בירור חלקם של חלבונים ויראליים וקוטיקולריים

ביעילות ההעברה של פוטיוירוסים

ע״י כנימות עלה

חיבור לשם קבלת תואר דוקטור לפילוסופיה

מאת

אביב דומברובסקי

הוגש לסינט האוניברסיטה העברית, בירושלים

אדר-תשס״ו

עבודה זו נעשתה בהדרכתם של:

פרופ' בנימין רקח

המחלקה לוירולוגיה

ודר' נור צחנובסקי

המחלקה לאנטומולוגיה

מנהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני בית דגן.

ברצוני להודות:

לפרופ' בנימין (בני) רקח:

על המזל הרב שנפל בחלקי לזכות בהדרכה וחינוך קפדני בתחום המקצועי אך עם חופש מדעי לנסות לברר ולחקור בכיוונים שונים בכדי לקדם את תוצאותיה של עבודה זו.
ומעבר לכך, על יכולתו לייעץ, להדריך ולסייע הן בכתיבה המדעית ובקשיים הטכניים שנתגלעו במהלך העבודה והן בבעיות היום יום האישיות שהופיעו במהלך תקופת לימודי במעבדתו.
כמו כן על דאגתו, תמיכתו ועזרתו הרבה לצעדי העתידיים כהכנה ליום שאחרי לימודים אלו.

לדר' נור צחנובסקי:

על ההדרכה והייעוץ המקצועי במהלך העבודה.

לדר' אירנה סובולב ולסימה זינגר:
על העזרה במהלך העבודה היומיומית.
לכל חברי המחלקה לוירולוגיה עימם ניתן היה להתייעץ בכל עת.
לפרופ' עבד גרא לדר' שרה שפיגל על הליווי והעזרה בכל בעיה במהלך התקופה.
לפרופ' משה בר-יוסף, לדר' ארווה אואט, לדר' עמית גל-און, לדר' רפי סלומון, לדר' ויקטור גאבה ולדר' מוניר מואסי על יכולתם לייעץ ולסייע בכל עת.
לדר' נתן גולופ ולדר' צאין על העזרה עם ה- 2D.
ליהודית תם ולזוריה. לפסח קציר ולשמחה אושרי על הטיפול האיכותי בצמחי החממה.
לסטודנטים מהמעבדות השונות במחלקה אשר הפכו לחברים טובים וניתן היה להסתייע בהם ולהחליף מידע וחוויות בכל עת (ע"פ סדר היכרותי עימם):
בראש ובראשונה לאוזגור בוטומן על החברות הטובה והעזרה במהלך שנות היכרותנו.
לאיתי מעוז, שלי דרור-להב, ליאת סיטי,יואל שיבולת, בועז קימלוב, תמר חורש, רינת ברקוביץ, עודד כהן, אהרון בלאלו, גיורא ברקן, סברינה חביב, רוני הוכמן וכמובן לאלינה חרונסקי .
לכולם תודה רבה על החברות במהלך התקופה.

עבודה זו מוקדשת לזוגתי לחיים ריקי דומברובסקי שידעה לעזור לתמוך ולסייע במהלך כל התקופה כך שאוכל להתמקד ככל האפשר ל לימודי במעבדה.
למשפחה הקרובה ששימשו משענת יציבה במהלך התקופה:
להורי דויד ואסתר דומברובסקי לסבתי שמחה חייט לאחיותי עינת מורן ושיר ולבני זוגם לחיים: יואב סופר ואיציק אביטן.
וכמובן להוריה של ריקי: אורית וסלו בן עמי שעזרו לנו רבות במהלך התקופה.

תקציר:

פוטיוירוסים (Potyviruses) מועברים מצמחים נגועים באמצעות כנימות עלה בצורה חולפת. בתהליך העברה של הפוטיוירוסים ע״י כנימות עלה מסייע חלבון ויראלי לא מבני Helper (הלפר), ההשערה הרווחת היא, כי חלבון ההלפר משמש כעין ״גשר״ בין חלקיק הוירוס לבין חדק הכנימה.

שני הפוטיוירוסים: *Zucchini Yellow Mosaic Virus* (ZYMV) התוקף צמחים ממשפחת הדילועיים ו- *Turnip Mosaic Virus* (TuMV) התוקף צמחים ממשפחת המצליבים, שימשו וירוסי מודל לבחינת ספציפיות העברה של פוטיוירוסים ע״י מיני כנימות עלה הנבדלים בטווח הפונדקאים שלהם.

מתוצאות ניסויי העברה של ZYMV ו- TuMV (רכישה מצמחים נגועים או ע״ג ממברנה) באמצעות מינים שונים של כנימות עלה, אנו למדים על קיומם של הבדלים בין מינים הניזונים על טווח פונדקאים רחב לעומת מינים הניזונים על טווח פונדקאים צר. כנימות העלה: *Myzus persicae* ו- *Aphis gossypii* (טווח פונדקאים רחב) מעבירות בסיוע חלבון ההלפר של ZYMV הן את הוריונים ההומולוגיים (של ZYMV) אך גם ויריונים הטרולוגיים (של TuMV). ממצא זה מצביע על קיום זיקה בין חלבון ההלפר של ZYMV לויריון של TuMV. לעומת זאת, שני מיני הכנימות הנ״ל העבירו בסיוע חלבון ההלפר של TuMV ויריונים של TuMV, אך כשלו ביכולתם להעביר באמצעות חלבון ההלפר של TuMV ויריונים של ZYMV. ממצא זה מצביע על העדר זיקה בין חלבון ההלפר של TuMV לויריונים של ZYMV. על מנת לבחון את חלקו של חלבון המעטפת של הויריון בזיקה אל חלבון ההלפר, הוכן וירוס כימרי המכונה ZY-TuNT בו הוחלף הקצה ה- N של חלבון המעטפת של ZYMV בקטע חופף של TuMV. חלבון ההלפר של TuMV אפשר העברה של הוירוס הכימרי ZY-TuNT ע״י כנימות העלה בעוד שויריונים של וירוס המוצא (ZYMV) לא הועברו עם חלבון ההלפר של TuMV. תוצאות אלו, מוכיחות את מעורבות הקצה ה- N של חלבון המעטפת, בהכרה של חלבון הלפר הומולוגי. כנימות העלה *M. persicae* ו- *A. gossypii* מעבירות הן ZYMV והן TuMV ביעילות, מאידך כנימות המצליבים *Brevicoryne brassicae* ו- *Lipaphis erysimi* מעבירות ביעילות TuMV אך אינן מעבירות ZYMV. תוצאות אלו מצביעות לכאורה על העדר זיקה בין אברי הפה של הכנימה לויריון או לקומפלקס הלפר- ויריון.

הבנת הזיקה של חלבון ההלפר אל חדק הכנימה חייבה ללמוד על המרכיבים של גפי הפה המעורבים בהעברה של הוירוס. שטח הפנים של חלל צינור המזון בדוקרנים המאקסילרים בחדק הכנימה עשוי קוטיקולה. הקוטיקולה בחרקים מורכבת מסיבי כיטין שקועים (embedded) בחלבונים קוטיקולריים ושעוות. חלק גדול מהחלבונים הקוטיקולריים (ח״ק) מתאפיינים ביכולת קישור אל מרכיב הכיטין בקוטיקולה. ידועים סוגים שונים של ח״ק הנבדלים זה מזה בטיפוס האתר השמור בחלבון. רצף ח׳ האמינו של אתר זה מכונה בשם R&R consensus ומייחסים לו את היכולת להתקשר אל הכיטין Chitin Binding Domain (CBD). חלבונים קוטיקולריים המצויים באזורים קשיחים או גמישים בקוטיקולה עשויים להציג טיפוסי R&R שונים.

בחרקים מסדרת Hemiptera ובכנימות עלה בפרט, לא היה קיים כל מידע קודם על חלבונים קוטיקולריים או על הגנים המקודדים להם. לכן, היה צורך להקדיש מאמץ רב בעבודה הנוכחית ליצירת בסיס ידע לחלבונים אלו. על מנת לבודד גנים לחלבונים קוטיקולריים, הוכנו ספריות cDNA של הכנימה *M. persicae* ונסרקו באמצעות נוגדן כנגד חלבונים קוטיקולריים או באמצעות תחלים (primers) ספציפיים המתאימים לרצפים שמורים בגנים ל ח״ק בריאקציות PCR. בדרך זו, התאפשר בידוד ואפיון cDNA ובהמשך גם DNA גנומי המקודדים ליצירת שישה חלבונים קוטיקולריים. חמישה מתוכם, כללו את מוטיב ה- R&R. שלושה גנים לח״ק מסוג RR-2 (אשר מצויים בד״כ באזורים קשיחים בקוטיקולה). בנוסף בודדו שני גנים לחלבונים קוטיקולריים מסוג RR-1 (אשר מצויים בד״כ באזורים גמישים בקוטיקולה). כמו כן, בודד גן נוסף אשר היה חסר בו מוטיב ה- R&R אך הראה דמיון רב ברצף לגנים לח״ק הידועים בחרקים אחרים. בידוד רצפי cDNA הומולוגיים ל- שלושה ח״ק נבחרים: MpCP1, MpCP2 ו- MpCP5 ממינים נוספים של כנימות עלה אפשר השוואה של רצף ח׳ האמינו החזוי ללימוד מידת הזהות והשוני הקיים ברצף הח״ק של מיני כנימות עלה שונים: הח״ק MpCP1 נמצא שמור מאוד בקרב חמישה מינים שונים נוספים של כנימות עלה אותם בדקנו: (*A. gossypii*, *B. brassicae*, *Rhopalosiphum maidis*, *Aphis fabae* ו- *L. erysimi*). שונות גבוה במעט נמצאה בח״ק MpCP2 בקרב ארבעה מינים שונים נוספים של כנימות עלה אותם בדקנו: (*A .gossypii*, *B. brassicae*, *A. fabae* ו- *R. padi*). לעומתם, בח״ק MpCP5 נמצאה השונות הגבוהה ביותר בקרב שלושת המינים הנוספים של כנימות עלה אותם בדקנו: (*A .gossypii*,

B. brassicae ו- *A. fabae*). בנוסף, השוואת רצף ח' האמינו החזויות של כ"א מהח"ק: MpCP1, MpCP2 ו- MpCP5, אפשרה קבלת מידע על האתרים השמורים והשונים בכ"א מהח"ק במיני כנימות העלה המוזכרים מעלה.

גנים לח"ק מטיפוס RR-1 אשר בודדו מגנום הכנימה *M. persicae* הראו נוכחות אינטרונים. בגנים לח"ק מטיפוס RR-2 לא נמצאו אינטרונים. בגן gMpCP4 נמצא אינטרון גדול יחסית (472bp) בעוד בגן gMpCP5 נמצאו שני אינטרונים קטנים יותר (85bp ו- 149bp).

שני גנים לח"ק הנבדלים באתר ה- R&R השמור בוטאו בחיידקי *Escherichia coli* לקבלת שני החי"ק: MpCP2 ו- MpCP5. חלבונים אלו שימשו כאנטיגן להכנת נוגדנים ספציפיים בארנבות. נוגדנים אלו, שימשו בהמשך לזיהוי וסיווג ח"ק של כנימות עלה.

בנוסף לבידוד cDNA וגנים לח"ק של כנימות עלה, נעשה מאמץ למצות ח"ק מכנימות עלה שלמות. שיטת המיצוי של הח"ק מכנימות העלה, התבססה על שיטות ידועות שפותחו למיצוי ח"ק בחרקים אחרים, זהותם של מרבית החלבונים במיצוי כח"ק, נקבעה לאחר זיהויים באמצעות הנוגדנים הספציפיים שהוכנו בעבודה זו כנגד ח"ק של כנימת עלה האפרסק.

החלבונים שמוצו מכנימת עלה האפרסק שימשו לבחינת קיום זיקה *in vitro* אל חלבון ההלפר הפוטיויראלי. ח"ק לאחר הפרדתם בג'ל אקרילאמיד באלקטרופורזה (חד ממדית) הועברו אל ממברנה ונחשפו בשיטת ה-overlay לחלבון ההלפר. נוכחות חלבון הלפר קשור אל חלבונים במיצוי מהכנימה נבחנה באמצעות נוגדן כנגד חלבון ההלפר. בחינה זו העידה על קיומה של זיקה אל שלושה פסי חלבונים במיצוי מהכנימה. כביקורת שימש חלבון הלפר מוטנט (שאינו מסייע להעביר וירוס) ואכן חלבון זה לא הראה זיקה אל אותם פסי החלבון. כמו כן, נבחנו דוגמאות מיצוי ח"ק משני חרקים המעבירים וירוס, אך אינם מעבירים ZYMV: כנימת עלה הכרוב *B. brassicae* וכנימת עש הטבק *Bemisia tabaci*. חלבון הלפר פעיל של ZYMV לא הראה זיקה אל מיצוי הח"ק מכנימת עלה הכרוב ומכנימת עש הטבק. ממצא זה מצביע על זיקה ספציפית של חלבון ההלפר של ZYMV אל ח"ק מכנימת עלה האפרסק שהינה ווקטור יעיל ל-ZYMV.

התיאוריה המקובלת על מרבית החוקרים להעברת פוטיוירוסים ע"י כנימות עלה, גורסת כי חלבון ההלפר משמש כ- "גשר" בין חדק הכנימה לחלקיק הויראלי וחלבון ההלפר הוא זה שנקשר לחדק הכנימה. על מנת לבחון נכונות תיאוריה זו, נבחן קיום זיקה ישירה בין חלבון מעטפת של ZYMV לבין

חלבונים קוטיקולריים באופן דומה לזה שבו נבחן קיום הזיקה של חלבון ההלפר. בחינה זו העלתה שלא התקיימה זיקה בין חלבון המעטפת או ויריונים של ZYMV אל חלבונים במיצוי מכנימת העלה *M. persicae*, זיקה זו התאפשרה רק כאשר הוסף חלבון הלפר אל הויריונים. ממצא זה מאשש את תיאורית הגשר. היות ופסי החלבונים (שמקורם במיצוי מכנימות העלה) אשר הגיבו עם חלבון ההלפר היו סמוכים זה לזה, לא ניתן היה להפרידם במידה המספיקה לצורך קביעת רצף חומצות האמינו. על מנת להשיג הפרדה טובה יותר, של מיצוי הח״ק נעשה שימוש בשיטת ההפרדה הדו-ממדית של חלבונים (2D). בדרך זו ניתן היה לאתר ולחלץ מהג׳ל באופן מדויק את כתמי חלבוני הכנימה שהראו זיקה אל חלבון ההלפר של ZYMV. כתמים אלו שימשו לקביעת רצף ח׳ האמינו שלהם. קביעת רצף ח׳ האמינו בדרך של Mass-Spectrometry אפשרה לאמת כי אלו אכן ח״ק. זיהוים כ- ח״ק התאפשר גם באמצעות הנוגדנים הספציפיים כנגד חלבונים קוטיקולריים של כנימת עלה. ממצא זה מאשר את הזיקה של חלבון ההלפר לחלבונים קוטיקולריים של כנימות עלה.

בסיכום, בעבודה זו, הוכח חלקו של הקצה ה-N של חלבון המעטפת בהכרה של חלבון ההלפר הפוטיויראלי. בודדו לראשונה cDNA וגנים לחלבונים קוטיקולריים של כנימות עלה והוכח כי חלק מהחלבונים הקוטיקולריים של כנימת העלה *M. persicae* מראים זיקה *in vitro* לחלבון ההלפר של הפוטיוירוס ZYMV.

תוכן עניינים:

1. סקירת ספרות:..3

1.1. וירוסים של צמחים: 3
1.2. צורות העברה של וירוסים בצמחים: 4
1.3. קבוצת הפוטיוירוסים (Potyviruses):..5
1.4.העברה של פוטיוירוסים באמצעות כנימות עלה: 9
1.5. מאפיינים כלליים של כנימות עלה: 16
1.6. רכישת ויריונים של פוטיוירוסים ע"י כנימות העלה: 20
1.7. חלבונים קוטיקולריים בחרקים Insect Cuticle Proteins: 22
1.8. אתרים שמורים בחלבונים קוטיקולריים המעורבים בקישורם אל הכיטין: 23
1.9. רצפים חוזרניים (Motifs) הידועים בחלבונים קוטיקולריים:..25
1.10. חלבונים קוטיקולריים שאינם מבניים:..26
1.11. נוכחות אינטרונים (Introns) בגנים לחלבונים קוטיקולריים:..28
1.12. תפקידם המשוער של האינטרונים: 29
1.13. מטרות המחקר: 30

2. שיטות וחומרים:..31

2.1. גידול מיני כנימות העלה: 31
2.2. סוג ומקור הוירוסים: 31
2.3. צמחי מקור לניקוי וירוס והלפר: 32
2.4. צמחי בוחן: 32
2.5. הדבקת צמחי מקור וצמחי בוחן: 32
2.6. ניקוי פוטיוירוסים:..33
2.7. ניקוי חלבוני "הלפר" Helper Component Proteinase (HC-Pro):..36
2.8. הפרדת חלבונים בג'ל אקרילאמיד (PAGE) בנוכחות SDS : 38
2.9. הכנת החלבונים לקביעת רצף: 41
2.10. שיטות סרולוגיות: 42
2.11. מיצוי חלבונים קוטיקולריים מכנימות עלה:..45
2.12. שיטות כלליות לעבודה מולקולארית: 46

2.13. תוכנות ביו-אינפורמטיות: 49

2.14. הכנת ספריות cDNA ממיני הכנימות השונים.. 49

2.15. סריקת ספריות ה- cDNA של כנימת העלה לבידוד cDNA לחלבונים קוטיקולריים חדשים: 50

2.16. ביטוי גנים לחלבונים קוטיקולריים מכנימות עלה בחיידקים: 53

2.17. שימוש בכרומטוגרפיה של זיקה אל - Ni-NTA להפרדה של החלבונים קוטיקולריים לאחר ביטויים בחיידקים:.. 55

2.18. הכנת נוגדנים רב שבטיים בארנבת כנגד חלבונים קוטיקולריים:...................... 56

2.19. שימוש בשבטים אינפקטיבים של ZYMV: 57

3. תוצאות:... 58

3.1. מאמר ראשון:

Dombrovsky A, Huet H, Zhang H, Chejanovsky N, Raccah B. (2003). Comparison of newly isolated cuticular protein genes from six aphid species. Insect. Biochem. Mol. Biol. 33, 709-715: 59

3.2. מאמר שני:

Dombrovsky A, Huet H, Chejanovsky N, Raccah B. (2005). Aphid transmission of a potyvirus depends on suitability of the helper component and the N terminus of the coat protein. Arch. Virol. 150, 287-298. 67

3.3. בידוד cDNA וגנים לחלבונים קוטיקולריים מכנימת העלה *Myzus persicae* 79

3.4. אפיון הזיקה בין חלבון ההלפר של ZYMV לחלבונים קוטיקולריים שמוצו מכנימת עלה האפרסק *Myzus persicae*: 100

4. דיון: 119

רשימת ספרות.. 136

נספחים:.. 163

Abstract:... I

1. סקירת ספרות:

1.1. וירוסים של צמחים:

וירוסים של צמחים, פוגעים ברוב צמחי הבר והתרבות, מחלות וירוס גורמות לנזקים כלכלים כבדים במגוון גידולים חקלאים: עצי פרי וירקות. מכיוון שהצמחים נטועים במקומם, הפצתו של הוירוס לצמחים פונדקאים חדשים תלויה על פי רוב בווקטור. מגוון אורגניזמים ידועים ביכולתם לשמש כווקטור: חרקים, פטריות ונמטודות. רוב מוחלט של וירוסים התוקפים צמחים, מועברים ע"י ווקטורים המשתייכים למערכת פרוקי הרגלים (Arthropoda) ובעיקר ע"י חרקים. מכלל החרקים המשמשים כווקטורים רובם משתייכים לסדרת הפשפשאים (Hemiptera) המתאפיינים בגפי פה דוקרים ומוצצים (Watson & Roberts, 1939; Watson, 1940). מבין הפשפשאים, מרבית הווקטורים המעורבים בהעברת וירוסים של צמחים מצויים במשפחת כנימות העלה (Aphididae). כנימות העלה משמשות כווקטור החשוב ביותר בהעברת וירוסים של צמחים. במהלך האבולוציה התפתחו התאמות ומנגנוני הגנה בין שלושת הגורמים הביוטים המעורבים: הצמחים, החרקים והוירוסים. התפתחו התאמות של הוירוס והחרק אל מחזור הגידול של הצמח והתאמה בין הוירוס לחרק, התאמה זו חשובה מאוד למידת העבירות של הוירוס. בשנים האחרונות, הוכח כי בצמחים ישנם מנגנוני הגנה כנגד חדירת גנים זרים, במערכות של צמחים טרנסגנים (English *et al.*, 1996) וכנגד גנים ויראלים (Baulcombe, 1996). הוירוס מתמודד במקביל כנגד מערכת ההגנה הצמחית באמצעות חלבונים ויראלים המצליחים לנטרל את תהליך ההשתקה של הגנים הזרים. בוירוסים מקבוצת הפוטיוירוסים (Potyviruses) חלבון ההלפר בנוסף לתפקידו המרכזי בהעברה של הוירוס ע"י כנימות עלה הוא התגלה גם כמדכא (Suppressor) יעיל במיוחד של (PTGS) Posttranscriptional gene silencing (Voinnet *et al.*, 1999; Kasschau & Carrington, 1998).

עבודה זו, עוסקת בלימוד הגורמים הקובעים את יעילות ההעברה של פוטיוירוסים המועברים בהעברה חולפת ע"י מינים שונים של כנימות עלה. **לכן, ההתמקדות בסקירת הספרות ובעבודה עצמה היא בהבנת האינטראקציה שבין הווקטור- כנימת העלה לבין חלבוני הוירוס המעורבים בתהליך העברה: חלבון ההלפר וחלבון המעטפת המרכיב את החלקיק הויראלי.**

1.2. צורות העברה של וירוסים בצמחים:

בטבע, העברה של וירוסים לצמחים תלויה בארבעה מרכיבים: צמח מקור נגוע בוירוס, ווקטור מתאים להעברה של הוירוס, צמח פונדקאי שאיננו נגוע "בריא" המתאים להדבקה בוירוס וגורמי סביבה המתאימים להם. הוגדרו שלוש צורות העברה של וירוסים ע"י חרקים: העברה חולפת (Non-persistent), העברה חצי מתמדת (Semi-persistent) והעברה מתמדת (Persistent). החלוקה נעשתה בהתאם לשלושה מאפיינים עיקריים: משך הזמן הנדרש לרכישת הוירוס ע"י החרק (Acquisition), משך זמן השהיה של הוירוס בגוף החרק (Retention) ומשך הזמן הנדרש להדבקת הצמח (Inoculation). בוירוסים מתמידים: משך הזמן הדרוש לרכישת הוירוס הוא ארוך, מספר שעות ולעיתים אף יותר. לאחר מכן יש צורך בתקופה לטנטית (בד"כ מספר ימים) במהלכם החרק עדין אינו מאפשר העברה של הוירוס. החרק המודבק, מאפשר העברה של הוירוס לצמחים במשך רוב תקופת חיו (הוירוס אינו אובד בזמן הנשל), חלק מהוירוסים המתמידים אף מתרבים בגוף החרק. פרק הזמן הדרוש להדבקה הוא דקות עד שעות ולעיתים אף ימים. בוירוסים מתמידים מתקיימת התאמה רבה בין הוירוס והחרק ורק מינים בודדים של כנימות עלה מאפשרים העברה של וירוסים אלו. להבדיל מצורת העברה מתמדת, בהעברה חולפת כל אחד מהשלבים, הזנה ו- הדבקה הוא קצר ביותר 10 עד 20 שניות. משך הזמן בו נשמר הוירוס בגפי הפה של הכנימה הוא קצר ביותר דקות עד כשעה ומשך זמן הדרוש להדבקה הוא קצר גם כן שניות ספורות עד דקות. לא קימת תקופה לטנטית לאחר רכישת הוירוס, כך שלמעשה החרק מיד לאחר רכישת הוירוס מסוגל להעבירו לצמחים חדשים. בוירוסים חולפים ישנה התאמה נמוכה בין הוירוס והחרק, ידועים מינים רבים של כנימות עלה המסוגלים להעביר וירוסים אלו. בוירוסים המועברים בהעברה חצי מתמדת, פרק הזמן הדרוש לרכישת הוירוס או להדבקה בוירוס הוא ממושך אך אינו כה ארוך כמו בהעברה מתמדת, הוירוס נרכש על פי רוב מרקמת השיפה. וירוסים המועברים בהעברה חצי מתמדת אינם חוצים את ממברנות המעי בחרק ואינם מתרבים בגוף החרק בדומה להעברה חולפת. קישור הוירוסים החצי מתמידים נעשה אל אזורים נרחבים בגפי הפה של החרק ולא רק בקדמתו כפי שמתקיים בוירוסים חולפים (Watson & Roberts, 1939; Sylvester, 1954; Raccah *et al.*, 2001).

1.2.1. עדויות לקיומה של ספציפיות בהעברה של וירוסים חולפים ע"י כנימות עלה:

בשל העובדה כי בהעברה חולפת מתקיימת ספציפיות נמוכה בין הוירוס אל החרק ובעבר אף נהגו להשתמש בשני תיאורים לאופן העברה זה: בראשון הכנימה מתוארת כ- "מחט מעופפת" המאפשרת את העברת הוירוסים מהצמחים הנגועים אל הבריאים, כאשר הויריונים ספוחים אל חלקו הפנימי של קצה החדק Stylet -tip של הכנימה (Taylor & Robertson, 1974) כך שלא מתקיימת כל ספציפיות בתהליך העברה. בתיאור השני הכנימה מאופיינת כ"מזרק מעופף", כאשר הזנת הרכישה והזנת ההדבקה של הוירוס הם שני תהליכים נפרדים בעלי מאפיינים ומרכיבים שונים (Gamez & Watson, 1964; Harris, 1977). כיום מתברר ששני תיאורים אלו אינם מדויקים דיים: מיני כנימות העלה נבדלות ביכולתם להעביר וירוסים שונים: קיימים מינים מסוימים המעבירים וירוסים רבים, לרוב מינים אלו מאכלסים טווח פונדקאיים רחב, לעומתם ידועים מינים אחרים המעבירים וירוסים ספורים או שאינם מעבירים כלל, מינים אלו בד"כ מאכלסים טווח פונדקאים צר (Raccah *et al.*, 1985; Wang *et al.*, 1998).

1.3. קבוצת הפוטיוירוסים (Potyviruses):

פוטיוירוסים משתייכים למשפחת ה- Potyviridae, הפוטיוירוסים מהווים את קבוצת הוירוסים של צמחים הגדולה ביותר. ידועים למעלה מ- 180 פוטיוירוסים שונים המנגעים טווח רחב של צמחים פונדקאים ממשפחות בוטניות שונות (Brunt, 1992; Shukla *et al.*, 1994). פוטיוירוסים מאופיינים בחלקיקי וירוס ארוכים בעלי מבנה חוטי ארוך, באורך של 680-900nm וקוטר של 11-15nm (Dougherty & Carrington,1988). פוטיוירוסים מועברים ע"י כנימות עלה בצורה חולפת (Nonpersistent), וחלקם אף מועברים בזרעים (Shukla *et al.*, 1994).

1.3.1. מבנה גנום הפוטיוירוס וארגונו:

החלקיק בנוי ממולקולה אחת של +ssRNA בגודל של כ- 10,000 bp המהווה Polycistronic mRNA (Dougherty & Carrington, 1988). ה- RNA הויראלי מתורגם לרב-חלבון בודד (polyprotein) בגודל של 340-368 kDa בהתאם לפוטיוירוס.

בקצה '5 מחובר אל ה- RNA הויראלי בקשר קוולנטי החלבון (VPg) Viral Protein genome linked, (Siaw *et al*., 1985; Plochocka *et al*., 1996; Murphy *et al*., 1996).

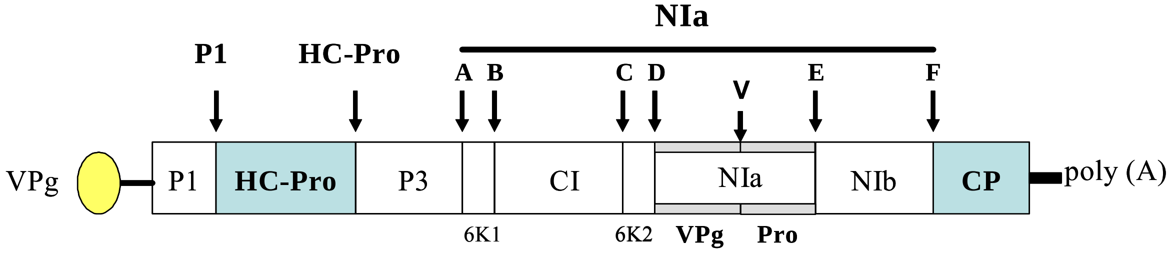
1.3.2. עיבוד רב-החלבון:

בפוטיוירוסים נעשה עיבוד רב-החלבון במהלך התרגום ולאחריו באמצעות שלוש פרוטאזות ויראליות המצויות ברב-חלבון: HC-Pro, P1 ו- NIa (Riechmann *et al*., 1992). תהליך עיכול רב-החלבון מתואר בתמונה מס' 1: הפרוטאזה NIa, בעלת יכולת עיכול בציס ובטרנס והיא האחראית לחיתוכים מהקצה הקרבוכסילי של שני שליש מרב החלבון: בשלב ראשון, מתבצע עיכול באתרים E ו- D, בהמשך מתבצע עיכול באתרים A, B, C ו- F, (Dougherty & Carrington, 1988). אתר עיכול נוסף V, מצוי בתוך החלבון NIa בין ה- VPg לאזור הפרוטאזה, האתר מורכב מרצף ח' אמינו השונה מזה המצוי באתרים האחרים והיעילות בעיכולו היא חלקית. כתוצאה מהעיכול החלקי משתחרר (רק בחלק מהמולקולות) החלבון VPg (Dougherty & Parks, 1991). שחרורו של ה-VPg מהחלבון NIa הכרחי לרפליקציה של ה- RNA, מוטציות הפוגעות באתר עיכול זה ומונעות את שחרורו של VPg, קטלניות לוירוס (Carrington *et al*., 1993). החלבון P1, הנו בעל יכולת פעילות כפרוטאזה המבצעת עיכול עצמי בקצה הקרבוכסילי של החלבון. בקצה הקרבוכסילי שלו מצוי אזור פרוטאוליטי מהסוג chymotrypsin-like serine proteinase (Verchot *et al.,* 1992). עיכול פרוטאוליטי בין P1 לבין HC-Pro הכרחי לאינפקטיביות הוירוס (Verchot & Carrington, 1995). חלבון ההלפר (HC-Pro), משמש גם כפרוטאזה בעיכול עצמי בין ההלפר בקצה הקרבוכסילי לחלבון P3 בין שתי החומצות האמיניות Gly-Gly. העיכול מתבצע במהלך התרגום של רב-החלבון. אזור הפרוטאזה בחלבון HC-Pro מצוי בקצה הקרבוכסילי והוא מהסוג Papain-like proteinase עם פעילות של ציסטאין במקום סרין (Verchot *et al*., 1991; Carrington & Dougherty, 1988).

1.3.3. החלבונים של הפוטיוירוסים:

החלבון הראשון (P1) גודלו כ- 31kDa, השני (HC-Pro) גודלו 53-56kDa, השלישי (P3) גודלו כ-40kDa, הרביעי (6K1) הנו חלבון קטן שגודלו 6kDa, החמישי (CI) הנו חלבון גופיפי ההסגר הגלילי גודלו כ- 71kDa, השישי חלבון קטן נוסף (6K2) גודלו כ- 6kDa, השביעי הוא חלבון גופיפי

ההסגר הגרעיני 'a' (NIa) שגודלו כ- 49kDa, (ממנו מעוכל מאוחר יותר החלבון השמיני VPg), התשיעי הוא חלבון גופיפי ההסגר הגרעיני 'b' (NIb) שגודלו כ- 58kDa, האחרון בקצה הקרבוכסילי הוא חלבון המעטפת CP שגודלו 30kDa. משני צדי האזור המקדד של ה- RNA קיימים שני אזורים שאינם מקדדים Non Coding Region (NCR) אורכו של האזור הלא מקודד נע בין 144 - 205bp. האזור שבקצה '5 עשיר בבסיסים אדנין ואורציל ומכיל רצפים שמורים החוזרים על עצמם במספר וירוסים (Shukla *et al.*, 1991) דבר המרמז על מעורבותם ברפליקציה ותרגום של הוירוס (Lain *et al.*, 1988; Turpen., 1989). בוירוס TEV נראה כי אתר זה מתפקד כ- Enhancer להגברת התרגום של רב-החלבון (Carrington & Freed, 1990). האזור הבלתי מקודד בקצה 3 משתנה בגודלו וברצף הבסיסים בקרב פוטיוירוסים שונים. במספר וירוסים, אתר זה מעורב בקישור אל אנזים הרפליקאז הויראלי (RdRp), ליצירת הגדיל המשלים (Dolja & Carrington, 1992). המבנה השניוני של אתר זה מספק הגנה מפני נוקלאזות (Rodriguez-Cerezo & Shaw, 1991) האזור הבלתי מקודד בקצה '5 קשור ליצירת הקומפלקס בין RdRp לריבוזום ולפקטור השעתוק Eif4F פעולה המאפשרת הגברת יעילות התרגום (Gallie, 2001).



תמונה מספר 1. חלבוני הפוטיוירוס.
סכימה כללית המציגה את סדר החלבונים בפוטיוירוסים בתהליך העיבוד של הרב-חלבון באמצעות שלושת הפרוטאזות: P1 , HC-Pro ו- NIa (Riechmann *et al.*, 1992; Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001).

1.3.4. תפקיד החלבונים בפוטיוירוסים:

החלבון P1 משמש כפרוטאז לעיכולו העצמי בקצה הקרבוכסילי (Verchot *et al.*, 1991) ומעורב באמפליפיקציה של הגנום הויראלי (Verchot & Carrington, 1995) ביחד עם החלבונים HC-Pro ו- P3 (Atreya *et al.*, 1992; Klein *et al.*, 1994). לחלבון (HC-Pro) Helper Component Proteinase תפקידים רבים במחזור החיים של הוירוס (Maia *et al.*, 1996): הוא משמש כפרוטאז

בעיכול עצמי מהרב-חלבון בקצה הקרבוכסילי (Maia *et al*., 1996) והכרחי להעברה של הוירוס ע״י כנימות (Kassanis & Govier, 1971a, 1971b); הוא מעורב בביטוי סימפטומים בצמח, (Lecoq & Pitrat, 1985) ברפליקציה, (Maia *et al*.,1996; Merits *et al*., 1998). ובנטרול מנגנון ההגנה הצמחי להשתקת גנים זרים (Kasschau & Carrington, 1998; Voinnet *et al*., 1999). חלבון ההלפר מעורב בנטרול תהליך ההשתקה בצמח (Kasschau *et al*., 2003). לחלבון המעטפת Coat Protein (CP) מספר תפקידים: עטיפת ה- RNA הויראלי (Dougherty & Carrington, 1988); הוא מעורב בתנועה של הוירוס בצמח (Rojas *et al*.,1997); ובעל תפקיד חיוני בהעברה של הוירוס באמצעות כנימות העלה (Govier & Kassanis, 1974b), לאחר אינטראקציה עם חלבון ההלפר (Pirone, 1991). בחלבון המעטפת הקצה הקרבוכסילי והקצה האמיני חשופים כלפי חוץ, כך שהאזור המרכזי יוצר את ליבת החלבון (Shukla *et al*., 1988). אזור הליבה, מעורב בתנועה בין תאים של הוירוס (Dolja *et al*., 1994). הקצה האמיני והקרבוכסילי, מעורבים במעבר הוירוס בין אברי הצמח דרך רקמת השיפה (Dolja *et al*., 1995). החלבון CI, מצטבר בציטופלסמה של התאים הנגועים ובעל פעילות של RNA הליקאז (Lain *et al*., 1990; Eagles *et al*.,1994) החיוני לרפליקציה של ה- RNA הויראלי הקצה ה- N של החלבון CI התגלה כמעורב בקישור אל חלבוני CI אחרים במערכת של Yeast two-hybrid system (Lopez *et al*., 2001). חלבון ה- CI מעורב ביכולת התנועה מתא לתא של הוירוס (Baunoch *et al*., 1991; Carrington *et al*., 1998). פוטיוירוסים מאופיינים לעיתים בגופיפי הסגר בצורה של שבשבת (pinwheel); מבנה זה נוצר לאחר קישור של חלבוני CI אל חלבוני המעטפת בציטופלסמה (Lain *et al*., 1990). רצף ח׳ האמינו של שני החלבונים הקטנים: 6K1 ו- 6K2 נמצא כבעל דמיון רב אל שני חלבונים אנלוגיים (2B ו- 3A) מקבוצת הוירוסים Picornavirus (King *et al*., 1991). החלבונים 6K1 ו- 6K2 מכילים מספר ח׳ אמינו הידרופוביות, המסייעות, בקישורם אל הממברנות על מנת שישמשו כעוגן בזמן הרפליקציה של ה- RNA (Restrepo *et al*., 1994). החלבון NIa מורכב משני חצאים: המחצית האמינית היא ה- VPg והמחצית הקרבוכסילית משמשת כפרוטאזה. החלבון VPg נקשר קוולנטית לקצה 5׳ של ה- RNA הויראלי (יתכן כי הוא משמש תחליף ל- CAP 5׳ המצוי ברוב סוגי ה- mRNA הידועים).

תפקידו המרכזי של החלבון VPg הוא בעיצוב והגנה על ה- RNA הויראלי מפני פירוק, כמו כן VPg מעורב ברפליקציה של הוירוס בצמח (Shahabuddin *et al.*, 1988). החלבון VPg, עובר אינטראקציה עם חלבונים של הצמח הפונדקאי (Leonard *et al.*, 2000; Schaad *et al.*, 2000). מוטציות בגן ה- VPg משפיעות על הספציפיות לפונדקאי ועל היכולת לאפשר הדבקה סיסטמית (Nicolas *et al.*, 1997, Rajamaki & Valkonen, 1999, Schaad *et al.*, 1997). החלבון NIb משמש כ- Replicase ומכיל רצפים הומולוגים לחלבוני רפליקציה של וירוסים שונים, חלבון NIb מצטבר בגרעין (Domier *et al.*,1987).

1.4. העברה של פוטיוירוסים באמצעות כנימות עלה:

וירוסים מקבוצת הפוטיוירוסים, מועברים מצמחים נגועים באמצעות כנימות עלה בצורה חולפת. ראשיתו של המחקר להבנת מנגנון העברה של הפוטיוירוסים החל כבר לפני 45 שנה, כאשר הראה Kassanis (1961) בניסוים שערך כי ניתן להעביר וירוסים לא עבירים (PVC, PAMV) ע"י הדבקת הצמח בו זמנית בוירוסים עבירים (PVA, PVY). קרוב ל- 10 שנים מאוחר יותר, הראו Govier & Kassanis, כי הזנה בויריונים מנוקים לא מאפשרת את העברת הוירוס. ווקטור הניזון ע"ג צמח נגוע בגזע עביר של הוירוס ולאחריו ניזון ע"ג צמח הנגוע בגזע בלתי עביר, יהיה מסוגל להעבירו. תופעה זו התקיימה רק בכיוון אחד – רכישת הוירוס העביר ולאחריו רכישת הוירוס הלא עביר, לא ניתן היה לקבל העברה בסדר הפוך של הזנה (Kassanis & Govier, 1971a, 1971b) והיוותה בסיס להשערה בדבר הימצאותו של "גורם" נוסף מלבד הויריון החשוב לקיום ההעברה. עדות נוספת לקיומו של "הגורם" הנוסף התקבלה כעבור מספר שנים כאשר אותם החוקרים הצליחו לנקות ויריונים ולבצע ניסויי הזנה עם כנימות. בניסויים אלו, התגלה כי כאשר מוסיפים את הנוזל העליון המתקבל לאחר סרכוז מוהל צמח נגוע בהשוואה לצמח בריא אל תמיסת ההזנה, המכילה ויריונים מנוקים התקבלה העברה רק לאחר הוספתו של המוהל מהצמח הנגוע (Govier & Kassanis,1974a, 1974b). ניסוי זה אושש את ההשערה בדבר הימצאותו של "גורם" חשוב נוסף (מלבד הויריון) הנרכש מהצמח הנגוע ומסייע בתהליך העברה של הוירוס ע"י כנימות. מכאן הגיעו למסקנה שבפוטיוירוסים, כנימות העלה חיבות לרכוש בנוסף לויריון, מוקדם יותר או בו-זמנית " רכיב - (Component) " נוסף שאיננו נמנה

על מרכיבי הויריון ההכרחי להעברה של הוירוס באמצעות כנימות עלה. "רכיב" זה, כונה בשם הלפר - Helper Component (HC) בשל יכולתו לסייע להעברת הויריונים. ההוכחה כי "רכיב" זה הינו חלבון המקודד ע"י הגנום הויראלי ואיננו נמנה על מרכיבי הויריון התקבלה בהמשך: שימוש בג'ל פילטרציה אפשר בידודו של חלבון בגודל של 100-200kDa מצמחים הנגועים ב- PVY, החלבון המבודד, סייע להעברת ויריונים של PVY. השקעת החלבון הנ"ל באמצעות נוגדן שהוכן כנגדו פגעה ביכולת ההעברה. מאידך נוגדן שהוכן כנגד הויריון, לא השפיע על פעילותו של חלבון ההלפר בהעברה (Govier *et a*l., 1977). שימוש בנוגדנים כנגד חלבון ההלפר וכנגד הויריון העלה את האפשרות כי חלבון ההלפר איננו חלק מהויריון. הוכחה לכך שחלבון ההלפר מקודד ע"י הגנום הויראלי, התאפשרה לאחר בידוד של שני חלבוני הלפר מוירוסים שונים: PVY, TVMV. בדיקה עם נוגדנים ספציפיים הראתה כי שני החלבונים נבדלים סרולוגית זה מזה, כך שמקורם של החלבונים הוא מהוירוס ולא מהצמח (Thornbury & Pirone, 1983). בעבודות מאוחרות יותר נקבע כי גודל חלבוני ההלפר של PVY ו- TVMV הוא כ- 53 kDa ו- 58 kDa בהתאמה, וכי חלבוני ההלפר פעילים בהעברה במצב של דימר או טרימר 100-150kDa, (Thornbury & Hellman, 1985). מספר מחקרים הראו כי חלבוני הלפר מפוטיוירוס אחד יכולים לסייע בהעברת ויריונים של פוטיוירוס אחר. עובדה זו מעלה את האפשרות שקיימת קרבה בין סוגי הפוטיוירוסים השונים. נמצא כי, חלבוני הלפר של WMV2 יכולים, בנוסף ליכולתם לסייע בהעברת ויריונים של WMV2 גם לסייע בהעברת ויריונים של TuMV. עם זאת, לעיתים השילוב פועל רק בכיוון אחד כמו במקרה הנדון, בו חלבוני הלפר של TuMV לא סייעו להעברת ויריונים של WMV2 (Sako & Ogata, 1981a, 1981b). חלבוני הלפר של WMV2 סייעו להעברת ויריונים של PRSV ו- ZYMV (Lecoq& Pitrat, 1985).

1.4.1. נוכחותו של חלבון מסייע Helper בפוטיוירוסים ותפקידיו השונים:

חלבון מסייע להעברה (הלפר) הינו מאפיין ייחודי לשתי קבוצות וירוסים, Potyviruses ו- Caulimoviruses. מראשית שנות ה- 70 ועד היום נעשו עבודות רבות על חלבון ההלפר הפוטיויראלי עבודות אלו הראו כי לחלבון ההלפר מגוון תפקידים רב, בנוסף ליכולתו לסייע בהעברה של הוירוס באמצעות כנימות עלה, הוא משמש כפרוטאז בעיכול עצמי מהרב-חלבון בקצה הקרבוכסילי, הוא בעל חשיבות גדולה במחזור החיים של הוירוס בצמח ומעורב בתנועה מתא לתא של הוירוס בצמח

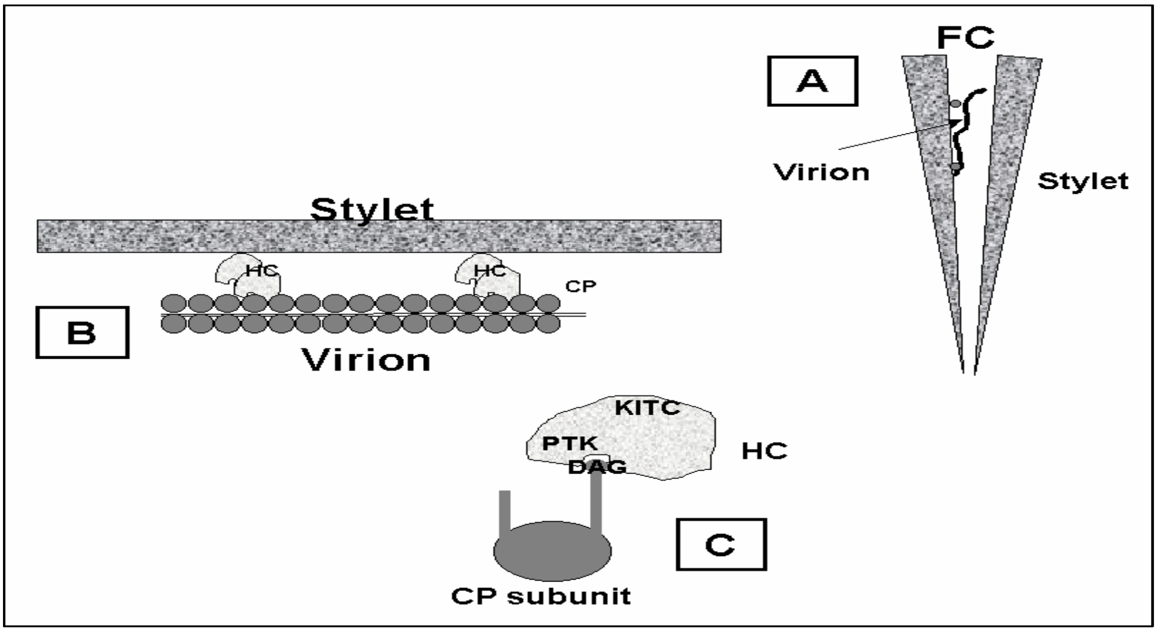
(Baunoch *et al*., 1990; Maia *et al*., 1996). חלבון ההלפר בשילוב עם חלבונים פוטיויראליים נוספים: CP ו- VPg מעורב בהתאמה אל הצמח הפונדקאי (Andrejeva *et al*., 1999) ובתנועה לאזורים מרוחקים בצמח (Cronin *et al*., 1995; Rojas *et al*., 1997). בחלבון ההלפר מצוי אתר המכיל רצף של ארבעה ח׳ אמינו FRNK המעורב בעוצמת הסימפטומים של הוירוס בצמח. בטבע בודד גזע בר של ZYMV המציג סימני וירוס מוחלשים, גזע זה של הוירוס נמצא מכיל את רצף ח׳ האמינו FINK בחלבון ההלפר (Lecoq & Pitrat, 1984). יצירת מוטציה נקודתית זו בקלון אינפקטיבי של ZYMV להחלפתה של ח׳ האמינו (R) ארגינין בח׳ אמינו (I) איזולאוצין ברצף F**R**NK אפשרה קבלת וירוס ZYMV בו חלבון ה- HC מכיל את הרצף FINK המראה סימנים מוחלשים בדומה לזה שבודד מן הבר (Gal-On & Raccah, 2000). לחלבון ההלפר תפקיד מרכזי כ- suppressor ל- Posttranscriptional gene silencing (PTGS) בנטרול מנגנוני ההגנה הצמחיים להשתקת גנים זרים (Voinnet *et al*., 1999; Kasschau & Carrington, 1998; Llave *et al*., 2000). כיום לאחר למעלה מ- 30 שנה של מחקר לאחר זיהויו של חלבון ההלפר, עדין חסר מידע רב על המבנה ואופן פעולתו בשילוב עם חלבונים מהצמח ומהכנימה המעורבים בשלבי ההתרבות של הוירוס בצמח והעברה של הויריונים ע״י כנימות העלה. יחד עם זאת הצטבר מידע חלקי על מבנה החלבון ואתרים שמורים המעורבים בתפקידיו השונים. היות ועבודה זו עוסקת בהעברה של פוטיוירוסים ע״י כנימות עלה, מושם הדגש בעיקר על מעורבותו של חלבון ההלפר בתהליך העברה תוך התייחסות אל אותם חלבונים ויראליים וחלבונים של הכנימה המעורבים בהעברה של הפוטיוירוסים.

1.4.2. אתרים שמורים בחלבון ההלפר המעורבים בהעברה ע״ כנימות העלה:

ידועים לפחות שני אתרים שמורים בחלבון ההלפר, המעורבים בתהליך העברה של הוירוס ע״י כנימות עלה: הראשון הוא האתר השמור **KITC** (Lys-Ile-Thr-Cys) הנפוץ במרבית הפוטיוירוסים אך מופיע כ- **KLSC** ב- ZYMV ו - WMV (Desbiez& Lecoq, 2004; Thornbury *et al*., 1990) בהתאמה. האתר השני, הוא רצף ח׳ האמינו **PTK** (Pro-Thr-Lys), זוהה לראשונה ב- ZYMV (Huet *et al*., 1994). בעבודות קודמות במעבדתנו אשר עסקו בעיקר באפיון מעורבות האתר השמור PTK בקישור אל הויריון, נמצא כי מוטציה נקודתית באתר השמור-PTK ושינויו ל- PAK החלפת ח׳ אמינו Thr(T) ב- ח׳ אמינו Ala(A) פוגעת ביכולתו של חלבון ההלפר לסייע בהעברת ויריונים ע״י

כנימות עלה (Huet *et al*., 1994). בעבודה מאוחרת יותר, הוכח כי מוטציה נקודתית זו ומוטציות נקודתיות נוספות באתר זה, פוגמות לחלוטין או מפחיתות משמעותית את יכולתו של חלבון ההלפר להיקשר אל ויריונים (Peng *et al*., 1998). המודל המקובל כיום, גורס שאתר ה-PTK של ההלפר נקשר אל הקצה ה- N של חלבון המעטפת. חשיבותו של אתר ה- KITC / KLSC בחלבון ההלפר במעורבות בהעברה של פוטיוירוסים שונים, הוכחה באמצעות אפיון שני גזעים מוטנטים מן הבר, בהם הוחלפה ח' האמינו Lys **(K)** ב- Glu **(E)** הממוקמות באתר השמור **KITC** בפוטיוירוסים שונים (Thornbury *et al*., 1990) או **KLSC** בוירוס ZYMV (Grumet *et al*., 1992) החלפה זו פגעה ביכולתו של ההלפר לסייע בהעברה (Thornbury *et al*., 1990), אך לא פגעה ביכולת קישורו אל הויריונים (Peng *et al*., 1998; Blanc *et al*., 1998) ראה תמונות מס' 2 ו- 3.

חלקיקי וירוס TEV, נצפו במיקרוסקופיה אלקטרונית באמצעות שימוש בנוגדן ראשוני ספציפי כנגדם ונוגדן שניוני המסומן בזהב כאשר הם מצויים בדוקרנים המאקסילרים של הכנימה *M. persicae* (Taylor & Robertson, 1974). חלבוני הלפר בעלי מוטציה נקודתית בה הוחלפה ח' האמינו **E** במקום ח' האמינו **K** באתר **K**ITC לא אפשרו העברת ויריונים באמצעות כנימות עלה, ולא ניתן היה לזהות את הקומפלקס הלפר וירוס באזורים הפנימיים שבחדק הכנימה לאחר בדיקת חתכי חדק של הכנימה במיקרוסקופיה אלקטרונית (Ammar *et al*., 1994; Blanc *et al*., 1998). הוכחה נוספת למעורבותו של האתר KITC בקישור אל הכנימה התקבלה, כאשר לא נמצאו כל הבדלים ביכולתם של חלבוני הלפר פעילים בהעברה (KITC או KLSC) ומוטנטים (ELSC או EITC) להיקשר אל חלקיקי וירוס המקובעים ע"ג ממברנה של ניטרוצלולוז (Blanc *et al*., 1998; Peng *et al*., 1998). בעבודתם של Wang וחובריו (1996) הוכח כי בכנימות אשר ניזונו מתערובת המכילה חלבוני הלפר וויריונים מסומנים רדיואקטיבית (I^{125}) התגלה כי הקומפלקס וירוס וחלבון HC תקין, מצוי באזורים המרוחקים בחלקו הפנימי של חלל צינור המזון שבחדק הכנימה. בכנימות שאינן ווקטור לוירוסים שנבדקו לא נצפה קישור. ממצאים אלו הובילו לחיזוקה של הנחת הגשר (Bridge hypothesis) שפותחה ב- 1974 ע"י Govier & Kassanis: המניחה כי חלבון ההלפר נקשר לחדק הכנימה מצידו האחד ואל הויריון מצידו השני, ראה מודל פעולה משוער בתמונה מספר 2.



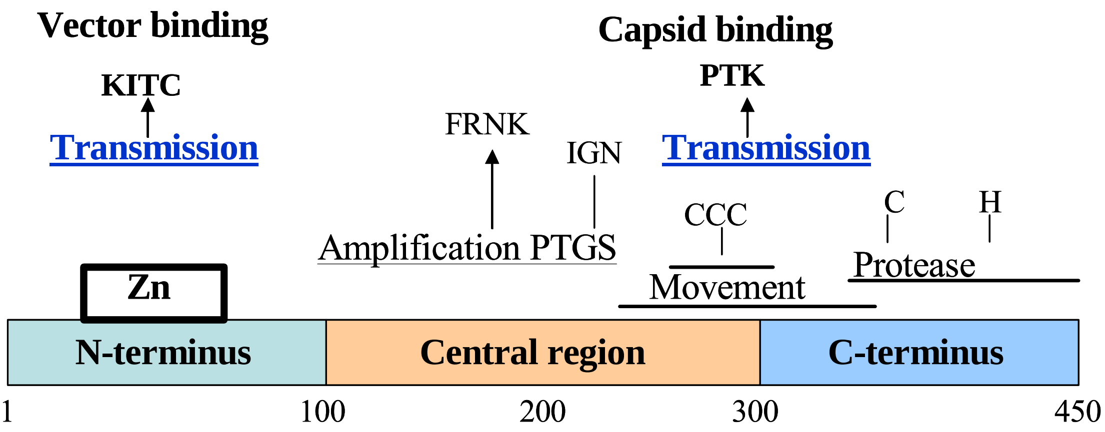
תמונה מספר 2. מודל הגשר (Raccah *et al.*, 2001).

סכימה כללית להנחה שהוצעה לראשונה ע"י (Govier & Kassanis, 1972b). (A), קישור של חלבון ההלפר (מסומן בעיגול) הויריון אל הציפוי החיצוני של חלל צינור המזון Food Canal (FC) שבחדק הכנימה. (B), חלבון ההלפר משמש כעין גשר בקישור הוירוס אל חדק הכנימה. שתי תת יחידות של חלבוני הלפר מעורבים בקישור אל הויריון ואל חדק הכנימה. (C), רצף ח' אמינו השמור DAG הממוקם בקצה ה- N של חלבון המעטפת ומצוי בחלקו החיצוני של החלקיק הויראלי חיוני בקישור אל חלבון ההלפר. רצף ח' האמינו השמור PTK בחלבון ההלפר חיוני בקישור אל חלבון המעטפת הפוטיויראלי.

ניתן לחלק את חלבון ההלפר ל- שלושה חלקים עיקרים (ראה תמונה מס' 3): הראשון הוא הקצה ה-N וסביבתו השני הוא האזור המרכזי והשלישי הוא הקצה ה- C. משערים, כי אזור קצה ה- N העשיר בח' האמינו היסטידין וציסטאין (Zn בתמונה מס' 3), יוצר מבנה של Zinc finger בו ממוקם הרצף השמור KITC / KLSC (ח"א 52-55 ב- ZYMV) המעורב בקישור אל חדק הכנימה (Blanc *et al.*, 1998). האזור המרכזי בחלבון, מעורב במגוון תפקידים שונים: בתנועה מתא לתא (Carrington *et al.*, 1996), בתנועה אל אזורים מרוחקים בצמח Long distance movement (Cronin *et al.*,1995) ובהתאמה אל הצמח הפונדקאי (Saenz *et a*l., 2002). כמו כן אזור זה מכיל רצפים המעורבים בקישור של RNA בפעילותו של ההלפר בצמח לנטרול מנגנון ההשתקה הצמחי (Voinnet *et al.*, 1999; Kasschau & Carrington, 1998). לאחרונה נמצאה מעורבותו של חלבון הלפר של *Lettuce Mosaic Virus* (LMV) בקישור אל קומפלקס החלבונים המרכיבים את

הפרוטאוזום בצמח 20S Proteasome ועיכוב יכולתו לפרק ח' גרעין *in vitro* קישור זה לא פגע ביכולת הפרוטאוזום לפרק חלבונים, יתכן וקישור זה הנו מנגנון נוסף של הפוטיוירוס באמצעות חלבון ההלפר לנטרל מנגנוני הגנה של הצמח כנגד חדירה של ח' גרעין זרות(Ballut *et al.*, 2005).

חלבון ההלפר, פעיל בהעברה של הפוטיוירוסים באמצעות כנימות במצב של דימר או טרימר (Thornbury & Hellman, 1985). שתי קבוצות שונות חקרו במקביל בשיטות שונות את יכולתו של ההלפר ליצור מבנים של דימרים וטרימרים ובהיסתמך על תוצאותיהם הם הגיעו למסקנות שונות. הראשונה, טענה כי רק הקצה ה- N של ההלפר מעורב בקישור אל חלבוני הלפר זהים נוספים (Urcuqui-Inchima *et al.*, 1999). לעומתם, הקבוצה השנייה טענה, כי שני הקצוות ה- N וה- C מעורבים ביכולת הדימריזציה של ההלפר (Guo *et al.*, 1999). בעבודה מאוחרת יותר, הוכח כי ניתן להשתמש בחלבון הלפר החסר 102 ח' אמינו מהקצה ה- N ועדין לקבל קישור אל חלבוני הלפר נוספים (Plisson *et al.*, 2003). בקצה ה- C, של חלבון ההלפר מצוי אזור פעילותו הפרוטאוליטית, מהקצה ה- C לכיוון מרכז החלבון מצוי הרצף PTK (ח"א 308-310 ב- ZYMV) המעורב בקישור של ההלפר אל חלבון המעטפת (Huet *et al* .,1994).



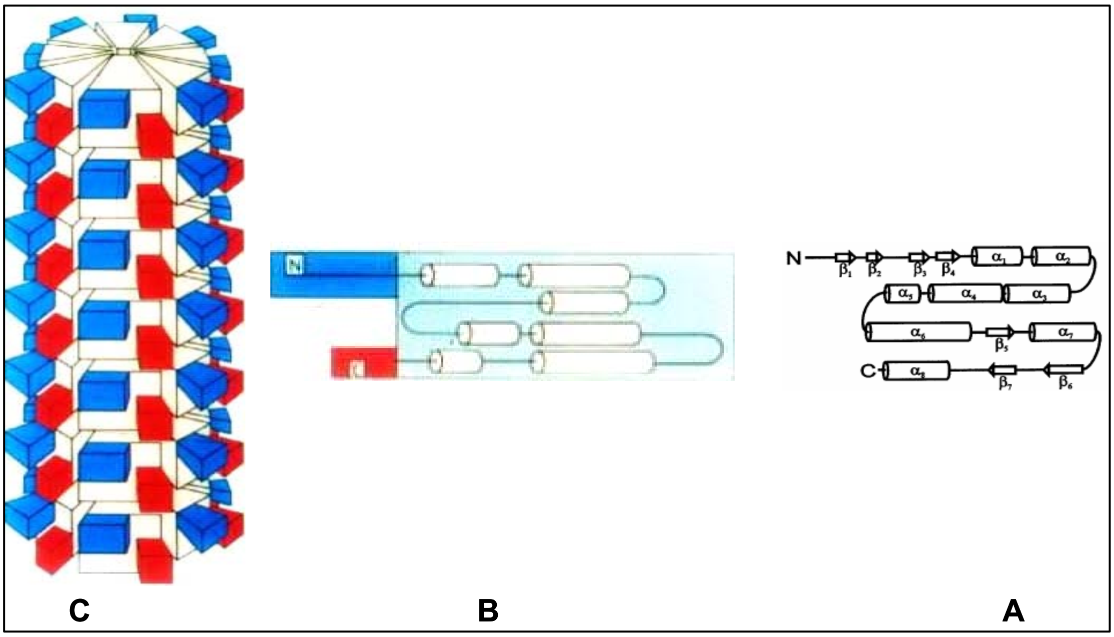
תמונה מספר 3. תפקידיו השונים של חלבון ההלפר.
סכימה המציגה את מיקומם של אתרים שמורים בחלבון ההלפר ותפקידיהם השונים במחזור החיים של הפוטיוירוס. הסכימה נעשתה בהתבסס על (Plisson *et al.*, 2003; Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001) עם שינויים.

1.4.3. חלבון המעטפת:

חלבון המעטפת (CP), שמו מעיד על תפקידו הראשון, הוא עוטף את ח' הגרעין הויראלית (+ssRNA) (Carrington & Dougherty, 1988) כ- 2000 תת יחידות של CP מרכיבות חלקיק ויראלי אחד. בתהליך העברה של הפוטיוירוס ע"י כנימות עלה, החלקיק הויראלי נקשר אל החלבון המסייע HC (Pirone, 1991). העובדה, כי הקצה ה- N והקצה ה- C של CP מצויים באתרים חיצונים בחלקיק הויראלי (Shukla *et al*., 1988) מעידה, על יכולתם הפוטנציאלית, להגיב עם חלבונים ויראלים וצמחיים, ראה תמונה מס' 4, (A, B ו- C). בקצה ה- N של CP מצוי רצף ח' אמינו שמור (אתר שמור) **DAG** (Asp-Ala-Gly), חשיבותו של אתר זה הוכחה במעורבות בקישורו של חלבון המעטפת אל חלבון ההלפר (Atreya *et al*., 1990) בפוטיוירוסים שונים (Blanc *et al*., 1997; Gal-On *et al*., 1992). ראה תמונה מס' 2C.

עבודות נוספות שנעשו בשנים האחרונות אשר בדקו את חשיבותו של כל הקצה ה- N ב- CP הראו כי: ניתן להסיר את הקצה ה- N או להחליפו בפפטידים קצרים ממקור לא ויראלי ועדין לקבל הדבקה מכאנית של הוירוס בצמח (אך לא ע"י כנימות), (Arazi *et al*., 2001). קישור *in-vitro* של CP אל חלבון ה- HC התקבל גם כאשר הוסר חלק או כל הקצה ה- N של ה- CP. ההשערה היא, כי קישור זה מתרחש במהלך ההתפתחות של הוירוס בצמח הנגוע ואיננו מעורב בתהליך העברה של הוירוס ע"י כנימות עלה (Roudet-Tavert *et al*., 2002). בהיסתמך על תוצאות עבודות אלו ניתן לשאר כי הקצה ה- N של CP חיוני לקישור אל חלבון HC בתהליך העברה של הויריון ע"י כנימות עלה (Blanc *et al*., 1997, Peng *et al*., 1998; Flasinski & Cassidy, 1998). חלבון המעטפת (CP), מעורב גם בתנועה של הוירוס: בתנועה בין תאים (cell to cell) ובתנועה לטווח הרחוק בין חלקי הצמח השונים (Long distance movement) (Rojas *et al*., 1997). הקצה ה- N של CP, מעורב בתנועה לטווח הרחוק ובהתפשטות סיסטמית של הוירוס בצמח. ב- TEV החסרת חלקים בקצה ה- N של CP אינה פוגעת ביצירת מבנה החלקיק הויראלי (assembly) אך פגעה ביכולת התנועה לטווח הרחוק (Dolja *et al*., 1994, Dolja *et al*., 1995). ניתן לחלק את CP לשלושה אזורים: שני הקצוות ה- N וה- C החשופים על פני הויריון (Baratova *et al*., 2001, Shukla *et al*., 1988) ואזור הליבה

(Core) שאיננו חשוף ומכיל רצף ח' אמינו השמור בקרב הפוטיוירוסים השונים. אזור הליבה מעורב ביצירת מבנה הויריון (Dolja *et al.*, 1995, Jagadish *et al.*, 1991, Varrelmann & Maiss, 2000) למעבר בתעלות הפלסמודסמטה (Rojas *et al.*, 1997) ולתנועה בין תאים (Dolja *et al.*, 1995). לעומת אזור הליבה השמור, הקצה ה- N, ברובו איננו שמור הן ברצף והן במספר ח' האמינו בקרב הפוטיוירוסים השונים (בין 21 ל- 96 ח' אמינו), (Shukla *et al.*, 1989; Shukla & Ward, 1989). לאחרונה נמצא כי למטען החשמלי של כלל ח' האמינו הממוקמות בקצה ה- N של CP מעורבות ביכולת התנועה בצמח להדבקה סיסטמית של ZYMV בצמחי קישוא (Kimalov *et al.*, 2004).



תמונה מספר 4. מבנה החלקיק הפוטיויראלי.

מבנה יחידה של חלבון המעטפת (A),(Baratova *et al.*, 2001) ; (B), (Shukla *et al.*, 1988).

מבנה החלקיק הפוטיויראלי (C), כ- 2,000 תת יחידות של חלבון המעטפת מרכיבות חלקיק וירוס אחד (Shukla *et al.*, 1988).

1.5. מאפיינים כלליים של כנימות עלה:

כנימות עלה משתייכות למחלקת החרקים Insecta, סידרת Hemiptera, תת-סידרה Homoptera, על-משפחה Aphidoidea. סווגו כ- 3700 מיני כנימות עלה (Eastop,1977) המחולקות למשפחות שונות, העיקרית שבינן היא משפחת כנימות העלה Aphididae, מתחלקת לתת- משפחות בעיקר על

פי מאפיינים מורפולוגיים, Lachninae, Pemphiginae ,Aphidinae) וכו') מבין כל תת-המשפחות, Aphidinae מונה למעלה ממחצית מיני כנימות העלה ורובם ווקטורים יעילים למרבית הוירוסים המנגעים צמחים (Blackman & Eastop, 1984).

מאפיינים כללים של משפחת כנימות העלה Aphididae: הכנימות בעלות מחוש ארוך, בעל 3-6 פרקים. חדק (rostrum) מורכב בד״כ מ- 4 פרקים לפעמים 5. בפיסת הרגל 2 פרקים. הכנפיים עדינות ושקופות; האחוריות צרות וקטנות מן הקדמיות ונאחזות בהן בשעת התעופה בעזרת קרסים זעירים (hamuli). ע״ג הפרק החמישי או השישי של הבטן או ביניהם מצוי בד״כ זוג צינוריות (siphunculi) בשעת מצוקה מופרשים דרכן תאי המולימפה טעוני שעווה המשמשים לצורכי התגוננות, דחייה וגם חומרים המשמשים לתקשורת תוך מינית. לוח הגב (tergite) האחרון של הבטן מאורך בדמות זנב קצר (cauda). גפי הפה הדוקרים ומוצצים של כנימות העלה מאפשרים החדרה של החדק אל צינורות השיפה (phloem). הכנימות ניזונות ממוהל הצמח הנחשב עני יחסית בהרכב וריכוז ח׳ האמינו ומקורות החנקן שבו (Slansky & Scriber, 1985). מספר עבודות ראשוניות הראו כי תהליך הדקירה וההזנה מהצמח ע״י הכנימה גורם לאינדוקציה בצמח, המשפרת את הרכב וריכוז ח׳ האמינו בשיפה עבור הכנימה (Riedell *et al*., 1998; Sandstrom *et al*., 2000). את ח׳ האמינו החסרות לתזונה של הכנימה מספקים חיידקיים אנדוסימביונטים (*Buchnera*) המצויים במעי הכנימה (Baumann *et al*., 1997).

1.5.1. תכונות של כנימת העלה המקנות להן יתרון לשמש כווקטור של וירוסים בצמחים:

רוב מיני כנימות העלה מוגבלים ביכולת הזנתם והתרבותם לצמחים ממשפחות בוטניות מסוימות (Monophagous). יחד עם זאת, ידועים גם מינים מסוימים של כנימות עלה רב-פונדקאיים (Polyphagous) כדוגמת כנימת העלה *M. persicae*, תכונה זו מאפשרת להם הזנה ממגוון פונדקאים ממשפחות בוטניות שונות (Blackman & Eastop, 1984). יכולת ההזנה הנרחבת מאפשרת להם יכולת הפצה של וירוסים המנגעים טווח רחב של מיני צמחים וגם וירוסים בעלי טווח פונדקאים צר יותר. היכולת של הכנימה להתרבות ברבייה מינית וברביית בתולין (Parthenogenetic reproduction) מאפשרת להם קצב ריבוי מהיר ביותר, עם מספר רב של צאצאים תוך פרק זמן קצר.

במהלך גידול וציפוף אוכלוסיית הכנימות ע״ג הצמח הפונדקאי נוצרים מופעים של הכנימה בעלי כנפיים בעלי יכולת נדידה אל צמחים חדשים, עובדה המגבירה את יכולת ההפצה של וירוסים שונים. גפי הפה הדוקרים ומוצצים של הכנימה מאפשרים לה לחדור את דופן התא הצמחי בקלות רבה במהלך טעימתם או הזנתם ממוהל התא הצמחי. פרק הזמן הדרוש לכנימה לרכישת וירוסים חולפים בגפי הפה במהלך הטעימה או ההזנה שלהם מהצמח הוא קצר ביותר מספר שניות עד דקות, תכונה זו היא למעשה אחת מהגורמים המרכזים שהפכו את כנימת העלה לווקטור יעיל במיוחד של וירוסים בצמחים. פרטים בודדים של כנימת עלה, החודרות לשדה בו מצויים מספר צמחים נגועים בוירוס מסוגלות בפרק זמן קצר להתרבות ולהפיץ את הוירוס בשדה כולו ולגרום לנזק רב. בפוטיווירוס כדוגמת ZYMV התוקף צמחים ממשפחת הדילועיים, השילוב של מוקדי נגיעות בוירוס בשדה עם נוכחות של הכנימה עלול לגרום לאפידמיה ולקריסה של השדה כולו.

מינים שונים של כנימות עלה, הגדלים על צמחים פונדקאים ממשפחות שונות, חלקם רב-פונדקאיות וחלקם חד-פונדקאיות נבחרו לצורך ביצוע הניסויים השונים.

1.5.2. מאפייני מיני כנימות העלה ששימשו במהלך העבודה לניסויים השונים:

כנימת עלה האפרסק, *M. persicae* Sulzer, נקראת כך על שם האפרסק המשמש אותה כפונדקאי ראשוני. כפונדקאים משניים משמשים מעל 40 משפחות של צמחים, ובכלל זה צמחים רבים בעלי חשיבות כלכלית. הן נפוצות בכל העולם, ומקורן כנראה באסיה. הן מצויות במושבות ע״ג עלי אפרסק צעירים בעונת האביב, או באוכלוסיות מפוזרות יותר בצמחים רבים אחרים, גם בעלים הבוגרים. גודלן 1.2-2.3 מ״מ. הכנימות הצעירות הן בגודל קטן עד בינוני, בצבעים ירוק בהיר, צהוב-ירוק חיוור, אפור-ירוק, ורוד או אדום; בתנאים קרים צבעי הירוק או האדום נעשים כהים יותר. לבוגרות ישנו כתם שחור במרכז הבטן. כנימות אלה הינן ווקטור הוירוסים החשוב ביותר בצמחים – הן מסוגלות להעביר יותר ממאה סוגים שונים של וירוסים מתמידים (Kennedy *et al.*, 1962) וחולפים (Blackman & Eastop, 1984).

כנימת עלה הכרוב, *Brevicoryne brassicae* L., ניזונות בעיקר על מיני צמחים ממשפחת המצליבים. הכוללים, כרוב, כרובית, צנון, חרדל ועוד. הן מצויות במושבות גדולות בצידו התחתון של העלה, וכן על עלי הכותרת. הן נפוצות באזורים בעלי אקלים מתון עד חם. הדרגות הצעירות הן בגודל בינוני- 1.6-2.6 מ״מ; צבען ירוק אפרפר או ירוק, עם סימנים כהים על בטנן ועל חלקן העליון. גופן עטוף

בשעווה לבנה-אפרפרה, המופרשת גם על הצמח ומכסה את המשטח עליו הן גדלות. הבוגרות הן בגודל 1.6-2.8 מ"מ; החזה והראש שלהן כהים ופסים אלכסוניים כהים מופיעים על הבטן העליונה. כנימות אלה משמשות כווקטור בהעברתם של כ- 20 וירוסים של צמחים, ובכלל זה וירוס המוזאיקה של הצנון, הכרובית, הכרוב והלפת.

כנימת העלה, *Lipaphis erysimi* Kaltenbach, גדלה אף היא על צמחים ממשפחת המצליבים, הן ניזונות על צידו התחתון של העלה או על גבי התפרחות של הצמחים הפונדקאים. כנימות אלו נפוצות בכל העולם. הדרגות הצעירות הן בגודל קטן עד בינוני - 1.4-2.4 מ"מ; צבען הוא ירוק-צהבהב, אפור-ירוק או ירוק זית, והן מצופות בציפוי שעווה לבן; בתנאי לחות, ציפוי השעווה נעשה צפוף יותר. הבוגרות הן בגודל 1.4-2.2 מ"מ, והן בעלות בטן בצבע ירוק כהה, ועורקי כנף כהים. כנימות אלה משמשות כווקטור ל- 10 מינים של וירוסים חולפים בצמחים, וביניהם מחלות מוזאיקה התוקפות צמחי צנון, כרובית, כרוב ולפת (Blackman & Eastop, 1984).

כנימת עלה הדילועיים, *Aphis gossypii* Glover, היא מין פוליפגי המאכלס מיני צמחים ממשפחות בוטניות שונות. הן חשובות כמזיק של גידולים ממשפחת הדילועיים כגון: מלון, קישוא, כמו כן גדלות על צמחי כותנה (נחשבות לאחד המזיקים העיקריים התוקפים יבול זה), קקאו, פלפל, וכן על צמחי נוי, כמו היביסקוס. הן נפוצות בעולם כולו: באזורים קרים (בהם הן מהוות מזיק עיקרי בגידולים בתוך חממות) וכן באזורים טרופיים. הדרגות הצעירות הן בגודל 0.9-1.8 מ"מ, ועשויות להופיע במגוון צבעים – אך לרוב בעלות צבע ירוק כהה. הבוגרות הן בגודל 1.1-1.8 מ"מ, בגוונים שונים של ירוק, ובעלות צינור Siphunculi כהה. במושבות צפופות המצויות בטמפרטורה גבוהה הכנימות הבוגרות עשויות להיות בגודל של פחות ממילימטר אחד, ובעלות צבע צהוב-לבן. כנימות אלה משמשות ווקטור בהעברה של יותר מ- 50 וירוסים של צמחים, בהם וירוסים חולפים ווירוסים מתמידים (Blackman & Eastop, 1984).

1.5.3. מבנה צינור המזון בחדק הכנימה:

הציפוי הפונה לחלל צינור המזון בחדק הכנימה מורכב מ- אפיקוטיקולה (Epicuticle). האפיקוטיקולה מורכבת משעוות וחלבונים בהם הושקעו סיבי הכיטין (Chitin), באזורים נרחבים באפיקוטיקולה ניתן לאתר אך ורק שעוות וחלבונים (ללא כיטין). הכיטין הנו רב-סוכר המורכב

ממונומרים של β-1-4- linked N-acetyl-D-glucosamine, הכיטין הנו המרכיב העיקרי בשלד של חרקים ומקנה לשלד את הקשיחות המאפיינת אותו.

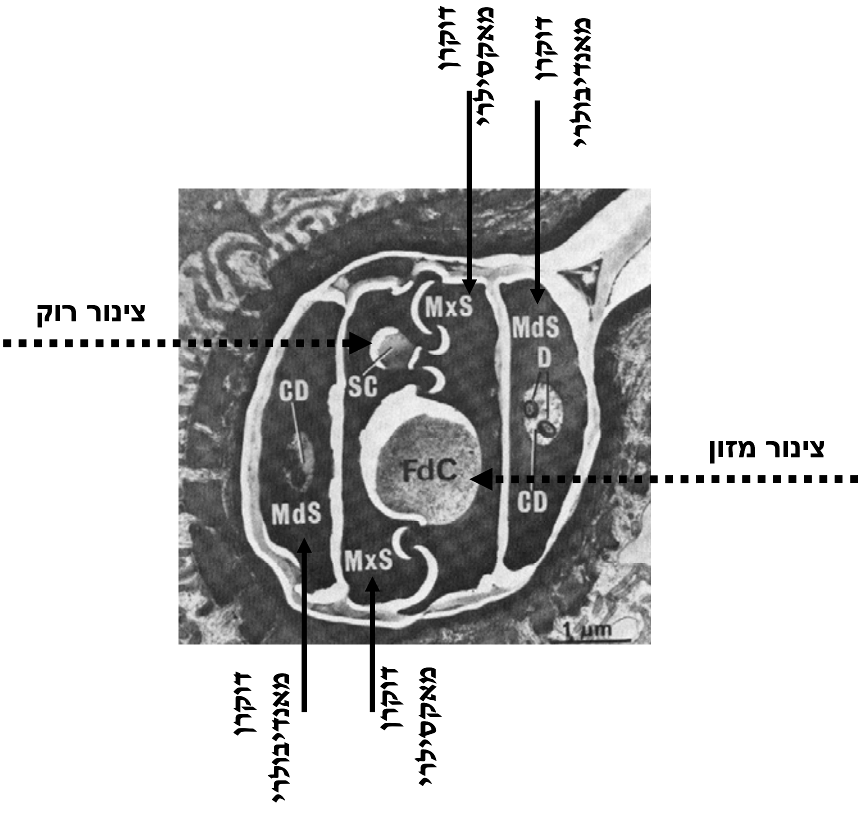
חלבונים קוטיקולריים (ח״ק), Cuticle Proteins (CuP), קבוצה זו של חלבונים מצויים ע״פ רוב בקוטיקולה של החרק. לחלקם הגדול של הח״ק יכולת להיקשר אל סיבי הכיטין, אך עם זאת ידועים גם ח״ק שאינם קשורים ישירות אל הכיטין, אלה קשורים אל ח״ק אחרים הקשורים אל הכיטין. השילוב של שעוות וח״ק בסיבי הכיטין מקנה לקוטיקולה חוזק עם יכולת גמישות. הרכב החלבונים והשעוות ביחס לכיטין נקבע בהתאם לדרישות הנחוצות לתפקידי האזורים השונים בגוף החרק, ומידת אי החדירות למים (Nevile, 1975; Vincent & Wegst, 2004).

1.6. רכישת ויריונים של פוטיוירוסים ע״י כנימות העלה:

מייד לאחר הגעתה (נחיתתה) של כנימת העלה אל הצמח הפונדקאי, מתבצעת הזנת טעימה קצרה, מספר שניות (10-20), מספיקות לכנימה באמצעות החדק, לחדור את האפידרמיס בצמח במהלך טעימתם מהצמח, בשלב זה הכנימה רוכשת את חלקיקי הוירוס (וחלבון ההלפר) בדוקרנים המאקסילרים (Maxillary stylets) שבחדק הכנימה בחלל צינור המזון Food canal (ראה תמונה מס׳ 5). פרק זמן זה הוכח כאופטימאלי לרכישה מרבית של חלקיקי הוירוס. הזנה ארוכה יותר של הכנימות (למעלה מדקה) מאפשרת להם החדרה עמוקה יותר של החדק מעבר לתאי האפידרמיס, הזנה זו פוגעת ומורידה את יעילות הרכישה וההדבקה בוירוס (Pirone & Harris, 1977). עובדה זו הוכחה באמצעות שימוש באלקטרודות המחוברות אל ראש הכנימה לצרכי מעקב אחר אופן הזנתם ומידת החדרת החדק אל הצמח (EPM)-Electrical Penetration Graph. מעקב אחר מידת החדרת החדק ומשך זמן ההזנה בשילוב עם שיעורי העברה של הוירוסים ע״י הכנימות הנבדקות, הראה כי יעילות העברה המרבית מתקיימת כאשר מתבצעות טעימות קצרות של הכנימה מהצמח בשניות הראשונות בתחילת ההזנה (Tjallingii, 1978; Powell, 1995; Martin *et al.*, 1997). קישור הוירוס אל גפי הפה של הכנימה ומידת השתמרותו בחדק (Retention) נלמדה לראשונה בעבודתו של Bradley משנת 1956 בעבודתו הוכח, כי וירוסים חולפים נקשרים אל גפי הפה של הכנימה והוטבע המושג **Stylet-borne viruses**, מאוחר יותר Harris בשנת 1977 הראה כי קישור הוירוסים אל גפי הפה של הכנימה, מתקיים באזורים מרוחקים בחדק. שימוש במיקרוסקופיה אלקטרונית

לבדיקת חתכי חדק של כנימות עלה לאחר רכישת וירוסים, אפשרו זיהוי של חלקיקי הוירוס ע״ג חדק הכנימה (Taylor & Robertson, 1974; Lim *et al.*, 1977). רק כעבור כ- 20 שנה, בעבודתם של Wang וחבריו, בשנת (1996) הוכח, כי חלקיקי וירוס המצויים ע״ג חדק הכנימה, אכן פעילים ביולוגית ומסוגלים לנגע צמחים בריאים.

חלקיקי הוירוס וחלבוני ההלפר, נקשרים לאזורים המצויים בקצה המרוחק שבחלל צינור המזון של חדק הכנימה Stylet tip (Ammar *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1996).



תמונה מספר 5. חתך רוחב של חדק כנימת העלה.

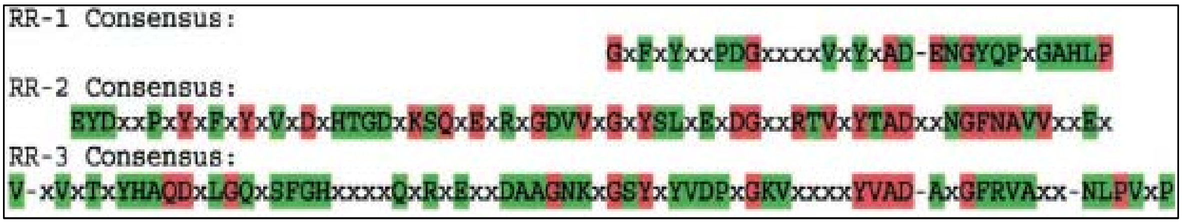
חתך רוחב של חדק כנימת העלה נלקח מ- Forbes, (1977). חיצים (מקוטעים) מצביעים על חלל צינור המזון (FdC) וצינור הרוק (SC) הנוצרים מהמבנה הייחודי של שני הדוקרנים המאקסילרים. בחלק העליון והתחתון של התמונה חיצים מצביעים על הדוקרנים המאקסילרים (MxS) והמאנדיבולרים (MdS).

1.7. חלבונים קוטיקולריים בחרקים Insect Cuticular Proteins:

בסוף שנות ה- 70 וראשית שנות ה- 80 התפרסמו עבודות ראשונות אשר בדקו טכניקות שונות למיצוי חלבונים מאזורים שונים בקוטיקולה של זבוב התסיסה *Drosophila melanogaster* (Fristorm *et al*., 1978), מזחלים של *Locusta migratoria* (Phillips & Loughton, 1976) ומטוואי המשי *Bombyx mori* (Nakato *et al*., 1990). בהמשך הצליחו לבודד ולאפיין את רצפי ח׳ האמינו של חלבונים קוטיקולריים (ח״ק) נוספים מסדרות החרקים הבאות: Lepidoptera, Coleoptera, Diptera ו- Orthoptera. בודדו ואופיינו ח״ק נוספים מזבוב התסיסה (Snyder *et al*., 1982; Henikoff *et al*., 1986; Apple & Fristorm, 1991; Qiu and Hardin, 1995). במקביל בודדו ח״ק גם מזחלים של *Tenebrio molitor*, (Charles *et al*., 1992; Mathelin *et al*., 1995; Rondot *et al*., 1996) ומזחלים של *L. migratoria*: (Højrup *et al*., 1986; Klarskov *et al*., 1989; Andersen & Højrup, 1987). בעבודתם של Rebers ו- Riddiford ב- 1988, הם הצליחו לבודד גנים לח״ק מספריות גנומיות של החרקים: *D. melanogaster* ו- *Manduca sexta*, חיזוי רצף ח׳ האמינו של הגנים לחלבונים השונים בהשוואה לרצפים של ח״ק שהיו ידועים באותה תקופה אפשרה זיהוי רצף שמור של 32 ח׳ אמינו ב- 7 ח״ק שמקורן בסדרות שונות של חרקים (Rebers & Riddiford, 1988). כ- 10 שנים מאוחר יותר, Andersen (1998), בהתבסס על תוצאותיהם של Rebers & Riddiford מ- 1988 ועל תוצאותיו מ- 1997 הציע לכנות את הרצף השמור של 32 ח׳ אמינו בשם RR-1 המיצג את קיצור שמם של Rebers & Riddiford. בח״ק של חרקים שונים זוהה רצף שמור נוסף, הרצף נמצא ארוך יותר וכולל 68 ח׳ אמינו. הרצף השני, כונה ע״י Andersen בשם RR-2 (Andersen, 1998) בהתבסס על תוצאות עבודתו הקודמת (Andersen & Højrup, 1997) ועבודות של חוקרים אחרים (Lampe & Willis.,1994; Charles *et al*., 1992; Klarskov *et al*., 1989; Krogh *et al*., 1995). רצף שמור נוסף, אשר הינו פחות נפוץ בחרקים, כולל 75 ח׳ אמינו ותואר עד כה רק בשלושה חלבונים קוטיקולריים, כונה בשם RR-3 (Andersen, 2000). בתמונה מס׳ 6, מפורט רצף ח׳ האמינו המאפיין כל אחד מסוגי הרצפים השמורים בח״ק: RR-1, RR-2, ו- RR-3 והשוואה של ח׳ אמינו המשותפות באתרי ה- R&R's השונים.

1.7.1. סיווג חלבונים קוטיקולריים:

עבודות ראשונות בתחום החלבונים קוטיקולריים, נהגו לסווג את הח״ק בהתאם לסוג הקוטיקולה: קוטיקולה גמישה או קוטיקולה קשיחה (Cox & Willis, 1987; Andersen & Højrup, 1987) בהתאם לדרגת ההתפתחות של החרק בה הח״ק מבוטאים (Chihara *et al.,* 1982; Wolfgang *et al.*, 1986; Dotson *et al.*, 1998) וע״פ היכולת למצותם מהחרק באמצעות אוריאה Urea- soluble proteins (Fristorm *et al.,* 1978). Andersen (1998), הראה כי ניתן לסווג את הח״ק בהתאם לרצף ח׳ האמינו באתר השמור R&R's (RR-1 ו- RR-2), היות ובמרבית המקרים נמצא כי ח״ק מקוטיקולה קשיחה מכילים את רצף האתר השמור מסוג RR-2 ואילו ח״ק מקוטיקולה גמישה מכילים את רצף האתר השמור מסוג RR-1 (Andersen,1998). לאחרונה, הוכח כי האתרים השמורים בחלבונים הקוטיקולריים (RR-1 ו- RR-2) מעורבים בקישור של הח״ק אל הכיטין Chitin Binding Domain (CBD) (Rebers & Willis, 2001; Togawa *et al.*, 2004) בהתאמה.



תמונה מספר 6. רצף חומצות האמינו המאפיין כל אחד משלושת סוגי החלבונים הקוטיקולריים.
בחרקים השונים ניתן לחלק את הח״ק בהתאם לסוג הרצף השמור: RR-1, RR-2, ו- RR-3. בתמונה, מובאים רצפי חומצות האמינו השמורים (consensus) בכ״א מסוגי ה- R&R's השונים. השוואה של רצפי ה- R&R's השונים זה אל זה מראה כי ישנה זהות גם בהרכב ח׳ האמינו בין אתרי ה- R&R's השונים, מסומנות בצבע אדום חומצות האמינו הנן בעלות זהות בשלושת אתרי ה- R&R's בח״ק מחרקים שונים, כאשר X מיצג ח׳ אמינית שאיננה שמורה (Willis *et al*., 2005).

1.8. אתרים שמורים בחלבונים קוטיקולריים המעורבים בקישורם אל הכיטין:

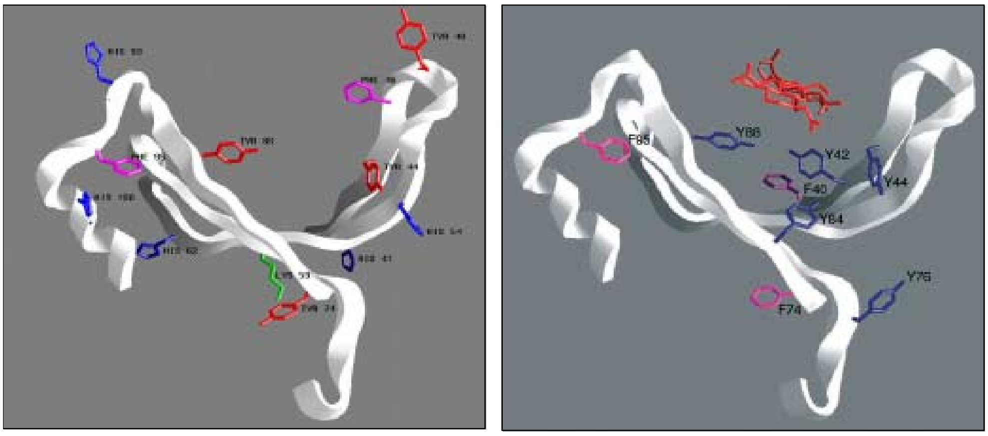
1.8.1. מעורבותם של אתרי RR-1 ו- RR-2 בקישור אל הכיטין:

בעבודתם של Rebers & willis (2001), הוכח לראשונה כי אתר ה- RR-2 בעל פעילות של CBD ומעורב בקישור הח״ק אל כיטין. הוכחה זו, התקבלה לאחר הוספת רצף ח׳ הגרעין המקדד לאתר השמור מסוג RR-2 של גן לח״ק מ- *Anopheles gambiae* אל רצף הגן (GST) Glutathione-S-

Transferase וביטויו בחיידקיי *E. coli*. החלבון המאוחה GST+RR-2, הראה יכולת קישור אל גרגירי כיטין והופרד באמצעותו משאר חלבוני החיידק (חסרי יכולת קישור אל כיטין) קישור אופטימאלי אל הכיטין התקבל ב- pH 7.0 (Rebers & Willis, 2001). ההוכחה כי האתר השמור מסוג RR-1 בעל פעילות של CBD נעשתה באופן דומה לאחר ביטויו בחיידקיים של חלבון מאוחה GST+RR-1 אשר הציג יכולת קישור אל הכיטין. קישור אופטימאלי התקבל ב- pH 6.4, עליה או ירידה בערכי ה- pH הפחיתו משמעותית את מידת הקישור אל הכיטין (Togawa *et al*., 2004).

1.8.2. זיהוי חומצות אמינו ורצפים ספציפיים באתר RR-1 ו- RR-2 המעורבים בקישור אל כיטין:

ביטוי בחיידקיים של החלבונים המאוחים: GST+RR-2 ו- GST+RR-1 אפשר החדרה של מוטציות נקודתיות ל- ח' אמינו ספציפיות (באתרים RR-1 ו- RR-2) ובחינת מעורבותם בקישור אל הכיטין. שתי מוטציות נקודתיות להחלפת ח' האמינו הארומאטיות: פנילאלנין (F) ברצף NG**F**NAVV או טירוזין (Y) ברצף **Y**TAD בח' אמינו אלאנין (A) באתר RR-2, פגעו ביכולת הקישור של GST+RR-2 אל הכיטין. מוטציה להחסרה של 10 ח' אמינו בקצה ה- N של RR-2 לא פגעה ביכולת הקישור אל הכיטין (Rebers & Willis, 2001). בשני חלבונים קוטיקולריים מסוג RR-1 החסרה של אזורים מהקצה ה- N ומהקצה ה-C פגעה ביכולת הקישור של GST+RR-1 אל כיטין (Togawa *et al*., 2004). מודלים משוערים לחיזוי המבנה המרחבי של הח״ק (תמונה מס' 7) מציגים כי ח״ק משני הסוגים, RR-1 ו- RR-2, ניחנים במבנה מרחבי דומה. בחלק העליון של כ״א מהחלבונים ניתן לזהות שקע (cleft) בו ממוקמים שיירי ח' אמינו ארומאטיות בעיקר פנילאלאנין (F) וטירוזין (Y). אתר ה- R&R יוצר את השקע ובתוכו מצוי משטח המאפשר את השתחלותו של הח״ק בסיבי הכיטין. ח' האמינו הארומאטיות המצויות בתוך אזור השקע ב- R&R של הח״ק מעורבות בקישור אל הכיטין (cuticle protein-chitin chain interactions) (Hamodrakas *et al*., 2002). במודל המרחבי המשוער המוצג בתמונה מס' 7, ניתן לראות בחלקו השמאלי התחתון של החלבון שקע נוסף, המשוער כמעורב בקישור של הח״ק אל ח״ק אחרים, (protein-protein interactions) חלקם חסרי אתר קישור אל כיטין, כך שאינם יכולים להיקשר ישירות אל הכיטין (Hamodrakas *et al*., 2002; Iconomidou *et al*., 2005).



RR-2 RR-1

תמונה מספר 7 : מודל משוער לחיזוי המבנה המרחבי של חלבונים קוטיקולריים מסוג RR-1 ו- RR-2.
בצד ימין, ח״ק מסוג RR-1 (Hamodrakas *et al*., 2002). משמאל, ח״ק מסוג RR-2 (Iconomidou *et al*., 2005).

1.9. רצפים חוזרניים (Motifs) הידועים בחלבונים קוטיקולריים:

ברצף ח' האמינו של ח״ק מחרקים שונים, זוהו רצפים שונים המהווים מוטיבים (Motifs) חוזרים. מוטיבים אלו, מכילים ע״פ רוב רצף קצר של 4-5 ח' אמינו החוזר על עצמו ומפוזר מספר פעמים משתנה בקצה ה- N ובקצה ה- C של הח״ק השונים בנוסף למוטיב ה- R&R הקיים בח״ק. חלק מן המוטיבים החוזרים בח״ק נמצאו מעורבים בפעילות פיזיולוגית בחרקים השונים: מוטיב חוזר, הנפוץ ביותר בח״ק, מכיל את רצף ח' האמינו: AAP(A/V) העשיר בח' האמינו אלאנין המאפיינת אזורים הידרופוביים ובשילוב עם פרולין ו- ואלין. מוטיב חוזר מסוג זה אותר בח״ק מבניים בעלי R&R וחסרי R&R (Rebers & Riddiford, 1988; Willis, 1999) בכ״א או בשני הקצוות ה- N או ה- C של הח״ק, ראה טבלה מס' 1. המוטיב החוזר AAP(A/V) זוהה גם בחלבונים מבניים אחרים שאינם קוטיקולריים כדוגמת החלבון (chorion) ממרכיבי מעטפת הביצה (eggshell) (Andersen *et al*., 1995) והחלבון אלסטין (elastin), משערים כי מוטיב זה מאפשר את קיפולו של האלסטין למבנה אופטימאלי המקנה לו את האלסטיות הדרושה לפעילותו (Urry *et al*., 1974; Urry, 1982).

מוטיב חוזר נוסף בח״ק, מכיל את רצף ח' האמינו: GYLG(G/Y)(G/Y) או GLLGLGY או GLLLGG בתחילתו של המוטיב. בח״ק שונים, זוהו אורכים שונים של המוטיב, המוטיב הקצר

ביותר, מכיל 6 שיירי ח' אמינו והמוטיב הארוך ביותר, מכיל 34 שיריי ח' אמינו (Andersen *et al.*, 1995). מוטיב זה, העשיר ב- ח' אמינו: גליצין, טירוזין וליאוצין, מאפיין גנים לח"ק המבוקרים ע"י ההורמון אקדיזון (Højrup *et al.*, 1986 ;Apple & Fristrom, 1991).

טבלה מספר 1. סיווג חלבונים קוטיקולריים מבניים הידועים כיום.

R&R	מכילים מוטיב חוזר מהסוג **AAP(AV)**	חסרי מוטיב חוזר מהסוג **AAP(AV)**	מספר חלבונים קוטיקולריים
RR-1	2	49	51
RR-2	36	8	44
RR-3	1	2	3
Not RR	26	15	41

סיווג של 139 חלבונים קוטיקולריים הידועים כיום, נעשה לפי סוג אתר ה- R&R ובהתאם לנוכחותו של המוטיב החוזר. הטבלה מבוססת על נתונים ממאמר סקירה בנושא (Willis *et al.*, 2005).

1.10. חלבונים קוטיקולריים שאינם מבניים:

רובם הגדול, של החלבונים בקוטיקולה של החרקים הידועים כיום הנם ח"ק מבניים. בנוסף אליהם, בודדו ואופיינו מהקוטיקולה חלבונים נוספים שאינם מבניים, בעלי תפקידים נוספים כדוגמת: פיגמנטים המצויים בקוטיקולה, אנזימים המעורבים בבניה ופירוק של הקוטיקולה, חלבוניי הגנה המצויים בהמולימפה ומופרשים אל הקוטיקולה ו- Arylphorins שתפקידם עדין איננו ידוע.

פיגמנטים- הפיגמנטים מהווים חלק מהמבנה הייחודי בקוטיקולה של החרקים השונים, אך הם אינם מסווגים כח"ק מבניים. ידועים שלוש קבוצות של פיגמנטים המצויים בקוטיקולה: הראשון Insecticyanins הוא פיגמנט כחול המיוצר באפידרמיס ומופרש במקביל אל ההמולימפה ואל הקוטיקולה. בנוכחות קרוטן (carotenes) בקוטיקולה הוא משנה את צבעו לירוק (Holden *et al.*, 1987). שני גנים ל- Insecticyanins בודדו מ- *Manduca sexta* (Li & Riddiford, 1992). פיגמנט צהוב ראשון בודד מ- *Drosophila melanogaster* (Kornezos & Chia, 1992) חלבון זה נמצא כבעל יכולת להגיב עם הגן- *ebony* המקדד לחלבון β-alanyl-dopamine synthase המאפשר

הצטברות מלנין בקוטיקולה. פיגמנט צהוב שני, בודד מדרגת הבוגר של – *Schistocerca gregaria*, נמצא כי הוא קושר אליו β-carotene בנוסף נמצא כי הוא מכיל רצף המצוי בחלבונים בעלי יכולת קישור של Juvenile hormone (Wybrandt & Andersen, 2001).

<u>אנזימים-</u> מגוון אנזימים מעורבים בתהליך הבנייה והפירוק של הקוטיקולה בחרקים, אנזימים אלו מצויים בקוטיקולה בשלבי ההתפתחות השונים של החרק אך הם אינם מהווים חלק ממנה. חלבון בגודל של 19kDa נמצא מעורב בתהליך ההתנשלות, רמת הביטוי של החלבון עולה טרם ההתנשלות, החלבון נמצא כבעל יכולת פרוטאוליטית לפירוק הקשר האמידי שבין N-acetylglucosamine בכיטין לבין ח' האמינו של הח"ק הקשורים לכיטין (Marcu & Locke, 1999). כמו כן, ידועים פרוטאזות וכיטינאזות בעלי יכולת לפרק את הקוטיקולה הישנה (Marcu & Locke, 1998). אנזימים מהקבוצה של Phenoloxidase מעורבים בתהליך החמצון וההקשחה של הקוטיקולה (Sugumaran,1998).

<u>חלבוני הגנה-</u> חלבון אנטי-בקטריאלי cecropin נמצא ברמות גבוהות במיצוי מהקוטיקולה 24 שעות לאחר חשיפת זחלים של *Bombyx mori* לחיידקים (Lee & Brey, 1994). בקוטיקולה של *M. sexta* נמצא שני חלבוני הגנה מסוג Scolexin (Molnar *et al*., 2001). חלבונים מהקבוצה של Prophenoloxidase-(proPO) לאחר עיכול פרוטאוליטי החלבון הופך ל- phenoloxidase-(PO) פעיל. האנזים PO מעורב בהקשחה של הקוטיקולה (Sugumaran,1998). האנזים PO בעל תפקיד במערכת ההגנה החרקית כנגד פתוגנים וטפילים באמצעות אנקפסולציה ומלאניזציה, האנזים הפעיל מזרז יצירת quinones לצורך סינתזה של מלנין (Soderhall *et al*., 1990; Ashida & Brey, 1995). כמו כן, האנזים PO מעורב גם בתהליך ההחלמה מפציעות בחרקים (Ashida & Brey, 1998).

<u>Arylphorins</u>- קבוצה נוספת של חלבונים קוטיקולריים לא מבניים, בעלי תכולה גבוהה של ח' אמינו ארומאטיות ושומנים. ניתן לסווג אותם כחלבוני המולימפה, אך ניתן לזהותם גם בקוטיקולה ברמות נמוכות יותר. תפקידם עדיו איננו ידוע, משערים כי הם מעורבים בתהליך ההקשחה של הקוטיקולה (Cox & Willis, 1985; Willis *et al*., 2005).

1.11. נוכחות אינטרונים (Introns) בגנים לחלבונים קוטיקולריים:

גנים המקדדים ליצירת ח״ק בחרקים בדומה לגנים אאוקריוטים (eukaryotic genes) לחלבונים אחרים מכילים לעיתים, אזורים בגנום שאינם מקדדים ליצירת חלבון, לאזורים אלו על אף שאינם מקדדים ליצירת החלבון, ישנה חשיבות רבה בבקרה על רמת הביטוי של ה- pre-mRNA ועל הפוליאדנילציה (polyadenylation) בקצה 3׳ של ה- mRNA ובהשפעה על בקרת הביטוי של החלבון (Le Hir *et al*., 2003). גנים אאוקריוטים רבים מכילים אינטרונים (introns) רצפי האינטרונים קוטעים את האזורים המקודדים לחלבון-אקסונים (exons). לאחר השעתוק (transcription) נוצר mRNA ראשוני המכיל את רצפי האינטרונים, תהליך של splicing באמצעות קומפלקס חלבוני ה-splicesome מאפשר חיתוך והרחקה של האינטרונים, ואיחוי של האקסונים זה לזה. ה- mRNA הנוצר מכיל שני אזורים בקצוות שאינם מתורגמים לחלבון, בקצה '5 (5' UTR) עד לרצף המקדד לח׳ אמינו מתיונין הראשונה ובקצה '3 (3' UTR) החל מקודון הפסק לסוף תרגום החלבון ועד לרצף של Poly A signal. חלק גדול מהגנים לח״ק שזוהו עד כה, נמצאו במקבצים (clusters) של גנים, כל מקבץ מכיל מספר שונה של גנים לח״ק (Willis *et al*., 2005). מקבץ הגנים לח״ק הגדול ביותר זוהה בזבוב התסיסה וגודלו כ- 22kb, המקבץ נמצא מכיל 12 גנים לח״ק (Charles *et al*., 1997; 1998), המקבץ הקטן ביותר שזוהה גודלו 3.9kb ב- *T. molitor* מכיל שני גנים (Rondot *et al*., 1998). תיאור מקבצי הגנים לח״ק בחרקים השונים מובא בטבלה מס׳ 2.

בגנים ל- ח״ק, דווח לראשונה על נוכחות אינטרונים בשישה גנים ל- ח״ק של *D. melanogaster*, בהם האינטרון הראשון קוטע את הגן באזור המקדד ליצירת Signal Peptide (SP) בין ח׳ האמינו השלישית לרביעית בח״ק (Snyder *et al*., 1982). עבודות נוספות שנעשו לאחר מכן בחרקים אחרים: *A. gambia*, *M. sexta* ו- *T. molitor* זוהו אינטרונים בחלק מהגנים לח״ק. ע״פ רוב, בגנים לח״ק אותר אינטרון אחד באורך של כ- 60 בסיסים הקוטע את הרצף המקדד ל- SP ולעיתים זוהה אינטרון שני נוסף. נוכחות של יותר מ- 2 אינטרונים דווחה ב- *B. mori*, שם אותרו 4 אינטרונים (Nakato *et al*., 1994). נכון לעכשיו, לא ידוע בספרות על נוכחות אינטרונים בגנים ל- ח״ק הקוטעים את הרצף המקדד ל- R&R's השונים (Willis *et al*., 2005).

1.12. תפקידם המשוער של האינטרונים:

מעורבותם של האינטרונים, בהגברת רמות הביטוי של הגן במספר הוכחה במערכות ניסוייות שונות: עכברים טרנסגנים אליהם הוחדר גן ל- chloramphenicol acetyltransferase חיידקיי תחת בקרה של פרומוטור H4 היסטון (histone), תוספת של אינטרון הקוטע את רצף הגן אפשרה קבלת כמות גדולה יותר של mRNA עד פי 300 יותר בהשוואה לביקורת ללא תוספת האינטרון (Choi *et al.*, 1991). בגנים אאוקריוטים אחרים כדוגמת: Murine β casein (Kolb, 2003) ובגן ל- Carnitine palmitoyltransferase Iβ (Wang *et al.*, 2002), נמצא כי לאינטרון הראשון, יכולת להגביר (enhancer) את פעילותו של הפרומוטור, ויכולת לווסת את פעילות הפרומוטור ואף להשתיקה לחלוטין. האינטרון הראשון בגן ל- Murine β casein התגלה בנוסף, גם כבעל יכולת פעילות של פרומוטור (Kolb, 2003). בגנים לח"ק בדומה לגנים האאוקריוטים שהוזכרו, הוכח לאחרונה גם כן, כי לאינטרון הראשון יכולת פעילות של אתר "מגביר" להגברת פעילותו של הפרומוטור ולקבלת רמות שעתוק (transcription) גבוהות (Lemoine *et al.*, 2004).

טבלה מספר 2. החרקים השונים מהם בודדו מקבצי גנים לחלבונים קוטיקולריים.

Species	Length of DNA examined	Number of genes found	Reference
Anopheles gambiae	17.4kb	3	Dotson *et al.*, 1998
Drosophila melanogaster	9kb	6	Snyder *et al.,* 1982
D. melanogaster	20.5kb	8	Apple & Fristrom,1991 Kaufman *et al.*, 1990
D. melanogaster	22kb	12	Charles *et al.*, 1997,1998
Manduca sexta	20kb	3	Horodyski & Riddiford, 1989
Tenebrio molitor	3.9kb	2	Rondot *et al.*, 1998

הנתונים המופיעים בטבלה נלקחו ממאמר סקירה בנושא (Willis *et al.*, 2005).

מלבד בידוד מקבצי הגנים (clusters) לח״ק כפי שהוזכר (טבלה מס׳ 2) בודדו גם גנים ספציפיים לח״ק כאשר רצף ה- cDNA המקדד לח״ק ידוע, שימש כגלאי (probe) לסריקה של ספריות גנומיות של חרקים שונים: *Hyalophora cecropia* (Binger & Willis, 1994; Lampe & Willis, 1994); *M. sexta* (Rebers & Riddiford, 1996); *T. molitor* (Mathelin *et al*., 1998); *B. mori* (Togawa *et al*., 2001), או לחילופין נעשה שימוש בתחלים הספציפיים לכל גן קוטיקולרי והגברתו באמצעות ריאקצית PCR ושימוש ב- DNA שהתקבל מהגנום החרקי או בספריה גנומיות של *Antheraea yamamai* כטמפליט (Kim *et al*., 2003).

גישה נוספת לבידוד cDNA המקודד לח״ק של *B. mori* (פחות אלגנטית אך מאסיבית יותר), בדקה את רצף הבסיסים של 1050 קלונים שבודדו באופן אקראי מספריית ה- cDNA של *B. mori* ואפשרה את בידודם של 31 cDNA המקודדים לח״ק, תשעה מתוכם אופיינו כמקודדים לח״ק חדשים (Takeda *et al*., 2001).

1.13 מטרות המחקר:

<u>מטרה 1</u>: בחינת מעורבות חלבון ההלפר בקביעת הספציפיות אל חלבוני מעטפת שונים בתהליך העברה של פוטיוירוסים ע"י כנימות עלה.

<u>מטרה 2</u>: בחינת מעורבות חלבון ההלפר הפוטיויראלי בקביעת הספציפיות אל מיני כנימות שונים בתהליך העברה.

<u>מטרה 3</u>: אפיון החלבונים הקוטיקולריים בכנימות עלה ובייחוד אלו המעורבים בזיקה אל חלבונים ויראליים של פוטיוירוסים.

2. שיטות וחומרים:

2.1. גידול מיני כנימות העלה:

מינים אחדים של כנימות העלה, שימשו במהלך העבודה למגוון ניסויים. הניסויים כללו: העברה של פוטיוירוסים, מיצוי חלבונים קוטיקולריים ובידוד ח' גרעין. הכנימות גודלו בתאים ממוזגים.
בעבודה נכללו המינים הבאים: כנימת עלה האפרסק *M. persicae* Sulzer וכנימת העלה *Lipaphis erysimi* Kaltenbach גודלו בחדרים מבודדים על חרדל *Brassica perviridis* מן הזן Tendergreen; כנימת עלה הכרוב, *Brevicoryne brassicae* L. גודלה על כרוב *Brassica oleracea*; כנימת עלה הדילועיים, *Aphis gossypii* Glover גודלה על קישוא *Cucurbita pepo* מזן מכלוא "מעיין"; כנימת עלה התירס, *Rhopalosiphum maidis* Fitch וכנימת הדגן האירופית *Rhopalosiphum padi* L. גודלו בחדרים נפרדים על תירס *Zea mays*; כנימת העלה *Aphis fabae* Scopoli גודלה על צמחי ענבי שועל (black nightshade) *Solanum niger*.

2.2. סוג ומקור הוירוסים:

במחקר הנוכחי שימשו שני פוטיוירוסים: וירוס המוזאיקה של הלפת *Turnip Mosaic Virus* (TuMV), מנגע בעיקר צמחים ממשפחת המצליבים ווירוס המוזאיקה הצהובה של הקישוא *Zucchini Yellow Mosaic Virus* (ZYMV) מנגע בעיקר צמחים ממשפחת הדילועיים. במהלך העבודה, נעשה שימוש בגזעים של ZYMV: גזע בר המועבר ביעילות רבה ע"י כנימות עלה (HAT) Highly Aphid Transmissible, מקורו בצמחי קישוא בבקעת הירדן (Gal-On *et al.*, 1992), שימש לניקוי ויריונים וגזע רקומביננטי אליו הוסף רצף המקודד לתוספת של 7 שיירים של חומצות האמינו היסטידין, בקצה ה-N של חלבון ההלפר His-HC (Kadoury *et al.*, 1998).

2.3. צמחי מקור לניקוי וירוס והלפר:

צמחי קישוא, גודלו בתנאי חממה תחת תאורה מתמדת באורך יום של 24 שעות. שבוע לאחר הנביטה הצמחים הודבקו בגזעים השונים של ZYMV. צמחי חרדל, גודלו בחממה ממוזגת ובתאורה מתמדת (אורך יום של 24 שעות). צמחי החרדל הודבקו ב- TuMV לאחר כ- 20 יום מהנביטה.

2.4. צמחי בוחן:

צמחי הבוחן גודלו בחממה ממוזגת: נבטים של מלפפון *Cucumis sativus* מזן מכלוא "כפיר" גודלו בחממה עד לגידול עלה אמיתי ראשון. הנבטים שימשו כצמחי בוחן לניסויי העברה עם הכנימות בגזעים השונים של ZYMV. נבטים של חרדל גודלו בחממה, הצמחים שימשו כצמחי בוחן ל- TuMV בשלב של עלה אמיתי ראשון.

2.5. הדבקת צמחי מקור וצמחי בוחן:

2.5.1. הדבקה מכאנית:

עלים נגועים בוירוס נכתשו בתמיסה של 1% K_2HPO_4 באמצעות מכתש ועלי. הצמחים אובקו קודם לכן בקרבורונדום והמיצוי הצמחי נמרח עליהם בעזרת רטיית גזה.

2.5.2. הדבקת צמחי קישוא עם DNA ויראלי אינפקטיבי:

הדבקה של צמחי קישוא בגזעים האינפקטיבים השונים של ZYMV(AGI, AGII) נעשתה באמצעות מכונת הדבקה (הפועלת בלחץ אויר) בעלת אקדח יורה חלקיקים (Bim-Lab) מתוצרת חברת ביו-עוז המבוססת על שיטה שתוארה במעבדתנו (Gal-On *et al.*, 1995). תמיסת הירי הכילה- 100 ng DNA מהפלסמיד האינפקטיבי של הוירוס (מהגזעים השונים) של ZYMV, Tungsten בריכוז 50mg/ml בתמיסת 50% גליצרול ו- 1.25M $Ca(NO_3)_2$ ביחס נפחי שווה של שלושת המרכיבים. הירי בוצע על פסיגים, בנפח של 5 µl מהתמיסה על כל פסיג, מרחק של כ- 3 ס"מ מהרקמה הצמחית בלחץ אוויר של 3-4 bar. הצמחים גדלו בתנאי החדר עד קבלת סימפטומים המעידים על הדבקה בוירוס.

2.5.3. ניגוע צמחים בפוטיוירוסים באמצעות כנימות עלה:

הכנימות נאספו מהצמח הפונדקאי אל מבחנה סגורה והורעבו למשך שעה טרם הזנת הרכישה **(acquisition access feeding):** כנימות העלה, הונחו ע"ג עלה או ממברנה להזנה (feeding) למשך 10 דקות. כאשר רכישת הוירוס נעשתה מממברנה, כ- 100 כנימות עלה הוכנסו לגליל הזכוכית שעל פתחו העליון נמתחה ממברנה דקה של Parafilm ופתחו התחתון נחסם עם משטח זכוכית למניעת יציאת הכנימות. על הממברנה הונחה תמיסה המכילה 10µl בופר בורט או פוספט המכילים כ- 100µg וירוס מנוקה ו- HC-Pro 40µl המצוי בבופר פוספט אליו הוסף 20% סוכרוז. על טיפת הנוזל הונחה זכוכית מכסה של מיקרוסקופ (לשיטוח הנוזל ע"ג הממברנה). גליל ההזנה כוסה בכוס פלסטיק ליצירת תנאי תאורה המדמה את התנאים המתקיימים בחלק התחתון של העלה במהלך ההזנה. משך הזנה היה ל-10 דקות. **הזנת הדבקה (inoculation access feeding):** הכנימות הועברו מהצמח הנגוע או לחילופין מן הממברנה להזנה על צמחי בוחן (חופשיים מהוירוס). למרות שדי בהזנה של כשעה לקבלת הדבקה, הושארו הכנימות על צמחי הבוחן עד למחרת היום מסיבות טכניות. קטילת הכנימות: ריסוס בניקוטין בריכוז 0.5% או לחילופין הגמעה בקונפידור Imidacloprid (Confidor, Bayer Ltd.) במיהול של 1:10,000 במים. לאחר תמותה של הכנימות, הצמחים הועברו לחדר גידול עם תאורה מתמדת וטמפרטורה קבועה של כ- 25 מ"צ עד להופעת סימני מחלה. צמחי הקישוא שהודבקו בוירוס ZYMV הראו סמני מחלה קשים הכוללים מוזאיקה, הצהבה, עיוות עלים 7-10 ימים לאחר ההדבקה. צמחי מלפפון ששימשו כצמחי בוחן הראו סימני מוזאיקה ובשושיות 8-10 ימים לאחר ההדבקה ב-ZYMV. צמחי חרדל ששימשו כצמחי בוחן הראו סימני מוזאיקה וגבשושיות 10-14 ימים לאחר הדבקה ב- TuMV.

2.6. ניקוי פוטיוירוסים:

2.6.1. ניקוי ZYMV:

ניקוי ZYMV נעשה ע"פ Antignus *et al.*, 1989. 100 גרם עלי קישוא נגועים בוירוס ZYMV נלקחו כ- 14-21 ימים לאחר ההדבקה. אל העלים הוספה תמיסה כתישה המכילה 50ml כלורופורם, 50ml פחמן טטרה כלורי ו- 0.15% ח' תיוגליקולית (החומרים מתוצרת חברת Bio Lab). העלים

נכתשו בהומוגיניזר חשמלי למשך 3 דקות. סרכוז נמוך במהירות של 10,000g למשך 15 דקות להרחקת חלקי צמח גסים. הנוזל העליון נאסף וסונן דרך Miracloth, (Calbiochem). הנוזל הונח על 20ml תמיסה המכילה: 0.05M boric acid pH 8.0 ו- 1mM EDTA (לנוחיות, מכונה תמיסה זו בופר בורט) אליה הוסף 20% סוכרוז (כרית סוכרוז) במבחנות של רוטור בעל זווית קבועה (fixed angle) SS-34. התערובת סורכזה באולטרצנטריפוגה במהירות של 60,000g למשך 90 דקות בטמפ' של 4°C. המשקע המתקבל הורחף בהומוגיניזר טפלון עם 1ml של בופר בורט ועורבל באיטיות למשך הלילה בטמפ' של 4°C. לאחר מכן, התרחיף הונח ע"ג גרדיאנט 45% - 15% של סוכרוז שהוכן יום קודם לכן. הגראדיאנט סורכז במהירות של 80,000 g למשך 150 דקות בטמפ' של 4°C ברוטור SW-28 Swinging bucket. שכבת הוירוס במבחנה הוצאה במקטעים של 3ml באמצעות משאבה פריסטלטית. נוכחות הוירוס במקטעים שהוצאו, נקבעה באמצעות מיקרוסקופ אלקטרונים. מקטעים המכילים וירוס, נאספו יחדיו ונמהלו באמצעות 3 נפחים של בופר בורט. הוירוס הופרד מתמיסת הסוכר ע"י השקעה במהירות של 70,000g ברוטור SW- Swinging bucket 28 למשך 60 דקות בטמפ' של 4°C. הנוזל העליון הורחק והמשקע הורחף ב - 500 µl - 300 בופר בורט ונלקח לקביעת איכות הניקוי וריכוז הוירוס בספקטרופוטומטר ע"י קביעת היחס 260/280 nm ולקביעת פעילות ביולוגיות של הויריונים.

2.6.2. ניקוי TuMV:

ניקוי TuMV נעשה ע"פ Sako, 1980. 100 גרם רקמת טרף בין עורקית מצמחים נגועים ב- TuMV הוספו ל- 150ml בופר כתישה המכיל: בופר פוספט I 0.5M K_2HPO_4 pH 7.5 אליו הוסף Na_2SO_3 0.1%. התערובת נכתשה בהומוגיניזר חשמלי במהירות איטית עד לכתישת כל העלים. הוספת 12ml butanol והמשך כתישה במהירות גבוהה עד לקבלת עיסה אחידה. סרכוז נמוך למשך 10 דקות במהירות של 4,500g בטמפ' של 4°C. הנוזל העליון נאסף וסונן דרך Miracloth. אליו הוסף Triton X-100 ביחס של 10 ml/L מהנוזל העליון. הדוגמא עורבבה באיטיות למשך כשעה בטמפ' של 4°C. הוספת PEG 8000 ביחס של 40 g/L ו- 5.84 g/L NaCl וערבוב איטי למשך כשעה בטמפ' של 4°C. סרכוז נמוך של הדוגמא למשך 10 דקות במהירות של 8,000g בטמפ' של 4°C.

המשקע שהתקבל הורחף בבופר פוספט I אליו הוסף 0.584 g/L NaCl. (כמות הבופר שהוספה היא שליש מכמות הנוזל העליון שהתקבל לאחר הסרכוז הראשון). סרכוז נמוך למשך 10 דקות במהירות של 7,500g בטמפ׳ של 4°C. הנוזל העליון נאסף ונמדד, אליו הוסף PEG 8000 ביחס של 80 g/L (להשקעה של הוירויונים) ערבוב באיטיות למשך כשעה ב- 4°C. סרכוז למשך 10 דקות במהירות של 8,000g בטמפ׳ של 4°C, המשקע הורחף ב- 3ml בופר פוספט I. סרכוז נמוך של הדוגמא, במהירות של 7,500g למשך 10 דקות בטמפ׳ של 4°C. הנוזל נאסף, כמות של 1.5ml הונחו על כ״א מ- 2 מבחנות הניטרוצלולוז המכילות 3.5ml של גראדינט צזיום כלוריד המכיל: בופר פוספט II 0.05 M K_2HPO_4 pH 8.2 אליו הוסף 30% צזיום-כלוריד (CsCl). סרכוז של הדוגמאות למשך 18 שעות ברוטור Ti-50 במהירות של 36,000g בטמפ׳ של 4°C. שכבת הוירוס במבחנה הוצאה במקטעים של 0.5ml לבדיקה במיקרוסקופ אלקטרונים, מקטעים בהם נמצא הוירוס נאספו ונמהלו x10 בבופר פוספט II. סרכוז לריכוז הדוגמא נעשה ברוטור Ti-50 למשך 120 דקות במהירות של 26,000g בטמפ׳ של 4°C. על המשקע המתקבל הונחו 200µl בופר פוספט II למשך הלילה בטמפ׳ של 4°C. למחרת נלקחה דגימה לקביעת איכות הניקוי וריכוז הוירוס המתקבל.

2.6.3. בדיקה ואחסון וירוסים מנוקים:

הוירוס נשמר בקירור בטמפ׳ של 4°C לצורך ביצוע הניסויים השונים, לפרק זמן של עד 6 חודשים. איכות הוירוסים TuMV ו- ZYMV נבחנה במיקרוסקופ אלקטרוני לאחר הניקוי. נעשה שימוש ברשתיות למיקרוסקופ המצופות בפילם Formwar ובשכבת פחם. הרשתית הונחה על טיפה מהתמיסה הנבדקת למשך דקה, נשטפה עם מס׳ טיפות מים ונצבעה ב- 1% Uranyl acetate למשך דקה ויובשה עם נייר סינון (התצפיות נעשו במיקרוסקופ אלקטרונים חודר מדגם JEOL 100-CX II). קביעת פעילות ביולוגיות נעשתה באמצעות העברה של הוירויונים המנוקים בתוספת חלבון הלפר מנוקה של כל אחד מהוירוסים ע״י כנימת העלה *M. persicae*.

2.7. ניקוי חלבוני "הלפר" Helper Component Proteinase (HC-Pro):

2.7.1. ניקוי חלבוני הלפר של ZYMV (שיטת הסרכוז):

תהליך הניקוי נעשה ע"פ Lecoq *et al.*, 1991. 100 גרם עלי קישוא נגועים ב- ZYMV נלקחו לאחר כ- 14 ימים ממועד ההדבקה. העלים נכתשו בהומוגינייזר חשמלי למשך שלוש דקות עם 300ml בופר מיצוי המכיל: pH 9.0, 0.3M K_2HPO_4. סרכוז נמוך במהירות של 4,000g למשך 15 דקות להרחקת חלקי צמח גסים. הנוזל העליון נאסף וסונן דרך Miracloth, סרכוז גבוה במהירות של 66,000g ברוטור SS-34 למשך 90 דקות בטמפ' של 4°C להשקעת חלקיקי הוירוס שנוכחותם מפריעה בניסויים עם חלבון ההלפר. איסוף 25ml העליונים של הנוזל שהתקבל (ע"מ להתרחק ככל האפשר מן המשקע המכיל ויריונים). אל הנוזל העליון הוסף 20% אמוניום סולפט להשקעת חלבונים. הדוגמאות נשמרו ב- 4°C למשך שעה, סרכוז נמוך למשך 10 דקות במהירות של 8,000g בטמפ' של 4°C לקבלת המשקע המכיל חלבונים. המשקע הורחף בהומוגינייזר טפלון יחד עם 14ml מבופר המיצוי וסורכז במהירות של 12,000g למשך 10 דקות בטמפ' של 4°C להרחקת תמיסת האמוניום סולפט. הנוזל העליון עורבב שוב למשך כחצי שעה עם 30% אמוניום סולפט. המשקע המכיל חלבונים הושקע שוב ע"י סרכוז נמוך במהירות של 8,000g למשך 10 דקות בטמפ' של 4°C. המשקע הורחף בהומוגינייזר יחד עם 3ml מבופר המיצוי, סורכז שוב להרחקת מלחי האמוניום במהירות של 12,000g למשך 10 דקות בטמפ' של 4°C. הנוזל העליון שנאסף מכיל את חלבון ההלפר, אליו הוסף סוכרוז לריכוז סופי של 20%, הדוגמאות נשמרו בהקפאה בטמפ' של -20°C להמשך הניסויים השונים.

2.7.2. ניקוי חלבוני הלפר של ZYMV באמצעות כרומטוגרפיה של זיקה אל NTA resin $Ni2^+$:

ניקוי חלבוני ההלפר של ZYMV באמצעות כרומטוגרפיה של זיקה (Affinity chromatography) אל Ni^{2+} NTA resin (Ni-NTA) כפי שתואר ע"י Kadoury *et al.*, 1998. נאספו 2 גרם רקמה צמחית נגועה בוירוס 8-12 ימים לאחר ההדבקה. העלים נכתשו במכתש ועלי יחד עם 6ml של בופר מיצוי

מקורר K_2HPO_4 0.3M ב- pH 8.8. הכתש סורכז במהירות נמוכה של 2,000g למשך כ- 10 דקות בטמפ׳ של 4°C. הנוזל העליון נאסף ועורבב יחד עם 400µl של Ni-NTR 50% שנשטף 3 פעמים בבופר המיצוי טרם השימוש. (ה- Ni-NTR נרכש מחברת Qiagen או מחברת Cytosignal). התערובת עורבבה במהירות איטית למשך שעה בטמפ׳ של 4°C. התערובת סורכזה כ- 2 דקות במהירות של 1,000g להשקעת Ni-NTA הספוח. משקע ה- Ni-NTA נאסף למבחנת 1.5ml ונשטף מספר פעמים בבופר המיצוי עד שהתמיסה הפכה לצלולה. בין שטיפה לשטיפה סורכזו המבחנות כ- 2 דקות במהירות של 1,000g. שלב השחרור של חלבון ההלפר מהניקל בוצע ע״י הוספת 400µl מבופר השחרור המכיל בופר מיצוי אליו הוספו EDTA 250mM או 300mM Imidazole (Sigma) (אימידזול) אל ה- Ni-NTR, הדוגמא טולטלה באיטיות למשך כ- 5 דקות בטמפ׳ של 4°C. להשקעת ה- Ni-NTR נעשה סרכוז נוסף למשך כ- 2 דקות במהירות של 1,000g . הנוזל העליון (כ- 400µl בנפח) מכיל את חלבון ההלפר. לתמיסה זו הוסף סוכרוז לריכוז סופי של 20%. הנוזל חולק למבחנות, כך שכל מבחנה הכילה כמות של 40µl המהווים כ- 40µg חלבון. הדוגמאות נשמרו בהקפאה עמוקה בטמפ׳ של 80 °C- ושימשו במהלך הניסויים השונים.

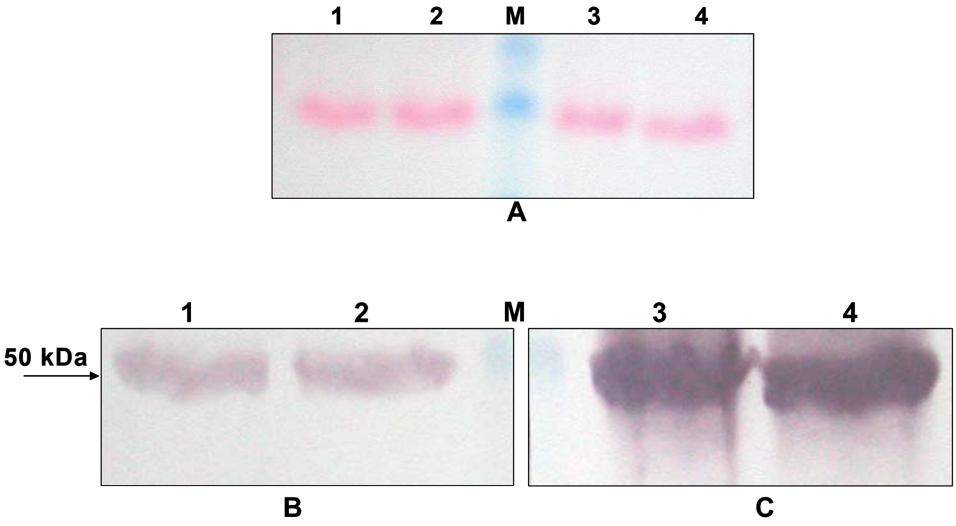
2.7.3. ניקוי חלבוני הלפר של TuMV באמצעות כרומטוגרפיה של זיקה אל NTA resin $Ni2^+$:

ניקוי חלבוני הלפר מצמחי חרדל נגועים ב- TuMV נעשה בדומה למפורט בסעיף הקודם מלבד השימוש בבופרים שונים אשר הצטיינו בשימור פעילותו הביולוגית של ההלפר של TuMV. כתישת דוגמאות העלים נעשתה בופר פוספט (K_2HPO_4 0.5M ,pH 8.8). להמשך תהליך ההפקה שימש בופר פוספט נוסף (K_2HPO_4 0.02M ,pH 7.4). שחרור ההלפר מ- Ni-NTA נעשה באמצעות בופר הפוספט השני אליו הוסף EGTA לריכוז סופי של 0.4M.

2.7.4 זיהוי סרולוגי של חלבוני הלפר מנוקים:

שימוש בנוגדנים רב-שבטים (Polyclonal) כנגד הלפר של ZYMV אפשר את זיהויו של ההלפר המנוקה תמונה מס׳ B-8. בגזעים של ZYMV בהם הוסף His-tag בקצה ה- N של ההלפר התאפשר

בנוסף, גם זיהוי באמצעות נוגדן חד-שבטי כנגד His-tag תמונה מס' 8-C. השימוש בנוגדנים הנ"ל נעשה באנליזה של western-blot המאפשרת גם השוואה של כמות ההלפר המתקבלת לאחר הניקוי. תגובה של הנוגדן החד שבטי (Monoclonal) כנגד His-tag תמונה מס' 8-C נראית בעוצמה חזקה יותר מזו שהתקבלה עם הנוגדן הרב שבטי כנגד ההלפר. לכן במהלך הניסויים הבאים לבחינת הקישור של ההלפר אל מיצוי הח"ק נעשה שימוש בנוגדן החד שבטי כנגד רצף ההיסטידינים.



תמונה מספר 8. השוואת יעילות הזיהוי של הלפר פעיל (ZY-H-KLSC) והלפר מוטנט (ZY-H-ELSC) באמצעות נוגדן רב-שבטי כנגד ההלפר לזה של נוגדן חד שבטי כנגד רצף ההיסטידינים.
במסגרת העליונה (A), הפרדת חלבונים וצביעתם בפונסו (Ponceau). במסגרת התחתונה: מצד שמאל (B), תגובת ההלפר המנוקה לנוגדנים רב-שבטים כנגד הלפר של ZYMV (במיהול 1:1000). מצד ימין C, תגובת ההלפר המנוקה לנוגדן חד-שבטי כנגד רצף ההיסטידינים (במיהול 1:4000). בערוצים הוטענו חלבוני ההלפר הבאים: 1: ZY-H-ELSC; 2: ZY-H-KLSC 3: ZY-H-KLSC; 4: ZY-H-ELSC. בערוץ M סמן גודל של חלבונים. ניקוי חלבוני ההלפר נעשה בשיטה של Ni-NTA כמתואר בעבודתו של כדורי וחובריו (Kadoury *et al.*, 1998).

2.8. הפרדת חלבונים בג'ל אקרילאמיד (PAGE) בנוכחות SDS :

2.8.1. אלקטרופורזה:

שיטה זו להפרדת חלבונים בשדה חשמלי ע"פ גודלם תוארה לראשונה ע"י (Laemmli, 1970). החלבונים מוטענים ע"ג ג'ל פוליאקרילאמיד ומופרדים בשדה חשמלי לאחר שעברו דנטורציה עם SDS והרתחה. החלבונים הנבדקים מצויים בתמיסה המכילה β-mercaptoethanol הגורם

לדנטורציה של החלבונים ע״י פתיחת הקשרים הדיסולפידים (S-S). SDS, עוטף את החלבונים במטענים שליליים, כתוצאה מכך מתאפשרת תנועתם בתוך הג׳ל בכוח השדה החשמלי לעבר האנודה. הפרדת החלבונים מתבצעת ע״פ גודלם בלבד, חלבונים קטנים ינועו מהר יותר בהשוואה לחלבונים גדולים. נעשה שימוש במכשיר Mini-Protean III של חברת Bio-Rad, ובג׳ל בריכוז של 12% אקרילאמיד המורכב משתי שכבות להפרדת החלבונים. להלן, מפורט סדר ההכנה והרכבם של הג׳לים.

ג׳ל הפרדה (תחתון) Separating gel המכיל:

1.05 ml X4 Separating buffer:

78ml ddH2O]. [18.17gr Tris-base(Bio Lab), 4ml 10% SDS (Sigma),

1.7ml ddH_2O

1.35ml 30% Acrylamide (Bio Lab)

61.5µl APS (Bio Lab) ו- 2.5µl TEMED (Bio Lab)

ג׳ל הטענה (עליון) Stacking gel המכיל:

0.49ml Stacking buffer 4X: (6.07gr Tris-base, 4ml 10%SDS , 90ml ddH2O)

1.1ml ddH_2O

0.33ml 30% Acrylamide

31 µl APS ו- 5.5µl TEMED

אל תמיסות החלבונים הנבדקים הוסף ביחס של 3:1 בופר דוגמא (Sample buffer) המכיל:

1ml β-mercaptoethanol (Sigma) ,4ml Glycerol (USB) ,5ml stacking gel buffer X4]

4ml 10% SDS, (Sigma) ו- 0.5mg bromophenol blue (Sigma)] . התערובת הורתחה למשך 5 דקות והוטענה על הג׳ל. ההרצה נעשתה עם בופר הרצה Running buffer X1 המכיל:

3gr Tris-base 14.4gr Glycine 10ml 10% SDS, ו- 820ml ddH_2O. ההרצה נעשתה בהתאם לתוכנית הבאה: 10 דקות ראשונות ב- 120V, 15 דקות נוספות ב- 140V ו- 60 דקות ב- 160V.

2.8.2. הפרדה דו-ממדית של חלבונים 2D-SDS-PAGE:

שיטה זו להפרדת חלבונים מתחלקת לשני שלבים עיקריים: בשלב הראשון הדוגמאות מוטענות ע״ג ״סטריפ״ המכיל טווח pH משתנה (הניתן לבחירה) נעשה שימוש בסטריפ בעל טווח מ- pH 3-10. כל

אחד מהחלבונים בדוגמא מתמקם באזור שונה ע״ג ״הסטריפ״ וזאת בהתאם ל- pH בו סך כל המטען הממוצע של החלבון יהיה שווה אפס, זאת היא הנקודה האיזואלקטרית של החלבון (PI) והיא מושפעת מהרכב ח׳ האמינו של כל חלבון. בשלב השני ״הסטריפ״ המכיל את הדוגמא מונח ע״ג ג׳יל SDS-PAGE ומופרד ע״פ המשקל המולקולארי של החלבונים. יתרונה של שיטה זו היא בהפרדה של החלבונים בשתי שיטות שונות, הפרדה זו מנוצלת לאנליזה של חלבון בודד לעיתים לצורך הכנת דוגמאות לבדיקת רצף ח׳ אמינו.

הפרדה ראשונית ע״פ הנקודה האיזואלקטרית: אל דוגמא המכילה מיצוי חלבונים קוטיקולריים ב- 8M Urea הוספו החומרים הבאים: 3% CHAPS (Sigma), 0.5% Triton X-100 (Bio Lab), 2% (v/v) IPG buffer (Amersham Pharmacia), 0.3% (w/v) DTT (Sigma) ו- 0.002% bromophenol blue (Sigma). שלב הספיחה- 250 µl מהדוגמא הוספו אל ״סטריפ״ IPG strips (pH 3-10) בגודל של 13cm. (Amersham Pharmacia) הדוגמא הונחה בטמפ׳ החדר למשך הלילה. הפרדה ע״פ הנקודה האיזואלקטרית- נעשתה במכשיר Multiphor II מתוצרת חברת Pharmacia בטמפ׳ של 18°C על פי התוכנית הבאה: 100V למשך 8 שעות, 300V למשך 15 דקות, 500V למשך 15 דקות, 1000V למשך 15 דקות, 1500V למשך 15 דקות, 2000V למשך 15 דקות, 2500V למשך 15 דקות, 3000V למשך 15 דקות, 3500V למשך 4 שעות. לאחר מכן הסטריפ הועבר אל תמיסת איזון ראשונה (Equilibration solution-1) המכילה: 50mM Tris-HCl, pH 8.8, 6M Urea, 30% Glycerol (v/v), 2% SDS(w/v), Bromophenol blue 0.002% ו- 2mM (TBP) Tributylphosphine (Sigma) לטלטול איטי למשך 5 דקות בטמפ׳ החדר. בהמשך ״הסטריפ״ הועבר אל תמיסת איזון שנייה (Equilibration solution-2) המכילה הרכב דומה מלבד (TBP) שהוחלף ב-Iodoacetamide 2.5% לטלטול איטי למשך 5 דקות בטמפ׳ החדר.

הפרדה שנייה, על פי המשקל המולקולארי: ״הסטריפ״ הונח במאוזן ע״ג ג׳יל של 12% Acrylamide, קיבוע ״הסטריפ״ ע״ג הג׳יל נעשה באמצעות הוספה של ג׳יל 0.5% Agarose המומס בבופר ההרצה של החלבונים. הרצה של ״הסטריפ״ נעשתה באופן דומה להרצה של ג׳יל חד-מימדי. לאחר ההרצה הג׳יל הועבר לצביעת קומאסי קולואידאלי Colloidal Coomassie blue G-250 (Sigma) או לחילופין הועבר לממברנה של ניטרוצלולוז לאנליזה של western-blot.

2.8.3. צביעה של חלבונים:

צביעת קומאסי (Coomassie): צובעת חלבונים באופן לא ספציפי. עם סיום ההפרדה הג׳ל מועבר אל תמיסת הצביעה המכילה: 2.5gr Coomassie brilliant blue R250 (Sigma) או 2.5gr Colloidal Coomassie blue G-250 ו- 100ml חומצת חומץ קרחונית (glacial acetic acid – Bio Lab) , 250ml Isopropanol (Bio Lab) ו- 650ml H_2O למשך 50 דקות בטלטול איטי. לאחר הצביעה תמיסת הצבע מסולקת ומוספת תמיסת destaining המכילה: 830ml H_2O ו- 70ml חומצת חומץ קרחונית. הג׳ל המצוי בתמיסה טולטל באיטיות למשך מספר שעות עד לזיהוי ברור של החלבונים בג׳ל.

צביעת פונסו (Ponceau): צובעת חלבונים באופן לא ספציפי. עם סיום העברה (transfer) של הג׳ל וקיבוע בחלבונים ע״ג הממברנה (ניטרוצלולוז) מוספת אל הממברנה תמיסת הצביעה המכילה(Sigma) Ponceau 0.2% ו- 1% חומצת חומץ קרחונית במים מזוקקים. הממברנה טולטלה באיטיות למשך דקה ובהמשך נשטפה עם מים מזוקקים מספר פעמים לסילוק שאריות הצבע ועד הופעת החלבונים המקובעים ע״ג הממברנה.

<u>2.9. הכנת החלבונים לקביעת רצף:</u>

קביעת רצף ח׳ האמינו בחלבונים השונים נעשתה בשיטה של (LC/MS) liquid Chromatography, electrospray Mass Spectrometry, בשלושה מקומות שונים, בציוד הבין מחלקתי (צב״מ) בבית החולים הדסה בירושלים, במחלקה לפרוטאומיקה בפקולטה לחקלאות שברחובות ובמחלקה לפרוטאומיקה בטכניון שבחיפה. להלן עיקרי התהליך כפי שנעשה במחלקות המוזכרות לעיל:

פיסת הג׳ל המכילה את החלבונים הצבועים נחתכת ומיובשת לאחר סילוק עיקר הצבע. החלבונים מעוכלים בתוך פיסת הג׳ל בעזרת אנזימים פרוטיאוליטים (ע״פ רוב באמצעות טריפסין), הפפטידים המתקבלים מופרדים ב– HPLC על קולונות דקות או קפילריות המאפשרות רגישות גבוהה. הפפטידים מוזרמים ישירות לספקטרומטר מסות ב- electrospray ועוברים אנליזה של מסות ופרגמנטציה על ידי פגיעה באטומי הליום. שברי הפפטידים עוברים אנליזת מסות מסוג MS ו- LC/MS. המידע המתקבל מאפשר זיהוי, בעזרת תוכנות ייעודיות של כל חלבון או תוצר גן שרצף חומצות האמינו שלהם מצוי במאגרי המידע.

2.10. שיטות סרולוגיות:

2.10.1. זיהוי חלבונים המופרדים ב- SDS-PAGE באמצעות נוגדנים באנליזה של : western blot

השיטה מאפשרת זיהוי של החלבון הנבדק באמצעות שימוש בנוגדן ספציפי כנגדו. העבודה בשיטה זו נעשתה באופן סטנדרטי כמתואר ע״י (Towbin *et al.*, 1979) ע״פ השלבים הבאים:

1. הרצת ג׳ל SDS-PAGE עם דוגמאות החלבון כפי המוזכר בסעיף 2.8.

2. עם סיום ההרצה הג׳ל מועבר אל מכשיר Electro blotting של חברת (Bio-Rad) Trans Blot Semi Dry Transfer cell. השריית הג׳ל, ממברנת הניטרוצלולוז (Schleicher & Schuell) ונייר ה- Whatman ששימשו לביצוע ה- blot נעשו בבופר העברה Transfer buffer המכיל: 0.2M Glycine (USB) , 0.025M Tris-base (Bio Lab) ו- 20% methanol (Bio Lab). העברה התבצעה בעוצמת זרם חשמלי של 250mA למשך 45 דקות.

4. צביעה של הממברנה בצביעת פונסו לזיהוי של החלבונים המקובעים ע״ג הממברנה. צביעת הפונסו הורחקה לאחר מספר שטיפות במים מזוקקים.

5. חסימת האתרים הפנויים בממברנה (blocking) על ידי טלטול הממברנה למשך שעה בטמפ׳ החדר בתמיסה המכילה 3% אבקת חלב בבופר Phosphate Buffer Saline (PBS).

4. הגבת הממברנה עם הנוגדן הראשוני מהול ב- PBS למשך הלילה ב- 4°C .

6. שלוש שטיפות של חמש דקות טלטול בין כל שטיפה של הממברנה עם תמיסת PBS+ 0.5% Tween שלאחריה הוסף הנוגדן השניוני כאשר הנוגדן הראשוני היה נוגדן חד-שבטי נעשה שימוש בנוגדן שניוני שהוכן בעז כנגד נוגדנים ממקור עכברי Goat anti mouse IgG (Sigma) במיהול של 30,000 : 1. כאשר הנוגדן הראשוני היה נוגדן רב-שבטי שמקורו בארנבות נעשה שימוש בנוגדן שניוני שהוכן בעז כנגד נוגדנים שמקורם בארנבת Goat anti Rabbit IgG (Sigma) במיהול 10,000 : 1. נעשה שימוש בנוגדנים שניוניים אליהם אוחה (conjugate) האנזים פוספאטאז אלקליני Phosphatase alkaline (Sigma).

7. טלטול למשך שעה בטמפ׳ החדר ובסופה נשטפה הממברנה שלוש פעמים למשך חמש דקות עם טלטול איטי בין כל שטיפה בתמיסה המכילה PBS+ 0.5% Tween לסילוק שאריות הנוגדן שלא נקשרו. העברת הממברנה אל 10ml תמיסת בופר סובסטרט לאנזים אלקאלין פוספטאז המכילה: Tris-HCl 100mM, NaCl 150mM ו- $MgCl_2$ 1mM אליה הוספו הסובסטרטים לאנזים: 66µl NBT(nitro blue tetrazolium)50mg/ml המצוי בתמיסה של 70% dimethylformamide ו- 33µl BCIP (5-bromo–4chloro-3-indolyl-phosphate)50mg/ml המצוי בתמיסה של 100% dimethylformamide מתוצרת חברת Promega.

8. פיתוח הריאקציה נעשה בחושך תוך כדי טלטול איטי במשך 2-10 דקות, הריאקציה הופסקה לאחר שטיפה של הממברנה במים.

2.10.2. בחינת הזיקה של חלבוני ההלפר אל חלבונים במיצוי חלבונים קוטיקולריים מהכנימות בשיטה של Far-western –blot:

טכניקה זו שימשה לבחינת זיקה *in-vitro* של חלבון ההלפר של ZYMV אל חלבונים שהתקבלו לאחר מיצוי חלבונים קוטיקולריים מכנימות העלה: *M. persicae*, *B. brassicae* ומכנימת העש *Bemisia tabaci*, להלן פירוט השלבים בתהליך:

הפרדה של הדוגמאות ע״ג ג׳ל חלבונים, העברה וקיבוע ע״ג ממברנת ניטרוצלולוז וצביעת הממברנה בצביעת פונסו נעשה בהתאם לפרוטוקול של western blot המפורט מעלה בסעיף 2.10.1.

להלן השלבים הנוספים לריאקצית Far-western-blot:

שטיפות מקדימות, הממברנה הודגרה בטלטול איטי בטמפ׳ החדר עם תמיסת בופר PBS למשך שעתיים, תמיסת הבופר הוחלפה כל 20 דקות. חסימה (blocking) של האתרים הפנויים בממברנה, נעשתה לאחר הוספה של תמיסת בופר PBS ו- 3% אבקת חלב ללא שומן, הממברנה הועברה לטלטול איטי למשך 3-5 שעות בטמפ׳ החדר או למשך הלילה בטמפ׳ של 4ºC. הממברנה נשטפה שלוש פעמים למשך חמש דקות בטלטול בין כל שטיפה בבופר פוספט pH 8.8 0.3M K_2HpO_4.

קישור, חלבון הלפר מנוקה, המצוי בתמיסה של בופר פוספט pH 8.8 0.3M K_2HpO_4 או מיצוי של צמח נגוע הוסף אל הממברנה. הממברנה טולטלה באיטיות למשך 3-5 שעות בטמפ׳ החדר או למשך

הלילה בטמפ׳ של 4^oC. שטיפות, הממברנה נשטפה שלוש פעמים, למשך חמש דקות בטלטול, בין כל שטיפה בבופר PBS-T. משלב זה, התהליך נעשה בהתאם לפרוטוקול של western blot המפורט בסעיף 2.10.1. נעשה שימוש בנוגדן חד שבטי (ממקור עכברי) המזהה רצף של שישה שיירי ח׳ האמינו היסטידין αHis tag מתוצרת חברת Sigma במיהול של 1:4000 כנוגדן ראשוני, ובנוגדן שהוכן בעז כנגד נוגדנים ממקור עכברי (Goat anti mouse IgG -Sigma) במיהול 30,000 : 1 כנוגדן שניוני.

2.10.3. זיהוי וירוסים באנליזה של ELISA- Enzyme Linked Immunosorbent Assay:

זיהוי של הוירוסים ZYMV או TuMV נעשה לפי ELISA- ACP (Antigen Coated Plate) :

הצמחים נכתשו בבופר ציפוי המכיל: $0.2gr\ NaN_3$, $2.93gr\ NaHCO_3$ ו- $1.59gr\ Na_2CO_3$ ב- 1 ליטר של מים מזוקקים התמיסה הובאה ל- pH 9.6. בכל באר בפלטה (המכילה 96 בארית) הוטענו 100µl מהמיצוי הצמחי. כל דוגמא הוטענה ל - 2 בארות. הפלטה הודגרה למשך שעתיים בטמפ׳ 37˚C או לחילופין למשך הלילה בטמפ׳ של 4˚C. שטיפה של הפלטה במי ברז ולאחר מכן 3 שטיפות עם PBS+Tween עם השרייה במשך 3 דקות בין כל שטיפה. הפלטה יובשה ע״ג ניר סופג. הוספת הנוגדן הראשוני, בכל באר הוטענה כמות של 100µl מתמיסה המכילה PBS אליו הוסף הנסיוב במיהול המתאים + 1% אבקת חלב רזה. הפלטה הודגרה במשך 3 שעות בטמפ׳ של 37˚C ולאחריהן התבצעו שלוש שטיפות עם PBS-T. הוספת נוגדן שניוני שהוכן בעז כנגד כל הנוגדנים שמקורם בארנבת Goat anti Rabbit Conjugate (Sigma) במהול 5,000 : 1. הפלטה הודגרה במשך 3 שעות בטמפ׳ של 37˚C ובהמשך נעשו שלוש שטיפות עם PBS-T. הוספת הסובסטרט, אל בופר סובסטרט pH 9.8 המכיל: 97ml diethanolamine ו - $0.2gr\ NaN_3$ בליטר מים מזוקקים הוסף הסובסטרט 0.6mg/ml p-nitrophenyl phosphate (Sigma) לקבלת ריאקצית צבע. ערכי פיתוח הצבע נקראו ב- ELISA Reader (Anthos reader 2001,Anthos) באורך גל של 405nm.

2.11. מיצוי חלבונים קוטיקולריים מכנימות עלה:

מבוסס על שיטות ידועות למיצוי ח״ק בחרקים (Fristorm *et al.*, 1978; Nakato *et al.*, 1990) עם שינויים להתאמתם לעבודה עם כנימות עלה.

א. איסוף וריכוז חלקי הקוטיקולה של הכנימה והרחקה של חלבונים שאינם קוטיקולריים:

1-5 גרם של כנימות עלה נאספו ונשמרו בהקפאה עמוקה 80- עד תחילת תהליך המיצוי של החלבונים הקוטיקולריים. הכנימות נכתשו במכתש ועילי, בתחילה בתוספת חנקן נוזלי ובהמשך הוסף בופר (TBS–L) TBS Low salt המכיל: pH 7.5 ,20mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, (PMSF) 3mM Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride (AppliChem) ו- 10mM β-Mercaptoethanol (ME).

הדוגמאות סורכזו במהירות של 8000g למשך 5 דקות, הנוזל העליון הורחק והמשקע נשמר.

המשקע המכיל שברים וחלקי קוטיקולה נשטף בבופר TBS-L מספר פעמים עד אשר הנוזל העליון של השטיפה המסולק הפך לבהיר. ניקוי נוסף של המשקע המכיל חלקי הקוטיקולה מחלבונים שאינם חלק מהקוטיקולה ומשומנים, נעשה באמצעות שטיפה של הדוגמאות בתמיסה בעלת ריכוז מלח גבוה יותר (TBS-H) TBS - High salt המכילה: pH 7.5 ,20mM Tris-HCl, 0.6 M NaCl, 3mM (PMSF) Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride ו- 10mM β-Mercaptoethanol (ME).

הדוגמאות עורבבו בוורטקס וסורכזו בין כל שטיפה ושטיפה במהירות של 10,000 g למשך כ- 10 דקות, הנוזל העליון סולק והמשקע נשמר. תהליך השטיפה של המשקע התבצע מספר פעמים עד קבלת גוון בהיר של הנוזל העליון המסולק. נעשו שטיפות נוספות במטרה להרחיק את עודפי המלחים מהדוגמא: שתי שטיפות בבופר TBS-L באופן דומה לזה שתואר קודם לכן. שתי שטיפות נוספות עם 10mM Tris buffer pH 7.0 (ללא כל מלחים), אפשרו סילוק של עודפי מלחים.

ב. מיצוי החלבונים: אל המשקע המכיל שברי קוטיקולה הוספה תמיסה המכילה: 8M Urea + 10mM Tris pH, 7.0 או לחילופין 10mM Tris pH, 7.0 + 1% Calcofluor (Sigma) הדוגמאות הודגרו בטלטול איטי בטמפ׳ החדר למשך 1-3 שעות ולאחר מכן סורכזו במהירות של 8000g במשך 10 דקות, הנוזל העליון המכיל את החלבונים הקוטיקולריים נאסף וסונן דרך Miracloth.

ג. הרחקה של הכימיקלים ששימשו לצורך מיצוי החלבונים ובדיקה של הדוגמאות:

דוגמאות שמוצו עם Calcofluor עברו דרך קולונה של Econo-prep10DG(Bio-Rad) לצורך סילוק של ה- Calcofluor מהדוגמא. דוגמאות שמוצו עם Urea, עברו דיאליזה כנגד 10mM Tris בנפח של 3 ליטר ב- 4ºC , לאחר כ- 3 שעות הוחלף בופר הדיאליזה בחדש, להמשך דיאליזה של 12 שעות נוספות. מיצוי החי"ק מהכנימה נבדק באמצעות הפרדה בג'ל חלבונים SDS-PAGE חד או דו-ממדי. לאחר ההפרדה, הג'ל נצבע בצביעת Coomassie או שהועבר אל ממברנה של ניטרוצלולוז לצורך הגבה עם נוגדן ספציפי כנגד חלבונים קוטיקולריים (western blot) או לבדיקת זיקת החלבונים המקובעים ע"ג הממברנה אל חלבון ההלפר של ZYMV (Far-western blot).

2.12. שיטות כלליות לעבודה מולקולארית:

2.12.1. חיידקים וגידולם:

חיידקי *Escherichia coli* מהקו DH5α שימשו לריבוי הפלסמידים השונים. החיידקים גדלו במצע Luria-Bertani Medium (LB) המכיל: 0.5% NaCl (Bio Lab), 0.5% yeast extract (BD) ו- 1% tryptone (BD) בתוספת או בהעדר Ampicillin 100µg/ml (AppliChem) בטמפ' של 37˚C. צלחות פטרי (25ml) שימשו לגידול ומיון של המושבות. הצלחות הכילו מצע LB בתוספת אגר 15g/L. בחירה של המושבות נעשתה ע"פ הבחנה בצבעם (כחול בעת ביטוי הגן LacZ או לבן בחוסר ביטוי של הגן) כאשר הוספו על פני כל צלחת 100 µl תמיסה המכילה 100mM IPTG ו - 20µl תמיסה המכילה X-gal 50 mg/ml (Fermentas). חיידקי *E. coli* מהקו BL21 (Novagen), גודלו במצע LB בתוספת Kanamycin בריכוז 50 µg/ml (AppliChem) ושימשו לביטוי גנים קוטיקולריים בחיידקים.

2.12.2. הפקת Total RNA:

25mg רקמת עלה צמחית או 50mg כנימות עלה ממינים שונים, נכתשו במבחנת אפנדורף 1.5ml. הליך זה נעשה תוך שימוש בקיט מסחרי להפקת ה-RNA, EZ-RNA מתוצרת תעשיות ביולוגיות בית-העמק. העבודה נעשתה בהתאם להוראות היצרן בפרוטוקול המצורף.

2.12.3. פלסמידים:

הפלסמיד pGEM-T-easy (Promega) שימש במהלך המחקר לשיבוט תוצרי ה- PCR ולריבוי שבטים (קלונים) שונים ולקביעת רצף הבסיסים של הגנים המשובטים בתוכם.

הפלסמיד pK35SZYMVNOS (Gal-On *et al.*, 1995) מכיל cDNA של גנום הוירוס ZYMV המשובט בפלסמיד pBluescript KS(+) (Stratagene) תחת בקרה של הפרומוטור CaMV 35S.

הפלסמיד pET-28a (Novagen) שימש לצורך ביטוי גנים לחלבונים בחיידקים.

2.12.4. הפקת DNA פלסמידי מהחיידקים:

4-5ml חיידקי *E. coli*, גודלו למשך 10-15 שעות בטמפ' של 37^{o}C במצע מזון LB+Amp.

DNA פלסמידי הופק מהחיידקים באמצעות קיט מסחרי (BioNeer). העבודה נעשתה בהתאם להוראות היצרן המצורפות.

2.12.5. הפקת DNA לאחר הפרדה בג'ל אגרוז:

המקטע המכיל את ה- DNA בגודל הרצוי נחתך מהג'ל ונשקל. שחרור ה-DNA מהג'ל וניקויו בוצע באמצעות קיט מסחרי Gene-Clean של חברת (BioNeer) ולמקטעים גדולים של DNA מעל 10,000 בסיסים נעשה שימוש בקיט מתוצרת חברת (Mo-Bio).

2.12.6. בידוד והעשרה של mRNA מדוגמאות המכילות Total RNA:

Total RNA 30-50mg ממיני הכנימות השונים, שימש לבידוד וריכוז של mRNA באמצעות קיט מסחרי Oligotex mRNA mini-kit של חברת Qiagen. העבודה נעשתה בהתאם להוראות היצרן המצורפות, תוצר ה- mRNA שהתקבל שימש אותנו כחומר מוצא להכנת ספריות ה- cDNA השונות.

2.12.7. אנזימים:

אנזימי הגבלה (Restriction enzymes) , T4 DNA Ligase ו- DNA פולימרזות:

DNA Polymerase = (Pfu; Taq) נעשה שימוש מתוצרתן של החברות: Promega, Fermentas ו- NEB- New England Biolabs. העבודה נעשתה בהתאם להנחיות המצורפות.

נעשה שימוש במיקס PCR מוכן PCR ready mix תוצרת חברת Promega.

2.12.8. ריאקצית Reverse Transcription (RT):

נעשה שימוש באנזים reverse transcriptase של Avian Myeloblastosis Virus (AMV) ובמעכב רנ׳אזות ribonuclease inhibitor שניהם מתוצרת חברת (Chimerx), העבודה נעשתה בהתאם להוראות היצרן המצורפות.

2.12.9. הרכב ריאקצית Polymerase Chain Reaction (PCR) סטנדרטית:

2μl cDNA מ- ריאקצית ה - RT, 2μl תחל sense בריכוז 10pmol/μl, 2μl תחל antisense בריכוז10pmol/μl , הוספה של $MgSO_4$ או $MgCl_2$ בריכוז המתאים לאנזים הפולימרז. 2.5μl בופר מתאים לאנזים הפולימרז Taq או Pfu. 2.5μl dNTPs (כ- 2.5mM מכ״א מהבסיסים). וכ- 1.5 יחידות פעילות של אנזים הפולימרז: Pfu: או Taq. הוספה של ddH2O מעוקרים להשלמת נפח הריאקציה ל- 25μl. במהלך העבודה הנוכחית נעשה שימוש בשיטת ה- PCR לביצוע ניסויים שונים: סריקה של ספריות cDNA של הכנימות לצורך בידוד והגברה של גנים קוטיקולריים חדשים.
הגברה של גנים המקודדים ליצירת חלבון המעטפת או חלבון ההלפר בוירוסים: TuMV ו- ZYMV ליצירת מוטציות נקודתיות או שבטים כימרים של הוירוסים הנ״ל. הריאקציות נעשו במכשיר מתוצרת חברת MJ-Research מהדגם PTC-200 בעל מכסה מחומם בתוך מבחנות של 0.2ml.

2.12.10. טרנספורמציה (transformation):

טרנספורמציה של הפלסמידים השונים לחיידקי *E. coli* מהגזעים השונים, נעשתה בשיטה המבוססת על הלם חום (heat shock). אל מבחנה המכילה 50 μl חיידקי *E. coli* קומפיטנטים (Competent cells) שהופשרו מהקפאה עמוקה 80- לקרח הוספו 5μl מהפלסמיד לאחר האיחוי (ליגאציה- ligation), למשך 10 דקות. המבחנה הועברה לחימום ב-°C 42 למשך 60 שניות (הלם חום) ובסופם המבחנה הועברה שוב אל קרח למשך 10 דקות. הוסף 0.3ml מדיום גידול עשיר (S.O.C) המכיל: 0.5% Yeast extract, 2.0% tryptone, 10mM NaCl, 2.5mM KCl, 10mM $MgCl_2$,20mM $MgSO_4$, 20mM glucose. ללא תוספת אנטיביוטיקה. החיידקיים גודלו בטלטול

באינקובאטור בטמפ׳ של 37 °C למשך שעה. בתום הגידול החיידקים נזרעו ע״ג צלחת פטרי המכילה מצע גידול (LB) ואנטיביוטיקה מתאימה בהתאם לגן המקנה עמידות המצוי בכ״א מהפלסמידים השונים.

2.13. תוכנות ביו-אינפורמטיות:

השוואת רצפים: ח׳ גרעין או ח׳ אמינו אל אלו הקיימים מאגר הגנים או החלבונים נעשתה באמצעות תוכנת BLAST המצויה באתר של National Center for Biotechnology Information (NCBI), כתובת האינטרנט, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html . חיזוי רצף ח׳ האמינו ומציאת מסגרת הקריאה המלאה של החלבון נעשה באמצעות שימוש בתוכנות המחשב BioEdit או DNA MAN. השוואת רצפי ח׳ הגרעין או ח׳ האמינו נעשתה באמצעות שימוש בתוכנה ClustalW המצויה ברשת האינטרנט בכתובת: http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html. תוכנת המחשב MultAlin נמצאה יעילה במיוחד לביצוע השוואות של מספר רב של רצפים. התוכנה מצויה ברשת האינטרנט בכתובת: http://ribosome.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html. הדגשת האזורים הזהים נעשתה באמצעות שימוש בתוכנה BOXSHADE 3.21 המצויה ברשת האינטרנט בכתובת: http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html.חיזוי אתרי החיתוך cleavage sites של Signal peptide(SP) נעשה באמצעות שימוש בתוכנה SignalP 3.0, המצויה ברשת האינטרנט בכתובת: http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/. התוכנהNetGene2 Server המצויה ברשת האינטרנט בכתובת: http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/ שימשה לחיזוי אתרי החיתוך (splicing) של האינטרונים ולזיהוי נקודות החיבור (junction) שבין האינטרונים לאקסונים ובין האקסונים לאינטרונים.

2.14. הכנת ספריות cDNA ממיני הכנימות השונים.

במהלך העבודה נעשה שימוש בשתי שיטות להכנת ספריות cDNA ממיני הכנימות השונים:

להכנת ספרית הביטוי הראשונה מהכנימה *M. persicae*. נעשה שימוש בקיט מתוצרת חברת Stratagene, המכיל שני קיטים נוספים מתוצרת חברת Stratagene : ZAP-cDNA synthesis kit ו- ZAP-cDNA GigapackIII Gold cloning kit. העבודה נעשתה בהתאם להוראות היצרן המצורפות. להכנת חמש ספריות נוספות בשיטה של SMART מתוצרת חברת Clontech, נעשה שימוש בשני קיטים מסחריים : SMART cDNA library construction kit מתוצרת חברת Clontech ו- ZAP-cDNA GigapackIII Gold cloning kit מתוצרת חברת Stratagene העבודה נעשתה בהתאם להוראות היצרנים. מכנימת העלה *M. persicae* הידועה ביכולתה לשמש וקטור יעיל של מגוון פוטיוירוסים הוכנו שלוש ספריות cDNA שונות : הראשונה, מכנימות שלמות בדרגות ההתפתחות השונות. השנייה, מזחלים בדרגה ראשונה והשלישית, מ- 200 ראשי כנימה מופרדים. מכנימת עלה הדילועיים *A. gossypii* המעבירה טווח רחב של פוטיוירוסים, הוכנה ספריה אחת מ- cDNA שהתקבל מכנימות שלמות בדרגות ההתפתחות השונות. מהכנימה *B. brassicae* המעבירה טווח צר של פוטיוירוסים המנגעים צמחים משפחת המצליבים הוכנה ספרית cDNA נוספת. ספריות cDNA אלו,שימשו אותנו כמאגר (cDNA פוטנציאלי המקדד לכלל חלבוני הכנימה) אותו ניתן לסרוק ולבודד cDNA המקודדים ליצירת ח״ק חדשים.

2.15. סריקת ספריות ה- cDNA של כנימת העלה לבידוד cDNA לחלבונים קוטיקולריים חדשים:

שימוש בריאקצית PCR, לסריקה של ספריות ה- cDNA באמצעות סדרה של תחלים, חלקם דגנרטיבים (Degenerate primers) ראה טבלה מס׳ 4. תחלים אלו, הותאמו אל רצף ח׳ הגרעין המקודד לח׳ אמינו שמורות המאפיינות את אתרי ה- R&R השונים בהסתמך על ידע שהצטבר בח״ק של חרקים אחרים, ראה תמונה מס׳ 9. להלן הרצפים השמורים אליהם תוכננו התחלים השונים : GAHLP, ADENG(Y/F) ו- PDG המאפיינים ח״ק מסוג RR-1, ו- TGDxKSQ, GDVVG ו- RTVxYTAD ו- NGFNAVV, המאפיינים ח״ק מסוג RR-2, ראה תמונה מס׳ 9.

RR-1
GxxxYxx**PDG**xxxxxxYx**ADENG(Y/F)QP**x**GAHLP**

RR-2
RYxVxDxxT**GD**x**KSQ**xExRx**GD-VV**xGxYSLxExDGxx**RTV**x**YTAD**xx**NGFNAVV**

תמונה מספר 9. רצף ח' האמינו ברצפי ה- consensus מסוג RR-1 ו- RR-2 השמורים בחלבונים הקוטיקולריים של החרקים השונים.

ח' האמינו המופיעות ברצף, נמצאו שמורות ברוב החי"ק הידועים בחרקים השונים. הסימון X ברצף ח' האמינו בתמונה מיצג מיקום שאינו שמור לח' אמינו מסוימת ומתקיימת בו שונות רבה. אזורים ברצף ח' האמינו המסומנים בהדגשה, שימשו לתכנון תחלים האקראיים, לבידוד הגנים לח"ק מספריות cDNA שונות.

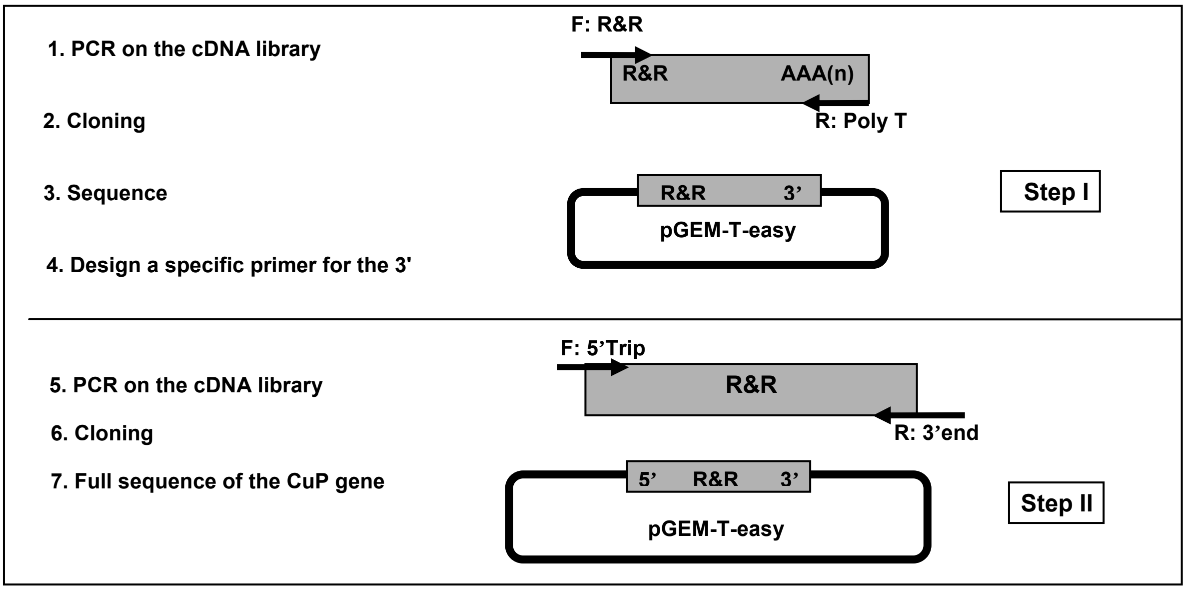
ספריות ה- cDNA שימשו כ- template לריאקציות PCR במטרה לבודד את הרצף המלא של ה- cDNA שונים המקדדים לחלבונים קוטיקולריים חדשים. התהליך נעשה בשני שלבים עיקריים המתוארים בתמונה מס' 10. רצף הבסיסים של כ"א מהתחלים השונים מפורט בטבלה מס' 4 . בשלב הראשון, נעשה שימוש בתחל sense דגנרטיבי (degenerate) המתאים לאתר ה- R&R השמור ובתחל משלים antisense (Poly T) המכיל 17 בסיסים של ח' הגרעין Thymine (T), תחל זה הנו כללי ומותאם אל רצף המורכב מח' הגרעין Adenine (A) ומצוי באורכים שונים ברוב ה- mRNA eukaryote (מלבד אלו של ההיסטונים). תוצרי ה- PCR שהתקבלו, (כ"א, מהמקטעים מקדד למחצית אורכו של החי"ק, דהיינו מאזור ה- R&R ועד לקצה ה- C של החלבון), הוחדר אל הפלסמיד pGEM-T easy ושובט בחיידקיי *E. coli*. פלסמידים המכילים את המחדרים השונים, לאחר ריבוי בחיידקים, נוקו ונשלחו לקביעת רצף ח' הגרעין. רצפי ח' הגרעין שהתקבלו, אומתו כמקודדים לח"ק באמצעות התוכנה BLAST המצויה באתר האינטרנט של NCBI המאפשרת השוואה אל רצפים המצויים בבנק הגנים. בשלב השני, נעשה שימוש בתחל sense (5'Trip) המתאים לאזור הממוקם בפלסמיד pTriplEx (במעלה ה- Multiple Cloning Site (MCS) בו הוחדרו מקטעי ה- cDNA השונים מהכנימה). ובתחל שני anti sense המותאם לרצף ספציפי בסוף האזור המקדד 3' untranslated region (UTR). תוצר ה-PCR שהתקבל לאחר הריאקציה שובט בחיידקים, נקבע רצף ח' הגרעין, ואומת כי הוא מכיל את הרצף הבסיסים השלם המקודד לחלבון הקוטיקולרי. אימות נוסף של רצף ה- cDNA המקודד לכ"א מהחי"ק נעשה לאחר תכנון תחלים ספציפיים לשני קצוות ה-

cDNA אל סופו של 5'UTR ואל תחילתו של 3'UTR, לבידוד הרצף המלא מכלל ה- RNA של הכנימות בריאקציה של RT-PCR, התוצר שהתקבל שובט ורוצף ואומת להיותו מקודד לח״ק.

טבלה מספר 4. פירוט התחלים השונים, לבידוד cDNA וגנים קוטיקולריים בכנימת העלה *M. persicae* ובמינים נוספים.

התאמה	**3'...................רצף התחל........................... 5'**	**אוריינטציה** משלים	**אוריינטציה** חיובי	**שם התחל**
	סריקה של ספריות ה- cDNA השונות :			**שלב-1**
RR-2	5'GG**N**GA**Y**GT**N**GTC**M**A**R**GG**N** 3'		**X**	Gdvv1
RR-1	5'GCTGACGA**R**AACGG**W**T**W**C 3'		**X**	Adeng1
RR-1	5'GCAGACGAAAACGG**W**T**WY** 3'		**X**	Adeng2
RR-1	5'GC**H**GACGAAAATGG**W**T**W**C 3'		**X**	Adeng3
RR-1	5'GC**H**GACGAAAACGG**W**T**W**T 3'		**X**	Adeng4
RR-1	5'GCCGA**Y**GAAAACGG**W**TA**Y** 3'		**X**	Adeng5
RR-1	5'GC**H**GACGAAAACGG**W**TT**Y** 3'		**X**	Adeng6
mRNA	5'T(x17)(AGC)3'	**X**		Poly-T
	בידוד cDNA וגנים קוטיקולריים שונים :			**שלב-2**
pTrip1EX	5'CTCGGGAAGCGCGCCATTGTGTTGGT 3'		**X**	5'Trip1
MpCP2	5'ATAACCTGTTTTGGTCTTGGTTTCGGGC 3'	**X**		3'Mpcp2
MpCP2	5'CAACATGAAGGTATTCATCATTCTGCCG 3'		**X**	5'Mpcp2
MpCP3	5'GAAATAATTAGTACGATGG 3'	**X**		3'Mpcp3
MpCP3	5'TACGGCCGGGATGGTAAGC 3'		**X**	5'dMpcp3
MpCP4	5'CTTCTTTTTGGAGCCTTCTGG 3'	**X**		3'Mpcp4
MpCP4	5'CAACATGCAGGTCACATTTGTC 3'		**X**	5'Mpcp4
MpCP5	5'GCTTCTTTTTGGAGTCTTCTGG 3'	**X**		3'Mpcp5
MpCP5	5'ATCATCATGAACACTTTGGTA 3'		**X**	5'Mpcp5
Mpcp?	5'GTGTTCAATAGTGGTAAACC 3'	**X**		3'Mpcp?
	בידוד רצף ה- cDNA של MpCP2 ו- MpCP5 ממינים שונים של כנימות עלה :			**שלב-3**
MpCP2	5' AGACTCAACAACCTCTTCAACATG 3'		**X**	'5-CP2
MpCP2	5' TGTAATAAACGTTTA**N**CAATAACC 3'	**X**		3'-CP2
MpCP5	5' GGTACACGTCCGAAAAAAATCATCATG 3'		**X**	'5-CP5
MpCP5	5' GTTACATGCGGGCTGGGT**N**TACTT 3'	**X**		3'-CP5

מינוח הבסיסים הדגנרטיבים Degenerate bases : N=(A,G,C,T); H=(A,C,T) ; W=(A,T); Y=(C,T).



תמונה מספר 10. סכימה המתארת את שני השלבים העיקריים לבידוד cDNA מספריית ה- cDNA המקדדים ליצירת חלבונים קוטיקולריים בכנימת העלה *Myzus persicae*.

2.16. ביטוי גנים לחלבונים קוטיקולריים מכנימות עלה בחיידקים:

רצף הגן לח״ק MpCP2 מסוג RR-2 ורצף ה- cDNA לח״ק MpCP5 מסוג RR-1 הוגברו באמצעות ריאקצית PCR תוך שימוש בתחלים אשר תוכננו ספציפית לרצפי כ״א מהגנים הנ״ל (ראה טבלה מס׳ 5). תחל לגדיל החיובי המכיל אתר חיתוך לאנזים ההגבלה- *Nco*I וקודון התחלה ATG המקודד לח׳ האמינו מתיונין בקצה 5’ של הקצה ה-N בחלבון הרצוי. תחל לגדיל המשלים המכיל אתר חיתוך לאנזים ההגבלה- *Xho*I תוצרי ההגברה נחתכו על ידי האנזימים *Nco*I ו- *Xho*I ועברו איחוי לפלסמיד pET-28a (Novagen) אשר נחתך גם כן בין אתרי החיתוך *Xho*I ו- *NcoI*.

טבלה מספר 5. פירוט התחלים השונים להכנת הקונסטרקטים לביטוי החלבונים הקוטיקולריים של הכנימה *Myzus persicae* בחיידקי *Escherichia coli*.

התאמה	3' ....רצף התחל.......................... 5'	אוריינטציה		שם התחל
		משלים	חיובי	
MpCP2	TA***CCATGG***CAACCGACGTAGTCTTAACCGGT		X	*NcoI* ΔCP2
MpCP2	GTG***CTCGAG***ATAACCTGTTTTGGTC TTGGTTTC	X		*XhoI* CP2
MpCP5	TA***CCATGG***CCCCGCCTAAGGAAGCTGC		X	*NcoI* ΔCP5
MpCP5	GTG***CTCGAG***CTTCTTTTTGGAGTCT TCTGG	X		*XhoI* CP5

רצף הבסיסים, המהווה אתר הכרה לאנזימי ההגבלה השונים מסומן בקו תחתון: אתר ההכרה לאנזים NcoI מצוי בתחל החיובי (sense) ואתר ההכרה לאנזים XhoI מצוי בתחל המשלים (anti sense). התחלים הנ"ל: שימשו להגברת רצף הגן של MpCP2 ורצף cDNA של MpCP5 מהכנימה Myzus persicae להכנת הקונסטרקטים לביטוי של החלבונים הללו בחיידקי Escherichia coli.

החדרת מקטעי ה- cDNA של MpCP2 ו- MpCP5 אל הפלסמיד pET-28a בין אתרי החיתוך *NcoI* ו- *Xho*I, אפשרה שימוש ברצף המצוי בפלסמיד המקודד לשישה שיירים של ח' האמינו היסטידין (6His-tag) בקצה ה- C של החלבון המבוטא לניקוי החלבון המבוטא והפרדתו משאר חלבוני החיידק בשיטה המבוססת על קישור שיירי ההיסטידינים אל ניקל (Ni-NTA).

פלסמידים המכילים את הקלונים: pET-28a+Mpcp2 ו- pET-28a+Mpcp5 הוחדרו אל חיידקי *E. coli* מהקו BL21 (Novagen). המושבות שהתקבלו נבדקו בריאקצית PCR לבדיקת הימצאות כל אחד מהגנים הנ"ל תוך שימוש בתחלים ספציפיים עבור כל אחד מהגנים הקוטיקולריים.

החיידקים גודלו במצע LB בתוספת אנטיביוטיקה Kanamycin (Kan) בריכוז 50 µg/ml למשך 12 שעות בטמפ' של 37°c. 100µl מתרחיף החיידקים שגדלו במשך הלילה הועברו למצע טרי של LB+Kan בנפח 10ml וגודלו במשך 3 שעות בטמפ' של 37°C עד לבליעה (O.D) של 0.3 - 0.2 באורך גל של 600nm). הוספת IPTG בריכוז סופי של 1mM לקבלת ביטוי מוגבר של חלבון והמשך גידול של החיידקים בטמפ' של 37°C למשך 4 שעות נוספות. עם תום הגידול, החיידקים סורכזו במהירות 5000 g למשך 15 דקות ב- 4°C. המשקע שהתקבל מכיל את החיידקים ושימש לצרכי הפקה וניקוי של החלבון המבוטא. משקע החיידקים הורחף ב- 1ml של בופר הרחפה המכיל: 50

mM Tris-HCl pH 7.6 אליו הוספו $MgCl_2$ mM 6 ,1 mM PMSF, 1mM DTT 0.1 mM EDTA. החיידקים עברו שבירה ע״י שלוש חזרות של הקפאה בחנקן נוזלי והפשרה באמבט מים. לאחר מכן הוסף האנזים ליזוזים (Sigma) לריכוז סופי של 2mM. הריאקציה הודגרה בקרח למשך 60 דקות. חיתוך הגנום הבקטריאלי נעשה באמצעות הוספת DNAse I (Sigma) לריכוז סופי של 50U/ml ואינקובציה למשך 10 דקות בטמפ׳ החדר. הדוגמא המצויה בקרח עברה טיפול בגלי סוני (סוניקציה) (בארבעה מחזורים של 30 שניות בכל מחזור ו- 20 שניות קירור בין המחזורים), על מנת לבצע פרוק נוסף של החיידקים ולצורך פרוק ״גופיפי ההסגר״ (Inclusion-bodies) הנוצרים במצב של ביטוי יתר של חלבונים בחיידקים. **הוספת Urea אל הדוגמאות לקבלת ריכוז סופי של 8M וטלטול איטי בטמפ׳ החדר למשך שעה, נעשתה רק בדוגמאות בהן הינו מעוניינים לקבל חלבון במצב דה-נטורטיבי.** המיצוי החיידקי סורכז במהירות של 5000g למשך 10 דקות והנוזל העליון נאסף ונשמר בטמפ׳ של 4°C.

<u>2.17. שימוש בכרומטוגרפיה של זיקה אל - Ni-NTA להפרדה של החלבונים קוטיקולריים לאחר ביטויים בחיידקים:</u>

החלבון המבוטא בחיידקיים הופרד משאר חלבוני החיידק באמצעות שימוש בשרף (resin) אליו קשורים קוולנטית NTA (Nitrilotriacetic acid) ו- ניקל (Ni). במצב זה, לניקל ישנם שני יונים חיובים פנויים המסוגלים להגיב ולקשור שני שיירים של ח׳ האמינו היסטידין. הניקל Ni-NTA בו נעשה שימוש הנו מתוצרת חברת Qiagen. להלן תהליך ההפרדה: אל l0ml מהמיצוי הוספו 30ml מבופר הקישור והשטיפה ו- 1ml Ni-NTA מתוך תמיסה בריכוז של 50% אשר נשטף 3 פעמים בבופר הקישור והשטיפה טרם השימוש. התערובת עורבבה במהירות איטית למשך שעה בטמפ׳ של 4°C. התערובת סורכזה כ- 2 דקות במהירות של 1,000g. משקע ה- Ni-NTA נאסף למבחנת 1.5ml ונשטף מספר פעמים בבופר המיצוי עד שהתמיסה הפכה לצלולה. בין שטיפה לשטיפה סורכזו המבחנות כ- 2 דקות במהירות של 1,000g. שחרור קישור לא ספציפי נעשה באמצעות שטיפות בריכוזים נמוכים ההולכים ועולים של אימידזול: 10mM - 75mM Imidazole. שחרור החלבונים

הקוטיקולריים מהניקל נעשה בשני שלבים. שחרור ראשוני נעשה ע״י הוספת 1ml מבופר הקישור והשטיפה אליו הוסף אימידזול לריכוז של 250mM Imidazole. הדוגמא הודגרה בטלטול למשך כ- 5 דקות. סרכוז נוסף למשך כ- 2 דקות במהירות של 1,000g אפשר השקעה של ה- Ni-NTA ואיסוף נוזל האלוציה הראשון (Elution-1). אלוציה שנייה נעשתה לאחר הוספת 1ml של בופר הקישור והשטיפה המכיל EDTA בריכוז של 250mM לערבוב איטי למשך 15 דקות. סרכוז נוסף למשך כ- 2 דקות ובמהירות של 1,000g אפשר את השקעת Ni-NTA ואיסוף של נוזל האלוציה השני (Elution-2).

2.18. הכנת נוגדנים רב שבטיים בארנבת כנגד חלבונים קוטיקולריים:

החלבונים הקוטיקולריים MpCP2 ו- MpCP5 לאחר הפרדתם מחלבוני החיידק (בשיטה של Ni-NTA) הופרדו בג׳ל חלבונים SDS-PAGE 12%. כ״א משני מקטעי החלבונים נחתך וחולץ מהג׳ל ונשלח לקביעת רצף ח׳ האמינו בחלבון לצורך אימות זהותו טרם ההזרקה.

בכל הזרקה הוזרק כ- 1mg של חלבון במצב נטיבי או במצב דנטורטיבי. דוגמא ראשונית של 2ml דם הוקזה מאוזן הארנבת לבדיקה ושימשה כביקורת (Pre-immune serum).

3. הזרקה ראשונה לארנבת: אל תמיסה של בופר פוספט K_2HPO_4 0.05M המכילה 1mg של החלבון בנפח של 1ml הוסף 1 ml Adjuvant Complete ליצירת אמולסיה אחידה להזרקה תת-עורית אל הירך.

4. נערכו 3 הזרקות נוספות בהפרשים של שבועיים בין כל הזרקה. בכל הזרקה עורבבו 0.5mg של החלבון בנפח של 1ml המצוי בתמיסה של בופר פוספט K_2HPO_4 0.05M עם 1 ml Adjuvant Incomplete ליצירת האמולסיה להזרקה.

5. שבוע לאחר ההזרקה השלישית הוקזו כ- 10ml דם מהארנבת לבדיקת western-blot. הדם הוקז מאוזן הארנבת והועבר לטמפ׳ של 37˚C למשך שעתיים לקרישה לאחר מכן הועבר ל- 4˚C למשך הלילה. הנסיוב הופרד מן הקריש בסרכוז במהירות 6,000g למשך 10 דקות. איכות הנוגדנים נבחנה באנליזה של western-blot כמתואר מעלה בסעיף 2.10.1.

2.19. שימוש בשבטים אינפקטיבים של ZYMV:

cDNA של גנום ה- RNA השלם של הוירוס ZYMV תחת בקרה של פרומוטור T7 (ממקור חיידקי), שובט בפלסמיד pBluescript KS(+) (Gal-On *et al*.,1991). היות והפרומוטור T7 (חיידקי) ואיננו מזוהה ע״י האנזים RNA Polymerase הצמחי ולכן, היה צורך ליצור טרנסקריפט (mRNA) במעבדה לצורך הדבקה של הצמחים בוירוס. החלפתו של הפרומוטור - T7 בפרומוטור 35S שמקורו בוירוס DNA צמחי CaMV- *Cauliflower Mosaic Virus* (וירוס המוזאיקה של הכרובית) אפשר הדבקה ישירה של הפלסמיד על צמחי קישוא ומלפפון, באמצעות טכניקה של ירי חלקיקים (Particle bombardment) והתקבלה הדבקה יעילה של הצמחים ב- ZYMV (Gal-On *et al*., 1995; Gal-On *et al*., 1997). אל הפלסמיד המכיל את השבט האינפקטיבי של ZYMV הוספו קודונים לתוספת של 7 שיירי ח׳ האמינו היסטידין בקצה ה- N טרמינלי של חלבון ההלפר. שבט זה אפשר הדבקה בוירוס של צמחי קישוא ושימש להפקת חלבון ההלפר מהצמח הנגוע באמצעות Ni-NTA (Kadoury *et al*.,1998). במהלך המחקר הנוכחי, נעשה שימוש רב בשבט זה לביצוע הניסויים השונים, והוא מכונה בהמשך העבודה בקצרה בשם ZYMV-His-HC.

שבטים של ZYMV בהם נעשה שימוש להכנת השבט ZY-H-ELSC.

שבט אינפקטיבי ZYMV-HCΔ9aaELSC המכיל מוטציה נקודתית להחלפת ח׳ האמינו (K) ליזין ב - (E) ח׳ גלוטמית באתר KLSC המשוער כמעורב בקישור אל חדק הכנימה. עקב מוטציית חסר (deletion) הוחסר ממנו רצף הבסיסים המקדד ל- 9 ח׳ אמינו במעלה רצף האתר השמור VVELSC ראה תמונה מספר 28 בפרק התוצאות.

פלסמיד ZYMV-His-HC-ELΔSac sub clone החסר מקטע בגודל של 6282 בסיסים המקודד לחלק מחלבון ההלפר ועד ההתחלה של חלבון NIb.

3. תוצאות:

3.1. מאמר ראשון:

Dombrovsky A, Huet H, Zhang H, Chejanovsky N, Raccah B. (2003). Comparison of newly isolated cuticular protein genes from six aphid species. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 33, 709-715.

Pergamon

Insect Biochemistry and Molecular Biology 33 (2003) 709–715

Insect Biochemistry and Molecular Biology

www.elsevier.com/locate/ibmb

Comparison of newly isolated cuticular protein genes from six aphid species

A. Dombrovsky [a], H. Huet [a], H. Zhang [a], N. Chejanovsky [b], B. Raccah [a,*]

[a] *Volcani Center, Department of Virology, Bet Dagan, Israel*
[b] *Volcani Center, Department of Entomology, Bet Dagan, Israel*

Received 12 February 2003; received in revised form 8 April 2003; accepted 10 April 2003

Abstract

This paper reports on the first aphids' cuticular proteins. One gene (*Mpcp1*) was obtained by screening a cDNA library of *Myzus persicae* with antibodies to a lepidopteran cuticle protein. MpCP1 presents a putative signal peptide, a central extended R&R domain, flanked by N- and C-terminal repeats of alanine, tyrosine and proline. The mRNA of *Mpcp1* could be detected in a larval and in adult stages. Primers based on *Mpcp1* allowed isolating and comparing cuticle protein genes from five aphid species, but not from whitefly or thrips. Comparison revealed a high degree of similarity. Data from this paper suggest that this cuticle protein family is typical and predominant to aphids. The conformation of these cuticle proteins and the significance on particular properties of aphid cuticle is discussed.
© 2003 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: Cuticle proteins; Aphids; R&R domain

1. Introduction

The insect exoskeleton, known as the cuticle, is composed of chitin filaments (a polymer of β-1-4-linked N-acetyl-D-glucosamine) embedded in a protein matrix. The cuticle serves as an integument providing protection to inner tissues. It also functions as a structural skeleton providing support and strength. The cuticle protein (CuP) component seems to dictate the function of different cuticles (within the same insect and/or among different insects) (for review see Andersen et al., 1995; Willis, 1999). The nature and sequence of CuP have been determined within the last few years for several insects from different orders, e.g. Diptera, Lepidoptera and Coleoptera (Andersen et al., 1997; Charles et al., 1997; Lampe and Willis, 1994), showing that the CuPs constitute a highly diverse group (Andersen et al., 1995). Also, comparison of CuPs in various insect larval stages suggests that some of them are stage-specific. This implies that the cuticle is not an inert structure but an organ with developmental dynamics (Chihara et al., 1982; Marcu and Locke, 1998; Csikos et al., 1999). A 33 amino acids (aa) conserved region has been observed in over 50% of the CuPs sequences reported from insects until now (Rebers and Riddiford, 1988; Iconomidou et al., 1999). This conserved region was named R&R consensus. More recently, it has been demonstrated that a 68 aa of the extended R&R motif corresponds to a chitin-binding domain (Rebers and Willis, 2001). Andersen (1998), comparing specific motives within the R&R consensus from several insects, has proposed classifying them into two subgroups, RR-1 and RR-2, which correspond mainly to so-called 'soft' and 'hard' CuPs, respectively.

The aim of this study was to analyze several cuticle proteins from aphids. Aphids have a complex biology (Dixon, 1973) and are of special importance as plant pests, because they serve as vectors for many plant viruses. Little is known about the cuticle proteins of this insect group. Aphid stylets are made of cuticle (Parrish, 1967). The food canal is the site where the non-persistent plant viruses are attached (Raccah, 1986; Raccah et al., 2001). Therefore, knowledge of the composition of aphid cuticle proteins may shed light on the mechanism

* Corresponding author. Tel.: +1-972-3-968-3368; fax: +1-972-3-956-4976.
E-mail address: braccah@volcani.agri.gov.il (B. Raccah).

0965-1748/03/$ - see front matter © 2003 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/S0965-1748(03)00065-1

of association between non-persistent plant viruses and their vector.

2. Materials and methods

2.1. Insects and their hosts

Aphids (Aphididae) *Myzus persicae*, Sulzer and *Lipaphis erysimi* Kaltenbach were raised on mustard (*Brassica perviridis* cv Tendergreen), *Aphis gossypii* Glover on squash (*Cucurbita pepo* cv. Ma'ayan), *Brevicoryne brassicae* L. on cabbage (*Brassica oleracea*), *Rhopalosiphum maidis* Fitch on corn (*Zea mays*) and *Aphis fabae* Scopoli on black nightshade (*Solanum niger)*. The whitefly (Aleyrodidae) *Bemisia tabaci* Gennadius was raised on mustard (*B. perviridis cv.* Tendergreen). Insects were kept in individual growth chambers at about 25 ± 3 °C and continuous light.

2.2. Construction of a cDNA library for M. persicae

A cDNA library of *M. persicae* was constructed using kits from Stratagene (cDNA synthesis kit, ZAP-cDNA synthesis kit, and ZAP-cDNA GigapackIII Gold cloning kit). Total RNA was purified from 30 mg of *M. persicae*, using the Ultraspec RNA isolation system from Biotecx Laboratories Inc. The mRNAs were purified from the total RNA with the Oligotex mRNA mini-kit from Qiagen. The purified mRNA served as template for cDNA library construction according to the manufacturer's instructions (Stratagene).

2.3. Screening with anti-CuP antibody

Recombinant phage plaques were visualized by their reaction with an anti-cuticle antiserum. A polyclonal antiserum raised against CuPs of *Manduca sexta* (kindly provided by L. Riddiford, University of Washington in Seattle) was used.

2.4. Sequencing and sequence analysis

DNA plasmids were purified with a Sigma miniprep kit, and sequenced by the Molecular Biotechnology Center (MBC), Rehovot, Israel. Nucleotide and amino acid sequences were analyzed and aligned with DNAMAN software, and with ClustalW. Sequence similarity was searched using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

2.5. Isolation of cuticular genes from different aphid species

Total RNA was extracted by grinding 50 mg of liquid nitrogen frozen aphids using the EZ-RNA kit (Kibbutz Beit Haemek, Israel), and served as template for RT-PCR. Reverse transcription was carried out with Avian myeloblastosis reverse transcriptase (CHIMERX, USA), with CuP5 primer (Table 1), and cDNA was amplified by a PCR reaction using Pfu turbo (Stratagene) or Taq polymerase, with CuP3 and CuP5 primers (Table 1). PCR products were cloned in pGEM-T Easy plasmid (Promega). Presence of the CuP gene in *Thrips tabaci* was screened through a cDNA library that was created and kindly provided by U. Lavi (The Volcani Center, Bet Dagan, Israel).

3. Results

3.1. Cloning of cuticular protein genes from Myzus persicae cDNA library

A cDNA library of *M. persicae* has been constructed. This library was later used to isolate a recombinant phage. The protein expressed by the recombinant phage reacted with a polyclonal antibody to a cuticle protein (CuP) from *Manduca sexta*. BLAST sequence analysis of the phage insert confirmed its identity as a CuP gene, 726 nucleotides (nt) long representing its 3′ end portion. The 5′ end of the gene was retrieved by PCR screening of the phage population using a specific reverse primer (CuP2) (Table 1), and the universal primer T3 (present in ZAP vector, at the 5′ side of the insert). In order to complement the 31 nt missing at the 5′ end, 5′-RACE from total aphid RNA was performed with the 5′/3′ RACE Kit of Boehringer, using the CuP2 primer. The full-length sequence of the aphid CuP is given in Fig. 1. This gene was deposited in GenBank (accession number: AF435075), and is referred to here as *Mpcp1*. The *Mpcp1* gene is composed of two untranslated regions (UTR) at the 5′ and 3′ ends (72 and 122 nt, respectively) and an open reading frame (ORF) of 678 nt. The starting codon ATG (position 73) is preceded by the sequence CAAA, which is in accordance with the (C/A)AA(A/C) consensus translation initiation site of *Drosophila* (Cavener, 1987). According to a prediction (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/), a putative cleavage of signal peptide is present between amino acids 18 and 19. Putative polyadenylation motif, AATAAA, is present at position 828, 22 nt upstream to the end of the gene.

3.2. Deduced protein sequence of the aphid cuticle protein

The deduced size of the newly reported MpCP1 is 226 aa. Its structure revealed four regions: a short *signal peptide* (18 aa) (S in Fig. 2), which is probably digested in mature CuP; a region of repeated motives at the N-terminal with 53 aa (designated *N-terminal repeats*); a

Table 1
Primers used for retrieval of cuticle genes

Primer	Orientation	Position (nt)	Sequence
CP2	Reverse	254–272	5′ GAT TCG TGT CCG TAT GTA G 3′
CP3	Forward	72–88	5′ ***GGA ATT C***AA TGG CAT
CP5	Reverse	743–760	5′ **CCG *CTC GA*** *G* TTT AGC TTA GTA AGC CG 3′
NGFN	Forward	438–460	5′ **AC ACC *GCT AG*** *C* GAC TAC AAC GGT TTC AAC GCC G 3′
Poly-T	Reverse	856–881	5′ T(x25)(AGCT)3′

Position of the primers according to *Mpcp1*. For subsequent cloning purposes, some primers have been designed with extra nucleotides (in bold) and with restriction sites (in italics).

```
1/                                      31/
GAA CAA TCA CCA ACG TTT GAT CTG TAA CTG TCG CAA TTC AAG CAC ACA AAT ACA GCC CCT
61/                 1                   91/7
AAA ACC ATC AAA ATG GCA TAC ATG TTC GTA GTC ATC GCC GCC TCC ATC TTG GCC ACC GCC
                 M   A   Y   M   F   V   V   I   A   A   S   I   L   A   T   A
121/17                                  151/27
TAC GGA TCT CCC GTA GCA GCA CCC ATC TAC GCC GCT GGC CCA GCT TAC TCA GCA CCC GCA
Y   G + S   P   V   A   A   P   I   Y   A   A   G   P   A   Y   S   A   P   A
181/37                                  211/47
TAC TCT GCT GCC CCG GCA TAT GCT GCA CCC TCT TCA TAC TCT GCT CCT TCT TAC AAA CCC
Y   S   A   A   P   A   Y   A   A   P   S   S   Y   S   A   P   S   Y   K   P
241/57                                  271/67
GCT TAC AAA CCA GCA GCA TAC GGA CAC GAA TCT TAC GAT GCC CCA GCT CCA TAC AAC TTC
A   Y   K   P   A   A   Y   G   H   E   S   Y   D   A   P   A   P   Y   N   F
301/77                                  331/87
GAA TAC AGC GTA AAC GAC CCA CAC ACC TAC GAC GTC AAG AGC CAA TCT GAA TAC GCC GAC
E   Y   S   V   N   D   P   H   T   Y   D   V   K   S   Q   S   E   Y   A   D
361/97                                  391/107
GGA AAC GGT TAC GTC AAG GGA TCC TAC AGT CTG GTC GAA CCC GAC GGT TCC ACC CGC ACT
G   N   G   Y   V   K   G   S   Y   S   L   V   E   P   D   G   S   T   R   T
421/117                                 451/127
GTC GAA TAC ACC GCT GAC GAC TAC AAC GGT TTC AAC GCC GTC GTC AAG AAG GAA GGT GGA
V   E   Y   T   A   D   D   Y   N   G   F   N   A   V   V   K   K   E   G   G
481/137                                 511/147
TAC GCT GCA CCA GCT TAC TCT GCA CCA GCA TAC TCT GCA CCA GCC TAC AAG GCC CCA GCT
Y   A   A   P   A   Y   S   A   P   A   Y   S   A   P   A   Y   K   A   P   A
541/157                                 571/167
TAC GCT GCC CCA GCC TAC TCT GCA CCA GCC TAC AAG GCC CCA GCT TAC GCT GCA CCA GCT
Y   A   A   P   A   Y   S   A   P   A   Y   K   A   P   A   Y   A   A   P   A
601/177                                 631/187
TAC TCT GCA CCA GCC TAC AAG TCC CCA TCT TAC TCT GCC CCG GCC TAC AAA GCC CCA TAC
Y   S   A   P   A   Y   K   S   P   S   Y   S   A   P   A   Y   K   A   P   Y
661/197                                 691/207
TCC GCT CCC TCA TAC TCC GCC CCA GCC TAC AAG GCC CCG TCT TAC TCC GCA CCA GCT TAC
S   A   P   S   Y   S   A   P   A   Y   K   A   P   S   Y   S   A   P   A   Y
721/217                                 751/227
TCC GCC CCA GCT TAC GCT GCC CCG GCT TAC TAA GCT AAA CAT TTG ACT TTT CAA AAT CAA
S   A   P   A   Y   A   A   P   A   Y
781/                                    811/
AAT GTC ACT TCT AAT TTA TTG TTA TTT ATT TAT TTA AAT GTG AAT ATA ATA AAC AAT TAA
841/                                    871/
TAT TTG CAA ATC CGT AAA AAA AAA AAA AAA AAA AA
```

Fig. 1. Nucleotide sequence of *Myzus persicae* cuticular protein gene, *Mpcp1*, and deduced primary structure of MpCP1. Amino-acid residues are shown above the nucleotide sequence and numbered from the first methionine residue. Sixty-three residues of the extended R&R domain are underlined, with the conserved amino-acids of ‘hard’ cuticle in bold (according to Iconomidou et al., 1999). The putative signal peptide is in italics and its suggested cleavage site is indicated by [+]. The putative polyadenylation signal sequence is double-underlined.

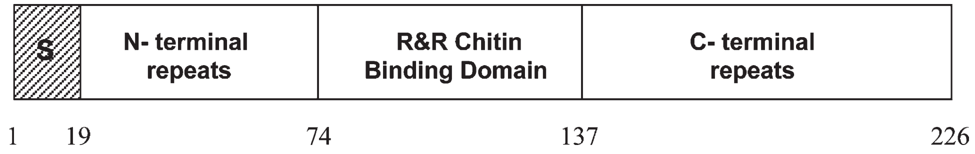


Fig. 2. Schematic representation of the primary structure of MpCP1. S stands for the signal peptide.

third and central region extending from position 74 to 136 aa (representing the extended R&R consensus), and a fourth region with numerous repeated motives at the C-terminal (designated C-terminal repeats) with 90 aa (Fig. 2). The central domain is mostly hydrophilic, whereas the N-terminal repeats and the C-terminal repeats regions tend to be hydrophobic (data not shown). Sequence similarity search by BLAST of the central region suggested that it corresponds to the extended R&R chitin-binding domain, showing high sequence similarity with that of subgroup RR-2 CuPs, mainly found in hard cuticle proteins of other insects (Fig. 3). Both

```
MpCP1      74 YNFEYSVNDPHTYDVKSQSEYADGNGYVKGSYSLVEPDGSTRTVEYTADDYNGFNAVVKK
DmCG7072   91 YSFNYGIKDPHTGDIKSQAEERDGD-VVKGQYSLVEPDGSVRTVDYTADDHNGFNAVVHK
AgCP6435   88 YSFNYGIKDPHTGDIKSQAEERDGD-VVKGQYSLVEPDGSVRTVDYTADDHNGFNAVVHK
BmWCP6     80 YEFNYGVHDAHTGDIKQQSEARDGD-VVKGSYSLVEPDGSTRTVEYQADDHNGFNAVVHR
TmACP20    67 YQFKYGVEDHRTGDRKQQAEVRVGD-VVKGEYSLAEPDGTVRVVKYTADDHNGFNAVVSR
LmACP8     61 YSFAYDVQDSLTGDSKTQHETRDGD-VVQGSYSVVDPDGTKRTVDYTADPHNGFNAVVHK
consensus   1 *.*.*...*..*.*.*.*.*  ..*.  .*.*.**...***..*.*.*.**..*******..
```

Fig. 3. Alignment of the chitin-binding domain of MpCP1 (this study) with comparable regions of other genes retrieved by BLAST. Proteins that showed highest sequence similarity to MpCP1, are presented. DmCG7072: sequence from total genome sequencing project of *Drosophila melanogaster* (has not been submitted as cuticular protein) [AAF50443]; AgCP6435: as previous, sequence from total genome sequencing project of *Anopheles gambiae* (putative has not been submitted as cuticular protein) [EAA10827], BmWCP6: cuticular protein from wing disc of *Bombyx mori* [BAB32481], TmACP20: cuticular protein of adult *Tenebrio molitor* [CAA45057], LmACP8: cuticular protein of adult *Locusta migratoria* [P11734]. Alignments were created with ClustalW and shading was done with BOXSHADE 3.21. Consensus is shown at the bottom with (.) indicating conserved substitutions and (∗) indicating identities.

the N-terminal and C-terminal regions are rich in alanine, proline and tyrosine. However, they differ in the arrangement of the repeats. In the N-terminal the repeats are not evenly distributed, whereas in the C-terminal their arrangement is extremely consistent. Proline is frequent in both terminals and dispersed among every four, five or six residues. The C-terminal is characterized by the presence of a unique stretch of the motif (A/S/K)APAY, repeated 14 times, plus four repeats in an altered motif (three '(K/S)(A/**S**)P**S**Y' and one 'KAPY'). The 18 prolines are evenly distributed every five residues (except for position 199, where a residue is missing in the upstream motif). Interestingly, BLAST analysis of a short repeat of the (A/S/K)APAY motif shows high degree of sequence identity to regions of several insect CuPs, but also with several proteins of a non-chitin-binding nature such as a vitelline membrane protein (from *Drosophila melanogaster*), a chorion protein (*Ceratitis capitata*), a non identified protein (with no R&R consensus) from *Anopheles gambiae*, and with the C-terminal of an even more distant RNA-polymerase sub-unit of Protist (Fig. 4).

3.3. Retrieval of the homologous cuticular protein gene from six aphid species

The homologous ORF was isolated by RT-PCR using the primers CuP3 and CuP5, flanking the *Mpcp1* ORF

```
    MpCP1:    1     AAPAY-----SAPAY-----SAPAY-----KAPAY-----AAPAY-----SAPAY
 DmVM26AB:   68     AAQAY--SAPAAPAY--SAPAAPAY--SAPAAPAY--SAPAAPAY--SAPAAPAY
 AgCP6333:  131     APVAY-----AAPAY-----AAHAY-----AAPAY-----AAHAY-----AAPAY
    BmCPA:  107     AAPAF-----SAASY-----AAPVY-----SAASY-----AAPAY-----SAASY
CcS19CHOR:  184   SVPAPSY---SAPAPSY---SAPAPSY---SAPAPSY---SAPSSSY---AAPAPASY
   Ce5K96:   97     AAPAY-APALGAPAY-APALAAPAY-APGLAAPAF--APAPVVAAAPAL--APAY
   MiRPB1: 1600     ASPAY---SPASPAY---SPASPAY---SPASPAY---SPASPAY---SPASPAY
TmPCP-C1B:   87     AAPVAAY---AAPIA-TAAYAAPVA-HAAYAAPVA-HAAYAAPVA-HAAYAAPVA
  LmACP21:   16     AARAY-----AAPVAY----AAPALR----AAPVAY----AAPAV--AKVAAPVAY
  Repeat:              P Y       P Y       P Y       P Y       P Y       P Y
```

Fig. 4. Alignment of six repeats of MpCP1 with other genes retrieved by BLAST. DmVM26AB: Vitelline membrane protein precursor of *Drosophila melanogaster* [P13238], AgCP6333: sequence from total genome sequencing project of *Anopheles gambiae* (unidentified protein) [EAA11236.1], BmCPA: cuticle protein of *Bombyx mori* [BAC10661.1], CcS19CHOR: chorion protein of *Ceratitis capitata* [CAA70118.1], Ce5K96: putative membrane protein of *Caenorhabditis elegans* [NP_505480.1], MiRPB1: DNA-dependent RNA polymerase II largest subunit of *Mastigamoeba invertens* [AAC62246.1], TmPCP-C1B: pupal cuticle protein of *Tenebrio molitor* [P80684], LmACP21: cuticle protein of *Locusta migratoria* [P81225]. Gaps (−) have been introduced to match the repeats.

(Table 1) from total RNA of five other aphid species (*L. erysimi*, *B. brassicae*, *A. gossypii*, *R. maidis* and *A. fabae*). The primers were used for RT-PCR from total RNA of the whitefly *B. tabaci* and to screen a cDNA library of the thrips *Thrips tabaci*. Despite many attempts, amplification of these non-aphid genes was not successful. The amplified genes of the five aphid species were of similar size to *Mpcp1*. For each gene, at least two independent clones were sequenced from both sides; the sequences have been deposited in GenBank (accession numbers: AY217538, AY217539, AY217540, AY217541, and AY217542, for LeCP1, BbCP1, AgCP1, RmCP1, and AfCP1, respectively). Sequence analysis showed that all the aphid genes shared close similarity (93 and 95% identity at the nucleotide and amino acid level, respectively). The putative signal peptide and a region encompassing the chitin-binding domain (from aa position 66 to 143) are 100% identical in all six aphid species. Therefore, the alterations are present only in the N and C terminal repeats region (Fig. 5).

The alterations in the N-terminal repeats region consist mostly in substitutions of alanine and serine, or insertions or deletions of these residues. There are two exceptions, G29 (replacing A29 in *R. maidis* and missing in *A. gossypii*. Also, proline replaces S/A38 in *B. brassicae*. However, the regular distribution of proline residues is conserved. Similarly, modifications in the C-terminal repeats region comprised mostly substitutions among lysine, alanine and serine, without altering the repeat sequences. A motif is deleted in *A. gossypii* (position 158–162). The exception is a threonine that replaces the consensus A223 in *L. erysimi*. It is noteworthy to notice that the modified repeat composed of four only residues instead of five (193–196 KAPY) is conserved as a four-residue repeat in all the aphid species. Thus, the proline regular distribution is not modified.

The total number of amino acid substitutions among homologous repeats regions is low. The number of lysine residues remained unchanged. One additional serine and one additional alanine residue (out of 28 and 64, respectively) were seen compared with the MpCP1. Unless proven otherwise, this minute change is not expected to inflict a major change in conformation.

```
MpCP1 27   AAGPA.YSAPAYSAAPAYAAPSSYSAPSYKPA.YKPAAYGHESYDAPAPYNFEY   78
AfCP1 27   -----.----------S---------------A----.----------------   78
LeCP1 27   -----.--------------------------.---------------------   78
BbCP1 27   -----.------P-------------------.-------Q-------------   78
RmCP1 27   S-A--A----S-A-----S-------------A---------------------   80
AgCP1 27   --.--A----S-A---S---------------A----.----------------   78


MpCP1  137 YAAPAYSAPAYSAPAYKAPAYAAPAYSAPAYKAPAYAAPAYSAPAYKSPSYSAPAYKAPYSAPSYSAPAYKAPSYSAPAYSAPAYAAPAY 226
AfCP1  137 ---------------------S---------------------------------------------------A------A----S---- 226
LeCP1  137 -----------K----A----S-------------------------A-------------------------A-----------ST--- 226
BbCP1  137 ----------------------------------S-S----------A-------------------------A-----------S---- 226
RmCP1  139 -----------K----S----K----A----S----S------------------------------------A-----------S---- 228
AgCP1  137 ---------------------.....-----------------------------------------------A------A----P---- 221
```

Fig. 5. Alignment of the deduced amino acid sequence among *Aphis fabae* (Af); *Aphis gossypii* (Ag); *Brevicoryne brassicae* (Bb), *Lipaphis erysimi* (Le); *Myzus persicae* (Mp); *Rhopalosiphum maidis* (Rm). aphid species. Only the regions with alteration are presented. (−) corresponds to identical residue; and (.) to missing residue.

3.4. Identification of cuticular protein mRNA in larvae and adults of M. persicae and L. erysimi

In order to ascertain if there was a transcription of *Mpcp1* and *Lecp1* in the first instar nymph and in apterate and winged adults of *M. persicae* and *L. erysimi* respectively, RT-PCR was performed beginning with total RNA from whole aphid. The RT step involved Poly-T followed by a PCR with CuP3 and CuP5 (Table 1). From Fig. 6, it is evident that the gene was amplified in the first instar larva and in the adults. The control (PCR reaction directed to the purified RNA without the RT step) did not yield a product (data not shown). The identity of *Mpcp1* and *Lecp1* was confirmed by sequencing the PCR products of all morphs, thus proving the presence of mRNA.

3.5. Isolation of other genes in M. persicae and L. erysimi

A primer (NGFN, Table 1) was designed for the isolation of additional CuPs from either *M. persicae* or *L. erysimi*. This forward primer was based on the conserved 'GFNAVV' motif of RR-2 type CuP, located in the central region of the CuP while the reverse primer was the Poly-T (Fig. 1). These primers served to retrieve partially the *Mpcp2* and *Mpcp3* from the cDNA library of *M. persicae*. The *Lecp2* was retrieved from *L. erysimi* by a RT-PCR of total RNA of whole aphids (apterate and winged adults). This set of primers was expected to amplify different hard CuP genes. However, the genes that were obtained, shared close similarity with *Mpcp1*, differing mostly in some repeat deletions of *C-terminal repeats* region, giving rise to truncated genes (Fig. 7). In the MpCP2 too the deletion of non-repeat motif exists (134–137 EGGY). The non-consensual threonine, located at the C-end of LeCP1, is also found in the truncated LeCP2.

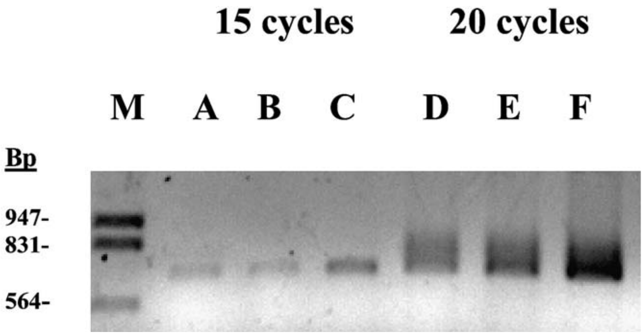


Fig. 6. RT-PCR amplification of *Lecp1* at different stages. Lane M: DNA marker λ *Hind*III + *Eco*RI. Lanes A–C and D–F, 15 and 20 cycles of PCR amplifications, respectively. Lanes A and D, apterous adults; B and E, alate adults; C and F, first instars. Only a representative gel from *Lipaphis erysimi* sample is presented, *Myzus persicae* gave a similar result.

4. Discussion

This is the first report cuticular proteins isolated from aphids. A CuP gene, named *Mpcp1*, was first isolated from the green peach aphid *M. persicae.* MpCP1 has in common attributes with many other insect CuPs: a signal-peptide at the N-terminal and the chitin-binding domain (Rebers and Willis, 2001). The chitin-binding domain is flanked by two regions with highly consistent repeats, particularly at its C-terminal (Fig. 2). The putative 18 aa peptide-signal exhibits hydrophobicity (data not shown) and its function is believed to allow secretion of the CuP from the cell (Nielsen et al., 1997). The central region represents the extended R&R chitin-binding domain (Iconomidou et al., 1999; Rebers and Willis, 2001). The R&R chitin-binding domain presents the GFNAVV motif of the protein of the subgroup RR-2, that is mainly found in a hard cuticle protein of other insects (Andersen, 1998; Iconomidou et al., 1999). This conserved region gave the best match with the predicted *Drosophila melanogaster* CuP gene (81%).

Fig. 7. Alignment of the amplified C-terminal of several *Myzus persicae* and *Lipaphis erysimi* cuticular proteins. According to MpCP1, alignment starts at position 126. Gaps (−) have been introduced to match the repeats. Alignments were created with ClustalW and shading was done with BOXSHADE 3.21. Consensus is shown at the bottom with (.) indicating conserved substitutions and (∗) indicating identities.

Based on *Mpcp1* sequence, primers were designed to isolate the homologous gene from five other aphids. These primers allowed amplification of the gene in all the tested aphid species. On the other hand, attempts to isolate the homologous CuP gene from *B. tabaci* (Aleyrodidae) or from *T. tabaci* (Thripidae) did not succeed, despite their systematic proximity.

These aphid CuP genes shared close similarities at the amino acid level. They all have an identical chitin-binding domain and minor alterations in the repeat structures. In addition, mRNA of *Mpcp1* and *Lecp1* was detected in the first instar larvae and two adult morphs of *M. persicae* and *L. erysimi* (respectively). Finally, we designed primers to isolate RR-2 CuPs other than MpCP1. Surprisingly, the three genes retrieved (two from *M. persicae* and one from *L. erysimi*) were similar to *Mpcp1*, encoding CuPs differing mostly in some repeat motif deletions. These data suggest that this gene family is rather typical to aphid species. In addition, by analogy to other insects, it probably comprises the principal protein component of aphid hard cuticle matrix.

Based on similarities of the primary and secondary structures of a soft CuP from the lepidopteran *Hyalophora cecropia* (Iconomidou et al., 2001) and the bovine plasma retinol-binding protein, from which the folding has been determined (Zanotti et al., 1994), Hamodrakas et al., (2002) proposed a structural model of the chitin-binding domain. The basic folding structure that has been proposed was an antiparallel β-pleated sheet half barrel interacting with chitin chains. We checked that the chitin-binding domain of MpCP1 fit this folding structure, using the Swiss-PdbViewer program (http://us.expasy.org/spdbv/) (data not shown). In aphid genes, this central domain is flanked by the N- and C-terminals that are characterized by numerous repeats of alanine, proline and tyrosine. In the N-terminal, these repeats are not evenly arranged, but proline itself is present at about the same frequency (every 4–5–6 residues) in both terminals. In the C-terminal, the repeats are evenly arranged. It is important to note that repeats were reported in several CuPs, but mostly in the form of AAP(A/V), whereas there is no valine residue in aphids' CuP repeats. Besides, this motif was not as evenly repeated as in aphids (Andersen et al., 1995; Andersen et al., 1997). The 90 aa C-terminal repeats region in MpCP1 and its homologues in other aphid species is composed only of repetitions of the (S/A/K)APAY motif (or its altered version) with 18 proline residues evenly distributed (Fig. 1). This structure is present in three other genes of *M. persicae* and *L. erysimi*, differing only in fewer repeats (Fig. 7). This seems to attribute an important role to the C-terminal repeat region. Andersen et al., (1995) proposed that the AAPA motif tends to form turns in the protein conformation. Presence of proline residues is also known to create turns in protein chains (Tronrud et al., 1986; Richardson and Richardson, 1989). Thus, the numerous repeats and proline residues in the N- and C-regions of this family of aphid CuP are believed to form a regular helix as found for the 'beta-spiral structure' of elastin, where there were repeats of the pentapeptide VPGVG motif (Urry et al., 1974; Urry, 1982; Andersen, 2002). Interestingly, the repeats AAPAY-SAPAY-SAPAY-KAPAY-AAPAY-SAPAY are found in several proteins, unrelated to chitin-binding CuP, such as chorion protein from Diptera, or RNA polymerase subunit of protist (Fig. 4). Further support for helicoidal structure is given by the fact that chorion proteins of several Lepidoptera and fish appear to have helicoidal structures too (Kafatos et al., 1977; Mazur et al., 1982). The helicoidal architecture is common in various biological systems and at different molecular scale (Neville, 1986; Iconomidou et al., 1999). This could be the reason for sequence similarity between unrelated proteins (including cellular protist protein) illustrated Fig. 4. The other frequently present amino acid is tyrosine. Tyrosine residues may be involved in protein–protein interaction, in view of tyrosine known function in cross-linking with neighboring intra- or intermolecular domains (Lassandro et al., 1994). Analyzing the aphid CuP domains, we may speculate that the central domain anchors the chitin chains, while the helicoidal 'spring-like' structures will serve to bind with neighboring proteins, lending coherence to the matrix and a certain elasticity.

Acknowledgements

We would like to thank L.M. Riddiford (University of Washington) for kindly providing antibodies to cuticular protein from *Manduca sexta*, and to Uri Lavi (The Volcani Center) for allowing us to use the *Thrips tabaci* cDNA library. This work was supported by a grant from BARD no US-2996-98.

References

Andersen, S.O., 2002. Characteristic properties of proteins from pre-ecdysial cuticle of larvae and pupae of mealworm *Tenebrio molitor*. Insect Biochem Mol Biol 32, 1077–1087.

Andersen, S.O., 1998. Amino acid sequence studies on endocuticular proteins from the desert locust, *Schistocerca gregaria*. Insect Biochem Mol Biol 28, 421–434.

Andersen, S.O., Hojrup, P., Roepstorff, P., 1995. Insect cuticular proteins. Insect Biochem Mol Biol 25, 153–176.

Andersen, S.O., Rafn, K., Roepstorff, P., 1997. Sequence studies of proteins from larval and pupal cuticle of the yellow meal worm, *Tenebrio molitor*. Insect Biochem Mol Biol 27, 121–131.

Cavener, D., 1987. Comparison of the consensus sequence flanking translational start sites in *Drosophila* and vertebrates. Nucl Acids Res 15, 1353–1361.

Charles, J.P., Chihara, C., Nejad, S., Riddiford, L.M., 1997. A cluster of cuticle protein genes of *Drosophila melanogaster* at 65A: sequence, structure and evolution. Genetics 147, 1213–1224.

Chihara, C.J., Silvert, D.J., Fristrom, J.W., 1982. The cuticle proteins of *Drosophila melanogaster*: stage specificity. Dev Biol 89, 379–388.

Csikos, G., Molnar, K., Borhegyi, N.H., Talian, G.C., Sass, M., 1999. Insect cuticle, an in vivo model of protein trafficking. J Cell Science 112, 2113–2124.

Dixon, A.F.G., 1973. Biology of Aphids. Edward Arnold (Publishers), London, UK.

Hamodrakas, S.J., Willis, J.H., Iconomidou, V.A., 2002. A structural model of the chitin-binding domain of cuticle proteins. Insect Biochem Mol Biol 32, 1577–1583.

Iconomidou, V.A., Chryssikos, G.D., Gionis, V., Willis, J.H., Hamodrakas, S.J., 2001. 'Soft'-cuticle protein secondary structure as revealed by FT-Raman, ATR FT-IR and CD spectroscopy. Insect Biochem Mol Biol 31, 877–885.

Iconomidou, V.A., Willis, J.H., Hamodrakas, S.J., 1999. Is β-pleated sheet the molecular conformation which dictates formation of helicoidal cuticle? Insect Biochem Mol Biol 29, 285–292.

Kafatos, F.C., Regier, J.C., Mazur, G.D., Nadel, M.R., Blau, H.M., Petri, W.H., Wyman, A.R., Gelinas, R.E., Moore, P.B., Paul, M., Efstratiadis, A., Vournakis, J.N., Goldsmith, M.R., Hunsley, J.R., Baker, B., Nardi, J., Koehler, M., 1977. The eggshell of insects: Differentiation-specific proteins and the control of their synthesis and accumulation during development. In: Beerman, W. (Ed.), Results and Problems in Cell Differentiation, vol. 8. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, pp. 45–145.

Lampe, D.J., Willis, J.H., 1994. Characterization of a cDNA and gene encoding a cuticular protein from rigid cuticles of the giant silkmoth, *Hyalophora cecropia*. Insect Biochem Mol Biol 24, 419–435.

Lassandro, F., Sebastiano, M., Zei, F., Bazzicalupo, P., 1994. The role of dityrosine formation in the crosslinking of CUT-2, the product of a second cuticlin gene of *Caenorhabditis elegans*. Mol Biochem Parasitology 65, 147–159.

Marcu, O., Locke, M., 1998. A cuticular protein from the moulting stages of an insect. Insect Biochem Mol Biol 28, 659–669.

Mazur, G.D., Regier, J.C., Kafatos, F.C., 1982. Order and defects in the silkmoth chorion, a biological analogue of a cholesteric liquid crystal. In: King, R.C., Akai, H. (Eds.), Insect Ultrastructure, vol. 1. Plenum Press, New York, pp. 150–185.

Neville, A.C., 1986. The physics of Helicoids: Multidirectional 'plywood' structures in biological systems. Phys Bull 37, 74–76.

Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., von Heijne, G., 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. Protein Eng 10, 1–6.

Parrish, W.B., 1967. The origin, morphology, and innervation of aphid stylets (Homoptera). Ann Ent Soc Am 60, 273–276.

Raccah, B., 1986. Non-persistent viruses: epidemiology and control. Adv Virus Res 31, 387–429.

Raccah, B., Huet, H., Blanc, S., 2001. Potyvirus. Molecular aspects of virus–vector interactions. In: Harris, K.F., Smith, O.P., Duffus, J.E. (Eds.), Virus–Insect–Plant Interactions. Academic Press, San-Diego, pp. 181–206.

Rebers, J.E., Riddiford, L.M., 1988. Structure and expression of a *Manduca sexta* larval cuticle gene homologous to *Drosophila* cuticle genes. J Mol Biol 203, 411–423.

Rebers, J.E., Willis, J.H., 2001. A conserved domain in arthropod cuticular proteins binds chitin. Insect Biochem Molec Biol 31, 1083–1093.

Richardson, J.S., Richardson, D.C., 1989. Principles and patterns of protein conformation. In: Fasman, G.D. (Ed.), Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation. Plenum Press, New York, pp. 1–98.

Tronrud, D.E., Schmid, M.F., Matthews, B.W., 1986. Structure and X-ray amino-acid sequence of bacteriochlorophyll, a protein from *Prosthecochloris aestuarii* refined at 1,9A resolution. J Mol Biol 188, 443–454.

Urry, D.W., 1982. Characterization of soluble peptides of elastin by physical techniques. Meth Enzymol 82, 673–716.

Urry, D.W., Cunnigham, W.D., Ohnishi, T., 1974. Studies on the conformation and interactions of elastin. Proton magnetic resonance of the repeating pentapeptide. Biochemistry 13, 609–616.

Willis, J.H., 1999. Cuticular proteins in insects and crustaceans. Am Zool 39, 600–609.

Zanotti, G., Marcello, M., Malpeli, G., Folli, C., Sartori, G., Berni, R., 1994. Crystallographic studies on complexes between retinoids and plasma retinol-binding protein. J Biol Chem 269, 29613–29620.

3.2. מאמר שני:

Dombrovsky A, Huet H, Chejanovsky N, Raccah B.(2005).

Aphid transmission of a potyvirus depends on suitability of the helper component and the N terminus of the coat protein. Archives of Virology. 150, 287-298.

Arch Virol (2005) 150: 287–298
DOI 10.1007/s00705-004-0407-7

Archives of Virology
Printed in Austria

Aphid transmission of a potyvirus depends on suitability of the helper component and the N terminus of the coat protein

A. Dombrovsky[1], **H. Huet**[1], **N. Chejanovsky**[2], and **B. Raccah**[1]

[1]Department of Virology, The Volcani Center, Bet Dagan, Israel
[2]Department of Entomology, The Volcani Center, Bet Dagan, Israel

Received June 18, 2004; accepted August 9, 2004
Published online October 21, 2004 © Springer-Verlag 2004

Summary. The present study investigates the specificity of potyviruses for aphid species. Two potyviruses differing in their host range were used: *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) mainly infecting cucurbits and *Turnip mosaic virus* (TuMV) mainly infecting crucifers. Two sets of aphids species were used as vectors, one polyphagous (*Myzus persicae* and *Aphis gossypii)* and the other from crucifers (*Brevicoryne brassicae* and *Lipaphis erysimi*). Evidence is provided that the specificity between a vector and a potyvirus depends either on the affinity between the aphid species and the helper component (HC) protein used or on the affinity between the HC and the virions. The difference between the two potyviruses cannot be attributed to the DAG domain which is unaltered in both N termini of the CP. Therefore, a ZYMV full length clone served to exchange a fragment encoding for the N terminus of the ZYMV CP by that of TuMV. This partial exchange in the ZYMV CP, allowed the TuMV HC to transmit the chimeric virus but not the wild type ZYMV. The significance of the N terminus context of the CP in the specificity for the HC is discussed.

Introduction

Potyviruses as typical non persistent viruses are carried within the mouthparts of their vectors (mostly aphids) [34, 36]. This implies a less intimate association between the virions and the insect organs than that required for circulative viruses [13]. This lesser association may explain the wider range of vectors known for non persistent viruses than reported for circulative viruses [19]. Nevertheless, cases where aphid species differ in their ability to transmit potyviruses, are documented from field [14, 26] and laboratory studies [31, 33]. Harris [15], thoroughly discussed the reasons for the variation in specificity and included factors that depend

on the host harboring the virus, environmental factors, factors depending on the virus strain or the vector species.

Transmission of potyviruses by aphid vectors requires the presence of a helper component (HC) protein (presented before or in mixture with virions) [11, 12, 23]. Apparently, the HC is required for retaining the virions within the food canal of the aphid stylets [4]. Early work of Kassanis and Govier [18], led them to formulate the so-called "bridge hypothesis", which is still valid nowadays. In this hypothesis, the HC is believed to bind on one hand to the stylet and on the other to the virions capsomers. Acquisition of potyviruses from parafilm membranes allowed testing the effect of heterologous HC-virions systems (where the HC of virus A is mixed with virions of virus B). Failure to transmit was demonstrated and attributed to incompatibility either between the HC and the virions [20, 30] or between the HC and the aphid species [37].

Several domains were identified so far in the HC that affect its ability to assist transmission, the KITC (or KLSC) domain in the N terminus [35] and the PTK in the central part of the HC [16] and more recently, a mutation in the CCC motif in a site upstream from the PTK motif of *Peanut stripe virus* (PStV) was found to assist transmission of virions with a mutation in the DAG domain of the coat protein [8]. The PTK domain was shown to affect the ability of the HC to bind to virions [22], whereas the KITC domain is probably involved in the stylets binding [4, 36].

The N-terminus of the potyviral coat protein and especially the DAG domain were found to determine aphid transmissibility of potyviruses [1, 9]. Later, evidence was presented to show that the DAG and the surrounding context in N terminus of *Tobacco vein mottling virus* affect aphid transmissibility [21]. A potyvirus with a mutation in the DAG domain failed to bind to the HC *in vitro* [3]. However, no information is available on the role of the N terminus in the recognition of the HC. The present study tests the hypothesis that an exchange of the N termini between potyviruses, may alter HC-virion specificity.

Methods

Aphids

All aphid species were collected in Israel and maintained in captivity in growth chambers at 25 ± 3°C with continuous light. Both the green peach aphid *Myzus persicae* (Sulzer) and the melon aphid *Aphis gossypii* (Glover) were from a colony kept in the Volcani Center for many years. *M. persicae* was raised on mustard (*Brassica perviridis* cv. Tendergreen) and *A. gossypii* was raised on squash (*Cucurbita pepo* cv. Ma'ayan). The crucifer aphids were collected from cabbage in the Coastal plain of Israel. *Lipaphis erysimi* (Kaltenbach) was also raised on mustard (cv. Tendergreen) and *Brevicoryne brassicae* (L.) was raised on cabbage (*Brassica oleracea*).

Viruses

Two potyviruses have served in the present study: *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) and *Turnip mosaic virus* (TuMV). Two strains of ZYMV have been used: a wild type and highly aphid transmissible strain which was isolated in Israel and described in our earlier work [16] and a helper component (HC) deficient strain which was engineered in our laboratory

and designated as ZYMV-PAK [22]. The wild type TuMV was isolated in Israel from garlic *(Allium sativum)* (R. Salomon, personal communication). The viruses were kept each on their respective host: ZYMV on squash (cv. Ma'ayan), and TuMV on mustard (cv. Tendergreen). Transmissibility of these strains was ensured by periodical aphid transmission.

Virus and helper components purification

ZYMV was purified as described in [9] with minor modifications and TuMV was purified according to Wang et al. [38].

The ZYMV and TuMV HCs were purified by the binding of the infected plant extract to an Ni^{2+}-NTA resin as described by us in a former study [17] and modified as in [38].

Replacement of the fragment encoding for the N terminus of the ZYMV coat protein by that of TuMV

The RNA encoding for the CP of an Israeli TuMV isolate has been amplified by RT-PCR from infected plant and cloned in pGEM-T-easy (Promega) (GenBank accession number AY325268). The fragment encoding for N-terminus has been replaced in an infectious full length clone (FLC) of ZYMV [10]. This was attained by engineering a subclone of ZYMV (SacI-XbaI), ZYMV-Sb-2, which has a *Pst*I site at the 5′end of the CP gene (Q/S, position 8540 in the ZYMV genome), and a *Kpn*I site at the beginning of the sequence encoding the core domain (between the 6th and the 7th amino-acid of the core, (KDVNA**GT**, position 8687) (Fig. 1a). The *Kpn*I site introduced a change of Serine to Threonine, at position 8690, which did not affect ZYMV behavior (data not shown). Corresponding restriction sites and beginning of the ZYMV-CP-core have been introduced in the fragment encoding for the N-terminus of TuMV-CP, using the primers TuN-Pst Forward (5′ GAT CTG CAG GCA GGC GAA ACG CTC GAC 3′, underlined is the *Pst*I site) and TuN-Kpn Reverse (5′ GGA GGT ACC AGC ATT GAC **GTC TTT** GTC TCG TTC 3′, underlined is the *Kpn*I site and bold are modifications to change TuMV-CP core to ZYMV-CP core) by PCR. The resulting product has been sequenced to confirm authenticity, then digested by *Pst*I and *Kpn*I, allowing incorporation in the Sb-2 subclone, giving rise to ZYMV-TuNT Sb-2. This subclone comprised of the entire N terminus of CP of TuMV. Finally, the fragment excised by SacI and XbaI has been replaced in the ZYMV FLC, giving rise to chimeric ZYTuNT FLC (Fig. 1b). The chimeric FLC was inoculated to squash plants using "BIM-LAB" (Bio-Oz Biotechnologies Ltd., Israel), a plant inoculation apparatus, based on the method described by Gal-On et al. [10].

Construction of a helper component deficient chimeric ZYTuNT

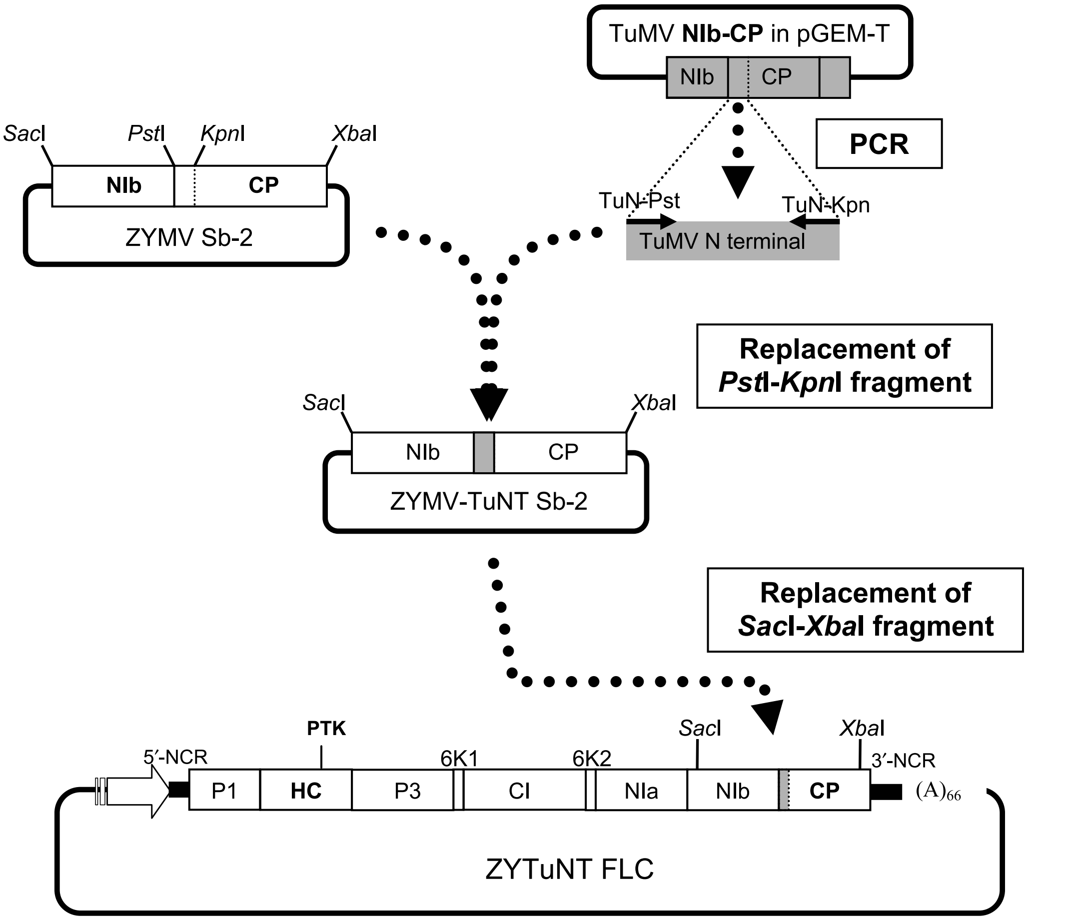
In order to test the aphid transmissibility of the chimeric ZYTuNT, when assisted by foreign HCs, there was a need to render its own HC inactive. In our earlier work, we reported on a mutation in the PTK domain of the HC that caused deficiency in the ability to assist transmission [16]. Later, this domain was proved to be involved in binding to the CP [22]. Therefore, in order to render the chimeric virus helper deficient, a fragment between the A*ge*I and B*am*HI restriction sites in the ZYTuNT FLC (encoding for the active PTK) was replaced by subclone pZHC(−) (encoding for the inactive PAK), as described by us in [16]. The resulting virus was designated ZYTuNT–PAK.

-Sb-2:
ZYMV NIb/---------ZYMV CP Nterminus----------------/------ZYMV Core---....
..DTVMLQ/SGTQPTVA*DAG*ATKKDKEDDKGKNKDVTGSGSSEKTVAAVTKD/KDVNAGTHGKIVPRLSKI....

TuMV:
TuMV NIb/---------TuMV CP Nterminus------------------------/---TuMV Core-------....
..VCVYHQ/AGETL*DAG*LTEEQKQAEKERKEREKAEKEREKQKQLALKKGKNSSQEEGERD/REVNAGTSGTFSVPRL

ZYMV-TuNT Sb-2:
ZYMV NIb/----------**TuMV CP Nterminus**-----------------------/------ZYMV Core--..
..DTVMLQ/**AGETL*DAG*LTEEQKQAEKERKEREKAEKEREKQKQLALKKGKNSSQEEGERD**/KDVNAGTHGKIVPRLSKI..

a



b

Fig. 1. **a** Amino-acid sequence of the N-terminus of the coat protein of ZYMV, TuMV, and ZYTuNT chimera. Double-underline indicates position of restriction enzyme sites used for swapping fragments (*Pst*I and *Kpn*I); underline indicates position of primers used for modifying TuMV sequence; in **bold** is TuMV sequence. In *italic* is the triplet DAG involved in HC binding; **b** Cloning steps to engineer ZYTuNT chimeric infectious clone. A partial sequence of TuMV NIb gene and the full sequence of the CP was cloned into pGEMT-easy plasmid. The N-terminus of the CP amplified by PCR reaction has been digested by the restriction enzyme Pst-Kpn. This fragment was used to exchange the homologous fragment from the ZYMV-Sub clone-2(Sb-2). The ZYMV-Sb-2 was digested with SacI-XbaI and the fragment replaced the homologous fragment in the ZYMV FLC, giving rise to ZYTuNT FLC

Aphid transmission

For plant to plant transmission, the aphids (from various species and hosts) were fasted for 1-hr in glass vials prior to the acquisition access feeding (AAF). In all cases, aphids were allowed 5 min AAF before being transferred to test plants for the inoculation access feeding (IAF). In all cases, the IAF was overnight. On the next morning, the aphids were then killed with Imidacloprid (Confidor, Bayer Ltd.) and the test plants were transferred to a growth chamber for symptoms development.

For transmission from membranes, the AAF of a mixture of virions and HC were as described earlier [25]. For sequential acquisition, *M. persicae* were allowed first to acquire of HC alone from a membrane for 10 min then they were transferred for an additional 5 min AAF on plants infected with a HC-deficient virus strain (either ZYMV-PAK or ZYTuNT-PAK) for acquisition of virions from plants. Thereafter, the aphids were transferred to test plants for an IAF as described in the section above.

Results

Determination of differential specificity in transmission of two potyviruses by aphid species

The working hypothesis in this study was that polyphagous aphid species will transmit viruses from various hosts while aphid species with a narrow host range will transmit viruses infecting hosts on which they feed but not viruses infecting more distant hosts. In order to test this hypothesis, transmission experiments were conducted with TuMV and ZYMV using different aphid species to establish the degree of specificity (Table 1). Two polyphagous aphids tested were *M. persicae* and *A. gossypii* and the cruciferous aphids were *L. erysimi* and *B. brassicae*.

As shown in Table 1, TuMV is transmitted efficiently either by the polyphagous aphids *M. persicae* and *A. gossypii* or by the crucifer aphids (ranging from 75 to 90%). On the other hand, ZYMV was transmitted efficiently by the polyphagous species but very poorly by *B. brassicae* and *L. erysimi* (1.8 and 0% respectively).

Differential transmissibility of potyviruses by aphids may result not only from their respective properties but also from the degree of attraction of the aphids to the acquisition hosts. In order to rule out such an effect, the viruses were acquired

Table 1. Transmission rates for two potyviruses acquired from infected plants by two polyphagous aphid species (*Myzus persicae* and *Aphis gossypii*) and two crucifer aphids species (*Brevicoryne brassicae* and *Lipaphis erysimi*)

Aphid species	Rates of transmission [Percentage ± SD]			
	N*	ZYMV	N	TuMV
M. persicae	4	38/46 [83 ± 7.0]	4	40/49 [82 ± 9.5]
A. gossypii	11	108/138 [78 ± 7.4]	4	35/40 [88 ± 12.6]
B. brassicae	12	3/159 [2 ± 5.4]	7	58/82 [75 ± 17.0]
L. erysimi	9	0/93 [0]	4	40/44 [91 ± 2.0]

Acquisition and inoculations hosts were *C. pepo* for ZYMV and *B. perviridis* for TuMV
*Number of repeats

Table 2. Rates of transmission of two potyviruses acquired from membrane with homologous or heterologous helpers using two polyphagous and two crucifer aphid species

Aphid species	**Rate of transmission [Percent ± SD]***							
	N**	ZYMVHC + ZYMV	N	TuMVHC + TuMV	N	**ZYMVHC + TuMV**	N	**TuMVHC + ZYMV**
M. persicae	7	127/141 [87 ± 6.0]	12	83/109 [75 ± 13.5]	3	89/131 [63 ± 6.0]	3	0/132 [0]
A. gossypii	6	82/97 [89 ± 11.2]	4	30/46 [66 ± 8.9]	5	31/45 [71 ± 15.7]	4	0/40 [0]
B. brassicae	6	0/65 [0]	7	89/131 [64 ± 28.2]	12	0/82 [0]	4	0/51 [0]
L. erysimi	12	0/88 [0]	12	17/37 [47 ± 5.8]	9	0/121 [0]	9	0/37 [0]

*AAF from membranes for 10 minutes. 10 aphids per test plants
**Number of repeats

also from an inert system. Transmission of purified virions of potyviruses from Parafilm membranes needs the presence of a purified HC [23]. Also, the *in vitro* acquisition system offers a way to determine which of the two viral components in the acquisition medium is required for the specificity to aphid species. Thus, the two aphid species were offered either a homologous mixture (HC and virions of the same potyvirus) or heterologous (HC and virions of different potyviruses) (Table 2).

As seen in Table 2, when acquiring the homologous mix of the HC and virions, the polyphagous species (*M. persicae* and *A. gossypii*) transmitted efficiently both ZYMV and TuMV (Table 2, first two columns). On the other hand, the crucifer aphids (*B. brassicae* and *L. erysimi*) transmitted efficiently the homologous mixture of TuMV but failed to transmit the homologous mixture of ZYMV (Table 2, first two columns). These results were consistent with those recorded in the plant to plant transmission (Table 1). Presenting heterologous mixtures to polyphagous or crucifer aphids allowed elucidating the reasons for the failure to transmit (bold letters in Table 2). As seen in Table 2, the polyphagous aphids were able to transmit TuMV with the ZYMV-HC but failed to transmit ZYMV with the TuMV-HC (Table 2, last two columns). The crucifer aphids failed to transmit the heterologous mixtures of either virus (Table 2, last two columns). These findings clearly demonstrate an incompatibility between the HC of TuMV and the virions of ZYMV. Also, they provide evidence, that the crucifer aphids do not recognize the HC of ZYMV. These findings can be explained by the bridge hypothesis where a failure to transmit may derive from a poor affinity between the aphid and the HC and/or a poor affinity between the HC and the virion.

Determination of the coat protein N-terminus role in the recognition of the HC

In the past, the N-terminus of the virion coat protein and specifically the DAG triplet were found to be associated with loss of aphid transmissibility [1, 9]. However, the two potyviruses used in the present study comprised of an unaltered DAG triplet and were all transmissible when assisted with a proper HC. Therefore, we laid an assumption that part of or all the N-terminus of the coat protein and not just the DAG, is involved in the association with the respective HC. In order to validate this assumption, we replaced a fragment that included the region encoding for entire N-terminus of TuMV CP with the corresponding region in the 35 S promoter driven ZYMV infectious clone [10] (Fig. 1). The resulting chimeric virus was designated ZYTuNT. The ZYTuNT was systemic in squash, and could be detected by ELISA using antibodies against TuMV (kindly provided by Dr. A. Gera, Dept. of Virology). The titer of the chimeric virus in the plants as determined by ELISA was similar to that of the non-chimeric virus, indicating comparable replication. However, it was practically impossible to purify sufficient quantities of virus from infected squash adopting either the methods used for purification of ZYMV or TuMV.

Table 3. Transmission of the Chimeric ZYTuNT-PAK with the assistance of helper proteins from two potyviruses by *Myzus persicae*

Sequential acquisition		Transmission		
First acquisition feeding from membrane[a]	Second acquisition feeding from Plants[a]	N[#]	Rate	Percent ± SD
Helper	Virus			
ZYMV	ZYTuNT-PAK	4	17/52	33 ± 12.6
ZYMV	ZYMV-PAK[b]	4	29/56	51 ± 15.0
TuMV	ZYTuNT-PAK	6	11/77	14 ± 4.7
TuMV	ZYMV-PAK	4	0/57	0
None	ZYTuNT-PAK	6	0/55	0

[a]Aphids were allowed a 10 min first acquisition access feeding (AAF) on a membrane with one of the helpers followed by a 5 min of AAF on plants infected with HC deficient virus, then the aphids were transferred for an overnight inoculation access feeding on test plants

[b]ZYMV-PAK is an helper deficient strain with a mutation in the PTK domain (Huet et al., [16])

[#]Number of repeats

Lacking purified virions that are needed for acquisition from membranes, we adopted the sequential acquisition approach, where the helper protein is acquired from membrane and then, the virions are acquired from infected plants. The virus used in transmission in this strategy, needed to have a deficient helper to render it totally dependent on an external helper. Thus, we engineered the HC deficient ZYTuNT-PAK (as described in the method section). The original ZYMV-PAK [16] and the ZYTuNT-PAK served in the experiments summarized in Table 3.

As seen in Table 3, the ZYMV HC assisted the transmission of the ZYMV-PAK but also the chimeric ZYTuNT-PAK. This result conforms to the results seen in Table 2, where ZYMV HC assisted the transmission of both ZYMV and TuMV virions (Table 2). On the other hand, TuMV HC which failed to assist the transmission of ZYMV virions (Table 2) did assist the transmission of the chimeric ZYTuNT-PAK, but to a low rate (14%) (Table 3). A lower rate of transmission is anticipated in sequential acquisition tests due to the compound probability for each of the acquisition steps. This is reflected in comparing the rates of transmission in Table 2 and 3 for ZYMVHC assisting ZYMV (87.2 versus 51%). The low, but positive transmission imply on a certain degree of recognition between the TuMV HC and the chimeric ZYMV-TuMV CP. This recognition was completely lacking when the intact ZYMV CP was used (Table 2 and 3).

Discussion

Specificity in virus transmission by vectors is defined by the ability of one vector species to transmit a certain virus but not another. The specificity can be

determined both by virus or vector properties. Nevertheless, in numerous reports from field [14, 26, 29] or laboratory studies [33, 6] it was established that certain vector species may fail or poorly transmit non persistent viruses that are readily transmitted by other vector species. In potyviruses [27] and in caulimoviruses [5] transmission depends on the presence of HCs. Non persistent transmission requires very brief probing time for inoculation and therefore, it is anticipated that vectors that do not colonize the host may still infect them when they probe. Nevertheless, it is logical to assume that aphid species will tend to transmit more readily viruses that infect hosts that they feed on than viruses in hosts on which they do not feed. The present work was aimed comparing the transmission abilities of aphid species that are known to be polyphagous to that of aphid species that have a narrow host range. *M. persicae* and *A. gossypii*, two species that colonize numerous host species from various botanical families were compared to two crucifer aphids that mainly reproduce on crucifers [7]. The results obtained both for plant to plant or from membrane show that *M. persicae* and *A. gossypii* transmit both ZYMV and TuMV, while *B. brassicae* and *L. erysimi* only transmit TuMV, that infects crucifers.

The involvement of the HC in the transmission process may add to the complexity of the specificity. Thus, a failure of an aphid to transmit may be the outcome of lack of recognition between the aphid and the HC, or between the HC and the virus. Kassanis and Govier [18], proposed a "bridge" mechanism where the HC binds on one hand to the aphid stylets and on the other hand to the virus. Recent findings based on molecular and electron microscopic studies support their proposed mechanism [3, 4, 22]. Acquisition of mixtures of HC and virions (homologous and heterologous), made it possible to analyze the cause of compatibility: The HC of ZYMV could assist the transmission of ZYMV and TuMV virions, whereas, the HC of TuMV assisted transmission of TuMV but not those of ZYMV. Besides, ZYMV-HC could not assist transmission in crucifer aphid.

Then, from the plant to plant transmission experiments and from the membrane feeding experiments, it is evident that both forms of specificity may exist (a) between the aphids and the virus (probably its HC) and (b) between the HC and the virion.

Little information is available on the mechanism of the helper binding to the aphid stylets. Proof for interaction between the HC and the CP associations was recently provided [3, 22]. Nevertheless, the failure of the TuMV HC to assist the transmission of ZYMV virions (Tables 1 and 2) can be attributed neither to the PTK nor to the DAG that were both present in the corresponding HC and virus. This led us to consider another approach, in which the entire N terminus of the TuMV CP (which is recognized by the TuMV HC) is replaced within the ZYMV CP. Indeed, this exchange resulted in rendering the chimeric ZYMV, transmissible (although at a lower rate than expected) by the TuMV HC. A possible explanation for the lower rate of transmission of the chimeric ZYMV is that the TuMV N-terminus may not be properly folded in the ZYMV context. This is however, the first report that attributes to the N terminus of the CP the recognition of a different HC. A

thorough work on the effect of the DAG context on aphid transmissibility has been done [21]. Moreover, Flasinski and Cassidy [8], showed that the HC of the peanut mottle virus (PeMoV), which has an ASC motif instead of the conserved CCC (15 aa upstream the PTK domain), assisted better the transmission of virions with the DAAA domain than virions with DAG domain. It has also been suggested that another type of interaction between HC and CP occurs *in planta*, but which apparently does not involve the DAG domain or N-terminus of HC, and which does not occur with virion particles, and then which is not in relation to aphid transmission [28].

Therefore, it is evident that more work is needed to elucidate the exact location of the N terminus that associate with the HC, especially in view of its relatively non conserved amino acid sequence. Unlike for the N terminus of the CP that is known to be present on the surface of the subunit [2, 32], little is known on the structure of the corresponding HC protein. A great stride ahead has been recently done by Plisson et al. [24], where they studied 2D crystals of the lettuce mosaic virus HC. Based on their study, the PTK domain is supposed to be present in the hinge domain. These authors propose that the regulation of accessibility is attained by the relative movement of two principal domains of the HC.

We therefore speculate, that the specificity between the CP and the HC is dictated by structural complementation between the N terminus of the CP and the hinge domain of the HC.

Acknowledgments

We thank Mrs. Sima Singer for her excellent technical assistance. This work was supported by a grant from the BARD no. US-US-2996-98.

References

1. Atreya CD, Raccah B, Pirone TP (1990) A point mutation in the coat protein abolishes aphid transmissibility of a potyvirus. Virology 178: 161–165
2. Baratova LA, Grebenshchikov NI, Shiskov AA, Kashirion IA, Radavsky JL, Jarvekulg L, Saarma M (1992) The topography of the surface of potato XL Tritium planigraphy and immunological analysis. J Gen Virol 73: 229–235
3. Blanc S, Lopez-Moya JJ, Wang R, Garcia-Lampasona S, Thornbury DW, Pirone TP (1997) A specific interaction between coat protein and helper component correlates with aphid transmission of a potyvirus. Virology 231: 141–147
4. Blanc S, Ammar ED, Garcia-Lampasona S, Dolja VV, Llave C, Baker J, Pirone TP (1998) Mutations in the potyvirus helper component protein: effects on interactions with virions and aphid stylets. J Gen Virol 79: 3119–3122
5. Blanc S, Hebrard E, Drucker M, Froissart R (2001) Caulimoviruses. In: Harris KF, Smith OP, Duffus JE (eds) Virus-insect-plant interactions. Academic Press, New York, pp 143–166
6. Bradley RHE, Rideout DW (1953) Comparative transmission of potato virus Y by four aphid species that infect potato. Can J Zool 31: 333–341
7. Eastop VF (1983) The biology of the principal aphid vectors. In: Plumb RT, Thresh JM (eds) Plant virus epidemiology. Blackwell Scientific Publ, Oxford, pp 115–132

8. Flasinski S, Cassidy BG (1998) Potyviruses aphid transmission requires helper component and homologous coat protein for maximal efficiency. Arch Virol 143: 2159–2172
9. Gal-On A, Antignus Y, Rosner A, Raccah B (1992) A mutation in the coat protein gene of zucchini yellow mosaic virus restored its aphid transmissibility but had no effect on its multiplication. J Gen Virol 73: 2183–2187
10. Gal-On A, Meiri E, Huet H, Wu J-A, Raccah B, Gaba V (1995) Particle bombardment drastically increases the infectivity of cloned DNA of zucchini yellow mosaic potyvirus. J Gen Virol 76: 3223–3227
11. Govier DA, Kassanis B (1974) Evidence that a component other than the virus particle is needed for aphid transmission of potato virus Y. Virology 57: 285–286
12. Govier DA, Kassanis B (1974) A virus-induced component of plant sap needed when aphids acquire potato virus Y from purified preparations. Virology 61: 420–426
13. Gray SM, Banerjee N (1999) Mechanisms of arthropod transmission of plant and animal viruses. Microbiol Mol Biol Rev 63: 128–148
14. Harrington R, Katis N, Gibson RW (1986) Field assessment of the relative importance of different aphid species in the transmission of potato virus Y. Potato Res 29: 67–76
15. Harris KF (1977) An ingestion-egestion hypothesis of noncirculative virus transmission by aphids. In: Harris KF, Maramorosch K (eds) Aphids as virus vectors. Academic Press, New York, pp 165–220
16. Huet H, Gal-On A, Meir E, Lecoq H, Raccah B (1994) Mutations in the helper component protease gene of zucchini yellow mosaic virus affect its ability to mediate aphid transmissibility. J Gen Virol 75: 1407–1414
17. Kadouri D, Peng Y-H, Wang Y, Singer S, Huet H, Raccah B, Gal-On A (1998) Affinity purification of HC-Pro of potyviruses with Ni^{2+}-NTA resin. J Virol Methods 76: 19–29
18. Kassanis B, Govier DA (1971) The role of the helper virus in aphid transmission of potato aucuba mosaic virus and potato virus C. J Gen Virol 13: 221–228
19. Kennedy JS, Day MF, Eastop VF (1962) A conspectus of aphids as vectors of plant viruses. Commonwealth Inst. of Entomology, London, pp 1–114
20. Lecoq H, Pitrat M (1985) Specificity of the helper-component-mediated aphid transmission of three potyviruses infecting muskmelon. Phytopathology 75: 890–893
21. Lopez-Moya JJ, Wang RY, Pirone TP (1999) Context of the coat protein DAG motif affects potyvirus transmissibility by aphids. J Gen Virol 80: 3281–3288
22. Peng YH, Kadoury D, Gal-On A, Huet H, Wang Y, Raccah B (1998) Mutations in the HC-Pro gene of zucchini yellow mosaic potyvirus: effects on aphid transmission and binding to purified virions. J Gen Virol 79: 897–904
23. Pirone TP, Blanc S (1996) Helper-dependent vector transmission of plant viruses. Ann Rev Phytopathol 34: 227–247
24. Plisson C, Drucker M, Blanc S, German-Retana S, Le Gall O, Thomas D, Bron P (2003) Structural characterization of HC-Pro, a plant virus multifunctional protein. J Biol Chem 278: 23753–23761
25. Raccah B, Pirone TP (1984) Characteristics of factors affecting helper-component mediated aphid transmission of a potyvirus. Phytopathology 74: 305–308
26. Raccah B, Gal-On A, Eastop VF (1985) The role of flying aphid vectors in the transmission of cucumber mosaic virus and potato virus Y to peppers. Ann Appl Biol 106: 451–460
27. Raccah B, Huet H, Blanc S (2001) Potyviruses. In: Harris KF, Smith OP, Duffus JE (eds) Virus-insect-plant interactions. Academic Press, New York, pp 181–206
28. Roudet-Tavert G, German-Ratana S, Delaunay T, Dellecole B, Candresse T, LeGall O (2002) Interaction between potyvirus helper component-proteinase and capsid protein in infected plants. J Gen Virol 83: 1765–1770

29. Ryden K, Brishammar S, Sigvald R (1983) The infection of potato virus Y0 and the occurrence of winged aphids in potato fields in Sweden. Potato Res 26: 229–235
30. Sako N, Ogata K (1981) Different helper factors associated with aphid transmission of some potyviruses. Virology 112: 762–765
31. Sako N, Yoshioka K, Eguchi K (1984) Mediation of helper component in aphid transmission of some potyviruses. Ann Phytopathol Soc Japan 50: 515–521
32. Shukla DD,Ward CW (1989) Identification and classification of potyviruses on the basis of coat protein sequence data and serology. Brief review. Arch Virol 106: 171–200
33. Sigvald R (1984) The relative efficiency of some aphid species as vectors of potato virus Y0 (PVY0). Potato Res 27: 285–290
34. Taylor CE, Robertson VM (1974) Electron microscopy evidence for the association of tobacco severe etch virus with the maxillae of *Myzus persciae* (Sulz). J Phytopathol 80: 257–266
35. Thornbury DW, Patterson CA, Dessens JT, Pirone TP (1990) Comparative sequence of the helper component (HC) region of potato virus Y and a HC-defective strain, potato virus C. Virology 178: 573–578
36. Wang RY, Ammar ED, Thornbury DW, Lopez-Moya JJ, Pirone TP (1996) Loss of potyvirus transmissibility and helper component activity correlates with non-retention of virions in aphid stylets. J Gen Virol 77: 861–867
37. Wang RY, Powell G, Hardie J, Pirone TP (1998) Role of the helper component in vector-specific transmission of potyviruses. J Gen Virol 79: 1519–1524
38. Wang RY, Pirone TP (1999) Purification and characterization of turnip mosaic virus helper component protein. Phytopathology 89: 564–567

Author's address: Prof. B. Raccah, Department of Virology, The Volcani Center, Bet Dagan, Israel; e-mail: braccah@agri.gov.il

3.3. בידוד cDNA וגנים לחלבונים קוטיקולריים מכנימת העלה *Myzus persicae*.

בוירוסים חולפים, מקובל להניח שהוירוסים נישאים בחלל של צינור המזון בחדק הכנימה (ראה פירוט בסקירת הספרות). פני שטח (surface) של חלל צינור המזון עשוי מקוטיקולה המורכבת מסיבי כיטין השקועים בחלבונים קוטיקולריים. כיטין ושעוות הנם מרכיבים לא ייחודיים והרכבם כמעט זהה בחרקים שונים. לעומתם, הח״ק הנם מרכיב ייחודי המקודד ע״י סוגים ומינים שונים של חרקים. יתרה מזאת, ידועים גם ח״ק הייחודיים לדרגת התפתחות מסוימת (Stage specific) של החרק (Chihara *et al.,* 1982; Marcu & Locke., 1998; Csikos *et al.,* 1999). בשל ההבדלים הקיימים בין מינים שונים של כנימות עלה בהעברה של וירוסים שונים, **השערת המוצא שלנו הייתה שאם הקוטיקולה מעורבת בקישור הוירוס לחדק, הרי מבין כל מרכיביה, לחלבונים הקוטיקולריים (ח״ק) יש הסבירות הגבוהה ביותר לייחודיות זו.**

במרוצת השנים, הצטבר ידע רב על ח״ק וגנים המקדדים ל- ח״ק בחרקים שונים המשתייכים לסדרות: Orthoptera, Lepidoptera, Diptera , Dictyoptera ו- Coleoptera כפי שתואר ביתר הרחבה בסקירת הספרות לעומתם, **בחרקים המשתייכים לסדרת ה- Hemiptera וכנימות עלה בפרט לא קיים כל מידע קודם בתחום זה.**

המאמר בסעיף 3.1 מתאר לראשונה בידוד cDNA מהכנימה *M. persicae* המקודד ליצירת החלבון הקוטיקולרי הראשון שזוהה בכנימות עלה (*M. persicae* Cuticle Protein 1 (MpCP1 ו - cDNA הומולוגים מחמישה מיני כנימות עלה נוספים (Dombrovsky *et al*., 2003).

פרק זה של העבודה, מהווה המשך לחלק הראשון ומספק הרחבה והעמקה משמעותית של הידע בתחום הגנים לח״ק בכנימות עלה.

3.3.1. הכנת ספריות cDNA בטכנולוגיה של SMART מכנימות עלה:

המאמר הראשון היה מבוסס על הכנת ספריית cDNA בטכנולוגיה של λ-ZAP. מספרייה זו בודד cDNA המקודד לח״ק הראשון בכנימות עלה (Dombrovsky *et al*., 2003). ספרייה זו, לא אפשרה בידוד cDNA נוספים המקודדים לח״ק נוספים בכנימת העלה, יתכן והספרייה איננה מייצגת את מלוא הפוטנציאל הגנומי של כנימת העלה.

במטרה להרחיב את הידע על רצפי cDNA המקודדים לח״ק נוספים בכנימות עלה, היה צורך להכין ספריות cDNA נוספות, הפעם בשיטה של SMART (ראה סעיף 2.14 בפרק שיטות וחומרים). שיטה זו נמצאה עדיפה בשל העובדה כי ניתן לקבל ייצוג טוב יותר של הפוטנציאל הגנומי בספריית ה-cDNA וניתן לקבל אורך מלא של מקטעי ה- cDNA השונים כולל האזורים שאינם מקדדים לחלבון 3'UTR ו- 5'UTR. הספריות הוכנו לא רק מהכנימה *M. persicae* אלא גם ממיני כנימות עלה נוספים. בטבלה מס' 6, מפורטים מאפייני ספריות ה- cDNA שהוכנו ממיני כנימות העלה השונות: הוכנו שלוש ספריות מכנימת העלה *M. persicae*: הראשונה, מכנימות שלמות המרוכבות מדרגות התפתחות שונות (M). השנייה, מזחלים בדרגה ראשונה (I) והספרייה השלישית, מראשים מופרדים של הכנימה *M. persicae* (H).

כמו כן, הוכנה ספריות (אחת מכל מין כנימה) מכנימות שלמות בתערובת דרגות ההתפתחות של הכנימה *A. gossypii*, ומכנימת העלה, *B. brassicae*.

טבלה מספר 6. מאפייני ספריות ה- cDNA השונות.

מין הכנימה	ספרייה	טיטר pfu/ml		זיהוי של גנים מיצגים					
		לפני הגברה	אחרי הגברה	**Tro***	Myo	**Cat***	CP1	GST	Ker
M. persicae	I	$2*10^4$	$5*10^{12}$	√	√	√	√	√	√
M. persicae	H	$2*10^5$	$8*10^{10}$	√	√	√	√	√	
M. persicae	M	$6*10^5$	$6*10^{10}$	√	√	√	√	√	
A. gossypii	M	$4*10^5$	$2*10^9$	√			√		√
B. brassicae	M	$1.5*10^6$	$2*10^{10}$	√	√		√		√

pfu = plaques forming units ; I= זחלים בדרגה ראשונה. H = ראשי כנימה מופרדים.

M = כנימות שלמות בדרגות ההתפתחות השונות.

שמות הגנים המיצגים: Myo = Myosin heavy chain ; GST = glutation S transferase; ;

Cat = Cathepsin ; CP1= Cuticle protein 1; Ker = Keratin associate protein; Tro= Tropomyosin.

*גנים שבודדו מספריית ה- cDNA של הכנימה *M. persicae* והופקדו בבנק הגנים GenBank:

Cathepsin B-N מספר גישה AY702822. Tropomyosin מספר גישה AY714063.

3.3.2. בידוד cDNA לחלבונים קוטיקולריים חדשים מכנימת העלה *Myzus persicae*:

סריקת ספריות ה- cDNA של כנימת העלה *M. persicae*, באמצעות תחלים שונים בריאקציות PCR אפשרה בידוד חמישה רצפים של cDNA המשוערים (putative) כמקודדים ליצירת ח״ק חדשים. רצף החלבון החזוי מכ״א מן הרצפים הנ״ל אפשר את השוואתם לרצפים של חלבונים קוטיקולריים ידועים המצויים בבנק הגנים (GenBank) באמצעות תוכנת החיפוש BLAST. השוואה זו, הראתה כי הח״ק החזויים מכילים רצפים שמורים הידועים בח״ק מסוגים שונים, סיווג הח״ק החזויים בכנימות התאפשר בשל זיהוי רצף ח׳ האמינו של האתר השמור מסוג R&R הייחודי בח״ק ודפוס הרצפים החוזרים (repetitive region), ראה סעיף מס׳ 1.7.1 בסקירת הספרות. במהלך העבודה, בודדו שני רצפי cDNA החזויים כמקודדים לח״ק בעלי אתר שמור מן הסוג RR-2. רצפים אלו כונו *M. persicae Cuticle Protein 2* (MpCP2) ו- *M. persicae Cuticle Protein 3* (MpCP3) ראה תמונות מס׳ 11 ו- 12. כמו כן, בודדו שני רצפי cDNA נוספים החזויים כמקודדים לח״ק בעלי אתר שמור מן הסוג RR-1. רצפים אלו כונו בשם: *M. persicae Cuticle Protein 4* (MpCP4) ו- *M. persicae Cuticle Protein 5* (MpCP5) ראה תמונות מס׳ 13 ו- 14. האתר השמור מסוג RR-2 מצוי בד״כ בקוטיקולה קשיחה בחרקים אחרים בעוד שהאתר מסוג RR-1 מצוי בקוטיקולה גמישה. רצף cDNA נוסף *M. persicae putative Cuticle Protein* (MppCP) חזוי כמקודד לח״ק המכיל רצף חוזר של ח׳ אמינו הזהה לרצפים הידועים בח״ק בחרקים שונים. היות והחלבון חסר את רצף האתר השמור מסוג R&R, תמונה מס׳ 15, הערכתנו היא כי החלבון משתייך לטיפוס של ח״ק חסרי R&R.

בעמודים הבאים, מצורפים רצפי ה- cDNA המקדדים לחלבונים הקוטיקולריים השונים שבודדו מכנימת העלה *M. persicae*.

מפתח הסימונים והקיצורים המופיעים ע״ג או בצמוד אל כ״א מהרצפים מפורט בנספח המצורף בסוף העבודה.

```
1      ATC ACA ATC AAT CAC TTC AAA CAG TAC TAC TAC AAC CAG TAG AAG    45
46     AAG TAT TCG ATT CAC AGA CTC AAC AAC CTC TTC AAC ATG AAG GTA    90
                                                  1 M   K   V      3
91     TTC ATC ATT CTG CCG TTA GTA GTT GCC ATG ATT TCA GCA ACC GAC   135
4       F   I   I   L   P   L   V   V   A   M   I   S   A + T   D     18
136    GTA GTC TTA ACC GGT GCA CCC GCG GCA TAC GTT GCG TCT TCG TAC   180
19      V   V   L   T   G   A   P   A   A   Y   V   A   S   S   Y     33

181    ACG TCG CAC GGA CCA GTC CCT TGG GCT TAT CTG CAA CCG TAC TAC   225
34      T   S   H   G   P   V   P   W   A   Y   L   Q   P   Y   Y     48

226    CAA TCA GCA CCG TTA GTG GCA TAC ACG GCA TAC ACA GCA CCA GCG   270
49      Q   S   A   P   L   V   A   Y   T   A   Y   T   A   P   A     63

271    GCC AAA GTT ATC GCC ACT GCC CCG GCT AAA ATC GTT ACA CCA CCA   315
64      A   K   V   I   A   T   A   P   A   K   I   V   T   P   P     78

316    GCC AGA ACC GTT CCT GTC GCC GTG GCC CCA GCA AAA CTT GTC GCA   360
79      A   R   T   V   P   V   A   V   A   P   A   K   L   V   A     93

361    CCG GCT GTA CCG GTC GCC AAA GTC GTA CAA GTC GTG CCC GCT CAA   405
94      P   A   V   P   V   A   K   V   V   Q   V   V   P   A   Q    108

406    TTC CAG CCC GAC CCA TCA TAC ACA TTC GCG TAC CAG GTA CAG GAT   450
109     F   Q   P   D   P   S   Y   T   F   A   Y   Q   V   Q   D    123

451    CAG ATA ACT GGC GAC TCC AAG AGC CAA GAG GAA ACC CGC CAA GGA   495
124     Q   I   T   G   D   S   K   S   Q   E   E   T   R   Q   G    138

496    GAT GTC GTC AAG GGC CGA TAC AGT CTG ATC GAA CCC GAT GGC ACC   540
139     D   V   V   K   G   R   Y   S   L   I   E   P   D   G   T    153

541    AGG AGA ACC GTA GAC TAC ACC GCT GAC CCA ACA AAC GGA TTC AAC   585
154     R   R   T   V   D   Y   T   A   D   P   T   N   G   F   N    168

586    GCG TAC GTA CAG AAA TCG GAT GTG CAA CAA GCC GTA TTC GTA CCA   630
169     A   Y   V   Q   K   S   D   V   Q   Q   A   V   F   V   P    183

631    TCG GTA TCA ACA GAC GAT GTA GAA ACT ATC AAA GTA GAC ACC ATC   675
184     S   V   S   T   D   D   V   E   T   I   K   V   D   T   I    198

676    GAA GTT GAA CAA GCC AGG TAT GCG CCC TCA GGC TCC AAA CCG TTG   720
199     E   V   E   Q   A   R   Y   A   P   S   G   S   K   P   L    213
721    AAG AAT ACG CTA GCT GTG CCC GAA ACC AAG ACC AAA ACA GGT TAT   765

214     K   N   T   L   A   V   P   E   T   K   T   K   T   G   Y    228
766    TGA TAA ACG TTT ATT ACA ATG AAT GTA TAC TTT GCT AAA CAA AAT   810
        *   *
811    CCA ATT TAA TTT ATA ATA TAG AGT ATA GAC AGT TAT GTT ATA TCA   855
856    TTA TTC ATT ATA TAT ATA TAT ATT TAT TTA TTC AAA TAA CAA TCT   900
901    GTA AAA CAA AAC AAA AAC CCA AAT AAA GTT AAT TTA TAT ATT TAT   945
946    AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA    969
```

תמונה מספר 11. רצף הבסיסים ב- cDNA של *MpCP2* אשר בודד מכנימת העלה *M. persicae* ורצף חומצות האמינו הנגזר ממנו. רצפים שאינם מקודדים לחלבון מופיעים בקצוות הרצף. מספר הגישה ב- GenBank: [DQ108935].

```
1      TAC GGC CGG GAT GGT AAG CAA TCA TCT TAC CCT GCT CCG TCT GCG   45
1       Y   G   R   D   G   K   Q   S   S   Y   P   A   P   S   A    15

46     GCC TAT GAA CAA CCA AAG TAC CCT GTA TCC CAA TAC TCA GCT CCT   90
16      A   Y   E   Q   P   K   Y   P   V   S   Q   Y   S   A   P    30

91     TCA TAC GAA GCT AAG CCA CAA TCA TAT TCA GCT CCC ACT CCA TCA   135
31      S   Y   E   A   K   P   Q   S   Y   S   A   P   T   P   S    45

136    TAC AAC AAA CAA CCG TCC CAA TCC TCA TCG GCC TAC CCG TCT TAC   180
46      Y   N   K   Q   P   S   Q   S   S   S   A   Y   P   S   Y    60

181    CCA AGC CAA AAA GCT CAT GCT GAA GAG TCT TAC GCA CCA AGA CCG   225
61      P   S   Q   K   A   H   A   E   E   S   Y   A   P   R   P    75

226    TAT AAA TTT GAA TAC AGC GTA AAT GAC GAA CAT ACA TAT GGC ATC   270
76      Y   K   F   E   Y   S   V   N   D   E   H   T   Y   G   I    90

271    AAA AGC CAA AAG GAA GAA AGT GAC GGA CAT CAA GTA AAA GGA TAC   315
91      K   S   Q   K   E   E   S   D   G   H   Q   V   K   G   Y    105

316    TAC ACT TTG TTG GAA GCT GAT GGT TCC CGT AGA ACT GTC GAG TAC   360
106     Y   T   L   L   E   A   D   G   S   R   R   T   V   E   Y    120

361    ACC GCA GAT GAA AAT GGA TTC AAC GCT GAC GTG AAA AAA GAA GAA   405
121     T   A   D   E   N   G   F   N   A   D   V   K   K   E   E    135

406    GCT CAA GGT TAC AAC AAA GCA GCT CCA GCT TAC AAC AAG GAC TCC   450
136     A   Q   G   Y   N   K   A   A   P   A   Y   N   K   D   S    150

451    CAA GCA TAT AAA TCT GCA CCA GCT GCT TAC AGC GCA CCC TCA TAC   495
151     Q   A   Y   K   S   A   P   A   A   Y   S   A   P   S   Y    165

496    AAC AAA CAA GAA TCG TCA TAT AGT GCA CAA CCT TCT TAT AAC GCA   540
166     N   K   Q   E   S   S   Y   S   A   Q   P   S   Y   N   A    180

541    CCT GCG TAC AAC AAA CAA GAA TCG TCA TAC GGT GCT CCA GCC AAA   585
181     P   A   Y   N   K   Q   E   S   S   Y   G   A   P   A   K    195

586    CAA TCT CAA GAA TAC GAA GCA CCA TCG TAC TAA TTA TTT CAC TAT   630
196     Q   S   Q   E   Y   E   A   P   S   Y   *  205

631    TTA TCA ACT ATG ATA TAA AGT GAA ATA ATA TTA CAA CTC AAC TTC   675
676    AAA TAC TAA ATT ATA AAT GTT GCA ACT TAA CTG TTA TGC TCT TTT   720
721    AAA TGT TTA AAT AAG AGT ACA AAA GAT TAT TAT TTG TAT TGC TTT   765
766    TTG AAT AAT AAT GTG ATT TAA AAA TCT ACC ATC ATA TTT GAA TTT   810
811    TAA TAA ATA TAT GTT ATT ACC AAA AAA AAA AAA AAA   846
```

תמונה מספר 12. רצף הבסיסים ב- cDNA של *MpCP3* אשר בודד מהכנימה *M. persicae* ורצף חומצות האמינו הנגזר ממנו. רצפים שאינם מקודדים לחלבון מופיעים בקצוות הרצף. מספר הגישה ב- GenBank: [DQ108936].

```
1      GCC GGG GAA TCA CAA ACA CAT CGC ACT CCG AAG AGC GAG TAC TAC   45
46     AGA CAG ACA CAA ACG AAG AAC AAA AAC TCC TTC AAC ATG CAG GTC   90
                                                     1 M   Q   V   3

91     ACA TTT GTC GTA TCG TCA TTG CTG TTA GCT GCC GTC GCA GTC AGC   135
 4      T   F   V   V   S   S   L   L   L   A   A   V   A   V   S    18

136    GCC TAC CCC GCT GGA CAG AGC CCG GAA TCC AGA GCC GTC ATC TTG   180
 19     A + Y   P   A   G   Q   S   P   E   S   R   A   V   I   L    33

181    GTC CAA GAT TCA GCA CCC AGC GCC GAC GGA TCA TTG AAG AAC AAC   225
 34     V   Q   D   S   A   P   S   A   D   G   S   L   K   N   N    48

226    TTC CAA ACC GAT AAC GGA ATC AAA CAA GAA GAA GTC AGG TAC TTG   270
 49     F   Q   T   D   N   G   I   K   Q   E   E   V   R   Y   L    63

271    AAG GCT GGC CCA GAA GGA CCC GTT TCA GTT GTC CAA GGA GCA GTG   315
 64     K   A   G   P   E   G   P   V   S   V   V   Q   G   A   V    78

316    TCT TAC GTG GCC CCA GAC GGC CAG ACC ATC CAA ACC GGC TAC GTC   360
 79     S   Y   V   A   P   D   G   Q   T   I   Q   T   G   Y   V    93

361    GCC GAC GAG AAC GGT TAC CAG CCG TAC GGC GCT CAC TTG CCC ACT   405
 94     A   D   E   N   G   Y   Q   P   Y   G   A   H   L   P   T    108

406    CCA CCA GCA ATC CCA TTC GAG ATC CAA GAG TCA CTC AGA TAC CTC   450
109     P   P   A   I   P   F   E   I   Q   E   S   L   R   Y   L    123

451    GCT TCT CTG CCC AGC ACT CCT GAA CCA AAA TAC CAG TAA GAC GGT   495
124     A   S   L   P   S   T   P   E   P   K   Y   Q   * 135

496    GAG CAC GCA GTG ACC ACC CCG GCC CGG TTT ATC CTC AAT TTT ATA   540
541    CCT ATA CCT AAT ATA CAT TAT ACC TAC CCC TCG AAA TGA TTA TCT   585
586    GCC ACA CGT TTA AAG CAT AAA CAT TGT AAC AAT GTT TAT GGT TTA   630
631    AAA GGC GGT TTC CAA AAG CCA ACA CTA TAC TTC TGT TAT TGG GTA   675
676    TAT TAA TGT TCT TCT ACT GCT CTC CTG TCC GTT TAC CTA TAA AGT   720
721    ATA ATA TAC ATA ATA ATG ATA TGT TAC CAT GAT CTC GTC ATT GCG   765
766    AAT TGT TGT CGA TGG CGA TGA CAT TAT ATT ATA TAA TTA TAC TAT   810
811    ATT TTA TTC TTT TAT TAC TTC ATC TCC GTC TTA TGT GCG GTT ATA   855
856    TAT TAT AAT CGT CAC ACA CGT ACA AGC GTG TAA TAT ATA ATA TAA   900
901    TAA ATC GTA TTA TGC AAA AAA AAA AAA AAA   930
```

תמונה מספר 13. רצף הבסיסים ב- cDNA של *MpCP4* אשר בודד מהכנימה *M. persicae* ורצף חומצות האמינו הנגזר ממנו. רצפים שאינם מקודדים לחלבון מופיעים בקצוות הרצף. מספר הגישה ב- GenBank: [DQ108938].

```
1       GGC ATC AGT TGT GTC ATC TGT CCA CAT CCC AAC ATA CGG CAA TTT    45
46      TCT GAT CAC GGT ACA CGT CCC AAA AAA ATC ATC ATG AAC ACT TTG    90
                                                 1 M   N   T   L     4
91      GTA GTG TTA GTA GCT GTC GTC GCA GCA GTG GCT GCC GCC CCG CCT    135
5        V   V   L   V   A   V   V   A   A   V   A   A + A   P   P     19
136     AAG GAA GCT GCC AAG GCT TTC ACT TTC AGT GGA TTC CCA TCC AAC    180
20       K   E   A   A   K   A   F   T   F   S   G   F   P   S   N     34
181     CAG GCC TAC TAC CCA GGT CAA CAA GCC TAC TAC CCA GGA TAC CAA    225
35       Q   A   Y   Y   P   G   Q   Q   A   Y   Y   P   G   Y   Q     49

226     GGT TAC CAG GGT TAC CAA GGT TAC TCC GGA TTC CGT AAC GGA TAC    270
50       G   Y   Q   G   Y   Q   G   Y   S   G   F   R   N   G   Y     64

271     TAC CCA GGA CAA CAA GGT TAC TAC CCA GGA TAC CAA GGT TAC CAG    315
65       Y   P   G   Q   Q   G   Y   Y   P   G   Y   Q   G   Y   Q     79

316     GGC TAC TAC CCA GGA TAC CAA ACT GGA TAC CAA GGC TAC TAC CCA    360
80       G   Y   Y   P   G   Y   Q   T   G   Y   Q   G   Y   Y   P     94

361     GGA TAC CAA GGT TAC AAC CGT GGT TAC TAC CCA GGT GCC CCA GCC    405
95       G   Y   Q   G   Y   N   R   G   Y   Y   P   G   A   P   A     109

406     GTC TAC CCC GCC GTC GGT GCC GTC ACC CCA GCC CCG ATC ATC GCA    450
110      V   Y   P   A   V   G   A   V   T   P   A   P   I   I   A     124

451     CCT GTG CCA GTC GTA CCC AAG GTT GTT TCT CCA GTG TAC AAA CCA    495
125      P   V   P   V   V   P   K   V   V   S   P   V   Y   K   P     139

496     GTA GAC AAC AAA TTG CCA GCT ATC ATC AGA CAA TCC CAA GAA GCT    540
140      V   D   N   K   L   P   A   I   I   R   Q   S   Q   E   A     154

541     GAC GTG AAC GGA TTC AAA TAC GGA TTC GGA ACC GAA AAC GGT ATC    585
155      D   V   N   G   F   K   Y   G   F   G   T   E   N   G   I     169

586     GTC GCC CAG GCC GCC GGA TAC GTG AAG AAC GCC GGA TCA GAA AAC    630
170      V   A   Q   A   A   G   Y   V   K   N   A   G   S   E   N     184

631     GCC GCC CAA GTG ATC GAA GGC TCT TAC TCC TAC GTT GGT GAC GAT    675
185      A   A   Q   V   I   E   G   S   Y   S   Y   V   G   D   D     199

676     GGT GCT CCA GTC GAA GTC AAG TAC TAC GCC GAC GAG ACC GGT TAC    720
200      G   A   P   V   E   V   K   Y   Y   A   D   E   T   G   Y     214
721     CAC GCA GTC GGA AAC GTC GTC CCG ACC ATC CCC TCA GAA ATC GCC    765
215      H   A   V   G   N   V   V   P   T   I   P   S   E   I   A     229
766     AAG TCT TTG GAA TTG ATC GCC TCC CAA CCA CAG AAA CCA GAA GAC    810
230      K   S   L   E   L   I   A   S   Q   P   Q   K   P   E   D     244
811     TCC AAA AAG AAG TAA ACC CAG CCC GCA TGT AAC CTG AAA CGG CCC    855
245      S   K   K   K   *  248
856     AAA CAC TCG TAT ACC ATT AGC TAT TAG ACA CTG CGT GAG AAA TCA    900
901     TGC ACA TAT TTT TAC CAT TGC AAA TAT TGT GTT TGC AGT GAT TTT    945
946     CGT TAT TCG TAT CTG AAA GAC GAA TAT CGA CAC ATT TAC TGT ACA    990
991     CAA TAA TTC AGT TAT GTT GGA TGT AAC AAA AAA AGA TGA AAA TAT   1035
1036    AAA AAC TTG AAG TTC AAA AAA AAA AAA AAA   1065
```

תמונה מספר 14. רצף הבסיסים ב- cDNA של *MpCP5* אשר בודד מהכנימה *M. persicae* ורצף חומצות האמינו הנגזר ממנו. רצפים שאינם מקודדים לחלבון מופיעים בקצוות הרצף. מספר הגישה ב- GenBank: [DQ108939].

רצף cDNA של *MppCp* אשר בודד מהכנימה *M. persicae* חיזוי רצף ח' האמינו בחלבון הראה כי הוא חסר את האתר מסוג R&R, אך מראה זהות ברצף ח' האמינו לאלו של החי"ק MpCP1 ולחי"ק נוספים הידועים בחרקים אחרים.

```
1      CAC ACC ACA TCC CGA GTA CAC ATC GAC AAC CAC AGG TTG AAG TTT   45
46     GCA GAT CAG TCG TAG ACA ACA CAA GAA GAA ATC ACC AAA ACA GAA   90
91     ATG GCT TCT TTC AAG TAT CTG ATA TTC ATC GCC TTG ACC GTC CTC   135
1       M   A   S   F   K   Y   L   I   F   I   A   L   T   V   L   15

136    AGC GTG TAC TAT GCC GCT GCC CAA GAA TCA CCA AAA GTC GAA GAA   180
16      S   V   Y   Y   A   A   A + Q   E   S   P   K   V   E   E   30

181    CAA GTT GGC GCT GAA GCC GCC AGA GTA AAG AAA CAC GCT TAC ATC   225
31      Q   V   G   A   E   A   A   R   V   K   K   H   A   Y   I   45

226    GCC GCC CCA GCT TTG GCC TAC TCC GCT CCA GTC TAC CCA TAC GCC   270
46      A   A   P   A   L   A   Y   S   A   P   V   Y   P   Y   A   60

271    TAC TCG GCT TAC CCG TAC TCG TAC TCG TAC CCG GCC GCA TAC CCA   315
61      Y   S   A   Y   P   Y   S   Y   S   Y   P   A   A   Y   P   75

316    ACT GCT TAC GCC GCT TAC CCA AGC TAC GCT TAC GCT CAC GAT GAC   360
76      T   A   Y   A   A   Y   P   S   Y   A   Y   A   H   D   D   90

361    GGC AAG TAC TGG CCA GGC AAA TAC GAA AAG ACT TAC TAC CCA GCT   405
91      G   K   Y   W   P   G   K   Y   E   K   T   Y   Y   P   A   105

406    GTC CCA GCT TAC AAG TCC GCC TAC CCG GTT TAC CAC TAT TGA ACA   450
106     V   P   A   Y   K   S   A   Y   P   V   Y   H   Y   *       118

451    CGC TTT TCC GAC CAC GCC TTT CAA ATC TTC CGG CAA CAA ACG TAG   495
496    TTT TTA AGA TAA TTT TAT AAA ACT TTT TTA ACA ATA AAA ATG TGA   540
541    TCT TTT TTT TTC AAA AAA AAA AAA AAA AAA    570
```

תמונה מספר 15. רצף הבסיסים ב- cDNA של *MppCP* אשר בודד מהכנימה *M. persicae* ורצף חומצות האמינו הנגזר ממנו. רצפים שאינם מקודדים לחלבון מופיעים בקצוות הרצף. מספר הגישה ב- GenBank: [DQ108937].

3.3.3. מאפיינים של רצפי ה- cDNA המשוערים כמקודדים לחלבונים קוטיקולריים בכנימה *Myzus persicae*:

ברצפים של ה- cDNA המשוערים (putative) כמקודדים לחי"ק שונים בכנימות עלה, זוהו אזורים לא מקודדים: ה- 5'UTR ו- 3'UTR ב- cDNA, אך בשל הטכניקה בה נעשה שימוש לבידוד 5'UTR ברצפים השונים שבודדו מספריית ה- cDNA, יש להניח כי לא בהכרח מצוי בידנו הרצף המלא של

כ״א מן ה- cDNA השונים. לעומת זאת, רצף 3' UTR בודד במלואו, החל מן הקודון המקודד לסוף התרגום ועד הרצף המקודד ל- Poly A signal. חיזוי הימצאות ומיקום אתרי חיתוך cleavage sites ל- Signal peptide (SP) נעשה באמצעות התוכנה המתאימה (ראה פרק שיטות וחומרים, סעיף 2.13). השוואת הרצף המתקבל לרצפים של ח״ק ידועים בחרקים אחרים אפשר להסיק כי רצף ה- DNA שבודד מכנימות העלה מייצג חלבון חזוי מושלם (מלבד הרצף ל- MpCP3). מיקום אתר חיתוך ל- SP, אותר לאחר 16-22 ח׳ אמינו חזויות מתחילת התרגום (המתיונין הראשון) בסבירות (probability) גבוהה. סיכום המאפיינים של רצפי ה- cDNA השונים מוצג בטבלה מס׳ 7.

טבלה מספר 7. מאפייני רצף החלבונים הקוטיקולריים השונים בכנימה *Myzus persicae*.

	5' UTR	ORF	Start ATG	Sp	N terminal repeats	R&R type	C terminal repeats	3' UTR	Amino acid	Mw
Protein	nts	nts	nts	No. of aa				nts	No.	kDa
MpCP1	72	678	73	18	(S/A)APAY	RR-2	(A/S/K)APAY	122	226	23.41
MpCP2	81	684	82	16	APA	RR-2		180	228	24.3
MpCP3	?	615	?	?	YSAP	RR-2	P(A/S)YNK	216	205	*22.7
MpCP4	81	405	82	19	/	RR-1	/	429	135	14.2
MpCP5	78	744	78	16	AYYP; GYQ GQQ ; GYYP	RR-1		228	248	26.49
MpCP?	90	354	91	22	AAPA, YP(A/Y)(A/Y)	No		125	118	13.2

(Sp), Signal peptide. (Mw), Molecular weight; סיכום מאפייני הרצפים השונים המפורטים בתמונות 11-15. חיזוי מיקום Signal peptide נעשה באמצעות תוכנה SignalP 3.0. קביעת משקל מולקולארי, איתור מסגרת הקריאה ORF וקביעת רצף חומצות האמינו החזוי נעשה באמצעות תוכנות DNAMAN ו- BioEdit. * הרצף איננו שלם במלואו.

3.3.4. השוואת רצף חומצות האמינו החזוי של החלבונים הקוטיקולריים מהכנימה *Myzus persicae*:

השוואת הרצפים של ה- cDNA השונים החזויים כמקודדים לחלבונים קוטיקולריים נעשתה באמצעות שימוש בתוכנות (ClustalW, BOXSHADE ו- MultAlin) וסיפקה מידע רב על האזורים

השמורים בח״ק. בייחוד אותרו האזור השמור R&R וטיפוס הרצפים החוזרים (בחלק מהח״ק) שעשויים להיות ייחודיים לכ״א מהחלבונים החזויים השונים. בשל ההבדלים ברצף ח׳ האמינו בח״ק החזוי מסוג RR-1 לח״ק חזוי מסוג RR-2 ההשוואה נעשתה בנפרד לכ״א משני הסוגים (RR-1 ו- RR-2). השוואת רצף ח׳ האמינו החזויות לשני הח״ק מסוג RR-1: MpCP4 ו- MpCP5 מופיעה בתמונה מס׳ 16. השוואת רצף ח׳ האמינו החזויות לשלושת הח״ק מסוג RR-2: MpCP3, MpCP2, ו- MpCP1 מופיעה בתמונה מס׳ 17.

```
MpCP4        1 MQVTFVVSSLLLAAVAVS--------------------------------
MpCP5        1 -MNTLVVLVAVVAAVAAAPPKEAAKAFTFSGFPSNQAYYPGQQAYYPGYQ
consensus    1    * **   ..****

MpCP4       19 -------------------------------AYPAGQS------------
MpCP5       50 GYQGYQGYSGFRNGYYPGQQGYYPGYQGYQGYYPGYQTGYQGYYPGYQGY
consensus   51                                 **. *.

MpCP4       26 ----------------------------------------PESRAVILVQ
MpCP5      100 NRGYYPGAPAVYPAVGAVTPAPIIAPVPVVPKVVSPVYKPVDNKLPAIIR
consensus  101                                          . .   ..
                                                      RR-1 consensus
MpCP4       36 DSAPSADGSLKNNFQTDNGIKQEEVRYLK-AGPEGPVSVVQGAVSYVAPD
MpCP5      150 QSQEADVNGFKYGFGTENGIVAQAAGYVKNAGSENAAQVIEGSYSYVGDD
consensus  151  *        *  * *.***      *.* ** *    *. *  ***. *

                    RR- 1 consensus
MpCP4       85 GQTIQTGYVADENGYQPYGAHLPTPPAIPFEIQESLRYLASLPSTPEPKY
MpCP5      200 GAPVEVKYYADETGYHAVGNVVPT---IPSEIAKSLELIASQPQKPEDSK
consensus  201 *  .   * *** **   *  .**   ** **  **  .** *  **

MpCP4      135 Q-
MpCP5      247 KK
consensus  251
```

תמונה מספר 16. השוואת רצף ח׳ האמינו החזוי בחלבונים הקוטיקולריים מסוג RR-1.

השוואת רצף ח׳ האמינו החזוי של החלבונים הקוטיקולריים MpCP4 ו- MpCP5 נעשתה באמצעות התוכנה ClustalW. הדגשת האזורים הזהים נעשתה באמצעות התוכנה BOXSHADE 3.21. בתחילת הרצף הוסף קו מודגש מעל אזור ה- Signal peptide (SP) וחץ מצביע על סופו. קו מודגש נוסף הוסף מעל רצף ח׳ האמינו של RR-1 consensus.

```
MpCP1        1 -----------------MAYMFVVIAASILATAYGSPVAAPIYAAGPAYS
MpCP2        1 MKVFIILPLVVAMISATDVVLTGAPAAYVASSYTSHGPVPWAYLQPYYQS
MpCP3        1 -----------------YGRDGKQSSYPAPSAAYEQPKYPVSQYSAPSYE
consensus    1                   . .    .. . ....  .  .  .  .. ..

MpCP1       34 AP--AYSAAPAYAAPSSYSAPS----------------------YKPAYK
MpCP2       51 APLVAYTAYTAPAAKVIATAPAKIVTPPARTVPVAVAPAKLVAPAVPVAK
MpCP3       34 AKPQSYSAPTPSYNKQPSQSSS----------------------AYPSYP
consensus   51 *.  .*.* .. ...   ....                      . * ..

                                 RR- 2 consensus
MpCP1       60 PAAYGHESYDAPAPYNFEYSVNDPHTYDVKSQSEYADGNGYVKGSYSLVE
MpCP2      101 VVQVVPAQFQPDPSYTFAYQVQDQITGDSKSQEETRQG-DVVKGRYSLIE
MpCP3       62 SQKAHAEESYAPRPYKFEYSVNDEHTYGIKSQKEESDG-HQVKGYYTLLE
consensus  101       . . .. .* *.*.*.* .*...*** *  .*   *** *.*.*

                RR- 2 consensus
MpCP1      110 PDGSTRTVEYTADDYNGFNAVVKKEGGYAAPAYSAPAYSAPAYKAPAYAA
MpCP2      150 PDGTRRTVDYTADPTNGFNAYVQKSD--VQQAVFVPSVSTDDVETIKVDT
MpCP3      111 ADGSRRTVEYTADE-NGFNADVKKEE-AQGYNKAAPAYNK-DSQAYKSAP
consensus  151 .**..***.****. ***** *.*..   . .  .*...  .  . .  .

MpCP1      160 PAYSAPAYKAPAYAAPAYSAPAYKSPSYSAPAYKAPYSAPSYSAPAYKAP
MpCP2      198 IEVEQARY-----------APSGSKPLKNTLAVPETKTKTGY--------
MpCP3      158 AAYSAPSYNK-------QESSYSAQPSYNAPAYNK--QESSYGAPAKQSQ
consensus  201  ..... *           ..    *.....*.    . ..* ...

MpCP1      210 SYSAPAYSAPAYAAPAY
MpCP2          -----------------
MpCP3      199 EYEAPSY----------
consensus  251  . .. .
```

תמונה מספר 17. השוואת רצף ח' האמינו החזוי של חלבונים הקוטיקולריים מסוג RR-2.

השוואת רצף ח' האמינו החזוי של החלבונים הקוטיקולריים MpCP1, MpCP2 ו- MpCP3 נעשתה באמצעות התוכנה ClustalW. הדגשת האזורים הזהים נעשתה באמצעות התוכנה BOXSHADE 3.21. קו מודגש הוסף מעל רצף ח' האמינו של RR-2 consensus.

RR- 2 consensus **א.**

```
RR-2   EYDxxPxYxFxYxVxDxxTGDxKSQxExRxGD-VVxGxYSLxExDGxxRTVxYTADxxNGFNAVVxxEx
MpCP1  SYDAPAPYNFEYSVNDPHTYDVKSQSEYADGNGYVKGSYSLVEPDGSTRTVEYTADDYNGFNAVVKKEG
MpCP2  QFQPDPSYTFAYQVQDQITGDSKSQEETRQGD-VVKGRYSLIEPDGTRRTVDYTADPTNGFNAYVQKSD
MpCP3  ESYAPRPYKFEYSVNDEHTYGIKSQKEESDGH-QVKGYYTLLEADGSRRTVEYTADE-NGFNADVKKEE

Aphids        Y F Y V D  T   KSQ E   G   VKG Y L  E DG  RTV YTAD  NGFNA V
consensus
```

ב.

```
                                        *   *    **      *  **  **   *

                  RR-1     GxxxYxxPDGxxxxxxYxADENG(Y/F)QPxGAHLP
RR- 1 consensus   MpCP4    GAVSYVAPDGQTIQTGYVADENG  Y   QPYGAHLP
                  MpCP5    GSYSYVGDDGAPVEVKYYADETG  Y   HAVGNVVP

                  Aphids   G  SYV  DG       Y ADE G  Y     G   P
                  consensus
```

תמונה מספר 18. השוואת רצפי הקונסנזוס של החלבונים הקוטיקולריים בכנימה *Myzus persicae*.

א. השוואת רצף ח' האמינו החזוי המהווה את אתר RR-2 בחל"ק של הכנימה *M. persicae* אל רצף ה-consensus בחרקים השונים.

ב. השוואת רצף ח' האמינו החזוי המהווה את אתר RR-1 בחל"ק של הכנימה *M. persicae* אל רצף ה-consensus בחרקים השונים.

ח' אמינו הצבועות באדום, נמצאו זהות לרצף ה- consensus הידוע בחל"ק מאותו סוג R&R: RR-1 ו-RR-2, מייצגים את רצף ה- consensus בחרקים השונים.

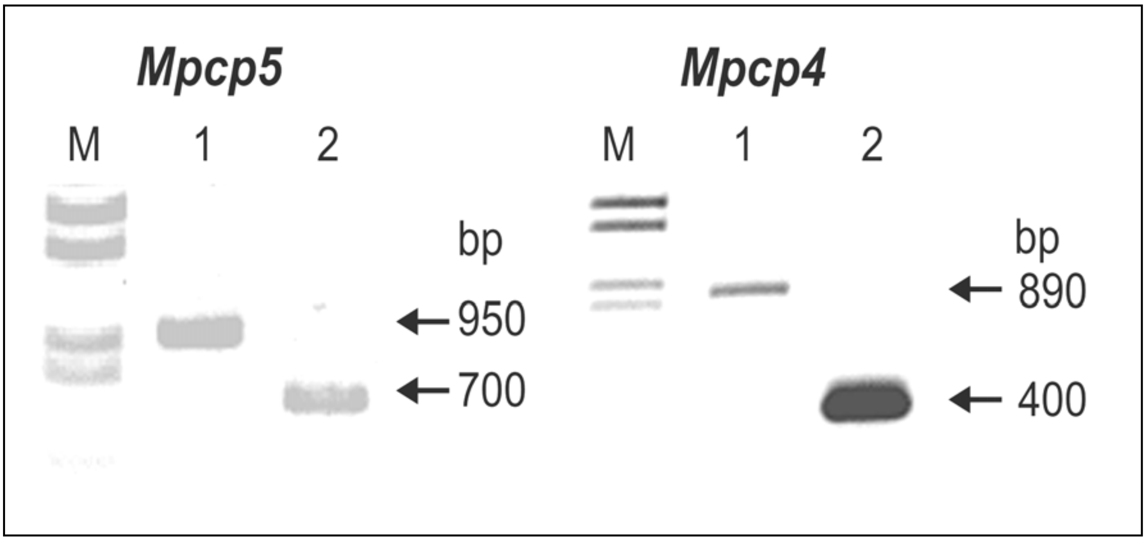
Aphids consensus, מייצג רצפים שמורים בקרב החל"ק השונים בכנימה *M. persicae*. ח' האמינו זהות בכל החל"ק מאותו סוג R&R בכנימה וזהות אל רצף ה- consensus הידוע בחרקים השונים (נצבע באדום). ח' האמינו המראות זהות רק אל החל"ק מאותו סוג R&R בכנימה (נצבע בשחור). **X, מייצג מיקום שאיננו שמור לח' אמינו מסוימת.**

* ח' אמינו אשר זוהתה כשמורה בשני סוגי אתרי ה- R&R של החל"ק בכנימה *M. persicae*.

3.3.5. בידוד גנים לחלבונים קוטיקולריים ישירות מכנימת העלה *Myzus persicae*:

בסעיפים הקודמים, התרכזה העבודה בבידוד רצפים מספריות ה- cDNA של הכנימה *M. persicae* וזיהויים כגנים פוטאטיביים (putative) לחל"ק ע"פ האזורים השמורים בהשוואה לחל"ק ידועים בחרקים אחרים. על מנת לוודא שרצפים אלו קיימים בכנימה עצמה, היה צורך לאמת את קיומם

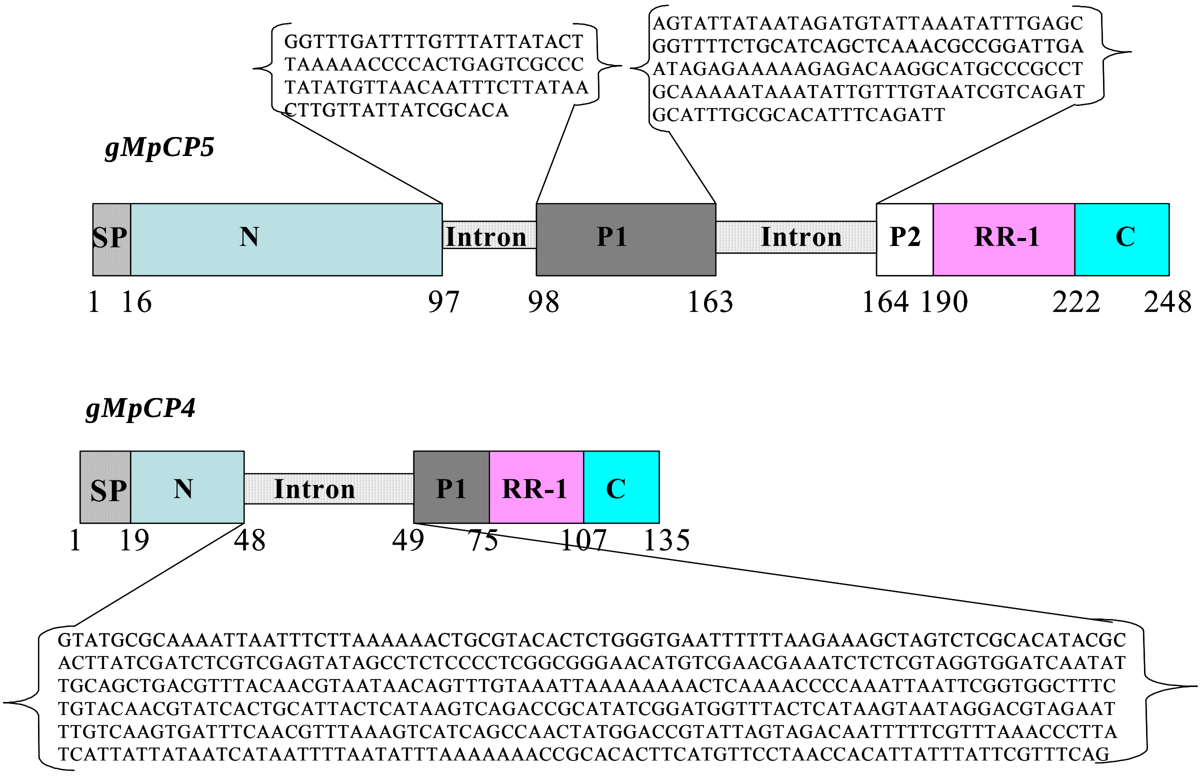
ברמת הגנום. איתור רצפי הגנים הקוטיקולריים בכנימה *M. persicae* נעשה ע״י השוואת ה- template של DNA שהופק מגנום הכנימה אל template מספריית ה- cDNA של *M. persicae* בריאקציות PCR ושימוש בתחלים ספציפיים התואמים את הקצוות בכ״א מרצפי ה- cDNA המייצגים ח״ק השונים. בתמונה 19, מוצגים תוצרי ההגברה של ה- PCR השונים אחרי ההפרדה ב- 1.1% ג׳ל אגרוז. בתמונה נראה בעליל שגודל תוצרי ההגברה עבור *MpCP4* ו- *MpCP5* כאשר נעשה שימוש ב- DNA הגנומי היה גדול מזה שנוצר על ה- template של ספריית ה- cDNA. לעומת זאת, תוצרי ההגברה של ה-DNA הגנומי ושל ה- template של מספריית ה-cDNA, היו זהים בגודלם עבור *MpCP2* ו- *MpCP3*. מההבדלים בגודל התוצרים של *MpCP4* ו- *MpCP5* על ה- template הגנומי ולאחר קביעת רצף הבסיסים, אפשר היה להקיש על קיומם של אינטרונים עבור *MpCP4* ו-*MpCP5*.



תמונה מספר 19. השוואת גודל תוצר ההגברה ב- PCR עבור רצפים של *MpCP4* ו- *MpCP5* על template של DNA גנומי לזה שהתקבל על template של ספריית ה- cDNA.
תוצרי ה- PCR הופרדו בג׳ל של 1.1% אגרוז. M, סמן גודל ל- DNA (DNA marker λ *Hind*III + *Eco*RI).
1, מיצג את תוצר ה- PCR שהתקבלו לאחר שימוש ב- template של DNA גנומי; 2, מייצג את תוצרי ה- PCR שהתקבלו לאחר שימוש ב - template של ספריית ה- cDNA.

כפי שרואים בתמונה 20 , ברצפי הגנים *MpCP4* ו- *MpCP5*, אותרו קטעים שאינם מקודדים לחלבון (אינטרונים) אשר מצויים ב- DNA הגנומי וחסרים ברצף ה- cDNA. קיומם של אינטרונים, אומת

בנוסף גם באמצעות התוכנה (NetGene2 Server) המאפשרת חיזוי אתרי החיתוך (splicing) של אינטרונים, (תמונה מסי 20). נוכחות אינטרונים אושרה רק בשני הגנים *gMpCP4* ו- *gMpCP5* המשתייכים לח"ק מסוג RR-1: ברצף הגן *gMpCP4* זוהה אינטרון אחד בגודל של 472bp, הקוטע את הגן באזור המקודד לחי אמינו מסי 48 בקצה ה- N של החלבון. ברצף הגן *gMpCP5* זוהו שני אינטרונים קטנים בגודל של 85bp ו- 149bp. אינטרון ראשון, הקוטע את הגן באזור המקודד לחי אמינו מסי 97 בקצה ה- N של החלבון. אינטרון שני, קוטע את הגן באזור המקודד לחי אמינו מסי 163 במרכז החלבון, כ- 100 בסיסים לפני האזור המקודד לרצף RR-1 השמור בח"ק.



תמונה מספר 20. סכימה כללית לתיאור מבנה הגנים הקוטיקולריים *gMpCP4* ו- *gMpCP5*.
SP מייצג את אזור ה- Signal Peptide; N מייצג את הקצה ה- N בחלבון הקוטיקולרי; P1 ו- P2 מייצגים אזורים ייחודיים לכל אחד מן החלבונים המתורגמים מן הגנים הנ"ל; RR-1 מיצג את האזור השמור בחלבונים קוטיקולריים (מעורב בקישורם אל הכיטין). C מייצג את הקצה ה- C בחלבון. רצף האינטרונים ומיקומו מצוין בסכימה. (מספרי הגישה לשני הגנים הנ"ל בבנק הגנים הוא: [DQ223895] ל- *gMpCP4* ו- [DQ223896] ל- *gMpCP5*.

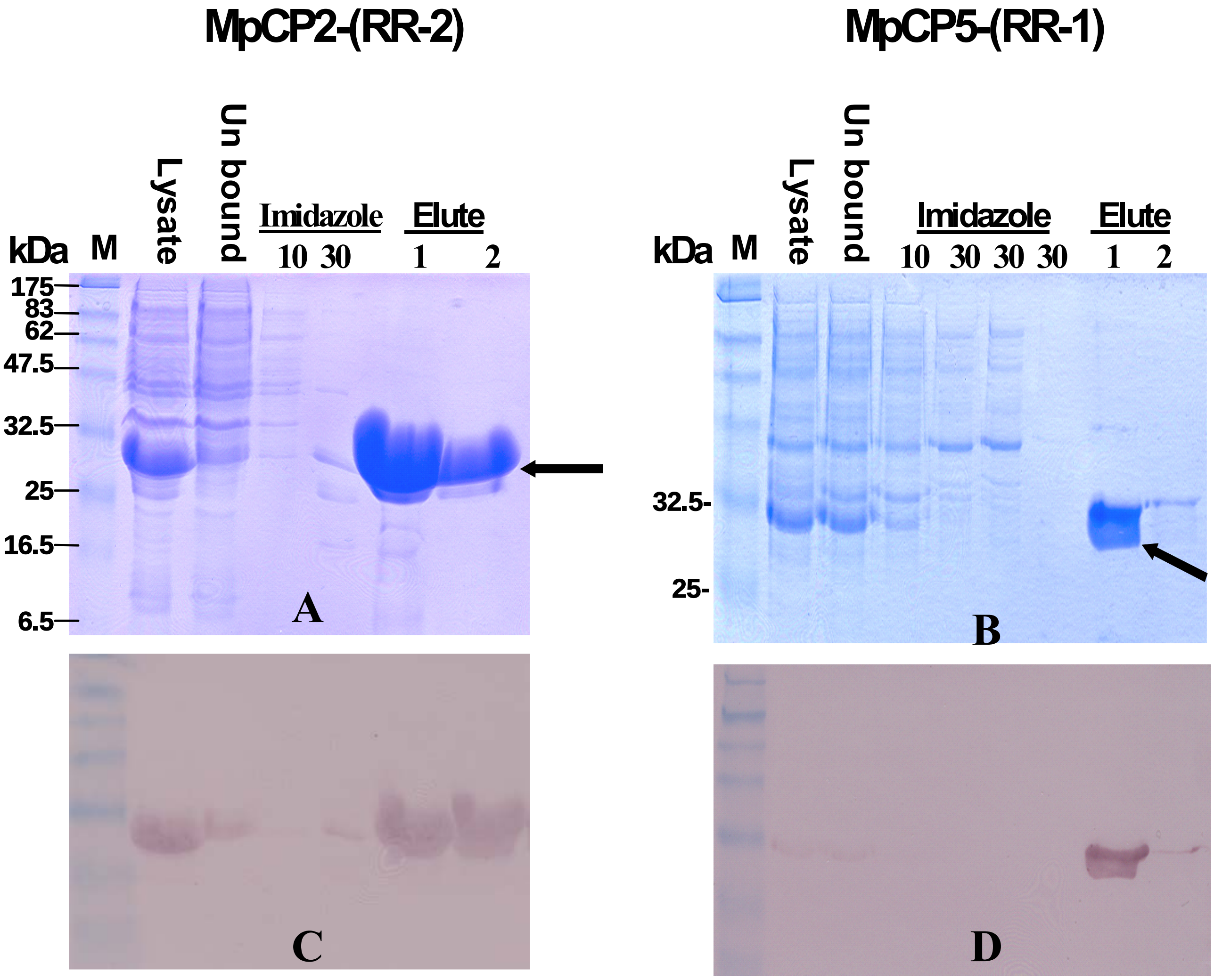
העובדה שרצפים שמקורם בספריית ה-cDNA של הכנימה *M. persicae* אפשרו דלייה של גנים מ-DNA גנומי של הכנימה מאפשרת לראשונה, קביעה שרצפים אלו אינם משוערים והם אכן גנים לחלבונים קוטיקולריים בכנימות עלה.

3.3.6. ביטוי חלבונים קוטיקולריים של כנימת העלה *Myzus persicae* בחיידקי *Escherichia coli*:

אישור קיומם של גנים לחלבונים קוטיקולריים אשר התאפשר בסעיף הקודם, אפשר את ביטויים בחיידקים במטרה לקבל את החלבון עצמו (ראה סעיף 2.16). חלבון קוטיקולרי שהושג בדרך זו, מאפשר להשתמש בו כאנטיגן להכנת נוגדנים ספציפיים כנגד ח״ק של הכנימה *M. persicae*, דבר שלא היה קיים עד כה. נוגדנים כנגד שני סוגי החי״ק MpCP2 (עם אתר שמור RR-1) ו- MpCP5 (עם אתר שמור RR-2) יכולים לשמש לזיהוי ספציפי של ח״ק מכנימות עלה.

לצורך ניקוי וזיהוי, שולבו בגנים לח״ק 6 שיירי היסטידין. נוכחות ההיסטידין אפשרה ניקוי של החלבונים שבוטאו בחיידקים משאר חלבוני החיידק בכרומטוגרפיה של זיקה אל Ni-NTA (ראה סעיף 2.17). בתמונה מס׳ 21 (A, B, C , D) מוצגים הח״ק אשר בוטאו בחיידקים כמתואר בסעיף 2.16, נוקו מחלבוני החיידק 2.17 בשיטה של Ni-NTA והופרדו ב- SDS-PAGE. זיהוי ספציפי של הח״ק במיצוי החיידקים (Lysate) לאחר אינדוקציה עם IPTG מוצג בתמונות 21C ו- 21D, נעשה באמצעות שימוש בנוגדן חד-שבטי המזהה שיירי היסטידין בקצה ה- C של הח״ק באנליזה של western blot. הח״ק (MpCP2 ו- MpCP5) לאחר ניקויים מחלבוני החיידק והפרדתם ב- SDS-PAGE מוצגים בערוצים Elute 1 ו- Elute 2.

שני הח״ק שהתקבלו בביטוי (MpCP2 ו- MpCP5) נשלחו לקביעת רצף ח׳ האמינו בשיטה של LC-MS/MS (ראה סעיף 2.9), רצף ח׳ האמינו שהתקבל אישש את זהותם של החלבונים המבוטאים בחיידקים כחלבונים קוטיקולריים.



תמונה מספר 21. הפרדה של החלבונים הקוטיקולריים מהכנימה *M. persicae* המבוטאים בחיידקי *Escherichia coli* מחלבוני החיידקיים.

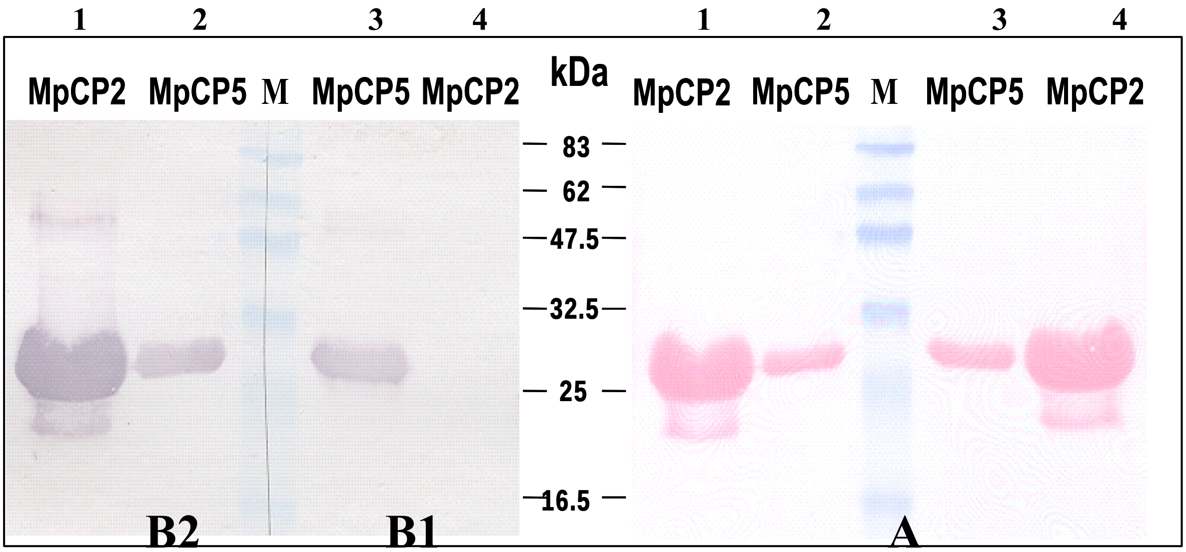
M מייצג סמן גודל לחלבונים; Lysate מייצג את כלל חלבוני החיידק לאחר אינדוקציה עם IPTG; Un-bound מייצג את החלבונים שלא נקשרו ל-Ni-NTA; Imidazole מייצג את פרופיל החלבונים לאחר דחיקה בשני ריכוזים של אימידזול; Elute מייצג את החי"ק המשוחררים מן ה- Ni-NTA בשתי האלוציות.

A ו- B, מציגים את הג'לים לאחר ההפרדה וצביעת Coomassie. ממברנות C ו- D מייצגים את התגובה של החי"ק לנוגדן החד-שבטי כנגד ההיסטידינים (מיהול של 1:40000). לאלוציה ראשונה שימש אימידזול בריכוז של 0.3M. לאלוציה שנייה שימשו אימידזול ו- EDTA (בריכוז של 0.3M ו- 0.25M בהתאמה). החץ, מופנה אל החי"ק שנשלחו לקביעת רצף ב- LC-MS/MS ושימשו כאנטיגנים להכנת הנוגדנים. (החלבונים הופרדו בג'ל חלבונים SDS-PAGE 12%. (C ו- D) והועברו אל ממברנה של ניטרוצלולוז ב- electroblotting).

3.3.7. הכנת נוגדנים כנגד חלבונים הקוטיקולריים, MpCP2 ו- MpCP5 בארנבות:

חלבונים של שני גנים לח״ק (MpCP2 ו- MpCP5) אשר בוטאו ב- *E. coli* (ראה סעיף 2.16) והופרדו מחלבוני החיידקים בתנאים נטיבים או דנטורטיבים ע״י קישור ושחרור מ- Ni-NTA (ראה סעיף 2.17) שימשו כאנטיגן לקבלת נוגדנים מארנבות. בחינה מקדימה של הנסיוב שנאסף טרם חיסון הארנבות (pre immune) הראתה כי הוא איננו מכיל נוגדנים כנגד כ״א מהח״ק.

בתמונה מס׳ 22, ניתן להבחין בבירור כי כ״א מהנסיובים שהוכנו, הראה תגובה כנגד הח״ק ששימש כאנטיגן. מעניין לציין כי הנוגדן כנגד MpCP2 הראה תגובה צולבת בזיהוי הח״ק MpCP5 בעוד שהנוגדן כנגד MpCP5 הגיב כנגד MpCP5 אך לא הגיב עם MpCP2.



תמונה מספר 22. תגובת הנוגדנים כנגד חלבונים קוטיקולריים של *Myzus persicae*

ממברנה A, מראה צביעת Ponceau של הממברנה. ממברנות B1 ו- B2 מייצגות את שתי חצאי ממברנה A. ממברנה B1, שימשה להגבה עם הנוגדן הדנטורטיבי כנגד הח״ק MpCP5 (מיהול של 1:1000); ממברנה B2 שימשה להגבה עם הנוגדן הדנטורטיבי כנגד הח״ק הדנטורטיבי MpCP2 במיהול 1:1000).

M מייצג סמן גודל של חלבונים; 1, מייצג את הח״ק MpCP2; 2 ו- 3, מייצגים את הח״ק MpCP5; 1 ו- 4, מייצגים את הח״ק MpCP2. (החלבונים הופרדו בג׳ל חלבונים SDS-PAGE 12% והועברו אל ממברנה של ניטרוצלולוז ב-electroblotting).

3.3.8. בידוד cDNA לחלבונים קוטיקולריים הומולוגים ל- MpCP2 ו- MpCP5 ממינים נוספים של כנימות עלה:

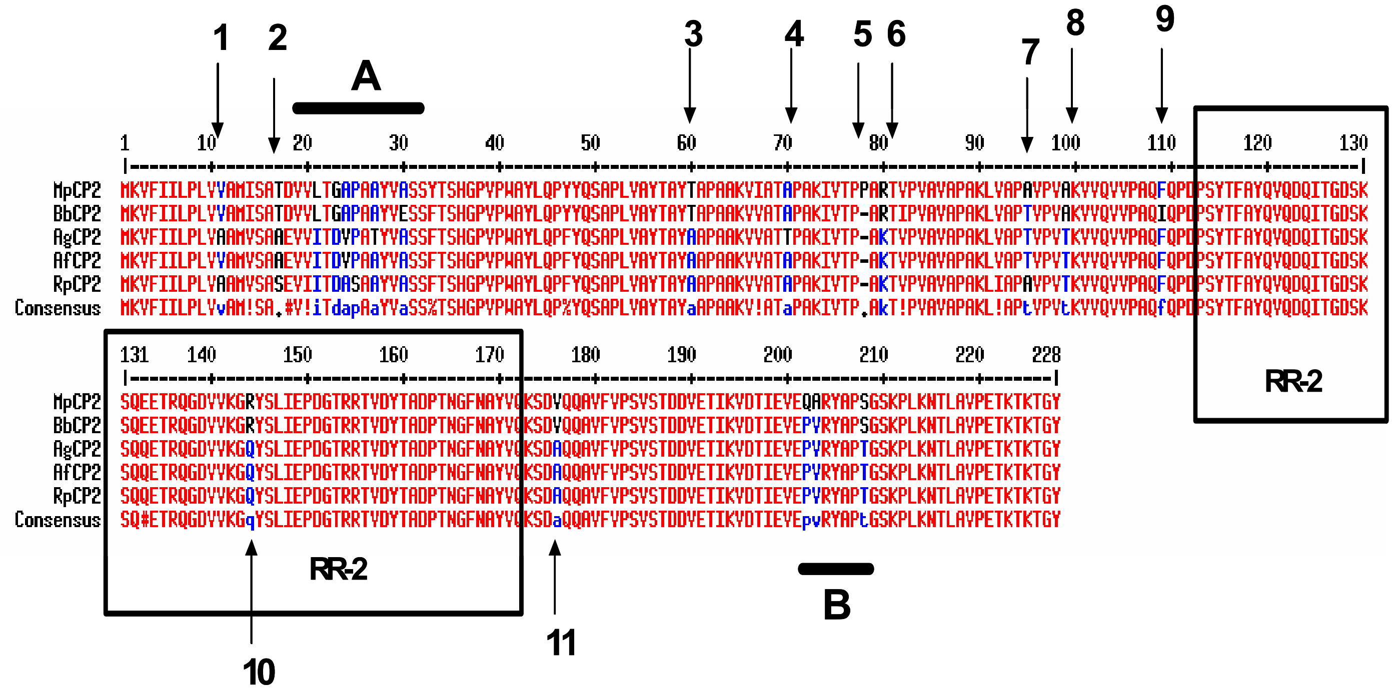
ללימוד מידת השונות הקיימת ברצף ח' האמינו של הח"ק במינים שונים של כנימות העלה, נבחרו שני חלבונים קוטיקולריים: MpCP2 נבחר לייצג את הח"ק מסוג RR-2 ו- MpCP5 נבחר לייצג את הח"ק מסוג RR-2. הפקת כלל ה- RNA ממיני הכנימות: (*A. gossypii*, *B. brassicae*, *A. fabae* ו- *R. padi*). ריאקציה של (Reverse Transcription) עם תחל (poly-T) אפשרה סינתזה של ה-DNA המשלים (cDNA). שימוש בתחלים ספציפיים המתאימים לקצוות הגנים MpCP2 ו-MpCP5 אפשרו בידוד והגברה של הרצפים ההומולוגים ממיני הכנימות הנ"ל. קביעת רצף הבסיסים של ה- cDNA ממיני הכנימות השונים אפשרו חיזוי רצף ח' האמינו של החלבונים ההומולוגים ל-MpCP2 ו- MpCP5 במיני הכנימות השונים.

תמונה מס' 23, מציגה השוואה של רצף החלבון החזוי של הח"ק ההומולוגים ל- MpCP2 מארבעה מיני כנימות עלה נוספים: (*A. gossypii*, *B. brassicae*, *A. fabae* ו- *R. padi*).

ניתן לראות כי החלבונים ההומולוגים ל- MpCP2 מראים דמיון גבוה ברצף ח' האמינו להוציא הבדלים מועטים. נמצאו 9 הבדלים ברצף ח' האמינו בין ח' אמינו מס' 11 ל- ח' אמינו מס' 30, ולכן מייצג את השוני הגדול ביותר בין מיני כנימות העלה. נוכחות ח' האמינו פרולין (P) במיקום 78 ברצף החלבון ייחודית רק לכנימה *M. persicae*.

אזור ה- RR-2 נמצא שמור בקרב מיני הכנימות השונים, מלבד הבדל יחיד, כאשר ח' האמינו ארגינין (R) (מס' 144 בחלבון), המופיעה בכנימות העלה *M. persicae* ו- *B. brassicae* הוחלפה לח' האמינו גלוטמין (Q), בכנימות *A. gossypii*, *A. fabae* ו- *R. padi*.

תוצאות השוואת רצפי ח' האמינו מצביעות, כי הכנימה *M. persicae* והכנימה *B. brassicae* מראות זהות גבוה ברצף ונבדלות מן המינים האחרים שנבדקו.

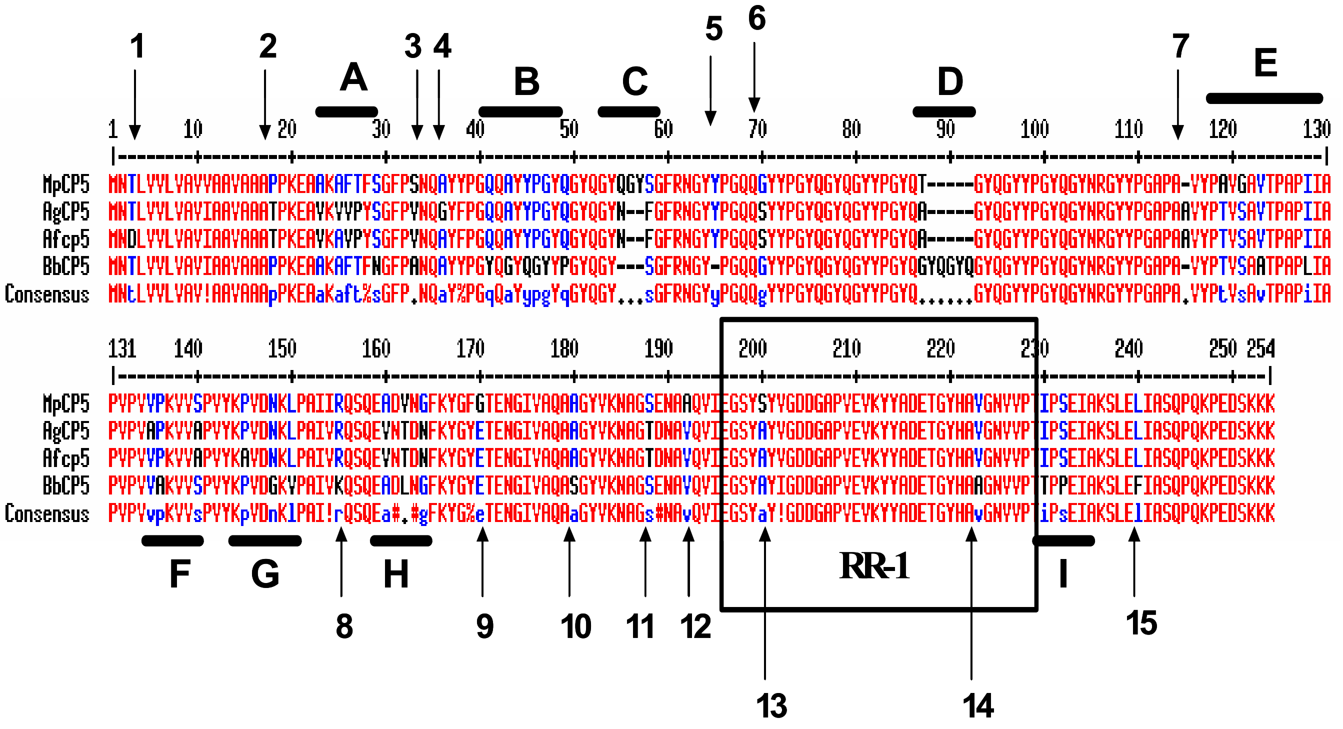


תמונה מספר 23. השוואת רצף ח' האמינו החזוי של החלבונים הקוטיקולריים ההומולוגים לחלבון MpCP2 בארבעה מינים של כנימות עלה.

רצף cDNA הומולוגי לגן *MpCP2* בודד מכנימות העלה (*Aphis gossypii*, *Brevicoryne brassicae*, *Aphis fabae* ו- *Rhopalosiphum padi*). ההשוואה נעשתה בתוכנה MultAlin. הוספו חיצים ממוספרים: 1 – 12, המופנים אל אזורים הנבדלים בחומצת אמינו בודדת. שני קוים מודגשים המסומנים ב- A ו- B מופנים אל אזורים בהם נצפו הבדלים ברצף של יותר מחומצת אמינו אחת. רצף ח' האמינו של אתר RR-2 מופיעות בשתי המסגרות.

תמונה מס' 24, מציגה השוואה של רצף החלבון החזוי של החי"ק ההומולוגים ל- MpCP5 בשלושה מינים של כנימות עלה: (*A. gossypii*, *B. brassicae* ו- *A. fabae*). בתמונה ניתן לראות כי חלבונים הומולוגים ל- MpCP5 מציגים דמיון גבוה ברצף ח' האמינו, למרות מציאותם של הבדלים לא מעטים ברצף ח' האמינו. רצף ח' האמינו המצוי בין ח' אמינו מס' 18 ל- ח' אמינו מס' 59, מראה את השוני הגדול בין מיני הכנימות. מלבד שינויים בסוג ח' האמינו, נמצאו אזורים המציגים חסר או תוספת של ח' אמינו כדוגמת האזורים C ו- D המסומנים בתמונה. תוספת של ח' האמינו אלאנין (A) במיקום 115 ברצף החלבון נראתה רק בכנימות *A. gossypii* ו- *A. fabae*. הבדלים ברצף של ח' אמינו בודדת זוהו במיקומים שונים כגון: ח' האמינו(S) סרין (מס' 200 בחלבון) זוהתה בכנימה *M. persicae* אך הוחלפה לח' האמינו אלאנין (A) במיני הכנימות האחרים. ח' האמינו (V) ואלין (מיקום מס' 223) אשר נמצאה בכנימות העלה: *M. persicae* , *A. gossypii* ו- *B. brassicae* הוחלפה

לחי האמינו אלאנין (A) בכנימה *A. fabae*. נראה כי מבין שלושת החי"ק אותם בדקנו, MpCP2 (MpCP1 ו- MpCP5) בקרב מיני הכנימות השונים, MpCP5 מראה את השונות הגבוה ביותר.



תמונה מספר 24. השוואת רצף ח' האמינו החזוי של החלבונים הקוטיקולריים ההומולוגים לחלבון MpCP5 בשלושה מינים של כנימות עלה.

רצף cDNA הומולוגי לגן *MpCP5* בודד מכנימות העלה: *Aphis gossypii*, *Brevicoryne brassicae*, ו- *Aphis fabae*. ההשוואה נעשתה בתוכנה MultAlin. הוספו חיצים ממוספרים: 1 – 15, המופנים אל אזורים הנבדלים בחומצת אמינו בודדת. שני קוים מודגשים המסומנים: A - I, מצביעים על אזורים בהם נצפה שוני ברצף של יותר מחומצת אמינו אחת. רצף ח' האמינו של אתר RR-1 מופיע במסגרת.

3.3.9. סיכום הפרק:

סריקה של ספריות ה- cDNA של הכנימה *M. persicae* באמצעות תחלים שונים המתוכננים לאזורים הידועים כשמורים בגנים ל- חי"ק אפשרה בידודם של חמישה רצפי cDNA כגנים פוטאטיביים (putative) לחי"ק בכנימת העלה *M. persicae*. חיזוי רצף ח' האמינו בכ"א מהרצפים אפשר את חלוקתם בהתאם לסוג האתר השמור הידוע בחי"ק של חרקים שונים.

שני הרצפים החזויים כמקודדים לחי"ק: MpCP2 ו- MpCP3 נמצאו מכילים את רצף ח' האמינו המאפיין חי"ק מסוג RR-2. שני הרצפים החזויים כמקודדים לחי"ק: MpCP4 ו- MpCP5 נמצאו

מכילים את רצף ח' האמינו המאפיין ח"ק מסוג RR-1. הרצף החזוי כמקודד ל- MppCP נמצא מכיל רצף חוזר של ח' אמינו המאפיין ח"ק אך לא נמצא רצף של אתר ה- R&R. השערתנו היא, כי הוא משתייך לסוג של ח"ק חסרי R&R. בהתאם לרצף הבסיסים של ה- cDNA המשוערים כמקודדים לח"ק השונים, תוכננו תחלים ספציפיים אל שני קצוות כ"א מהרצפים, להגברה ובידוד באמצעות ריאקציות PCR של מקטעי הגנים הקוטיקולריים מ- DNA גנומי של הכנימה *M. persicae*.

השוואת גודל תוצר ה- PCR ורצף הבסיסים שהתקבל כאשר הוגבר DNA גנומי בהשוואה להגברה של ספריית ה- cDNA בכ"א מהרצפים אפשר לראשונה זיהוי של הגנים הפוטאטיביים (cDNA) כגנים קוטיקולריים בכנימות עלה. בנוסף, רק בשני הגנים *gMpCP4* ו- *gMpCP5* לח"ק מסוג RR-1 אותרה נוכחות אינטרונים: ברצף הגן *gMpCP4* זוהה אינטרון אחד בגודל של 472bp וברצף הגן *gMpCP5* זוהו שני אינטרונים קטנים בגודל של 85bp ו- 149bp. במטרה ללמוד על ההבדלים בגנים ובחלבונים הקוטיקולריים של כנימות העלה מסוגי ה- R&R השונים, נבחר הגן לח"ק *gMpCP2* לייצג את הח"ק מסוג RR-2. והגן לח"ק *gMpCP5* נבחר לייצג את הח"ק מסוג RR-1. תחלים אשר תוכננו אל שני קצוות כ"א מהגנים: *gMpCP2* ו- *gMpCP5*, אפשרו באמצעות ריאקציות PCR, הגברה ובידוד של רצפי cDNA הומולוגים לגנים הללו ממינים נוספים של כנימות עלה: (*A. gossypii*, *B. brassicae*, *A. fabae* ו- *R. padi*). השוואת רצפי ח' האמינו החזויות של כ"א מהח"ק: MpCP2 ו- MpCP5, אפשרה קבלת מידע על האתרים השמורים והשונים בכ"א מהח"ק הנ"ל בקרב מיני כנימות העלה השונים המוזכרים מעלה. כמו כן רצף הגן ל- MpCP2 ורצף ה- cDNA ל- MpCP5 בוטאו בחיידקי *E. coli* לקבלת חלבונים קוטיקולריים. הח"ק MpCP2 ו- MpCP5 לאחר הפרדתם מחלבוניי החיידק שימשו לחיסון ארנבות לצורך קבלת נוגדנים ספציפיים כנגד סוגי הח"ק השונים בכנימות עלה. כל המידע, שהתקבל על הרצפים השונים המקודדים לח"ק בכנימות עלה, (נשלח אל GenBank) והנוגדים השונים, שהתקבלו כנגד החלבונים הקוטיקולריים של כנימת העלה *M. persicae* שימשו אותנו בהמשך העבודה בחלק העוסק באפיון של הח"ק המעורבים בזיקה אל חלבון ההלפר הפוטיויראלי.

3.4. אפיון הזיקה בין חלבון ההלפר של ZYMV לחלבונים קוטיקולריים שמוצו מכנימת עלה האפרסק *Myzus persicae*:

משערים, כי קישור הפוטיוירוסים מתרחש באזורים החיצונים בחלל צינור המזון שבחדק כנימת העלה (Ammar *et al*., 1994; Wang *et al*., 1996). אזורים אלו, מצופים קוטיקולה המורכבת בעיקר מסיבי כיטין בהם מושקעים (embedded) ח״ק ושעוות. כיטין ושעווה, זהים בחרקים השונים ומהווים את אבני הבניין של הקוטיקולה. לעומתם, ח״ק הנם ייחודיים למין החרק ולעיתים אף לדרגת התפתחות ספציפית של החרק.

השערת המוצא בחלק זה של העבודה, היא כי הח״ק מעורבים בזיקה אל חלבוני הפוטיוירוסים. ידוע, כי כנימות עלה בכל דרגות ההתפתחות השונות מעבירות ביעילות פוטיוירוסים, לכן ניתן להעריך בסבירות גבוהה, כי ח״ק מבניים שאינם ספציפיים לדרגת התפתחות מסוימת הם אלו המעורבים בקישור ההלפר הפוטיויראלי.

בתחילה, נבדקה האפשרות, לאתר ח״ק בעלי זיקה להלפר של פוטיוירוסים ע״י סריקת חלבונים שבוטאו מספריות ה- cDNA של הכנימה *M. persicae* בחיידקי *E. coli* באמצעות חלבון ההלפר. כיוון מחקר זה לא הניב כל תוצאות, למרות ניסיונות חוזרים רבים. יתכן והסיבה נעוצה בהבדל המהותי הקיים בביטוי ועיבוד של חלבונים שמקורם בכנימת העלה (eukaryotic) לעומת הביטוי בחיידקיים *E. coli* (prokaryotic) בהם לא קיים תהליך עיבוד של החלבון כגון גליקוזילציה של החלבון הנפוצה מאוד בח״ק. אפשרות נוספת לחוסר ההצלחה יכולה להיות משום שספריות ה-cDNA אינן מייצגות ומבטאות נכונה את כלל הפוטנציאל החלבוני של כנימת העלה. בשל הקושי הנ״ל, נקטנו בגישה חלופית לבחינת הזיקה של הח״ק אשר מוצו מכנימות העלה אל ההלפר הפוטיויראלי. עד כה, מיצוי ח״ק נעשה בחרקים שונים (כגון חגבים, חיפושיות וכו׳) שמרביתם בעלי מימדים גדולים בהרבה מכנימות עלה. בשל גודלן קטן המימדים, היה צורך למצות כנימות עלה שלמות ורבות.

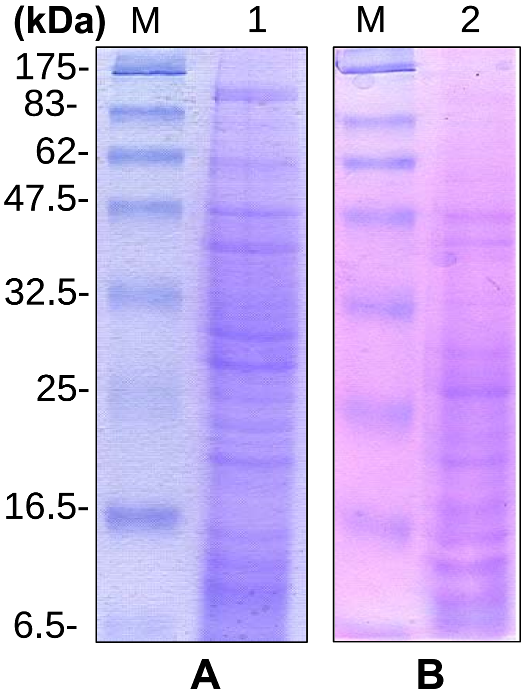
3.4.1. מיצוי חלבונים קוטיקולריים מכנימת העלה ***Myzus persicae***:

קוטיקולה בשלה בחרק, עברה חמצון והקשחה והח״ק שקועים בסיבי הכיטין ואינם משתחררים בקלות. על מנת לשחרר את הח״ק מהקוטיקולה יש צורך להרחיק ככל האפשר את חלבוני הכנימה שאינם חלק מהקוטיקולה ולרכז את חלקי הקוטיקולה.

בעבודות קודמות בחרקים אחרים (Fristorm *et al*., 1978; Nakato *et al*., 1990) , נעשה מיצוי ח״ק מקוטיקולה מוקשית באמצעות חומרים שונים. על בסיס שיטות אלו המתוארות בסעיף 2.11 בפרק שיטות וחומרים נעשה המיצוי בכנימות עלה תוך שימוש בחומרים הבאים: 8M Urea, 4M Guanidine hydrochloride, 1% Calcofluor או 1% Congo red. כ״א מהחומרים הוסף בנפרד אל מבחנה המכילה את חלקי הקוטיקולה של הכנימה.

מבין החומרים שנבחנו לעיל בבחינה ראשונית נבחרו שניים, 8M Urea ו- 1% Calcofluor. כפי שניתן לראות בתמונה מס׳ 25, מיצוי הח״ק שהתקבל לאחר שימוש בשני החומרים 8M Urea או 1% Calcofluor הראה דפוס דומה. המיצוי מכיל מגוון חלבונים בטווח של גדלים. כפי שרואים בתמונה לעיל, נע המשקל המולקולארי של החלבונים בטווח הגדלים שבין 6kDa לבין 100kDa.

פרופיל מיצוי הח״ק של הכנימה *M. persicae* דומה לזה שתואר בחרקים שונים. בחרקים אחרים נמצא כי מרבית הח״ק אינם בעלי משקל מולקולארי גבוהה ומצויים בטווח הגדלים שבין 5kDa ל- 40kDa (Fristorm *et al*., 1978; Nakato *et al*., 1990). יחד עם זאת, תוארו גם ח״ק בעלי משקל מולקולארי הגבוהה מ- 90kDa. מתמונה מס׳ 25, עולה כי מיצוי הח״ק באמצעות 8M Urea מניב מגוון רחב יותר של חלבונים ובכמות גדולה יותר ולכן החלטנו להמשיך במיצוי עם חומר זה.



תמונה מספר 25. השוואת יעילות המיצוי של חלבונים קוטיקולריים של כנימת העלה *Myzus persicae* באמצעות שני החומרים: 8M Urea ו- 1% Calcofluor .

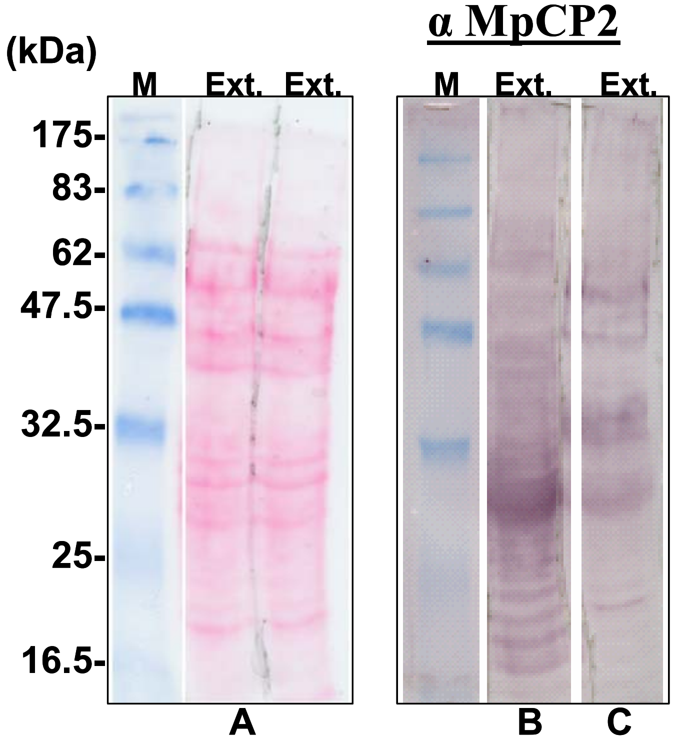
פרופיל החלבונים הקוטיקולריים שמוצו באמצעות 8M Urea מוצג משמאל (A) ואלו שמוצו באמצעות 1% Calcofluor מוצג בצד ימין (B). M מיצג סמן גודל של חלבונים. ההפרדה נעשתה ב- 12% SDS-PAGE והצביעה ב- Coomassie.

3.4.2. זיהוי חלבונים קוטיקולריים במיצוי מהכנימה *Myzus persicae* באמצעות שימוש בנוגדנים שהוכנו כנגד החלבון הקוטיקולרי MpCP2:

הכנת הנוגדנים ששימשו לצורך זיהוי של הח״ק במיצוי מכנימת העלה תוארה בסעיף 2.18, בפרק העוסק בחומרים ושיטות. הנוגדנים התקבלו לאחר חיסון ארנבות בח״ק שנקבע כגן גנומי אשר כונה בשם MpCP2, רצף הגן בוטא בחיידקים והח״ק הופרד מחלבוני החיידק בתנאים נטיבים או דנטורטיבים. בתמונה מס׳ 26 ניתן להבחין בבירור, כי נוגדנים שהתקבלו לאחר חיסון ארנבת בחלבון MpCP2 דנטורטיבי (ממברנה מס׳ 1) אפשרו זיהוי של כ- 17 פסי חלבון במיצוי הכנימה. לעומת זאת, הנוגדנים שהתקבלו כנגד החלבון במצב הנטיבי (ממברנה מס׳ 2) זיהו רק כ- 8 פסי חלבון במיצוי הכנימה. שני הנוגדנים אותם בדקנו, הוכנו כנגד תוצר הביטוי בחיידקים של הגן לח״ק MpCP2 מראים תגובה צולבת (cross reactivity) אל ח״ק אחרים בדוגמאות המיצוי ולכן, ניתן

להסיק, כי רובם הגדול של פסי החלבונים שנראו במיצוי של *M. persicae* (תמונה 25) הם אכן ח"ק.

יש לציין כי זהו **הדיווח הראשון על נוגדנים ספציפיים כנגד חלבונים קוטיקולריים של כנימות עלה.**



תמונה מספר 26. זיהוי חלבונים קוטיקולריים במיצוי מכנימת העלה *Myzus persicae* באמצעות נוגדנים כנגד MpCP2.

ערוץ M, מייצג סמן גודל לחלבונים. בכ"א מהערוצים המסומנים ב- Ext הוטענה דוגמא זהה של מיצוי של ח"ק עם 8M Urea מכנימת העלה *M. persicae*. ממברנה (A), צביעת Ponceau. לאחר מכן, הממברנה נחתכה, וכל אחד משני הערוצים נחשף לנוגדן שונה. (B),לנוגדן כנגד ח"ק דנטורטיבי ו-C לנוגדן כנגד ח"ק נטיבי. החלבונים הופרדו ב- SDS-PAGE 12%, הועברו אל ממברנה של ניטרוצלולוז ונחשפו לנוגדנים במיהול של (1:1,500) באנליזה של western blot.

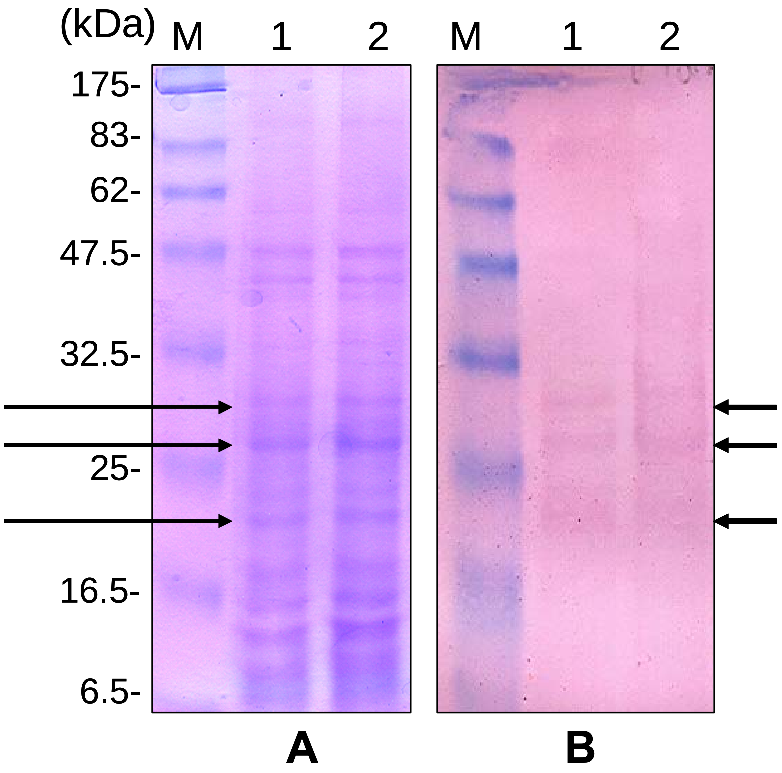
3.4.3. בחינת הזיקה של חלבון ההלפר של ZYMV אל חלבונים במיצוי מהכנימה *Myzus persicae*:

בחינת הזיקה של ההלפר אל מיצוי החלבונים מכנימת העלה *M. persicae* מוצגת בתמונה מס' 27.

בתמונה, הלפר מנוקה של ZYMV מגיב עם חלבונים במיצוי בשיטה של Far-western blot.

שלושת החיצים המופיעים בשני צדי תמונה מס' 27, מצביעים על שלושת פסי התגובה של חלבונים שמוצו מהכנימות ומראים זיקה אל ההלפר של ZYMV.

התוצאה המוצגת הנה דיווח ראשון בו תוארה זיקה בין חלבון ההלפר הפוטיויראלי לבין חלבונים קוטיקולריים של כנימת עלה.



תמונה מספר 27. בחינת הזיקה של ההלפר של ZYMV אל חלבונים קוטיקולריים ממיצוי של כנימת העלה *Myzus persicae*.

פרופיל החלבונים שמוצו מכנימת העלה *M. persicae* באמצעות 8M Urea לאחר צביעה ב- Coomassie מוצג משמאל (A). תגובה של ההלפר אל חלבונים במיצוי מוצגת מימין (B). סדר הטענת הדוגמאות בערוצים השונים: M, סמן גודל של חלבונים. 1, מיצוי ראשון. 2, מיצוי שני. (החלבונים הופרדו ב- 12% SDS-PAGE, הועברו אל ממברנה של ניטרוצלולוז. אל הממברנה הוסף 200µg הלפר של ZYMV מנוקה. נוכחות ההלפר הקשור זוהתה באמצעות נוגדן חד-שבטי כנגד רצף ההיסטידינים המצוי בקצה ה- N של ההלפר (His-tagged Helper) במהול של (1:4,000) באנליזה של Far-western blot.

* חלבון ההלפר נוקה בכרומטוגרפיה של אפיניות אל Ni-NTA.

* ביקורות שליליות לניסוי הזיקה מובאות במרוכז בהמשך בתמונה מס' 29.

3.4.4. הכנת חלבון הלפר His-tagged עם מוטציה נקודתית באזור השמור KLSC:

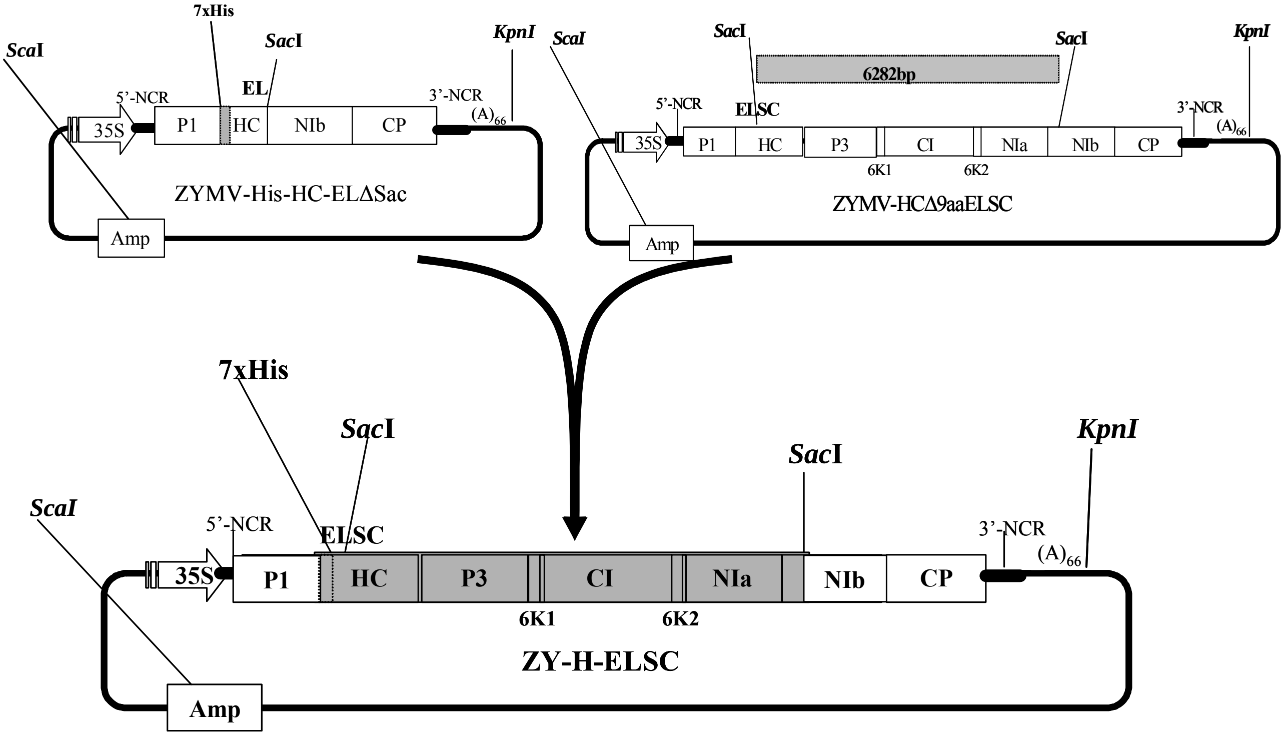
בעבודות קודמות, הוכח שהאזור השמור KITC, בחלבון ההלפר של PVY ו-TVMV קובע את השארות הוירוס (retention) בחדק הכנימות (Wang *et al*., 1996; Blanc *et al*., 1998). על מנת לבחון אם אתר שמור זה מעורב בזיקה לח"ק, עלה הצורך ליצור שבט של הפוטיוירוס ZYMV, הזהה לטיפוס הבר אך מותמר באזור השמור מ-KLSC ל-ELSC. שבט המוצא היה שבט בו הגן להלפר שלו כולל קידוד לשבעה היסיטידינים על מנת לאפשר את ניקויו בכרומטוגרפיה של אפיניות אל Ni-NTA. השבט המותמר שהתקבל קרוי ZY-H-ELSC (שבט של ZYMV, ה- H מיצג את נוכחות ההיסטידינים, ו- ELSC מיצג את המוטציה באזור השמור). גזע הוירוס שנבע משבט זה, אמור להיות נעדר יכולת לסייע להעברת וריונים ואם אכן, אזור זה מעורב בהשארות בחדק, עשוי להיות מעורב בזיקה לח"ק ויוכל לשמש כביקורת שלילית בניסויים השונים.

יצירת השבט המוטנט ZY-H-ELSC נעשתה באמצעות שימוש בשבטים אחדים של ZYMV המצויים במעבדתנו ומתוארים בסעיף 2.19, בפרק העוסק בחומרים ושיטות.

להלן פרוט שלבי ההכנה העיקריים: הפלסמיד ZY-His-ELΔSac עוכל באמצעות אנזים ההגבלה *Sac I* תוצר העיכול האנזימתי נוקה ושימש כ- וקטור אליו הוחדר מקטע בגודל 6282 בסיסים המכיל את האזור המקודד לחלק מחלבון ההלפר וממשיך עד לאזור המקדד לחלק מהחלבון NIb אשר התקבל לאחר עיכול של הפלסמיד המכיל את השבט האינפקטיבי ZY-HCΔ9aaEL באמצעות שלושת אנזימי ההגבלה: *SacI*, *ScaI* ו- *KpnI* אחד אחר השני.

תוצר החיבור הנו הפלסמיד המבוקש ZY-H-ELSC המכיל את תוספת שיירי ההיסטידינים בקצה ה- N של ההלפר ואת המוטציה של ELSC בחלבון ההלפר ראה תמונה מס' 28 .

אנליזות של RT-PCR לצמחים הנגועים ובדיקת רצף הבסיסים של התוצר המכיל את מקטע המקודד לסוף החלבון P1 וחלבון ההלפר אפשרה לאמת, כי הוא מקדד לרצף שיירי ההיסטידינים בקצה ה- N של ההלפר ומכיל את המוטציה הנקודתית להחלפת ליזין ב- ח' גלוטמית באתר KLSC.



תמונה מספר 28. שלבי הבניה של השבט האינפקטיבי ZY-H-ELSC.

קבלת מקטע בגודל 6282 בסיסים המקודד לחלק מחלבון ההלפר וממשיך עד לאזור המקדד לחלק מהחלבון NIb נעשה באמצעות עיכול הפלסמיד ZYMV-HCΔ9aaELSC עם שלושת אנזימי ההגבלה: *ScaI*, *SacI* ו- *KpnI*. תוצר העיכול הינו מקטע אשר הוחדר אל פלסמיד sub clone אשר עוכל עם אנזים ההגבלה *SacI* להחסרת האזור המתאים.

3.4.5. בחינת יכולתו של ההלפר המוטנט לסייע להעברת ZYMV באמצעות כנימות עלה:

נבחנה יכולתם של ההלפרים (תקין KLSC ומוטנט ELSC) לסייע להעברת ויריונים של ZYMV באמצעות כנימת העלה *M. persicae* לאחר הזנה ע"ג ממברנה של פאראפילם.

תוצאות ניסויי העברה (ראה טבלה מס' 8), עולות בקנה אחד עם תוצאות הידועות בפוטיוירוסים אחרים בהם הוכח כי החלפת ח' האמינו ליזין בח' גלוטמית באתר השמור KITC ברוב הפוטיוירוסים (או KLSC ב- ZYMV) פוגעת ביכולת ההלפר להיקשר אל גפי הפה של הכנימה. המוטציה אותרה לראשונה כאשר בודד מן הבר ואופיין גזע של PVY (המכונה בשם PVC) בו נפגעה יכולת ההלפר לסייע להעברת ויריונים ע"י כנימות עלה (Thornbury *et al*., 1990). בדומה ל- PVC, בודד ואופיין גזע בר של ZYMV (המכונה בשם Ct) (Grumet *et al*., 1992).

טבלה מספר 8. שיעורי העברה של ZYMV :

חלבון הלפר	מס' החזרות	שעור העברה	
		מס' צמחים נגועים / מס' צמחים נבדקים	אחוז ההעברה(± סטיית תקן)
ZY-H-**K**LSC	4	43/51	84.8(±3.23)
ZY-H-**E**LSC	4	0/48	0

הזנת הרכישה של כנימות עלה *Myzus persicae* נעשתה ע"ג ממברנה של פאראפילם המכילה הלפר ELSC או KLSC המופק באמצעות כרומטוגרפיה של אפיניות אל Ni-NTA מצמחי קישוא נגועים ב- ZYMV ובוירויונים מנוקים של ZYMV.

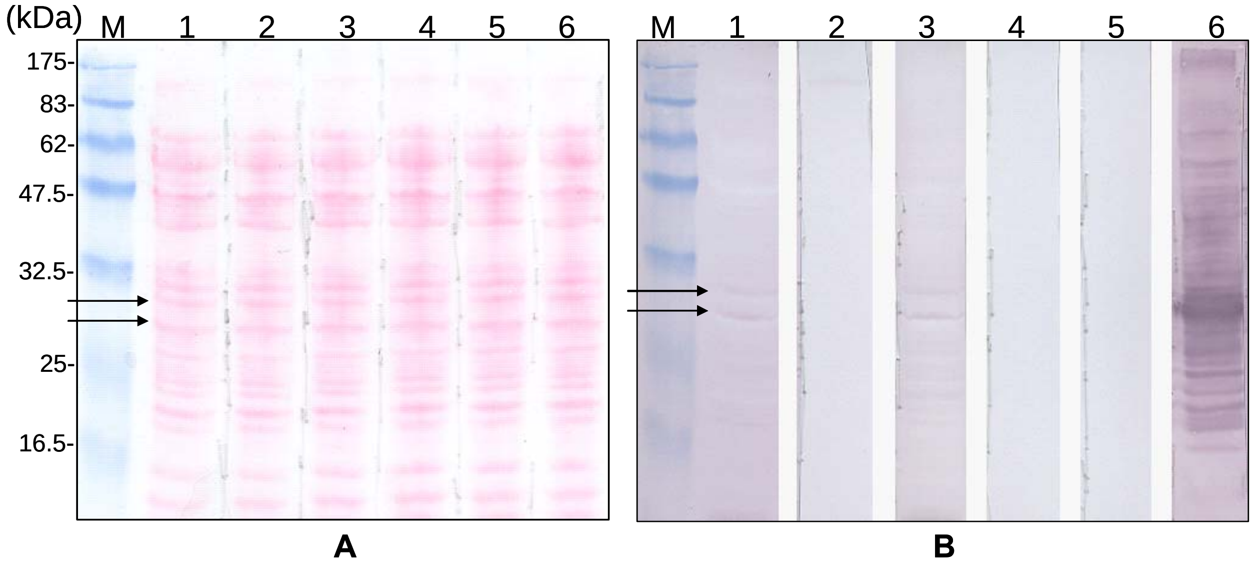
3.4.6. השוואת הזיקה של הלפר פעיל למוטנט, אל מיצוי החלבונים הקוטיקולריים של הכנימה *Myzus persicae*:

הזיקה של ההלפר אל מיצוי הח"ק מכנימת העלה *M. persicae* הושוותה עם חלבוני הלפר מנוקים של הלפר תקין מן הגזע ZY-H-KLSC ומן הגזע המוטנט ZY-H-ELSC תמונה מס' 29 :

בממברנה מס' 1 ו- 2 ניתן לראות תגובה חיובית של ההלפר מן הגזע התקין אל הח"ק המקובעים ע"ג הממברנה (ראה שני חיצים בצדה השמאלי של התמונה הימנית).

בנוסף, נבחנה הזיקה במיצוי מסונן של צמחי קישוא נגועים בגזע הוירוס ZY-H-KLSC וגזע הוירוס ZY-H-ELSC (תמונה מס' 29 : ממברנה מס' 3 ו- 4). גם כאן, רואים תגובה חיובית של זיקה של הצמחים הנגועים בוירוס התקין (ראה שני חיצים המכוונים אל הפסים המתאימים בממברנה 1 ו- 3 בתמונה מס' 29. לא נצפתה כל תגובה כאשר נעשה שימוש במיצוי מצמח קישוא שאיננו מודבק ב- ZYMV (בריא) ממברנה מס' 5 בתמונה מס' 29 .

זהותם של החלבונים במיצוי הכנימה כחלבונים קוטיקולריים התאפשרה באמצעות הנוגדן כנגד הח"ק MpCP2 (ממברנה מס' 6 בתמונה מס' 29).



תמונה מספר 29. בחינת ספציפיות הזיקה של ההלפר אל חלבונים במיצוי מכנימת העלה *Myzus persicae*.

מיצוי של חלבונים קוטיקולריים עם 8M Urea מהכנימה *M. persicae* ערוצים 1-6, M סמן גודל של חלבונים. הדוגמאות הופרדו ב- 12% SDS-PAGE. הגיל הועבר אל ממברנה של ניטרוצלולוז. ממברנה (A), מציגה צביעה ב- Ponceau של כלל החלבונים במיצוי, הממברנה (A) נחתכה לרצועות וכל אחת מהן טופלה בנפרד (B): 1. 150 µg הלפר ZY-H-KLSC מנוקה ב- Ni-NTA; 2. 150 µg הלפר ZY-H-ELSC מנוקה ב- Ni-NTA; 3. מיצוי של צמח קישוא נגוע ב- ZY-H-KLSC; 4. מיצוי של צמח קישוא נגוע ב- ZY-H-ELSC. 5. מיצוי של צמח קישוא שאיננו נגוע ב- ZYMV (בריא); 6. ביקורת (ללא טיפול).

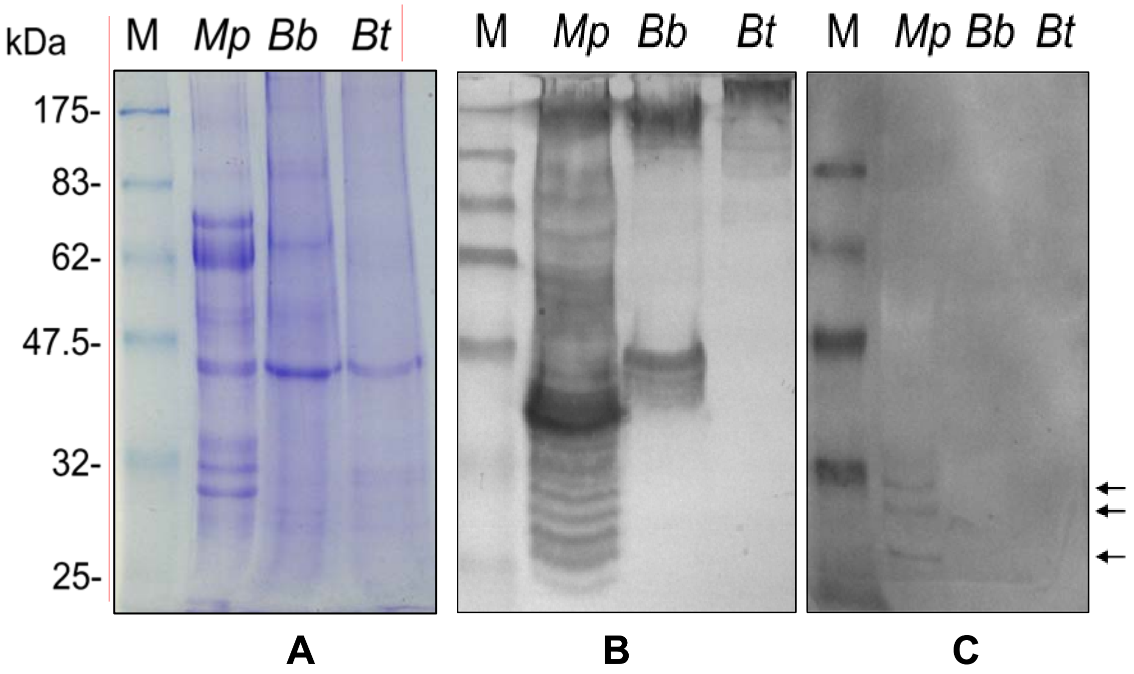
מימין (B), ספציפיות הזיקה של ההלפר של ZYMV אל החלבונים הקוטיקולריים. זיהוי הזיקה בפיסות הממברנה מס׳ 1-5, נעשה באמצעות נוגדן חד-שבטי כנגד רצף ההיסטידינים בקצה ה- N של ההלפר (His- tagged Helper) במיהול של (1:4,000) באנליזה של Far-western blot. זיהוי של הח״ק בפיסת הממברנה מס׳ 6, נעשה באמצעות נוגדן כנגד הח״ק MpCP2 דנטורטיבי במיהול של (1:1500).

3.4.7. בחינת הזיקה של הלפר של ZYMV אל מיצוי חלבונים קוטיקולריים מחרקים שאינם ווקטור של ZYMV.

על מנת לבחון אם הזיקה של חלבון ההלפר לח״ק היא ספציפית לכנימות עלה נערכה השוואה של הזיקה של חלבון ההלפר לח״ק שמקורם בכנימות עלה שאינן ווקטור לוירוס ZYMV. במערכת הנבדקת שימשו ח״ק שמוצו מכנימת העלה *M. persicae* (ווקטור יעיל) ומשני חרקים שאנן ווקטור ל-ZYMV, כנימת העלה *B. brassicae* וכנימת עש הטבק *Bemisia tabaci* (כנימות העש, התקבלו מדר׳ חזי אנטיגנוס).

פרופיל החלבונים של שלושת הכנימות: *B. brassicae*, *B. tabaci* ו- *M. persicae* היה שונה מלבד חלבון בגודל משוער של 45kDa המצוי בכל שלושת הערוצים בשיעור דומה (צד A בתמונה מספר 30 ערוצים: *Bb*, *Bt* ו - *Mp*. כצפוי, הנוגדן נגד ח״ק זיהה את מרבית החלבונים במיצוי מכנימת העלה *M. persicae* (רצועת ה-*Mp* במרכז התמונה (B). הנוגדן נגד הח״ק של *M. persicae* זיהה מקטע חלבון אחד עיקרי בגודל משוער של 45kDa במיצוי החלבונים מכנימת העלה *B. brassicae*. לעומת זאת, הנוגדן הנ״ל לא אפשר זיהוי של ח״ק במיצוי החלבונים מכנימת העש *B. tabaci* (ערוץ *Bt* במרכז התמונה B).

כפי שהראנו בסעיף הקודם, ח״ק שמקורם בכנימה *M. persicae* הראו זיקה לחלבון ההלפר של ZYMV (ראה חיצים מכוונים שלושה חיצים אל פסי החלבון ברצועת ה-*Mp* בממברנה C בתמונה מס׳ 30). מאידך, לא נצפתה תגובה דומה של ההלפר אל מיצוי הח״ק מכנימת העלה *B. brassicae* וכנימת העש *B. tabaci*. שלושת פסי הח״ק מכנימת העלה *M. persicae* שהגיבו עם חלבון ההלפר ראה ממברנה C בתמונה מס׳ 30). נמצאו בגודל משוער של 31 kDa, 27 kDa ו- 21 kDa. במטרה לזהות ביתר דיוק כ״א מהחלבונים הנ״ל יש צורך להפרידם בהפרדה נוספת. התברר שקיים קושי רב, לקבל הפרדה מספקת של חלבון בודד מתוך תערובת חלבונים בהפרדה חד-ממדית, לכן, נעשה מאמץ להשתמש בשיטות הפרדה שמאפשרות קבלת חלבון בודד.



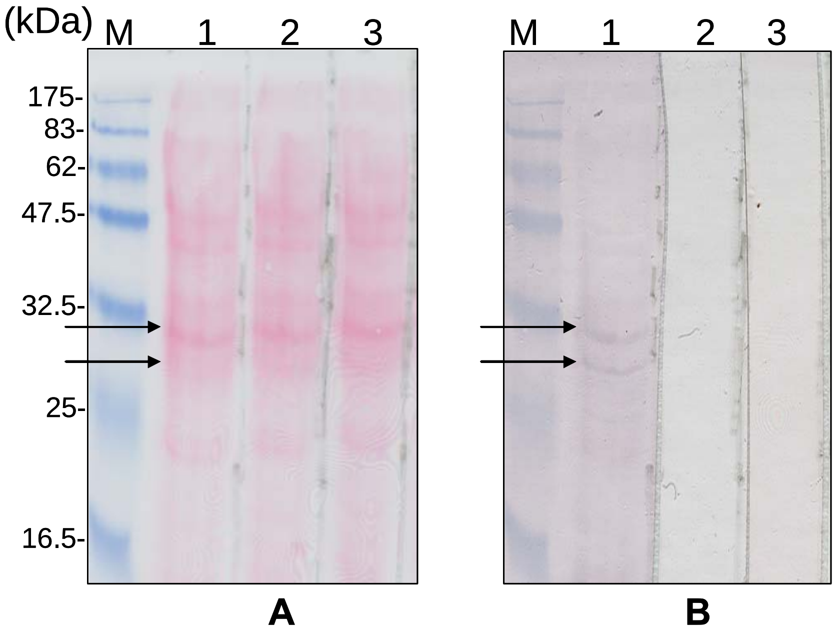
תמונה מספר 30. בחינת הזיקה של חלבון הלפר של ZYMV אל חלבונים קוטיקולריים מהכנימה *Myzus persicae*, כנימת עלה הכרוב *Brevicoryne brassicae* וכנימת העש *Bemisia tabaci*.
מיצוי הח״ק מכנימות שונות באמצעות 8M Urea הופרד ב- 12% SDS-PAGE. משמאל (A), צביעת קומאסי (Coomassie) של החלבונים. הג׳ל הועבר אל ממברנות של ניטרוצלולוז (B, C).
זיהוי החלבונים הקוטיקולריים (B), נעשה באמצעות נוגדן נגד הח״ק MpCP2 במיהול (1:1500) באנליזה של western blot. זיהוי הזיקה של ההלפר (נעשה שימוש ב- 300 µg חלבון הלפר מנוקה ב- Ni-NTA) מגזע הוירוס ZY-H-KLSC אל הח״ק (C), נעשה באמצעות נוגדן חד שבטי כנגד His-tag במיהול (1:4000) באנליזה של Far-western blot. סדר ההטענה של הדוגמאות: M=סמן גודל לחלבונים; *Mp* = מיצוי ח״ק מכנימת העלה *M. persicae*; *Bb* = מיצוי ח״ק מכנימת העלה *B. brassicae*; *Bt* = מיצוי ח״ק מכנימת העש *B. tabaci*.

3.4.8. בחינת הזיקה של חלבון המעטפת של ZYMV אל מיצוי החלבונים הקוטיקולריים של כנימת העלה *Myzus persicae*:

מתוצאות עבודתם של Salomon & Bernardi בשנת (1995) בוירוס הגמדון והמוזאיקה של התירס *Maize Dwarf Mosaic Virus* (MDMV) עולה האפשרות כי יתכן ומתקיים קישור ישיר של חלבון המעטפת אל חדק הכנימה. עבודות שנעשו בהמשך עם וירוסים אחרים מקבוצת הפוטיוירוסים לא הצליחו לחזור על תוצאותיהם ולאשר את הסברה כי יתכן ומתקיים קישור ישיר של חלבון המעטפת

אל חדק הכנימה (Wang *et al*.,1998; Blanc *et al*., 1997). קישור ישיר של חלבון המעטפת כפי שהוצע ע״י Salomon & Bernardi אל חדק הכנימה מחייב זיקה בין חלבון המעטפת הפוטיויראלי לחלבונים הקוטיקולריים. לכן נבחנה יכולת הזיקה של חלבון המעטפת של ZYMV אל מיצוי החי״ק של כנימת העלה *M. persicae*, ראה תמונה מס׳ 31.

כפי שניתן לראות בתמונה מס׳ 31, לא מתקיימת זיקה ישירה של חלבוני המעטפת או ויריונים אל החלבונים במיצוי מכנימת העלה *M. persicae*. הביקורת לקיום הזיקה (ערוץ מס׳ 1 בתמונה) נראית לאחר הוספה של חלבוני הלפר אל הויריונים ואפשרה את זיהוים של שני פסי החלבונים בגודל משוער של 31 kDa ו- 27 kDa (ראה שני חיצים המכוונים אל פסי החלבונים בתמונה מס׳ 31).



תמונה מספר 31. בחינת הזיקה של חלבון המעטפת אל חלבונים במיצוי מכנימת העלה *Myzus persicae*.

מיצוי של חלבונים קוטיקולריים עם 8M Urea מהכנימה *M. persicae* ערוצים 1-3, M סמן גודל של חלבונים. הדוגמאות הופרדו ב- SDS-PAGE 12%. הג׳ל הועבר אל ממברנה של ניטרוצלולוז. ממברנה (A), מציגה צביעה ב- Ponceau של כלל החלבונים במיצוי, הממברנה (A) נחתכה לרצועות וכל אחת מהן טופלה בנפרד (B): 1. הלפר ZY-H-KLSC מנוקה ב- Ni-NTA הוסף אל ויריונים של ZYMV מנוקים; 2. הלפר ZY-H-KLSC מנוקה ב- Ni-NTA; 3. ויריונים של ZYMV מנוקים.

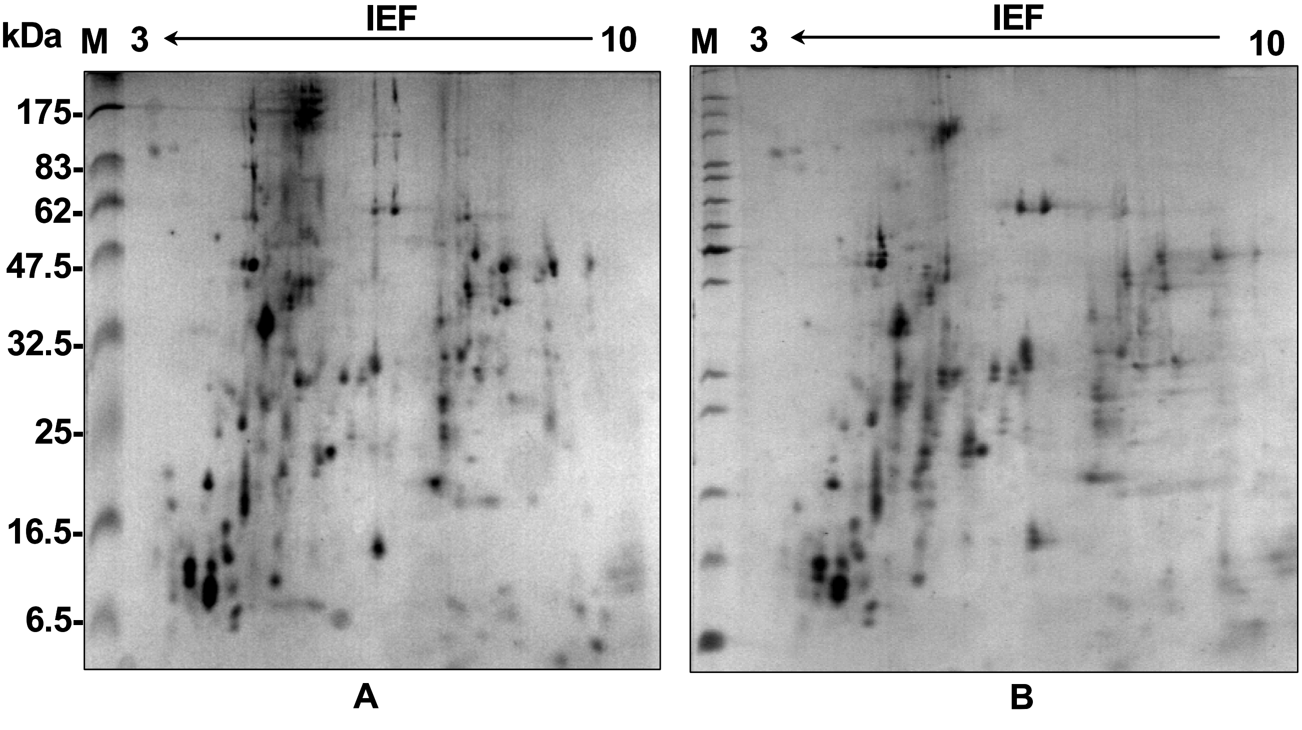
מימין (B), זיהוי הזיקה בפיסות הממברנה מס׳ 1-3, נעשה באמצעות נוגדן רב-שבטי כנגד ZYMV במיהול של (1:3,000) באנליזה של western blot.

3.4.9. הפרדה דו-ממדית של מיצוי חלבונים קוטיקולריים מכנימת העלה *Myzus persicae*:

הפרדה דו ממדית של שני מיצויים נפרדים של ח״ק מכנימת העלה *M. persicae* מוצגת בתמונה מס׳ 32. פיזור החלבונים בשני המיצויים הציג דפוס הפרדה דומה.

ניתן לזהות כי הנקודה האיזואלקטרית של מרבית הח״ק נעה בטווח שבין pH 4.0 ל- pH 9.0 נצפו שתי קבוצות עיקריות של ח״ק חומציים pH 4.0 – pH 6.0 ובסיסיים pH 6.0- pH 9.0.

טווח הגדלים של הח״ק בהפרדה הדו-ממדית מייצג את הגדלים השונים של הח״ק ותואם לזה שהתקבל בהפרדה החד ממדית. יחד עם זאת, ניתן לזהות כי מרבית הח״ק בדוגמא מפוזרים בטווח גדלים שבין 6kDa ל- 62kDa. המיצוי הראשון המוצג בתמונה מס׳ 32-A, שימש אותנו למהלך הניסויים הבאים המפורטים בהמשך.



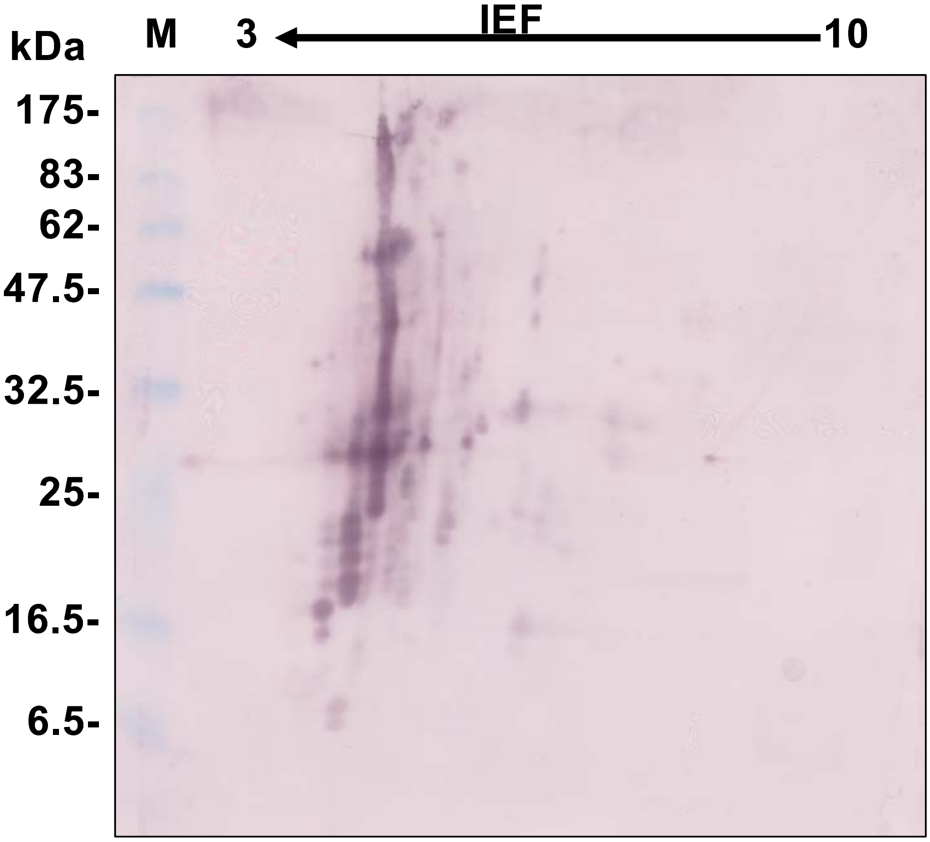
תמונה מספר 32. דפוס החלבונים הקוטיקולריים מכנימת העלה *Myzus persicae* לאחר הפרדה דו ממדית.

נבחנו שני מיצויים של ח״ק מכנימת העלה *M. persicae* באמצעות 8M Urea:

מיצוי 1, (A) ומיצוי 2, (B). הדוגמאות הופרדו בשתי הפרדות עוקבות (2D): הפרדה ראשונה, לפי הנקודה האיזואלקטרית ב- ״סטריפ״ (IPG strips (pH 3-10; הפרדה שנייה, לפי המשקל המולקולארי, ב- 12% SDS-PAGE. הג׳לים נצבעו בצביעת קומאסי קולואידלי (Colloidal Coomassie blue).

3.4.10. זיהוי החלבונים הקוטיקולריים של כנימת העלה *Myzus persicae* שהופרדו דו-ממדית באמצעות נוגדן נגד חלבון קוטיקולרי:

זיהוי הכתמים של הח״ק לאחר ההפרדה הדו-ממדית נעשה באמצעות הנוגדן שהוכן נגד הח״ק MpCP2 ותואר לעיל בתמונה מס׳ 26. דפוס התגובה של הנוגדנים מוצג בתמונה מס׳ 33. ניתן לזהות כי, נוגדן זה הגיב עם מרבית הח״ק בדוגמא הממוקמים בטווח שבין pH 4.0 – pH 7.0 ובטווח גדלים 8kDa- 150kDa. הנוגדנים זיהו טווח רחב של ח״ק (ח״ק חומציים וניטרליים) בכל טווח הגדלים.



תמונה מספר 33. זיהוי חלבונים קוטיקולריים במיצוי מכנימת העלה *Myzus persicae* לאחר הפרדה דו-ממדית באמצעות נוגדנים כנגד חלבון קוטיקולרי של כנימות עלה.

מיצוי של ח״ק מכנימת העלה *M. persicae* באמצעות 8M Urea הופרד בשתי הפרדות עוקבות (2D): הפרדה ראשונה, לפי הנקודה האיזואלקטרית ב- ״סטריפ״ (pH 3-10) IPG strips. הפרדה שנייה, לפי המשקל המולקולארי ב- SDS-PAGE 12%. הג׳ל הועבר אל ממברנה של ניטרוצלולוז אשר הוגבה עם נוגדנים רב-שבטיים כנגד MpCP2 דנטורטיבי (במהול של 1:1500) באנליזה של western blot.

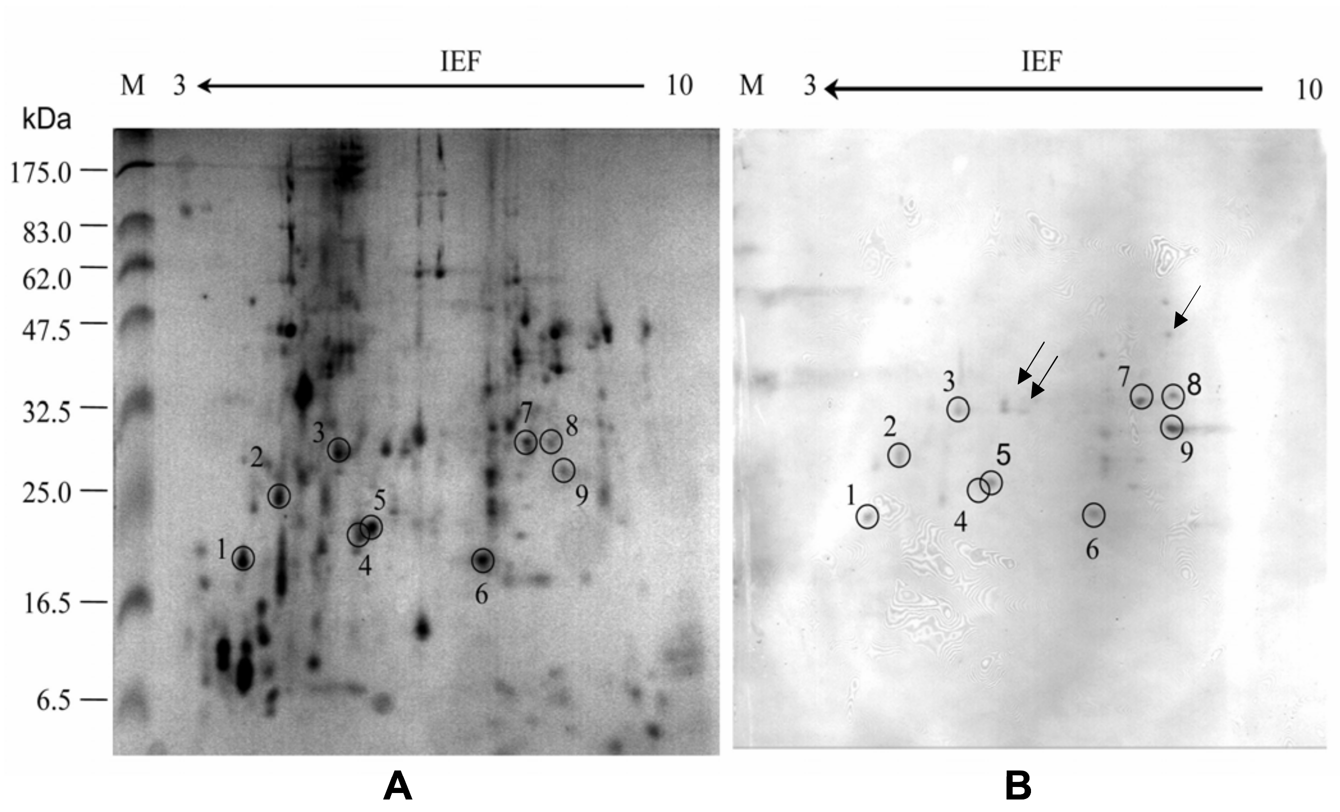
3.4.11. בחינת הזיקה של חלבון הלפר של ZYMV אל מיצוי חלבונים קוטיקולריים מכנימת העלה *Myzus persicae* לאחר הפרדה דו-ממדית:

כפי שתואר לעיל, (סעיפים: 3.4.3, 3.4.6 ו- 3.4.7) שלושה ח״ק בגודל משוער של 21 kDa, 27 kDa ו- 31 kDa הראו זיקה אל ההלפר. מאחר ובהפרדה דו ממדית, ניתן היה לקבל הפרדה טובה יותר של החלבונים, נעשה ניסיון לחזור על הניסוי לבחינת הזיקה של ההלפר אל הח״ק, אלא שהפעם, נבחנת הזיקה עבור חלבונים שהופרדו דו ממדית.

חלבון ההלפר של ZYMV, מראה זיקה לכ- 15 כתמים של חלבונים במיצוי מכנימת העלה *M. persicae* (תמונה מס׳ 34: A ו- B). כתמי החלבונים אשר הראו את התגובה החזקה ביותר אל ההלפר סומנו ומוספרו ע״ג הממברנה (1 – 9) (ראה תמונה 34-B), ע״מ שניתן יהיה לאתר ולבודד אותם מג׳ל נוסף אשר הופרד במקביל ונצבע בקומאסי (ראה תמונה 34-A).

כל תשעת הכתמים של הח״ק נחתכו וחולצו מהג׳ל ונשלחו לקביעת רצף ח׳ האמינו בחלבונים בטכניקה של LC-MS/MS. חישוב המשקל המולקולארי והנקודה האיזואלקטרית של כ״א מכתמי החלבון נעשה בהתאם למיקומם בג׳ל החלבונים לאחר ההפרדה הדו-ממדית ומסוכם בטבלה מס׳ 9.

זהות הפפטידים לחלק מן הכתמים נקבעה בשיטת LC-MS/MS סיכום הנתונים מובא בטבלה מס׳ 9. מלבד תשעת הכתמים ששימשו לקביעת רצף ח׳ האמינו, מסומנים בחיצים שלושה כתמי חלבונים נוספים, אשר הראו זיקה לחלבון ההלפר וניתן להגדירם כח״ק על סמך התגובה החיובית לנוגדן (תמונה מס׳ 33) שהוכן כנגד הח״ק MpCP2. שלושת כתמי החלבון הנ״ל לא נכללו בטבלה מס׳ 9.



תמונה מספר 34. זיקה של הלפר של ZYMV אל חלבונים במיצוי חלבונים קוטיקולריים מכנימת העלה *Myzus persicae* לאחר הפרדה דו ממדית.

מיצוי של ח״ק מכנימת העלה *M. persicae* באמצעות 8M Urea הופרד בהפרדה דו-ממדית:

הפרדה ראשונה, לפי הנקודה האיזואלקטרית ב-״סטריפ״ IPG strips (pH 3-10) והפרדה שנייה, לפי המשקל המולקולארי, בג׳ל חלבונים 12% SDS-PAGE.

משמאל (A), צביעת קומאסי קולואידלי (Colloidal Coomassie blue) של הג׳ל.

מימין (B), זיקה של ההלפר אל מיצוי הח״ק מכנימת העלה. הג׳ל הועבר אל ממברנה של ניטרוצלולוז, אליה הוסף הלפר של ZYMV. זיהוי ההלפר הקשור נעשה באמצעות נוגדן חד-שבטי במיהול של (1:4000) כנגד רצף ההיסטידינים בקצה ה- N של ההלפר באנליזה של Far-western blot.

טבלה מספר 9. זיהוי כתמי החלבונים המראים זיקה אל ההלפר של ZYMV:

Protein Identification*					MW (kDa)**		pI***	
Spot No.	**Protein identity**	**NCBI Accession No.**	**No. of peptides**	**Coverage %**	**Observed**	**Predicted**	**Observed**	**Predicted**
2	GroEL *Buchnera aphidicola*	AAR21862	1	4.7	24.2	55.4	4.56	5.17
3	Cuticle protein *Aphis gossypii*	AAO63549	4	30.7	30	23.02	5.37	6.08
4	Cuticular protein *Myzus persicae*	AAL29466	4	37.1	22.2	23.4	5.75	6.07
5	Cuticle protein *Myzus persicae*	AAZ20451	5	47	22.3	26.5	5.88	6.587
7	Hypothetical protein *Apis mellifera*	XP_397538	1	14.3	31	17.8	7.6	9.28
9	Cuticle protein *Myzus persicae*	AAZ20447	8	52	28.5	24.3	8.12	6.58

המספר הסידורי של כתמי החלבון המופיעים בטבלה הנם בהתאם לסימון ע"ג הממברנה בתמונה מס' 34-B.

* **Protein Identification** קביעת רצף ח' האמינו של פפטידים מהחלבונים הנבדקים נעשה באמצעות Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry (LC-MS/MS) **.**

MW = **Molecular Weight** = משקל מולקולארי.**

*** **pI** = **Isoelectric point** = נקודה איזואלקטרית.

השוואת ערכי **MW** ו- **pI** שהתקבלו לאחר ההפרדה בג'ל הדו-ממדי **Observed** לאלו המאפיינים את החלבון החזוי **Predicted** באמצעות (LC-MS/MS).

מספר הפפטידים שהתקבלו ומידת כיסוים את החלבון החזוי מהווה את מדד ה- **Coverage**.

סיכום הנתונים השונים של כ״א מתשעת כתמי החלבון, חלקם זוהו באמצעות קביעת רצף ח׳ האמינו ואחרים זוהו באמצעות הנוגדן כנגד הח״ק MpCP2 מפורט בטבלה מס׳ 10.

טבלה מספר 10. סיכום מאפייני תשעת כתמי החלבונים מהכנימה *Myzus persicae* המראים זיקה אל הלפר של ZYMV.

מס׳ כתם החלבון	**זוהה ב- LC-MS/MS כ- ח״ק**	**זוהה באמצעות נוגדן כנגד MpCP2**
1	*לא זוהה	
2	**איננו ח״ק	
3	√	
4	√	√
5	√	√
7		√
8	*לא זוהה	√
9	√	

* לא התקבל זיהוי של פפטידים באנליזה של LC-MS/MS.

** הפפטידים שהתקבלו ב- LC-MS/MS זוהו כחלבון שאיננו חלבון קוטיקולרי.

3.4.12.סיכום הפרק:

עבודה נוכחית זו, עסקה לראשונה באפיון חלבונים קוטיקולריים שמוצו מכנימות עלה זהו הדיווח הראשון על ח״ק בחרקים מסדרת ה- Hemiptera. גולת הכותרת של העבודה, מציגה עדות ראשונה על קיומה של זיקה *in-vitro* בין ההלפר הפוטיויראלי לבין ח״ק מכנימת העלה *M. persicae*. הוכנו לראשונה נוגדנים כנגד ח״ק המאפשרים זיהוי של מרבית הח״ק במיצוי מכנימת העלה *M. persicae*.

- הלפר של ZYMV הראה זיקה *in-vitro* אל שלושה פסי חלבון עיקריים במיצוי של ח״ק מכנימת העלה *M. persicae*.
- השוואה בין הלפר תקין KLSC להלפר מוטנט ELSC ביכולת הזיקה אל מיצוי ח״ק מכנימת העלה *M. persicae* מצאה, כי רק ההלפר תקין מראה זיקה אל החלבונים במיצוי.
- הוכח שהזיקה של הח״ק אל ההלפר מתקיימת רק למין הכנימה המהווה וקטור.
- ההפרדה הדו-ממדית (2D), אפשרה הפרדה טובה ומדויקת יותר של מיצוי הח״ק מכנימת העלה *M. persicae*.
- נמצא שהזיקה של ההלפר של ZYMV מתקיימת לשלושה חלבונים במיצוי מכנימת העלה *M. persicae* בגודל משוער של: 21 kDa, 27 kDa ו- 31 kDa. לאחר שיפור ההפרדה (ג׳ל דו-מימדי), הראה ההלפר של ZYMV זיקה (בעוצמה שונה) אל כ- 15 כתמי חלבון במיצוי הח״ק לאחר ההפרדה הדו-ממדית.
- ארבעה מתוך תשעת כתמי חלבון שעבורם נקבע רצף ח׳ האמינו בחלבונים (3, 4, 5 ו- 9) נמצאו מציגים רצפים שמורים הידועים בח״ק בחרקים שונים. שניים מתוכם (4 ו- 5) זוהו בנוסף גם ע״י הנוגדן כנגד הח״ק MpCP2.
- שני כתמי חלבונים נוספים (7 ו- 8) שלא זוהו ב- LC-MS/MS זוהו ע״י הנוגדן כנגד הח״ק MpCP2.

מכלל התוצאות שהתקבלו, ניתן לאמת את השערת המוצא: כי חלבונים קוטיקולריים בכנימות העלה מעורבים בזיקה *in vitro* אל חלבון ההלפר הפוטיויראלי.

4. דיון:

כנימות עלה, מעבירות וירוסים רבים המנגעים צמחים, תהליך העברה כולל: ווקטור (כנימת העלה), פתוגן (וירוס) ופונדקאי (צמח). בוירוסים מתמידים, מתקיימת התאמה רבה בין הוירוס לכנימה המאפשרת את כניסתו של הוירוס למעי, שרידותו בהמולימפה ובבלוטות הרוק של כנימת העלה לפרק זמן ממושך (בוירוסים מסוימים גם את התרבותם propagation בגוף הכנימה). יכולתו של הוירוס להיכנס דרך דפנות המעי של הכנימה, מחיבת התאמה בין חלבוני הוירוס לחלבונים שונים של כנימת העלה. התאמה זו מסבירה מדוע כה קטן מספר המינים של כנימות עלה, המאפשרים העברה של וירוסים מתמידים (Pirone & Blanc 1996; Gray, 1996). לעומת זאת, העברה של וירוסים חולפים באמצעות כנימות עלה היא חיצונית. בשלב ההעברה, הוירונים מצויים בחלל צינור המזון שבחדק הכנימה. עד כה, לא היה קיים כל מידע על הגורמים בגפי הפה של כנימת העלה המעורבים בתהליך. מספר המינים של כנימות עלה, המאפשרים העברה של וירוסים חולפים הוא גדול מזה הידוע לגבי וירוסים מתמידים (Ng & Perry, 2004). וירוסים חולפים נחלקים לשני אופני העברה: בראשון, מתאפשרת העברה של ויריונים מנוקים ע״י כנימות העלה. אופן העברה זה כולל וירוסים המשתייכים לקבוצת ה- carlaviruses, alfamoviruses ו- cucumoviruses ההנחה היא שחלבון המעטפת הויראלי מעורב ישירות בקישור אל גפי הפה של הכנימה. בשני, ויריונים מנוקים אינם מועברים ע״י כנימות עלה אלא אם כן הם מוגשים לרכישה בנוכחות חלבון ויראלי נוסף (Helper dependent vector transmission) שאיננו חלק מהחלקיק הויראלי. ההנחה היא שחלבון זה מעורב בקישור אל גפי הפה של הכנימה. אופן העברה זה כולל וירוסים בקבוצת ה- potyviruses ו- caulimoviruses בהם הוכחה מעורבות חלבון מסייע. Pirone & Blanc בשנת (1996) טענו כי האסטרטגיה של חלבון ״מסייע״ - הלפר, בוירוסים השונים התפתחה מאוחר יותר מזו של חלבון המעטפת היות ו- ״צוואר הבקבוק״ בהעברה של וירוסים צמחים הוא בהתאמתם אל הווקטור ישנו יתרון לוירוסים בעלי חלבון המתמחה בהתאמה אל הווקטור. הפולימרזות הויראליות RNA ו- DNA יוצרות שגיאות ברפליקציה של הגנום הויראלי (Chao, 1990) ובתוספת מוטציות טבעיות של הוספה או חסר(Domingo *et al.*, 1985; Rao & Hall, 1993), נוצרים וריאנטים ויראלים שונים, חלקם בעלי יתרון לוירוס. נוכחות חלבון מסייע שאיננו חלק מהחלקיק הויראלי מאפשר התאמה

טובה יותר (adaptability) של החלבון המסייע אל הווקטור ללא כל פגיעה במבנה החלקיק הויראלי. כמו כן, החלבון המסייע יכול לסייע להעברת וריאנטים שונים של הוירוס המצויים בצמח קרוב לוודאי שהוריאנטים הנפוצים ביותר של ההלפר בעלי ההתאמה הטובה ביותר הן אל הווקטור והן אל חלקיק הוירוס הם אלו המועברים לצמחים הפונדקאים. יתרון נוסף לנוכחותו של חלבון "מסייע", בוירוסים מקבוצת הפוטיוירוסים נמצא, כי החדרה של חלבון ההלפר במקביל עם חלקיק הוירוס אל התא של הצמח הפונדקאי מסיעת ומגדילה את יכולת ההתבססות והמעבר של חלקיקי הוירוס בתאי הצמח הפונדקאי (Cronin *et al*., 1995). עם גילוי תופעת ההלפר בשנות ה-70 ובהתבסס על תוצאותיהם בניסויי העברה של הפוטיוירוסים השונים, הועלתה ההשערה המכונה בשם "הנחת הגשר" "The Bridge hypothesis" (Govier & Kassanis, 1974b). הנחה זו, העלתה את האפשרות כי חלבון ההלפר משמש כ- "גשר" בין הויריון והכנימה (Govier & Kassanis, 1971b). עבודות שנעשו בעשור האחרון, מאוששות את השערת הגשר, בכך שהראו כי חלבון ההלפר הוא זה הנקשר אל הכנימה ולא הויריון (Wang *et a*l.,1998; Blanc *et al*., 1998). במידה והשערת הגשר תתקיים בממצאים ניסיוניים נוספים, היא עשויה ללמד על מעורבותו של ההלפר ויכולת התאמתו אל החלבונים השונים המעורבים בתהליך העברה.

עבודה זו, עסקה בהעברה של וירוסים חולפים מקבוצת הפוטיוירוסים באמצעות מינים שונים של כנימות עלה. נבחנה מעורבותו של חלבון ההלפר בקביעת ההתאמות אל החלבונים השונים המעורבים בתהליך העברה של הפוטיוירוסים ע"י כנימות העלה.

<u>משמעות ההתאמה בין חלבון ההלפר לחלבון המעטפת:</u>

בניסויים בהם נעשה ניסיון ללמוד על ההעברה של שני פוטיוירוסים שונים התברר כי, חלבון ההלפר של ZYMV אפשר העברת ויריונים של TuMV, עובדה המעידה על קיום התאמה בין חלבון ההלפר של ZYMV לחלבון המעטפת של TuMV. לעומת זאת, חלבון ההלפר של TuMV לא סייע להעברת ויריונים של ZYMV. בניסויים שימשו שני מיני הכנימות: *M. persicae* ו- *A. gossypii* המצטיינים בהעברת שני הוירוסים (ZYMV ו- TuMV). תוצאה זו, מעידה על העדר התאמה בין חלבון הלפר של TuMV לחלבון המעטפת של ZYMV אך לא להיפך.

תוצאות אלו תואמות לממצאים שבהן נבחנה ההעברה ההטרולוגית של פוטיוירוסים אחרים: כך הראו Wang *et al*., (1998) שחלבון הלפר של TuMV סייע בהעברה של ויריונים של TuMV ו-

TEV אך לא סייע להעברה של ויריונים של PVY ו- WMV2 (Sako & Ogata, 1981). כמו כן, חלבון הלפר של WMV2 סייע להעברת ויריונים של WMV2, אך גם של PRSV ו- ZYMV (Lecoq & Pitrat, 1985). משמעות ממצאים אלו היא כי **חלבוני ההלפר יכולים להיות נבדלים ביכולתם לסייע בהעברת ויריונים של קבוצת פוטיוירוסים אחת ולא לסייע להעברת ויריונים של קבוצה אחרת.** בהיבט רחב יותר, ניתן לשער כי לחלבוני ההלפר זיקה שונה אל וירוסים שונים, או להיפך, לחלבוני המעטפת בויריונים של פוטיוירוסים שונים, זיקה שונה לחלבוני הלפר שונים.

שני הקצוות של חלבון המעטפת (הקרבוכסילי והאמיני) נמצאו פונים אל פני השטח של החלבון (Shukla *et al.*, 1988). הקצה ה- N של החלבון במרבית הפוטיוירוסים כולל רצף שמור של שלוש ח' האמינו ח' אספרטית (D), אלנין (A) וגליצין (G) (DAG). החלפה של הח' האספרטית (D) בח' הגלוטמית (E) הפכה את TVMV ללא עביר (Atreya *et al.*, 1990), כמו כן נמצא שהחלפה של אלנין (A) בתריאונין (T) באתר DAG של ZYMV-CP גורמת לאבדן יכולת ההעברה של הויריונים באמצעות כנימות עלה (Gal-On *et al.*, 1992). כפי שתואר מעלה, חלבוני המעטפת של ZYMV ו-TuMV נבדלו ביכולתם להסתייע בחלבוני הלפר שונים בתהליך העברה. בעבודה המוצגת כאן (ראה, Dombrovsky *et al.*, 2005) רצף ח' האמינו בקצה ה-N של חלבון המעטפת (CP) של ZYMV ו-TuMV (בדומה לפוטיוירוסים רבים אחרים), מצוי הרצף השמור והלא מותמר DAG. למרות קיום רצף זה, נבדל ה-TuMV מ-ZYMV בכך שאינו מועבר ע"י ההלפר של ZYMV (בעוד שה-ZYMV מועבר עם ההלפר של TuMV). מכך ניתן להסיק, כי למרות שרצף ח' האמינו DAG בחלבון המעטפת מעורב בזיקה אל ההלפר, יתכן והוא איננו הגורם הבלעדי המעורב בקביעת ההתאמה בזיקה אל חלבוני הלפר של פוטיוירוסים שונים.

מאחר שויריונים של כ"א משני הפוטיוירוסים מועברים ע"י חלבוני ההלפר העצמים, היה יסוד להניח שחומצות אמינו נוספות לרצף ה-DAG בקצה ה-N מעורבות בזיקה להלפר של וירוס אחד אך לא למשנהו.

הוירוס הכימרי של ZYMV בו הוחלף קטע בקצה ה- N של CP בזה של TuMV (ZY-TuNT) אפשר לבחון את ההנחה ולהראות שקיים רצף נוסף בקצה ה-N אשר מעורב ביכולת של חלבון המעטפת להכיר חלבון הלפר לא הומולוגי.

מן העבודה הנוכחית (Dombrovsky *et al*., 2005) ומתוצאותיהם של חוקרים אחרים (Blanc *et al*., 1998 ; Flasinski & Cassidy, 1998), ברורה המשמעות של הזיקה בין הקצה ה-N של חלבון המעטפת לחלבון ההלפר בתהליך ההעברה ע״י כנימות עלה. עם זאת, דרושה עבודה ניסויית רבה נוספת לאיתור ח׳ האמינו הספציפיות ברצף הקצה - N של CP המעורבות בזיקה אל חלבון הלפר אחד אך לא לחלבון הלפר אחר.

<u>הקשר בין חלבון ההלפר הפוטיויראלי לבין גפי הפה בכנימות עלה:</u>

בפרק התוצאות סעיף 3.1, הראנו כי TuMV ו- ZYMV מועברים באופן דיפרנציאלי ע״י מינים שונים של כנימות עלה. הסתבר שמינים של כנימות רב-פונדקאיות (פוליפגיות) (*M. persicae* ו- *A. gossypii*) מעבירות את שני הוירוסים בעוד כנימות המעדיפות מצליבים (אוליגופגיות) (*B. brassicae* ו- *L. erysimi*), מעבירות ביעילות TuMV אך לא ZYMV.

לכן נבחנה האפשרות שחלבון ההלפר מגלה זיקה למרכיבים בגפי הפה של מין כנימה אחד ונעדר זיקה לאותם מרכיבים בכנימה במין כנימה אחר.

בניסויי העברה עם כנימות עלה שרכשו תערובת של וריונים וחלבוני הלפר המוגשים ע״ג ממברנה של פראפילם, התקבלו התוצאות הבאות: הכנימות *M. persicae* ו- *A. gossypii* מעבירות TuMV הן באמצעות ההלפר ההומולוגי (מ-TuMV) והן עם ההלפר של ZYMV. מאידך, הכנימות: *B. brassicae* ו- *L. erysimi* מעבירות וריונים של TuMV רק כאשר הם מוגשים בתערובת עם הלפר של TuMV אך כאשר הם מוגשים עם הלפר של ZYMV. *B. brassicae* ו- *L. erysimi* אינן מעבירות וריונים של ZYMV גם כאשר הוא מוגש עם ההלפר ההומולוגי. מכך משתמע בבירור ששני מיני כנימות אלו אינן ״מכירות״ את חלבון ההלפר של ZYMV.

בסיכום, התמונה המצטיירת לגבי מעורבותו של ההלפר בהעברת וריונים ע״י כנימות, היא קיומן של שתי התאמות בלתי תלויות. האחת בין חלבון ההלפר לטיפוס חלבון המעטפת של הוירוס והשנייה בין חלבון ההלפר למין כנימת העלה השמש להעברה. ממצאים אלו תואמים את הנחת הגשר שהוצעה ע״י Govier & Kassanis לפני מעל ל-30 שנה בטרם היו בידם הכלים הניסיוניים להוכחתה.

Goldbach (1986) העלה את האפשרות כי במהלך האבולוציה התפתחו וירוסים שלהם חלבוני הלפר "שהכירו" טוב יותר את הווקטור שלהם (Goldbach, 1986) מאחר וזה הקנה להם יתרון הישרדותי, בכך שהובטחה המשכיות העברת הוירוס אל הפונדקאי המתאים ביותר עבורו.

(Pirone & Blanc, 1996) ציינו בסקירתם כי הבדלים ביכולת ההעברה של פוטיוירוסים מסוימים ע"י מיני שונים של כנימות עלה, יכולים להיות מוסברים במספר דרכים:

1. הבדלים הנובעים ממרכיבים המצויים בגפי הפה של מינים שונים כנימות עלה המאפשרים "הכרה" או "אי הכרה" של חלבוני הלפר.
2. אירועים המתרחשים בחלל צינור המזון של חדק הכנימה שבמהלכם עשוי להתפתח עיכול דיפרנציאלי של חלבון ההלפר של וירוס המזוהה כ- "זר" (שאינו מועבר ע"י מין הכנימה המעורב כמו במקרה הפרטי של אי העברת ה- ZYMV ע"י שני מיני כנימות המצליבים.
3. מיני כנימות שאינן מעבירות וירוסים מסוימים בשל חוסר היכולת ל"שחרר" את חלקיק הוירוס הקשור לחלל צינור המזון בחדק.

מבין שלוש האפשרויות הנ"ל, התבססה הנחת העבודה שלנו על הראשונה שנראית לנו פשוטה ובעלת סבירות גבוהה יותר מן האחרות. ע"פ הנחת עבודה זו, מיני כנימות שונים נבדלים בהרכב החלבונים הבונים את החדק ובכללו את הציפוי הקוטיקולרי של צינור המזון. הבדלים בהרכב או במבנה החלבונים המרכיבים את חדק הכנימה ישפיעו על מידת "ההכרה" (recognition) של חלבוני ההלפר המעורבים בהעברה.

במידה והנחת עבודה זו נכונה, נשאלה השאלה **מהם מרכיבי החדק, בעלי הזיקה אל חלבון ההלפר?** תהליך זה של הכרה, מחייב קשירה של חלבון ההלפר, בצידו האחד אל ציפוי צינור המזון בחדק הכנימה, כאשר צדו האחר קשור לויריון.

למרות שבעבודות מיקרוסקופיות, הוכח בעליל שחלבון ההלפר עוטה על החלל הפנימי של צינור המזון (Ammar *et al.*, 1994), לא תואר עד כה, מרכיב חלבוני או אחר שמקורו בכנימות עלה המראה זיקה לחלבון ההלפר.

מטרתה המרכזית של העבודה הייתה בחינת ההשערה האם קימת זיקה בין חלבון ה- ההלפר הפוטיויראלי לחלבונים קוטיקולריים מכנימת העלה. גישה זו היא חדשנית וטרם נבחנה בווקטור כלשהו של וירוסים של צמחים.

אפיון חלבונים קוטיקולריים של כנימות עלה:

כפי שתואר בסקירת הספרות, משערים כי הפוטיוירוסים נקשרים אל ציפוי הקוטיקולה של חלל צינור המזון בחדק הכנימה (Ammar *et al*., 1994; Wang *et al*., 1996). הקוטיקולה בחרקים מורכבת בעיקר מסיבי כיטין בהם הושקעו ח"ק (בתוספת חומרים אחדים נוספים כגון שעוות). מאחר והכיטין הוא מרכיב אינרטי אשר מצוי גם בחיידקים ובצמחים ואינו ייחודי לחרקים, היה הגיוני להעריך שהח"ק הם המרכיב הייחודי בקוטיקולה המשקף הבדלים בין סוגים ומינים שונים של חרקים. בספרות יש עדויות על שונות בהרכב הח"ק אפילו באותו פרט עצמו ועל ח"ק ייחודיים לדרגות התפתחות שונות של חרקים (Chihara *et al.,* 1982; Dotson *et al*., 1998). בחרקים מסדרת ה- Hemiptera ככלל ובכנימות עלה בפרט, לא היה קיים כל מידע קודם על ח"ק וגנים לח"ק. ע"מ לבחון את האפשרות שח"ק מעורבים בהכרה של חלבון ההלפר, היה צורך ליצור בסיס ידע לתחום חדש זה. לצורך זה, נבחרה כנימת העלה *M. persicae* הידועה כאחד הווקטורים היעילים ביותר של וירוסים בכלל ופוטיוירוסים בפרט. שתי גישות מחקר משלימות נבדקו במקביל במהלך העבודה ליצירת בסיס הידע על ח"ק בכנימות עלה: הראשונה נעשתה ע"מ לבודד גנים לח"ק בכנימות עלה ולאפיינם. השנייה, נעשתה ע"מ למצות ח"ק מכנימות עלה שלמות שתאפשר לבחון את חלקם בזיקה לחלבון הלפר. הכנת ספריות cDNA ממיני כנימות העלה (כנימת העלה האפרסק *M. persicae* כנימת עלה הכרוב *B. brassicae* וכנימת עלה הדילועיים *A. gossypii*) שימשו אותנו כמאגר פוטנציאלי ממנו בודדו מקטעי cDNA המקודדים לח"ק. סריקה של ספריית ה- cDNA של כנימת העלה *M. persicae* באמצעות נוגדן רב-שבטי כנגד ח"ק של *M. sexta* (הנוגדן התקבל מפרופ' Lynn M. Riddiford מאוניברסיטת Washington Seattle), אפשרה בידוד cDNA המראה זהות ברצף ח' האמינו החזוי אל רצפי ח' האמינו של ח"ק מסוג RR-2 הידועים בחרקים אחרים. בחרקים, מחמש סדרות שונות, אופיינו גנים וח"ק, בהם זוהו ברצף הח"ק שלושה סוגי אתרים שמורים מטיפוס ה- R&R' (Rebers & Riddiford, 1988; Andersen, 1998).

בשניים מתוכם, RR-1 ו- RR-2 הוכחה מעורבות הרצף השמור בקישור אל הכיטין Chitin (CBD) Binding Domain (Rebers & Willis, 2001 ; Togawa *et al*., 2004 בהתאמה), כמו כן, זוהו רצפי ח' אמינו המהווים מוטיבים חוזרים בחלק מהח"ק (Andersen *et al*., 1995). מאחר ועבודה זו, היא ראשונית בכנימות עלה, כונו הגנים החזויים כגנים לח"ק ע"פ מין הכנימה ממנו בודדו:

הראשון כונה בשם (MpCP1) *Myzus persicae* Cuticle Protein 1 רצף cDNA הומולגי ל- MpCP1 בודד והוגבר מכלל ה- RNA של הכנימה *M. persicae* ומחמישה מינים נוספים של כנימות עלה: *A. gossypii*; *B. brassicae*; *A. fabae*; *R. maidis* ו- *L. erysimi*. אנו משערים, כי החלבון הקוטיקולרי הראשון בכנימות העלה xxCP1 הנו ח״ק החיוני למבנה הקוטיקולרי של מיני הכנימות השונים (זוהה בכל ששת מיני הכנימות אותם בדקנו).

העובדה כי רצף ח׳ האמינו נמצא בזהות גבוהה בקרב מיני כנימות שונים יכולה להצביע על קיומם של אתרים שמורים החיוניים בח״ק, ולכן השתמרו במהלך האבולוציה. מיעוט הידע על ח״ק בכנימות עלה מאפשר לנו לאתר פעילות מוגדרת אחת של הח״ק (למרות שלא נבדקה), להיקשר אל הכיטין וזאת בשל הימצאותו של הרצף השמור מסוג RR-2 בעל פעילות של CBD, (Togawa *et al*., 2004).

ניתן היה לבודד cDNA המקודד לח״ק MpCP1 או LeCP1 מדרגות התפתחות שונות של שני מיני הכנימות. הממצאים מעידים כי הח״ק הנ״ל מצוי בדרגות השונות ולכן, אינו נמנה על הח״ק הספציפיים לדרגת התפתחות ספציפית stage specific. בנוסף לרצף השמור R&R2, מראים הגנים חלבון צפוי הכולל מוטיב חוזר (repetitive motif) של ח׳ אמינו הדומה למוטיבים חוזרים בח״ק מבניים של חרקים אחרים (Andersen *et al*., 1995).

שימוש בנוגדן כנגד ח״ק של *M. sexta*, לסריקה של ספריות הביטוי השונות של כנימות העלה, לא אפשר בידודם של cDNA המקודדים לח״ק נוספים על זה שתואר ב- Dombrovsky *et al*., (2003).

בשל חסרונם של נוגדנים נוספים נגד ח״ק היה צורך בגישה שונה לסריקה של ספריות ה- cDNA השונות במטרה לבודד cDNA נוספים המקודדים ל- ח״ק. בידוד גנים נוספים התאפשר ע״י תכנון ובניה של תחלים דגנרטיבים המתאימים לרצפים שמורים הידועים בגנים לח״ק לסריקה של ספריות ה- cDNA בריאקציות PCR. תכנון התחלים התבסס על ידע קיים על רצפי הגנים לח״ק בחרקים אחרים המצוי בבנק הגנים GenBank. חמשת רצפי ה- cDNA שבודדו בתהליך זה מקודדים ליצירת חמישה ח״ק פוטאטיבים (putative) חדשים: שנים מהם (MpCP2 ו- MpCP3) כללו רצף ח׳ האמינו מסוג RR-2. שנים אחרים (MpCP4 ו- MpCP5) כללו רצף ח׳ האמינו מסוג RR-1. חלבון שלישי (MppCP) לא כלל רצף מסוג R&R השונים, אך זוהו בו מוטיבים חוזרים של ח׳ האמינו: AAPAY, AYSAP, המציגים דמיון רב למוטיב חוזר המצוי ב- MpCP1 ובח״ק ההומולוגים ממיני

הכנימות השונים. ח״ק הנעדרים R&R תוארו עבור חרקים אחרים כגון *L. migratoria* (Krogh et al., 1995; Kalume et al., 2003). להערכתנו, חלבון זה הוא ח״ק המשתייך לסוג הח״ק נעדרי האתר המקשר לכיטין (חסרי R&R) (Andersen, 2000). רצפי ה- cDNA השונים אשר בודדו מספריות ה- cDNA של הכנימה *M. persicae* המשוערים כמקודדים לח״ק השונים מוגדרים כגנים פוטאטיבים. איתור רצפי הגנים הקוטיקולריים בכנימה *M. persicae* התאפשר לאחר הגברה של DNA גנומי באמצעות ריאקציות PCR ושימוש בתחלים ספציפיים התואמים את הקצוות בכ״א מרצפי ה- cDNA המייצגים ח״ק השונים. השוואת גודל ורצף תוצרי ההגברה של ה- DNA הגנומי לתוצרי ספריות ה- cDNA מהכנימה *M. persicae* , אפשרו מחד זיהויים כגנים אמיתיים לח״ק (לא עוד פוטאטיביים). מאידך, הם אפשרו לקבוע את הימצאותם של אינטרונים בשני גנים לח״ק gMpCP4 ו- gMpCP5 (ראה תמונות מס׳ 19 ו- 20). אינטרונים נמצאו רק בגנים המקודדים לח״ק מסוג RR-1. גודלם של האינטרונים היה שונה בשני הגנים, ב- gMpCP4 נמצא אינטרון יחיד בגודל של 472bp. ברצף הגן gMpCP5 נמצאו שני אינטרונים קטנים יחסית (בגודל של 85bp ו- 149bp). האינטרון הראשון, קוטע את הגן בקצה ה- N של החלבון בעוד האינטרון השני, קוטע את הגן במרכזו. נוכחות אינטרונים, תוארה בגנים לח״ק מסוג RR-1 ו- RR-2 בחרקים שונים, בד״כ תואר אינטרון יחיד ולעיתים רחוקות יותר זוהה גם אינטרון שני נוסף. במרבית הגנים לח״ק המכילים אינטרונים נמצא כי האינטרון הראשון קוטע את רצף הגן באזור המקודד ל- Signal Peptide (SP), עד כה לא דווח על אינטרון הקוטע את רצף הגן הקוטיקולרי באזור המקודד לאתר ה- R&R השמור. מיקומם של האינטרונים ברצף הגנים הקוטיקולריים *gMpCP4* ו- *gMpCP5*, בכנימה *M. persicae* נמצא תואם באופן חלקי לידע שהצטבר בגנים לח״ק בחרקים השונים: כאן כמו בחרקים אחרים האינטרונים לא קטעו את הגנים באזור המקודד לאתר ה- R&R השמור. מאידך, בשונה ממרבית הגנים הקוטיקולריים בחרקים השונים, האינטרון לא קטע את האזור המקודד ל- SP. בעבודות קודמות בהם חקרו את מבנה גנים קוטיקולריים בחרקים שונים, העלו מספר סברות ע״מ להסביר את מציאותם של האינטרונים בגנים קוטיקולריים. הסברה הרווחת, טוענת כי הגן הקוטיקולרי הקדמון הכיל שלושה או ארבעה אינטרונים, במהלך האבולוציה חלק מהגנים איבדו חלק מהאינטרונים (Charles *et al*., 1997; 1998).

על נוכחות האינטרונים בגנים הקוטיקולריים אפשר ללמוד מן הידע הרב שהצטבר על נוכחות של אינטרונים בגנים אאוקריוטים שונים שאינם קוטיקולריים. בגנים אאוקריוטים רבים, הוכח כי אינטרון מעורב בבקרה על רמת הביטוי של ה- pre-mRNA ועל הפוליאדנילציה (polyadenylation) בקצה 3' של ה- mRNA ובהשפעה על בקרת הביטוי החלבון (Le Hir *et al*., 2003). בגנים קוטיקולריים, נמצא כי לאינטרון הראשון (בעיקר זה הקוטע את רצף האזור המקודד ל- SP), פעילות של אתר "מגביר" (enhancer) או כ-ווסת לפעילות הפרומוטור (Wang *et al*., 2002; Kolb, 2003). בגנים הקוטיקולריים, הוכח גם כן, כי לאינטרון הראשון יכולת פעילות של אתר "מגביר" להגברת פעילותו של הפרומוטור ולקבלת רמות שעתוק (transcription) גבוהות (Lemoine *et al*., 2004).

השוואה של אזורים שמורים בחלבונים הקוטיקולריים של כנימת העלה *M. persicae*:

כפי שמשתקף מהרצפים השונים המתוארים בסעיפים 3.2.2 ו 3.2.3 ומהטבלא המסכמת (ראה טבלא מספר 7), ניתן לזהות בבירור כי שני החי"ק מסוג RR-1 שונים זה מזה: הן ברצף ח' האמינו והן בגודל החי"ק. רצף ח' האמינו הממוקמות לקראת סופו של רצף ה- SP, בצמוד לאתר החיתוך כמעט זהה (ראה תמונה מס' 16). אפשר להניח מכך ששני החלבונים מופרשים לאזור זהה בחרק. נמצאה זהות במרבית ח' אמינו אתר השמור RR-1. רצפים זהים אחדים נראו גם בקצה ה- C של החי"ק.

אתר ה- RR-1 בחי"ק של החרקים השונים, מכיל רצף של 32 ח' אמינו, שמרביתן שמורות. השוואת רצף החלבון של שני החי"ק מטיפוס של הכנימה *M. persicae* אל רצף הקונצנזוס הידוע בחרקים השונים מצביעה על זהות מלאה בכל ח' אמינו השמורות עבור החי"ק MpCP4 ופחותה יותר עבור החי"ק MpCP5. השוואת רצף החלבון בשלושת החי"ק מטיפוס RR-2 (MpCP1, MpCP2 ו- MpCP3) מלמדת על השונות הניכרת בהם, אנו מניחים שהשוני מעיד על תפקידיהם השונים בקוטיקולה של הכנימה. למרות השוני הרב, קיימת זהות רבה ברצף ה- RR-2 (כפי שנצפה עבור החי"ק מטיפוס RR-1) וברצפים שמורים בקצה ה- C של MpCP1 ו- MpCP3 זוהו רצפים של מוטיבים חוזרים הידועים בחי"ק של חרקים אחרים. בחי"ק של החרקים השונים, רצף הקונצנזוס של אתר ה- RR-2 כולל 68 ח' אמינו, שמרביתן (43) שמורות. בחי"ק של הכנימה *M. persicae*, רצף אתר ה- RR-2, של MpCP2 הראה את הזהות הגבוהה ביותר אל רצף הקונצנזוס, 38 ח' אמינו זהות

מתוך ה- 43 השמורות (כ- 88% זהות). רצף אתר ה- RR-2, של MpCP1, הראה זהות דומה של 37 ח' אמינו מתוך ה- 43 השמורות (כ- 86% זהות). מידה פחותה יותר של זהות קיימת ברצף אתר ה- RR-2 של MpCP3, 33 ח' אמינו מתוך ה- 43 השמורות (כ- 76% זהות).

מוטיבים חוזרים בחלבונים הקוטיקולריים של הכנימה *Myzus persicae*:

מוטיבים חוזרים (רצף ח' אמינו המופיע מספר פעמים בחלבון) נמצאו בקצה ה- N של הח"ק של הכנימה *M. persicae*. בנוסף, בשני ח"ק (MpCP1 ו- MpCP3) נצפה מוטיב חוזר גם בקצה ה- C.

היחיד מבין הח"ק של הכנימה *M. persicae* שבו לא נצפו מוטיבים חוזרים הוא MpCP4.

הימצאותם של מוטיבים חוזרים בח"ק מאפיינת כמחצית מהח"ק הידועים בחרקים השונים (Willis *et al*., 2005). בחלבון MpCP1 ובח"ק ההומולוגי בחמשת המינים האחרים של כנימות עלה, המוטיבים החוזרים היו כדלקמן: SAPAY, KAPAY או AAPAY. [ראה קצוות ה- N וה- C של MpCP1 כמתואר ב- (2003) ,Dombrovsky *et al*.]. מוטיב חוזר דומה, (YSAP) נצפה בקצה ה- N של MpCP3. מוטיבים חוזרים שנצפו בח"ק של הכנימה *M. persicae*, דומים למוטיבים שדווחו בח"ק של חרקים אחרים כדוגמת APA, AYY, AAPA ו- APAY (Andersen *et al*., 1995) נמצאו מכילים רצפים העשירים בח' האמינו אלאנין פרולין וטירוזין נמצאו בוריאציות שונות, בח"ק מבניים של חרקים שונים. יחד עם זאת, יש לציין כי רצפים דומים וזהים, אותרו בחלבונים מבניים אחרים שאינם קוטיקולריים כדוגמת החלבון (chorion) ממרכיבי מעטפת הביצה (eggshell) (Andersen *et al*., 1995) והחלבון אלסטין (elastin), משערים כי מוטיב זה מאפשר את קיפולו של האלסטין למבנה אופטימאלי המקנה לו את האלסטיות הדרושה לפעילותו (Urry *et al*., 1974; Urry, 1982). מוטיב חוזר המכיל את רצף ח' האמינו P(A/S)YNK ממוקם בקצה ה- C של MpCP3 נמצא ייחודי לכנימות עלה ולא נמצא דומה לו בכל הרצפים של ח"ק הידועים ב חרקים אחרים. יתכן ורצף זה מצוי ומשמש אזור ייחודי בקוטיקולה ה של כנימות עלה.

מוטיב חוזר נוסף, המכיל את רצף ח' האמינו GYQ / GYY מצוי ב- MpCP5 והנו ייחודי לכנימות עלה. מוטיב חוזר עם דמיון מסוים כולל את רצף ח. האמינו GYLG(G/Y)(G/Y) עשיר גם כן

בגליצין וטירוזין תואר בח"ק של חרקים אחרים. לרצף זה יוחסה שם בקרת הביטוי של החלבון נעשית ע"י רמות ההורמון אקדיזון (Højrup *et al*., 1986 ;Apple & Fristrom, 1991).

בח"ק בהם בקרת ביטויים נעשית בהתאם לרמת האקדיזון בהמולימפה של החרק, הוכח כי לאקדיזון יכולת בקרה (up or down regulation) על פעילותם של הפרומוטורים בגנים קוטיקולריים אלו (Noji *et al*., 2003).

השוואת הגנים לחלבנים הקוטיקולריים שבודדו ממינים שונים של כנימות עלה:

השוואת רצף ח' האמינו של הח"ק (חזויים ע"פ הגנים הרלבנטיים) ממינים שונים של כנימות עלה, נעשתה עבור שני ח"ק מסוג RR-2 (MpCP1 ו- MpCP2) וח"ק אחד מסוג RR-1 (MpCP5).

השוואת רצף שלושת הח"ק הנ"ל במיני הכנימות השונות מלמדת אותנו על קיומה של זהות רבה ברצף של הח"ק ההומולוגים במיני הכנימות השונים בעיקר באזור ה- R&R. יחד עם זאת, אפשר היה לעמוד על הימצאותם של אזורים פחות שמורים בקצוות הח"ק, בהם מתקיימת שונות רבה יותר ברצף ואותרו מספר מצומצם של הבדלים. נראה כי מבין שלושת הח"ק אותם בדקנו בקרב מיני הכנימות השונים, MpCP5 מראה את השונות הגבוה ביותר.

הוכחות לקיום זיקה בין חלבון ההלפר הפוטיויראלי לבין חלבונים קוטיקולריים של הכנימה *Myzus persicae*

כפי שצוין בראשית הדיון, היו עד כה רק הוכחות נסיבתיות לכך שחלבון ההלפר הפוטיויראלי נקשר לחדק הכנימה (זיהוי סרולוגי של ההלפר באמצעות מיקרוסקופ אלקטרונים ע"פ השטח של צינור המזון בכנימה *M. persicae* לאחר רכישתו ממברנה (Ammar *et al*., 1994; Blanc *et al*., 1998).

יחד עם זאת, לא היו עד כה האמצעים לאשר זיקה ישירה בין חלבון ההלפר הויראלי לבין הקוטיקולה (המצפה את דוקרני החדק של כנימת העלה) או אל מרכיביה.

בידוד ואפיון של ח"ק של כנימות עלה והכנת הנוגדנים הספציפיים נגדם, אפשרו לראשונה לבחון את קיומה של זיקה בין חלבון ההלפר לחלבון קוטיקולרי. בחינת הזיקה בין חלבון ההלפר הפוטיויראלי לחלבונים קוטיקולריים מכנימת העלה, נעשתה בשתי דרכים:

תחילה, נבחנה אפשרות של קיום זיקה בין חלבון ההלפר לבין ח"ק המבוטאים מספריית ה- cDNA של הכנימה *M. persicae* באמצעות חיידקיי *E. coli*. בניסויים חוזרים רבים לא עלה בידנו לאתר

זיקה בין חלבון ההלפר לחלבוני הכנימה, הסבר אפשרי לאי ההצלחה יכולה להיות נעוצה בהבדל המהותי בביטוי ועיבוד של חלבונים שמקורם בכנימת העלה (eukaryotic) לעומת חלבונים המתקבלים ע״י ביטוי בחיידקיים *E. coli* (prokaryotic) בהם לא קיים תהליך עיבוד של החלבון כגון גליקוזילציה של החלבון הנפוצה מאוד בח״ק. הסבר חלופי (פחות סביר) לחוסר התגובה יכולה להיות העובדה שספריות ה- cDNA אינן מייצגות ומבטאות נכונה את כלל הפוטנציאל החלבוני של כנימת העלה. על מנת להתגבר על הקושי הנ״ל, נעשה ניסיון למצות ח״ק מכנימות עלה שלמות ולבחון את הזיקה של חלבון ההלפר לח״ק לאחר המיצוי. קוטיקולה בוגרת של חרקים, עוברת תהליך של חמצון והקשחה, והחלבונים השקועים בסיבי הכיטין אינם מסיסים ואינם משתחררים בקלות. ע״מ למצות חלבונים לא מסיסים אלו, נעשה בחרקים שונים שימוש בחומרים: Calcofluor, Urea, או Guanidine hydrochloride למיצויים מהקוטיקולה (Fristorm *et al*., 1978; Vail *et al*., 1996). שיטות המיצוי לח״ק פותחו והותאמו לחרקים אחדים, שמרביתם היו גדולים בהרבה מכנימות עלה (כגון חגבים, חיפושיות וכו׳) (Nakato *et al*., 1990; Fristorm, 1991). גודל הכנימות (כ-2 מ״מ) חייב למצות כנימות עלה שלמות ורבות. כפי שדווח לגבי מיצוי ח״ק מחרקים אחרים, נמצא ששני החומרים, 8M Urea ו- 1% Calcofluor אפשרו קבלת מיצוי של ח״ק מכנימת העלה *M. persicae* המייצג מגוון ח״ק בטווח גדלים שבין 5kDa ל- 90kDa (Fristorm *et al*., 1978; Nakato *et al*., 1990). מיצוי החלבונים עם 8M Urea הראה עדיפות על המיצוי עם 1% Calcofluor בכך שהניב פרופיל רחב יותר של חלבונים, בטווח הגדלים שבין 20kDa ל- 90kDa, לכן העדפנו למצות ח״ק מכנימות עלה עם אוריאה בהמשך העבודה. החלבונים שמוצו עם אוריאה מהכנימה *M. persicae* זוהו באמצעות נוגדנים לחלבונים קוטיקולריים שתוארו לעיל. מסתבר שמרבית פסי החלבון שהתקבלו במיצוי הגיבו חיובית לנוגדנים שהוכנו כנגד MpCP2, ולכן נקבעה זהותם כח״ק. יש לזכור שתהליך המיצוי, נעשה על כנימות עלה שלמות, בעוד אתר היעד לזיקה של ההלפר הם ח״ק המצויים בחדק, בשל הגודל המזערי של החדק לא היה מעשי למצות חדקים בלבד. יחד עם זאת, במחקרים על ח״ק בחרקים אחרים נמצא כי הח״ק נוצרים בתאי האפידרמיס אך אינם מושקעים בהכרח בכיטין במקום היווצרותם (Csikos *et al.*, 1999). **לכן, סביר להניח כי מבין כלל החלבונים שמוצו מכנימות עלה שלמות, חלקם ח״ק המצויים גם בחדק הכנימה.** בחינת הזיקה של חלבון ההלפר

הפוטיויראלי אל חלבונים שמוצו מהכנימה *M. persicae* נעשתה בשיטת ה-Overlay. שיטה זו שימשה בעבר לבחינת הזיקה *in-vitro* של חלבון ההלפר אל חלבון מעטפת ויראלי (Blanc *et al.*, 1997) או אל ויריונים המקובעים ע״ג ממברנה של ניטרוצלולוז (Peng *et al.*, 1998). חלבון ההלפר של ZYMV הגיב עם שלושה פסי חלבון מתוך כלל החלבונים שמוצו מהכנימה *M. persicae*. ממצא זה הינו הדיווח הראשון על קיומה של זיקה בין חלבון ההלפר הפוטיויראלי אל חלבונים מהכנימה. על מנת לוודא שתגובה זו איננה אקראית ובעלת ספציפיות, היה צורך להכין חלבון הלפר עם מוטציה באתר שלו מייחסים את הקישור לחדק. לכן, הוכן שבט אינפקטיבי של ZYMV המכיל מוטציה נקודתית להחלפת ח׳ האמינו ליזין (שייר בסיסי בעל מטען חיובי) בח׳ גלוטמית (המכילה שייר חומצי בעל מטען שלילי) באתר השמור KLSC של ZYMV. בעבר הראו Grumet *et al.*, (1992) ו- Atreya & Pirone (1993) שמוטציה באתר זה גרמה לאיבוד יכולתו של חלבון ההלפר לסייע בהעברה של הוירוס. ההשערה, היא כי אתר זה מעורב בזיקה של ההלפר אל אותם גורמים/חלבונים המצויים בחלקו החיצוני של חלל צינור המזון שבחדק הכנימה בתהליך העברה של הפוטיוירוסים (Wang *et al.*, 1996). אתר KLSC מצוי באזור העשיר בח׳ האמינו ציסטאין והיסטידין בעל מבנה של Zinc finger (Robaglia *et al.*, 1989). בעבודות נוספות, בהם למדו את המבנה המרחבי (תלת ממדי - 3D) של חלבון ההלפר, מצאו כי האתר KLSC ממוקם באתרים חיצוניים בחלבון ולכן הוא בעל פוטנציאל להגיב עם חלבונים אחרים (Plisson *et al.*, 2003; Ruiz-Ferrer *et al.*, 2005). השוואת הזיקה בין חלבוני ההלפר תקין (KLSC) לא פעיל (ELSC) אל מיצוי החלבונים במיצוי מהכנימה *M. persicae*, הראתה זיקה של ההלפר התקין לחלבוני כנימה. לעומתו, ההלפר עם המוטציה של ELSC לא הראה זיקה לחלבוני הכנימה. העובדה כי לא נצפתה זיקה של ההלפר המוטנט אל החלבונים במיצוי מהכנימה *M. persicae*, יכולה לרמז על כך שהמוטציה באתר KLSC באזור ה- Zinc finger משבשת את המבנה המרחבי של חלבון ההלפר ובכך את תפקודו. על מנת לוודא כי הזיקה של חלבון ההלפר של ZYMV היא אכן ספציפית לח״ק של הכנימה *M. persicae* הידועה כווקטור יעיל במיוחד של ZYMV, נבדקה יכולת הזיקה של חלבון ההלפר של ZYMV אל מיצוי ח״ק מכנימת עלה הכרוב *B. brassicae* (שלא יכולה להעביר ויריונים באמצעות ההלפר של ZYMV) או אל מיצוי ח״ק מכנימת עש הטבק *B. tabaci* (איננה מסוגלת לשמש ווקטור של

פוטיוירוסים). תוצאות ניסויי הקישור הנ"ל הראו כי ההלפר של ZYMV מראה זיקה רק אל חלבונים במיצוי מהכנימה *M. persicae*. תוצאות אלו עולות בקנה אחד עם תוצאות ניסויי העברה של ZYMV באמצעות מיני כנימות עלה ראה סעיף 3.2 (Dombrovsky *et al.*, 2005).

עבודה זו מוכיחה כי, מתקיימת זיקה *in vitro* של ויריונים (חלבוני מעטפת) של ZYMV אל הח"ק של הכנימה *M. persicae*, רק כאשר הוסף חלבון הלפר פעיל אל הויריונים. תוצאות אלו עולות בקנה אחד עם הנחת הגשר שהוצעה בראשית שנות ה- 70 (Govier & Kassanis, 1972b) ונתמכה עם תוצאותיהם של רוב מוחלט של העבודות בתחום (Wang *et al.*,1998; Blanc *et al.*, 1997) ושוללת את האפשרות כי מתקיים קישור של חלבוני המעטפת אל חלבוני הכנימה כפי שנטען ע"י Salomon & Bernardi, (1995). על מנת לקבוע את זהות חלבון הכנימה המעורב בזיקה להלפר, נעשה שימוש בג'ל חד-ממדי להפרדה של החלבונים במיצוי. באופן זה זוהו שלושה פסי חלבון בעלי יכולת זיקה ספציפית אל חלבון ההלפר של ZYMV. עם זאת, לא עלה בידנו לבודד בנפרד כ"א משלשת הפסים למרות ניסויים חוזרים בריכוזי אקרילאמיד שונים בג'ל ההפרדה.

על מנת לקבל הפרדה טובה יותר של מיצוי הח"ק מהכנימה *M. persicae* נעשה שימוש בהפרדה דו-ממדית (2D) של חלבונים. זהותם של כתמי החלבון לאחר ההפרדה נקבע באמצעות הנוגדן כנגד MpCP2. בחינת התגובה של חלבון ההלפר של ZYMV אל כתמי החלבון שהתקבלו אחרי ההפרדה הדו-ממדית אפשרה זיהוי זיקה (בעוצמה שונה) אל 15 כתמי חלבון.

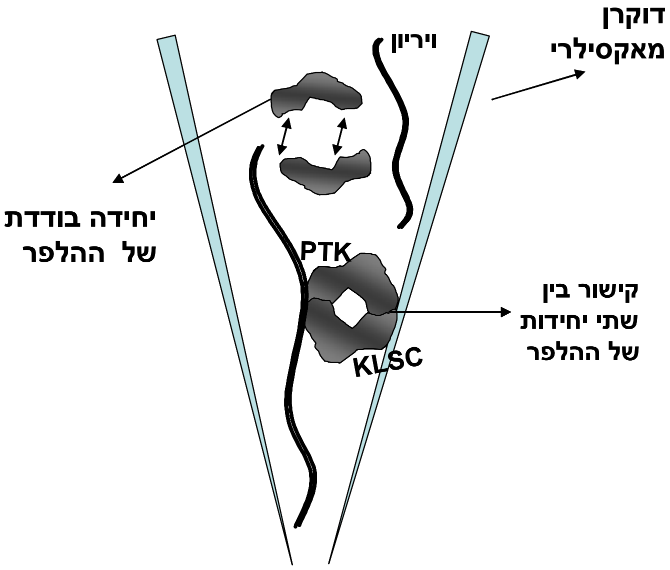
יתרונה של שיטת ההפרדה הדו-ממדית, היה בכך שאפשרה לחלץ בקלות יחסית מהג'ל את כתמי החלבונים שהראו זיקה אל ההלפר. זיהוי כתמי החלבון במיצוי מהכנימה *M. persicae* שהגיבו עם חלבון ההלפר כחלבונים קוטיקולריים התבסס על שתי שיטות משלימות: האחת, קביעת רצף החלבון וזיהויו כח"ק (חסרונה שהיא תלויה במסד הנתונים המצומצם לח"ק של כנימות עלה) ושנייה ע"ס התגובה של כ"א מן הכתמים לנוגדן כנגד MpCP2. מרבית כתמי החלבונים במיצוי מ- *M. persicae* אשר הראו זיקה אל חלבון ההלפר זוהו באחת או בשתי שיטות הזיהוי הנ"ל (סיכום הנתונים מפורט בטבלא מס' 10). רצפי ה- cDNA והגנים הגנומים של הח"ק שבודדו מכנימות העלה והופקדו על ידנו בבנק הגנים GenBank, אפשרו יצירת מסד נתונים אשר שימש אותנו כבסיס להשוואה של הפפטידים שהתקבלו בבדיקת רצף ח' האמינו (LC-MS/MS) של חלבוני כנימה שמוצו מכנימות

שלמות והראו זיקה אל חלבון ההלפר. המידע הרב, שהתקבל על הגנים והחלבונים קוטיקולריים של כנימות עלה אפשר לנו לקדם את הידע להבנת מנגנון העברה של הפוטיוירוסים באמצעות כנימות עלה. עבודה זו סיפקה עדות ראשונה לקיומה של זיקה *in-vitro* בין חלבון ההלפר הפוטיויראלי של ZYMV לחלבונים קוטיקולריים של הכנימה *M. persicae*. לכן, הנתונים שבידנו עד כה, מאפשרים לטעון שהשערת המוצא כי חלבונים קוטיקולריים המצויים בציפוי הקוטיקולרי של חלל צינור המזון שבחדק הכנימה מעורבים בזיהוי וקישור של חלבון ההלפר הפוטיויראלי יש לה על מה להסתמך. בעתיד, יידרשו ניסוים *in vivo* ע״מ לקבוע בוודאות שהח״ק משמשים ״כרצפטורים״ לזיהוי וקישור של חלבוני ההלפר בחדק הכנימה. יש להניח כי אל בסיס הנתונים שיצרנו על הגנים והחלבונים הקוטיקולריים של כנימות העלה בבנק הגנים יוכל לשמש בעתיד גם עבודות נוספות העוסקות בוירוסים חולפים אחרים מקבוצות שונות כגון *Cucumber Mosaic Virus* (CMV) מקבוצת ה-Cucumoviruses בהם חלבון המעטפת הויראלי נקשר ישירות אל אזורים נרחבים בציפוי הקוטיקולרי של חלל צינור המזון שבחדק הכנימה (Perry, *et al*., 1994; 1998). ניסיון לאפיין את האינטראקציה בין וירוסים לכנימות עלה המשמשים כווקטור נעשה גם בוירוסים מקבוצת ה-Polerovirus המועברים בצורה מתמדת וצירקולטיבית (circulative). מנגנון ההעברה של קבוצת וירוסים זו הוא שונה ומורכב בהרבה ממנגנון ההעברה של וירוסים חולפים: הויריונים חודרים את ממברנת המעי משתכפלים ומניצים אל חוץ המעי ונודדים בהמולימפה אל בלוטות הרוק. צורת העברה זו מחייבת מעורבות של אברים וחלבונים שונים של כנימת העלה. ע״מ לאפיין את חלבוני כנימת העלה המעורבים בתהליך, נעשה בעבודות אלו שימוש הן בהפרדה דו-ממדית של החלבונים, והן בבחינת זיקה בין הויריונים לבין חלבוני כנימה. בניסויי זיקה *in-vitro* זוהו החלבונים Rack-1, GAPDH3 ו- Actin מהכנימה *M. persicae* כמעורבים בזיקה אל ויריונים של (BWYV) *Beet Western Yellow Virus* (Seddas *et al*., 2004). הוכחות לקיום זיקה בין ההלפר לחלבונים הקוטיקולריים של כנימות העלה, מחייבות התייחסות אל העובדה כי חלבון ההלפר פעיל בהעברה כדימר (Thornbury & Hellman, 1985; Plisson *et al*., 2003).

נשאלת השאלה כיצד מעורבת שתי תת-היחידות בתהליך ההעברה?

אין עדיין ממצאים ניסויים המסבירים את האופן שבו שתי היחידות של חלבון ההלפר פועלות בעת ההעברה. אפשרות מקובלת על חוקרים אחדים (ראה סקירתם של Pirone & Blanc, 1996) היא

שצידה האחד של יחידת חלבון ההלפר הראשונה קשורה אל דופן צינור המזון בחדק הכנימה, בעוד צידה קשור אל יחידה חלבון ההלפר השנייה ואילו הקצה השני קשור לויריון, ראה סכמה בתמונה מספר 35.



תמונה מספר 35. מעורבות חלבון ההלפר בקישור ויריונים אל הציפוי הקוטיקולרי בחלל צינור המזון שבחדק הכנימה.

בוירוסים חולפים, הקישור והשחרור של הוירוס מן החדק נעשה בפרק זמן קצר. מחקר זה תרם להבנת הזיקה וממנה על הקישור של הוירוס באמצעות חלבון ההלפר לכנימה. מאידך, עדין חסר מידע רב להבנת מנגנון השחרור של הויריונים בתהליך ההדבקה. ייתכנו לפחות שלוש אפשרויות

I. הויריון משתחרר מן ההלפר, בעוד ההלפר נשאר צמוד לחדק.

II. הויריון משתחרר מן החדק בעודו קשור להלפר (ההלפר מתנתק כולו מן החדק).

III. יחידת חלבון הלפר אחד נשארת קשורה לחדק, ואילו היחידה השנייה, משתחררת לציטופלסמה בעודה קשורה לויריון.

בתהליך השחרור יכולים להיות מעורבים גורמים התלויים בכנימת העלה, כגון חלבונים פרוטאוליטים המצויים בנוזל הרוק של הכנימה (שיוכלו אולי לגרום לשחרור יחידת הלפר אחת מרעותה או לשחרור הויריון מן ההלפר. תהליך השחרור עשוי להיות מוכתב ע"י גורמים הנתרמים

ע״י הצמח הפונדקאי ממנו ניזונה כנימת העלה, כגון דרגת ה- pH בתאי הצמח עשויה לגרום לשינוי מטען ובכך לגרום לדיסוציאציה (disassociation) של יחידות חלבון ההלפר או לניתוק הויריון מן ההלפר. יידרש מחקר נוסף ע״מ לקבוע אילו מן האפשרויות הנזכרות לעיל, אכן קורה בחדק, וכיצד הידע שנאסף בעבודה זו, יוכל לסייע בליבון אפשרויות אלו. אם אכן יתברר שהויריון המשתחרר לתוך הציטופלסמה של הצמח, נשאר צמוד לחלבון ההלפר, לדבר יכולה להיות משמעות פיסיולוגית. ייתכן ובכך מסייע ההלפר הקשור לויריון, בשלבים הראשונים של תנועתו בתא מאחר והוכח שלחלבון ההלפר יש גם תפקיד של חלבון תנועה(Cronin *et al.*, 1995; Rojas *et al.*, 1997).

סיכום ממצאי העבודה:

- הראנו כי מינים שונים של כנימות עלה נבדלים ביכולתם להעביר פוטיוירוסים שונים.
- הצבענו על כך שמיני כנימות העלה נבדלים ביכולת ההעברה של פוטיוירוסים בכך שמתקיימת ״הכרה ״ או ״ זיקה״ אל חלבון הלפר מתאים.
- הוכחנו שהקצה ה- N של חלבון המעטפת הפוטיויראלי, מעורב בקביעת ההתאמה לסוג חלבון ההלפר.
- יצרנו מסד נתונים חדש של cDNA וגנים לח״ק של כנימות עלה.
- התקבלו חלבונים קוטיקולריים של כנימות עלה ע״י מיצוי מכנימות עלה ונקבעה זהותם באמצעות הפרדה דו ממדית, קביעת רצף ואפיון סרולוגי.
- הראנו לראשונה, קיומה של זיקה *in-vitro* בין חלבון ההלפר הפוטיויראלי אל ח״ק של כנימת העלה.

עבודה זו פותחת אפשרויות חדשות לאפיון הקשר בין ההלפר לכנימות עלה. בעתיד יהיה צורך לבחינת קיומה של זיקה גם עם חלבוני הלפר של פוטיוירוסים נוספים ועם מיצוי ח״ק ממינים נוספים של כנימות עלה. בעתיד כאשר שיטות הזיהוי יהיו רגישות יותר יתאפשר לאתר את הח״ק אשר מגיבים עם ההלפר בחלל צינור המזון ולבחון קיום זיקה *in-vivo*.

רשימת ספרות:

Allison, R.F., Dougherty, W., Park, T.D., Willis, J., Johnston R.E., Kelly, M.E. & Armstrong, F.B. (1985). Biochemical analysis of the capsid protein of *tobacco etch virus*: N-terminal amino acids are located on the virion's surface. Virology. 147, 309-316.

Ammar, E.D., Jarlfors, U. & Pirone, T.P. (1994). Association of potyvirus helper component protein with virions and the cuticle lining the maxillary food canal and foregut of an aphid vector. Phytopathology. 84, 1054-1060.

Andersen, S.O., Højrup, P., & Roepstorff, P. (1986). Characterization of cuticular proteins from the migratory locust, *Locusta migratoria*. Insect Biochemistry. 16, 441-447.

Andersen, S.O. & Højrup, P. (1987). Extractable proteins from abdominal cuticle of sexually mature locusts, *Locusta migratoria*. Insect Biochemistry. 17, 45–51.

Andersen, S.O., Højrup, P. & Roepstorff, P. (1995). Insect cuticular proteins. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 25, 153-176.

Andersen, S.O., Rafn, K. & Roepstorff, P. (1997). Sequence studies of proteins from larval and pupal cuticle of the yellow meal worm, *Tenebrio molitor*. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 27, 121-131.

Andersen, S.O. (1998). Amino acid sequence studies on endocuticular proteins from the desert locust, *Schistocerca gregaria*. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 28, 421-434.

Andersen, S.O. (2000). Studies on proteins in post-ecdysial nymphal cuticle of locust, *Locusta migratoria*, and cockroach, *Blaberus craniifer*. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 30, 569-577.

Andersen, S.O. (2002). Characteristic properties of proteins from pre-ecdysial cuticle of larvae and pupae of mealworm *Tenebrio molitor*. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 32, 1077-1087.

Andrejeva, J., Puurand, U., Merits, A., Rabenstein, F., Jarvekulg, L. & Valkonen, J.PT. (1999). Potyvirus helper component-proteinase and coat protein (CP) have coordinated functions in virus-host interaction and the same CP motif affects virus transmission and accumulation. Journal of General Virology. 80, 1133-1139.

Antignus, Y., Raccah, B., Gal-On, A. & Cohen, S. (1989). Biological and serological characterization of *zucchini yellow mosaic* and *watermelon mosaicvirus-2* isolates in Israel. Phytoparasitica. 17, 289-298.

Apple, R.T. & Fristrom, J.W. (1991). 20-Hydroxyecdysone is required for, and negatively regulates, transcription of *Drosophila* pupal cuticle protein genes. Developmental Biology. 146, 569–582.

Arazi, T., Shiboleth, Y.M. & Gal-On, A. (2001). A nonviral peptide can replace the entire N terminus of *zucchini yellow mosaic potyvirus* coat protein and permits viral systemic infection. Journal of Virology. 75, 6329-36.

Ashida, M. & Brey, P.T. (1995). Role of integument in insect defense: prophenoloxidase cascade in the cuticular matrix. Proceedings of National Academy of Science, USA. 92, 10698-10702.

Ashida, M. & Brey, P.T. (1998). Recent advances in research on the insect prophenoloxidase cascade. In: Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insects (P.T. Brey & D. Hultmark, eds). Chapman & Hall, London. pp 135-172.

Atreya, C.D., Raccah, B. & Pirone, T.P. (1990). A point mutation in the coat protein abolishes aphid transmissibility of a potyvirus. Virology. 178, 161-165.

Atreya, P.L., Atreya, C.D. & Pirone, T.P. (1991). Amino acid substitutions in the coat protein result in loss of insect transmissibility of a plant virus. Proceedings of National Academy of Science, USA. 88, 7887-7891.

Atreya, C.D., Atreya, P.L., Thornbury, D.W. & Pirone, T.P. (1992). Site-directed mutations in the potyvirus HC-Pro gene affect helper component activity, virus accumulation, and symptom expression in infected tobacco plants. Virology. 191, 106-111.

Atreya, C.D. & Pirone, T.P. (1993). Mutational analysis of the helper component-proteinase gene of a potyvirus: effect of amino acid substitutions, deletions and gene replacement on virulence and aphid transmissibility. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA. 90, 11919-11923.

Ballut, L., Drucker, M., Pugniere, M., Cambon, F., Blanc, S., Roquet, F., Candresse, T., Schmid, H.P., Nicolas, P., Gall, O.L. & Badaoui, S. (2005). Hc-Pro, a multifunctional protein encoded by a plant RNA virus, targets the 20S proteasome and affects its enzymic activities. Journal of General Virology. 86, 2595-2603.

Baratova, L.A., Efimov, A.V., Dobrov, E.N., Fedorova, N.V., Hunt, R., Badun, G.A., Ksenofontov, A.L., Torrance, L. & Jarvekulg, L. (2001). *In situ* spatial organization of

Potato virus A coat protein subunits as assessed by tritium bombardment. Journal of Virology. 75, 9696-9702.

Baulcombe, D.C. (1996). Mechanisms of pathogen-derived resistance to viruses in transgenic plants. Plant Cell. 8, 1833–1844.

Baumann, P., Moran, N.A. & Baumann, L. (1997). The Evolution and Genetics of Aphid Endosymbionts. Bioscience. 47, 12-20.

Baunoch, D.A., Das, P. & Hari, V. (1990). *Potato virus Y* helper component protein is associated with amorphous inclusion. Journal of General Virology. 71, 2479-2482.

Baunoch, D.A., Das, P., Browning, M.E. & Hari, V. (1991). A temporal study of the expression of the capsid, cytoplasmic inclusion and nuclear inclusion proteins of *tobacco etch potyvirus* in infected plants. Journal of General Virology. 72, 487–492.

Binger, L.C. & Willis, J.H. (1994). Identification of the cDNA, gene and promoter for a major protein from flexible cuticles of the giant silkmoth *Hyalophora cecropia* Insect Biochemistry and Molecular Biology. 24, 989-1000.

Blackman, R.L. & Eastop, V.F. (1984). Aphids on the world crops. An identification guide. (A Wiley-interscience publication). pp 1-415.

Blanc, S., Lopez-Moya, J.J., Wang, R., Garcia-Lampasona, S., Thornbury, D.W. & Pirone, T.P. (1997). A specific interaction between coat protein and helper component correlates with aphid transmission of a potyvirus. Virology. 231, 141–147.

Blanc, S., Ammar, E.D., Garcia-Lampasona, S., Dolja, V.V., Llave, C., Baker, J. & Pirone, T.P. (1998). Mutations in the potyvirus helper component protein: Effects on interactions with virions and aphid stylets. Journal of General Virology. 79, 3119–3122.

Bradley, R.H. (1956). Effects of depth of stylet penetration on aphid transmission of *potato virus Y*. Canadian Journal of Microbiology. 6, 539-547.

Brunt, A.A. (1992). The general properties of potyviruses. Archives of Virology. 5, 3-16.

Carrington, J.C. & Dougherty, W.G. (1988). A viral cleavage site cassette: identification of amino acids sequences required for *tobacco etch virus* polyprotein processing. Proceedings of National Academy of Science, USA. 85, 3391-3395.

Carrington, J.C., Freed, D.O. & Oh, C.S. (1990). Expression of potyviral polyprotein in transgenic plant reveals three proteolytic activities required for complete processing. EMBO Journal. 9, 1347-1353.

Carrington, J.C., Haldeman, R., Dolga, V.V. & Restrepo, H.M. (1993). Internal cleavage and trans-proteolytic activities of the VPg-proteinase (NIa) of *tobacco etch potyvirus in vivo*. Journal of Virology. 67, 6995-7000.

Carrington, J.C., Kasschau, K.D., Mahajan, S.K. & Schaad, M.C. (1996). Cell-to-cell and long-distance movement of viruses in plants. Plant Cell. 8, 1669-1681.

Carrington, J.C., Jensen, P.E. & Schaad, M.C. (1998). Genetic evidence for an essential role for potyvirus CI protein in cell-to-cell movement. Plant Journal.14, 393–400.

Cavener, D. (1987). Comparison of the consensus sequence flanking translationa1 start site in *Drosophila melanogaster* and vertebrates. Nucleic Acids Research. 15, 1353-1361.

Charles, J.P., Bouhin, H., Quennedey, B., Courrent. A. & Delachambre, J. (1992). cDNA cloning and deduced amino acid sequence of a major, glycine-rich cuticular protein from the coleopteran *Tenebrio molitor*. Temporal and spatial distribution of the transcript during metamorphosis. European Journal of Biochemistry. 206, 813-819.

Charles, J.P., Chihara, C., Nejad, S. & Riddiford, L.M. (1997). A cluster of cuticle protein genes of *Drosophila melanogaster* at 65A: sequence, structure and evolution. Genetics Society of America. 147, 1213-1224.

Charles, J.P., Chihara, C., Nejad, S. & Riddiford, L.M. (1998). Identification of proteins and developmental expression of RNAs encoded by the 65A cuticle protein gene cluster in *Drosophila melanogaster*. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 28, 131-138**.**

Chihara, C.J., Silvert, D.J. & Fristrom, J.W. (1982). The cuticle proteins of *Drosophila melanogaster*: stage specificity. Developmental Biology. 89, 379-388.

Choi, T., Huang, M., Gorma, C. & Jaenisch, R. (1991). A generic intron increases gene expression in transgenic mice. Molecular and Cellular Biology. 11, 3070-3074.

Cox, D.L. & Willis, J.H. (1985). The cuticular proteins of *Hyalophora cecropia* from different anatomical regions and metamorphic stages. Insect Biochemistry.15, 349-362.

Cox, D.L. & Willis, J.H. (1987). Analysis of the cuticular proteins of *Hyalophora cecropia* with two dimensional electrophoresis. Insect Biochemistry.17, 457-468.

Cronin, S., Verchot, J., Haldeman-Cahill, R., Schaad, M.C. & Carrington, J.C. (1995). Long-distance movement factor: a transport function of the potyvirus helper component proteinase. Plant Cell. 7, 549-559.

Csikos, G., Molnar, K., Borhegyi, N.H., Talian, G.C. & Sass, M., (1999). Insect cuticle, an *in vivo* model of protein trafficking. Journal of Cell Science. 112, 2113-2124.

Desbiez, C. & Lecoq, H. (2004). The nucleotide sequence of Watermelon mosaic virus (WMV, Potyvirus) reveals interspecific recombination between two related potyviruses in the 5' part of the genome. Archives of Virology. 149, 1619-1632.

Dolja, V.V. & Carrington, J.C. (1992). Evolution of positive strand RNA viruses. Seminars in Virology. 3, 315-326.

Dolja, V.V., Haldeman, R., Robertson, N.L., Dougherty, W.G. & Carrington, J.C. (1994). Distinct functions of capsid protein in assembly and movement of *tobacco etch potyvirus* in plants. EMBO Journal. 13, 1482-1491.

Dolja, V.V., Haldeman-Cahill, R., Montgomery, A.E., Vandenbosch, K.A. & Carrington, J.C. (1995). Capsid protein determinants involved in cell to cell and long distance movement of *tobacco etch potyvirus*. Virology. 206, 1007-1016.

Dombrovsky, A., Huet, H., Zhang, H., Chejanovsky, N. & Raccah, B. (2003). Comparison of newly isolated cuticular protein genes from six aphid species. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 33, 709-715.

Dombrovsky, A., Huet, H., Chejanovsky, N. & Raccah, B. (2005). Aphid transmission of a potyvirus depends on suitability of the helper component and the N terminus of the coat protein. Archives of Virology. 150, 287-298.

Domier, L.L., Shaw, J.G. & Rhoads, R.E. (1987). Potyviral protein share amino acid sequence homology with picorna, como and caulimoviral protein. Virology. 158, 20-27.

Dotson, E.M., Cornel, A.J., Willis, J.H. & Collins, F.H. (1998). A family of pupal-specific cuticular protein genes in the mosquito *Anopheles gambiae*. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 28, 459-472.

Dougherty, W.G. & Carrington, J.C. (1988). Expression and function of potyviral gene produce. Annual Review of Phytopathology. 26, 123-143.

Dougherty, W.G. & Parks, T.D. (1991). Post-translational processing of the *tobacco etch virus* 49-kDa small nuclear inclusion polyprotein: identification of an internal cleavage site and delimitation of VPg and proteinase domains. Virology. 183, 449-456.

Eagles, R.M., Balmori-Melián, E., Beck, D.L., Gardner, R.C. and Forster, R.L.S. (1994). Characterization of NTPase, RNA-binding and RNA-helicase activities of the cytoplasmic inclusion protein of *tamarillo mosaic potyvirus*. European Journal of Biochemistry. 224, 677–684.

Eastop, V.F. (1977). Worldwide importance of aphids as virus vectors. In: (KF Harris. and K. Maramorosch. (Eds)). Aphids as Virus Vectors. Academic Press Inc. pp 4-61.

English, J.J., Mueller, E. & Baulcombe, D.C. (1996). Suppression of virus accumulation in transgenic plants exhibiting silencing of nuclear genes. Plant Cell. 8, 179-188.

Flasinski, S. & Cassidy, B.G. (1998). Potyviruses aphid transmission requires helper component and homologous coat protein for maximal efficiency. Archives of Virology. 143, 2159-2172.

Forbes, A.R. (1977). The mouthparts and feeding mechanisms of aphids. In "Aphids as Virus Vectors" (K.F. Harris and K. Maramorosch eds). pp. 83-103. Academic Press, NY.

Fristrom, J.W., Hill, R.J. & Watt, F. (1978). The procuticle of Drosophila: heterogeneity of urea-soluble proteins. Biochemistry. 17, 3917-3924.

Gallie, D.R. (2001). Cap-independent translation conferred by the 5' leader of *tobacco etch virus* is eukaryotic initiation factor 4G dependent. Journal of Virology. 75, 12141-12152.

Gal-On, A., Antignus, Y., Rosner, A. & Raccah, B. (1991). Infectious *in vitro* RNA transcripts derived from cloned cDNA of cucurbit potyvirus, *zucchini yellow mosaic virus*. Journal of General Virology. 72, 2639-2643.

Gal-On, A., Antignus, Y., Rosner, A. & Raccah, B. (1992). A *zucchini yellow mosaic virus* coat protein gene mutation restores aphid transmissibility but has no effect on multiplication. Journal of General Virology. 73, 2183-2187.

Gal-On, A., Meiri, E., Huet, H., Hua, W.J., Raccah, B. & Gaba, V. (1995). Particle bombardment drastically increased the infectivity of cloned DNA of *zucchini yellow mosaic* potyvirus. Journal of General Virology. 77, 3223-3227.

Gal-on, A., Meiri, E., Elman, C., Gray, D.J. & Gaba, V. (1997). Simple hand-held devices for the efficient infection of plants with viral-encoding constructs by particle bombardment. Journal of Virological Methods. 64, 103-110.

Gal-On, A. & Raccah, B. (2000). A point mutation in the FRNK motif of the potyvirus HC-Pro gene alters symptom expression in cucurbits and elicits protection against the severe homologous virus. Phytopathology. 90, 467–473.

Gamez, R. & Watson, M.A. (1964). Failure of anesthetize aphid to acquire or transmit henbane mosaic virus when their sytlets were artificially inserted into leaves of infected or healthy tobacco plants. Virology. 22, 292-295.

Goldbach, R. (1986). Molecular evolution of plant RNA Viruses. Annual Review of Phytopathology. 24, 289-310.

Govier, D.A. & Kassanis, B. (1974a). Evidence that a component other than the virus particle is needed for aphid transmission of *potato virus Y*. Virology. 57, 285-286.

Govier, D.A. & Kassanis, B. (1974b). A virus induced component of plant sap needed when aphids acquire *potato virus Y* helper component. Virology. 61, 420-426.

Govier, D.A., Kassanis, B. & Pirone, T.P. (1977). Partial purification and characterization of the *potato virus Y* helper component. Virology. 78, 306-314.

Gray, S.M. (1996). Plant virus proteins involved in natural vector transmission. Trends in Microbiology. 4, 259-264.

Gray, S.M. & Banerjee, N. (1999). Mechanisms of arthropod transmission of plant and animal viruses. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 63, 128-148.

Grumet, R., Bade, R. & Hammar, S. (1992). Analysis of the *zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) potyviral helper component, possible identification of an aphid-interaction domain.[Abstract]. Phytopathology. 82, 1176.

Guo, D., Mertis, A. & Saarma, M. (1999). Self-association and mapping of interaction domains of helper component-proteinase of *potato A* potyvirus. Journal of General Virology. 80, 1127-1131.

Hamodrakas, S.J., Willis, J.H. & Iconomidou, VA. (2002). A structural model of the chitin- binding domain of cuticle proteins. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 32, 1577-1583.

Harrington, R., Katis, N. & Gibson R.W. (1986). Field assessment of the relative importance of different aphid species in the transmission of *potato virus Y*. Potato Research 29, 67-76.

Harris, K.F. (1977). An ingestion–egestion hypothesis of noncirculative virus transmission. In: Aphids as Virus Vectors 1st edn, Edited by K. Maramorosch. New York: Academic Press. pp 165-220.

Harrison, B.D. & Robinson, D.J. (1988). Molecular variation in vector-borne plant viruses: epidemiological significance. Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences. 321, 447-462.

Henikoff, S., Keene, M.A., Fechtel, K. & Fristrom, J.W. (1986). Gene within a gene: nested *Drosophila* genes encode unrelated proteins on opposite DNA strands. Cell. 44, 33–42.

Højrup, P., Andersen, S.O. & Roepstorff, P. (1986). Primary structure of a structural protein from the cuticle of the migratory locust, *Locusta migratoria*. The Biochemical Journal. 236, 713–720.

Horodyski, F.M. & Riddiford, L.M. (1989). Expression and hormonal control of a new larval multigene family at the onset of metamorphosis of the tobacco hornworm. Developmental Biology. 132, 292–303.

Huet, H., Gal-On, A., Meir, E., Lecoq, H. & Raccah, B. (1994). Mutations in the helper component protease gene of *zucchini yellow mosaic virus* affect its ability to mediate aphid transmissibility. Journal of General Virology. 75, 1407-1414.

Iconomidou, V.A., Willis, J.H., & Hamodrakas, S.J. (2005). Unique features of the structural model of 'hard' cuticle proteins: implications for chitin-protein interactions and cross-linking in cuticle. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 35, 553-560.

Jagadish, M.N., Ward, C.W., Gough, K.H., Tulloch, P.A., Whittaker, L.A. & Shukla, D.D. (1991). Expression of potyvirus coat protein in *Escherichia coli* and yeast and its assembly into virus-like particles. Journal of General Virology. 72, 1543-1550.

Jagadish, M.N., Huang, D. & Ward, C.W. (1993). Site-directed mutagenesis of a potyvirus coat protein and its assembly in *Escherichia coli*. Journal of General Virology. 74, 893–896.

Kadoury, D., Peng, Y.H., Wang, Y., Singer, S., Huet, H., Raccah, B. & Gal-On A. (1998). Affinity purification of HC-Pro of potyvirus with Ni^{+2}-NTA resin. Journal of Virological Methods. 76, 19-29.

Kalume, D.E., Kieffer, S., Rafn, K., Skou, L., Andersen, S.O. & Roepstorff, P. (2003). Sequence determination of three cuticular proteins and isoforms from the migratory locust, *Locusta migratoria*, using a combination of Edman degradation and mass spectrometric techniques. Biochimica et Biophysica Acta. 1645, 152-163.

Kassanis, B. (1961). The transmission of the *potato aucuba mosaic virus* by aphid from plants also infected by *potato virus A* or *Y*. Virology. 13, 93-97.

Kassanis, B., & Govier, D.E. (1971a). New evidence on the mechanism of aphid transmission of *potato virus C* and *potato aucuba virus*. Journal of General Virology. 10, 99-101.

Kassanis, B. & Govier, D.E. (1971b). The role of helper virus in aphid transmission of *potato aucuba mosaic virus* and *potato virus C*. Journal of General Virology. 13, 221-228.

Kasschau, K.D., Cronin, S. & Carrington, J.C. (1991). Genome amplification and long-distance movement function associated with the central domain of *tobacco etch potyvirus* helper component-proteinase. Virology. 228, 251-262.

Kasschau, K.D. & Carrington, J.C. (1995). Requirement for HC-Pro processing during genome amplification of *tobacco etch potyvirus*. Virology. 209, 268-273.

Kasschau, K.D. & Carrington, J.C. (1998). A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. Cell. 95, 461–470.

Kasschau, K.D., Xie, Z., Allen, E., Llave, C., Chapman, E.J.,. Krizan, K.A. & Carrington, J.C. (2003). P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA function. Developmental Cell. 4, 205–217.

Kaufman, T.C., Seeger, M.A. & Olsen, G. (1990). Molecular and genetic organization of the antennapedia gene complex of *Drosophila melanogaster*. Advances in Genetics. 27, 309-362.

Kennedy, J.S., Day, M.F. & Eastop, V.F. (1962). A conspectus of aphid as a vectors of plant viruses. Commonwealth Institute of Entomology, London. 1-114.

Kim, S.R., Yoon, H.J., Lee, K.S., Kim, I., Je, Y.H., Sohn, H.D. & Jin, BR. (2003). Molecular cloning of three cDNAs encoding putative larval cuticle protein expressed differentially after larval ecdysis from the mulberry longicorn beetle, *Apriona germari*. Comparative Biochemistry and Physiology. 136, 803-811.

Kimalov, B., Gal-On, A., Stav, R., Belausov, E. & Arazi, T. (2004). Maintenance of coat protein N-terminal net charge and not primary sequence is essential for *zucchini yellow mosaic virus* systemic infectivity. Journal of General Virology. 85, 3421-3430.

Klarskov, K., Hojrup, P., Andersen, S.O. & Roepstorff, P. (1989). Plasma-desorption mass spectrometry as an aid in protein sequence determination. Application of the method on a cuticular protein from the migratory locust (*Locusta migratoria*). Biochemical Journal 262, 923-930.

King, A.M.Q., Lomonssoff, G.P. & Ryan, M.D. (1991). Picornaviruses and their relatives in the plant kingdom. Seminars in Virology. 2 , 11-19.

Klein, P.G., Klein, R.R., Rodriguez-Cerezo, E., Hunt, A.G. & Shaw, J.G. (1994). Mutational analysis of the *tobacco vein mottling virus* genome. Virology. 204, 759-769.

Kolb, A. (2003). The first intron of the murine β-casein gene contains a functional promoter. Biochemical and biophysical research communications 306,1099-1105.

Kornezos, A. & Chia, W. (1992). Apical secretion and association of the *Drosophila* yellow gene product with developing larval cuticle structures during embryogenesis. Molecular and general genetics. 235, 397-405.

Krogh, T.N., Skou, L., Roepstorff, P., Andersen, S.O & Hojrup, P. (1995). Primary structure of proteins from the wing cuticle of the migratory locust, *Locusta migratoria.* Insect Biochemistry and Molecular Biology. 3, 319-329.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227, 680-685.

Lain, S., Riechmann, J.L., Mendez, E. & Garcia, J.A. (1988). Nucleotide sequence of the 3' terminal region of *plum pox potyvirus* RNA. Virus Research. 10, 325-342.

Lain, S., Riechmann, J.L. & Garcia, J.A. (1990). RNA helicase: a novel activity associated with a protein encoded by a positive strand RNA virus. Nucleic Acids Research. 18, 7003-7006.

Lampe, D.J. & Willis, J.H. (1994). Characterization of a cDNA and gene encoding a cuticular protein from rigid cuticles of the giant silkmoth, *Hyalophora cecropia*. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 24, 419-435.

Lassandro, F., Sebastiano, M., Zei, F. & Bazzicalupo, P. (1994). The role of dityrosine formation in the crosslinking of CUT-2, the product of a second cuticlin gene of *Caenorhabditis elegans*. Molecular and Biochemical Parasitology. 65, 147-159.

Le Hir, H., Nott, A. & Moore, M.J. (2003). How introns influence and enhance eukaryotic gene expression. Trends in Biochemical Sciences. 28, 215-220.

Lecoq, H. & Pitrat, M. (1984). Interaction of *Zucchini Yellow Mosaic Virus* Strains and Muskmelon Lines. Cucurbit Genetics Cooperative Report. 7, 43-44.

Lecoq, H. & Pitrat, M. (1985). Specificity of the helper component mediated aphid transmission of three potyviruses infecting muskmelon. Phytopathology. 75, 890-893.

Lecoq, H., Bourdin, D., Raccah, B., Hiebert, E. & Purcifull, D.E. (1991). Characterization of *zucchini yellow mosaic virus* isolate with a deficient helper component. Phytopathology. 81, 1087-1091.

Lee, W.J. & Brey, P.T. (1994). Isolation and identification of cecropin antibacterial peptides from the extracellular matrix of the insect integument. Analytical Biochemistry. 217, 231-235.

Lemoine, A., Mathelin, J., Braquart-Vernier, C., Everaerts, C. & Delachambre, J. (2004). A functional analysis of ACP-20, an adult-specific cuticular protein gene from the beetle Tenebrio: role of an intronic sequence in transcriptional activation during the late metamorphic period. Insect Molecular Biology. 13, 481-493.

Leonard, S., Plante, D., Wittmann, S., Daigneault, N., Fortin, M.G. & Laliberte, J.F. (2000). Complex formation between potyvirus VPg and translation eukaryotic initiation factor 4E correlates with virus infectivity. Journal of Virology. 74, 7730–7737.

Lim, W. L. & Hagedorn, D. J. (1977). Bimodal transmission of plant virus. In: Aphids as Virus Vectors, Edited by K.F. Harris & K. Maramorosh. New York:Academic Press. pp 237-251.

Li, W. & Riddiford, L.M. (1992). The two duplicated insecticyanin genes, ins-a and ins-b are differentially expressed in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. Nucleic Acids Research. 22, 2945-2950.

Llave, C., Kasschau, K.D. & Carrington, J.C. (2000). Virus-encoded suppressor of posttranscriptional gene silencing targets a maintenance step in the silencing pathway. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 97, 13401-13406.

Lopez-Moya, J.J., Canto, T., Diaz, R.J.R. & Lopez, A.D. (1995). Transmission by aphid of a naturally non-transmissible *plum pox virus* isolate with the aid of *potato virus Y* helper component. Journal of General Virology. 76, 2293-2297.

Lopez-Moya JJ, Wang R.Y & Pirone T.P. (1999). Context of the coat protein DAG motif affects potyvirus transmissibility by aphids. Journal of General Virology. 80, 3281-3288.

Lopez, L., Urzainqui, A., Dominguez, E. & Garcia, J. A. (2001). Identification of an N-terminal domain of the *plum pox potyvirus* CI RNA helicase involved in self-interaction in a yeast two-hybrid system. Journal of General Virology. 82, 677–686.

Maia, I.G., Haenni, A.L. & Bernardi, F. (1996). Potyviral HC-Pro: a multifunctional protein. Journal of General Virology. 77, 1335-1341.

Marcu, O. & Locke, M. (1998). A cuticular protein from the moulting stages of an insect. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 28, 659-669.

Martin, B., Collar, J.L., Tjallingii, W.F. & Fereres, A. (1997). Intracellular ingestion and salivation by aphids may cause the acquisition and inoculation of non-persistently transmitted plant viruses. Journal of General Virology. 78, 2701-2705.

Mathelin, J., Bouhin, H., Quennedey, B., Courrent, A. & Delachambre, J. (1995). Identification, sequence and mRNA expression pattern during metamorphosis of a

cDNA encoding a glycine-rich cuticular protein in *Tenebrio molitor*. Gene. 156, 259-264.

Mathelin, J., Quennedey, B., Bouhin, H. & Delachambre, J. (1998). Characterization of two new cuticular protein genes specifically expressed during the post-ecdysial molting period in *Tenebrio molitor*. Gene. 211, 351-359.

Merits, A., Guo, D. & Saarma, M. (1998). VPg, coat protein and five non-structural proteins of potato A potyvirus bind RNA in a sequence-unspecific manner. Journal of General Virology. 79, 3123–3127.

Molnar, K., Borhegyi, N.H., Csikos, G. & Sass, M. (2001). The immunoprotein scolexin and its synthesizing sites-The midgut epithelium and the epidermis. Acta Biologica Hungarica. 52, 473-484.

Murphy, J.F., Rychlik, W., Rhoads, R.E., Hunt, A.G. & Shaw, J.G. (1990). The VPg of *tobacco etch virus* RNA is the 49kDa proteinase or the N-terminal 24kDa part of the proteinase. Virology. 65, 511-513.

Murphy, J.F., Klein, P.G., Hunt, A.G. & Shaw, J.G. (1996). Replacement of the tyrosine residue that links a potyviral VPg to the viral RNA is lethal. Virology. 220, 535-538.

Nakato, H., Toriyama, M., Izumi, S., & Tomino, S. (1990). Structure and expression of mRNA for a pupal cuticle protein of the silkworm, *Bombyx mori*. Insect Biochemistry. 20, 667–678.

Nakato, H., Shofuda, K., Izumi, S. & Tomino, S. (1994). Structure and developmental expression of a larval cuticle protein gene of the silkworm, *Bombyx mori*. Biochimica et Biophysica Acta. 1218, 64-74.

Neville, A.C. (1975). Biology of the Arthropod Cuticle, Springer-Verlag, New York. p 448.

Ng, J.C.K. & Perry, K.L. (2004). Transmission of plant viruses by aphid vectors. Molecular Plant Pathology. 5, 505-511.

Noji, T., Ote, M., Takeda, M., Mita, K., Shimada, T. & Kawasaki, H. (2003). Isolation and comparison of different ecdysone-responsive cuticle protein genes in wing discs of *Bombyx mori*. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 33, 671-679.

Parrish, W.B. (1967). The origin, morphology, and innervation of aphid stylets (Homoptera). Annals of the Entomological Society of America 60, 273-276.

Peng, Y.H., Kadoury, D., Gal-On, A., Huet, H., Wang, Y. & Raccah, B. (1998). Mutations in the HC-Pro gene of *zucchini yellow mosaic* potyvirus: Effects on aphid transmission and binding to purified virions. Journal of General Virology. 79, 897-904.

Perry, K.L., Zhang, L., Shintaku, M.H, & Palukaitis, P. (1994). Mapping determinants in *cucumber mosaic virus* for transmission by *Aphis gossypii*.Virology. 205, 591-595.

Perry, K.L., Zhang, L. & Palukaitis, P. (1998). Amino Acid Changes in the Coat Protein of *Cucumber Mosaic Virus* Differentially Affect Transmission by the Aphids *Myzus persicae* and *Aphis gossypii*. Virology. 242, 204-210.

Phillips, D.R. & Loughton, B.G. (1976). Cuticle protein in *Locusta migratoria*. Comparative Biochemistry and Physiology. 55, 129-135.

Pirone, T.P. & Harris, K.F. (1977). Nonpersistent Transmission of Plant Viruses by Aphids. Annual Review of Phytopathology. 15, 55-73.

Pirone, T.P. (1991). Viral genes and gene products that determine insect transmissibility. Seminars in Virology. 2, 81-87.

Pirone, T.P. & Blanc, S. (1996). Helper-dependent vector transmission of plant viruses. Annual Review of Phytopathology. 34, 227-247.

Plisson, C., Drucker, M., Blanc, S., German-Retana, S., Le Gall, O., Thomas, D. & Bron, P. (2003) Structural characterization of HC-Pro, a plant virus multifunctional protein. The Journal of Biological Chemistry. 278, 23753-23761.

Plochocka, D., Welnicki, M., Zielenkiewicz, P. & Ostoja-Zagórski, W. (1996). Three-dimensional model of the potyviral genome-linked protein. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 93, 12150–12154.

Powell, G. (1995). Intracellular salivation is the aphid activity associated with inoculation of non-persistently transmitted viruses. Journal of General Virology. 86, 469-472.

Power, A.G. (2000). Insect transmission of plant viruses: a constraint on virus variability. Current Opinion in Plant Virology. 3, 336-340.

Qiu, J. & Hardin, P. (1995). Temporal and spatial expression of an adult cuticle protein gene from *Drosophila* suggests that its protein product may impart some specialized cuticle function. Developmental Biology. 167, 416-425.

Raccah, B. & Pirone, T.P. (1984). Characteristics of factors affecting helper component mediated aphid transmission of a potyvirus. Phytopathology. 74, 303-308.

Raccah, B., Gal-on, A. & Eastop, V.F. (1985). The role of flying aphid transmissibility of *cucumber mosaic virus* and *potato virus Y* to peppers in Israel. Annals of Applied Biology. 106, 451-456.

Raccah, B., Huet, H., Blanc, S. (2001). Potyviruses. In: (Harris, K.F. Smith, O.P. and Duffus, J.E. eds). Virus-Insect-Plant Interactions. Academic Press, New York and London. 181-206.

Rajamaki, M.L. and Valkonen, J.P. (1999). The 6K2 protein and the VPg of *potato virus A* are determinants of systemic infection in *Nicandra physaloides*. Molecular Plant-Microbe Interactions. 12, 1074–1081.

Rebers, J.E., Riddiford, L.M. (1988). Structure and expression of a *Manduca sexta* larval cuticle gene homologous to *Drosophila* cuticle genes. Journal of Molecular Biology. 203, 411-423.

Rebers, J.E., Niu, J. & Riddiford, L.M. (1997). Structure and spatial expression of the *Manduca sexta* MSCP14.6 cuticle gene. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 27, 229-240.

Rebers, J.E. & Willis, J.H. (2001). A conserved domain in arthropod cuticular protein binds chitin. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 31, 1083-1093.

Restrepo- Hartwig, M.A. & Carrington, C.J. (1994). The *tobacco etch potyvirus* 6kDa protein is membrane associated and involved in viral replication. Journal of Virology. 68, 2388-2397.

Riechmann, J.L., Lain, S. & Garcia, J.A. (1992). Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. Journal of General Virology. 73, 1-16.

Riedel, D., Lesemann, D.E. & Maiss, E. (1998). Ultrastructural localization of nonstructural and coat proteins of 19 potyviruses using antisera to bacterially expressed proteins of plum pox potyvirus. Archives of Virology. 143, 2133–2158.

Robaglia, C., Durand-Tardiff, M., Tronchet, M., Boudazin, G., Astier-Manifacier, S. & Casse-Delbart, F. (1989). Nucleotide sequence of *potato virus Y* (N strain) genomic RNA. Journal of General Virology. 70, 935-947.

Rodriguez-Cerezo, E. & Shaw, J.G. (1991). Two newly detected nonstructural viral proteins in potyvirus-infected cells. Virology. 185, 572 579.

Rojas, M.R., Zerbini, F.M., Allison, R.F., Gilbertson, R.L. & Lucas, W.J. (1997). Capsid protein and helper component-proteinase function as potyvirus cell-to-cell movement proteins. Virology. 237, 283-295.

Rondot, I., Quennedey, B., Courrent, A., Lemoine, A. & Delachambre, J. (1996). Cloning and sequencing of a cDNA encoding a larval-pupal-specific cuticular protein in *Tenebrio molitor* (Insecta, Coleoptera) Developmental expression and effect of a juvenile hormone analogue. European Journal of Biochemistry. 235, 138-143

Rondot, I., Quennedey, B. & Delachambre, J. (1998). Structure organization and expression of two clustered cuticle protein genes during the metamorphosis of an insect, *Tenebrio molitor*. European Journal of Biochemistry. 254, 304-312.

Roudet-Tavert, G., German-Retana, S., Delaunay, T., Delecolle, B., Candresse, T. & Le-Gall, O. (2002). Interaction between potyvirus helper component-proteinase and capsid protein in infected plants. Journal of General Virology. 83, 1765-1770.

Saenz, P., Salvador, B., Simon-Mateo, C., Kasschau, K.D., Carrington, J.C. & Garcia, J.A. (2002). Host-specific involvement of the HC protein in the long-distance movement of potyviruses. Journal of Virology. 76, 1922-1931.

Sako, N. (1980). Loss of aphid transmissibility of *turnip mosaic virus*. Phytopathology. 70, 647-649.

Sako, N. & Ogata, K. (1981a). Helper factor essential for aphid transmissibility of *turnip mosaic virus*. Annals of the phytopathological Society of Japan 47, 68-70.

Sako, N. & Ogata, K. (1981b). Different helper factors associated with aphid transmission of some potyviruses. Virology. 112, 762-765.

Salomon, R. & Bernardi, F. (1995). Inhibition of viral aphid transmission by the N-terminus of the *maize dwarf mosaic virus* coat protein. Virology. 213, 676-679.

Sandstrom, J., Telang, A. & Moran, N.A. (2000). Nutritional enhancement of host plants by aphids - a comparison of three aphid species on grasses. Journal of Insect Physiology. 46, 33-40.

Sawada, H., Nakato, H., Togawa, T., Nakagoshi, M., Takikawa, S. & Dohke, K. (2003). Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding a novel cuticle protein in the silkworm, *Bombyx mori*. Comparative Biochemistry and Physiology. 134, 519–527.

Schaad, M.C., Lellis, A.D. & Carrington, J.C. (1997). VPg of *tobacco etch potyvirus* is a host genotype-specific determinant for long-distance movement. Journal of Virology. 71, 8624–8631.

Schaad, M.C., Anderberg, R.J. & Carrington, J.C. (2000). Strain-specific interaction of the *tobacco etch virus* NIa protein with the translation initiation factor eIF4E in the yeast two-hybrid system. Virology. 273, 300–306.

Shahbuddin, M., Shaw, J.G. & Rhoads, R.E. (1988). Mapping of the *tobacco vein mottling virus* VPg cistron. Virology. 163, 635-637.

Shofuda, K.I., Togawa, T., Nakato, H., Tomino, S., & Izumi, S. (1999). Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding a larval cuticle protein of *Bombyx mori*. Comparative Biochemistry and Physiology. 122, 105–109.

Shukla, D.D., Strike, P.M., Tracy, S.L., Gough, K.H. & Ward, C.W. (1988). The N and C terminus of the coat proteins of potyviruses are surface-located and the N terminus contains the major virus-specific epitopes. Journal of General Virology. 69, 1497-1508.

Shukla, D.D. & Ward, C.W. (1989). Identification and classification of potyviruses on the basis of coat protein sequence data and serology. Brief review. Archives of Virology. 106, 171–200

Shukla, D.D., Frenkel, M.J. & Ward, C.W. (1991). Structure and function of the potyvirus genome with special reference to the coat protein coding region. Canadian Journal Plant Pathology. 13, 178-191.

Shukla, D.D., Ward, C.W. & Brunt, A.A. (1994). The potyviridae. Wallingford, UK: CAB International. p 516.

Siaw, M.F.E., Shahabuddin, M., Ballard, S., Shaw, J.G. & Rhoads, R.E. (1985). Identification of a protein covalently linked to the 5' terminus of *tobacco vein mottling virus* RNA. Virology. 142, 134-143.

Snyder, M., Hunkapiler, M., Yuen, D., Silvert, D., Fristrom, J. & Davidson, N. (1982). Cuticle protein genes of Drosophyla: structure, organization and evolution of four clustered genes. Cell. 29, 1027-1040.

Sylvester, E.S. (1954). Aphid transmission of nonpersistent plant viruses with special reference to the *Brassica nigra virus*. Hilgardia. 23, 53-98.

Takeda, M., Mita, K., Quan, GX., Shimada, T., Okano, K., Kanke, E. & Kawasaki, H. (2001). Mass isolation of cuticle protein cDNAs from wing discs of *Bombyx mori* and their characterizations. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 31, 1019-1028.

Taylor, C.E. & Robertson, V.M. (1974). Electron microscopy evidence for the association of tobacco severe etch virus with the maxillae of *Myzus persciae* (Sulz.). Journal of Phytopathology. 80, 257-266.

Thornbury, D.W. & Pirone, T.P. (1983). Helper components of two potyviruses are serologically distinct. Virology. 125, 487-490.

Thornbury, D.W., Hellmann, G.M., Rhoads, R.E. & Pirone, T.P. (1985). Purification and characterization of potyvirus helper component. Virology. 144, 260-267.

Thornbury, D.W., Patterson, C.A., Dessens, J.T. & Pirone, T.P. (1990). Comparative sequence of the helper component (HC) region of *potato virus Y* and a HC-defective strain, potato virus C. Virology. 178, 573-578.

Thornbury, D.W., Heuvel, J.F.J., Lesnaw, J.A. & Pirone, T.P. (1993). Expression of potyvirus proteins in insect cell infected with a recombinant baculovirus. Journal of General Virology. 74, 2731-2735.

Tjallingii, W.F. (1978). Mechanoreceptors of the aphid labium. Entomologia Experimentalis et Applicata. 24, 731-737.

Togawa, T., Shofuda, K., Yaginuma, T., Tomino, S., Nakato, H. & Izumi, S. (2001). Structural analysis of gene encoding cuticle protein BMCP18, and characterization of its putative transcription factor in the silkworm, *Bombyx mori*. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 3, 611-620.

Togawa, T., Nakato, H. & Izumi, S. (2004). Analysis of the chitin recognition mechanism of cuticle proteins from the soft cuticle of the silkworm, *Bombyx mori*. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 34, 1059-1067.

Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proceedings of National Academy of Science, USA. 76, 4350-4354.

Turpen, T. (1989). Molecular cloning of the *potato virus Y* genome: Nucleotide sequence homology in non-coding regions of potyviruses. Journal of General Virology. 70, 1951-1960.

Urcuqui-Inchima, S., Maia, I.G., Drugeon, G., Haenni, A.L. & Bernardi, F. (1999). Effect of mutation within the Cys-rich region of potyvirus helper component-proteinase on self-interaction. Journal of General Virology. 80, 2809-2812.

Urcuqui-Inchima, S., Haenni, A.L. & Bernardi, F. (2001). Potyvirus proteins: a wealth of functions. Virus Research. 74, 157-175.

Urry, D.W. Cunnigham, W.D. & Ohnishi, T. (1974). Studies on the conformation and interactions of elastin. Proton magnetic resonance of the repeating pentapeptide. Biochemistry. 13, 609-616.

Urry, D.W. (1982). Characterization of soluble peptides of elastin by physical techniques. Methods in Enzymology. 82, 673-716.

Varrelmann, M. & Maiss, E. (2000). Mutations in the coat protein gene of *Plum pox virus* suppress particle assembly, heterologous encapsidation and complementation in transgenic plants of *Nicotiana benthamiana*. Journal of General Virology. 81, 567–576.

Verchot, J., Koonin, E.V. & Carrington, J.C. (1991). The 35kDa protein from The N-terminus of the potyviral polyprotein functions as a third virus encoded proteinase. Virology. 185, 527-535.

Verchot, J., Herndon, K.L. & Carrington, J.C. (1992). Mutational analysis of the *tobacco etch potyviral* 35-kDa proteinase: identification of essential residues and requirements for autoproteolysis. Virology. 190, 298–306.

Verchot, J. & Carrington, J.C. (1995). Debilitation of plant potyvirus infectivity by P1 proteinase-inactivating mutation and restoration by second-site modifications. Journal of Virology. 69, 1582-1590.

Vincent J.F.V & Hillerton J.E. (1979). The tanning of insect cuticle - A critical review and a revised mechanism Journal of Insect Physiology. 25, 653-658.

Vincent, J.F.V. & Wegst, U.G.K., (2004). Design and mechanical properties of insect cuticle. Arthropod Structure and Development. 33, 187-199

Voinnet, O., Pinto, Y.M. & Baulcombe, D.C. (1999). Suppression of gene silencing: A general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. Proceedings of National Academy of Science, USA. 93, 14147-14152.

Wang, G.L., Moore, M.L. & McMillin, J.B. (2002). A region in the first exon/intron of rat carnitine palmitoyltransferase Ibeta is involved in enhancement of basal transcription. The Biochemical Journal. 362, 609-618.

Wang, R.Y., Ammar, E.D., Thornbury, D.W., Lopez-Moya, J.J. & Pirone, T.P. (1996). Loss of potyvirus transmissibility and helper component activity correlates with non-retention of virions in aphid stylets. Journal of General Virology. 77, 861-867.

Wang, R.Y., Powell, G., Hardie, J. & Pirone, T.P. (1998). Role of the helper component in vector-specific transmission of potyviruses. Journal of General Virology. 79, 1519-1524.

Wang, R.Y, & Pirone, T.P. (1999). Purification and characterization of *turnip mosaic virus* helper component protein. Phytopathology. 89, 564-567.

Watson, M.A. & Roberts, F.M. (1939). A comparative study of the transmission of *Hyoscyamus virus 3*, *potato virus Y*, and *cucumber virus1* by the vector *Myzus persicae* (Sulz), *M. circumflxus* (Buckton) and *Macrosiphum gei* (Koch). Proceeding of the Royal Society of London, Series B. 127, 543-576.

Watson, M.A. (1940). Studies on the transmission of *sugar-beet yellows virus* by the aphid, *Myzus persicae* (Sulz.). Proceedings of the Royal Society of London Series B. 128, 535 552.

Willis, J.H. (1999). Cuticular proteins in insects and crustaceans. American Zoologist. 39, 600-609.

Willis, J.H., Iconomidou, V.A., Smith, R.F. & Hamodrakas, S.J. (2005). Cuticular proteins. In: Gilbert, L.I., Iatrou, K., Gill, S.S., (Eds.), Comprehensive Molecular Insect Science, vol. 4 Elsevier, New York. pp 79-110.

Wolfgang,W.J., Fristrom, D. & Fristrom, J.W. (1986). The pupal cuticle of *Drosophila*: differential ultrastructural immunolocalization of cuticle proteins. The Journal of Cell Biology. 102, 306-311.

Wybrandt, G.B. & Andersen, S.O. (2001). Purification and sequence determination of a yellow protein from sexually mature males of the desert locust, *Schistocerca gregaria*. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 31, 1183-1189.

נספחים (Appendices)

מפתח הסימונים והקיצורים:

כ"א מן הרצפים של ה- cDNA לח"ק השונים, כונה בשם (מלא ומקוצר) המרמז על, מין הכנימה ומספרו הסידורי של הח"ק אליו הוא מקודד. בצמוד מצוין מספר הגישה (Accession numbers) כפי שהתקבל לאחר הפקדתו של הרצף בבנק הגנים GenBank.

בתחילת הרצף, מופיעה רצף הבסיסים של 5'UTR שאיננו מקודד ל- ח' אמינו בחלבון, לקראת סופו של הרצף **מסומן בהדגשה** וריאציות שונות של הרצף **(C/A)AA(A/C)** המהווים translation initiation site.

בהמשך **מסומן בהדגשה** רצף הבסיסים ATG הראשון, המקודד ל- ח' האמינו מתיונין Methionine **המסומנת באות M בהדגשה** בתחילת החלבון, הספרה 1 מופיעה בצמוד ומעידה על תחילת מספור ח' האמינו בחלבון.

מתחתיה של כל שורת בסיסים המקודדים לחלבון, מופיעים בצמוד רצפי ח' האמינו אליהם הם קודדו.

הסימן *+ **מודגש ב- Italic*** ברצף ח' האמינו, מעיד על הימצאותו של אתר חיתוך cleavage sites ל- (SP)Signal peptide. חיזוי אתר החיתוך של SP נעשה באמצעות שימוש בתוכנה SignalP 3.0 המצויה ברשת האינטרנט בכתובת http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/.

רצפי ח' האמינו המהוות מוטיב חוזר בח"ק מסומנות בגווני צבע שונים.

רצפי ח' האמינו המהוות את אתר ה- R&R השמור, מסומנות בקו תחתון.

ח' האמינו באתר ה- R&R, הידועות כשמורות בח"ק של החרקים השונים מסומנות בקו תחתון בתוספת גוון רקע אפור.

ח' אמינו המהוות חלק ממוטיב חוזר הידוע בח"ק של חרקים שונים מסומנות בגווני צבע שונים.

הופעת הסימון של כוכבית * ברצף ח' האמינו מעידה כי התקבל קודון פסק TAA או TGA להפסקת תרגום החלבון, בצמוד תצוין ספרה המעידה על מספרה של ח' האמינו האחרונה בחלבון.

בהמשך מפורט רצף הבסיסים שאיננו מקודד לחלבון 3' UTR, לקראת סופו מופיעים וריאציות שונות של רצף הבסיסים **AATAA(A/T)** **המסומנים בהדגשה ובקו תחתון כפול** ומעידים על תחילתו הצפויה של רצף ה- Poly A.

רשימת קיצורים :

APS- Ammonium Persulfate

bp- base pair

CBD- Chitin Binding Domain

cDNA- complementary DNA

DNA- Deoxyribonucleic acid

EDTA- Ethylenediamine-tetra-acetic acid

g- gravity

IPTG- Isopropyl-beta-D-Thio-Galactopyranoside

kDa- Kilo Dalton

LC/MS- Liquid Chromatography, Mass Spectrometry

Mw- Molecular weight

NBT - Nitro Blue Tetrazolium

Ni-NR- Ni^{2+}-NTA-resin

NTA- Nitrilotriacetic Acid

PBS -Phosphate Buffer Saline

PMSF- Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride

R&R- Rebers & Riddifor

RNA- Ribonucleic acid

Rpm- Revolutions per minute

SDS - Sodium Dodecyl Sulfate

SDS-PAGE- SDS- Polyacrylamide Gel Electrophoresis

SP- Signal peptide

TBS - Tris Buffer Saline

TBS -H - TBS High salt

TBS- L - TBS Low salt

TEMED - Tetramethil – Ethylene- Diamine

Tris - Tris (hydroxymethyl) aminomethane

Contents:

1. Introduction:……………………………………..3

1.1. Plant viruses:……………………………………………………………...3

1.2. Manner of virus transmission:………………………………………………...4

1.3. The potyviruses genus:……………………………………..……………..5

1.4. Aphid transmission of potyviruses:……………………………..……….9

1.5. General characterization of aphids:………………………………………16

1.6. Acquisition of potiviral virions by aphid:………………………….……..20

1.7. Insect cuticular proteins:……………………………………….……….22

1.8. Conserved region within cuticular proteins involved in chitin interaction:.23

1.9. Repetitive motifs found in cuticular proteins:………………………………25

1.10. Nonstructural cuticular proteins:…………………………………..…….26

1.11. Intron structure of cuticular protein genes:……………………………..…28

1.12. The estimate role of introns:……………………………………………….30

2. Materials and methods:…………….……….31

2.1. Rearing aphids:………………………………………………………………..31

2.2. Virus strains:…………………………………………………….……….31

2.3. Rearing plants for virus and helper purification:…………………..……….32

2.4. Indicator plants:……………………………………………….……...…32

2.5. Infections of host and test plants:………………………………….………….32

2.6. Virus purification:……………………………………………………………..33

2.7. Purification of Helper Component Proteinase (HC-Pro):………………..….36

2.8. Separation of protein on polyacrylamide gel electrophoresis:……..……..….38

2.9. Preparation of protein samples for sequence determination:………..…...41

2.10. Serological methods:…………………………………………………...…..42

2.11. Extraction of aphid cuticular proteins:……………………………..…….45

2.12. General methods for molecular biology:……………………………………46

2.13. Bioinformatics tools:………………………………………………………49

2.14. Construction of cDNA libraries of aphids:……………………………………49

2.15. Screening the *Myzus persicae* cDNA for isolation of cuticular proteins cDNA:…………………………………………………………………………………50

2.16. Expression of cuticular protein genes in bacteria:…..…………………….…..53

2.17. Purification of the expressed protein from the bacteria using Ni-NTA affinity chromatography:……………………………………………..55

2.18. Preparation of rabbit polyclonal antibodies for cuticular proteins:…..….56

2.19. Using ZYMV infectious clones:……………………………………..…57

3. Results:……………………………………...58

3.1. Article 1: Dombrovsky A, Huet H, Zhang H, Chejanovsky N, Raccah B. (2003). Comparison of newly isolated cuticular protein genes from six aphid species. Insect. Biochem. Mol. Biol. 33, 709-715:………………..……………59

3.2. Article 2: Dombrovsky A, Huet H, Chejanovsky N, Raccah B.(2005). Aphid transmission of a potyvirus depends on suitability of the helper component and the N terminus of the coat protein. Arch. Virol. 150, 287-298:…………….…...67

3.3. Isolation of cDNAs and genes for cuticular proteins from the aphid *Myzus persicae*:………………………………………………………………………..7 9

3.4. Characterization of the affinity between ZYMV helper to cuticular proteins extracted from the green peach aphid *Myzus persicae*:………………...……..100

4. Discussion:……………….…………………119

References:…..………..……………………..136

Appendices:…………………………..………...163

Abstract:……………………………….……..I

Abstract:

Potyviruses are transmitted by aphids in a non persistent manner. Aphid Transmission of potyviruses requires the presence of a non structural viral protein called Helper Component (HC). The most accepted hypothesis for the mode of HC assistance to potyvirus transmission is the so-called “bridge hypothesis”, that proposes that the HC binds on one hand to the aphid's stylet and on the other hand to virions. In order to determine that specificity of the HC for potyviral virions, we made use of *zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) (infecting cucurbits) and *turnip mosaic virus* (TuMV) (infecting crucifers). The HC of ZYMV could assist the transmission of virions of both the homologous (ZYMV) and the heterologous TuMV. On the other hand, the HC of TuMV could assist transmission of virions of TuMV but failed to transmit those of ZYMV. These findings implied an incompatibility between TuMV-HC to the ZYMV virions. To ascertain the role of the potyviral coat protein (CP) in the recognition by the HC, the full length clone of ZYMV has served to construct a chimeric virus in which the N terminal of the CP was replaced by that of TuMV, (ZY-TuNT). Transmission results have shown that the TuMV-HC now assists the chimeric virus ZY-TuNT. Polyphagous aphids species, *M. persicae* and *A. gossypii* readily transmitted both ZYMV and TuMV whereas, the crucifer species *Brevicoryne brassicae* and *Lipaphis erysimi* transmitted TuMV efficiently, but not ZYMV. From these results, it is evident that the ZYMV-HC is not recognized by the mouthparts of the crucifer aphids. Potyviruses are carried within the food canal of the maxillary stylet, presumable bound via the HC to its lining. The aphids' stylets are made of cuticle, the cuticle of insects is a composite material made of chitin filaments embedded in a cuticular proteins (CuP)

matrix and sealed with waxes. Cuticular proteins interact with the chitin fibers through conserve domains (R&R consensus) that function as a chitin binding domain (CBD). The R&R consensus differ in CuPs from rigid or flexible cuticle. Until now, data on the CuPs and CuP genes from insects in the order Hemiptera (including aphids) was not available. Therefore, in the current work an effort has been made to create a base of knowledge for cuticular genes and proteins. CuP genes were isolated by the construction of several cDNA libraries for *M. persicae*. These libraries were screened by two methods, the first with an anti-CuPs antiserum for the proteins expressed from the libraries and the second using degenerate primers for the conserve R&R consensus of the CuPs looking for their presence in the cDNA libraries in PCR reactions. In this manner, the cDNAs encoding for CuP were isolated and characterized. These cDNA sequences allowed to isolated six CuP genes from the genomic DNA of *M. persicae*. Five of them contain the R&R motif; three of them were of the RR-2 type (mostly found in CuP's from rigid cuticle). Two additional CuP genes contained the RR-1 domain (mostly found in CuP's from flexible cuticle). In addition, one putative CuP gene lacked the R&R consensus and was classified as CuP based on the high sequence similarity to cuticle proteins known from other insects. Conserved homologs for the gene for the CuP from *M. persicae,* (MpCP1) were founds in sequences from five other species of aphid species analyzed herein (*L. erysimi, B. brassicae, A. gossypii, Rhopalosiphum maidis* and *Aphis fabae*). The homolog for another CuP (MpCP2) from *M. persicae* was slightly more variable among sequences from four aphid species (*B. brassicae, A. gossypii, Rhopalosiphum padi* and *A. fabae*) that MPCP1. On the other hand the MpCP5, was variable among the homologous genes of three aphid species (*B. brassicae, A. gossypii* and *A. fabae*). Presences of introns in genomic genes for CuPs,

was only found in those with the RR-1 consensus (*MpCP4* and *MpCP5*): a large intron (472bp) for the *MpCP4* and two smaller introns (85 and 149 bp) for the *MpCP*5.

Expression of CuP genes with two type of consensus (RR-1 and RR-2) in *Escherichia coli*, allowed retrieving the respective proteins. These proteins served as antigens for obtaining specific antibody to aphid's CuPs in rabbits.

Extraction of proteins from whole aphids allowed obtaining cuticle proteins in another manner. The methods for extraction were based on those applied for other insects. The total proteins profile for whole aphids' extracts (*M. persicae*) was determined after separation on polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). Many electroblotetd bands were recognized as CuPs by the specific antisera that were prepared earlier.

The interaction between CuPs extracted from *M. persicae* with the ZYMV HC, was determined by the overlay method. CuPs electroblotted on nitrocellulose membrane were challenged with purified HC. Bound HC was visualized using an antibodies specific to HC. In this manner, three major protein bands were found to bind HC. The mutated HC (inactive in assisting transmission) used as a negative control did not bind to the CuPs. Another control was made using protein extracts from two non-vector species for ZYMV, the aphid *B. brassicae* and the whitefly *Bemisia tabaci*, both failing to interact (*in-vitro*) with the purified active HC by overlay assays. The bridge-hypothesis assumes that the virion is indirectly bound to the stylets via the HC. To ascertain whether virions are directly bound to the CuP (NOT via the HC), the electroblotted CuP was challenged with ZYMV-CP or virion in overlay assays. There was no proof for direct binding between the CP and the electroblotted cuticle proteins. However, when purified HC was added to the virions during the overlay assay, binding to the cuticle proteins occurred. These finding provide additional support for the bridge-

hypothesis. The protein bands reacting with the HC were close and their proximity did not allow the separation required for protein sequencing. Therefore, separation by the two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) was adopted in order to get a better resolution of the CuPs. The 2-DE separation of CuPs yielded numerous spots that served for the challenge of the purified HC (as described above for the single dimension). The PAGE spots respective to those reacting with the HC, were excised and served for the determination of the amino acid sequence by mass spectrometry (MS). The amino acid sequence of some of the proteins spots reacting with the HC confirmed their identity as cuticular proteins (based on the sequence data available in the database). Some spots, for which no information was available in the database, were recognized as CuP based on their reaction to antibodies to CuP. These findings are the **first proof** for an *in vitro* association between the potyviral HC and the aphid cuticular proteins.

In summary, the following findings were reported: the N-terminal of the coat protein is involved in the recognition a homologous helper. The first aphid cuticular protein cDNAs and genes have been isolated. Several *M. persicae* cuticular proteins were found to interact *in-vitro* with the potyviral ZYMV-HC.

This work was carried out under the supervision of:

Prof. Benjamin Raccah

At the department of Virology

&

Dr. Nor Chejanovsky

At the department of Entomology

ARO, The Volcani Center, Bet Dagan.

The role of viral and cuticular proteins in the transmission efficiency of potyviruses by aphids

Thesis submitted for the degree of

"Doctor of Philosophy"

By

Aviv Dombrovsky

Submitted to the Senate of the Hebrew University

March - 2006