر آن در سلول ape1 چهار برابر بیشتر از نیمه عمر آن در سلولهای نوع وحشی (Scott و همکاران، 2001) است. این باعث شد که ما بررسی کنیم که آیا یکی دیگر از پروتئین های باری،  $\alpha$  mannosidase (Ams1)، می تواند روی واردات Cvt19 تاثیر بگذارد یا خیر. ما آزمایش فاز-پالس را برای نظارت بر حمل و نقل preApe1 و Cvt19 برای واکوئل انجام دادیم. در  $ams1\alpha$ ، این حال، تخریب Cvt19 قابل مقایسه با تخریب سلول های نوع وحشی (شکل A5) بود. علاوه بر این، حذف

AMS1 به هرگونه تغییر در فرآوری prApe1 (به شکل A5) منجر نشد. این نتایج با میکروسکوپ فلورسانس، که موقعیت یابی طبیعی GFP-Cvt19 و GFP-Ape1 را در سلول های ams1 نشان داد حمایت می شدند (شکل B5). در مقابل، Cvt19 در سلولهای ape1 $\alpha$  تثبیت شد که مشابه با نتیجه دیده شده در سلول های apg1 $\alpha$  (شکل A5)، در توافق با مطالعات قبلی است (Scott و همکاران، 2001). این نتایج نشان داد که prApe1، اما نه Ams1، برای واردات های مناسب Cvt19 به واکوئل لازم است. به منظور بررسی در بیشتر آثار prApe1 در واردات Cvt19، ما محل GFP-Cvt19 را در apg1 در مقایسه با سلول های  $\alpha$  و ape1 $\alpha$  مقایسه نمودیم. همانطور که از موقعیت یابی GFP-Ape1 در سلول های apg1 انتظار می رفت، GFP-Cvt19 نیز در محل مجاور به واکوئل در فشار apg1،  $\alpha$  متمرکز شده است (شکل B5). در مقابل، در سلول های ape1 $\alpha$ ، GFP-Cvt19 به طور یکنواخت در سیتوپلاسم (شکل B5)، سازگار با توزیع پراکنده GFP-Cvt19، C263 و GFP-Cvt19 فاقد دامنه اتصال prApe1 (شکل D3) توزیع شد. در مجموع، این نتایج پیشنهاد می کند که کمپلکس Ape1 از طریق تعامل بین prApe1 و Cvt19 متمرکز می شود.

حمل و نقل Ams1 به واکوئل نیز در کشش  $cvt19\Delta$  معیوب است که نشان می دهد که Cvt19 برای هر دوی prApe1 و Ams1 (Scott و همکاران، 2001) گیرنده است. به علت واردات کاهش یافته Cvt19 در سلول های ape1، حمل و نقل Ams1 به واکوئل نیز می تواند کاهش یابد. برای آزمایش این فرضیه، ما تحت کنترل پروموتور درون زای AMS1، GFP-Ams1 را ساختیم و آن را در چند کشش جهش یافته بوسیله میکروسکوپ فلورسانس مورد بررسی قرار دادیم. در محیط کشت غنی، این ساختار، یک کشش حفره ای را با چند نقطه کوچک در منطقه پیش حفره ای در کشش نوع وحشی ارائه داد (شکل C5). القای اتوفاژی (مکانیزم اصلی کاتابولیک شامل تخریب سلول یا اجزای سلولی بدون وظیفه) به واسطه گرسنگی و یا درمان راپامایسین به یک نتیجه مشابه منجر شد اما سیگنال حفره را روشن تر ساخت (داده ها نشان داده نشده است). علاوه بر این، چندین نقطه کوچک GFP-Ams1، در لومن حفره در سلول های pep4 $\alpha$  مشاهده شد (داده ها نشان داده نشده است)، که نشان می دهد که GFP-Ams1 در وازیکول CVT گنجانیده شده است. هنگامی که تشکیل CVT (CVT) وازیکول با حذف APG1 مسدود می

شود، GFP-Ams1 در منطقه پیش حفره ای انباشته می شود (شکل 5C). در مقابل، حذف CVT19 یا APE1 ناشی GFP-Ams1 در سیگنال های پراکنده در سیتوپلاسم (شکل C5)، نشان می دهد که prApe1 و Cvt19 نیاز به انتقال و موقعیت یابی Ams1 در واکوئل و ساختار پیش حفره ای دارند. از آنجا که GFP-Ams1 هنوز هم توزیع سیتوزولی در  $\Delta cvt19$   $apg1\alpha$  و  $ape1\alpha$  کشش را نشان داد (داده ها نشان داده نشده است)، عملکرد Cvt19 و prApe1 در Ams1 حمل و نقل در یک مرحله زودتر از Apg1 به نظر می رسد. اگرچه GFP-Ams1 به عنوان یک نقطه برجسته در سلول  $cvt9\alpha$  انباشته می شود، نزدیک به واکوئل منتقل و موقعیت یابی می شود (شکل C5). علاوه بر این، مشاهده کردیم که YFP-Ams1 با CFP-Ape1 یا CFP-Cvt19 را در هر دو  $apg1$  و  $cvt9\alpha$  به طور همزمان موقعیت یابی می شود (شکل F5)، نشان می دهد که Ams1 در کمپلکس Ape1-Cvt19 انباشته می شود.



شکل 6. مدل هدف یابی انتخابی

CVT به وزیکول محموله های CVT

(A) رسم شماتیک حوزه های الزام آور در prApe1 . Cvt19 اتصال دامنه (آبی رنگ) در منطقه باقی مانده های اسید آمینه 153 تا 191، که شامل پیش بینی مارپیچ از شکل پیچش واقع می شود. این منطقه 10 اسید آمینه از 406 تا 415 ( زرد ) و در منطقه 8 اسید آمینه از 388 تا 395 ( سبز ) برای Aut7 های صحافی و Cvt9 الزام آور، به ترتیب می باشد . دامنه اتصال دقیق برای Ams1 شده است مشخص نشده است ، اما در منطقه ای در داخل باقی مانده اسید آمینه 192-387 ( فلش قرمز رنگ ) قرار گرفته است .

(b) پس از سنتز prApe1 آن را بلافاصله به شکل dodecamers های در سیتوزول ، که بیشتر به یک Ape1 کمپلکس وابسته به propeptide آن مونتاژ می شود. Cvt19 سپس به Ape1 پیچیده می شود، که آن هم توسط propeptide prApe1 واسطه متصل می شود. از آنجا که Ams1 قادر به به معاشرت با Cvt19 از طریق یک دامنه مشخص از دامنه اتصال prApe1 است، Ams1 را می توان در کمپلکس Ape1 به عنوان نتیجه پیچیده نمود و تشکیل Ape1 Cvt19 متمرکز می شود. Cvt9 سپس با پایانه C Cvt19 برای به کارگیری کمپلکس Ams1 - Cvt19 Ape1 به PAS ، جایی که Aut7 متصل به پایانه C Cvt19 است برای اطمینان از اختلاط کمپلکس به وزیکول CVT تعامل پیدا می کند. برای جزئیات بیشتر متن را مشاهده کنید.

برای روشن شدن اینکه آیا تجمع از Ams1 در و کمپلکس Ape1 - Cvt19 ، وابسته به تعامل بین Ams1 و Cvt19 است ، ما یک آزمایش جداسازی پیوستگی را از عصاره apg1 یک پروتئین  $\alpha$  سلولهای بیان پروتئین A- Cvt19 و HA- برچسب گذاشته شده توسط Ams1 انجام دادیم. همانطور که در شکل D5 نشان داده شده است ، HA- Ams1 به با پروتئین A- Cvt19 از عصاره سلول apg1  $\alpha$  به طور همزمان خالص سازی شد. همراه با داده ها از شکل 3 ، این نتیجه شکل یک کمپلکس Ams1 Cvt19 Ape1 را پیشنهاد می دهد. علاوه بر این، ما متوجه شدیم که تعامل Ams1 Cvt19 هنوز وجود دارد، حتی در ape1  $\alpha$  apg1Δ سلول ها، که در آن Ams1 در سیتوپلاسم ( D5 شکل ) پراکنده شده است و نشان می دهد که Ams1 و Cvt19 می تواند یک کمپلکس گیرنده باری باشد که در نتیجه کمپلکس Ape1 را تشکیل می دهند. اگر این امکان وجود دارد و به شکل های پیچیده Ams1 - Cvt19 Ape1 است، محل های اتصال برای prApe1 و Ams1 در داخل Cvt19 باید در مکان های



مختلف واقع شده باشد. برای آزمایش این مورد، ما یک جداسازی پیوستگی را از پروتئین  $\alpha$  lysates apg1 سلول  $\alpha$  acvt19 از بیان HA- Ams1 و پروتئین C28  $\alpha$  A- Cvt19 و یا پروتئین A- Cvt19 224C انجام در نتیجه دادیم. تست Western blots نشان داد که پروتئین C28  $\alpha$  A- Cvt19 قادر به جلو و پایین نمودن هر دو prApe1 و Ams1 بود، در حالی که تنها prApe1 با پروتئین Cvt19 رسوب شد (شکل 5E). این نتیجه که Ams1 از طریق محل این است که جدا از محل اتصال prApe1 (شکل A6) با Cvt19 در ارتباط است.

## References

- Abeliovich, H., Dunn, W.A., Jr., Kim, J., and Klionsky, D.J. (2000). Dissection of autophagosome biogenesis into distinct nucleation and expansion steps. *J. Cell Biol.* 151, 1025–1034.
- Adams, A., Gottschling, D.E., Kaiser, C.A., and Stearns, T. (1998).

Methods in Yeast Genetics. A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Baba, M., Osumi, M., Scott, S.V., Klionsky, D.J., and Ohsumi, Y. (1997). Two distinct pathways for targeting proteins from the cytoplasm to the vacuole/lysosome. *J. Cell Biol.* 139, 1687–1695.

Brunk, U.T., and Terman, A. (2002). The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging: accumulation of damaged mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis. *Eur. J. Biochem.* 269, 1996–2002.

Gerhardt, B., Kordas, T.J., Thompson, C.M., Patel, P., and Vida, T. (1998). The vesicle transport protein Vps33p is an ATP-binding protein that localizes to the cytosol in an energy-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 273, 15818–15829.

Ho, Y., Gruhler, A., Heilbut, A., Bader, G.D., Moore, L., Adams, S.L., Millar, A., Taylor, P., Bennett, K., Boutilier, K., et al. (2002). Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature* 415, 180–183.

Hutchins, M.U., and Klionsky, D.J. (2001). Vacuolar localization of oligomeric  $\alpha$ -mannosidase requires the cytoplasm to vacuole targeting and autophagy pathway components in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 276, 20491–20498.

James, P., Halladay, J., and Craig, E.A. (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 144, 1425–1436.

Kamada, Y., Funakoshi, T., Shintani, T., Nagano, K., Ohsumi, M., and Ohsumi, Y. (2000). Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J. Cell Biol.* 150, 1507–1513.

pathway proteins, Cvt13 and Cvt20, to phosphatidylinositol 3-phosphate at the pre-autophagosomal structure is required for selective autophagy. *J. Biol. Chem.* 277, 30198–30207.

Noda, T., Suzuki, K., and Ohsumi, Y. (2002). Yeast autophagosomes: de novo formation of a membrane structure. *Trends Cell Biol.* 12, 231–235.

Oda, M.N., Scott, S.V., Hefner-Gravink, A., Caffarelli, A.D., and Klionsky, D.J. (1996). Identification of a cytoplasm to vacuole targeting determinant in aminopeptidase I. *J. Cell Biol.* 132, 999–1010.

Reggiori, F., and Klionsky, D.J. (2002). Autophagy in the eukaryotic cell. *Eukaryot. Cell* 1, 11–21.

Robinson, J.S., Klionsky, D.J., Banta, L.M., and Emr, S.D. (1988). Protein sorting in *Saccharomyces cerevisiae*: isolation of mutants defective in the delivery and processing of multiple vacuolar hydrolases. *Mol. Cell. Biol.* 8, 4936–4948.

Scott, S.V., Hefner-Gravink, A., Morano, K.A., Noda, T., Ohsumi, Y., and Klionsky, D.J. (1996). Cytoplasm to vacuole targeting and autophagy employ the same machinery to deliver proteins to the yeast vacuole. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 12304–12308.

Scott, S.V., Baba, M., Ohsumi, Y., and Klionsky, D.J. (1997). Aminopeptidase I is targeted to the vacuole by a nonclassical vesicular mechanism. *J. Cell Biol.* 138, 37–44.

Scott, S.V., Nice, D.C., III, Nau, J.J., Weisman, L.S., Kamada, Y., Keizer-Gunnink, I., Funakoshi, T., Veenhuis, M., Ohsumi, Y., and Klionsky, D.J. (2000). Apg13p and Vac8p are part of a complex of phosphoproteins that are required for cytoplasm to vacuole targeting. *J. Biol. Chem.* 275, 25840–25849.

Scott, S.V., Guan, J., Hutchins, M.U., Kim, J., and Klionsky, D.J.

Kim, J., Scott, S.V., Oda, M.N., and Klionsky, D.J. (1997). Transport of a large oligomeric protein by the cytoplasm to vacuole protein targeting pathway. *J. Cell Biol.* 137, 609–618.

Kim, J., Huang, W.-P., and Klionsky, D.J. (2001a). Membrane recruitment of Aut7p in the autophagy and cytoplasm to vacuole targeting pathways requires Aut1p, Aut2p, and the autophagy conjugation complex. *J. Cell Biol.* 152, 51–64.

Kim, J., Kamada, Y., Stromhaug, P.E., Guan, J., Hefner-Gravink, A., Baba, M., Scott, S.V., Ohsumi, Y., Dunn, W.A., Jr., and Klionsky, D.J. (2001b). Cvt9/Gsa9 functions in sequestering selective cytosolic cargo destined for the vacuole. *J. Cell Biol.* 153, 381–396.

Kim, J., Huang, W.-P., Stromhaug, P.E., and Klionsky, D.J. (2002). Convergence of multiple autophagy and cytoplasm to vacuole targeting components to a perivacuolar membrane compartment prior to de novo vesicle formation. *J. Biol. Chem.* 277, 763–773.

Kirisako, T., Baba, M., Ishihara, N., Miyazawa, K., Ohsumi, M., Yoshimori, T., Noda, T., and Ohsumi, Y. (1999). Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast. *J. Cell Biol.* 147, 435–446.

Klionsky, D.J., Cueva, R., and Yaver, D.S. (1992). Aminopeptidase I of *Saccharomyces cerevisiae* is localized to the vacuole independent of the secretory pathway. *J. Cell Biol.* 119, 287–299.

Klionsky, D.J., and Ohsumi, Y. (1999). Vacuolar import of proteins and organelles from the cytoplasm. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15, 1–32.

Klionsky, D.J., and Emr, S.D. (2000). Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 290, 1717–1721.

Leber, R., Silles, E., Sandoval, I.V., and Mazon, M.J. (2001). Yol082p, a novel CVT protein involved in the selective targeting of aminopeptidase I to the yeast vacuole. *J. Biol. Chem.* 276, 29210–29217.

LeMasters, J.J., Nieminen, A.L., Qian, T., Trost, L.C., Elmore, S.P., Nishimura, Y., Crowe, R.A., Cascio, W.E., Bradham, C.A., Brenner, D.A., and Herman, B. (1998). The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochim. Biophys. Acta* 1366, 177–196.

Luijken, J.J., van den Berg, M., Heikoop, J.C., and Meijer, A.J. (1992). Autophagic degradation of peroxisomes in isolated rat hepatocytes. *FEBS Lett.* 304, 93–97.

Nice, D.C., Sato, T.K., Stromhaug, P.E., Emr, S.D., and Klionsky, D.J. (2002). Cooperative binding of the cytoplasm to vacuole targeting

(2001). Cvt19 is a receptor for the cytoplasm-to-vacuole targeting pathway. *Mol. Cell* 7, 1131–1141.

Segui-Real, B., Martinez, M., and Sandoval, I.V. (1995). Yeast aminopeptidase I is post-translationally sorted from the cytosol to the vacuole by a mechanism mediated by its N-terminal extension. *EMBO J.* 14, 5476–5484.

Silles, E., Mazon, M.J., Gevaert, K., Goethals, M., Vandekerckhove, J., Leber, R., and Sandoval, I.V. (2000). Targeting of aminopeptidase I to the yeast vacuole is mediated by Ssa1p, a cytosolic member of the 70-kDa stress protein family. *J. Biol. Chem.* 275, 34054–34059.

Suzuki, K., Kirisako, T., Kamada, Y., Mizushima, N., Noda, T., and Ohsumi, Y. (2001). The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *EMBO J.* 20, 5971–5981.

Tolkovsky, A.M., Xue, L., Fletcher, G.C., and Borutaite, V. (2002). Mitochondrial disappearance from cells: a clue to the role of autophagy in programmed cell death and disease? *Biochimie* 84, 233–240.