

**מעורבות החלבון היראלי Helper Component בהתפתחות
תסמיני המחלה של וירוס המוזאיקה הצהובה של הקישוא (ZYMV)
בדלועיים.**

חיבור לשם קבלת תואר דוקטור לפילוסופיה מאת

יואל משה שבולת

הוגש לסינט האוניברסיטה העברית בירושלים

ספטמבר 2008

עבודה זו נעשתה בהדרכתם של:

דר' עמית גל-און

דר' צחי ארזי

שלמי תודות

תודה לאשתי עדיה ולילדי שקד ואלון אשר נאלצו להסתפק בשעות "אבא" מועטות,

תודה למירי ואמנון גורמן היקרים שדחפו אותי לכאן,

תודה למנחי עמית וצחי על הידידות ועל התקופה הפרודוקטיבית והנעימה,

תודה לויקטור על הידידות ועל הדיונים המשותפים,

תודה לחברי למעבדה דיאנה, רוני, אלינה, אנה וגיורא,

תודה לאביב, אוזגור, אבי, דרור, קובי, וכל החברים,

ותודה לכל חברי המחלקה לזירולוגיה ומחוצה לה בהם נעזרתי.

תוכן העניינים

| | |
|----|---|
| c | שלמי תודות |
| d | תוכן העניינים |
| f | רשימת קיצורים |
| 1 | תקציר |
| 5 | מבוא |
| 5 | א.תיאור הוירוס |
| 6 | ב.תסמינים – symptoms |
| 6 | ג. השתקה – RNA-silencing |
| 8 | ד. מערכת הבקרה שלאחר שעתוק - post-transcriptional gene silencing |
| 10 | ה. דיכוי-השתקה - suppression of gene-silencing |
| 11 | ו. חלבון Helper component |
| 14 | ז. מטרות המחקר |
| 14 | 1.ז. מטרה עיקרית: |
| 14 | 2.ז. מטרות משנה: |
| 14 | שיטות המחקר |
| 14 | א.צמחים, הדבקתם בוירוס ואיסוף הדוגמאות |
| 15 | ב.פלסמידים |
| 17 | ג. רשימת תחלים וגלאים ((primers and probes |
| 20 | ד. הפקת RNA וכימותו |
| 20 | 1.ד. Total RNA |
| 20 | 2.ד. Northern-blot ל- RNA זעירים (smRNA) |
| 23 | 3.ד. smRNA specific microarray |
| 24 | ה. מבחן השתקה GFP |
| 24 | ו. Real-time PCR (Q-PCR) |
| 24 | 1.ו. טיפול ב-RNA |
| 25 | 2.ו. יצירת cDNA |
| 25 | 3.ו. ראקציית ה-Q-PCR |
| 26 | ז. כימות חלבון Western blot |
| 27 | ח. Electro-mobility shift assay (EMSA) |
| 27 | 1.ח. תמציות צמחיות |
| 28 | 2.ח. הכנת הגלאי: תצמידי RNA רדיואקטיביים |
| 29 | 3.ח. ניסוי ה-EMSA |
| 30 | תוצאות |
| 30 | א. זיהוי החומצות האמיניות בתיבת FRNK של חלבון HC-Pro המעורבות בהופעת תסמינים. |
| 30 | א.1. איפיון מהלך המחלה |
| 31 | א.2. השפעת מוטציה באתר FRNK על כמות הוירוס בצמח. |
| 34 | ב. עיכוב מערכת ההשתקה של הצמח. |
| 34 | ב.1. מוטציה בתיבת FRNK אינה משפיעה על הצטברות siRNA ויראלי |

| | |
|------------|---|
| 37 | 2. ב. המוטציה FINK אינה פוגעת בפעילות עיכוב ההשתקה של חלבון HC-Pro של ZYMV. |
| 39 | 3. ב. פעילות עיכוב השתקה ב-Potyvirus אחרים |
| 40 | ג. אפיון ביוכימי של האינטראקציה בין miRNA ו-siRNA לבין חלבון HC-Pro. |
| 40 | ג. 1. חלבון ZYMV-HC-Pro קושר תצמידים smRNA דו גדיליים |
| 44 | ג. 2. דרושים שתי מטענים חיוביים באתר FRNK לקישור יעיל של smRNA duplex |
| 46 | ג. 3. קינטיקת קישור |
| 50 | ד. זיהוי ה-microRNA וגני-המטרה שלהם בקישור אשר קשורים להופעת התסמינים. |
| 50 | ד. 1. הצטברות תצמידים miRNA/miRNA* |
| 56 | ד. 2. המבנה המרחבי של תצמידים miRNA/miRNA* וקישורם על ידי החלבון HC-Pro. |
| 58 | ד. 3. שיבוט גנים מקישור המהווים מטרה ל-miRNA |
| 73 | ד. 4. בדיקת הרמה המצטברת של ה-mRNA הבלתי-חתוכים של גני-מטרה של miRNA נבחרים |
| 73 | ד. 4. א. תנאי הניסוי |
| 73 | ד. 4. ב. נורמליזציה |
| 74 | ד. 4. ג. רמת תעתיק- גני-מטרה של miRNA166 |
| 74 | ד. 4. ג. 1. גן המטרה REVOLUTA |
| 76 | ד. 4. ג. 2. גן המטרה INCURVATA-4 |
| 77 | ד. 4. ג. 3. גן המטרה PHAVOLUTA |
| 80 | ד. 4. ד. גני-מטרה של miRNA159 |
| 80 | ד. 4. ה. גני-מטרה של miRNA 319 |
| 81 | ד. 4. ו. גני-מטרה של ta-siRNA |
| 83 | ד. 4. ז. גן מטרה של Argonaute1 – miR168 |
| 89 | דיון ומסקנות |
| 107 | נספחים |
| 108 | ביבליוגרפיה |
| ii | CONTENTS |
| iii | ABSTRACT |

רשימת קיצורים

| | |
|--------------|---|
| AGO | ARGONAUTE |
| APS | Ammonium persulfate |
| ARF | AUXIN RESPONSE FACTOR |
| bp | Base-pair |
| cDNA | Complementary DNA |
| CMV | <i>Cucumber mosaic virus</i> |
| CP | Coat protein |
| Ct | Cycle threshold |
| CTV | <i>Citrus tristeza virus</i> |
| DCL | DICER-like |
| dpi | Days post inoculation |
| dsRNA | Double-strand RNA |
| DTT | 1,4-Dithio-DL-threitol |
| EDC | 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide |
| EDTA | ethylene-diamine-tetra-acetic acid |
| EMSA | Electromobility shift assay |
| EST | Expressed sequence tag |
| EtBr | Ethidium bromide |
| EV | Empty vector |
| GFP | Green fluorescent protein |
| GSB | Gel-shift buffer |
| HA | Hemagglutinin (Influenza virus) |
| HC-Pro | Helper component- proteinase |
| HD-ZIP | Homeodomain-leucine zipper transcription factor family |
| IR | Inverted repeat, hairpin |
| kDa | Kilo Dalton |
| LNA | Locked nucleic acid |
| miRNA, miR | microRNA |
| miRNA*, miR* | microRNA star |
| MOPS | 3-[N-morpholino]propanesulfonic-acid |
| MYB | MYB-domain transcription factor family |
| NAT | Natural antisense transcript |
| nat-siRNA | Natural antisense siRNA |
| NI | Non-inoculated |
| nt | nucleotide |
| NTC | No-template control |
| Oligo | Oligonucleotide |
| PAGE | Polyacrylamide gel electrophoresis |
| PCR | Polymerase chain reaction |
| PHB | PHABULOSA |
| PHV | PHAVOLUTA |
| PNK | Polynucleotide kinase |
| PPV | <i>Plum pox virus</i> |
| Pre-miRNA | microRNA precursor |
| PTGS | Post transcriptional gene silencing |
| PVY | <i>Potato virus Y</i> |
| Q-PCR | Quantitative PCR, Real-time PCR |
| RdDm | RNA dependent DNA methylation |
| RDR, RdRp | RNA dependent RNA polymerase |
| REVO | REVOLUTA |
| RISC | RNA induced silencing complex |
| RNAi | RNA interference |
| RSS | RNA silencing suppressor/suppression |
| RT | Reverse-transcription |
| RT-Q-PCR | Reverse transcription followed by Q-PCR |
| SDS | Sodium dodecyl sulfate |
| SEM | Standard error of means (standard deviation/ square root of n) |
| SGS | SUPPRESSOR OF GENE SILENCING gene |
| siRNA | Small interfering RNA |
| smRNA | Small RNA |
| ssRNA | Single-strand RNA |
| ta-siRNA | Trans-acting siRNA |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine |
| TEV | <i>Tobacco etch virus</i> |
| TRV | <i>Tobacco rattle virus</i> |
| TuMV | <i>Turnip mosaic virus</i> |
| UTR | Untranslated region |
| vsRNA | Viral genome-derived siRNA |
| ZYMV | <i>Zucchini yellow mosaic virus</i> |

הערה: האיורים 2, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 28, ו-29 וחלקים מהתמליל (בתרגום) מופיעים גם ב- (Shiboleth *et al.* 2007) אשר פורסם במהלך הכנת עבודה זו, לעיתים בעיבוד שונה. המאמר מצורף בנספחים.

Note: Figures 2, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 28 and 29, often in modified form, and parts of the manuscript (translated), appear also in (Shiboleth *et al.* 2007), which was published during the preparation of this thesis. This paper is added in the appendices.

תקציר

הוירוס *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) שייך לקבוצת ה-*Potyvirus* במשפחת ה-*Potyviridae*. תסמיני ZYMV בדלועים כוללים הצהבה, נינוס, עוותי פרי וזרעים והופעתם של עלים חוטיים מלווים באיים ירוקים כהים ומוזאיקה.

בעבודה זו באתי לבחון את הבסיס המולקולרי להתהוות המחלה הויראלית בצמחים. לשם כך, חקרנו את החלבון הפוטיויראלי Helper component proteinase (HC-Pro) הידוע כגורם פתוגניות (pathogenicity factor). ביטוי ביתר של החלבון HC-Pro בארבידופסיס טרנסגני יוצר פנוטיפ הדומה לתסמינים של הדבקה בוירוס. לחלבון ה-HC-Pro תפקידים רבים, כאשר אחד המרכזיים שבהם הוא RNA-silencing suppressor (RSS) המאפשר ל פוטיוירוס להתגונן ממערכות ההגנה הצמחיות. למערכת השתקת ה-RNA (RNA-silencing, RNA-interference [RNAi]) האנטי-ויראלית ולמערכת הבקרה העצמית הצמחית שלאחר שעתוק ([PTGS] post-transcriptional gene silencing) רכיבים משותפים רבים כגון RDR, DICER, RISC ו-RNA קצרים (smRNA). בצמחים טרנסגניים בהם שובשו מרכיבי הביוסיני תיזה של רכיבים שונים במערכת ההשתקה, או ששובשה פעילותם, נראים עוותים התפתחותיים קשים הדומים ל עיתים לתסמינים המתקבלים מ הדבקה בוירוסים. למרות זאת, ישנו פער בין הידע ש-HC-Pro הוא גורם פתוגניות בפני עצמו, לבין היעדר הידע על דרך פעולתו בתא הצמחי ועל שורה של התרחשויות בתא הקודמות להופעת התסמינים. על מנת לברר שאלה זו, עשיתי שימוש בתבדידים מוחלשים של הפוטיוירוס ZYMV. מוטציה נקודתית בתיבה השמ ורה FRNK (conserved motif) הממוקמת בחלקו המרכזי של חלבון HC-Pro מ-FRNK ל-FINK (R₁₈₀), בה מוחלפת חומצת האמינו הטעונה Arginine (R) ב-Isoleucine (I) הבלתי טעונה, גורמת לירידה דרסטית בחומרת התסמינים בעלי דלועים שונים בהשוואה לוירוס הבר. צמחי קישוא הם כמעט חסרי תסמינים חמישה ימים לאחר ההדבקה (5 dpi) גם

כאשר הם מודבקים ב וירוס האלים $ZYMV^{FRNK}$ וגם בוירוס המוחלש $ZYMV^{FINK}$. נמצא כי כמות חלבון ה-HC-Pro מצטברת בעלים לרמה דומה בזמן זה בשני התבדידים. בעקבות זאת בחנו את ההשפעה של הפחתת המטען בתיבת FRNK על תפקידו של HC-Pro כמעכב של מערכת ההגנה האנטי- ויראלית. לשם כך נמדדה רמתם המצטברת של small interfering RNA (siRNA) שמקורם ברצפי הוירוס (viral siRNA [vsiRNA]), ונמצא כי מוטציה זו, הגורמת לאובדן תסמיני מחלה, אינה משפיעה באופן מהותי על הצטברות vsiRNA ב-5 dpi. יתר על כן, תוך שימוש במבחן ב-*Nicotiana benthamiana* בו מב וטא החלבון HC-Pro במנותק מהוירוס, נמצא כי פעילותו של HC-Pro כמעכב השתקה היה דומה בין טיפוס הבר HC^{FRNK} לבין שני המוטנטים המוחלשים HC^{FINK} ו- HC^{FRNA} . מכאן, שלא נמצאה התאמה בין החלשת התסמינים לבין היבטים אלה של פעילות RSS.

ה-microRNA (miRNA) הם קבוצה גדולה של רנ "א קצרים שתפקידם הוא מתן ספציפיות בבקרה שלילית של התבטאות גנים שונים, הידועים כ"גני-מטרה" (miRNA-target genes), בעיקר לאחר שעתוקם. בתהליך הביוסינתזה של ה-miRNA נוצר תוצר ביניים שהוא תצמיד $miRNA/miRNA^*$ (duplex). ה-miRNA מוטען ל-RISC וה-miRNA*, שהוא תוצר הלוואי, נעלם במהירות מהתא. לאחרונה התגלה כי HC-Pro קושר תצמדי siRNA-duplex. לכן, נבחנה האפשרות כי מוטציה הגורמת לפחיתה בתסמינים משפיעה על עוצמת הקישור הפיזי בין HC-Pro לבין תצמדי siRNA או $miRNA/miRNA^*$ דו-גדיליים בעזרת מבחן Electromobility Shift Assay. נמצא כי תצמידים אלה נקשרים ל-HC-Pro בתמציות צמחים מודבקים ב- $ZYMV^{FRNK}$ האלים, אך HC-Pro מתמציות צמחים מודבקים ב- $ZYMV^{FINK}$ המוחלש קושר הרבה פחות duplex. פעילות קישור של חלבון HC-Pro נצפתה גם בתמציות עלים שמקורן בצמחי *N. benthamiana* המבטאים את החלבון ביתר ללא נוכחות הוירוס. נמצא כי דרושים שני מטענים חיוביים באתר FRNK לקישור יעיל של siRNA duplex. במבחנים ביוכימיים נתגלה כי הקישור של החלבון HC^{FRNK} ל-siRNA like duplex היא לא-קואופרטיבית עם קבוע קישור K_m של בערך 150 nM, וכי HC^{FINK}

קושר בעוצמה פי 33 חלשה יותר. מכאן, נמצאה התאמה בין עוצמת קישור לתסמינים הנגרמים מוירוס הנושא את המוטציה האמורה.

לאור ממצאים אלו, בחנו את האפשרות כי קישור בידי HC-Pro ישפיע על רמות miRNA בצמח וע"י כך ישפיע על הפנוטיפ הצמחי בעת מחלה. בעזרת microarrays השווינו בין רמתם של כל ה-miRNA הצמחיים שהיו ידועים, ושל רצפי miRNA* חזויים, בין צמחי קשוא מודבקים ב-ZYMV^{FRNK} האלים, ZYMV^{FRNK} המוחלש, או בלתי מודבקים כבקורת. מניתוח תוצאות ההיברידיזציה עולה כי miRNA רבים שהיו חזויים להיות שמורים אבולוציונית אכן התבטאו ברמות גבוהות בעלי קישוא. נתגלה כי הדבקה בוירוס האלים ZYMV^{FRNK} מונעת את פירוקם הטבעי של miRNA*, ומכאן אפשר להניח ש-HC^{FRNK} קושר תצמיד *in-vivo* miRNA/miRNA*. לעומת זאת, בהדבקה בוירוס המוחלש ZYMV^{FRNK}, ההתפרקות נמנעה באופן דומה ל-HC^{FRNK} רק בקבוצה מסויימת של miRNA*. קבוצה זו אופיינה בכך שהמבנה המרחבי החזוי של ההליקס הכפול של ה-miRNA/miRNA* duplex מושלם יותר. לעומת זאת, כאשר ה-duplex הכיל אי זיווגים עוקבים או שמיבנה ההליקס עוות ע"י החסרה/הוספה של נוקלאוטיד באחד הגדילים אזי היה הבדל משמעותי בעוצמת הקישור בין HC^{FRNK} ל-HC^{FRNK}. מכאן שאפשר וישנם תצמידים הנקשרים טוב יותר או טוב פחות ל-HC^{FRNK} *in-vivo*. בנוסף, נמצא כי מירב ההצטברות של miRNA ו-miRNA* הנגרמת ע"י הדבקה בוירוס מתרחשת כבר בעלה הראשון 5 ימים לאחר הדבקה וקודם להופעת התסמינים.

כיוון שישנה אפשרות שקישור תצמיד דו-גדילי ע"י HC-Pro גורמת לכידת miRNA (sequestration) והקטנת המאגר של miRNA זמינים ל-RISC, הועלתה השערה כי תהיה הצטברות בלתי מבוקרת של גני-מטרה (target genes). לשם כך, שובטו באופן חלקי מקישוא 10 גנים החזויים להיות גני-מטרה של ארבעה miRNA ושל trans-acting siRNA (ta-siRNA) אחד. בכולם נמצא אתר המתאים לקישור ה-miRNA או ה-ta-siRNA המתאים. תעתיקי גנים אלו כומתו ע"י שימוש בתחלים משני עברי אתר המטרה של miR-RISC, תכנון המונע את הגברתם של תעתיקים חתוכים. בחלק מגנים אלו נמצאה השפעה

ברורה של הדבקה בירוס האלים ZYMV^{FRNK} ושל המוטציה R₁₈₀ על הצטברותם של תעתיקי הגן. רמתם המצטברת של התעתיקים הבלתי- חתוכים של INCURVATA-4 ושל PHAVOLUTA, שניהם גורמי שעתוק ממשפחת HD-ZIP המבוקרים בידי miR166, עולים בתגובה להדבקה בירוס האלים ZYMV^{FRNK} כבר בעלה הראשון 5 ימים לאחר הדבקה. תפקידם החשוב של חלבוני HD-ZIP בבקרת התפתחות הצמח, יחד עם הממצא כי רמתם עולה בהדבקה בירוס האלים, מתאימה להנחה כי עליה לא מבוקרת ברמת הביטוי של גנים אלו עשויה לתרום לתסמינים המתקבלים בהדבקה בירוסים. בעבודה זו נבדקה גם רמתו של ta-siRNA אשר מבקר את רמתם של Auxin Response Factors (ARF), ושמקורו בתעתיק TAS3. TAS3 מהווה מטרה ל-AGO7-miR390. נמצא כי שני הירוסים, אך במיוחד ZYMV^{FRNK} האלים, מעכבים את הצטברותו של ta-siRNA זה, בעיקר בזמנים מאוחרים יותר. ממצא זה עשוי להתאים להנחה שלכידת miR390 תגרום לירידה בביסוינטיזה של ה-ta-siRNA. למרות זאת, לא היה ניתן לזהות עליה ברמתם של תעתיקי ARF.

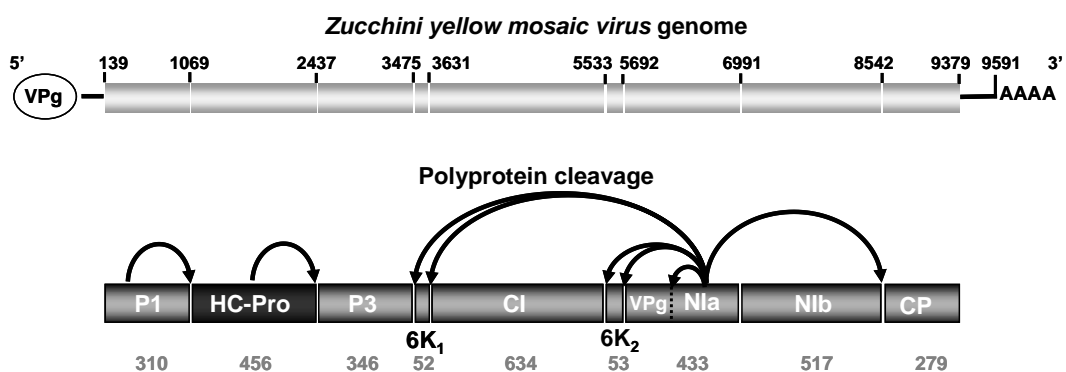
בשל חשיבותו הרבה של הגן ARGONAUTE-1 (AGO1) במערכת ההשתקה האנדוגנית ובמנגנוני ההגנה בפני וירוסים, בהיותו הרכיב החלבוני של RISC, היתה חשיבות לבדוק כיצד מושפעת בקרת רמת התעתיק שלו ע"י miR168-RISC באופן יסודי. נמצא כי הדבקה ב-ZYMV^{FRNK}, ופחות מכך ב-ZYMV^{FINK}, גורמת לעליה ברמת השעתוק (DNA→RNA) של הגן AGO1 וכי הירוסים אינם מונעים את חיתוכו של גן זה ע"י RISC. מכאן שאפשר שהצמח מפצה בהצלחה על התחרות בין AGO1 לבין HC-Pro על microRNA ע"י ייצור יתר של תעתיק AGO1. לכן אפשר וייצור יתר של חלבון AGO1 מאפשר הפחתה ואיזון מסויימים של רמתם של גני-מטרה למרות נוכחותו של HC-Pro.

לסיכום, המחקר הנוכחי הביא להבנה טובה יותר של מנגנון הפעולה של חלבון HC-Pro הווירלי בהשריית תסמיני מחלה בדלועיים לאחר הדבקה בירוס ZYMV. נדרשת עבודה נוספת לפרום את מבוך האירועים הנובעים מההשפעות של קשירת miRNA ע"י HC-Pro בצמח מודבק בירוס על בקרה ברמת השעתוק, שלאחר שעתוק, ועל תרגום.

מבוא

א. תיאור הוירוס

הוירוס *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) שייך לקבוצת ה-*Potyvirus* במשפחת ה-*Potyviridae*. ה-*potyviruses* הם הקבוצה הגדולה ביותר של וירוסים צמחיים, והם מנגעים כמעט את כל גידולי התרבות (Shukla et al. 1994). למשפחה זו גנום ssRNA, גדיל מקודד (plus strand) יחיד של כ-9.5 kb (9,591 בסיסים ב-ZYMV). RNA זה מתורגם לרב-חלבון (polyprotein) עיקרי יחיד המעוכל ל-8-9 חלבונים פונקציונליים ע"י פרוטאזות המשחררות את עצמן מחלבון זה (איור 1) (Gal-On 2007). ביריון, ה-RNA עטוף במספר רב של יחידות חלבון מעטפת (coat-protein, CP) זהות היוצרות מבנה מאורך גמיש. הוירוס מתרבה בציטופלסמה, ונע מתא לתא ובמערכת ההובלה. הוירוס ניתן לזיהוי בעלים, בשורשים ובגבעולים אך לא במריסטמות הקודקודיות והלטריליות וכמות חלבון המעטפת שלו מתחת לסף הזיהוי בארבע המפרקים הקרובים למריסטמה (Lin et al. 2007a). וירוסים מקבוצה זו מועברים מצמח לצמח ע"י כנימות עלה באופן ספציפי ע"י היכרות בין חלבונים בחדק הכנימה ובין החלבונים הויראליים HC-Pro ו-CP (Gal-On et al. 1992; Huet et al. 1994; Dombrovsky et al. 2007).



איור 1. ארגון גנום הוירוס *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) והרב-חלבון המתורגם ממנו. החצים מסמנים את הפרוטאזות ואתרי הפרוטאזות ליזה שלהם ברב-חלבון. חלבון Helper-Proteinase component (HC-Pro) מסומן בצבע כהה. המספרים השחורים מסמנים את מיקום הבסיסים והאפורים את גודל תוצרי החלבון בחומצות אמיניות.

ב. תסמינים – symptoms

ZYMV גורם לאחת המחלות הכלל- עולמיות הקשות של מיני דלועים שונים כולל אב טיחים, מלונים, מלפפונים וקישואים (Desbiez and Lecoq 1997). וירוסים גורמים לשלל תסמינים שונים בצמחים העשויים לכלול מוזאיקה, הצהבות, נבילות, התייבשויות, נינוס ועוד. קבוצה של תסמינים ייחודיים להדבקה בוירוסים כוללת פגיעות רב- מערכתיות הנראות כפגיעה בתהליכי התפתחות וכוללות שינויים רבים בביטוי גנים שונים (pleiotropic developmental-defects) (Kasschau et al. 2003; Whitham et al. 2006). תסמיני ZYMV בדלועים כוללים מוזאיקה והופעת איים ירוקים כהים בעלים, הצהבה, נינוס, עוותי פרי וזרעים והופעת עלים חוטיים (filamentous, shoestring-leaves). שינויים תוך תאיים כוללים שינוי במבנה ומספרם של כלורופלסטים בדלעת (Zechmann et al. 2003) ואפשר של-HC-Pro תפקיד בתופעה זו כיוון שנמצא שהוא קושר ferredoxin ומונע את כניסתו לכלורופלסט בתירס מודבק ב- *Sugarcane mosaic virus* (Cheng et al. 2008). נמצאה קורלציה חיובית בין כמות הוירוס בדלעת המודבקת ב- ZYMV לבין עוצמת התסמינים (Zechmann et al. 2007), אך מוטנטים בעלי תסמינים מוחלשים יכולים להתקבל גם ללא פחיתה משמעותית בכמות הוירוס בצמח (Gal-On and Raccach 2000; Arazi et al. 2001).

ג. השתקה – RNA-silencing

כדי להלחם בטפילים תוך- תאיים כגון וירוסים וירואידים וטרנספוזונים התפתחה בצמח, בין היתר, מערכת המבוססת על השמדה של RNA זר, באופן ספציפי לרצף, הנקראת מערכת השתקת RNA (RNA-silencing, RNA-interference [RNAi]) (Voinnet 2005; Li and Ding 2006). האות הראשוני המפעיל את תהליך ההשתקה הוא RNA דו-גדילי (dsRNA). dsRNA יכול להיווצר במספר דרכים: ממבנה דו- גדילי תוך- מולקולרי הנוצר מהתקפלות עצמית של RNA; מתוצר ביניים בזמן שכפול הגנום הויראלי כאשר גדיל אחד מסונטז על גבי הגדיל המשלים; או כאשר RNA "בלתי נורמלי" (aberrant RNA, כגון 5'-m7G cap

או זנב (3'-polyA) מזוהה ומועתק ע"י RNA-dependant RNA polymerase (RdRp,) (Wassenegger and Pelissier 1998; Voinnet 2008) (RDR dsRNA). זה מהווה סובסטרט לאנזימי DICER-like (DCL) החותכים אותו לחתיכות קצרות של dsRNA (duplex) באורך 21-24 בסיסים, כאשר מקצוות ה-3' של שני הגדילים בולטים 2 בסיסים חד גדיליים (di-nucleotide 3'-overhang). תוצרי חיתוך אלה ניקראים small interfering RNA (siRNA) RNA. בארבידופסיס ארבעה אנזימי DCL, כאשר DCL2 יוצר siRNA באורך 22 בסיסים; DCL3 -24 בסיסים; DCL4 -21 בסיסים; ו-DCL1 יוצר microRNA (miRNA) באורכים שונים (Xie *et al.* 2004; Voinnet 2008). לאחר העיבוד על ידי DCL ה--duplex siRNA נפרד וגדיל יחיד שלו הנקרא "guide" מוזן לקומפלקס RNA induced silencing (RISC) complex (RISC) המכיל חלבון ARGONAUTE ("slicer", AGO,) (Vaucheret *et al.* 2004). RISC המכיל מולקולת RNA חד-גדילית קצרה (small RNA, smRNA) מכונה RISC משופעל (או מתוכנת, "programmed"). בארבידופסיס 10 חלבוני AGO שונים והתפקיד של רק חלק מהם פוענח (Vaucheret 2008). בעוד גדיל ה-"guide" מוזן ל-RISC, הגדיל המשלים לו, הנקרא "passenger" או "כוכבית" (*, star), מושמד במהירות. RISC משופעל מזהה וחותך RNA חד גדילי (כגון גנום הוירוס) במרכז הרצף המשלים ל-guide-siRNA אותו הוא מכיל. חיתוך זה אומנם מוציא את הוירוס מכלל פעולה באופן ישיר, אך כדי להתחרות בקצב הרפליקציה של הוירוס התפתחה בצמח מערכת הגברה. במערכת זו, ה-RNA החתוך מהווה סובסטרט ל-RDRs (ול-DCLs לאחר מכן), ובכך נוצרת כמות גדולה של siRNA שניוני הזמין ל-RISC והמאפשר חיתוך יעיל יותר של ה-RNA הויראלי (Schwach *et al.* 2005). siRNA שניוני יכול לנוע מתא לתא ובמ ערכת ההובלה של הצמח ועשוי להכין את מערכות ההגנה בצמח להגעת הוירוס לאתרים מרוחקים (Mlotshwa *et al.* 2003; Himber *et al.* 2002). למערכת השתקה זו נגד וירוסים ולמערכת הבקרה העצמית הצמחית שלאחר שעתוק (post-transcriptional gene silencing [PTGS]) רכיבים משותפים רבים כגון RNA קצרים, RISC, RDR ו-DICER.

ד. מערכת הבקרה שלאחר שעתוק - *post-transcriptional gene silencing*

silencing

ה-microRNA (miRNA) הם קבוצה גדולה של רנ "א קצרים, חד-גדיליים באורך של כ-21-24 בסיסים, המקודדים ע"י הגנום של בע "ח וצמחים. תפקידם הוא מתן ספציפיות בבקרה שלילית של התבטאות גנים שונים, הידועים כ"גני-מטרה" (miRNA-target genes), בעיקר לאחר שעתוקם ([PTGS] post-transcriptional gene-silencing). מנגנון הפעולה הידוע ביותר בצמחים מסתיים בחיתוך ה-mRNA של גן המטרה (Bartel and Bartel 2003; Carrington and Ambros 2003; Bartel 2004; Dugas and Bartel 2004) אך לאחרונה התגלתה חשיבותו של מנגנון עיכוב תרגומו של ה-mRNA (Brodersen *et al.* 2008), כפי שנופוץ יותר בבע "ח (Reinhart *et al.* 2002; Carrington and Ambros 2003; Bartel 2004). בתהליך הבייוסינטיזה של ה-miRNA בצמחים משועתק גן ל-mRNA שאינו מקודד לחלבון, ומכונה miRNA-precursor (pre-miRNA), המתקפל ל מבנה דמוי סיכת-ראש (hairpin-loop). בגרעין התא, הפרקורסור הנ"ל נחתך בשתי גדיליו, מאזור דו-גדילי בלתי-מושלם שבו, ע"י האנזים DCL1 לדופלקס של miRNA/miRNA*. דופלקס זה ממותל ע"י HEN1 בקצוות 3'. miRNA* ("miRNA כוכבית" המקביל ל-"passenger strand" ב-siRNA), שהוא הגדיל המשלים הבלתי פעיל, נעלם במהירות וכמעט אינו ניתן לזיהוי ב-Northern-blot בניגוד ל-miRNA העשוי להצטבר בתא בכמויות גבוהות. לאחר הבייוסינטיזה של ה-miRNA ותוך הפרדתו מ-miRNA* (unwinding) הוא חובר לחלבון ARGONAUTE (AGO) (בדרך כלל AGO1) שב-RISC (Baumberger and Baulcombe 2005). RISC משופעל זה מונחה ע"י ה-miRNA לחיתוך או עיכוב תרגומו של ה-mRNA של גן מטרה, המכיל אתר מטרה (target-site) בעל רצף משלים חלקית ל-miRNA. מקשת רחבה של צמחים שובטו וזוהו קבוצה של מספר משפחות miRNA שמורים ביותר מטחביים (Arazi *et al.* 2005), דרך חשופי זרע, ועד לדגניים וצמחים פורחים (Reinhart *et al.* 2002) ואף באצות חד-תאיות (Zhao *et al.* 2007). ככל שמטפסים בענפי העץ האבולוציוני ישנם miRNA נוספים השמורים רק במשפחות צמחים מסוימות ואף ספציפיים לצמח מסוים

(Zhang *et al.* 2006a). נכון להיום, טרם נעשה שיבוט של miRNA מדלועיים. גם גני המטרה של miRNA שמורים אבולוציונית ובמיוחד באתר המטרה. בצמחים, לעיתים קרובות, mRNA המטרה מקודדים לגורמי שעתוק חשובים ביותר המשפיעים על מהלך ההתפתחות של העובר או של אברי הצמח ועל הפנוטיפ שלו (Reinhart *et al.* 2002; Bartel and Bartel 2003).

קבוצה נוספת של RNA קצרים אנדוגניים הם ה- trans-acting siRNA (ta-siRNA). siRNA מבקרים גני-מטרה (בניגוד לבקרה *cis* של siRNA "רגילים") באופן דומה משהו ל-miRNA אלא שהביוגנזה שלהם שונה. גנים המקודדים ל-ta-siRNA (הנקראים TAS) משועתקים ככל mRNA, ובדומה ל-pre-miRNA אינם מתורגמים לחלבון. בניגוד ל-pre-miRNA, הם אינם מתקפלים אלא מהווים יעד לקישור ע"י RISC, המשופעל ע"י miRNA בעל רצף משלים חלקי ל-TAS, וזה חותך אותם. תוצרים אלה, המוגנים ע"י החלבון SGS3 מפני אקסונוקלאזות, מהווים תבנית ל יצירת RNA דו-גדילי על ידי RDR6 (Peragine *et al.* 2004; Adenot *et al.* 2006). dsRNA מושלם זה נחתך בידי DCL4 ל-ta-siRNA ספציפיים בעלי תפקידי בקרה על גני מטרה מקודדים לחלבון (Xie *et al.* 2005). לדוגמה, הפרקוסור TAS3 מארבידופסיס נחתך ל-ta-siRNA-TAS3-D7/D8 וזה מוזן ל-AGO7 ומבקר את רמתם של תעתיקים ממשפחת ה-Auxin-response factors (ARF) (Montgomery *et al.* 2008).

בצמח נפוצים קבוצות נוספות של siRNA. קבוצה אחת, שמקורם בתעתיקי antisense טבעיים (natural antisense transcripts, NAT), היא nat-siRNA, שתפקידם רק מתחיל להתגלות. חלקם משופעלים בתגובה לעקות אביוטיות (Borsani *et al.* 2005) או ביוטיות (Katiyar-Agarwal *et al.* 2006) ותפקידם לבקר את רמתם של גנים שונים הקשורים לעקות אלה. קבוצה שניה היא siRNA שמקורם בטרנספוזונים או רצפים חוזרניים אחרים, ואלה מעורבים בהשתקתם ב-*cis* ע"י RNA-dependent DNA methylation (RdDm) וביצירת heterochromatin (Xie *et al.* 2004; Zilberman *et al.* 2004).

שיבושים במרכיבי הביוסינטיזה של רכיבים שונים במערכת ההשתקה, או שיבוש פעילותם, גורמים לעוותים התפתחותיים קשים הדומים לעיתים לתסמינים המתקבלים מדבקה בירוסים (Kasschau et al. 2003).

ה. דיכוי-השתקה - *suppression of gene-silencing*

כדי לפעול נגד מערכת ההשתקה וירוסים פיתחו במהלך האבולוציה חלבונים המעכבים את ההשתקה המכונים Suppressors of gene-silencing או RNA-silencing suppressors (RSS). זהו RSS ממשפחות וירוסים רבות (Wang and Metzloff 2005) ואלה פועלים בדרכים מגוונות על רכיבים שונים של מערכת ההשתקה (טבלה 1).

טבלה 1. מספר מעכבי השתקה (RSS) מוירוסים שונים ומנגנון הפעולה שלהם.

| ספרות | מנגנון משוער | מעכב השתקה | וירוס (קיצור, קבוצה) |
|---|---|-----------------|--|
| Lakatos et al. 2006;) (Merai et al. 2006 | קישור siRNA-duplex | HC-Pro | <i>Tobacco etch virus</i> (TEV, Potyvirus) |
| (Ye and Patel 2005) (1 בסתירה ל- (Lakatos et al. 2006) (2 | קישור חומצות גרעין חד או דו גדילות ללא העדפת גודל או קישור siRNA-duplex | P21 | <i>Beet yellows virus</i> (BYV, Closterovirus) |
| (Merai et al. 2006) | קישור siRNA-duplex | gammaB | <i>Barley stripe mosaic virus</i> (BSMV, Hordeivirus) |
| (Merai et al. 2006) | קישור siRNA-duplex | P15 | <i>Peanut clump virus</i> (PCV, Pecluvirus) |
| (Zhang et al. 2006b)א (Goto et al. 2007)ב | א) קושר AGO1 ב) קושר dsRNA | 2b | <i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV, Cucumovirus) |
| (Csorba et al. 2007) | קישור siRNA-duplex | P122 subunit | <i>Tobacco mosaic virus</i> (TMV, Tobamovirus) |
| (Ye et al. 2003) | קישור siRNA-duplex | P19 | <i>Tomato bushy stunt virus</i> (TBSV, Tombusvirus) |
| (Merai et al. 2006) | קישור dsRNA ללא העדפת גודל | CP | <i>Turnip crinkle virus</i> (TCV, Tombusvirus) |
| (Baumberger et al. 2007) | קישור AGO1 ושליחתו לפרוטאזום לפירוק | P0 | <i>Beet western yellows virus</i> (BWYV, Polerovirus) |
| (Glick et al. 2008) | קישור ל-SGS3 | V2 | <i>Tomato yellow leaf curl virus</i> (TYLCV, Geminivirus) |
| (Merai et al. 2006) | קישור ל-dsRNA ללא העדפת גודל | P14 | <i>Potato leaf roll virus</i> (PoLV, Aureovirus) |

לרוב מעכבי השתקה ויראליים אלו אין דמיון בין משפחות ברמת החומצות האמיניות, או אף במבנה לאלה שפוענחו (לדוגמא, p19 פועל כד ימר ו- p21 כטבעת אוקטמרית), גם כאשר המנגנון לכאורה דומה. פיתוח מנגנונים בלתי תלויים הפועלים כנגד מערכת ההשתקה לאורך האבולוציה מחזקת את ההשערה כי חשיבותם להשרדות הוירוס מכרעת. ישנם אף וירוסים כגון *Citrus tristeza virus* (CTV, Closterovirus) בו אופיינו 3 מעכבי השתקה שונים המקודדים ע"י גנום הוירוס (Lu et al. 2004).

1. חלבון *Helper component*

ב-*Potyvirus* חלבון ה-RSS נקרא *Helper-component-proteinase* (HC-Pro) (Anandalakshmi et al. 1998; Brigneti et al. 1998; Kasschau and Carrington 1998). זהו חלבון רב-תפקודי, אשר גם מתפקד כפרוטאז בחיתוך הרב-חלבון (Verchot et al. 1992), העברת הוירוס ע"י כנימות (Pirone and Blanc 1996), קישור לחלבון המעטפת CP (Blanc et al. 1997), קישור RNA חד-גדילי בשני אתרים (Urcuqui-Inchima et al. 2000), תנועה ורפליקציה של הוירוס (Cronin et al. 1995; Kasschau and Carrington 1995), ובסינרגיה בין וירוסים (Shi et al. 1997; Wang et al. 2002). מבחנים ביוכימיים הראו כי HC-Pro קושר את rgs-CaM (חלבון צמחי בעל פעילות דומה ל-RSS) (Anandalakshmi et al. 2000), מעכב פעילות אנדונוקלאוליטית של ה-20S proteasome (Ballut et al. 2005), ומונע מתליציה של siRNA ויראליים (Ebhardt et al. 2005; Yu et al. 2006). HC-Pro יוצר דימרים או מולטימרים ופעיל במבנים אלו (Urcuqui-Inchima et al. 1999; Plisson et al. 2003; Ruiz-Ferrer et al. 2005). באופן סכמטי ניתן לחלק את מבנה ה-HC-Pro לשלוש חלקים: חלק 'N-טרמינלי ההכרחי להעברת הוירוס ע"י כנימות עלה, חלק 'C-טרמינלי בעל פעילות פרוטאוליטית ואשר נוכחותו הכרחית גם לפעילות תקינה של RSS (Varrelmann et al. 2007), וחלק מרכזי החשוב לפעילות רבות, כולל פעילות RSS (Plisson et al. 2003). החלק המרכזי מכיל מספר תיבות (motifs) השמורות בכל קבוצת ה-*Potyvirus*, הכוללות את תיבת FRNK (בחומצות אמיניות מספר 179-182 בחלבון HC-Pro של ZYMV), והקשורות לעוצמת התסמינים

הויראליים ב-ZYMV. מוטציה של FRNK ל-FINK (R_{180I}) גורמת לירידה דרסטית בחומרת התסמינים בעלי דלועים שונים, עד כי הצמח נראה בריא בשדה ומאפשרת קבלת פירות נורמליים, מבלי להפחית משמעותית את כמות הוירוס או את האינפקטיביות שלו (Gal-On and Raccach 2000). מוטציה זו נוצלה למטרת הגנה הדדית (cross-protection) בפני ZYMV אלים בשדה (Gal-On and Shibolet 2005) ולפיתוח וקטור ויראלי לביטוי חלבונים רקומביננטיים בצמחים (Arazi et al. 2001; Shibolet et al. 2001; Arazi et al. 2002). מוטציות בחלק המרכזי של HC-Pro שאינן ממוקמות בתיבת FRNK, ב-Potyvirus אחרים, יכולות גם הן לגרום לפחיתה בתסמינים מבלי להשפיע על הצטברות הוירוס (Saenz et al. 2001).

במהלך דוקטוראט זה, התגלה כי HC-Pro יכול לקשור ds-smRNA (Lakatos et al. 2006; Merai et al. 2006). ליכולת זו ישנן השלכות על מנגנון ההשתקה הצמחי, גם בהגנה מוירוסים, וגם בהתפתחות הצמח כיוון שאפשר ש-siRNA ו-miRNA יהיו מופקעים (sequestered) במצב דו גדילי בלתי פעיל. מנגנון זה דומה לזה של RSS אחרים כגון P19 של Tombusvirus (ראה טבלה 1) (Silhavy et al. 2002; Lakatos et al. 2005; Ye and Patel 2004).

ראוי לציין כי ניתן לשחזר חלק מהתסמינים של הדבקה בוירוס בלא הדבקה ע"י ביטוי חלבון HC-Pro בצמחים טרנסגניים. צמחי ארבידופסיס וסויה טרנסגניים אשר ביטאו כמויות משתנות של חלבון HC-Pro הציגו תסמינים התפתחותיים שחריפותם תאמה את רמת החלבון הטרנסגני בצמח (Lim et al. 2007; Mlotshwa et al. 2005). הועלתה השערה כי תסמינים אלה נובעים מאובדן בקרה בתהליכים מבוקרי smRNA (Kasschau et al. 2003). כיוון שמוטציות הגורמות לפגיעה בהצטברות miRNA כגון *hyl1*, *hen1*, *dcl1* ו-*ago1* גורמות לפנוטיפים דומים של פגיעה פליאוטרופית בהתפתחות בארבידופסיס (Lobbes et al. 2006), הוסק כי הדמיון בין פנוטיפים אלה לבין תסמיני הדבקה בוירוס נובעים מפגיעה ברכיבים משותפים למסלולים אלה. ואכן, נמצא כי רמות miRNA מסויימים, ובאופן בולט רמות miRNA*, עולות בעת הדבקה בוירוס (Mallory et al. 2002;)

Kasschau *et al.* 2003; Chapman *et al.* 2004; Dunoyer *et al.* 2004; Zhang *et al.* 2006b). אפשר לשער כי כתוצאה מקישור והפקעת miRNA ע"י HC-Pro תיתרחש עליה ברמתם של תעתיקים שלמים של גני- מטרה (ביחס לתעתיק חתוך) עקב מניעת חיתונם בידי RISC, ואכן נמצאו מספר (מועט) של גנים שהצטברותם מתאימה להשערה זו (Kasschau *et al.* 2006b; Zhang *et al.* 2003). מלבד תוצאות ברורות יותר בצמחים טרנסגניים המבטאים HC-Pro קיים מעט מאוד מידע על שינויים בגני מטרה עקב הדבקה בוירוס. בצמחים טרנסגניים בהם מבוטא הטרנסגן באופן קבוע ורצוף, בניגוד לצמח מודבק בוירוס, מבוטא ה-HC-Pro גם במריסטמות. כמו כן, אף שוירוסים גורמים לשינויים גדולים ועקביים ברמתם של תעתיקים רבים של mRNA שונים, סריקות כלליות למציאת mRNA המשתנים עקב הדבקה בוירוסים שונים לא העלו אף גן מטרה ידוע של miRNA או ta-siRNA (Whitham *et al.* 2003; Whitham *et al.* 2006).

אם כן, נשאלת השאלה מהם הגורמים ליצירת תסמינים עקב הדבקה בוירוס. על מנת לברר שאלה זו היה צורך במערכת השוואתית בה ניתן האות ליצירת התסמינים עוד בטרם הופעתם. בעבודה זו, עשיתי שימוש בתבדידים מוחלשים של ZYMV, שאינם גורמים כמעט לתסמינים (Gal-On and Raccach 2000) והשונים מטיפוס הבר במוטציות נקודתיות בתיבה השמורה FRNK (conserved motif) הממוקמת בחלקו המרכזי של חלבון ה-HC-Pro.

בעבודה זו באתי לבחון את מהות המחלה הויראלית. ישנו פער בין הידע ש-HC-Pro הוא גורם פתוגניות (pathogenicity factor) בפני עצמו, לבין הידע על דרך פעולתו על הצמח ועל ההתרחשויות בצמח קודם להופעת התסמינים.

ז. מטרת המחקר

ז.1. מטרה עיקרית:

הבנת מנגנון הפעולה של חלבון HC-Pro הווירלי בהשריית תסמיני מחלה בדלועיים לאחר הדבקה בוירוס ZYMV.

ז.2. מטרת משנה:

- זיהוי החומצות האמיניות בתיבת FRNK של חלבון HC-Pro המעורבות בהופעת תסמינים ובעיכוב מערכת ההשתקה של הצמח.
- אפיון ביוכימי של האינטראקציה בין miRNA ו-siRNA לבין חלבון HC-Pro.
- זיהוי ה-microRNA והגנים הצמחיים המעורבים בהופעת התסמינים.

שיטות המחקר

א. צמחים, הדבקתם בוירוס ואיסוף הדוגמאות

צמחי קישוא *Cucurbita pepo* L. מזן "מעין" נזרעו בעציצים בתערובת טוף- כבול בתוספת דשן איטי- שחרור וגודלו בחדר גידול מבוקר תחת תאורה קבועה ב- 23°C. 5 ימים לאחר הנביטה הודבקו פסיגי הנבט עם פלסמיד המכיל cDNA המקודד לגנום השלם של ZYMV (Gal-On et al. 1991). ההדבקה נעשתה ע"י ירי במתקן המתואר ב-(Gal-On et al. 1995). עלי קישוא נאספו על קרח בזמנים שונים לאחר הדבקה להפקת RNA או חלבון. לניסויים הכמותיים בהם נעשה שימוש ב- RNA ל-microarray, ל-northern-blot ול-RT-QPCR נעשה שימוש באותו RNA אשר הופק מ-3 חזרות נפרדות שגודלו בנפרד ("חזרות ביולוגיות" A, B ו-C) ואשר הורכבו מחתיכות עלים מ-7-9 צמחים שונים כ"א. עלים של צמחים בלתי מודבקים (H או uninoc), מודבקים בוירוס האלים $ZYMV^{FRNK}$, או בוירוס המוחלש $ZYMV^{FINK}$ נאספו ב-5, 7 או 14 ימים לאחר הדבקה (days post inoculation dpi). כיוון

שהתסמינים 5 ימים לאחר הדבקה היו לרוב בלתי נראים, אוחד ה-RNA מהצמחים השונים רק לאחר וידוא ההדבקה ב-ZYMV ע"י שמירתם עד להופעת פנוטיפ ברור הטיפוסי למוטציה. הוירוס המוחלש היה יציב בתנאי הניסוי.

ב. פלסמידים

ב.1. פלסמידי cDNA המקודדים לוירוסים

הדבקת צמחים נעשתה ע"י ירי של פלסמידים המקודדים לגנום המלא של ZYMV תחת בקרה של פרומוטור 35S CaMV (Gal-On *et al.* 1995). רצפי הוירוס ZYMV אשר שימשו לעבודה זו מהונדסים כך שאינם עבירים ע"י כנימות עלה שהם הוקטור הטבעי (Gal-On *et al.* 1992). נעשה שימוש בקלוני cDNA אינפקטיביים, ובהם הוירוס הגורם תסמינים אלימים בדומה לטיפוס הבר ZYMV^{FRNK} (רצף ב-GenBank: gb|EF062582), והוירוס המוחלש השונה ממנו בחומצה אמינית יחידה (R₁₈₀) ZYMV^{FINK} (gb|EF062583) (Gal-On and Raccach 2000). שבטים של וירוסים אלה המשובטים לתוך הפלסמיד pGreen מתוארים ב-Arazi *et al.* 2001). בכדי להקל על זיהוי חלבון HC-Pro ב-western-blot הוסף בקצה ה-N-terminal רצף (HA)-tag influenza-hemagglutinin בחלק מהמקרים כפי שמצויין בתוצאות HC-Pro משני הוירוסים הוגבר בעזרת תחל 5' המכיל את האתר *SalI* ואת ה-HA-tag, ותחל 3' המכיל את האתר *BamHI*. תוצרי PCR אלה שובטו לתוך pKS35S-FLC-HIS שהוא שבט המבטא וירוס שבו ל-HC-Pro מוסף HIS-tag כמתואר ב-Kadouri *et al.* 1998), החתוך ב-*SalI* וב-*BamHI*. שבטים ויראליים מוחלשים (ZYMV^{FINK}) המבטאים GFP או CMV-Fny-2b כגון נוסף, והמכונים בהתאמה ZYMV-AGII-GFP ו-ZYMV-AGII-2b, מתוארים ב-Arazi *et al.* 2001; Wang *et al.* 2004). על מנת להחליף את אתר ה-FINK ברצפים FRNK, FKNK או FRNA בשבט ZYMV-AGII-GFP נעשה שימוש בטכניקת splicing-overlap extension-PCR. כל תוצר PCR הכיל 5'-*BstEII* ו-3'-*BamHI* שאיפשרו את החדרתם ל-ZYMV-AGII-GFP חתוך באנזימים אלו (א. חרונסקי, טרם פורסם).

ב.2. פלסמידים בינאריים

לבטוי-ביתר של חלבון ה- HC-Pro בעלים של צמחי *N. benthamiana* יוצרו פלסמידים בינאריים המבטאים את החלבון ואשר שימשו להתמרה של חיידקי *Agrobacterium tumefaciens* שהוזרקו לעלה (אגרו-אינפילטרציה). פלסמיד השלד בשיבוט היה pBin19-GFP אשר מבטא את החלבון Green fluorescent protein (GFP) בין פרומוטור 35S לבין NOS-terminator (Epel et al. 1996). המחדר GFP הוצא עם האנזימים XbaI/NotI והוחלף ע"י ZYMV-HC-Pro עם HA-tag. מחדר חדש זה הוכן ע"י PCR עם תחל 5' המכיל אתר XbaI ו-HA-tag ותחל 3' המכיל קודון stop ואתר NotI. התבנית לראקציה היו הפלסמידים המכילים את רצף ה-ZYMV בעל המוטציה המתאימה המתוארים למעלה (א. חרונסקי, טרם פורסם). לחלופין, כדי לבטא ביתר את חלבון ה- HC-Pro של *Tobacco etch virus* (TEV) נעשה שימוש בתחלים המכילים את האתרים SalI/NotI בדרך דומה, כאשר התבניות לראקציות ה-PCR היו pGreen-TEV-HC^{FRNK} ו-pGreen-TEV-HC^{FINK} (ארזי צ. תוצאות בלתי מפורסמות).

כדי לייצר פלסמיד הגורם להשתקת GFP במערכת האגרו-אינפילטרציה נוצר מחדר המשעתק RNA היוצר בהתקפלותו על עצמו מבנה "סיכת ראש" שגדילו האחד זהה ל-GFP והשני משלים לו (inverted repeat, IR). מחדר זה הוכן ע"י הגברתו ב-PCR של pEGFP (Clontech) עם תחלים לפי המתואר ב- (Wesley et al. 2001) והחדרתו לפלסמיד הביניים pHannibal כמתואר. מבנה ה-IR שהתקבל הועבר יחד עם רצפי הבקרה הנלווים לפלסמיד הבינארי הסופי pART27 בעזרת חיתוך ב-NotI (א. חרונסקי טרם פורסם).

ב.3. פלסמידים המכילים רצפי גני-מטרה (Target-gene clones)

גנים המכילים קטעים מרצפי גני- מטרה של miRNA הוגברו בראקציית PCR. לאחר אלקטרופורזה נוקה המקטע הרלוונטי מג'ל (Zymo-gel purification kit), ושובט בשיטת T/A-cloning לפי הוראות היצרן (Promega) לתוך pGEM-T easy (Promega) או לתוך pTZ57/T (Fermentas). כאשר ראקציית ה-PCR נערכה עם פולימראזה proofreading שאינה מוסיפה את הבסיס A לקצה הרצף, כגון האנזים Phusion (Finnzymes), הוספו

קצוות A בעזרת Taq-polymerase: [Taq-polymerase 0.1 μ l (Fermentas), 1 μ l (JMR) "PCR-buffer with $MgCl_2$ ", 2 mM dATP, 1 μ l, בנפח סופי של 10 μ l, והדגרה $72^\circ C$ למשך 10 דקות]. ראקציה זו נוקתה בעזרת Qiaquick PCR-cleanup kit (Qiagen) לפני השיבוט.

ג. רשימת תחלים וגלאים (primers and probes)

תחלי ה-DNA ששימשו לשיבוט וריצוף גני מטרה של miRNA מקישוא אשר נבחנו בעבודה זו מוצגים בטבלה 2A. תחלי ה-DNA ששימשו לכימות גני מטרה אלו, גנום ה-ZYMV וגני ה-"house-keeping" ב-Q-PCR (quantitative / real-time PCR) מוצגים בטבלה 2B. רצפי הגלאים ששימשו ל-northern-blot וליצירת גלאי RNA דו-גדילי למבחני קישור ב-EMSA מוצגים בטבלה 3. אותיות שאינן מהנוקלאוטידים המקובלים A, T, U, C או G ברצף, משמען תערובת נוקלאוטידים (degenerate primers) לפי הטבלאות המקובלות בספרות ואצל היצרנים. רצפי RNA מסומנים בקו תחתון. הסימן + מסמן שהנוקלאוטיד שאחריו הוא מסוג (LNA) Locked nucleic acid.

טבלה 2A. תחלים ששימשו לשיבוט

| שם | גן מטרה | רצף |
|--------------------------|---------|----------------------------|
| odT (20) VN | mRNA | TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN |
| AGO1_3_01 | AGO1 | CTCCTTKATCATKCCACCAG |
| AGO1_3_02 | AGO1 | CTRTCWGATGTCTCBGGYTCC |
| AGO1_5 | AGO1 | GATGAATAAGAAAATGRTYAATGG |
| AthmiR168TargetFwd | AGO1 | TTCCCSAKCWGCAYCAAGC |
| sqAGO_1207Rev | AGO1 | CATCACGGGTTGAGAAGCTGAGT |
| sqAGO1middleRev | AGO1 | TCTGACACAGAGCGAGAGAA |
| sqAGOcontig1053Rev | AGO1 | GGCTGGAAGACGATTACCAA |
| sqAGOcontig548Fwd | AGO1 | AGGACGCGGTAACATATGGTG |
| sqARF3_1153RCrev | ARF3 | GACCGCAACCACCACTTTCCTTA |
| SqARF3_936Fwd | ARF3 | gagGAGATTGTTGCCTGACTTACAT |
| sqARF3a_1119RC | ARF3A | GACTTCATTGGTGGCAGTGGCTATT |
| sqARF3a_925Fwd | ARF3A | agGAGATCATTTCTCTGGTTACTC |
| sqARF4_1107RC | ARF4 | CACCTAAACTAGGCTCTGGTTTTTC |
| sqARF4_927Fwd | ARF4 | gaGGTGCGATCTTCTGCACAACAA |
| AthmiR166TargetFwd | HD-ZIP | YTGGRATGAAGCCTGGTCCGG |
| AthIncurv_1177Fwd | INCU | AGYCCTGCAGGRCTTTTGTCCA |
| CmelIncurv_2690Rev | INCU | ACATATTGTCGAGCCATCGAT |
| sqINCU1215rev | INCU | GGCCTTTGAAAGAACTCTGTT |
| sqINCURV-294rev | INCU | AATGGTTCACCATTGGCT |
| MU5707Fwd190 | MU5707 | CGTCCCTCCGGATTTACTT |
| MU5707Fwd432 | MU5707 | GATCATAGTGGAGGCGGAGA |
| MU5707Rev755 | MU5707 | GATTCGCGTCGGAATTAGAA |
| MU5707Rev812 | MU5707 | GTTGGAGGAAGCAGAGGATG |
| AthPHV487Fwd | PHV | CAGGAAGCTGAGTGTATGA |
| AthPHV-667Fwd | PHV | AAACCCAACACMTCAGCATCC |
| csatPHV-2490Rev | PHV | ATATCCAGACCAGCCTGGTT |
| PHVplant409Fwd | PHV | ACAGATCAAAGTYTGGTTYCAGAA |
| sqPHV16-845Rev | PHV | TGCGGGAACAGCAACGATT |
| SqPHV888Rev | PHV | AGACTAACAAGACCACAGGC |
| sqPHVc116-119Rev | PHV | AATTTCCGCAACCTTCATTG |
| sqPHVc116-249Rev | PHV | CAGCTGCTAATGTCTGTTGGA |
| sqPHV-SPAN-113Fwd | PHV | GCATCTGGAACAACCACAGA |
| sqPHV-SPAN-230Fwd | PHV | CTTGCAATAGCCGAGGAGAC |
| sqPHVspan-527Fwd | PHV | AACGACCGTCTGCAGAAGCA |
| sqPHV-SPAN-55Fwd | PHV | GAAGCAGTCTCTCGTTTGG |
| Revo1_362fwd | REVO1 | AGAATGGGTATATGCGCCAACAT |
| REVO1_503Fwd | REVO1 | CAGAGGAGATTTTGGCAGCC |
| REVO1_510Fwd | REVO1 | CGATTGCCGGAGCCTTGAAGT |
| Revo1_516rev | REVO1 | CAAAATCTCCTCTGCAATAGACAA |
| REVO1_595rev | REVO1 | TACTACATTAGCGCCTGCACGA |
| REVO1_677rev | REVO1 | AATCTTCATGGGCTCTAAACCG |
| REVO2_503Fwd | REVO2 | CAGAGGAGACCTTGGCAGAG |
| REVO2_677rev | REVO2 | AATCTTCGAAGGCTCCAAACTT |
| sqUM159t_406Fwd | UM159t | AGAATTGTGGGTTCCATCCCGGTCAG |
| UM159_target-site_781Rev | UM159t | TTTGGTTTGAAGGGGCTC |
| UM159t_172fwd | UM159t | CCACARAGRGACTTGGTGT |
| UM159t_825rev | UM159t | CTCTTCWYSCCAACCATCTTC |
| UM159target-site_763Fwd | UM159t | GAGCCCCCTTCAAACCAA |
| miR159TargetFwd | | WKSAGCTCYCTTCAWCCAA |

טבלה 2B. תחלי Q-PCR

| שם | שחוש | סוג אמפליקון | גן | רצף |
|--------------------|-------|----------------|-------------|-------------------------|
| Actin14L | Q-PCR | Reference gene | Actin | CCACTCAACCCAAAGGCTAA |
| Actin14R | Q-PCR | Reference gene | Actin | CACACCATCACCAGAATCCA |
| Actin19L | Q-PCR | Reference gene | Actin | GGAGCTGAGAGATTCCGTTG |
| Actin19R | Q-PCR | Reference gene | Actin | CCACTGAGGACGATGTTTCC |
| Cmel-Actin-F | Q-PCR | Reference gene | mel-Actin | ACAATGAGCTTCGTGTGCTC |
| Cmel-Cyclophylin-F | Q-PCR | Reference gene | Cyclophilin | GATGGAGCTCTACGCCGATGTC |
| Cmel-Cyclophylin-R | Q-PCR | Reference gene | Cyclophilin | CCTCCTGGCACATGAAATTAG |
| Cmel-UBQ-F | Q-PCR | Reference gene | Ubiquitin | acaacatccagaaggagtc |
| Cons TUA-F | Q-PCR | Reference gene | TubulinA | CTTACCGCCAGCTCTTCCA |
| SqTUA5L | Q-PCR | Reference gene | TubulinA | CCAGTTTGAGGTTTCGATGGT |
| SqTUA5R | Q-PCR | Reference gene | TubulinA | GCTGCTCATGGTAAGCCTTC |
| SqTUA14L | Q-PCR | Reference gene | TubulinA | TCCCCACAAGTCTCAACCTC |
| SqTUA14R | Q-PCR | Reference gene | TubulinA | TCATTGTCAAGGAGCACAGC |
| sqAGO Q-fwd603 | Q-PCR | target gene | AGO1 | GGAGGATCTTCTTCTGGTGGGA |
| sqAGO Q-rev705 | Q-PCR | target gene | AGO1 | CCAGAGATGACATTGGCTGA |
| sq5707 Q-Fwd53 | Q-PCR | target gene | AGO1 | CGCAGGTAACAACCTCGAAT |
| sq5707 Q-Rev198 | Q-PCR | target gene | AGO1 | GAAGGCGATTGATGGGTCTA |
| sqAGO1 Q-465fwd | Q-PCR | target gene | AGO1 | GCCGAGGAACATCTCAACAT |
| sqAGO1 Q-567Rev | Q-PCR | target gene | AGO1 | CACCATAGTTACCGCTCCT |
| sqAGO1 Q-2577fwd | Q-PCR | target gene | AGO1 | TTTGGTGCCGATGTAACTCA |
| sqAGO1 Q-2671Rev | Q-PCR | target gene | AGO1 | TTTGTAACTTCGGCCAATC |
| sqAGO1 Q756Fwd | Q-PCR | target gene | AGO1 | CAACAAATTTCCATCCAGCA |
| sqAGO1 Q860 Rev | Q-PCR | target gene | AGO1 | GCTACCCATTCTGGTCTCA |
| sqAGO1 Q 716Rev | Q-PCR | target gene | AGO1 | GGAAGAACTCGCCAGAGATG |
| sqINCURV-Q-218rev | Q-PCR | target gene | INCU | CCTTGAGGATTTTCAGCAACTC |
| sqINCURV-Q-61Fwd | Q-PCR | target gene | INCU | ACTGGAAGTCCGCTGGAG |
| PHVsp Sense | Q-PCR | target gene | PHV | GAGTTCCTTTCCAAGGC+AAC |
| PHVsp AS | Q-PCR | target gene | PHV | TTTCGAGAAACAGCAACAAT+CC |
| PHV16 AS | Q-PCR | target gene | PHV | CGGGAACAGCAACGAT+TC |
| sqUM159t Q 526fwd | Q-PCR | target gene | UM159t | CTCCAATGGTGAATGTGTCT |
| sqUM159t Q 670Rev | Q-PCR | target gene | UM159t | GTGCCAACCATCTGTAACCTT |
| CP-489F | Q-PCR | ZYMV genome | CP | GCCGCTCTTTTCGAAGATAA |
| CP-639R | Q-PCR | ZYMV genome | CP | GAACCAAGAGGCGAATGCT |
| HC 1564fwd | Q-PCR | ZYMV genome | HC-Pro | AACCACATGCATCTGACTGG |
| HC 1716rev | Q-PCR | ZYMV genome | HC-Pro | TCGCTTGGAAATGGTATCCTC |

טבלה 3. טבלאת גלאים

| שם | שחוש | סוג | רצף |
|------------------|------------------|-----------|---------------------------------|
| hsa-mir16 | synthetic duplex | RNA-Oligo | <u>UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG</u> |
| hsa-mir16* | synthetic duplex | RNA-Oligo | <u>CCAGUAUUAAACUGUGCUGCUGAA</u> |
| hsa-mir16RC-2+2 | synthetic duplex | RNA-Oligo | <u>CCAAUUAUUACGUGCUGCUAAA</u> |
| Lu_miR159b_RC | miR159 probe | probe | AAGAGCTCCCTTCAATCCAAA |
| Ptc-miR*159c_RC | miR159* probe | probe | TATTGGACTTCAAGGAGCTCCA |
| zma-miR166i_RC | miR166 probe | probe | GGGAATGAAGCCTGGTCCGA |
| Csat_miR*166Y_RC | miR166* probe | probe | CCTCGAGCCAGCCAACATTC |
| ath-miR168aRC | miR168 probe | probe | TTCCCGACCTGCACCAAGCGA |
| cmelo mir168*RC | miR168* probe | probe | ATTCAGTTGATGCAAGGCGGG |

ד. הפקת RNA וכימותו

ד.1. Total RNA

RNA הופק מעלי קישוא או מעלי *N. benthamiana* בעזרת TRI-reagent (MRC) לפי הוראות היצרן. הופקו כמויות גדולות של RNA מדוגמאות הקישוא למטרת אגירתן עד סיום המחקר. מאגרי RNA אלה שימשו במהלך כל המחקר לשיבוט גנים חדשים מקישוא, ולכל המבחנים הכמותיים על מנת למנוע שונות ניסויית ולאפשר השוואה בין ניסויים כמותיים ל-miRNA, לבין גני המטרה שלהם, מאותה דוגמא. RNA שנשמר במקפוא -80°C נבדק שוב לאחר כ-3 שנים ע"י אלקטרופורזה ונמצא תקין לחלוטין (נספחים, איור S1).

כימות RNA נעשה ע"י קריאה בספקטרופוטומטר (Nanodrop). טיפול ב-DNaseI נעשה רק למטרת Real-time PCR (Quantitative, Q-PCR) בעזרת (Ambion) Turbo-DNaseI kit עפ"י הוראות היצרן.

ד.2. Northern-blot ל-RNA זעירים (smRNA)

כדי להשוות את רמתם המצטברת של RNA זעירים: miRNA, miRNA*, siRNA ו-ta siRNA נעשו שני סוגים של ג'ל 15% acrylamide עם 8M urea שהתאימו לשני פרוטוקולים שונים לקיבוע ה-RNA למברנה:

ד.2.א. אלקטרופורזה בבופר TBE, קיבוע למברנה עם UV.

בסוג הראשון, הבופר בג'ל, בופר ההרצה ובופר הטרנספר הכילו 0.5X Tris-Borate-EDTA (TBE). smRNA הועברו למברנת (Whatman) Nytran SPC בהעברה רטובה זה RNA-עבר קיבוע למברנה (crosslinking) בעזרת 0.24 Joule של אור אולטרה-סגול (Stratalinker, Stratagene). בפרוטוקול זה הוטענו על הג'ל $20\ \mu\text{g}$ של total RNA לבאר.

ד.2.ב. אלקטרופרזה בבופר MOPS, קיבוע למברנה עם EDC.

בסוג השני, שנעשה בדיוק לפי הפרוטוקול המתואר ב-(Pall et al. 2007) והיה בעל רגישות משופרת (בערך פי 12), נעשה קיבוע של ה-RNA אל מברנת ניילון בעזרת 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC). בכל התהליך אסורה נוכחותו של TRIS (כגון זה המצוי ב-TBE).

אופן הכנת הג'ל היה [מספיק לשני ג'לים קטנים (Biorad Protean3)]:

| | |
|-------------------------|----------|
| Acrilamide:BIS 28:1 40% | 11.25 ml |
| Urea | 12.9 gr |
| MOPS pH 7.0 100 mM | 6 ml |
| H ₂ O | 3.2 ml |
| APS | 300 µl |
| TEMED | 30 µl |
| סה"כ | 30 ml |

בפרוטוקול זה הוטענו 10 µg של total-RNA לבאר בלבד. הדוגמאות הורצו במתח של 100 V למשך 90-120 דקות בבופר הרצה 3-[N-morpholino]propanesulfonic-acid 20 mM (MOPS) pH 7.0. ג'לים אלה הועברו למברנת ניילון Hybond NX (GE) במים בלבד במתח קבוע של 20 V למשך 40 דקות במכשיר Biorad semidry. אופן הכנת תמיסת הקיבוע היה (מספיק לקיבוע שני ג'לים קטנים כנ"ל):

את התמיסה מכינים מיד לפני השימוש ובסדר המתואר. להוסיף 122.5 µl של 12.5 M HCl. להוסיף 373 mg של EDC (Pierce) ולהשלים את הנפח ל-12 ml במים. בתמיסה זו מרטיבים 2 שכבות של נייר Whatman 3MM בגודל 11x9 ס"מ המונחות בכלי שטוח שאינו פלסטי, ועל הנייר מניחים בזהירות את המברנות (פנים למעלה) מבלי להרטיב את צידן העליון. מכסים את הכלי מבלי לגעת במברנה ומכניסים לתנור שחומם מראש ל-60°C למשך שעה. בסוף התהליך שוטפים את המברנות במים ומייבשים לשימוש עתידי.

ראוי לציין כי למרות ההבדלים ברגישות המסקנות שהתקבלו משני הפרוטוקולים היו זהות.

ד.ג. היברידיזציה

לזיהוי רצפי miRNA ו-miRNA* סונטוזו גלאי DNA בעלי רצף הופכי- משלים (reverse-complement) לרצפים ידועים (<http://microrna.sanger.ac.uk/sequences>) או שנתגלו בעבודה הנו כחית עפ"י אנליזה ביואינפורמטית של רצפי מלון ומלפפון שנתקבלו מספריות ESTs (טבלה 3). הגלאים סומנו בקצה 5' עם γ - ^{32}P -ATP. הרכב ראקציה הסימון:

| | |
|--|------------------|
| DNA oligo 10 pmol/ μl | 2 μl |
| T4-polynucleotide kinase 10U/ μl (PNK, NEB) | 2 μl |
| PNK buffer (NEB) | 5 μl |
| γ - ^{32}P -ATP (3000 Ci/mmol 10mCi/ml, EasyTides, Perkin Elmer) | 5 μl |
| H_2O | 36 μl |
| סה"כ | 50 μl |

התערובת עברה הדגרה ב- 37°C למשך שעה, והגלאי נוקה ע"י העברתו בקולונת ג'ל-פילטרציה (Pharmacia Microspin G-25 או דומה) ע"י סרוז ב- $735 \times g$ למשך 2 דקות. הממברנה עברה פרה-היברידיזציה עם 15 ml בופר rapid hybridization (תעשיות בילוגיות, בית העמק) ב- 40°C והגלאי המנוקה הוסף במלואו לבופר זה לאחר כשעה. היברידיזציה נעשתה למשך לילה ב- 40°C . הממברנה נשטפה פעמיים למשך רבע שעה ב- $2\times \text{SSC}$, 0.2% SDS ב- 50°C , יובשה ונחשפה למסך פוספואימג'ר (Fuji).

לזיהוי רצפי GFP-siRNA הוכן גלאי RNA ע"י לינאריזציה של פלסמיד pBluescript-GFP עם האנזים SalI ושעתוקו *in-vitro* ע"י T7 RNA polymerase (Fermentas) בנוכחות α - ^{32}P -UTP. [בפרוטוקול משופר נעשה שימוש ב-RiboScribe T7 RNA Probe Synthesis Kit (Epicentre)]. הגלאי עבר היברידיזציה עם הממברנה למשך הלילה בתמיסה של $2\times \text{SSC}$, 1% SDS, ו-100 $\mu\text{g/ml}$ Herring-sperm DNA (ICN, USA) ב- 45°C . הממברנה נשטפה פעמיים למשך רבע שעה ב- $2\times \text{SSC}$, 0.1% SDS ב- 40°C , יובשה ונחשפה למסך פוספואימג'ר (Fuji). התמונות שהתקבלו כומתו בעזרת התוכנה ImageJ.

ד.3. smRNA specific microarray

כדי לסרוק RNA מקישוא לקיומם של כל ה-miRNA הידועים מצמחים ואת רצפי ה-miRNA* החזויים שלהם, וכדי לגלות הבדלים ברמת ביטוי של רצפים אלו בין הטיפולים, נעשו 3 ניסויים בהם הודפסו גלאים לרצפים אלו על מערך DNA ממוזער (microarray). הגלאים ב-microarray אלו הודפסו ע"י LC-Sciences (Houston, TX, USA) על סמך הרצפים מ-Sanger miRBase (ל-2 הניסויים הראשונים, A ו-B, גרסא v7.1, ולניסוי השלישי, C, גרסא v10.0 המכילה רצפים נוספים) (<http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/>). גלאים ל-miRNA* הודפסו על סמך הרצפים החזויים (לא מוכחים ביולוגית) ממבנה הפרקורסור של אותו miRNA. בנוסף הודפסו על ה-microarray גלאים לרצפים שנתגלו באופן ביואינפורמטי או אמפירי במאמרים שונים (Yoo *et al.* 2004; Adai *et al.* 2005; Li and Zhang 2005; Lu *et al.* 2005). כדי לזהות siRNA ממקור ויראלי הודפסו גלאים כנגד כל הגנום של ZYMV (גדיל מקודד, plus strand) וכנגד כל הגדיל המשלים לו (minus strand). גלאים אלו, באורך 25 בסיסים כל אחד רועפו (tiled) בחפיפה של 13 בסיסים בין גלאי לגלאי. מספור הגלאים נעשה לפי מיקומם בגנום בגדיל המקודד מקצה 5'. בכל microarray הוגבו שני דוגמאות RNA בוזמנית. היברידיזציה נערכה ע"י LC-Sciences עם smRNA שבודד בעזרת mirVana miRNA Isolation Kit (Ambion) מ-20 µg total RNA מקישוא מהטיפולים השונים המתוארים בסעיף א'. למקטע RNA זה הוסף "זנב" polyA בעזרת poly-A polymerase ונעשתה ליגציה לאחד משני "תוויות" (tag) אוליגונוקלאוטידיות. לאחר ההיברידיזציה ל-microarray נעשתה היברידיזציה שניה עם דנדרמריים ספציפיים ל"תוויות" ומסומנים בנפרד בצבענים Cy3 או Cy5. בדוגמאות ה-RNA הוכנסו כמויות מדודות של RNA זרים (spike) כבקורות פנימיות ואלו שימשו לנורמליזציה של התוצאות.

ה. מבחן השתקת GFP

כדי לבחון פעילות מעכבי השתקת גנים (RNA silencing suppressors, RSS) נעשה שימוש במבחן השתקת GFP בדומה לזה המתואר ב- (Brigneti *et al.* 1998), ובתנאים דומים. בקצרה, הוכנו תבדדי חיידקי אגרובקטריום שונים הנושאים: (1) פלסמיד המבטא EGFP (GFP), (2) פלסמיד המשעתק RNA היוצר בהתקפלותו על עצמו מבנה "סיכת ראש" שגדילו האחד זהה ל-GFP והשני משלים לו (inverted repeat, IR), (3) פלסמידים המבטאים HC-Pro מטיפוס הבר או מוטנטי. שילובים שונים של תבדידים מחיידקים אלה הוזרקו לעלי צמחי *N. benthamiana* ("אגרו-אינפילטרציה"). פלסמידים המבטאים HC-Pro על בסיס pBin19 הוזרקו עם אגרובקטריום מזן EHA105, הפלסמידים pART-EGFP ו-pART-IR-EGFP הוזרקו עם אגרובקטריום מזן GV2260-C58. בהזרקות לצורך הכנת חלבון HC-Pro (לצורך EMSA) תרבית החיידקים נמהלה ל- 1.5 OD_{600} במצע LB-MES טרי והוזרקה לעלה שלם. במבחן RSS, בו הוזרקו יחדיו שלושה תבדידים, נמהל כל תבדיד באחר או בפלסמיד ללא מחדר (Empty vector, EV) ל- 0.5 OD_{600} של 0.5, והוזרק לאיזור מוגבל של העלה. דוגמאות חלבון הוכנו מ-2-3 עלים לצמח (ראה סעיף ח.1. "תמציות צמחיות"). פלואורוסצנציה של GFP בעלים מנותקים נצפתה וצולמה תחת אור אולטרה-סגול (מנורת UVP model B100A) עם מצלמה דיגיטלית תוך שימוש בפילטר צהוב.

1. Real-time PCR (Q-PCR)

1.1. טיפול ב-RNA

כדי לכמת רמת RNA באוכלוסיית total RNA נעשה שימוש ב-Reverse-transcription-PCR (RT-Q-PCR) Real-time quantitative PCR. בניסוי נתון נלקחו בו זמנית כמויות שוות של RNA לטיפול ב-DNaseI, $10 \mu\text{g}$ בנפח סופי $40 \mu\text{l}$ (Ambion Turbo-DNase kit) ולאחר מכן אינאקטיבציה עם ראגנט אינאקטיבציה לפי הוראות היצרן, ריכוז נמדד בשנית לאחר הטיפול ב-DNaseI והדוגמאות נמהלו ל- $100 \text{ ng}/\mu\text{l}$ וריכוז נמדד בשלישית לאימות (טווח סטיה

מקסימלי (98-102 ng/μl). כדי להוכיח ששלמות ה-RNA נשמרה במלואה, בתום תקופת המחקר נלקחו 0.5 μg מכל דוגמא מטופלת לאלקטרופורזה בג'ל אגרוז דנטורטיבי (איור S1 [בנספחים]).

2. יצירת cDNA

מדוגמאות ה-RNA המטופלות ב-DNaseI, בהם נעשה שימוש רב-פעמי, נלקחו 250 ng לראקציית reverse transcription (Invitrogen Superscript-II 50 units, DTT 1mM, בופר ראקציה, 0.5 mM dNTPs-mix, 5 pmol תחל ספציפי [או בתערובת תחלים 5 pmol מכל תחל ספציפי], בנפח סופי של 10 μl, והראקציה בוצעה ב-42°C למשך שעה, שלאחריה אינאקטיבציה ב-70°C של האנזים למשך 10 דקות. בסוף התהליך נמהלה הראקציה במים ביחס 1:4.

לחלופין, כאשר נעשה שימוש בתחל המכיל שרשרת oligo-dT (התחל OdTVN, ראה טבלה 2A) נעשתה ראקציה דו-שלבית. מהתחל נלקחו 500 ng שהוספו ל-500 ng של RNA בנוכחות נוקלאוטידים, חוממו לדנטורציה ב-70°C ואוחזו בקרח, לפי הוראות היצרן (Invitrogen). רק לאחר שלב זה הוספו שאר מרכיבי הראקציה כנ"ל, והכוללים 100 units של האנזים Superscript-II בנפח סופי של 20 μl. הראקציה והמיהול כנ"ל. לכל ניסוי הוכן cDNA בו זמנית לכל הטיפולים.

3. ראקציית ה-Q-PCR

ראקציית ה-Q-PCR נערכה במכשיר Rotor-Gene 3000 (Corbett life science). 4 μl של cDNA מהול 1:4 במים הוספו למבחנות המכילות תערובת ראקציה מוכנה (Thermo-scientific ABSOLUTE QPCR SYBR GREEN MIX) יחד עם זוג תחלים ספציפיים (ריכוז סופי 0.2 pmol/μl) בנפח סופי של 15 μl. מכל cDNA נעשו שתיים או שלוש חזרות טכניות. אלא אם צויין אחרת (טבלה Q-PCR reaction variables.xls) תנאי הראקציה היו: 15 דקות אקטיבציה ב-95°C, ולאחר מכן 40 מחזורים של 95°C למשך 10 שניות, 60°C למשך 15 שניות, ו-72°C למשך 20 שניות. קריאת ההחזר הפלואורוסצנטי נעשתה לקראת סיום שלב

האלונגציה ב-72°C, אך לעיתים היה צורך לבצע קריאה נוספת בטמפרטורה גבוהה יותר כדי להמנע מקריאת החזר מ- primer-dimer (ראה טבלה לעיל). רמת הסף לקביעת ערכי Ct (Cycle threshold) היתה 0.01 אלא אם צויין אחרת. הנתונים עברו סינון רעש לתיקון עקומה (Noise slope-correction) ונורמליזציה פנימית בשיטת Dynamic-tube בעזרת התוכנה Rotorgene v6.0 (Corbett life science). לפני ניתוח התוצאה, כאשר נעשו שתי חזרות טכניות, כאשר היה הבדל מהותי בין החזרות – שניהן נפסלו, אך כאשר נעשו שלוש חזרות נפסלה החזרה החריגה בלבד. שלוש חזרות איפשרו הצגת טווח standard error of means (SEM). דוגמאות נפסלו גם אם בעקומת ההתכה (melting curve) של התוצר (ים) בסיום הראקציה נראה תוצר בעל נקודת התכה נוספת או שונה מהבקורת. ניסוי בו בבקורת השלילית (NTC) נראה תוצר בעל נקודת התכה כשל התוצר האמיתי נפסל כולו אלא אם מספר המחזורים המפריד ביניהם היה גדול מ-8 (הבדל פי 256 בריכוז). ניתוח התוצאות נערך באחת השיטות הבאות: ביטוי יחסי תוך נירמול לגן "housekeeping" בשיטת $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Winer *et al.* 1999), או חישוב מספר עותקי RNA ל-RNA ng total RNA תוך שימוש בעקומת כיוול שהורכבה מלפחות שבע מיהולים עשרוניים של פלסמיד בטווח הרלוונטי.

ז. כימות חלבון Western blot

כדי לכמת את רמת החלבון ZYMV-HC-Pro המצטברת נעשה שימוש ב-western-blot. עלים מצמחים מודבקים נשקלו ונכתשו ב-3.3 נפחים של בופר דנטורטיבי ESB (Kimalov *et al.* 2004). לחלופין, כאשר הדוגמא שימשה גם למבחן קשירה EMSA, הכתישה נעשתה ב-GSB (ראה סעיף ח'), טופלה כמתואר ל-EMSA, ולאחר פיצול הדוגמא עברה דנטורציה ע"י הוספת בופר הטענה ל-SDS-PAGE עפ"י (Laemmli 1970) והרתחה. דוגמאות (8 µg) עברו הפרדה באלקטרופורזה בג'ל דנטורטיבי 12% אקרילאמיד (Laemmli 1970), העוברו לממברנת ניטרולולוז (Protran, Schleicher & Schuell) במכשיר Biorad semidry ונחמו ב-3% חלב/TBS-Tween כמתואר ב-(Kimalov *et al.* 2004).

לזיהוי חלבונים בעלי HA-TAG הממברנה הוגבה עם נוגדן מונוקלונלי אנטי- HA (Roche) מחולדה במיהול 1:5,000 ב-TBS-Tween ב-4°C למשך לילה, לאחר שטיפות הוגבה הממברנה עם נוגדן alkaline phosphatase (AP)-IgG goat anti-rat conjugate (Sigma) במיהול 1:5,000 כנ"ל לשעה בטפרטורת חדר.

לזיהוי חלבון ZYMV-HC-Pro ללא TAG הממברנה הוגבה עם נוגדן פוליקלונלי מארנבת נגד ZYMV-HC בריכוז 1:4,000 כנ"ל (מתנתו הנדיבה של S.D. Yeh, טיוואן), ולאחר מכן עם AP-IgG goat anti-rabbit conjugate בריכוז 1:6,000 כמתואר לעיל.

לזיהוי חלבון TEV-HC-Pro הממברנה הוגבה עם נוגדן פוליקלונלי מארנבת בריכוז 1:1,000 כנ"ל ולאחר מכן עם AP-IgG goat anti-rabbit conjugate כמתואר לעיל.

לזיהוי חלבון GFP הממברנה הוגבה עם נוגדן מונוקלונלי מעכבר בריכוז 1:2,000 כנ"ל ולאחר מכן עם AP-IgG goat anti-mouse conjugate בריכוז 1:30,000 כמתואר לעיל.

הממברנות פותחו עם BCIP/NBT (Promega) לפי הוראות היצרן, נסרקו בסורק שולחני וכומתו בעזרת התוכנה ImageJ.

(EMSA) Electro-mobility shift assay .n

כדי לבחון את הקישור של החלבון HC-Pro לתצמידי small-RNA ערכנו מבחן EMSA עפ"י פרוטוקול שהותאם מ-(Merai *et al.* 2006).

1.ח תמציות צמחיות

תמציות צמחיות הוכנו ע"י כתישה עם עלי פלסטי בתוך מבחנה מיוצבת בקרח של עלי קישוא או *N. benthamiana* 1/4 w/v ב-gel shift buffer (GSB) טרי קר: pH 30 mM HEPES (7.3), 66 mM KCl, 100 mM NaCl, 10 mM DTT (ממקור טרי), 0.02% Tween 20, 0.8 mM MgCl₂, ו-4% גליצרול. הדוגמאות סורכזו פעמיים ל משך 10 דקות ב-15,000g ב-4°C, והנוזל הועבר לאחר כל סרכוז למבחנות חדשות. דוגמאות לשימוש עתידי הוקפאו במנות ב-80°C. כאשר התאפשר, ניסוי הקשירה נערך בדוגמאות טריות ולא קפואות.

ח.2. הכנת הגלאי: תצמידי RNA רדיואקטיביים

תצמידי RNA רדיואקטיביים הוכנו בפרוטוקול שהותאם מ- (Lakatos *et al.* 2006).
אוליגונוקלאוטיד RNA (100 pmol) המקודד ל- miRNA ההומני hsa-miR16 (5'-
3' UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG-3') סומן בקצה עם γ - ^{32}P -ATP (3000 Ci/mmol) (Perkin Elmer, Easytides, 10mCi/ml) בעזרת T4 PNK (NEB) (1 μM T4-PNK, 10X, 2 μM T4-PNK buffer (ריכוז כפול), 5 μM γ - ^{32}P -ATP, ומים עד לנפח סופי של 10 μL).
במקביל נערכה ראקציה לזירחון בלתי רדיואקטיבי של 200 pmol מהאוליגונוקלאוטיד RNA המשלים, בנפח של 20 μL ובכמויות כפולות, בה מוחלף ה-ATP הרדיואקטיבי ב-10 μL של 2 mM ATP שאינו רדיואקטיבי. הגדיל המשלים שאינו רדיואקטיבי הוגב עם הגדיל הרדיואקטיבי ביחס מולרי כפול. זהות הגדיל המשלים בניסויים שונים היה miR16* (5'-
3' CCAGUAUU AACUGUGCUGCUGAA-3'), או לחלופין, גדיל משלים במלואו ל- hsa-miR16 מלבד 2 בסיסים בולטים משתי קצוות ה-3' (5'-
3' CCAAUAUUUACGUGCUGCUAAA-3') בדומה ל-siRNA-duplex (ראה איור 7). בסיום ראקצית הזירחון (37°C, שעה), כדי לסלק את הנוקלאוטידים המיותרים, אוחדו שתי הראקציות במלואן, הוספו מים עד נפח סופי של 50 μL , והוטענו על קולונת Sepharose G25 (Pharmacia) מוכנה מראש וסורכזו מיד ב-735g למשך 2 דקות. כביקורת חד-גדילית נשמרה טרם האיחוד מנה של כ-0.1 μL מהאוליגונוקלאוטיד המסומן ונמהלה ב-10 μL GSB. להשקעת האוליגונוקלאוטידים המזורחנים הוספו 5 μL glycogen 5 mg/ml, 15 μL 3M NaOAc, ו-500 μL EtOH (השהייה ב-20°C למשך שעה, סירכוז במהירות מקסימלית 15 דקות וייבוש). כדי לאחות את הגדילים (strand-annealing) הורחף המשקע ב-10 μL של בופר שהותאם מ- (Elbashir *et al.* 2001) בריכוז כפול: 40 mM K-acetate, 12 mM HEPES (pH 7.3), 0.8 mM Mg-acetate. תהליך האיחוי נעשה כאשר המבחנה הוכנסה לכלי זכוכית עם כליטר מים רותחים שהונח להם להתקרר לאט במשך לילה ב-4°C. כדי לוודא שימוש רק בתצמיד של שתי הגדילים (duplex) ה-RNA הרדיואקטיבי נוקה מג'ל: כל ה-RNA בתוספת כ-1 μL צבע GSB עם מעט Bromophenol blue ו-Cyan cyanol) הוטען על ג'ל אקרילאמיד 15%,

0.5X TBE, ונעשתה אלקטרופורזה ב- 0.5X TBE קר ב-110 V למשך 120 דקות על קרח במתקן 3 miniProtean (Bio-Rad). הג'ל נעטף בשקית פוליא תילן שקופה ונחשף למסך פוספואימג'ר (Fuji) לכדקה. הצילום הודפס והוצמד לשקית כך שניתן לחתוך את הגלאי הדו-גדילי מהג'ל דרך הפלסטיק. הגלאי הדו-גדילי (המאוחה) מעוכב בג'ל באופן ברור ביחס לבקורת החד-גדילית. חתיכת הג'ל הרדיואקטיבית הוכנסה למבחנה ונמעכה קלות עם טיפ של 1 מ"ל בתוך $350 \mu\text{g}$ 0.3M NaCl. תצמיד ה-RNA המסומן מוצה מהג'ל ע"י הדגרתו במשך הלילה ב-4°C. להשקעת התצמיד המנוקה הנוזל הועבר למבחנה חדשה עם $5 \mu\text{g}$ glycogen 5 mg/ml ועם 1 מ"ל EtOH קר. לאחר השהייה של מספר שעות ב-20°C- המבחנה סורכה במהירות מקסימלית ל-15 דקות, המשקע נשטף ב-80% EtOH קר ויובש. המשקע הורחף ב- $234 \mu\text{g}$ של GSB שהביא אותו לריכוז של כ-100 mM המוכן לשימוש. ריכוז הגלאי הוערך עפ"י תצמיד בלתי רדיואקטיבי שנוקה במקביל (בתוספת EtBr) ונמדד בספקטרופוטומטר (Nanodrop). הגלאי נשמר במקפוא -20°C וניתן לשימוש ממושך עד דעיכת הקרינה.

3. ניסוי ה-EMSA

ניסוי ה-EMSA נערך בד"כ ע"י הוספת $1 \mu\text{g}$ של גלאי ל- $20 \mu\text{g}$ של תמצית צמחית (ריכוז סופי של גלאי מסומן 4.76 nM) והדגרת התערובת בטמפ' חדר כרבע שעה. בניסויי התחרות ההומולוגית הוסף גם $1 \mu\text{g}$ של גלאי בלתי מסומן (ריכוז סופי של גלאי מסומן 4.55 nM). לתערובת זו הוסף כ- $1 \mu\text{g}$ צבע (GSB עם מעט Bromophenol blue ו-Cyan cyanol) ו-10 μg מתערובת זו הוטענו על ג'ל פוליאקרילאמיד. הרכב הג'ל נמצא חשוב להצלחה: בופר 0.5x Tris-borate, 2.5% glycerol, 4% acrylamide:BIS 58:1, 1/2,000 TEMED, 1/133 APS 10%. הג'ל (במתקן Bio-Rad mini-PROTEAN3 בעובי 1 mm) פולמר למשך יותר מ-3 שעות (עד יממה מראש) ב-4°C, נשטף והורץ טרום-הטענה למספר דקות. אלקטרופורזה נערכה על קרח ב-75 V למשך 75 דקות ב-0.5x TBE קר. הג'ל קולף מהזכוכית ע"י הצמדתו לניר Whatman 3MM יבש גזור בדיוק לגודל הג'ל, הוכנס לשקית פוליא תילן, נאטם, ונחשף למסך פוספואימג'ר למשך כ-3 שעות. כימות התמונה המתקבלת נעשה בעזרת התוכנה ImageJ.

תוצאות

א. זיהוי החומצות האמיניות בתיבת FRNK של חלבון HC-Pro המעורבות

בהופעת תסמינים.

א.1. איפיון מהלך המחלה

הוירוס ZYMV מקבוצת ה-*Potyvirus* גורם לתסמינים אלימים בדלועיים. גנום ה-RNA של הוירוס מתורגם לרב-חלבון המעובד למספר חלבונים. אחד מחלבונים אלו הוא ה-HC-Pro, שבין תפקידיו הרבים ידוע כמעכב השתקה (RNA-silencing suppressor, RSS) (Kasschau and Carrington 1998), ובהיותו גורם המשרה פתוגניות (pathogenicity factor) בצמח גם בהעדר הוירוס (Kasschau *et al.* 2003). בחלבון ה-HC-Pro תיבה שמורה מאוד בקבוצת ה-*Potyvirus*, FRNK. כפי שדווח בפרסומים קודמים (Gal-On and Raccach 2000) מוטגנזה נקודתית בקלון cDNA אינפקטיבי של ZYMV בה מוחלפת חומצה אמינית ב-HC-Pro מטיפוס הבר מ-FR₁₈₀NK (Arg טעונה חיובית) ל-FI₁₈₀NK (בלתי טעונה), גורמת לפחיתת תסמינים משמעותית בדלועים שונים המודבקים בוירוס המוטנטי לעומת טיפוס הבר.

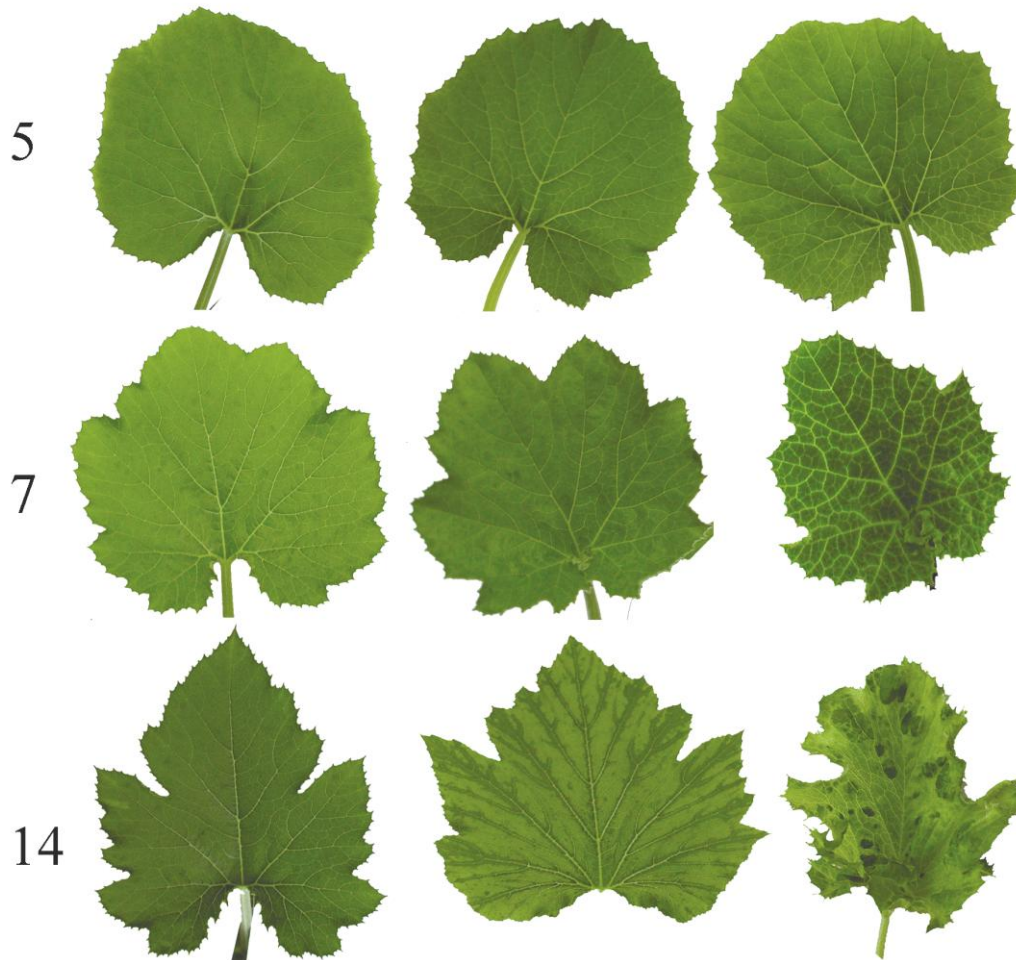
בצמחי קישוא, תסמיני ההדבקה גם עם הוירוס האלים ZYMV^{FRNK} וגם עם הוירוס המוחלש ZYMV^{FINK} ראשיתם בחמישה ימים לאחר ההדבקה (days post infection, dpi) בהבהרה קלה של העורקים של העלה האמיתי הראשון (איור 2A). הדבקה נעשתה על הפסיגים ע"י ירי פלסמיד כמתואר בפרק השיטות. בצמחים מודבקים ב-ZYMV^{FRNK} התסמינים התפתחו להבהרת עורקים ברורה בעלה האמיתי השני ב-7 dpi, ולעוותי עלים, נינוס והופעת "איים ירוקים כהים" אופייניים ב-14 dpi (איור 2A). בשלבים מאוחרים יותר (איור 2B) הצמחים היו מנונסים, העלים היו בהירים ובעלי עוותים התפתחותיים חריפים שהתאפיינו בצורה "חוטית" (filamentous) בהם מוחלפת רוב הרקמה שבין עורקי העלה באונות עמוקות. על הרקמה הנותרת נראים "איים ירוקים כהים" בולטים. התסמינים מופיעים תוך התפתחות העלה וכך נשארים העלים התחתונים גם בזמנים המאוחרים, פחות או יותר נורמליים, וכל עלה חדש

הוא בעל תסמינים חמורים מקודמו. לעומת זאת, צמחים המודבקים בוירוס המוחלש ZYMV^{FINK} נראו דומים מאוד לצמחים בלתי מודבקים (NI, "Non-Inoc") והציגו תסמינים מעטים הכוללים התבהרות קלה וקפלים קלים דמויי מניפה לאורך העורקים. ראוי לציין כי קישוא הוא הפונדקאי הרגיש ביותר ל-ZYMV ובשאר הדלועים כגון מלון, מלפפון ואבטיח בהדבקה ב-ZYMV^{FINK} לא ניתן לזהות תסמינים.

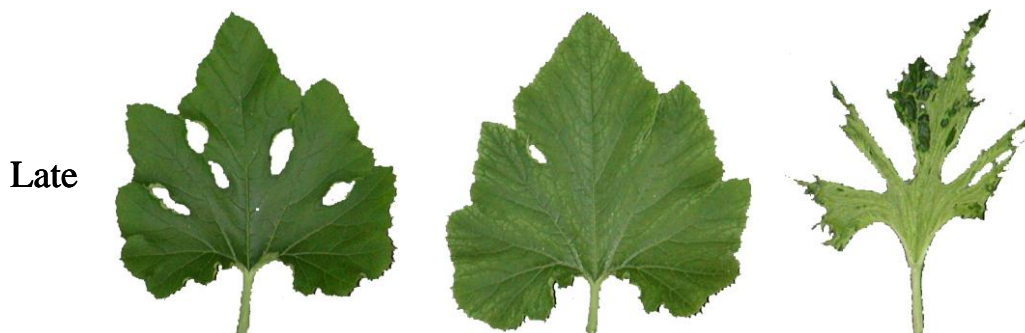
2. השפעת מוטציה באתר FRNK על כמות הוירוס בצמח.

כדי לבחון את ההבדלים בין הוירוס המוחלש ZYMV^{FINK} לוירוס האלים ZYMV^{FRNK} היה צורך לוודא כי ההבדלים אינם נובעים מאפקט כמותי גרידא (כגון פחיתה בכמות הוירוס או אי-יציבות חלבון HC-Pro המוטנטי) אלא מהבדל איכותי מהותי בפעילות שני החלבונים. רמות ה-RNA הויראלי מתוך כמות שווה של RNA כללי מהצמח נבדקה ב-RT-Q-PCR בין צמחים מודבקים בתבדידים השונים. נמצאה פחיתה קלה (18-35%) ברמת הוירוס בעקבות המוטציה בעלה האמיתי הראשון ב-5 dpi (איור 3A), וגם בניסוי שלישי ב-5 dpi (ניסוי C, לא מוצג) שנערך בנפרד, נמצאה פחיתה של 9%. הבדל זה נעלם לאחר נורמליזציה לגן האנדוגני Cyclophilin המעורב בבקרת חלוקת התא (איור 3B). רמתו של גן זה יציבה יחסית רק ב-5 ימים לאחר הדבקה ולא בזמנים האחרים, כאשר כל הגנים המקובלים שנבחנו הושפעו אף יותר מהדבקה בוירוס ולא שמרו על ביטוי יציב. נורמליזציה נידונה בהרחבה בפרק 4. השוואת כימות ZYMV עם ובלי נורמליזציה מוצגת להמחשת הבעיה. בעלה האמיתי השני, ב-7 dpi, ההבדל בין הצטברות ה-RNA של התבדידים גדל ויש פחיתה של 44-53% ברמת ה-RNA הגנומי של ZYMV^{FINK} ביחס ל-ZYMV^{FRNK} (הבדל אשר שוב נעלם לאחר נורמליזציה), וב-14 dpi ההבדל מתגבר עד כדי פי 11, וגם לאחר נורמליזציה נשמר הבדל של כ-7. מתוצאות אלו עולה כי רמת הוירוס בצמח המודבק בוירוס האלים נשמרת לאורך זמן ובצמח המודבק בוירוס המוחלש רמתו יורדת לאחר זמן מה. הוירוס מגיע לרמתו המכסימלית כבר ב-5 dpi, לפני הופעת תסמינים. כמו כן עולה כי ההבדל בין התבדידים בזמן זה, 5 dpi, הוא הקטן ביותר ועומד על כ-21%±8% (standard error of means, SEM) יותר ב-ZYMV^{FRNK} בממוצע (ללא נורמליזציה).

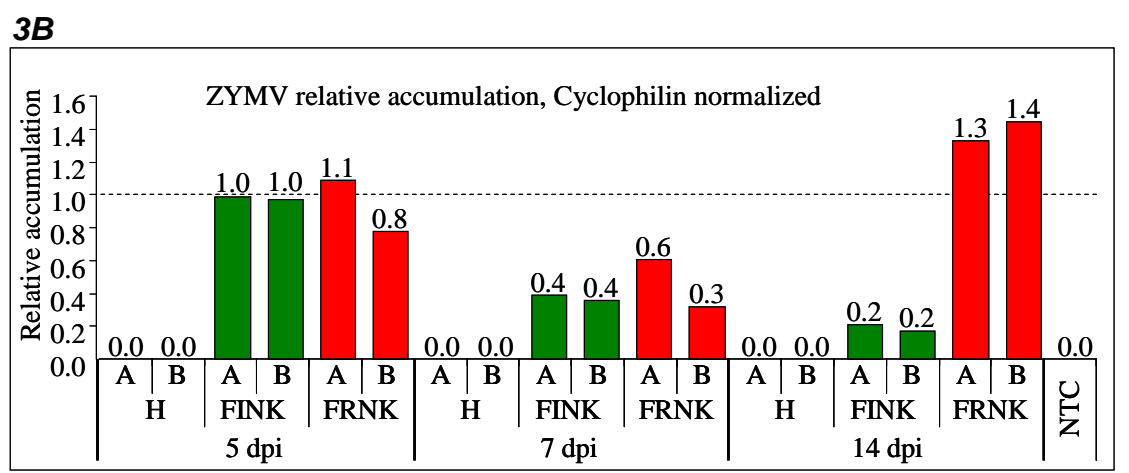
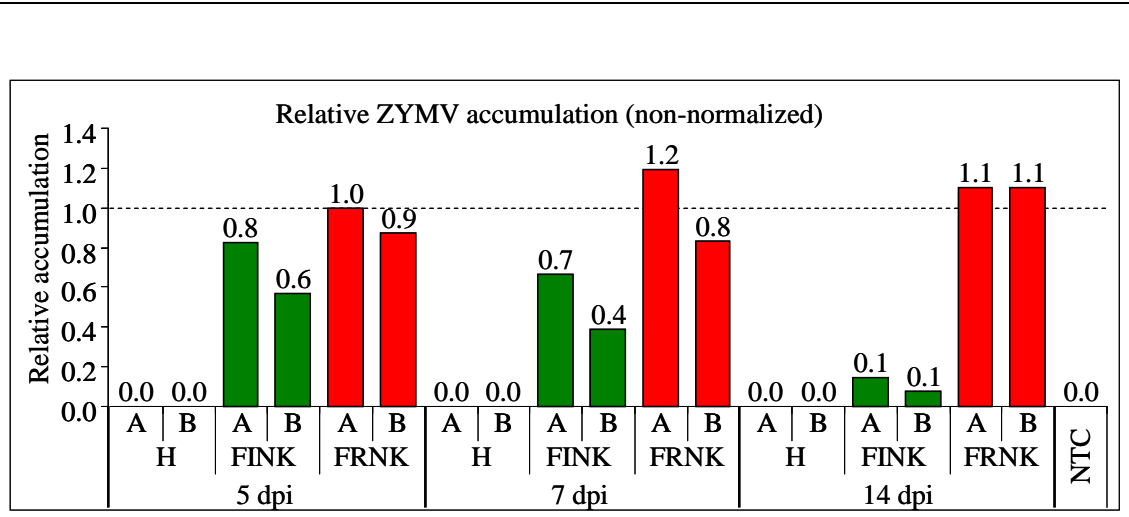
A Non-Inoc. ZYMV^{FINK} ZYMV^{FRNK}



B



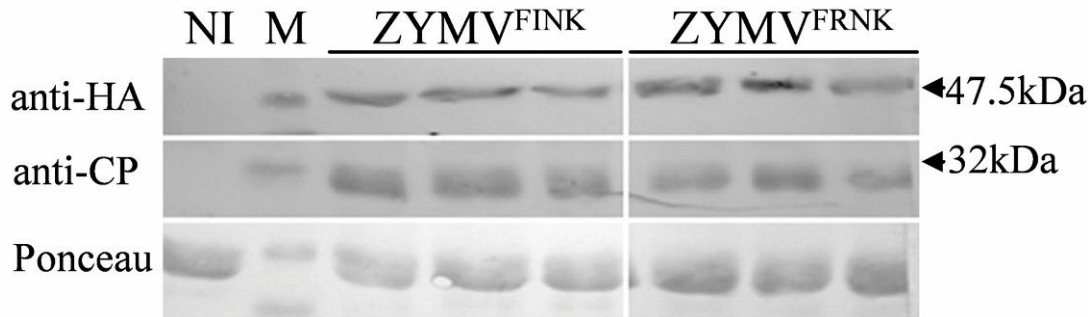
איור 2. מוטציה בתיבת FRNK של הגן HC-Pro מחלישה את תסמיני המחלה של הוירוס ZYMV. עלי קישוא מזן מעיין המציגים תסמינים סיסטמיים של ZYMV ב-5, 7, וב-14 ימים לאחר הדבקה בוירוס האלים ZYMV^{FRNK} או בוירוס המוחלש ZYMV^{FINK}. עלים מצמחים בלתי מודבקים (Non-Inoc) מוצגים כבקורת. ב-A עלים מהניסוי ממנו הופק RNA. ב-B עלים מניסוי אחר בזמן מאוחר יותר (late).



איור 3. רמת הצטברות היחסית של RNA גנומי של ZYMV בעלי קישור מודבקים ב-ZYMV^{FRNK} (אדום, FRNK) או ב-ZYMV^{FINK} (ירוק, FINK). ההצטברות היחסית של כל הדוגמאות היא ביחס ל-FRNK בלתי מנורמל בחזרה ביולוגית A. ניסוי ה-RT-Q-PCR המוצג נותח ב-2 דרכים שונות. באיור 3A, התוצאה לא מנורמלת לגן צמחי, ונותחה בשיטת $2^{-\Delta Ct}$ וב-3A, אותו ניסוי מנורמל ל-Cyclophilin בשיטת $2^{-\Delta\Delta Ct}$. הניסוי נערך בשתי חזרות ביולוגיות (A ו-B) בשלוש זמנים לאחר הדבקה (3 days post infection, dpi). H מסמל צמח לא מודבק, NTC (no-template control) מסמל בקורת ללא תבנית cDNA. כל חזרה ביולוגית מורכבת מאיחוד של 7-9 עלים מצמחים שונים.

נוסף על בדיקת רמות ה-RNA הגנומי, כדי לבדוק אם ישנם הבדלים ברמת החלבון HC-Pro, וכבקות גם רמות של חלבון המעטפת Coat protein (CP), נעשה ניסוי western blot (איור 4). נמצא כי ב-5 dpi רמות החלבון HC-Pro היו דומות. לעומת זאת, רמות נמוכות יותר של חלבון נצפו ב-7 וב-14 ימים לאחר הדבקה ב-ZYMV^{FINK} (לא מוצג). מכאן

שאינן לפסול את האפשרות כי בשלבים המאוחרים יש השפעה כמותית על התפתחות התסמינים. כיוון שכך, כדי להמנע מהשפעה כמותית של חלבון ה- HC-Pro וכדי להפריד בין גורמי התסמינים לבין תולדותיהם, העלה האמיתי הראשון ב- 5 dpi, שהוא כמעט חסר תסמינים נבחר לאנליזה מעמיקה לכל אורך העבודה.



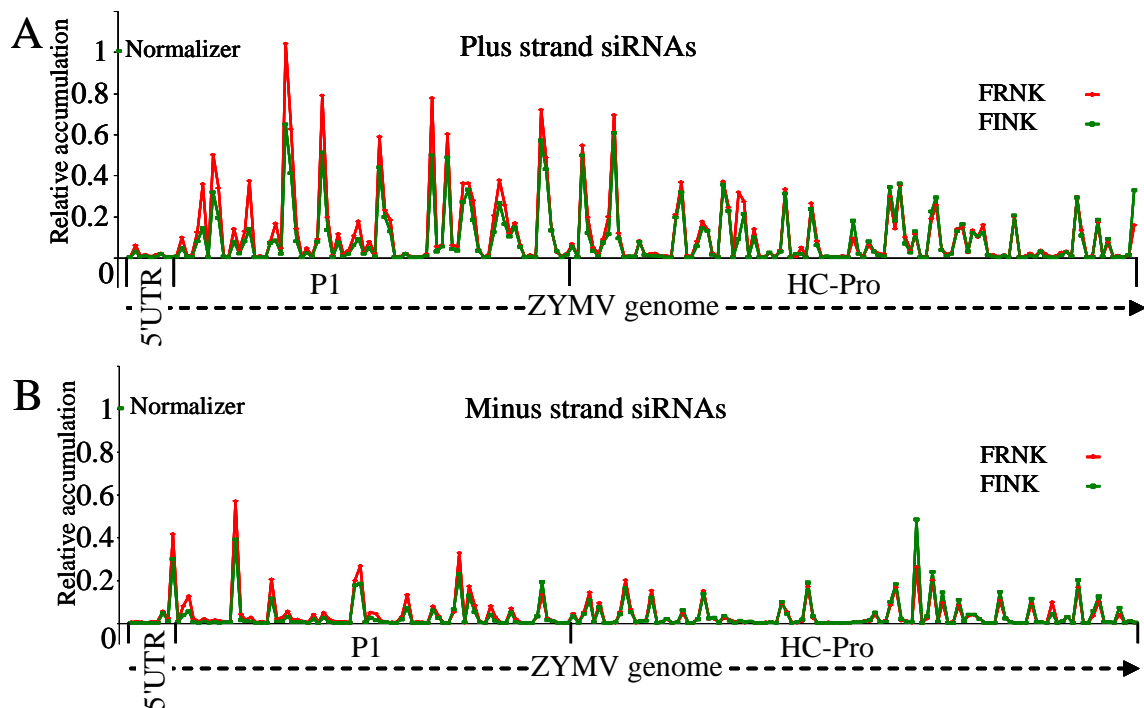
איור 4. רמות HC-Pro עם HA-tag ורמות חלבון המעטפת (CP) נבדקו, ב-western-blot בעזרת הנוגדנים מסומנים משמאל. כלל חלבוני הצמח הופקו מעלי קישוא (3 חזרות לטיפול) 5 ימים לאחר הדבקה. דוגמא מעלה קישוא בלתי- מודבק (Non-inoculated, NI) הוטענה כבקורת. החצים מסמנים את המשקל המולקולרי עפ"י הסמן (M) הקרוב. צביעת Ponceau התבצעה להדגים הטענה שווה.

ב. עיכוב מערכת ההשתקה של הצמח.

ב.1. מוטציה בתיבת FRNK אינה משפיעה על הצטברות siRNA ויראלי

מעכבי השתקה (RNA-silencing suppressors, RSS) הם חלבונים ויראליים שתפקידם למנוע את השמדת הוירוס בידי מערכת ההשתקה המבוססת RNA של הצמח. אלה יכולים לפעול בשלבים שונים של התהליך (ראה טבלה 1 בסעיף ה') כולל קשירה והפקעה של siRNA. בין יתר תפקידיו, HC-Pro הוא גם RSS, ונמצא כי גם הוא קושר siRNA (Merai *et al.* 2006). פעילות ה-RSS של HC-Pro מופתה באופן גס לאזור המרכזי של הגן בו נמצאת גם התיבת FRNK (Plisson, 2003). כדי לבחון אם מוטציות בתיבת FRNK של ZYMV פוגעות ביכולת החלבון לפעול כמעכב השתקה *in-vivo* תוכנן ניסוי הבוחן את רמת ההצטברות של siRNA שמקורם ברצפי הוירוס (vsiRNA). לצורך כך נעשה שימוש ב-

microarray (שבב-דנ"א, צ'יפ) עליו הודפסו גלאים אוליגונוקלאוטידיים המתאימים לגנום ה-ZYMV כמו גם לרצפי miRNA ו-miRNA* (ראה פרק ג.). צ'יפ זה עבר היברידיזציה עם cDNA שנוצר ממקטע RNA נמוך-משקל מולקולרי שהופק מצמחים נגועים בוירוס 5 ימים לאחר הדבקה, בשלוש חזרות ביולוגיות נפרדות. רמות ZYMV-vsiRNA נבחנו בעזרת סדרת גלאים באורך 25 נוקלאוטידים המרועפים (tiling) בחפיפה של 13 נוקלאוטידים, ומכסים את מלוא הגנום של ZYMV גם בגדיל המקודד (sense, plus strand) וגם בגדיל המשלים לו (antisense, minus-strand).



איור 5. הצטברות vsiRNA מצמחי קישוא מודבקים ב-ZYMV האלים והמוחלש. 5 ימים לאחר הדבקה, בעזרת microarray, נמדדה הרמה המצטברת היחסית של vsiRNA שמקורם בגדיל המקודד (plus strand, A) ושל הגדיל המשלים (minus strand, B) של גנום ה-ZYMV בצמחים שהודבקו ב-ZYMV^{FRNK} (אדום) או ב-ZYMV^{FINK} (ירוק). על-ה-microarray הודפסו גלאים אוליגונוקלאוטידים באורך 25 בסיסים המכסים את כל גנום ה-ZYMV בגדיל המקודד ובגדיל המשלים, בריעוף (tiling) גלאים של 13 בסיסים. מוצגים באיור 193 גלאים עוקבים מהגדיל המקודד והגלאים המשלימים להם מהגדיל המשלים המייצגים 2,437 בסיסים המקודדים ל-5'UTR, לחלבון P1 ולחלבון HC-Pro. לשם פשטות מוצגת חזרה מייצגת אחת של הניסוי משלוש שנעשו. הערכים ב-A וב-B מוצגים בקנה מידה זהה ומיוחסים לבקורת פנימית (normalizer) בעלת ערך שרירותי של 1, ביחס אליה נורמלו כל תוצאות ה-microarray.

כך, הודפסו 746 גלאים מזווגים לכל אחד מהג דילים (זיווג = reverse-complementary + 2nt 3' overhang). רמות ZYMV-vsiRNA נבחנו מ-RNA שהופק 5 ימים לאחר הדבקה (איור 5). נמצא כי יש הצטברות של siRNA מסויימים (hotspots) אך לא של אחרים. כדי להשוות בין רמתם המצטברת של ה-vsiRNA בין הטיפולים השונים נבחר באופן שרירותי הרף 10% מרמת האות (סיגנל) של בקורת חיובית פנימית של הניסוי (internal spike-in normalizer) (הערך 0.1 relative accumulation באיור). מהתוצאות עולה כי בצמחים בלתי מודבקים בוירוס אף גלאי לא נתן אות קרוב לערך הרף וכי הערך הממוצע היה נמוך פי כ-85 מהרף. בצמחים המודבקים בוירוס 5 ימים לאחר הדבקה, בבחינת הגדיל המקודד, 21% מהגלאים ל-ZYMV^{FRNK} ו-26% מהגלאים ל-ZYMV^{FINK} חצו את הרף, אך לעומת זאת, בבחינת הגדיל המשלים רק 5% ו-10% חצו את הרף בהתאמה. תצפית זו מדגימה שרמת ה-vsiRNA מהגדיל המקודד מצטברת לרמות גבוהות יותר מאלה מהגדיל המשלים. חשוב יותר, נמצא כי ה-siRNA שהצטברו לא היו מזווגים עם siRNA שהצטברו מהגדיל המשלים דבר המאפשר להסיק כי אין הצטברות של siRNA-duplex כלל אלא של גדיל אחד שמקורו ב-duplex זה.

בבחינת הרמה המצטברת של vsiRNA, לאורך כל הגנום, מהגדיל המקודד, עוצמת האות של הגלאים שחצו את הרף היתה דומה בין הוירוס האלים ZYMV^{FRNK} והוירוס המוחלש ZYMV^{FINK}; 25%-27% מהבקורת הפנימית בהתאמה. לעומת זאת, רמתם המצטברת של ה-vsiRNA שמקורם בגדיל המשלים היתה מעט גבוהה יותר ב-ZYMV^{FRNK} מאשר ב-ZYMV^{FINK}; 20%-13% בהתאמה. מנתונים אלו ניתן להסיק כי מוטציה ב-ZYMV הגורמת לאובדן תסמיני מחלה אינה משפיעה באופן מהותי על הצטברות vsiRNA בשלב מוקדם זה של ההדבקה (5 dpi).

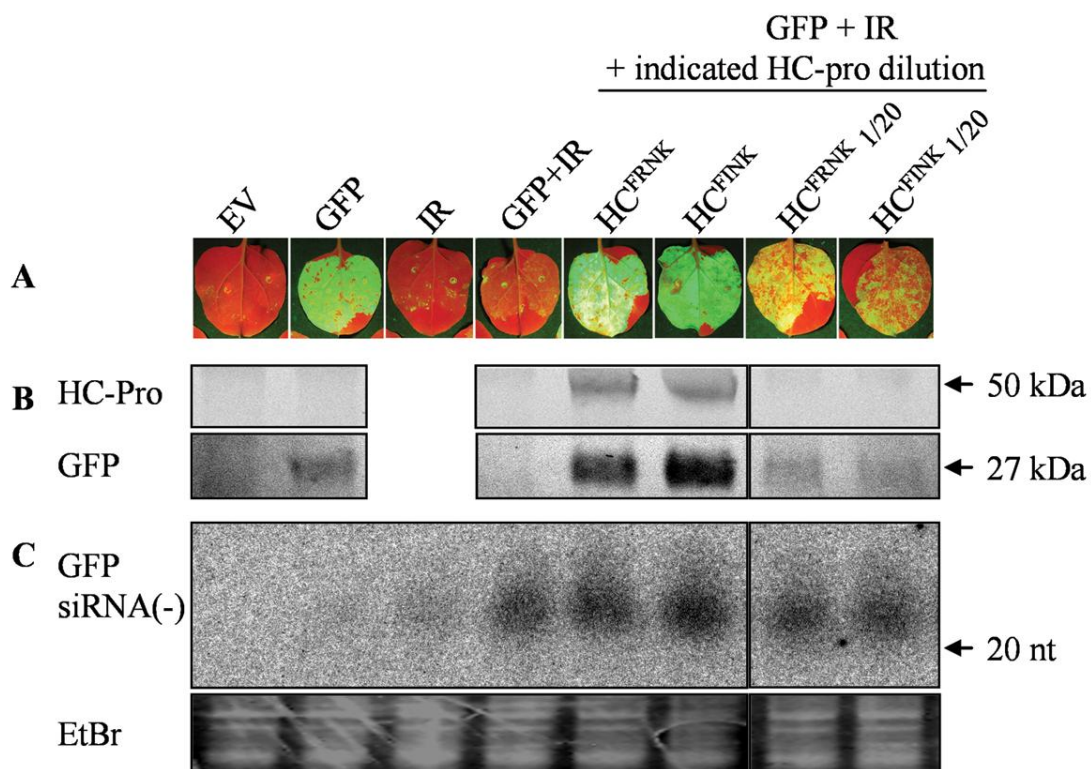
מעניין לציין כי חלוקת הגלאים שחצו את הרף אינה אחידה לאורך גנום הוירוס. בגדיל המקודד לא הגיבו גלאים לא ב-5' UTR ולא ב-3' UTR (לא מוצג). בגדיל המשלים לא הגיבו גלאים ב-3' UTR (לא מוצג). תוצאות אלו חזרו בכל שלוש החזרות הביולוגיות של הניסוי.

ב.2. המוטציה FINK אינה פוגעת בפעילות עיכוב ההשתקה של חלבון HC-

Pro של ZYMV.

פעילות HC-Pro כמעכב השתקה אופיינה במבחן ב- *N. benthamiana* בו מתבטא החלבון במנותק מהוירוס בעזרת פלסמיד בינארי המבוטא בחיידק *Agrobacterium tumefaciens* מותמר (Brigneti et al. 1998). חלבון HC-Pro מסומן ב-HA-tag בקצה ה-N' שלו ושמקורו ב- $ZYMV^{FRNK}$ (HC^{FRNK}) והחלבון המקביל HC^{FINK} שובטו לוקטור בינארי. פעילותם כמעכבי השתקה נבחנה ע"י הזרקתם לעלה יחד עם פלסמיד המבטא את חלבון ה-GFP ועם פלסמיד המבטא מבנה דמוי סיכת-ראש של GFP (IR, inverted repeat) הגורם להשתקת ביטוי של GFP (איור 6). באיור נראים עלי *N. benthamiana* מוארים ב-UV (A), ואנליזה של החלבונים (B), וה-siRNA (C) שהופקו מהם. ניתן לזהות רמה גבוהה של זהירות GFP תחת אור אולטרה-סגול מיומיים לאחר ההזרקה כאשר זה מוזרק לבדו וזהירותו דועכת מאליה לאחר מספר ימים נוספים (לא מוצג). בנוכחות IR לא ניתן לזהות GFP מלכתחילה כתוצאה מהשתקתו (איור 6A, GFP+IR). מעכב השתקה פעיל מונע השתקה זו של GFP ומונע דעיכת הזהירה לאורך זמן ממושך (עד נבילת העלה). מהתוצאות עולה כי בנוכחות חלבון HC-Pro יש דיכוי של מערכת ההשתקה ונראה כי יטוי של GFP. לא היה הבדל בין פעילותם של המוטנט המוחלש HC^{FINK} וטיפוס הבר HC^{FRNK} , וכמות חלבון ה-GFP שנמדדה היתה דומה (איור 6B). בניסוי נוסף, נבחן גם חלבון HC מסומן ב-HA-tag שמקורו במוטנט אחר, $ZYMV^{FRNA}$ (HC^{FRNA}) (ראה איור 9), וגם בניסוי זה לא נמצאה פחיתה בפעילותו ביחס ל- $ZYMV^{FRNK}$. כדי לתת תשובה יותר כמותית נעשה מיהול פי עשרים של הפלסמיד המבטא את HC^{FINK} ו- HC^{FRNK} (בפלסמיד שאינו מבטא דבר, EV) מבלי להפחית את כמות הרכיבים האחרים. מהתוצאה עולה כי כמות ה-GFP פחתה באופן דומה ביחס למעכב הלא מהול וכי לא נראה הבדל כלל בין HC^{FRNK} לבין HC^{FINK} . מאנליזה של רמות ה-siRNA מהגדיל המשלים ל-GFP ניתן לראות (איור 6C) כי רוב ה-siRNA הנוצר בעלה הוא שניוני כיוון שכמותו בנוכחות IR בלבד נמוכה מאוד (מסקנה זו נובעת מכך שהגלאי תוכנן לזהות רק את הגדיל המשלים ל-GFP [antisense] שלא מוזרק לצמח ולכן בהכרח נוצר

בעלה ע"י RDR מהגדיל המקודד המשועתק מהתבנית המוזרקת, השווה ב-6C את הנתבים GFP ו-IR לנתב (GFP+IR). כמו כן, בשלב זה של הניסוי, כמות ה-siRNA הנוצר מ-GFP לבדו נמוכה מאוד, (אף שישנה השתקה מסויימת כפי שניתן לראות מכמות חלבון ה-GFP הנמוכה יותר, 6B) ורק שילוב של GFP ו-IR מביא להשתקה יעילה והצטברות גבוהה של siRNA. נמצא כי בנוכחות HC-Pro יש מניעה של ההשתקה אך הצטברות ה-siRNA כלל אינה פוחתת, ואפשר שאף מתגברת מעט. נמצא כי אין כל הבדל בין HC^{FRNK} ו- HC^{FINK} גם בהצטברות siRNA.



איור 6. פעילות מניעת ההשתקה של HC-Pro אינה נפגעת עקב הפחתת מטען באתר FRNK. עלי *N. benthamiana* הוזרקו עם ריכוזים שווים של תרביות חיידקי אגרובקטריום המכילים שילובים שונים של פלסמידים בינאריים. אלה ביטאו אחד מהרשימה: GFP, מבנה דמוי סיכת-ראש של GFP (IR), את חלבון ה-ZYMV-HC-Pro מאוחה ל-HA-tag מהוירוס האלים (HC^{FRNK}) או מהוירוס המוחלש (HC^{FINK}) או פלסמיד ביקורת ריק (Empty vector, EV). תרביות המבטאות HC-Pro נמהלו גם פי עשרים (1/20) בתרבית המכילה EV, תוך שמירה על ריכוז GFP ו-IR קבוע. ב-A מוצגים תצלומים של עלים שלמים תחת תאורת UV, 4 ימים לאחר הזרקה (agroinfiltration), הזמן בו נאספו חלבון (B) ו-RNA (C). רמות חלבון GFP וחלבון HC-Pro זוהו בעזרת (B) western-blot בכמות תמצית צמחית שווה, והוגבו עם נוגדנים מונוקלונליים נגד HA-tag או נגד GFP. החצים מסמלים את הגודל הצפוי של GFP (27 kDa) ושל מונומר HC-Pro (50 kDa). הצטברות siRNA שמקורם ב-GFP נבחנו בעזרת (C) northern-blot עליו הוטענו $10 \mu\text{g}$ total-RNA לבאר. הממברנה הוגבה עם תעתיק GFP-sense-strand רדיואקטיבי. גודל הוערך בעזרת אוליגונוקלאוטיד DNA באורך 20 בסיסים (nt, מיקומו מסומן בחץ) צבוע באתידיום ברומיד (EtBr). הג'ל צבוע ב-EtBr באזור ה-tRNA מוצג כבקורת להטענה שווה.

מכאן ניתן להניח כי מוטציה בחלבון HC-Pro הגורמת ביורוס השלם לתסמינים מוחלשים , אינה מפחיתה את עוצמת עיכוב ההשתקה שלו, ולא משפיעה על כמות ה- siRNA במבחן בטבק, כפי שאיננה משפיעה על כמות ה- vsiRNA שנוצרת בצמח מודבק ביורוס (סעיף ב1, איור 5).

ב.3 פעילות עיכוב השתקה ב-Potyvirus אחרים

חלבוני HC-Pro של קבוצת ה- *Potyvirus* הם בעלי דמיון רב במעקובת חומצות האמינו . בחפיפה [Clustal-W alignment, (Thompson et al. 1994)] של החלבון השלם מ-44 בני הקבוצה השונים שרצפיהם מצויים ב- GenBank מתקבל ששני החברים הרחוקים ביותר זה מזה הם בעלי זהות ח' אמיניות של מעל 36%, שני הדומים ביותר 84%, והזהות הממוצעת בין כל החברים היא כ- 47%. אתר ה- FRNK הנמצא באזור המרכזי הוא אחד ממספר אתרים שונים השמורים מאוד באזור זה בכל הקבוצה (ראה איור 28). רק בארבע וירוסים מקבוצה זו (מתוך 44) ישנם שינויים בתיבת FRNK והשינויים משמרים תמיד את המטען החיובי (K/R) ואת הח' אמינית הארומטית (F/Y) ואת מיקומם. כדי לבחון האם התופעה בה מוטציה באתר ה- FRNK מפחיתה תסמינים אך לא משפיעה על עיכוב השתקה כפי שנמצא ב- ZYMV היא כללית, נעשתה חזרה על ניסוי עיכוב השתקה של GFP בטבק עם HC-Pro מהוירוסים *Turnip mosaic virus* (TuMV), *Potato virus Y* (PVY), ו- *Tobacco etch virus* (TEV). בניסוי זה, GFP נבדק 4 ימים לאחר הזרקה ונמצא כי הוא הושתק במידה רבה גם ללא IR (ראה איור 9A). HC-Pro^{FRNK} מטיפוס הבר היה כצפוי פעיל בכל שלושת הוירוסים הנ"ל (באיור 9 מוצגת התוצאה רק ל- TEV, ראה עבודת מסטר אלינה חרונסקי). לעומת זאת, ובניגוד לחלבון ZYMV-HC-Pro^{FINK}, לא היו החלבונים המוטנטים HC-Pro^{FINK} של TEV, PVY או TuMV פעילים כמעכבים כלל. כמו כן, קלונים אינפקטיביים של TEV ושל TuMV איבדו את יכולתם להדביק את הפונדקאים שלהם כאשר נעשתה בהם המוטציה ל- FINK (תוצאות לא מוצגות). מכאן ששלמות אתר FRNK הכרחית לתפקיד החלבון כמשתיק (RSS) ב-*Potyvirus* שונים, אך ב- ZYMV מספיק מטען חיובי יחיד (FINK או FRNA) באתר לפעילות זו.

ג. אפיון ביוכימי של האינטראקציה בין miRNA ו-siRNA לבין חלבון

HC-Pro.

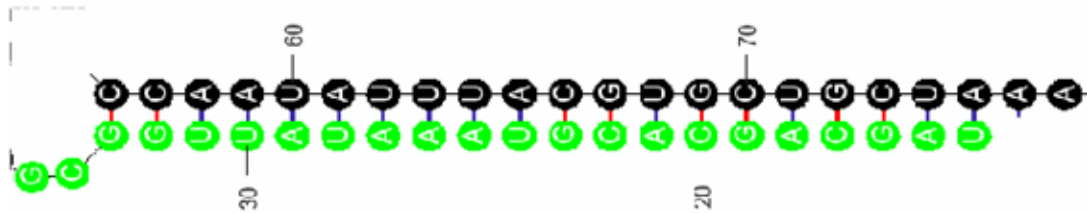
ג.1. חלבון ZYMV-HC-Pro קושר תצמידי smRNA דו-גדיליים

למעכבי השתקה מוירוסים שונים מנגנונים שונים לשיתוק מערכת ההגנה הצמחית . מנגנון המצוי במספר משפחות שונות הוא קישור של תצמידי smRNA דו-גדיליים (smRNA duplex) וכנראה הפקעתם (sequestration) של ה-siRNA הפעילים תוך מניעת פעילותם ב-RISC. מאחר שלאחרונה התגלה כי גם HC-Pro יכול לקשור תצמיד דו-גדילי של siRNA (siRNA duplex) (Lakatos et al. 2006; Merai et al. 2006) נבחנה האפשרות כי מוטציה הגורמת לפחיתה בתסמינים משפיעה על קישור זה בעזרת מבחן (Electromobility Shift Assay [EMSA]). נבחנו הקישור הפיזי בין HC-Pro לבין תצמידים מלאכותיים של smRNA דו-גדיליים מזורחנים משני סוגים (איור 7). הסוג הראשון , (איור 7A), miRNA/miRNA*-like duplex, מבוסס על זוג miR16 האנושי יחד עם miR16* האנושי ובו שתי הגדי לים משלימים זה לזה באופן בלתי- מושלם כך שבסיס בלתי מזווג אחד יוצר שבירה של המבנה ההליקלי (insertion-deletion [indel]), בסיס אחד מצוי בזיווג שגוי פשוט (simple mismatch), ושתי בסיסים נוספים מצויים בזוג G-U (איור 7A). סוג זה בא לדמות miRNA/miRNA* duplex טבעי כפי שהוא נחתך מ- miRNA precursor. בסוג השני, (איור 7B), siRNA-like duplex, miR16* הוחלף בגדיל הופכי- משלים מדויק ל-miR16. סוג זה בא לדמות siRNA כפי שהוא נחתך מ-dsRNA מושלם. בשני הסוגים ישנה תוספת זהה של 2 בסיסים חד-גדיליים בקצה 3' של כל גדיל (di-nucleotide 3'-overhang) כפי שהם קיימים בטבע.

A. miRNA duplex (hsa-miR16/miR16*)



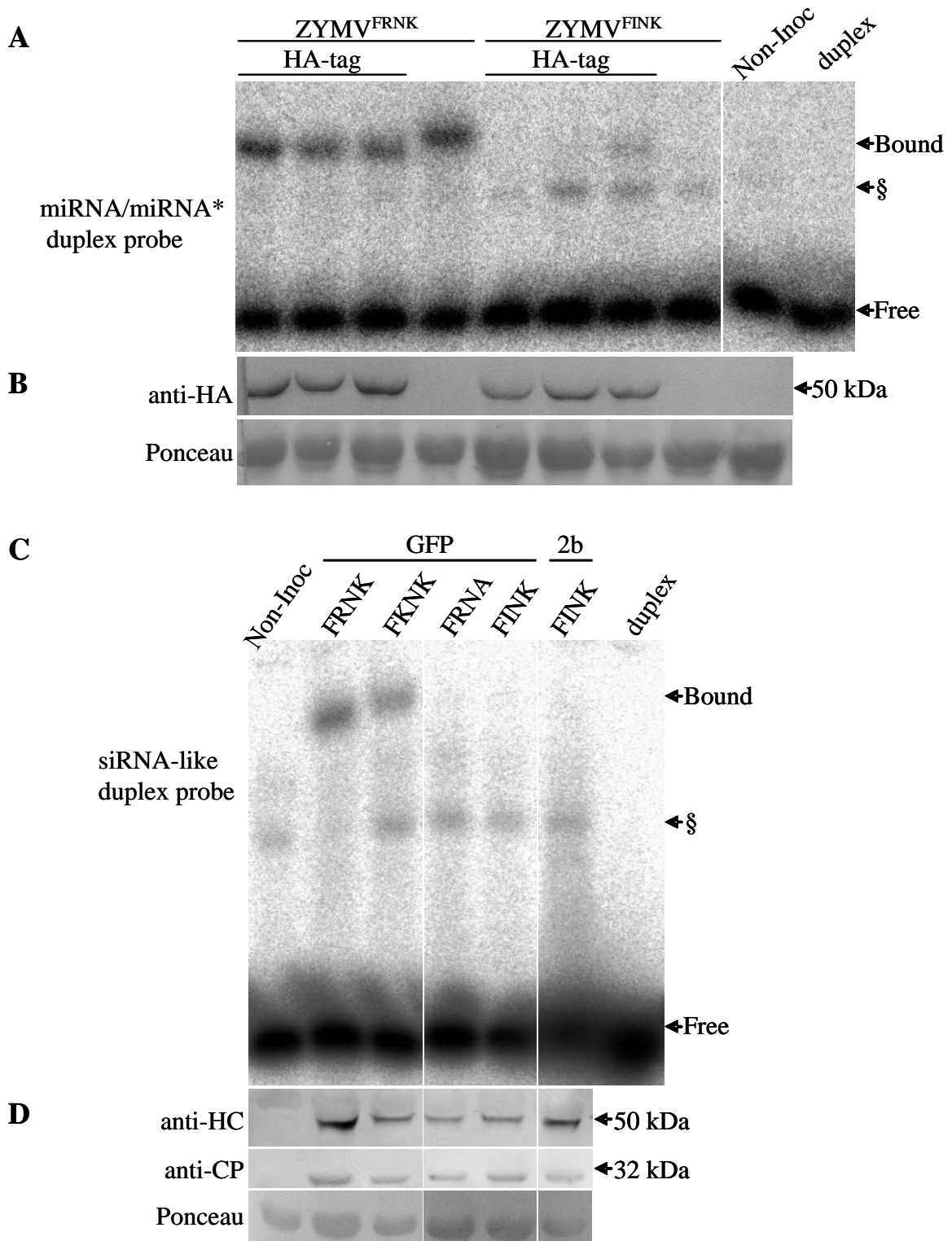
B. siRNA-like duplex (hsa-miR16/miR16RC)



איור 7. גלאי RNA דו-גדיליים למבחן קישור EMSA. (A) תצמיד (דופלקס) miRNA/miRNA* טיבעי המורכב מ-miR16 אנושי (ירוק) ומ-miR16* (שחור) כפי שהם מתקפלים ונחתכים יחד מתעתיק pre-miR16. כוכבית אדומה מסמלת את מיקומה של אי-התאמה פשוטה (simple mismatch), ו-X אדום מסמן את מיקומו של שבירת מבנה הליקלי (insertion-deletion [indel]). זוגות G-U מסומנות כהתאמה.

(B) דופלקס דמוי siRNA מלאכותי המורכב מ-miR16 האנושי (ירוק) ומגדיל משלים לו בדיוק מלבד 2 בסיסים בולטים מכל צד 3' כפי שהיו צפויים להחתך ע"י Dicer (שחור).

ראקציות קישור תצמידי ה-smRNA המסומנים ל-HC-Pro נעשו ע"י הדגרתם *in-vitro* עם תמציות מעלי קישוא מודבקים ביורוס, או לחלופין, עם תמציות עלי *N. benthamiana* אליהם הוזרק חיידק אגרובקטריום המכיל פלסמיד המבטא HC-Pro. בניסוי בקישואים, הודבקו הצמחים בתבדידי ZYMV שונים בהם הוכנסו מוטציות שונות ב-HC-Pro. (איור 8). בראקציית קישור ל-miRNA-like duplex נבחנה המוטציה ZYMV^{FINK} בהשוואה ל-ZYMV^{FRNK} (טיפוס הבר) (איור 8A). בכדי להקל על כימותו של חלבון HC-Pro בניסוי זה, סומן החלבון בקצה ה-N' שלו ב-HA-tag בשלוש מהחזרות לכל טיפול וכבוקרת נעשתה חזרה אחת ללא HA-tag.



איור 8. תיבת FRNK של ZYMV-HC-Pro מעורבת בקישור RNA-duplex. תמציות עלי קישור הוכנו ל-EMSA מצמחים מודבקים ב-ZYMV (A ו-B), או מצמחים מודבקים ב-ZYMV רקומביננטי המבטא גן זר (C ו-D) 5 ימים לאחר הדבקה. ב-A נעשה קישור לגלאי miRNA/miRNA* duplex (ראה איור 7A) וב-C נעשה קישור לגלאי siRNA-like duplex (ראה איור 7B). ב-A וב-B נלקחו 3 דוגמאות עלים מצמחים מודבקים באחד משתי התבדידים, האלים $ZYMV^{FRNK}$, או המוחלש $ZYMV^{FINK}$, הנושאים HC-Pro מאוחה ל-HA-tag, דוגמא אחת מצמח המודבק בתבדיד כנ"ל ללא tag, ודוגמאת בקורת בלתי מודבקת (Non-Inoc).

ב-C וב-D נראות דוגמאות מייצגות מעלי צמחים מודבקים ב-ZYMV רקומביננטי המבטאים GFP או את החלבון 2b (ה-RSS של הוירוס CMV-Fny), והמכילים את המוטציות באתר FRNK המצויינות בראש העמודה.

גלאי רדיואקטיבי קשור (bound) וגלאי חופשי (free) מסומנים בחצים. גלאי הוטען כבקורת ללא תמצית צמחית (duplex). § מסמן חלבון או קומפלקס צמחי אנדוגני משוער שלעיתים קשר את הגלאי גם בהעדר וגם בנוכחות HC-Pro.

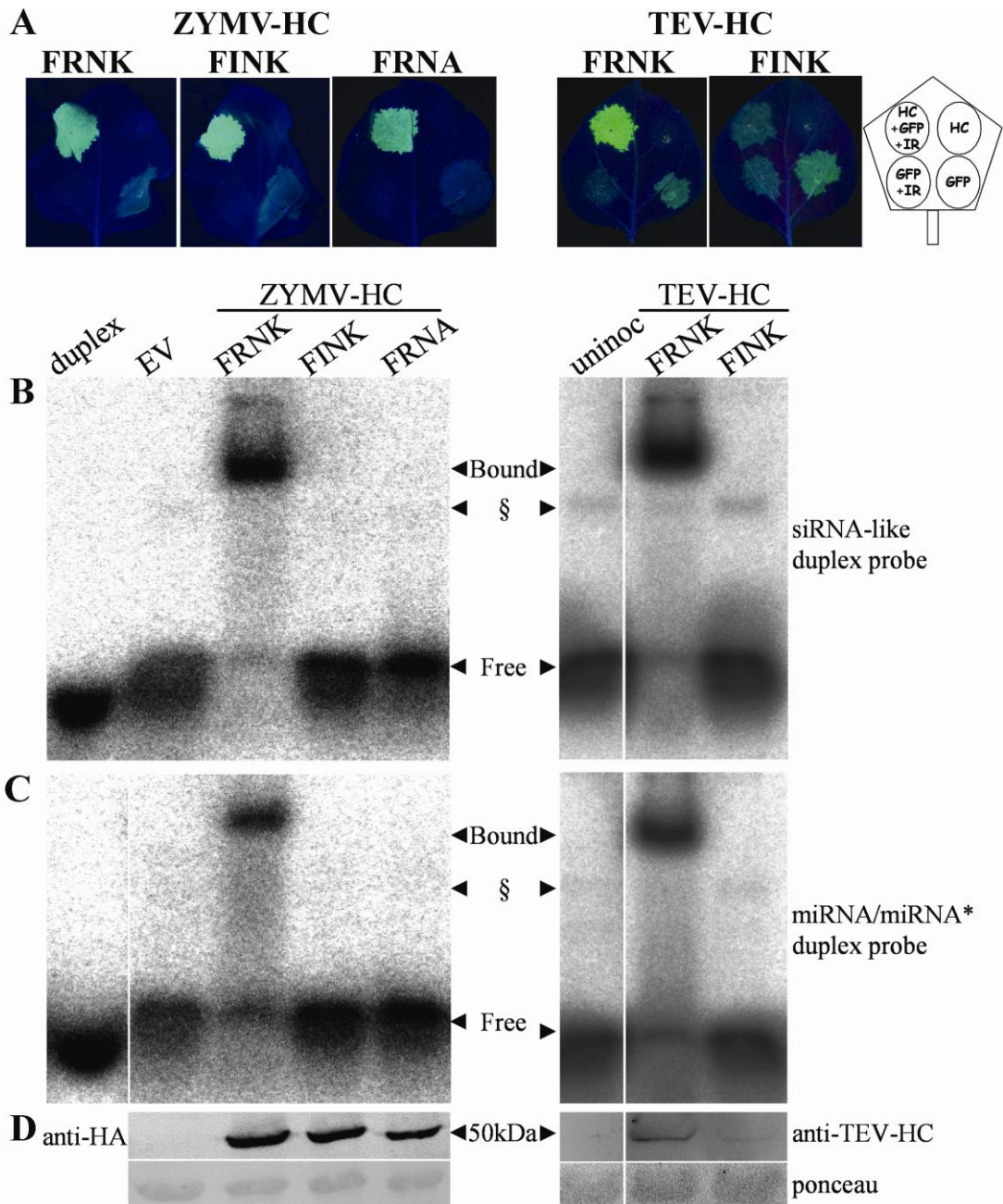
כמויות החלבון נמדדו לבקורת ב-western-blot לכל ניסוי ונראות ב-B וב-D, עם נוגדנים מונקלונליים נגד HA-tag או פוליקלונליים נגד ZYMV-HC-Pro ונגד ZYMV-CP בהתאמה. החצים מסמלים את הגודל הצפוי של CP (32 kDa) ושל מונומר HC-Pro (50 kDa). צביעת Ponceau נעשתה כביקורת להטענה שווה של חלבון.

נמצא כי miRNA-like duplex עוכב בג'ל בפרקציה שלא עוכבה בצמח בריא (ומכאן נקשר) בצמחים מודבקים ב- $ZYMV^{FRNK}$. לעומת זאת, תמציות מצמחים מודבקים ב- $ZYMV^{FINK}$ קשרו הרבה פחות duplex, לעיתים קרובות ברמות בלתי ניתנות לזיהוי (איורים 8A, 8C). גם בתמצית של $ZYMV^{FRNK}$ ללא ה-tag היה קישור בין HC-Pro ל-duplex, אך קומפלקס זה נדד לאט יותר בג'ל מסיבה לא ידועה. חלבון או קומפלקס צמחי אנדוגני קושר duplex הנודד מהר מהפרקציה המכילה HC-Pro נראה לעיתים קרובות בג'ל גם בדוגמאות של צמחים בלתי מודבקים וגם בדוגמאות מודבקות בוירוס (מסומן ב-§, ראה גם איורים 9, 10). כימות חלבון ה-HC-Pro בעזרת western-blot תוך שימוש בנוגדנים נגד HA-tag (איור 8B) הראה כי כמות חלבון ה-HC-Pro דומה בצמחים המודבקים ב- $ZYMV^{FRNK}$ וב- $ZYMV^{FINK}$. תוצאה זו מראה כי הקישור הפחות של $ZYMV^{FINK}$ ל-duplex אינו נובע מרמות מופחתות של חלבון HC-Pro.

פעילות קישור duplex ע"י חלבון HC-Pro נצפתה בתמציות עלים שמקורן גם בעלה קישור נגוע בוירוס כאמור, אך גם בצמחי *N. benthamiana* המבטאים את החלבון ביתר ללא נוכחות הוירוס (ראה איורים 9, 10) בעזרת אגרואינפילטרציה. ניסויים אלה איפשרו לבחון קישור ופעילות מניעת השתקה במקביל תוך ייצור כמויות חלבון גדולות לניסויים כמותיים.

ג.2. דרושים שתי מטענים חיוביים באתר FRNK לקישור יעיל של smRNA duplex

בתמציות עלה קישור מודבקים בוירוס האלים, ZYMV^{FRNK}, ובוירוס עם מוטציה המשמרת את המטען החיובי, ZYMV^{FKNK} (R₁₈₀K), נמצא קישור חזק של siRNA-like duplex (איור 8C). וירוס זה, ZYMV^{FKNK} היה בעל תסמינים אלימים כמו טיפוס הבר (אלינה חרונסקי עבודת מסטר). מוטציות בהם המטען הופחת כגון ZYMV^{FINK} ו-ZYMV^{FRNA} קשרו את ה-duplex במידה פחותה (אם בכלל) (איור 8C). הוירוס ZYMV^{FRNA}, בו המטען מופחת במיקום חדש (K₁₈₂A), היה בעל תסמינים מוחלשים כמו ZYMV^{FINK} ובעל רמות דומות של וירוס בצמח (חרונסקי א.). בניסוי המוצג ב-8C נעשה שימוש בוירוס המבטא את הגן הזר GFP אשר שימש כבקורת בלבד. כאשר בוטא הגן הזר 2b, שהוא מעכב השתקה חזק מהוירוס *Cucumber mosaic virus* (CMV), יחד עם HC-Pro^{FINK} (המוחלש) נתקבלו תסמינים אלימים [ראה] (Wang et al. 2004). הקישור של HC-Pro ל-duplex לא השתנה בנוכחות ה-RSS הנוסף 2b, למרות התסמינים האלימים והיה חלש ביותר אם בכלל. נוסף על הניסויים בצמחים מודבקים בוירוסים נעשו ניסויי קשירה בתמציות עלי *N. benthamiana*, שהופקו 3 ימים לאחר הזרקה בחיידקי אגרובקטריום המבטאים את החלבון HC-Pro במנותק מהוירוס (איור 9). ניסויים אלו נערכו גם ל-siRNA-like duplex (איור 9B) וגם ל-miRNA/miRNA*-like duplex (איור 9C).



איור 9. החלפת חומצות אמיניות טעונות חיובי בשתי אתרים שונים של ZYMV-HC-Pro מפחיתה קישור תצמיד RNA מבלי לפגוע בפעילותו כמעכב השתקה. (A) החלבונים ZYMV-HC^{FINK} ו-ZYMV-HC^{FRNA} המבוטאים ביתר בעלי *N. benthamiana* פעילים כמעכבי השתקה, בעוד החלבון TEV-HC^{FINK} אינו פעיל. לעלי הצמחים הוזרקו תרביות אגרובקטריום המכילים שילובים שונים של פלסמידים בינאריים המ בטאים ביתר את חלבוני HC-Pro (HC) המצויינים מעל תצלומי העלים יחד עם המוטציות המתאימות. החלבונים מ-ZYMV מאוחים ל-HA-tag. תצלומים של עלים מנותקים נלקחו תחת UV ב-4 dpi (TEV) או ב-7 dpi (ZYMV). הדיאגרמה מימין לפנל A מראה את דגם ההזרקה לעלה. IR מסמל פלסמיד המשתיק GFP. כל התרביות נמהלו אחת בשניה או בתרבית שאינה מבטאת דבר (EV) ל-OD₆₀₀ של 0.5. (B ו-C) מבחן קשירה. תמציות עלים מוזרקים ב-HC בלבד מעלה נפרד מאותם צמחים המצולמים ב-A, או מצמח מוזרק ב-EV בלבד או מצמח בלתי מוזרק (uninoc) נלקחו 3 ימים לאחר הזרקה ל-EMSA שנערכה עם 5 nM של גלאי דמוי siRNA (B) או עם גלאי miRNA/miRNA* (C). Bound מסמל גלאי קשור, Free גלאי חופשי ו-§ חלבון צמחי אנדוגני קושר דופלקס שנראה לעיתים ב-EMSA. (D) אותם תמציות נלקחו גם ל-western-blot עם הנוגדנים המצויינים.

תמציות עלה המכילות ZYMV- HC^{FRNK} ולשם השוואה גם TEV-HC^{FRNK} קשרו את שתי סוגי התצמידים כמעט עד התפלות כל הגלאי החופשי (רוויה של החלבון ביחס לתצמיד). קישור של siRNA-like duplex התקבל גם ב-ZYMV-HC^{FINK} ברמה נמוכה בהרבה (ראה גם איור 10B), אך כלל לא היה ניתן לזיהוי ב-TEV-HC^{FINK}. ההבדל שנצפה בין תמציות העלה המוזרקות ב-ZYMV-HC-Pro לא נבע מהבדל בכמות החלבון כפי שניתן לראות ב-western-blot (איור 9D). רמות חלבון ה-ZYMV-HC^{FINK} הוערכו כ-1.1 µg/lane לעומת ZYMV-HC^{FRNK} שהוערכו כ-1.7 µg/lane תוך שימוש בסידרת מיהולים של ZYMV-HC-Pro מנוקה. לעומת זאת, רמות החלבון המוטנטי TEV-HC^{FINK} היו נמוכות בערך פי עשר מאלו של טיפוס הבר TEV-HC^{FRNK}. כדי להראות שההבדל בקישור אינו נובע מהבדל בכמות גרידא נעשה מיהול פי מאה של TEV-HC^{FRNK} ונמצא שהוא עדיין קושר siRNA-like duplex (תוצאה לא מוצגת). בהתאמה לתוצאות הנ"ל, כאמור, הוירוס TEV^{FINK} גם אינו אינפקטיבי.

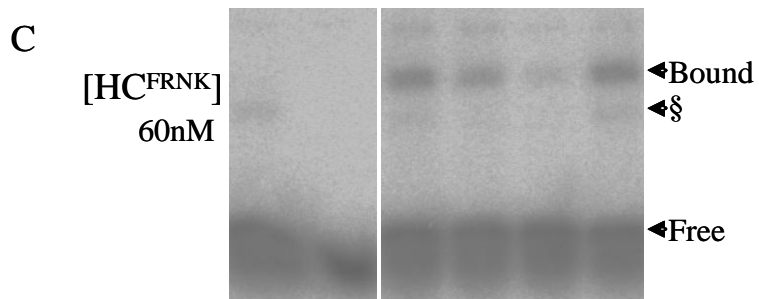
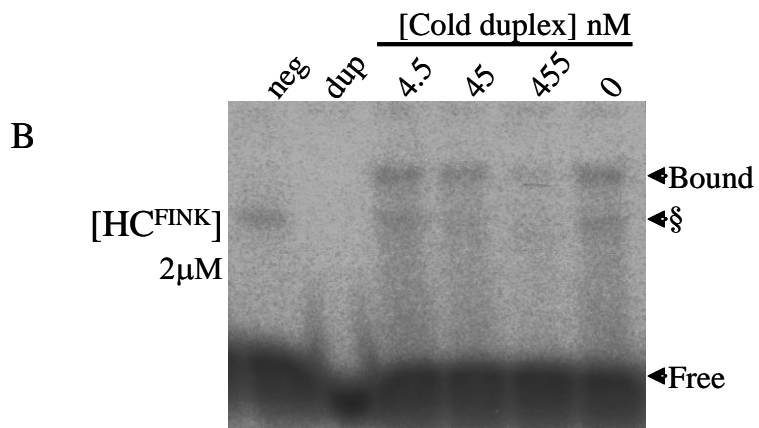
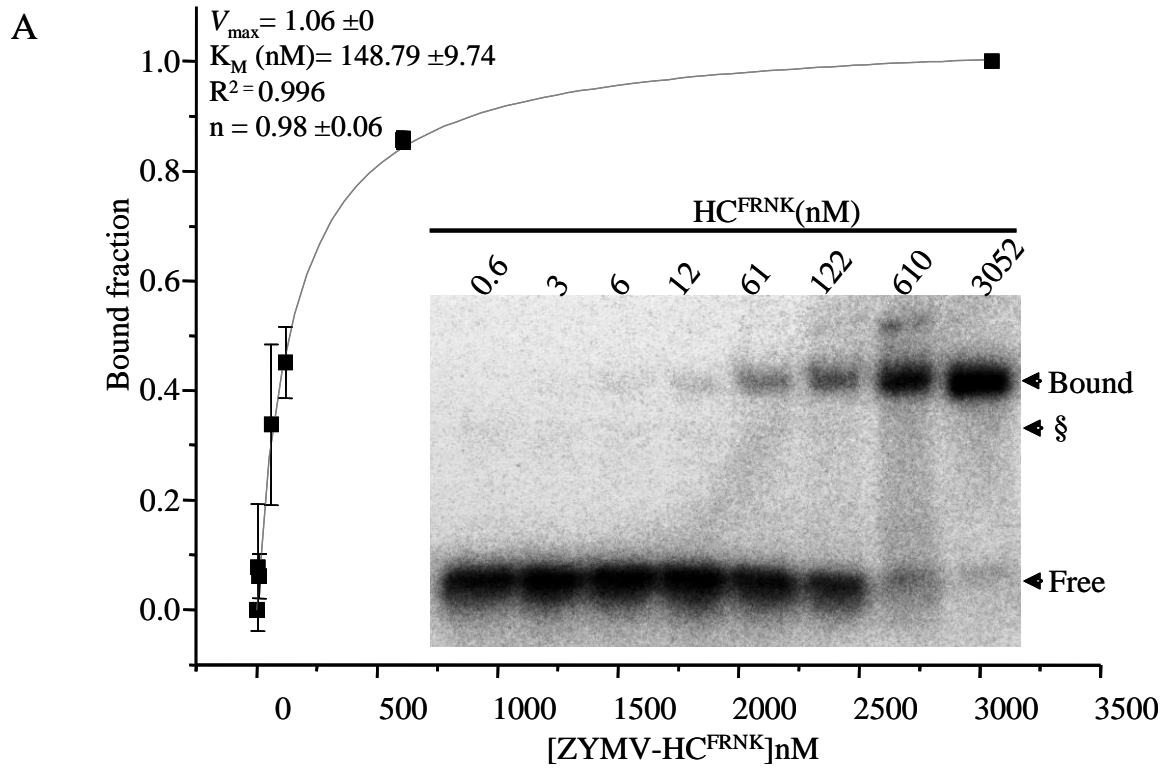
כפי שהמוטציה ZYMV-HC^{FRNK} שמרה על פעילותה כ-RSS חזק במבחן האגרואינפילטרציה ב-*N. benthamiana* אך קשרה רמות נמוכות מאוד של תצמיד, כך גם נמצא כי המוטציה HC^{FRNA}, בה המטען הופחת במיקום שונה באותה תיבה, היתה פעילה כ-RSS חזק וגם היא קשרה רמות נמוכות מאוד של duplex אם בכלל (איור 9B, C). מכאן, נמצאה התאמה בין עוצמת קישור לתסמינים הנגרמים מוירוס הנושא את המוטציה האמורה, וניתן לומר ששתי המטענים החיוביים בתיבת FRNK מסייעים לשימור עוצמת הקישור ונמצאים בקורלציה עם תסמינים חריפים וכי מטען מופחת גורם לקישור מופחת ונמצא בקורלציה עם תסמינים חלשים.

ג.3. קינטיקת קישור

רמת הביטוי של חלבון ZYMV-HC-Pro ב-*N. Benthamiana* בעזרת אגרו-אינפילטרציה היתה גבוהה בהרבה מזו שבצמחי קישוא מודבקים בוירוס, ולכן נבחרה מערכת זו למבחנים ביוכימיים. עוצמת הקישור של HC-Pro ל-siRNA-like duplex אופיינה ע"י קישור עודף

duplex עם כמות HC-Pro משתנה. לשם כך, נמהלה תמצית עלי *N. Benthamiana* מרכז
HC-Pro התחלתי של כ- 3×10^3 nM, באופן סדרתי ל- 0.6 nM HC-Pro, הודגרה עם 4.8
nM siRNA-like duplex והקישור נבחן בשיטה של EMSA (איור 10A).

איור 10. חלבון ZYMV-HC^{FRNK} קושר דופלקס siRNA באפיניות גבוהה בהרבה מחלבון
ZYMV-HC^{FINK}. (A) סידרת מיהולים של תמציות עלי *N. benthamiana* המבטאות את
החלבון HC^{FRNK} נבחנו ב-EMSA עם 4.76 nM גלאי siRNA-like duplex. בתמונה בתוך
הגרף מוצג ג'ל EMSA מייצג. הדוגמאות נמהלו בתמציות עלה שהוזרק עם פלסמיד שאינו
מבטא דבר (EV) לריכוזי HC-Pro המצויינים מעל הבראות. עקומת Hill (גרף קווי) חושבה
ממוצעייהם של 4 ניסויים. עוצמת האות כומתה מתמונה שהתקבלה ממכשיר
phosphorimager בעזרת התוכנה ImageJ. עקומת Hill והערכים הביוכימיים שהתקבלו
(שמאל למעלה) יוצרו בעזרת התוכנה Origin 7.5. מוט השגיאה מראה את סטיית התקן
לארבע חזרות. n מסמל את מקדם Hill (apparent Hill coefficient). (B,C) מבחני תחרות
הומולוגיים ב-EMSA. גלאי תצמיד siRNA-like duplex מזורחן ב- γ -³²P עורבב מראש
לריכוז של 4.54 nM עם ריכוזים שונים של תצמיד siRNA-like duplex מזורחן לא
רדיואקטיבי מתחרה (cold) והודגר עם תמצית עלי *N. benthamiana* המבטאות HC^{FRNK}
או HC^{FINK} מאוחים ל-HA-tag. מבחני התחרות נערכו עם תמצית HC^{FINK} בלתי מהולה (B)
(בריכוז 2μ M), או בתמצית מהולה פי 50 של HC^{FRNK} (C) (מיהול בתמצית צמח בלתי
מזרק, ריכוז של 60 nM). תמצית מצמחים בלתי מודבקים (neg) ותצמיד ds-smRNA ללא
דוגמא צמחית (dup) הורצו כבקורות. § מסמן חלבון או קומפלקס צמחי אנדוגני משוער
שלעיתים קרובות את הגלאי גם בהעדר וגם בנוכחות HC-Pro.



עקומת Hill שהתקבלה מממוצע של ארבע ניסויים הראתה כי הקישור של החלבון HC^{FRNK} היא לא-קואפרטיבית עם קבוע קישור K_m של בערך 150 nM (איור 10A) בתנאי הניסוי. לא היה ניתן לחשב קבוע זה ל- HC^{FINK} בגלל שקישור בריכוז ההתחלתי (בערך 2×10^3 nM) היה נמוך בהרבה מרוויה, וכי מי הול של פי חמש בלבד גרם לאובדן יכולת זיהוי הקישור. בניסיון לערוך מבחנים ביוכימיים נוספים עם חלבון HC-Pro מנוקה, בוטאו חלבונים עם N'-HA-tag ועם N'-His-tag. חלבונים אלו נוקו בקולונות יעודיות או הועשרו ע"י השקעה (immuno-precipitation) בנוגדנים ספציפיים, אך למר ות שהיו פעילים לפני הניקוי / ההעשרה, חלבונים אלו איבדו את יכולתם לקשור siRNA-like duplex במבחן ה-EMSA לאחריו (תוצאות לא מוצגות).

כדי להדגים את הספציפיות ולהדגיש את ההבדלים בין עוצמות הקישור של HC^{FRNK} ושל HC^{FINK} נערך ניסוי של תחרות-הומוולוגית. בניסוי זה, התחרה siRNA-like duplex מזורחן, לא רדיואקטיבי ("קר"), עם הקישור של אותו גלאי מסומן ("חם"). בניסוי מסוג זה על החלבון להיות רווי בליגנד (הדופלקס המסומן, הגלאי), וזה מוכנס בעודף גדול. בגלל הקישור החלש של HC^{FINK} , נשארה כמות גדולה של גלאי חופשי גם כאשר נעשה שימוש בתמצית חלבון בלתי מהול, שריכוז HC-Pro הוערך בה (בניסוי western-blot נפרד) בכ- $2 \mu M$ (איור 10B). כדי להבטיח רוויה גם של HC^{FRNK} עם duplex היה צורך למהול אותו. נעשה מיהול של פי 50 מהריכוז ההתחלתי (בתמצית מצמח בלתי מודבק), וריכוז זה הוערך בכ- 60 nM (איור 10C).

בהשוואה בין שני ניסויים אלה התקבלה תמונה דומה למדי, ובה התקבלה פחיתה מועטה באות הגלאי הקשור ביחס נפחים 10 קר ל-1 חם (45 nM קר) ואשר דעך עוד ביחס 100 קר ל-1 חם (455 nM קר), כאשר האות היה קרוב בשניהם לסף הזיהוי. מכאן, שכדי להגיע לקשירת כמות siRNA-duplex דומה בידי החלבונים HC^{FRNK} ו- HC^{FINK} היה צורך להשתמש בריכוז חלבון בערך פי 33 יותר גבוה ב- HC^{FINK} מאשר ב- HC^{FRNK} , תצפית המדגימה את חשיבותו של המטען בקישור smRNA-duplex.

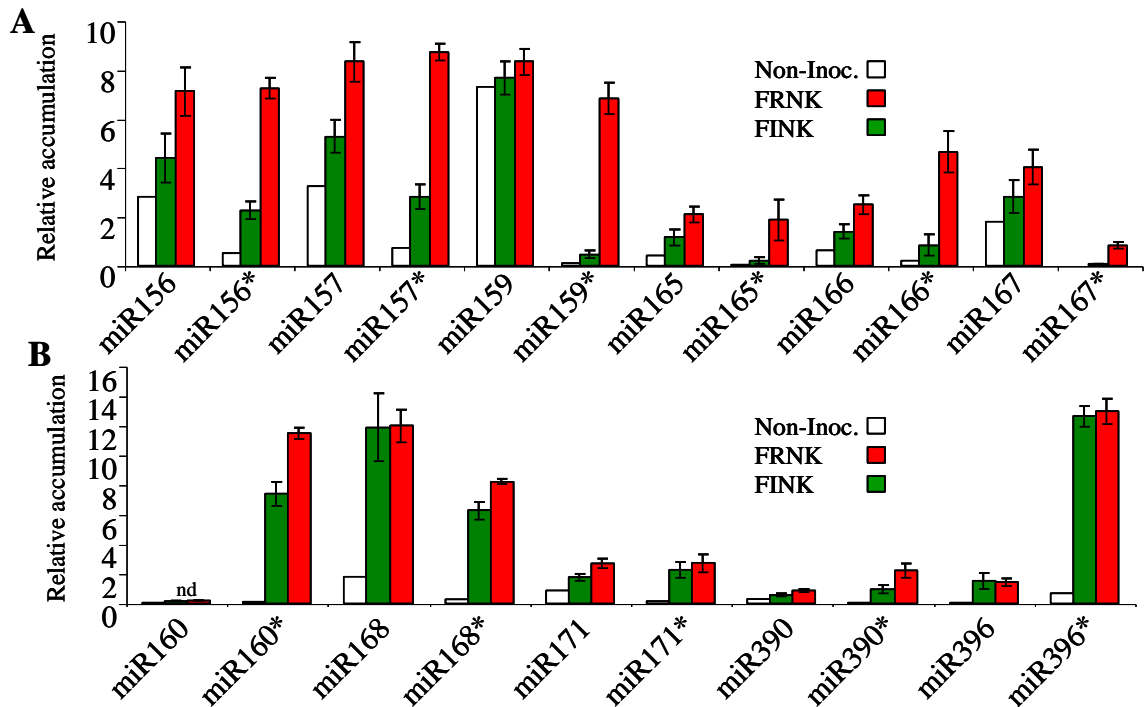
ד. זיהוי ה-*microRNA* וגני-המטרה שלהם בקישוא אשר קשורים להופעת

התסמינים.

ד.1. הצטברות תצמידי *miRNA/miRNA**

כיוון שוירוסים יכולים לגרום לתסמינים הדומים לצמחים בעלי מוטציות בגנים שונים הקשורים למערכת הבקרה העצמית שלאחר שעתוק (PTGS) (Lobbes *et al.* 2006), וזו מבוססת על *miRNA* ו-*ta-siRNA* (Brodersen and Voinnet 2006), נעשו ניסויים הבודקים את רמתם בעת הדבקה ויראלית. זה מכבר נתגלה כי מעכבי-השתקה מוירוסים שונים של צמחים, ובהם HC-Pro, אכן עשויים לגרום לשינויים ברמות *miRNA* (Mallory *et al.* 2002;) (Kasschau *et al.* 2003). לכן, היה חשוב לבדוק את רמתם בעת הדבקה ב- ZYMV. כדי להסיק אם ה-*miRNA* מעורבים ביצירת התסמינים הויראליים, נעשה שימוש בכלי המאפשר להבדיל בין תגובה כללית המושרית בצמח בתגובה לפתוגן, לבין מנגנון המוביל לתסמינים, והוא ההשוואה בין צמחים המודבקים בוירוס האלים ZYMV^{FRNK} והוירוס שכמעט אינו משרה תסמינים ZYMV^{FINK}.

אף שלא קיים כמעט מידע גנומי מקישוא, ישנם מספר רב של *miRNA* שמורים אף בין צמחים מרוחקים אבולוציונית (Zhang *et al.* 2006a). כדי לבחון מי מהם אכן קיים בעלי קישוא, ולברר אם הרמות המצטברות של *miRNA* ו-*miRNA** מושפעות ממוטציה מפחיתת מטען בתיבת FRNK, נבחנו רמתם של כל ה-*miRNA* הצמחיים שהיו ידועים בזמן הניסוי ושל רצפי ה-*miRNA** החזויים שלהם בעזרת ה-*microarrays* שתוארו בסעיף ב1 ובפרק השיטות (סעיף ד3). ה-*microarrays* הוגבו עם תוצרי פרקציית ה-*smRNA* מצמחי קישוא 5 ימים לאחר הדבקתם ב- ZYMV^{FRNK} או ב- ZYMV^{FINK} בשלוש חזרות ביולוגיות. כבקורת נלקחו דגימות מצמחים בלתי מודבקים (איור 11).



איור 11. רמות הצטברות של miRNA ו-miRNA* נבחרים בצמחי קישוא 5 ימים לאחר הדבקה ב-ZYMV. רמתם נמדדה בעזרת microarray (הזהה לזה שבאיור 5) עליו הודפסו גלאים אוליגונוקלאוטידיים מתאימים. צמחי קישוא בלתי מודבקים (non-inoc), עמודות לבנות) הושאו לצמחים מודבקים ב-ZYMV^{FRNK} (אדום, FRNK) או ב-ZYMV^{FINK} (FINK, ירוק) בשלוש חזרות ביולוגיות בלתי תלויות. ההצטברות היחסית (relative accumulation) היא ביחס לתעתיק בקורת פנימית שערכה "1", אליה נורמלו התוצאות. פרקצית ה-smRNA שסומנה והוגבה עם ה-microarray היתה מצירוף של 7 עד 9 צמחים לכל טיפול. מוט השגיאה מסמל את טווח שגיאת תקן הממוצעים (SEM) משלושת החזרות. nd (not detected) מסמל רצף שלא זוהה. האיור מחולק שרירותית לשתי חלקים, העליון, A, ובו הצטברות miRNA* גבוהה ב-FRNK מזו שב-FINK בפי 3 או יותר, והתחתון, B, בו יחס ה-miRNA* הנ"ל גבוה בפחות מפי 3.

מניתוח תוצאות ההיברידיזציה עולה כי miRNA רבים שהיו חז ויים להיות שמורים אבולוציונית אכן התבטאו ברמות גבוהות בעלי קישוא (איור 11). רמתם של miRNA רבים

הגיעו לערכים גבוהים בהרבה מערכי ה- siRNA ממקור יראלי (vsiRNA) (השווה איור 5 לאיור 11, סולם הסקאלה זהה). לדוגמא, הערך הגבוה ביותר שהתקבל ל- vsiRNA כלשהו היה בערך שווה ל-1 ו-miR159 שהתבטא ברמה גבוהה הגיע לערך של כ-7. יתר על כן, בקורות פנימיות של ה- microarray הראו כי השיטה רגישה מאוד לאי-זיווג בודד (single-base mismatch) וכי זה גורם לפחיתה של יותר מפי 21 באות המתקבל (תוצאה לא מוצגת). תכונה זו איפשרה להעריך מתוך הרצפים שהיו זמינים ב- microarray והגיבו, איזה מה-miRNA ומה-miRNA* החזויים דומים ביותר לאלה הקיימים בפועל בקישוא.

טבלה 4. רצפי miRNA ו-miRNA* נבחרים שרמתם נותחה בעבודה

| אבטיפוס | תצמיד | שם רצף [@] | רצף המטרה | אורך, בסיסים |
|---------|--------------|---------------------|------------------------|--------------|
| miR156 | miR156/156* | zma-miR156j | UGACAGAAGAGAGAGAGCACA | 21 |
| miR156* | | S-ptc-MIR156j | UGUGCUCUCUAUGCUUCUGUCA | 22 |
| miR157 | miR157/157* | ath-miR157d | UGACAGAAGAUAGAGAGCAC | 20 |
| miR157* | | S-ath-MIR157d | AUGUGCUCUCUAUGCUUCUGUC | 22 |
| miR159 | miR159/159* | ath-miR159b | UUUGGAUUGAAGGGAGCUCUU | 21 |
| miR159* | | S-ptc-MIR159c | UGGAGCUCCUUGAAGUCCAAUA | 22 |
| miR165 | miR165/165* | ath-miR165a | UCGGACCAGGCUUCAUCCCC | 21 |
| miR165* | | S-ath-MIR165a | GGGGAAUGUUGUCUGGAUCGAG | 22 |
| miR166 | miR166/166*Y | sbi-miR166a | UCGGACCAGGCUUCAUCCC | 20 |
| miR166* | | Csat-miR*166Y | GGAAUGUUGGUCUGGUCGAGG | 21 |
| miR166 | miR166/166*X | sbi-miR166a | UCGGACCAGGCUUCAUCCC | 20 |
| miR166* | | Csat-miR*166X | GGAAUGUUGUCUGGUCGAGG | 21 |
| miR167 | miR167/167* | ptc-miR167f | UGAAGCUGCCAGCAUGAUCUU | 21 |
| miR167* | | S-ath-MIR167d | UACUAGGUCAUCCUGCAGCUUC | 22 |
| miR168 | miR168/168* | ath-miR168a | UCGCUUGGUGCAGGUCGGGAA | 21 |
| miR168* | | cmelo-mir168* | CCCGCCUUGCAUCAACUGAAU | 21 |
| miR171 | miR171/171* | osa-miR171b | UGAUUGAGCCGUGCCAAUAUC | 21 |
| miR171* | | S-osa-MIR171d | GAUGUUGGCCCGGUCACUCAG | 22 |
| miR390 | miR390/390* | ath-miR390a | AAGCUCAGGAGGGAUAGCGCC | 21 |
| miR390* | | S-ath-MIR390a | UGGCGCUAUCCAUCUGAGUUU | 22 |
| miR396 | miR396/396* | ath-miR396a | UUCCACAGCUUUUCUUGAACUG | 21 |
| miR396* | | S-osa-MIR396c | AGAGGGUCAAGAAAGCUGUGGG | 22 |

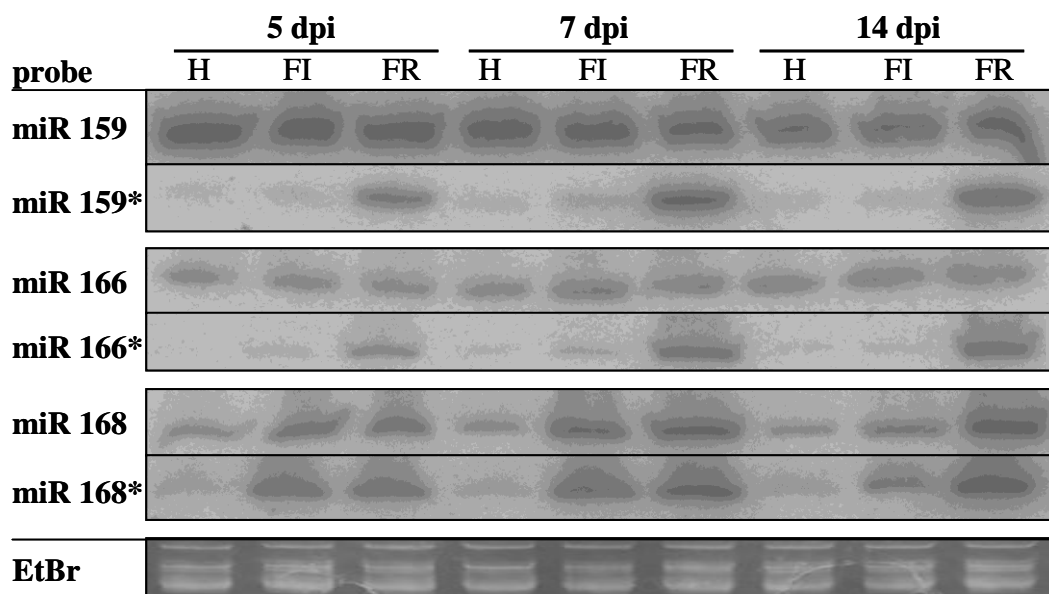
מקרא: @zma=Zea maize, ptc=Populus trichocarpa, ath=Arabidopsis thaliana, osa=Oryza, cmelo=Cucumis melo, csat=Cucumis sativus, sbi=Sorghum bicolor, sativa. מסמל רצף סוכבית חזוי.

הרצפים אשר הגלאי להם נתן את האות בעל העוצמה הגבוהה ביותר בדוגמאות ZYMV^{FRNK} מבין רצפי האבטיפוס מוצגים בטבלה 4, ללא התייחסות לאורגניזם המקור, מלבד miR166* (באפור), כאן מוצגים שני רצפים בעלי הבדל אחד (קו תחתון). תוצאות הניסויים המוצגות באיורים 10 ו-11 הם ל-miR166*Y. באיור 13 מוצגים הקיפולים ויחסי

ההצטברות של שניהם . מקור הרצפים ושמותיהם ב-<http://microrna.sanger.ac.uk/> .. באופן כללי, רמות miRNA* ו-miRNA* שזוהו היו גבוהות בצמחים מודבקים , ובמיוחד באלה המודבקים בוירוס האלים ZYMV^{FRNK}, מאלה שבצמחים בלתי- מודבקים. נמצאו הבדלים גדולים ברמות ה-miRNA* שהיו בולטים במיוחד ביחס להבדלים הקטנים יותר שנראה בד "כ ברמות ה-miRNA* עצמם (איור 11). רמות miRNA* שהצטברו היו בדרך כלל נמוכות מאוד בצמחים לא מודבקים , כצפוי מאי- יציבותם בתא . כיוון שרמתם של miRNA* בצמחים מודבקים היתה תמיד גבוהה מזו שבצמחים לא מודבקים אפשר להסיק כי ההדבקה מונעת את פירוקם.

נמצאו הבדלים ניכרים בין רמתם המצטברת של miRNA* בצמחים מודבקים ב-ZYMV^{FRNK} לאלה המודבקים ב-ZYMV^{FINK} בקבוצה המוצגת באיור 11A. בקבוצה זו, רמות miRNA* היו גבוהות בצמחים מודבקים ב-ZYMV^{FRNK} מאלה המודבקים ב-ZYMV^{FINK}. לדוגמא, ההבדל הממוצע (*n*-fold) ברמות המצטברות של miR159* בין טיפולים אלה היה פי 19.7 (standard error of means [SEM], ±7.6), ול-miR166* פי 10.1 (SEM, ±4.8) (איור 11A). בקבוצה שניה של miRNA* המוצגת באיור 11B, ההבדלים היו קלים יותר. לדוגמא, ההבדל הממוצע בין הצטברות miR168* בצמחים מודבקים ב-ZYMV^{FRNK} לבין אלה המודקים ב-ZYMV^{FINK} היה פי 1.3 (SEM, ±0.2) בלבד (איור 11B).

כדי לאשש את התוצאות ולעקוב אחר קינטיקת ההצטברות כתלות במשך הזמן שלאחר הדבקה נבדקו רמתם המצטברת של מספר זוגות miRNA/miRNA* ב-5, 7 ו-14 יום לאחר ההדבקה ע"י שימוש בטכניקת northern-blot (איור 12). רצפים אלה נכללים בשתי קבוצות ה-miRNA/miRNA*- המתוארות לעיל, זו שהמוטציה FINK מפחיתה מאוד את הצטברות ה-miRNA* ביחס לטיפוס הבר (איור 11A) וזו שהמוטציה מאפשרת את הצטברות ה-miRNA* בדומה לטיפוס הבר (איור 11B), כאשר miR159/miR159* ו-miR166/miR166* נכללים בקבוצה הראשונה ו-miR168/168* בקבוצה השנייה.



איור 12. השפעת הפחתת המטען בתיבת FRNK על הצטברות לאורך זמן של miRNA ו- miRNA* 159, 166 ו-168 בעלי קישוא מודבקים ב- ZYMV. Northern-blot של RNA מצמחים בלתי מודבקים (H), צמחים מודבקים ב- ZYMV^{FRNK} (FR) וב- ZYMV^{FINK} (FI) הוגבו עם גלאים משלימים ל- smRNA המצויינים משמאל לאוטורדיוג רמות. 10 או 20 µg של total-RNA שהופק מ-8 צמחים לכל טיפול הוטענו לבאר. ימים מהדבקה (dpi) מצויינים בראש התמונה. צביעה באתידיום ברומיד (EtBr) של אזור ה- tRNA מאחד מ-6 הגלים הזהים מוצגת כבקורת להטענה שווה.

RNA הופק מהעלה האמיתי הראשון של קבוצה של צמחי קישוא מודבקים באחד משני הוירוסים 5 ימים לאחר הדבקה, מהעלה השני 7 ימים לאחר הדבקה ומהעלה השלישי או הרביעי 14 ימים לאחר הדבקה ומצמחים בלתי מודבקים (H) בזמן המקביל. רמות ה-RNA הויראלי (איור 3) היו בשיאם כבר ב-5 dpi (אך לא חלבון HC-Pro, לא מוצג). נמצאה רמה גבוהה של miR159 ושל miR166 בעלי קישוא (איור 12), ורמתם היתה דומה בצמחים מודבקים ובצמחים בלתי מודבקים. לעומתם, ה-miRNA* המקבילים, miR159* ו-miR166*, היו כמעט בלתי ניתנים לזיהוי בצמחים לא מודבקים או בצמחים מודבקים ב וירוס המוחלש ZYMV^{FRNK} אך הצטברו לרמות גבוהות מאוד בצמחים מודבקים בטיפוס הבר ZYMV^{FRNK}. רמתם המשיכה להצטבר בצמחים מודבקים ב- ZYMV^{FRNK} גם ב-7 וב-14 ימים לאחר הדבקה.

לעומת זאת, miR168 הצטבר בעלי צמחים בלתי מודבקים ונמצא כי הדבקה בכל אחד משני הוירוסים גרמה לעליה בהצטברות זו. ב-5 וב-7 ימים לאחר הדבקה רמות miR168 בצמחים מודבקים ב-ZYMV^{FRNK} היו דומות לאלה שבצמחים מודבקים ב-ZYMV^{FINK}, אך ב-14 ימים לאחר הדבקה היתה ההצטברות גבוהה יותר ב- ZYMV^{FRNK} (איור 12). בעלים בריאים זוהתה כמות נמוכה מאוד של miR168* כצפוי, אך בצמחים המודבקים בוירוס האלים ZYMV^{FRNK} וגם בצמחים המודבקים בוירוס המוחלש ZYMV^{FINK} הוא הצטבר לרמות גבוהות מאוד. בניגוד ל-miR159* ול-miR166* לא נמצא הבדל מהותי ברמות ההצטברות של miR168* בין צמחים מודבקים בשתי הוירוסים השונים ב-5 וב-7 ימים לאחר הדבקה. ב-14 ימים לאחר הדבקה רמתו של miR168* פחתה מעט בצמחים מודבקים ב-ZYMV^{FINK} ביחס לצמחים מודבקים ב-ZYMV^{FRNK}. דפוס זה של הצטברות היה דומה מאוד לזה של ה-miRNA המקביל. ניסוי זה מראה כי מירב ההצטברות של miRNA/miRNA* הנגרמת ע"י הדבקה בוירוס מתרחשת כבר בעלה הראשון 5 ימים לאחר הדבקה וקודם להופעת התסמינים.

הצטברות של miRNA* עשויה להתאים לתצפית בה החלבון HC-Pro קושר duplex- miRNA/miRNA* *in-vitro* כפי שהוצג בניסויי ה-EMSA (סעיף ג'). תופעה בה נראים

הבדלים בהצטברות miRNA* בין הוירוסים עשויה להתאים לעוצמת קישור פחותה בוירוס המוחלש בין HC-Pro לבין תצמיד miRNA/miRNA* בצמח. אף על פי כן, נתגלה כי ישנה קבוצה של מספר miRNA* , כדוגמת miR168* (איורים 11B ו-12) בהם קיימת הצטברות גבוהה בשני הוירוסים.

נמצאו הבדלים קלים בין תוצאות ה- microarray לבין אלה של ה- northern-blot שניתן להסבירם ברגישות ובספציפי ות הרבה יותר של הזיהוי ב- microarray ומספר החזרות הביולוגיות שנעשו, בניגוד לאפשרות שב-northern-blot זהו ע"י הגלאים גם קרובי-משפחה.

ד.2. המבנה המרחבי של תצמידי miRNA/miRNA* וקישורם על ידי החלבון

HC-Pro.

כדי לנסות להבין מדוע קיים הבדל בהצטברות בין שתי קבוצות ה-miRNA*, זו שהמוטציה FINK משפיעה עליה מאוד (איור 11A) וזו שהמוטציה משפיעה עליה פחות (איור 11B), זווגו 11 miRNA שמורים עם ה-miRNA* החזויים שלהם (אלה נבחרו עפ"י עוצמת אות ה- hairpin המירבית ב- microarray) בצורה ממוחשבת ב- hairpin מלאכותי ונחזה הקיפול שלהם בתוכנה mFold (Zuker 2003) (איור 13).

איור 13. זווג miRNA ו-miRNA* (שורה עליונה) החזויים עפ"י עוצמת האות המירבית ממשפחה נתונה כפי שהתקבלה מממוצע שלוש חזרות מה- microarray המוצג באיור 12. הקיפול נעשה בעזרת תוכנת mFold (שורה שניה). על פני הקיפול מסומנים אזורים של כיפוף ההליקס (indel) ב-X אדום ואי- התאמות פשוטות (simple mismatch) בכוכבית אדומה. מספר אי התאמות ברצף מסומנות בתיבה אדומה. יחס האותות שהתקבל מה- microarray (\pm SEM) בין miRNA* של ZYMV^{FRNK} חלקי ZYMV^{FINK} מוצג בשורה השלישית, בלילך ערכים גבוהים מפי 3, ובירוק ערכים נמוכים מפי 3. בשורה הרביעית נמנו מספר אי-הזיווגים ברצף כאשר גם G-U נחשב כזווג.

| | | | | | | |
|-------|----------|----------------------|---------------------------------|-------------|-------------|-----------|
| 7727 | 154 | miRNA*-1 miRNA mFOLD | בעלי סיגנל גבוה ביותר מזוויגים) | FRNK / FINK | לא מזוויגים | |
| miRNA | 157/157* | | | 1 | 3.3 | ± 0.6 |
| miRNA | 159/159* | | | 2 | 19.7 | ± 7.6 |
| miRNA | 165/165* | | | 2+1 | 11.2 | ± 2.7 |
| miRNA | 166/166* | | | 2+1 | 10.1 | ± 4.8 |
| miRNA | 166/166* | | | 2+1 | 6.8 | ± 3.5 |
| miRNA | 167/167* | | | 1 | 12.8 | ± 1.1 |
| miRNA | 168/168* | | | 1+1 | 1.3 | ± 0.2 |
| miRNA | 171/171* | | | 1+1 | 1.2 | ± 0.0 |
| miRNA | 390/390* | | | 1 | 2.5 | ± 0.3 |
| miRNA | 396/396* | | | 1 | 1.0 | ± 0.1 |

X = (indel) כפינה ההלקס
 * = (mismatch) פשוט

נמצא כי הקבוצות נבדלות זו מזו במבנה החזוי של ה-*miRNA/miRNA* duplex*. בארבעת הזוגות המצטברים באופן דומה (*miR168*, 171, 390 ו-396, איור 13 מסומנים בירוק) חזוי מבנה ללא אי-זיווגים עוקבים (*no multiple mismatches*) וללא שבירת מבנה ההליקס (no insertions/ deletions), ולעומת זאת, בשבעת הזוגות בהם יש הצטברות פי 3 או יותר בעת הדבקה ב-*ZYMV^{FRNK}* (*miR156*, 157, 159, 165, 166 ו-167, מסומנים בלילך) ישנם אי זווגים לפחות מאחד הסוגים המתואר מעלה. מכאן אפשר להעלות השערה כי *miRNA/miRNA*-duplex* מושלמים יותר, נקשרים ביעילות דומה ע"י החלבון *HC^{FRNK}* מטיפוס הבר והחלבון *HC^{FINK}* המוטנטי בצמח (*in-vivo*), גם כאשר המטען באתר הקישור מופחת, אך לעומת זאת, כאשר ה-*duplex* מכיל אי זיווגים עוקבים או שמיבנה ההליקס מעוות ע"י החסרה/הוספה של נוקלאוטיד באחד הגדילים אזי בא לידי ביטוי משמעותי בתא ההבדל בעוצמת הקישור בין *HC^{FRNK}* ל-*HC^{FINK}*. בניגוד לכך, בתוצאות הקישור *in-vitro* (ראה סעיף ג.) נראתה פחיתה ברורה בעוצמת הקישור של החלבון המוטנטי *HC^{FINK}* גם עם *duplex* מושלם. מאידך, הקישור של ה-*miRNA-like duplex* היתה חלשה יותר מ-*duplex* מושלם גם ב-*HC^{FRNK}* תוצאה המחזקת את חשיבות המבנה של ה-*duplex* לקישורו ל-*HC-Pro*.

ד.3. שיבוט גנים מקישוא המהווים מטרה ל-*miRNA*

כיוון שישנה אפשרות שקישור תצמיד דו-גדילי ע"י *HC-Pro* גורמת ללכידת *miRNA* (*sequestration*) והקטנת המאגר של *miRNA* זמינים ל-*RISC*, הועלתה השערה כי תהיה הצטברות בלתי מבוקרת של גני-מטרה (*target genes*). לשם כך, שובטו מקישוא שבטים חלקיים של 10 גנים החזויים להיות גני-מטרה של ארבעה *miRNA* ושל *ta-siRNA* אחד. בכולם נמצא אתר המתאים לקישור ה-*miRNA* או ה-*ta-siRNA* המתאים.

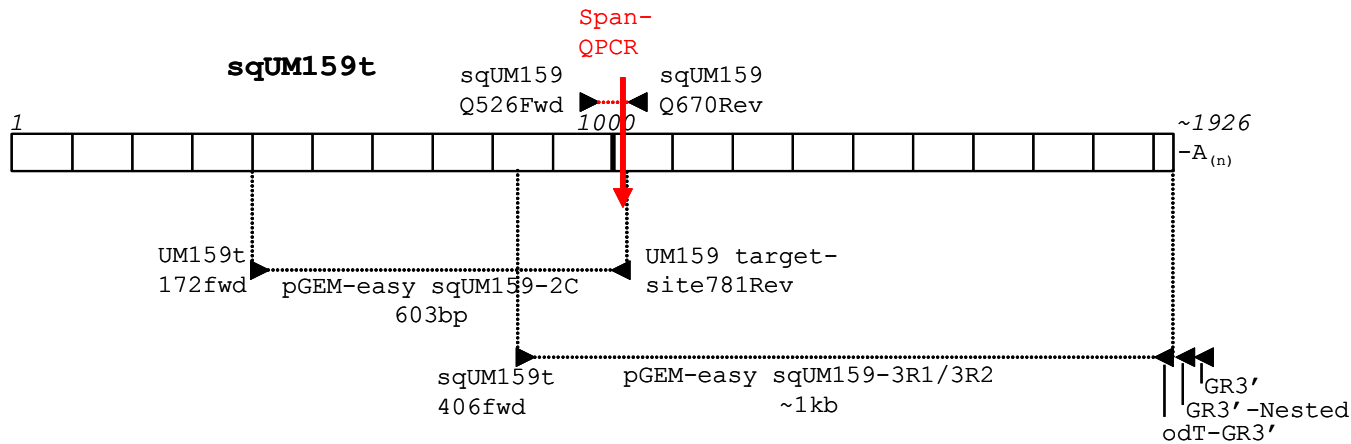
miR159. גני המטרה הידועים של *miR159* הם גורמי השעתוק (*transcription factors*) *MYB33*, *MYB65* ו-*MYB101* ומספר גנים נוספים ממשפחה זו (*Palatnik et al. 2007*). ביטול אתר המטרה של *miR159* ב-*MYB33* בארבידופסיס גרם לפגיעה פליאוטרופית דרמתית בהתפתחות הצמח (*Millar and Gubler 2005*). ביטוי *miR159* מוגבר המושרה

ע"י ABA הוא מנגנון הומאוסטטי הגורם לפחיתה (לפחות בחלק) מגורמי השעתוק הנ"ל ומפחית את רגישותו של נבט הצמח להורמון בתנאי עקה אביוטית (Reyes and Chua, 2007). כיון שלא עלה בידי לשבט הומולוגים לגני מטרה ידועים של miR159 ממשפחת MYB, שיבטתי גן החזוי להיות מטרה שתפקידו בלתי ידוע על סמך גן מעגבניה המכונה UM159t (unknown miR159 target). UM159t שובט והוכח כמטרה של miR159 בעגבניה במעבדתו של דר' ארזי (קובי בוקסדורף, טרם פורסם) והוא הומולוגי למספר גנים שתפקידם לא ידוע מצמחים אחרים בהם האתר שמור. שיבוט הגן מקישוא (איור 14) נעשה במספר שלבים הכוללים (בקצרה) שימוש בתחל fwd (תחל הזהה ברצפו לגדיל המקודד) באזור השמור בין מספר צמחים שונים, עם תחל rev (תחל הופכי, reverse-complement לגדיל המקודד) על אתר המטרה של miR159, ולאחר מכן בחירת תחל fwd חדש מרצף הקישוא שהתקבל ל-3'-RACE. בגן מקישוא, sqUM159t, אכן נמצא אתר המתאים לקישור miR159 שהיה זהה לחלוטין לאתר המטרה של עגבניה, גפן, צפצפה ואורז (איור 14A). בדיעבד נמצאו בבסיס הנתונים רצפי EST דומים ממלון שלא כיסו את אתר הקישור והיו מ-5' (מלון) או מ-3' לו (אבטיח) (לא מוצגים).

A) UM159t partial nucleic-acid alignment

| | | | |
|----------------|-----|---|-----|
| sqUM159 contig | 528 | -----CAATGGTGAATGTGCTTCAACAACTTCAAGTCTTCTGGCCTTAATACCCAGATAGAGCCCCCTTCAAACCAAAGCTATTGTTATGGCAACTACTCAACCATCTGGGCAGA | 640 |
| Tomato contig | 702 | TTCAT---CAATGATGAATACTCATCAGGGATTTCATCATCATCTGTACTAAATATCAGATGGAGCCCCCTTCAAACCAAATTTATTATTCGTGTAATTATTTTACCTCTGTGGCCTGA | 818 |
| Populus eugene | 594 | TTCATGCTCAATGGTAAATGCCTCGTCAGGAAGTTTCATCATCATCTTTGCCAAATCCTCAGATGGAGCCCCCTTCAAACCAAAGCTATTATG---ACAACATATGTACCTGTTGGATAGA | 710 |
| Vitis CU459221 | 556 | -----CAATGGTCAATGTCTCATCAGGAATTCATCATCACTATACCAAATTTTCAGATAGAGCCCCCTTCAAACCAAAGCTATTATGGCAAACAACATCACATCCATGTGGCCAGA | 668 |
| Rice 12001.m07 | 403 | -----CGATGGTGAGCA-----CGGGCCTGTGCTGACGGCGTCGGCGCGCCACCACCGGAGCCCCCTTCAAACCAAATGTACAGCAGCAGCGGGCAGCAGGAGCAGCGCCGCGGC | 509 |
| ath-miR159b RC | 1 | ~~~~~AAAGAGCTCCCTTCAATCCAAA | 21 |

B) sqUM159t clone and primer organization



איור 14. (A) קטע מהשוואת רצף הבסיסים של UM159t משישו (sqUM159t Contig, עבודה נוכחית), לרצפים מעגביה (Tomato contig SGN-), (U320975), צפצפה (Populus eugene3.00012728|Poptr1_1), גפן (Vitis CU459221) ואורז (Rice 12001.m07761). שם רצף miR159b מארבידופסיס (באוריינטציה הופכית reverse-complement, RC), מודגש באדום. בסיסים זהים ביותר מ-62% מהרצפים מודגשים בצהוב.

(B) ארגון הפלסמידים והתחלים (ראשי חצים שחורים) של sqUM159t משישו. החץ האדום מייצג את מיקום אתר המטרה החזוי של miR159 ביחס ל-mRNA החזוי של sqUM159t. הקטע המוגבר ב-RT-Q-PCR מסומן בקו אדום.

miR166. גני המטרה הידועים של miR166 הם גורמי שעתוק ממשפחת Class III (HD-Zip) homeodomain-leucine zipper. ממשפחה זו שובטו מקישוא ה-mRNA של INCURVATA4, שלוש פאראלוגים של PHAVOLUTA ושתי פאראלוגים של REVOLUTA.

INCURVATA-4 (הידוע גם כ- [CNA] CORONA, Icu-4, ATHB15) מעורב בארבידופסיס בין היתר בהתפתחות צינורות ההובלה בתפוח (Kim *et al.* 2005), ומוטנטים בלתי רגישים ל-miR166 הם בעלי שינויים בסידור העלים (phytotaxis), אדקסיאליזציה (adaxialization) של איברים צדדיים, שינויים במבנה ואורך השורש ובעלי גידול מוגבר של עצה בגבעול (Ochando *et al.* 2006). גן בעל דמיון רב ל-INCURVATA-4 שובט מקישוא (בקצרה, איור 15) ע"י בחירת תחל rev על סמך רצפי pyrosequencing ממלון (דר' קציר נ. טרם פורסם) שהיו בעלי דמיון ל-INCURVATA-4 מארבידופסיס והיו 5' לאתר המטרה של miR166, יחד עם תחל fwd על אתר המטרה או לחלופין יחד עם תחל fwd שנבחר באזור שמור בין INCURVATA-4 מארבידופסיס ורצפים של שלושה פאראלוגים דמויי INCURVATA-4 מצפצה (איור 15 incurvata). התחלים נבחרו באופן שימזער את הסיכון להגברת רצפים של PHAVOLUTA ו-REVOLUTA המקורבים. שתי רצפי הקישוא שהתקבלו היו זהים למעשה בקטע החופף. נמצאה זהות כמעט מוחלטת ברצף אתר המטרה בין INCURVATA-4 מקשוא לארבעת הגנים שצויינו מעלה (איור A 15).

A. INCURVATA-4 partial nucleotide alignment. חפיפת רצפים חלקית של INCURVATA-4

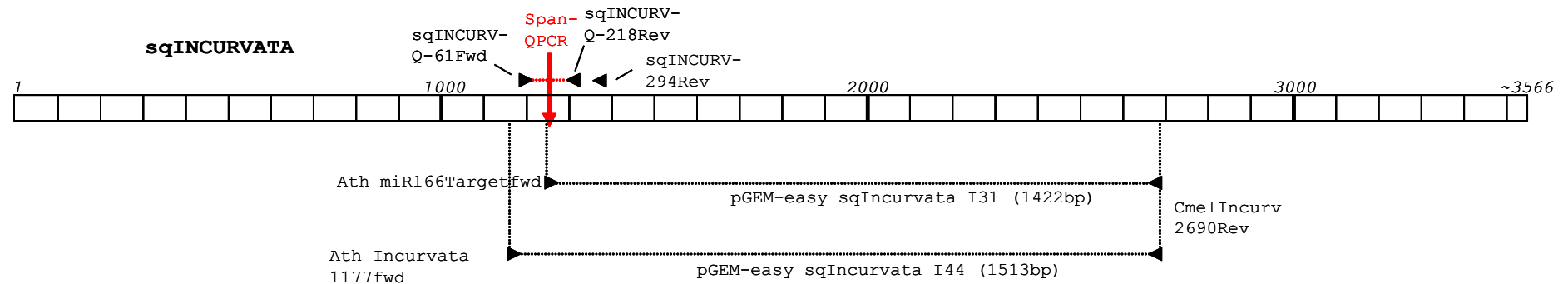
```

miR166TarSite TC271870 1 ~~~~~CTGGAATGAAGCCTGGTCCGG----- 21
sqINCURVATA Consensus 1 ~~~~~kccctgcagggcttttgtccaTTGCAGAAGAGACTTTAACAGAGTTTCTTTCAAAGGCCACTGGAACCTGCGTGGAGTGGGTCCAAATGCCTGGAATGAAGCCTGGTCCGGATTCCATTG 121
AthB-15 (incu4) gi|3069 1168 AGAGATGCTAGTCTCTGCAGGACTTTTGTCCATTGCAGAAGAACTTTAGCAGAGTTTCTTTCAAAGGCCACTGGAACCTGCTGTGAGTGGGTTCAGATGCCTGGAATGAAGCCTGGTCCGGATTCCATTG 1297
Pt HB5 gi|60327628|gb 454 AGGGATGCTAGTCTCTGCAGGACTTTTGTCCATTGCAGAAGAGACTTTAACAGAGTTTCTTTCAAAGGCCACTGGAACCTGCTGTAGAGTGGGTCCAAATGCCTGGAATGAAGCCTGGTCCGGATTCCATTG 583
Pt HB6 gi|60327630|gb 451 AGGGATGCTAGTCTCTGCAGGACTTTTGTCCATTGCAGAAGAGACTTTAACAGAGTTTCTTTCAAAGGCCACTGGAACCTGCTGTAGAGTGGGTCCAAATGCCTGGAATGAAGCCTGGTCCGGATTCCAGTG 580
Pt HB8 gi|60327634|gb 418 AGGGATGCCAGCCTGCAGGACTTTTGTCCATTGCAGAAGAGACTTTAGCAGTTTCTTTCAAAGGCCACTGGAACCTGCTGTGAGTGGGTCCAAATGCCTGGATGAAGCCTGGTCCGGATTCCATTG 547
    
```

מקרא (שמות רצפים מלאים)

miR166TarSite TC271870- אתר מטרה בארבידופסיס
 sqINCURVATA Consensus (עבודה נוכחית) קשוא, קונצנזוס משתי שבטים
 AthB-15(incu4)gi|30695148|ref|NM_179464.1| Arabidopsis thaliana ATHB-15 (INCURVATA 4); DNA binding / transcription factor
 Pt HB5 gi|60327628|gb|AY919620.1| Populus trichocarpa class III HD-Zip protein 5 (HB5) mRNA, complete cds
 Pt HB6 gi|60327630|gb|AY919621.1| Populus trichocarpa class III HD-Zip protein 6 (HB6) mRNA, complete cds
 Pt HB8 gi|60327634|gb|AY919623.1| Populus trichocarpa class III HD-Zip protein 8 (HB8) mRNA, complete cds

B. Squash INCURVATA-4 clones and primer location. שבטי INCURVATA-4 מקשוא ומיקום תחלים.



איור 15. (A) השוואת בסיסים חלקית בין INCURVATA-4 מארבידופסיס, לרצף שהתקבל מקישוא, ולשלוש פאראלוגים של גן זה מצפצפה (ראה מקרא).
 בצהוב התאמה של יותר מ-62%. באותיות קטנות רצף מקובע בידי תחל. (B) ארגון הפלסמידיים והתחלים (ראשי חצים שחורים, לרצף רשימת תחלים
 בפרק השיטות) של sqINCURVATA מקשוא. החץ האדום מסמל את אתר המטרה החזוי של miR166. האזור המוגבר ב-RT-Q-PCR מסומן בקו אדום.

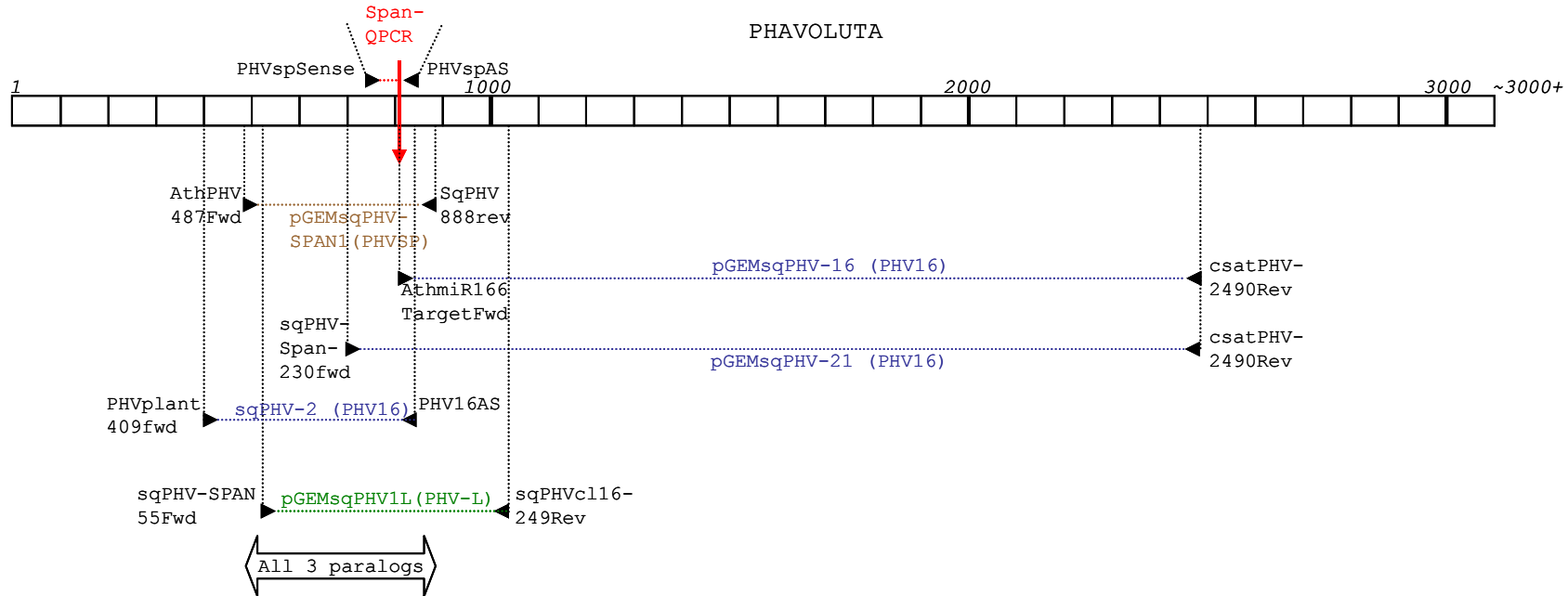
PHAVOLUTA (PHV) ב-*Nicotiana sylvestris* מבקר את כיווניות צמיחת הקמביום ברקמות ההובלה ואת מבנה מריסטמות הקודקוד והתפרחת ומונע את הכרעת הגורל ההתפתחותי של רקמות אלה (McHale and Koning 2004). מוטנטים בלתי רגישים ל-miR165/166 מאבדים את הבקרה על קוטביות המריסטמה וגורמים לאדקסיאליזציה של העלה (McConnell et al. 2001; Emery et al. 2003).

שובטו שלוש פאראלוגים של PHV מקישוא, PHV16, PHVSP, ו-PHV-L (איור 16 PHAVOLUTA). השיבוט מקישוא (בקצרה) נעשה ע"י בחירת תחל rev עפ"י רצף מלפפון הדומה ל-PHV יחד עם תחל fwd על אתר המטרה של miR166. בהמשך נבחר תחל rev על סמך הרצף שהתקבל (PHV-16) יחד עם תחל fwd על פי ארבידופסיס אך התקבל פאראלוג אחר (PHV-SP) המכסה את אתר המטרה של miR166. ניסיונות להגדיל את החפיפה ביניהם בעזרת תחלים נוספים העלו פאראלוג שלישי (PHV-L). מציאת שלוש גנים דומים אלה יצרה צורך בבחירת תחלים נוספים להמשך הריצוף שיבחינו ביניהם ופעולה זו יצרה חפיפה באזור אתר החיתוך שאיפשרה לבחור תחלים ספציפיים למבחן הכמותי. למרות הדמיון הרב בין PHV ל-PHB בארבידופסיס, שלושת הרצפים מקישוא דמו יותר ל-PHV. לשלושת הפאראלוגים נמצא אתר מטרה משוער ל-miR166 הזהה לחלוטין לאתר המטרה של miR166 ב-PHV מארבידופסיס ו-*N. benthamiana* (איור 16).

A. PHAVOLUTA nucleotide alignment (partial).

| | | | | |
|------------------|-----|--|-----------------------|----|
| Ath-miR166a | 1 | ~ | GGGGAATGAAGCCTGGTCCGA | 21 |
| sqPHV-16 | 342 | AGTTCCTTTCCAAGGCTACAGGAACTGCTGTCGACTGGGTCCAGATGATTGGGATGAAGCCTGGTCCGGATTCTATTGGAATCGTTGCTGTTTCCGCAACTGCAGTGGGGTAGCAGCGC | 461 | |
| sqPHV-1L | 204 | AGTTCCTTTCCAAGGCTACAGGAACTGCTGTCGACTGGGTCCAGATGATTGGGATGAAGCCTGGTCCGGATTCCATTGGTATCGTTGCTGTTTCCGCAACTGCAGCGGGGTGGCAGCAC | 323 | |
| sqPHV-SP | 258 | AGTTCCTTTCCAAGGCAACAGGAACTGCTGTCGACTGGGTTCAAATGATTGGGATGAAGCCTGGTCCGGATTCAATTGGGATGTTGCTGTTTTCGAAAATTGCAATGGGGTAGCAGCAC | 377 | |
| Ath PHAVOLUTA | 747 | AGTTCCTTTCCAAGGCTACAGGAACTGCTGTCGACTGGGTCCAGATGATTGGGATGAAGCCTGGTCCGGATTCTATTGGTATCGTAGCTGTTTCCGCAACTGCAGTGGAAATAGCAGCAC | 866 | |
| N.sylvestris PHV | 866 | AGTTCCTTTGGAAAGGCTACTGGAAGTCTGTCGACTGGGTCCAGATGATTGGGATGAAGCCTGGTCCGGATTCTATTGGTATGTTGCTGTTTCCGCAACTGCAGTGGGGTAGCAGCAC | 985 | |

B. PHAVOLUTA plasmid and primer arrangement



מקרא (שמות רצפים מלאים)

Ath PHAVOLUTA gi|145336269|ref|NM_102785.4| *Arabidopsis thaliana* PHV (PHAVOLUTA)
 N.sylvestris PHV gi|45479745|gb|AY560320.1| *Nicotiana sylvestris* PHAVOLUTA-like HD-ZIPIII

איור 16. (A) השוואת בסיסים חלקית בין PHAVOLUTA מארבידופסיס (Ath), לרצף דומה מ-*Nicotiana sylvestris*, ולבין שלושת הפאראלוגים שנמצאו בקשוא (sq) PHV16 (שם בכחול), PHVSP (שם בחום), ו-PHV-L (שם בירוק). שם הרצף של Ath-miR166a, המוצג באוריינטציה הופכית (RC) מודגש באדום. רצף מודגש בצהוב מסמל התאמה של יותר מ-62%. (B) ארגון הפלסמידיים והתחלים (ראשי חץ שחורים) של sqPHAVOLUTA מקשוא ביחס למבנה המשוער של ה-mRNA. החץ הדו-ראשי מסמל את אזור החפיפה בין כל שלושת הפאראלוגים. מקישוא, PHV16 (קוים כחולים), PHVSP (קו חום), ו-PHV-L (קו ירוק). החץ האדום מסמל את מיקום אתר המטרה של miR166. הקו האדום מסמל את המקטע שהוגבר ב-RT-Q-PCR מקלון PHV-SP.

REVOLUTA (REV), הידוע גם כ-INTERFASCICULAR FIBERLESS1) בארבידופסיס דרוש להתפתחות מריסטמה קודקודית ומגביל את חלוקת התאים בעלים ובגבעולים (Talbert *et al.* 1995). מוטנטים בלתי רגישים ל-miRNA מאופיינים ע"י אדקסיליזציה של איברים צדדים ושינויים בסידור הרדיאלי של רקמות ההובלה בגבעול (Emery *et al.* 2003). שובטו שתי גנים מקישוא הדומים ל-REVOLUTA, sqREVO1 ו-sqREVO2 (איור 17 A, ירוק ותכלת בהתאמה) המכילים אתר מטרה ל-miR166 הזהה לאתר המטרה של REVOLUTA מארבידופסיס וצמחים נוספים. שני הגנים שובטו (בקצרה, איור 17) ע"י שימוש בתחלים דגנרטיביים שתוכננו ע"י השוואת מספר רב של צמחים. נמצא כי בקטע חופף של 619 בסיסים יש זהות של 80% ביניהם ברמת הנוקלאוטידים, ממצא שעזר לתכנן זוגות תחלים ספציפיים למבחן הכמותי. בדיעבד נמצאו גם רצפי EST ורצפי pyrosequencing (קציר נ. טרם פורסם) דומים ממלון המכסים חלקים מקצה 3' של REVOLUTA אך לא אתר המטרה (לא מוצג).

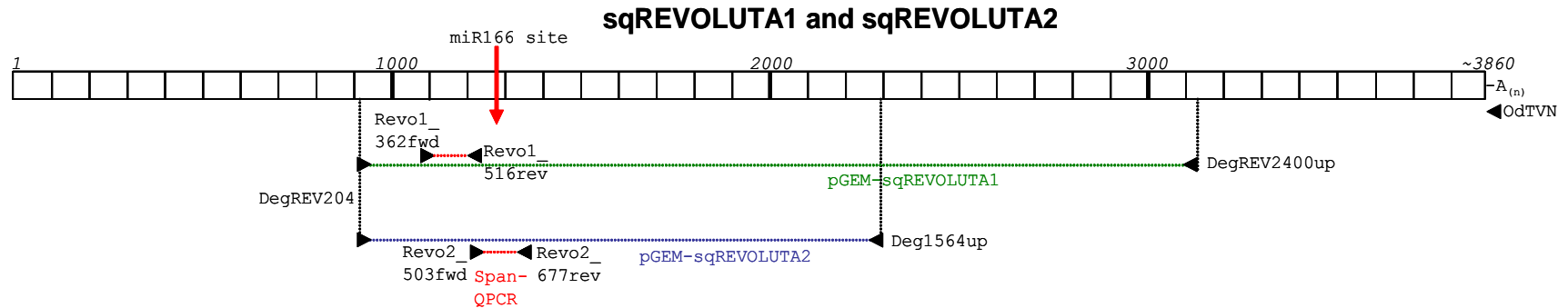
A.

| | | | |
|----------|------|---|------|
| miR166RC | 1 | GGGGAAATGAAGCCTGGTCCGA | 21 |
| sqREVO1 | 333 | CTACAGGAACCTGCTGTCGATTGGGTCCAGATGCCTGGGATGAAGCCTGGTCCGGATTCGGTGGGAATCTTTGCCATTTC | 472 |
| sqREVO2 | 326 | CTACAGGAACCTGCTGTCGATTGGGTCCAGATGCCTGGGATGAAGCCTGGTCCGGATTCGTTGGGATCTTTGCCATTTC | 465 |
| AthREV | 1229 | CTACAGGAACCTGCTGTTGATTGGGTTCAGATGCCTGGGATGAAGCCTGGTCCGGATTCGGTGGCATCTTTGCCATTTC | 1368 |
| ZmRLD1 | 602 | CTACTGGGACAGCTATTGATTGGGTCCAGATGCCTGGGATGAAGCCTGGTCCGGATTCAGTTGGTATCGTTGCCATTTC | 741 |
| ZeHB12 | 809 | CCACAGGAACCTGCTGTTGATTGGGTCCAGATGCCTGGGATGAAGCCTGGTCCGGATTCAGTTGGGATCTTTGCCATTTC | 948 |
| ZeHB11 | 1195 | CTACAGGAACCTGCTGTTGATTGGGTCCAGATGCCTGGGATGAAGCCTGGTCCGGATTCGGTGGGATCTTTGCCATTTC | 1334 |
| ZeHB1 | 525 | CTACAGGAACCTGCTGTTGATTGGGTCCAGATGCCTGGGATGAAGCCTGGTCCGGATTCAGTTGGGATCTTTGCCATTTC | 664 |
| PtrHB2 | 518 | CCACAGGAACCTGCTCTTGAGTGGGTCCAGATGCCTGGAAATGAAGCCTGGTCCGGATTCGATTGGGATTTTTTCCATTTC | 657 |
| PtrHB1 | 530 | CTACAGGAACCTGCTGTCGATTGGGTCCAGATGCCTGGGATGAAGCCTGGTCCGGATTCGGTGGGATCTTTGCCATTTC | 669 |
| PprHB1 | 483 | CTACAGGACTGCTGTTGATTGGGTTCAGATGCCTGGGATGAAGCCTGGTCCGGATTCGGTGGGATCTTTGCCATTTC | 622 |
| OsREV2 | 940 | CTACTGGTACAGCTATTGATTGGGTCCAGATGCCTGGGATGAAGCCTGGTCCGGATTCGGTGGTATTGTGGCCATTTC | 1079 |
| OsREV1 | 536 | CTACAGGACTGCTGTTGATTGGGTGCCAATGCCTGGGATGAAGCCTGGTCCGGATTCGTTGGTATTGTGGCCATTTC | 675 |
| LjREV1 | 521 | CTACAGGAACCTGCTGTTGATTGGGTCCAGTTCGCCGGGATGAAGCCTGGTCCGGATTCGGTGGGATCTTTGCCATTTC | 660 |
| LeREV1 | 697 | CTACAGGAACCTGCTGTCGATTGGGTCCGATGCCTGGGATGAAGCCTGGTCCGGATTCAGTTGGGATTTTTGCCATTTC | 836 |

מקרא

- AthREV NM_125462.3| Arabidopsis thaliana REV (REVOLUTA)
- ZmRLD1 NM_001112063.1| Zea mays rolled leaf1 (rld1), mRNA
- ZeHB12 AB084382.1| Zinnia elegans ZeHB-12 mRNA for homeobox leucine zipper
- ZeHB11 AB084381.1| Zinnia elegans ZeHB-11 mRNA for homeobox leucine zipper
- ZeHB1 AJ312053.1| Zinnia elegans mRNA for HD-Zip protein (hb1 gene)
- PtrHB2 AY919617.1| Populus trichocarpa class III HD-Zip protein 2 (HB2)
- PtrHB1 AY919616.1| Populus trichocarpa class III HD-Zip protein 1 (HB1) mRNA,
- PprHB1 DQ013803.1| Phyllostachys praecox HB1 mRNA, partial cds
- OsREV2 AY425991.1| Oryza sativa homeodomain leucine-zipper protein Hox10 mRNA, complete cds
- OsREV1 gb|AY423716.1| Oryza sativa (japonica cultivar-group) HD-ZIP protein Hox9 mRNA, complete cds
- LjREV1 BK005805.1| TPA_inf: Lotus japonicus class III HD-Zip protein REV1 gene, complete cds
- LeREV1 gb|BT013577.1| Lycopersicon esculentum clone 132322R, mRNA sequence

B.



איור 17. (A) השוואת בסיסים חלקית בין REVOLUTA מארבידופסיס (AthREV) למספר גדול של צמחים (ראה מקרא) ולשתי שבטי REVOLUTA מקשוא, sqREVO1 (שם מודגש בירוק) ו-sqREVO2 (בתכלת). שם הרצף miR166 מסומן באדום, באוריינטציה reverse complement (RC). בצהוב התאמה של יותר מ-62%. (B) ארגון הפלסמידים והתחלים של REVOLUTA מקשוא. חץ אדום מסמל את מיקום אתר המטרה של miR166. תחלים מסומנים בראש חץ שחור. קו אדום מסמל את הרצף המוגבר ב-RT-Q-PCR ליד הקלון הרלוונטי.

miR 319. miR319 מכונה גם JAW) גני המטרה הידועים של miR319 הם גורמי שעתוק בעלי TCP domain, בקרה המתקיימת אף בטחבים (Arazi et al. 2005). בארבידופסיס חמש גנים ממשפחה זו (מתוך 24) מבוקרים ע"י miR319, וביטוי ביתר גורם לפנוטיפ דמוי *Cincinnata* (*cin*), גן המבקר התמיינות וגדילה של תאים בעלים ובעלי כותרת של לוע הארי (Palatnik et al. 2007).

שובט גן- מטרה חזוי המכיל אתר משלים ל- miR319 אשר כונה sq5707. לגן זה דמיון לגנים CYCLOIDEA ו-LANCEOLATE שהם שתי גנים מאוד דומים ממשפחת TCP-domain (איור 18). הגן LANCEOLATE בעגבניה מבקר היווצרות עלעלים מורכבים (Ori et al. 2007), והגן CYCLOIDEA המבקר התמיינות סוגי פרחים בגרברה (Broholm et al. 2008). שיבוט הגן מקישוא נעשה בעקבות מציאת רצף משלים ל-miR319 ב-EST בשם MU5707 מפרי מלון שנמצא בבסיס נתונים (<http://www.icugi.org>). תוכנו תחלים משני עברי אתר המטרה עפ"י MU5707 (איור 18. sq5707). רצף המלון החלקי, כמו גם רצף הקישוא האורתולוגי לו, לא כיסו את אתר ה-TCP, אך הרצף ההומולוגי להם מארבידופסיס (TCP4, gi|15232470), והרצפים של CYCLOIDEA ו-LANCEOLATE מעגבניה הכילו גם אתר TCP וגם אתר מטרה ל-miR319.

```

ath-miR319a RC 1 -----GGGAGCTCCCTTCAGTCCAA-----20
Squash sq5707 70 AATTTCCTCCGCCATCGCCGCGTTCGCAATCTGCAACCGCTGTTGGAGAAAACCAATTGGTTTCTCAGAGGGGA C CCCTTCAGTCCAGTTACACGCCCTCGATTTCGCGCTTGGATAGACCCATC 188
Melon MU5707 510 AGTTTCCTCCGCCATCGCCGCGTTCGCAATCTGCAACCGCTATTTGGAGAAAACCAATTGGTTTCTCAGAGGGGA C CCCTTCAGTCCAGTTACACGCCCTCGATTTCGCGCTTGGACAGACCCGTC 637
Tomato cycloidea 1416 AATTCGCC-----ACCAGCACGGGCGTGTGTCAGCAGCTATTCGGTCAAAATCAGTTTCTCAGAGGGGA C CCCTTCAGTCCAGTAAACACATCTTCGGTTTCGCGCATGGATGGATCCGTC 1534
Tomato lanceolate 1401 AATTCGCC-----ACCAGCACGGGCGTGTGTCAGCAGCTATTCGGTCAAAATCAGTTTCTCAGAGGGGA C CCCTTCAGTCCAGTAAACACATCTTCGGTTTCGCGCATGGATGGATCCGTC 1519
Arabidopsis TCP4 -----TTCTCAGAGGGGT~C~CCCTTCAGTCCAGTTACAGTCCCATGATCCGTGCTTGGTTTGATCC

```

איור 18. השוואת קטע מרצף הנוקלאוטידים של sq5707 מקישוא לקטעים מהרצפים MU5707 ממלון, TCP4 מארבידופסיס (EU550942) ורצפיהם של cycloidea ו-lanceolate מעגבניה. שם הרצף של miR319a מארבידופסיס מודגש באדום, הרצף באורינטציה הופכית (reverse complement). בצהוב התאמה של יותר מ-62%.

ta-siRNA TAS3-D7/D8 מלבד miRNA, ישנה קבוצה נוספת של RNA זעירים המשמשים בצמח לבקרה שלאחר שעתוק המכונה trans-acting siRNA (ta-siRNA) (Peragine *et al.* 2004). ta-siRNA מבקרים גני-מטרה באופן דומה משהו ל-miRNA אלא שהביוגנזה שלהם שונה. גנים ל-ta-siRNA משועתקים ככל mRNA אך אינם מתורגמים לחלבון, ו-RNA בלתי מקודד זה מהווה תבנית ליצירת RNA דו-גדילי בידי RdR6. dsRNA זה בסוף התהליך נחתך בידי Dicer ל-ta-siRNA ספציפיים בעלי תפקיד י בקרה על גנים אחרים. למטרת העבודה הנוכחית שובטו ונבדקו גני מטרה המבוקרים ע"י ה-ta-siRNA שמקורם בתעתיק TAS3 והמכונים TAS3-D7/D8.

גני המטרה הידועים של TAS3-D7/D8 הם גורמי שעתוק ממשפחת ה-Auxin response (ARFs) ARF2 factors, ARF3, ARF4 (ETTIN, ETT) ו-ARF4 (Williams *et al.* 2005a). ל-ARF3 ול-ARF4 שתי אתרי מטרה של TAS3-D7/D8 כל אחד. ביטוי גנים אלו מוגבר בנוכחות אוקסין. ARF3 ו-ARF4 הם 2 גנים דומים המבקרים את המעבר ממופע יובנלי לבוגר בארבידופסיס. ל-ARF3 תפקיד בהתפתחות הפרח, אולם במוטנטים כפולים עם ARF4 יש אדקסיאליזציה של רקמות אבקסאליות בכל הרקמות העליונות של הצמח (Pekker *et al.* 2005). גם ל-ARF2 תפקידים מגוונים בהתפתחות ומוטנטים שלו הם בעלי תסמינים פלאוטרופיים (Okushima *et al.* 2005). שובטו מקישוא שלוש גנים, sqARF3, sqARF3a ו-sqARF4 (איור 19) (ע"י שימוש בתחל fwd דגנרטיבי שמור יחד עם 3'-RACE) ובנוסף מדלועים נוספים, מספר גנים דומים ל-ARF3 (ע"י שימוש באותו תחל fwd עם תחל המשלים לאתר המטרה של TAS3-D7/D8). יכולם נמצאו שתי אתרי מטרה אפשריים ל-TAS3-D7/D8 ("אתר 5'" ו"אתר 3'" איור 19A).

מטבלת רמות הדמיון ברמת הנוקלאוטידים (איור 19 B) ומהעץ הפילוגנטי (איור 19 C) עולה כי יש דמיון רב בין sqARF3 מקישוא לגנים ששובטו מדלועים אחרים (יותר מ-92%), דמיון מעט נמוך יותר לפאראלוג שלו sqARF3a מקישוא (כ-90%), ודמיון נמוך עוד יותר ל-sqARF4 מקישוא (כ-60%).

A.

```

Ath ARF3      1298 TGAGATTCAGAGGGTCTTGCAAGGTCAAGAAATTTTCCGGGTTTATCAACACTTGTTCGGATGGTGGAGCCGGTGCCAAGGAGGCCGCTTCAAAGGAACAGAAATTTGGT----- 1410
sqARF4       827 TTAGATCCCTAAGGTCTTGCAAGGTCAAGAAATGTAGG-TATGGTATCACCCCTTTACGGTGTGATAATACCGCAAAACGCTCACGGAGTTGAGGTGCGATCTTCTGCACAACAAAATCAAGCGT 955
sqARF3a     830 TAAGATTCAGAGAGGTCTTGCAAGGTCAAGAAATTTTAGGTTACAGTA-CTCCCATTTGATGGCGACGACAACATTCGT---CATCCACCGGAGAAGAGGAGATCATTCCCTGGTTACTCGGTTCAAGGA 955
sqARF3      830 TAAGGTTCCATTAAGGTCTTGCAAGGTCAAGAAATTTTAGGCTACAATA-CTCCCACTGACTGTGATGACAAACACTCGTTATCATCCACCTGAGAAGAGGAGATTGTGCCTGACTTACATGGTTCTGGTA 958
D7/D8 (5'-site) 1 -----GGGTCTTACAAGGTCAAGAA----- 21

Ath ARF3      1410 -----GACTCTTATGGT-----TTCCAATAAGGTCTTGCAAGGTCAAGAAACAGTTCCCGCCTAC-- 1464
sqARF4       956 CAGGTGGAGTTGAAAA--GCTTAATA-----TAGGTGATTATGTAACCTCTTTCACAGGCTTTATG-----GAATCTGATAGATTCTGAAGGTCTTGCAAGGTCAAGAAATATGCTCATTGAGGCC 1070
sqARF3a     956 TAGCTCTAATGAGAAATGGTCCAAGAAATCCAGTTACCAACTCTGAAACTTCCTCCCGGGGTTTCATGTTTGTATGAATCCTTCCAATTCCAATAAGGTCTTGCAAGGTCAAGAAATGATCCT--AGTCCA 1083
sqARF3      959 TAGCTCTGATGAGAAATGGTCCAGAAACCGACTTATCAACTCCGAAACTTCCTCACGGGGTTTCGTGTTTGTATGAATCCTTCCAATTCCAATAAGGTCTTGCAAGGTCAAGAAATATTTCCA--GGTCCC 1086
D7/D8 (3'-site) 1 -----GGGTCTTACAAGGTCAAGAA----- 21
  
```

B.

| | sqARF4 | sqARF3a | sqARF3 | CsatARF3.1 | CsatARF3.2 | WM-ARF3 | CmeloARF3 |
|------------|----------|----------|----------|------------|------------|----------|-----------|
| sqARF4 | ID | 0.607 | 0.614 | 0.624 | 0.613 | 0.623 | 0.623 |
| sqARF3a | 0.607 ID | ID | 0.895 | 0.902 | 0.893 | 0.903 | 0.904 |
| sqARF3 | 0.614 | 0.895 ID | ID | 0.924 | 0.998 | 0.923 | 0.924 |
| CsatARF3.1 | 0.624 | 0.902 | 0.924 ID | ID | 0.923 | 0.94 | 0.974 |
| CsatARF3.2 | 0.613 | 0.893 | 0.998 | 0.923 ID | ID | 0.921 | 0.923 |
| WM-ARF3 | 0.623 | 0.903 | 0.923 | 0.94 | 0.921 ID | ID | 0.944 |
| CmeloARF3 | 0.623 | 0.904 | 0.924 | 0.974 | 0.923 | 0.944 ID | ID |

C.



איור 19. שיבוט וריצוף רצפי Auxin response factors (ARF) מדלועים. (A) קטע מהשוואת רצפים מקשו (sq) לרצף של ARF3 מארבידופסיס (Ath). שם רצף ה-ta-siRNA, TAS3-D7/D8 (באורינטציה הופכית) מול שתי אתרי מטרה שלו מודגש באדום. (B) השוואת ההומולוגיה בין רצפי ה-ARF ששובטו מהדלועים מלפפון (Csat), אבטיח (WM) ומלון (Cmelo) בקטע החופף ביניהם. (C) עץ פילוגנטי (un-rooted tree) של רצפי הדלועים בשיטת DNAdist Neighbor-Joining/UPGMA method.

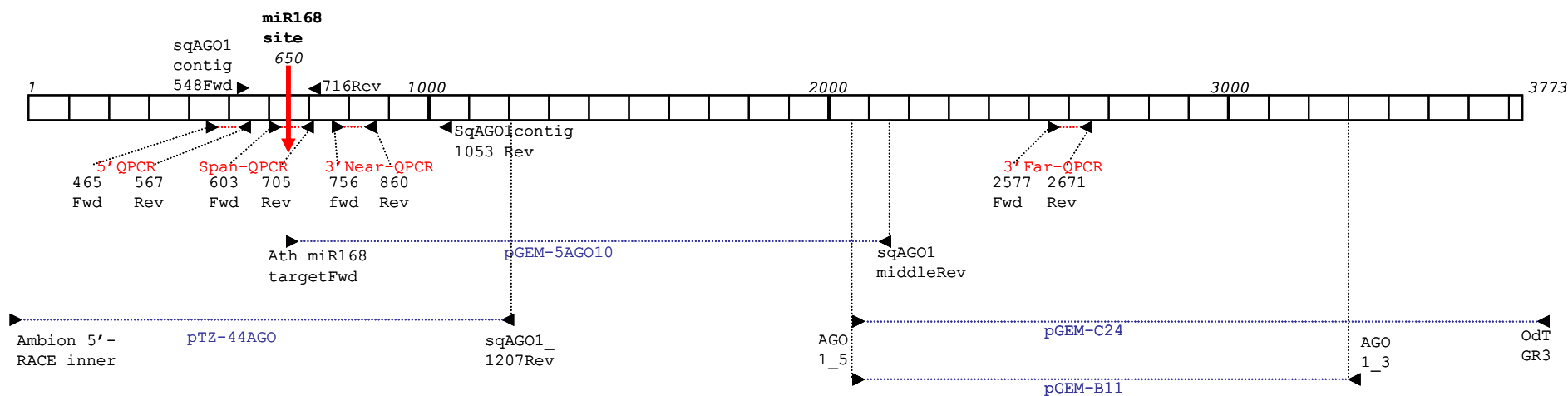
miR168, וגן המטרה שלו ARGONAUTE-1

גן המטרה של miR168 הוא ARGONAUTE-1 (AGO1). AGO1 הוא הרכיב החלבוני של RISC ומכונה גם slicer בשל תפקידו בחיתוך mRNA של גני-מטרה. גן מטרה זה שובט במלואו מקישוא (3770 בסיסים) בעבודה הנוכחית תוך שימוש בתחלים באזורים שמורים בין צמחים שונים בשילוב עם 3'-RACE ו-5'-RACE (איור 20B). נמצא כי אזור המטרה של miR168 שמור למדי בין צמחים רבים (איור 20A), אך לא באופן מושלם, והאזור סביב אתר המטרה, הקרוב לקצה 5', אך בתוך הקטע המקודד של הגן, אינו שמור. רוב רצף הנוקלאוטידים של שאר חלקי הגן היה דוקא שמור מאוד, ונמצאה זהות של בין כ- 67-72% לגנים המוצגים באיור על פני כ-3150 בסיסים כאשר הדמיון הרב ביותר היה לגפן (לא מוצג).

A

```

ath-miR168a RC 1 ~~~~~TTCCCGACCTGCACCAAGCGA~~~~~ 21
Squash AGO1 596 CATTGGGGGAGGATCTTCTCTGGTGGACCATCCAGGCCACCAGTTCCCGAGCTGCACCAAGCAACCCAGTGTATC~~~~~AAGGTGGG 680
A.thaliana AGO1 313 ~~~~~CTTCTCTGGACCACCGCAGAGACAATCAGTTCCCGAGCTGCATCAAGCTACCTCACCTACTT-----ATCAAG---CGGTG 387
Pisum sat. AGO1 478 ~~~~~CTTCTTATGGAGGCCACCTAGGCCACCAGCACCCGAGCTGCACCAAGCTACCTCAGTTCCCTCCGTGCCATATCCAGTTGCGGTG 564
Vitis vin. AGO1 403 ~~~~~CTTCTGGTGGCCCTCCTTAAGCCGTTAAGTTCCGATCTGCACCAAGCTACGCAGGCGAGTT-----ATGCAGCCGGGGGA 480
N.bentham. AGO1 304 ~~~~~TGGGGGGCCGTGGGGCACGGCCACCAGTACCCGAGCTGCACCAAGCAACCCAGACTCCACATCAGC---CTGTACCATATGGA 384
Oryza sat. AGO1 446 ~~~~~TGTTCCTTCAGGTTTCATCAAG---AACAGTTCCCGAGCTGCACCAAGCCACATGTCCAAT-----ACCAAGCCCCG 516
  
```



B

איור 20. (A) השוואת בסיסים חלקית בין ARGONAUTE-1 (AGO1) ששובט מקישוא (Squash), באזור אתר המטרה של miR168 (באיור מוצג miR168a מארבידופסיס באוריינטציה הופכית, ath-miR168a RC), לבין גנים דומים (לפי הסדר) מארבידופסיס, אפונה, גפן, *Nicotiana benthamiana* ואורז. בצהוב התאמה של יותר מ-62%. (B) ארגון התחלים (ראשי חצים שחורים) והפלסמידים (קווים כחולים) של sqAGO1. חץ אדום מסמל את אתר המטרה של miR168. קווים אדומים מסמלים את האזור המוגבר ב-Q-PCR.

ד.4. בדיקת הרמה המצטברת של ה-mRNA הבלתי-חתוכים של גני-מטרה של

miRNA נבחרים

כדי לבחון את ההשערה כי יהיו הבדלים ברמתם המצטברת של תעתיקי מטרה (target gene mRNA) פעילים בין צמחים מודבקים בוירוס האלים ZYMV^{FRNK} או בוירוס המוחלש ZYMV^{FINK}, עקב ההבדלים שנצפו בלכידה המשוערת של miRNA בידי HC-Pro, נערכו ניסויי כימות ב-Real-time PCR (Quantitative-, Q-PCR). לשם כך שובטו כאמור (סעיף ד.3.) כעשרה גנים מקישוא הדומים לגני- מטרה ידועים מא רבידופסיס, שאיפשרו בחירת תחלים ספציפיים וכיולם. התעתיקים כומתו ע"י שימוש בתחלים משני עברי אתר המטרה של miR-RISC (RISC משופעל ע"י ה-miRNA המתאים), כיוון שידוע שבצמחים קיימת בקרה שלאחר-שעתוק העשויה לגרום לחיתוך הגן באתר זה, ותעתיק חתוך אינו מוגבר בניסוי. אפשרות שניה המניבה תוצאה דומה היא בחירת תחל ל- cDNA מ-3' לאתר המטרה ושני תחלי Q-PCR מ-5' לאתר. בטיפולים נבחנו רמות התעתיקים השונים מעלי קישוא מצמחים לא מודבקים (H) לעומת צמחים מודבקים בוירוסים ZYMV^{FRNK} או ZYMV^{FINK} בשלוש נקודות זמן לאחר ההדבקה, 5, 7, ו-14 יום מהדבקה (dpi) המהווים את העלה האמיתי הראשון, השני והשלישי/רביעי בהתאמה.

ד.4.א. תנאי הניסוי

בבדיקות ה-Q-PCR היתה הקפדה יתירה על איכותם ואחידותם של דוגמאות ה-RNA (ע"י בדיקה באלקטרופורזה, ראה איור S1 בנספחים), על ריכוז RNA שווה שנלקח לטיפול DNase ועל ריכוז שווה של RNA מטופל DNase שנלקח ל-Reverse-transcription (RT) (ע"י קריאה בספקטרוטומטר Nanodrop) ועל ביצוע בו-זמני של כל אחד מהשלבים הנ"ל לכל הדוגמאות. השימוש בערכה של Ambion לניטרול ה-DNase איפשר גם להפחית יוני Ca⁺⁺ המעכבים PCR (על פי הצהרת היצרן).

ד.4.ב. נורמליזציה

באופן מפתיע נתגלה כי ישנו קושי אמיתי בנורמליזציה (reference-gene normalization) של תוצאות ה-Q-PCR. מקובל (Winer et al. 1999) לנרמל תוצאות של ניסויים אלו בעזרת

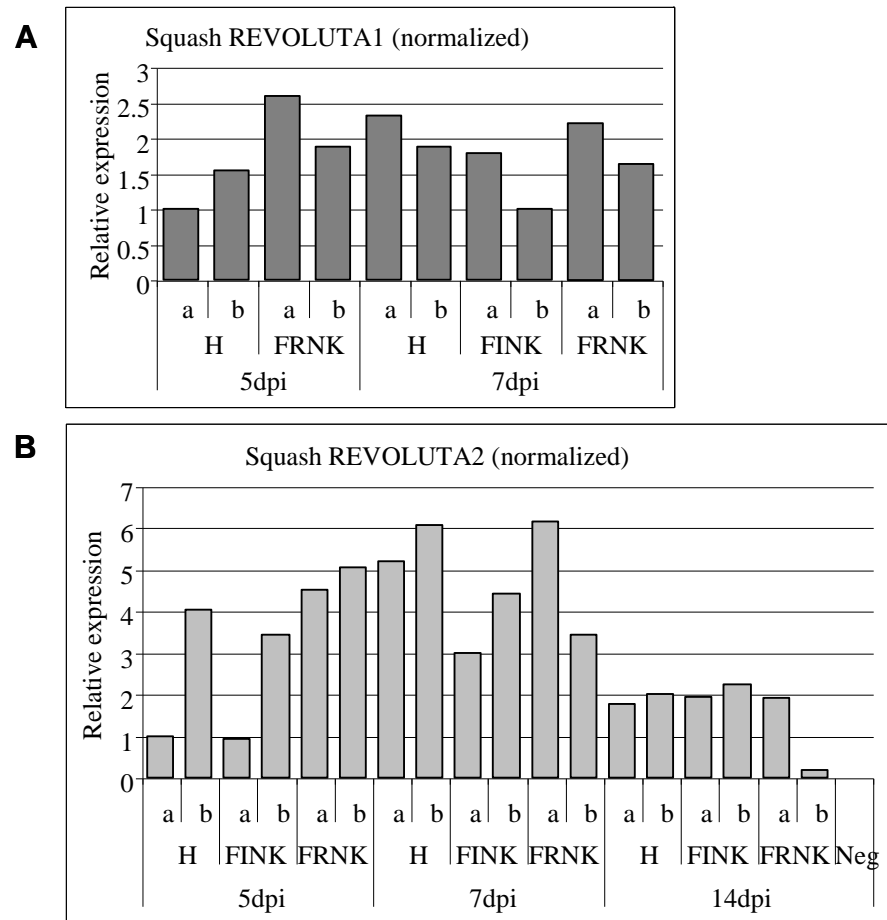
הפחתת הערכים המתקבלים עבור גנים שאינם משתנים עקב הטיפול הנבדק מקבוצה של גנים שנהוג לכנותם housekeeping genes. בקרה זו באה לוודא דיוק טכני ; לקיחת כמות RNA שווה ל- reverse transcription, לקיחת כמות cDNA שווה ל- Q-PCR ועילות ראקציות cDNA דומות. כמו כן, נורמליזציה מאפשרת להשוות בדיעבד בין ניסויים שנערכו בזמנים או בתנאים שונים. כאשר כל הניסוי נעשה בעת אחת, תוך הקפדה על דיוק כמותי וישנן חזרות ביולוגיות לטיפולים, בעצם הופכת הבקרה למיותרת והיא מזהה הבדלים ביולוגיים אמיתיים ולא ארטפקטים ניסויים. בניסיון למצוא גן שאינו משתנה בתנאי הניסוי שובטו מקישוא הגנים המקובלים Actin (שלד התא), Tubulin A (microtubuli), ו- Ubiquitin (סימון חלבונים לפירוק) וכמו כן שובט Cyclophilin (מחזור התא) הידוע כיציב בדרגות בשלות שונות של קליפת פרי מלון (קציר נ., ופורטנוי ו. תקשורת אישית). הסתבר שהרמה המצטברת של גנים אלו אינה יציבה בצמח מודבק ב- ZYMV בכל שלושת הזמנים שנבדקו בניסוי, אולי עקב שינויים גלובליים המתרחשים בהתבטאות גנים בצמחים נגועים בירוס. הגן היחיד שהיה ניתן לשימוש להשוואה בין צמח בריא ומודבק, במידה מוגבלת, היה Cyclophilin, שהרמות שלו היו יציבות יחסית, אבל רק ב-5 ימים לאחר הדבקה (תוצאה לא מוצגת, השווה תוצאות כימות ZYMV עם ובלי נורמליזציה באיור 3).

ד.ג.4. רמת תעתיק- גני-מטרה של miRNA166

ד.ג.4.1. גן המטרה REVOLUTA

נבדקה רמת ההצטברות של mRNA בלתי-חתוך של שני גנים מקישוא הדומים ל- REVOLUTA שכונו sqREVO1 ו-sqREVO2 (לרצף ומפה ראה איור 17). נבחרו תחלים ספציפיים לכל אחד מהם. התחלים של sqREVO2 מאגפים את אתר החיתוך המשוער של miRNA166, והתחלים של sqREVO1 תוכננו מ-5' לאתר בעוד ה-cDNA (לשניהם) נעשה עם תחל OdTVN הנקשר לזנב ה-polyA ב-3' של ה-mRNA. הספציפיות נבחנה על פלסמידים המקודדים לשתי הגנים ונמצאה מצויינת בתנאי ה-PCR בהם נעשה שימוש. התעתיק השלם של הגן sqREVO1 הצטבר ברמות נמוכות מאוד בעלים בכל הטיפולים (שתי חזרות ביולוגיות), ונע בין ערכי Cycle threshold (Ct) של כ-27-30 (הראקציה נמשכה ל-45 מחזורים). בערכי Ct כאלה, ובגלל מספר המחזורים החריג הדרוש, נפסלות

דוגמאות רבות בגלל הופעת פריימר- דימר. למרות זאת, ההבדלים הממוצעים שנצפו בין הטיפולים בראקציות התקינות לא היו מהותיים ולא הצדיקו המשך בדיקה של גן זה (איור 21A).



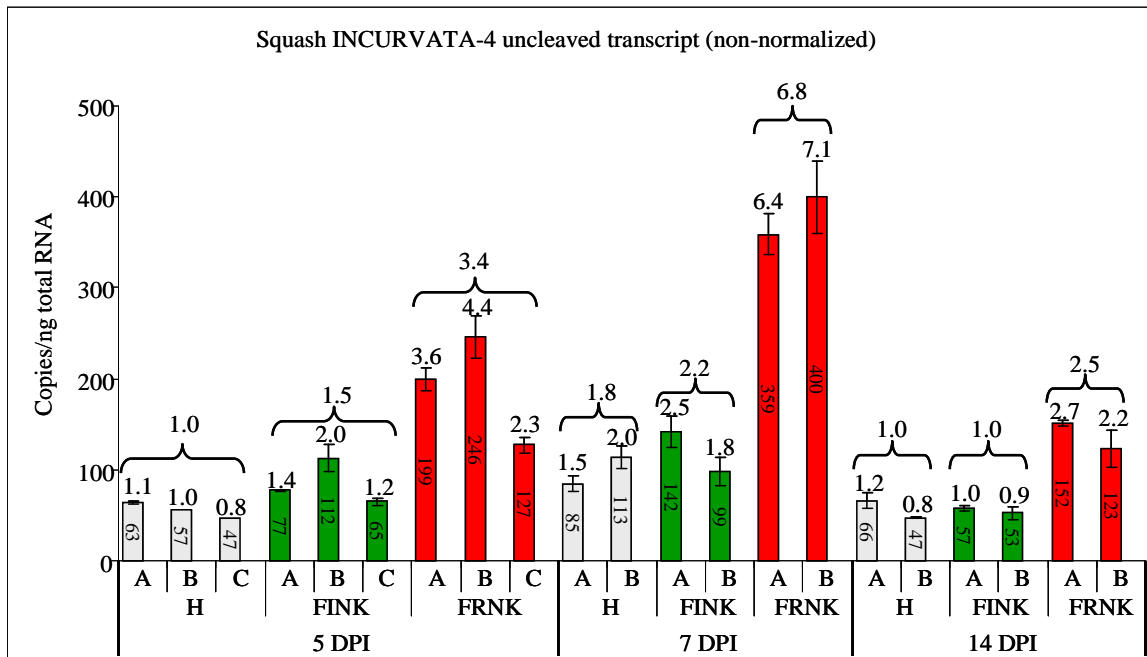
איור 21. מבחן RT-Q-PCR לכימות רמת mRNA בלתי חתוך של REVOLUTA1 (A), ושל REVOLUTA2 (B) מקישואים בלתי מודבקים (H), מודבקים בוירוס המוחלש (FINK) או בוירוס האלים (FRNK) בשלוש זמנים שונים לאחר הדבקה (dpi). התוצאות מנורמלות ל-Cyclophilin בשיטת $\Delta\Delta Ct$, ומוצגות ביחס (relative expression) לדוגמא הבלתי מודבקת של אחת משתי החזרות הביולוגיות (a,b).

התעתיק השלם של הגן sqREVO2 הצטבר ברמות גבוהות יותר מאלה של sqREVO1 ונע בטווח רחב בין ערכי Ct של 20-27. בניסוי זה לא הופיע פריימר- דימר ולא נפסלו דוגמאות. מהתוצאות עולה כי ישנם הבדלים של עד פי 4 בין החזרות הביולוגיות בתוך הטיפול מבלי שנראה הבדל מהותי בין הטיפולים וגם לגן זה לא נעשתה בדיקה מעמיקה יותר (איור 21B).

כיוון שלא ניתן להסיק מסקנות ברורות מרמת ה- mRNA של REVOLUTA, שובטו ונבדקו רמתם של תעתיקי גנים אחרים מאותה קבוצת HD-ZIP המבוקרים ע"י miR166, INCURVATA-4 ו-PHAVOLUTA.

ד.ג.4.2. גן המטרה INCURVATA-4

נבדקה רמת ההצטברות של mRNA בלתי-חתוך של גן מקישוא הדומה ל- INCURVATA-4 (CORONA, AthB-15) שכונה sqINCU. נבחרו תחלים ספציפיים ל- INCURVATA-4, המאגפים את אתר החיתוך המשוער של miRNA166, על סמך השוואת רצפיהם של כל חברי משפחת HD-ZIP כולל הרצפים ששובטו בעבודה זו מקישוא. חישוב כמות עותקי התעתיק השלם ל- ng total RNA נעשה ע"י הכנה של עקומת כיוול מסדרת מיהולים ארוכה של פלסמיד בריכוז מדוד ואורך ידוע. נמצא כי בעלה האמיתי הראשון, 5 ימים לאחר הדבקה, רמתו המצטברת הממוצעת של INCURVATA-4 לשלוש חזרות ביולוגיות היתה מעט נמוכה בצמחים בריאים (H, 56 עותקים ל- ng total RNA) מאלה המודבקים בוירוס המוחלש (FINK, 85 עותקים) אך רמתו בצמחים מודבקים בוירוס האלים (FRNK, 191 עותקים) היתה גבוהה פי 3.4 בממוצע (איור 22). בעלה השני, שבעה ימים לאחר הדבקה, נמצא שרמתו המצטברת בצמח הבריא (ממוצע של שתי חזרות ביולוגיות) היתה גבוהה מזו של העלה הראשון (99 עותקים), וגם כאן, כמו ביום החמישי, הדבקה בוירוס האלים גרמה לעליה פי 3.9 ברמתו (379 עותקים), בעוד הוירוס המוחלש לא גרם לעליה משמעותית (120 עותקים). 14 ימים לאחר הדבקה היתה רמתו של INCURVATA-4 בעלה הצמח הבריא דומה לזו שב-5 dpi (57 עותקים), דומה גם בצמח המודבק בוירוס המוחלש (55 עותקים), ובדומה לזמנים האחרים, גבוהה פי 2.5 בצמח המודבק בוירוס האלים (137 עותקים). מתוצאות אלה עולה כי רמתו המצטברת של התעתיק השלם של INCURVATA-4 עולה בתגובה להדבקה בוירוס המכיל HC-Pro עם מטען חיובי בתיבת FRNK.

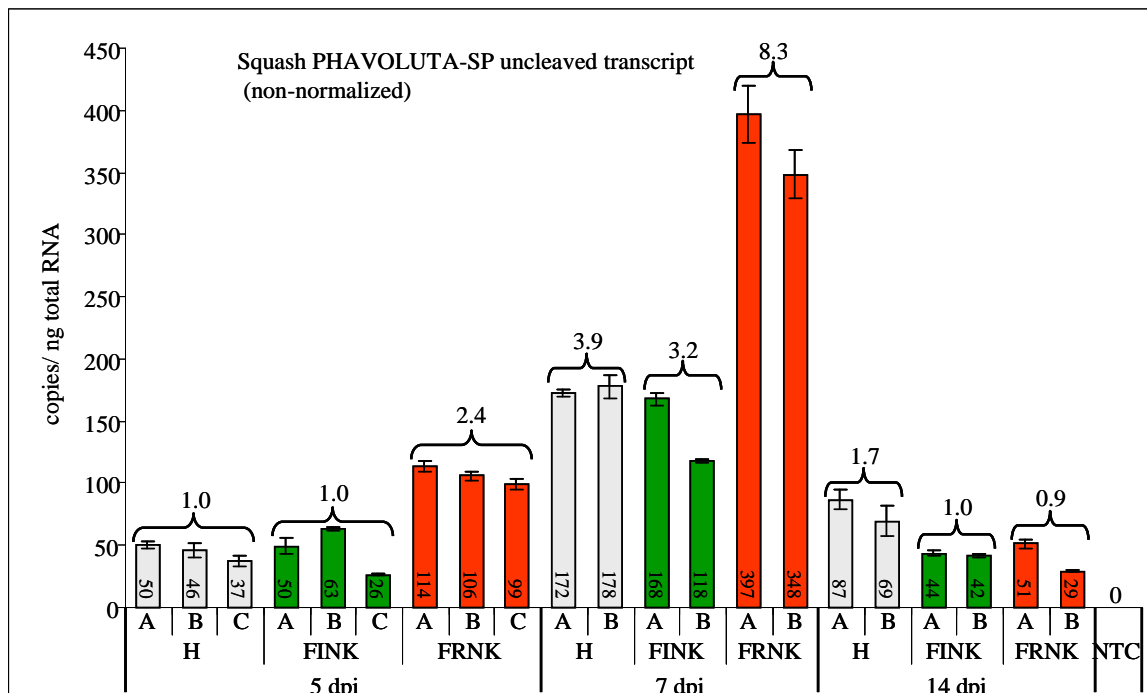


איור 22. מבחן RT-Q-PCR לכימות רמת mRNA בלתי חתוך של INCURVATA מקישואים בלתי מודבקים (H), מודבקים בירוס המוחלש (FINK) או בירוס האלים (FRNK) בשלוש זמנים שונים לאחר הדבקה (DPI), במספר חזרות ביולוגיות (A,B,C). בתוך כל עמודה מוצגים מספר עותקים/ng total RNA, ומעל העמודות הכמות היחסית של ערך זה ביחס לערך הממוצע (מעל הסוגריים) מצמח בריא 5 ימים לאחר הדבקה. מוט השגיאה מסמל את טווח שגיאת תקן הממוצעים (SEM) משלוש חזרות טכניות.

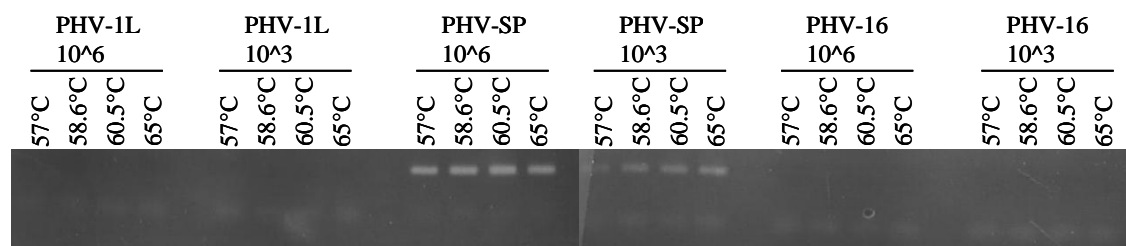
ד.ג.4. גן המטרה PHAVOLUTA

נמצאו שלושה גנים מקישוא הדומים ל- PHAVOLUTA שכונו sqPHV-16, sqPHV-1L ו- sqPHV-SP השונים במידה מועטה זה מזה בקטע המאגף את אתר החיתוך של miR166 (איור 16). בעזרת זוג תחלים ספציפיים המכילים כל אחד נוקל אוטיד Locked nucleic acid (LNA) קרוב לקצה 3' נבדקה רמת ההצטברות של mRNA בלתי-חתוך של sqPHV-SP (איור 23). ב-PCR, בעזרת בקורות עם פלסמידים המכילים את הקטע הרלוונטי מכל אחד משלושת הגנים (1×10^6 ו- 1×10^3 עותקים לראקציה, 34 מחזורים), הוכח כי התחלים מזהים אך ורק את אתר הרצף של sqPHV-SP כצפוי בכל טווח טמפרטורות ה-annealing שנבדק, מ-57°C ועד 65°C (איור 24). כמו כן, במהלך הניסוי עצמו (40 מחזורים ב-60°C) הוכנסו בקורות ב- 1×10^6 עותקים לראקציה והספציפיות היתה מוחלטת.

נמצא כי בעלה האמיתי הראשון , 5 ימים לאחר הדבקה , רמתו המצטברת הממוצעת של PHAVOLUTA לשלוש חזרות ביולוגיות היתה דומה בצמחים בריאים (H, 45 עותקים ל-ng total RNA) לבין אלה המודבקים בוירוס המוחלש (FINK, 46 עותקים) אך רמתו בצמחים מודבקים בוירוס האלים (FRNK, 106 עותקים) היתה גבוהה פי 2.4 בממוצע (איור 23). בעלה השני, 7 ימים לאחר הדבקה, נמצא שרמתו המצטברת בצמחים הבריאים (ממוצע של שתי חזרות ביולוגיות) היתה גבוהה מזו של העלה הראשון (175 עותקים), וגם כאן, כמו ביום החמישי, הדבקה בוירוס האלים גרמה לעלייה פי 2.1 ברמתו (373 עותקים), בעוד שבוירוס המוחלש רמתו היתה דומה לזו של צמחים בלתי מודבקים (143 עותקים). לעומת זאת, 14 ימים לאחר הדבקה, רמתו המצטברת של PHAVOLUTA ירדה בצמחים הבריאים ביחס לעלה השני (78 עותקים), ורמתו בצמחים המודבקים בוירוס המוחלש והאלים היתה אף נמוכה מכך והגיעה ל-55% ול-51% מערכו בהתאמה (43 ו-40 עותקים בהתאמה).



איור 23. מבחן RT-Q-PCR לכימות רמת mRNA של PHAVOLUTA-SP בלתי חתוך של מקישואים בלתי מודבקים (H), מודבקים בווירוס המוחלש (FINK) או בווירוס האלים (FRNK) בשלוש זמנים שונים לאחר הדבקה (dpi), במספר חזרות ביולוגיות (A,B,C). בתוך כל עמודה מוצגים מספר עותקים/ng total RNA, ומעל הסוגריים הכמות היחסית הממוצעת של ערך זה ביחס לצמח בריא חמישה ימים לאחר הדבקה. מוט השגיאה מסמל את טווח שגיאת תקן הממוצעים (SEM) משלוש חזרות טכניות.



איור 24. בדיקת ספציפיות התחלים המכילים LNA ששימשו ל-RT-Q-PCR של איור 23 ל-PHV-SP. גיל אלקטרופורזה של תוצרי PCR (33 מחזורים, בתערובת ראקציה של Q-PCR) לפלסמידים מהולים (מספר עותקי תבנית הפלסמיד /ראקציה מעל לקו) (ב-4 טמפרטורות annealing שונות. גודל התוצר 101bp).

יש דימיון מסוים בין רמת ההצטברות הכללית של התעתיק השלם של INCURVATA-4 ושל PHAVOLUTA, ששניהם מבוקרי- miR166, בטווח של בערך 400-50 עותקים ל- ng total RNA (טווח Ct של 18-22). יש דימיון גם בהשפעת הוירוסים האלים והמוחלש על הצטברות תעתיקים אלו, כאשר הוירוס המוחלש גורם לעליה קלה, אם בכלל, ברמה המצטברת והוירוס האלים גורם להצטברות של יותר מפי 2 ברמת התעתיק גם 5 ימים וגם 7 ימים לאחר הדבקה. לאחר 14 ימים מהדבקה ישנה ירידה ברמה הבסיסית של התעתיקים מהשיא של היום השביעי, והשפעת הוירוס האלים ניכרת רק על הצטברות INCURVATA-4, בדומה לזו המתרחשת בזמנים הקצרים יותר, אך לא על PHAVOLUTA.

ד.ד. גני-מטרה של miRNA159

רמתו המצטברת של mRNA בלתי-חיתוך של גן-מטרה חזוי אשר כונה sqUM159t נבדקה ע"י Q-PCR עם תחלים המאגפים את אתר החיתוך משני עבריו (ראה איור 14). cDNA לניסוי זה נעשה עם תחל odTVN. מניתוח התוצאות נמצא כי רמת הצטברותו בעלי קישוא היתה נמוכה מאוד (Ct ממוצע של כ-27) בכל הטיפולים, ולא נמצא הבדל ברמתו המצטברת בין צמחים בלתי מודבקים לבין צמחים מודבקים ב- ZYMV^{FRNK} ב-5, 7, או 14 ימים לאחר הדבקה (לא מוצג). נראה כי הגן שאופיין בעבודה זו אינו מושפע מהדבקה ב- ZYMV אך ידוע של-miR159 מספר גני-מטרה נוספים שלא שובטו מקישוא ולכן לא היתה אפשרות לבחון את רמתם.

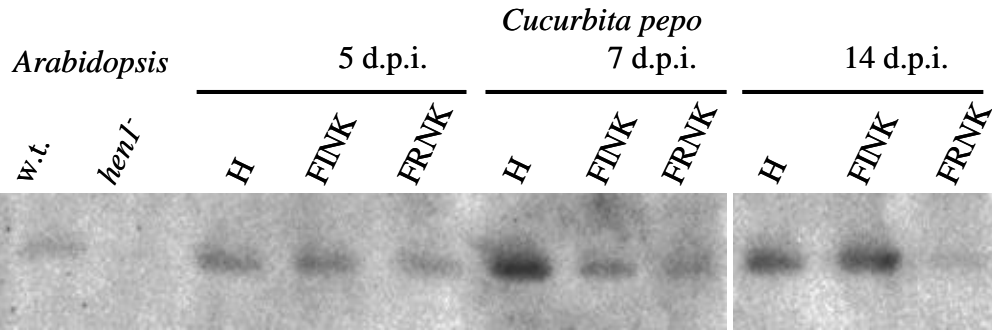
ד.ה. גני-מטרה של miRNA 319

נבדקה רמת ההצטברות של mRNA בלתי-חיתוך של גן-מטרה חזוי המכיל TCP4-domain ואתר משלים ל- miR319 אשר כונה sq5707. לגן זה דימיון לגנים CYCLOIDAE ו- LANCEOLATE שהם גורמי-שעתוק מעגבניה המהווים מטרה ל- miRNA 319. בניית תוצאות RT-Q-PCR (לא מוצג) נמצא כי רמתו בצמח אינה נמוכה (טווח Ct של 19.4-22.3) וכי התבטאותו יציבה יחסית לאורך זמן בעלים בלתי מודבקים. נמצא כי אין עליה ברמתו של sq5707 הקשורה להדבקה בוירוס 5 ימים לאחר הדבקה. 7 ימים לאחר הדבקה היו הבדלים גדולים בין החזרות הביולוגיות של FRNK מה שלא איפשר הסקת מסקנות מניסוי זה. ב-14

ימים מהדבקה היה הביטוי בצמח המודבק ב- ZYMV^{FRNK} גבוה מזה של הצמח המודבק
בירוס המוחלש שהיה זהה לרמתו של הצמח הבלתי-מודבק.

ד.4.ו. גני-מטרה של ta-siRNA

כאמור, מלבד miRNA, ישנם בצמח קבוצה נוספת של RNA זעירים המשמשים בצמח
לבקרה שלאחר שעתוק המכונים (ta-siRNA) trans-acting siRNA (Peragine *et al.*)
(2004). ta-siRNA מבקרים גני-מטרה באופן דומה משהו ל-miRNA אלא שהביוגנזה שלהם
שונה. תעתיקים יוצרי- ta-siRNA מהווים תבנית ליצירת RNA דו-גדילי (dsRNA) בידי
RdR6. dsRNA זה בסוף התהליך נחתך בידי Dicer ל-ta-siRNA ספציפיים באורך 21
בסיסים בעלי תפקידי בקרה על גנים אחרים. בעבודה זו נבדקה רמתו של TAS3-D7 שהוא
ta-siRNA שמקורו בתעתיק TAS3. TAS3 מהווה מטרה ל-AGO7-miR390 בשני אתרים
שונים, כאשר באתר הקרוב לקצה 3' מתבצע חיתוך ובאתר השני לא. חיתוך זה במקום
מוגדר מאפשר לאחר יצירה של dsRNA ע"י RdR6, חיתוך סדור וחוזרני ע"י DCL4 ל-
siRNA מוגדרים וקבועים. שניים מ-siRNA אלו שמקורם בגדיל + מכונים D7 ו-D8 ורצפם
זהה. TAS3-D7/D8 היא המולקולה הרגולטורית המוזנת ל- AGO7-RISC ומבקרת גנים
משפחת ה-Auxin response factors (ARF) לאחר שעתוקם (post-transcriptional)
(control) (Montgomery *et al.* 2008). סונטז גלאי LNA ל-TAS3-D7/D8 על סמך הרצף
מארבידופסיס ועגבניה (ע"י Pekker I., מכון וייצמן) שהוגב עם total RNA מקישוא, כמתואר
לניסויים השונים, ב-northern blot (איור 25).



איור 25. הצטברות ה-*TAS3-D7/D8 ta-siRNA* בעלי קישור. Northern-blot של RNA מצמחים בלתי מודבקים (H), צמחים מודבקים ב-*ZYMV^{FRNK}* (FRNK), וב-*ZYMV^{FINK}* (FINK) הוגבו עם גלאי LNA משלים ל-*TAS3-D7/D8*. 30 µg של total-RNA שהופק מ-8 צמחים לכל טיפול הוטענו לכל באר. ימים מהדבקה (dpi) מצויינים בראש התמונה. RNA מארבידופסיס מטיפוס הבר (w.t.) וממוטנט *hen1* הוטענו כבקורת.

התקבלה תוצאה כי הגלאי זיהה RNA בגודל המתאים בכל שלושת הטיפולים: צמח בריא (H), צמח מודבק בווירוס המוחלש (FINK), וצמח מודבק בוירוס האלים (FRNK), ובשלושת הזמנים 5, 7, ו-14 ימים לאחר הדבקה (dpi). בעלה האמיתי הראשון, 5 ימים לאחר הדבקה, לא היו הבדלים ניכרים בין הטיפולים. לעומת זאת, בעלה האמיתי השני, 7 ימים לאחר הדבקה, עלתה רמתו של D7/D8 בצמח הבריא ביחס ל-5 ימים לאחר הדבקה אך עליה זו עוכבה גם בצמחים המודבקים בוירוסים האלים וגם בוירוס המוחלש. לעומת זאת, ביום ה-14 לאחר הדבקה נראה הבדל משמעותי מאוד ברמתו של D7/D8 בין הווירוסים השונים, כאשר בצמח המודבק בוירוס האלים *ZYMV^{FRNK}* הרמה היתה נמוכה ביותר, אך גם בצמח הבריא וגם בצמח המודבק בוירוס המוחלש *ZYMV^{FINK}* היו רמות גבוהות. עלינו לזכור כי רמת הווירוס האלים עצמו גבוהה יותר ביום ה-14 לאחר הדבקה מזו של הווירוס המוחלש. מכאן שהווירוסים, אך במיוחד *ZYMV^{FRNK}*, מעכבים את הביוסיני תיזה או את הצטברותם של D7/D8. לאור הממצא כי כמותו של *ta-siRNA-D7/D8* יורדת בהדבקה בוירוס האלים היינו מצפים לראות עליה ברמתם של ARF עקב אובדן הבקרה שלאחר שעתוק. לבדיקת השערה זו בדקנו בעזרת RT-QPCR את רמתם של ARF3, ARF3A, ו-ARF4 ששובטו מקישוא ומכילים אתר מטרה ל-D7/D8 (ראה איור 19). התחלים, המאגפים את אתר המטרה של D7/D8, תוכנו באופן ספציפי כך שלא תהיה הגברה צולבת בין קרובי המשפחה השונים, דבר שאומת תוך שימוש בפלסמידים כתבנית. מהתוצאות עולה כי לא נראתה השפעה

ברורה על רמתם של התעתיקים הבלתי-חתוכים של גנים אלו בהדבקה בירוסים המוחלש או האלים. (תוצאות לא מוצגות).

ד.ז.4. גן מטרה של miR168 – Argonaute1

בשל חשיבותו הרבה של הגן ARGONAUTE-1 (AGO1) במערכת ההשתקה האנדוגנית ובמנגנוני ההגנה בפני וירוסים, בהיותו הרכיב החלבוני של RISC, היתה חשיבות לבדוק כיצד מושפעת בקרת רמת התעתיק שלו ע"י miR168-RISC באופן יסודי. כדי להבחין אם הדבקה בירוס גורמת לשינויים בבקרת השעתוק (DNA→RNA) או בבקרה שלאחר-שעתוק (post-transcriptional gene-silencing), בנוסף לבדיקת רמת הצטברות של mRNA הבלתי חתוך (תעתיק שלם), נבחנה גם רמתם המצטברת של מקטעים שאריתיים משני עברי אתר החיתוך של miR168-RISC (איור 26), תוצרי החיתוך "מקטע 3'" ו"מקטע 5'".

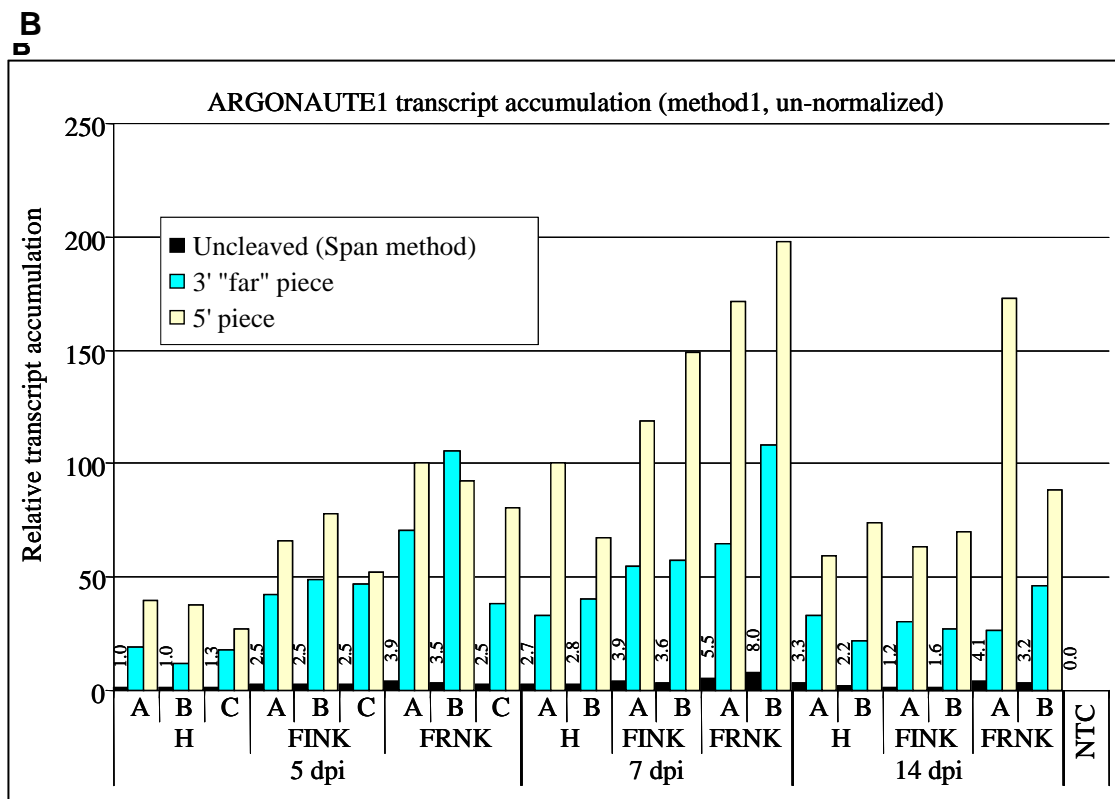
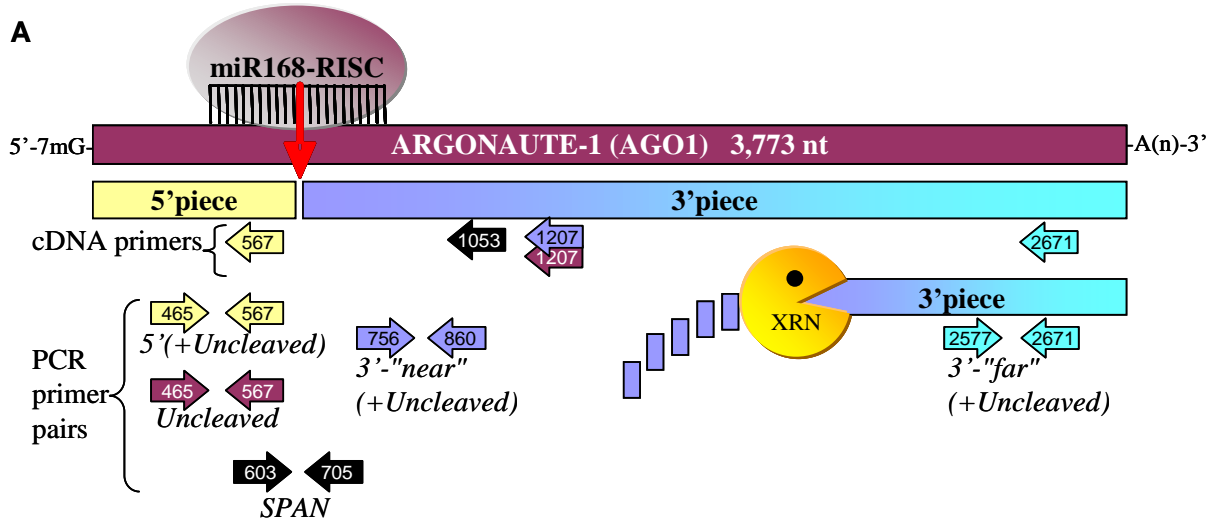
איור 26. הדבקה ב-ZYMV מגבירה את כמות תעתיק ARGONAUTE-1 ולא מונעת את חיתוכו. מבחן RT-Q-PCR לכימות תעתיקי AGO1 מקישואים בלתי מודבקים (H), מודבקים בירוס המוחלש (FINK) או בירוס האלים (FRNK) בשלוש זמנים שונים לאחר הדבקה (dpi), במספר חזרות ביולוגיות (A,B,C).

(איור A) תרשים סכימטי של ARGONAUTE1, אתר החיתוך של miR168-RISC (חץ אדום) והתחלים ששימשו למבחני RT-Q-PCR הכמותיים. תחלים (חצים ממוספרים, המספרים מייצגים חלק משם התחל) בצבעים דומים משייכים בין cDNA ל-Q-PCR הרלוונטי, וזהים לצבע העמודות הרלוונטיות בגרפים B ו-C. מתחת כל זוג תחלים ששימשו ל-Q-PCR מוצגים (באותיות נטויות) שמות התוצרים בהם נעשה שימוש בגרפים. באיור מוצגת גם סכימה בה הנוקלאזה XRN4 מעכלת מ-5' ל-3' את תוצר החיתוך של RISC "מקטע 3'".

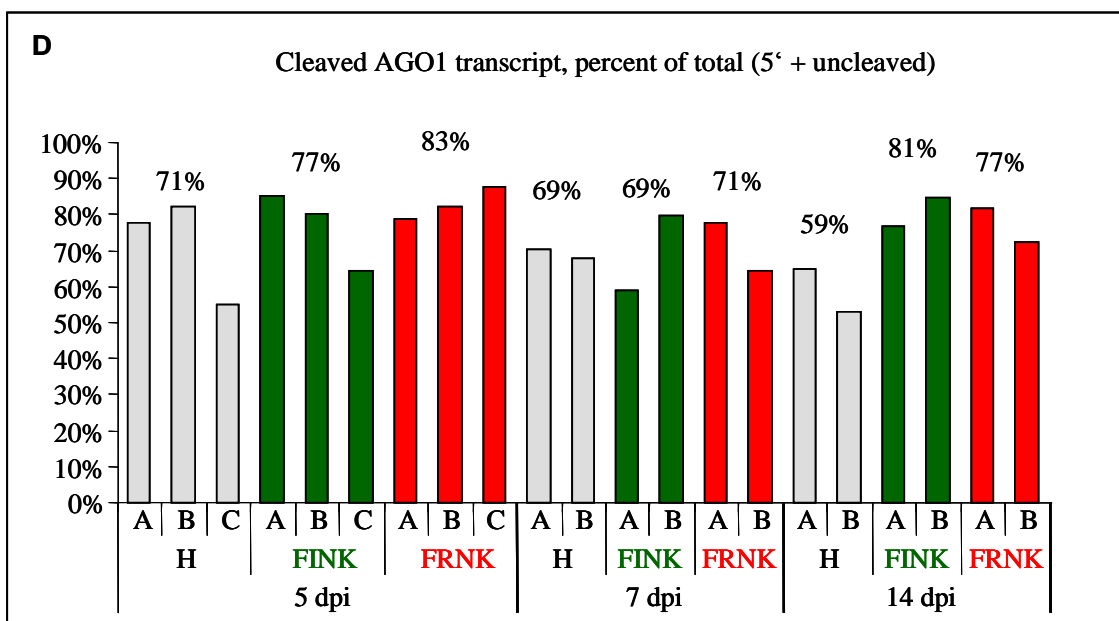
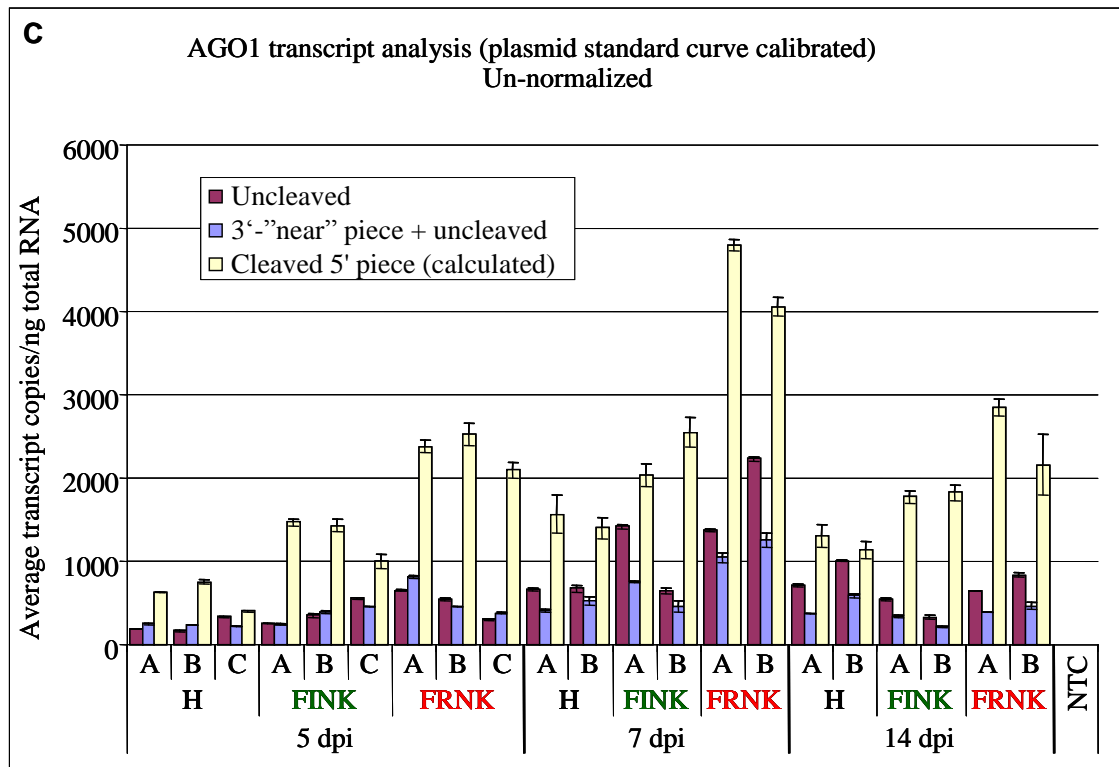
(איור B) הצטברות יחסית של תעתיקי AGO1 כפי שנמדדה ב"שיטה 1" (השיטה הראשונה), בניתוח בשיטת Ct², ובה נמדד כמות התוצר הבלתי חתוך ע"י זוג תחלי Q-PCR משני עברי אתר המטרה (עמודות שחורות, uncleaned). הרמות היחסיות של התוצר הבלתי חתוך מצויינות מעל העמודות. בניסוי זה נבחנה גם הכמות של תוצר "מקטע 3'" מרוחקת מאתר המטרה ("far"-3', עמודות תכולות), ושל תוצר "מקטע 5'" (5'-piece, עמודות צהובות).

(איור C) הצטברות מספר מוחלט של עותקי תעתיק AGO1 ל-total RNA ng כפי שנמדדה ב"שיטה 2" (השיטה השנייה, תחל cDNA מצידו הרחוק של האתר), בניתוח בעזרת עקומות כיוול, ובה נמדד התוצר הבלתי חתוך (Uncleaved, עמודות בצבע בורדו) ע"י זוג תחלים ששניהם מצד 5' של אתר המטרה אך ה-cDNA נעשה עם תחל מ-3' לאתר. בניסוי זה נבחנה גם הכמות של תוצר "מקטע 3'" הקרובה לאתר המטרה ("near"-3', עמודות סגולות-בהירות), ושל תוצר "מקטע 5'" (5'-piece, עמודות צהובות), מוצג לאחר הפחתה אריתמטית של כמות התוצר השלם). מוט השגיאה מסמל את טווח שגיאת תקן הממוצעים (SEM) Standard error of means משלוש חזרות טכניות.

(איור D) כמות התוצר החתוך מסך התוצר מחושב מאיור C, באחוזים.



איור 26 A ו-B (ראה תיאור למעלה)

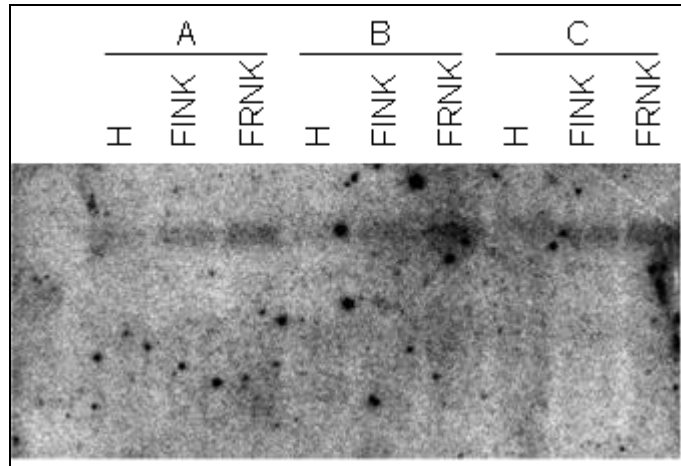


איור 26 C ו-D. (ראה תיאור למעלה)

רמת התעתיק השלם נבחנה בשתי דרכים, ע"י תחלים מאגפים משני עברי אתר החיתוך ("שיטה 1", איור 26B), או לחלופין ע"י יצירת cDNA מתחל הנמצא 3' לאתר החיתוך ו-PCR עם תחלים הנמצאים שניהם 5' לאתר ("שיטה 2", איורים 26C, D). בשיטה השניה אפשר היה להשוות בעזרת זוג תחלי Q-PCR אחד גם את רמת התעתיק השלם וגם את זו של המקטע החתוך מצד 5', כאשר התבניות לראקציה נוצרות משתי ריאקציות ו-1 ליצירת

cDNA, האחת עם תחל הממוקם 5' לאתר החיתוך (המודדת את כמותו של מקטע 5' ועוד כמותו של התעתיק הבלתי חתוך) והשניה עם תחל הממוקם 3' לאתר החיתוך (המודדת רק את התעתיק הבלתי חתוך). שיטה זו מאפשרת לנטרל מקור שונות העשוי לנבוע מעילות ראקציה שונה, ומהצטברות תוצרי לוואי דו-גדיליים שונה, של תחלים שונים ב-PCR. בניסוי זה נעשתה עקומת כיוול של הראקציה בעזרת סדרת מיהולים עשרונית של הפלסמיד pTZ-44AGO המכיל מקטע מהגן sqAGO1. התקבלה יעילות ראקציה של 94% (100%= הכפלה מלאה של תוצרי ה-PCR בכל מחזור) ששימשה לחישוב מספר עותקים מוחלט ל-ng total-RNA. לבחינת הצטברות המקטע 3' נעשה cDNA ו-PCR עם תחלים הנמצאים שלושתם מ-3' לאתר החיתוך. יעילות ראקציה זו היתה 96%, וגם כאן הכיוול נעשה עם אותו פלסמיד כפי שנעשה לעיל.

הצטברות התעתיק השלם: מניתוח התוצאות של השיטה השניה (איור 26C), אך גם בשיטה הראשונה (26B), עולה כי רמת התעתיק השלם של AGO1 בצמחים בלתי מודבקים בוירוס (H) עולה בעלה האמיתי השני והשלישי ביחס לעלה הראשון. הדבקה בוירוס המוחלש ZYMV^{FINK} גרמה לעליה ממוצעת של פי 1.7 (פי 2.2 בשיטה הראשונה) ביחס לעלה הבלתי מודבק (3 חזרות ביולוגיות) 5 ימים לאחר הדבקה, אך ההבדלים בין החזרות הביולוגיות היתה גדולים מהבדל זה. הדבקה בוירוס האלים ZYMV^{FRNK} גרמה לעליה ממוצעת של פי 2.2 (פי 3 בשיטה הראשונה) 5 ימים לאחר הדבקה, אך גם כאן השוני בין החזרות הביולוגיות היה גדול. הדבקה ב-ZYMV^{FINK} גרמה לעליה ממוצעת של פי 1.5 (פי 1.4 בשיטה הראשונה) 7 ימים מהדבקה (2 חזרות ביולוגיות) והדבקה ב-ZYMV^{FRNK} גרמה לעליה ממוצעת של פי 2.7 (פי 2.5 בשיטה הראשונה) אך גם כאן השוני היה גדול כאמור. 14 ימים לאחר הדבקה נצפתה דווקא ירידה מסויימת ברמת AGO1 השלם בעקבות הדבקה בוירוס אך גם כאן השוני היה גדול כנ"ל. תוצאה דומה ביום החמישי מהדבקה, בה רמת התעתיק גבוהה בהדבקה בוירוס האלים נתקבלה גם ב-northern blot שנעשה מדגימות שנלקחו 5 ימים לאחר הדבקה לשלושת החזרות הביולוגיות (איור 27). הגלאי בניסוי זה היה pTZ-44AGO (ראה איור 26) וכיסה גם את אתר המטרה וגם את "מקטע 5'" ואת "מקטע 3'" - "near"-3' אך לא את מקטע "far"-3'. בניסוי נראה רק התעתיק השלם כבנד יחיד ומכאן שאפשר ששאר המקטעים מצויים באוסף של אורכים שונים.



איור 27. הצטברות תעתיק ARGONAUTE-1 בעלי קישוא 5 ימים לאחר הדבקה . Northern-blot של RNA מצמחים בלתי מודבקים (H), צמחים מודבקים ב- ZYMV^{FRNK} (FRNK), וב- ZYMV^{FINK} (FINK) ב-3 חזרות ביולוגיות (A,B,C). הממברנה הוגבה עם גלאי DNA משלים ל-sqAGO1. 20 µg של total-RNA שהופק מ-8 צמחים לכל טיפול הוטענו לכל באר.

הצטברות "מקטע 5'":

רמתו של "מקטע 5'" השאריתי המתקבל ב-Q-PCR מהווה את הסכום של ה-mRNA השלם ועוד השארית החתוכה . מניתוח התוצאות נראה כי רמת התעתיק החצוי (תעתיק שנחתך באתר המטרה) של AGO1, כפי שנמדד בקצה 5' , ולאחר הפחתת תרומת התעתיק השלם לסיגנל, גבוהה באופן בולט מרמת התעתיק השלם בכל תשע הטיפולים על חזרותיהם (בממוצע פי 3.8) (איור 26C). רמתו של "מקטע 5'", בדומה לרמתו של התעתיק השלם , עלתה גם בצמח בלתי מודבק בוירוס בעלה השני ביחס לרמתו בעלה הראשון . במודגש, רמתו של "מקטע 5'" בצמח מודבק בוירוס האלים ZYMV^{FRNK} הייתה גבוהה מרמתו בצמח בלתי מודבק בכל החזרות , ורמתו בצמח מודבק בוירוס המוחלש ZYMV^{FINK} הייתה רמת ביניים בשלושת הזמנים על חזרותיהם . היחס בין כמות תעתיק "מקטע 5'" החצוי לכמות התעתיק השלם השתנה בין פי 8.3 לבין פי 2.2 ללא תלות כלשהי בהדבקה בוירוס (איור 26D). מכאן ניתן להסיק כי רוב התעתיק (בין 59% ל-83% בממוצע) גם בצמחים נג ועים בוירוס וגם בצמחים בריאים מצטבר בתא במצב חתוך בכל עת . מכאן שהדבקה בוירוס האלים גורמת לעליה גדולה ברמתו המצטברת של התעתיק החתוך ללא הפחתה (או אף

עליה מסויימת) ברמתו של התעתיק השלם, וכי לוירוס המוחלש השפעת ביניים על תהליך זה.

הצטברות "מקטע 3'":

מניתוח התוצאות נראה כי רמת התעתיק החצוי של AGO1, "מקטע 3'", כאשר זה נמדד קרוב לאתר החיתוך ("near"-3', ראה סכימה באיור 26A), לפני הפחתת הערך של התעתיק השלם, היה דומה או אף נמוך מעט מזה של התעתיק השלם. מכאן כי כמותו לאחר ההפחתה היא אפס. תוצאה שלילית (לאחר ההפחתה) עשויה לנבוע מהבדלים בין יעילותם של התחלים השונים ומהצטברות שונה של תוצרי לוואי דו-גדיליים. בניסוי אחר, על אותו RNA (איור 26B), שנערך על "מקטע 3'" הרחק מאתר החיתוך וקרוב לקצה 3' של הגן (-3' "far", ראה סכימה באיור 26A) נמצא כי רמתו גבוהה באופן משמעותי מרמת התעתיק השלם בכל הטיפולים, נמוכה מעט (בד"כ) מרמת "מקטע 5'", ורמתו עולה בעלה השני ובעת הדבקה בוירוס בדומה ל-"מקטע 5'". מכאן ניתן להסיק כי אפשר שהדגרדציה של "מקטע 3'" מהירה מזו של "מקטע 5'" ומתבצעת מ-5' ל-3' (ראה סכימה באיור 26A). כמו כן תוצאה זו תומכת בהשערה כי רמת השעתוק (DNA→RNA) של הגן AGO1 מוגברת בהדבקה בוירוס וכי הוירוס אינו מונע את חיתוכו המשוער של גן זה ע"י RISC. היחס של רמה זו לרמת התעתיק השלם משקפת את שווי המשקל בין יצירת תעתיק חדש, חיתוכו ע"י RISC ודגרדציה של המקטעים הנלווים. מכאן, שרמה זו יכולה לרמז על רמת התעתיק הבסיסי ועל קצב החיתוך של RISC. מכאן שבניגוד להשערה כי HC-Pro מעכב חיתוך של גני מטרה, מסתמנת תמונה אפשרית שבה לא רק שאין פחיתה ברמת החיתוך של תעתיק AGO1, אלא שהצמח מפצה בהצלחה על התחרות בין AGO1 לבין HC-Pro על microRNA ע"י ייצור יתר של תעתיק AGO1 ובנוסף, גורם להצטברותו של miR168 לשם בקרתו (לעליה ברמת miR168 ראה איורים 11B ו-12).

דיון ומסקנות

תסמיני מחלה ויראלית בצמח הינם מגוונים ועשויים לנבוע מגורמים רבים . קבוצה חשובה של תסמינים נובעת מאובדן רגולציה בהתפתחות האיברים הדומה לזו המתרחשת כאשר פוגע ים במערכת הבקרה המבוססת- RNA. דוגמא לתסמין דמוי- ויראלי שפוענח הוא הפנוטיפ *wiry* בעגבניה ובו העלים הם חוטיים עקב אובדן הבקרה על פולריות העלה . פנוטיפ זה נובע מפגיעה ברכיבים שונים (RDR6, ARGONAUTE7 או- SGS3) הדרושים ליצירתו/פעילותו התקינה של TAS3 ta-siRNA המבקר את רמתם של Auxin-response factors (Pekker et al.) (2007; Eshed et al. 2005).

בעבודה הנוכחית נעשה ניסיון לבסס קשר בין חלבון ה- RSS הויראלי HC-Pro, תסמיני המחלה הויראלית לבין מערכת הבקרה המבוססת RNA. לראשונה, זהו חומצות אמיניות טעונות חיובית בתיבת FRNK של חלבון HC-Pro בוירוס ZYMV המשפיעות על הופעת התסמינים ועל עוצמת הקישור של החלבון ל-siRNA-duplex ול-miRNA/miRNA* duplex, שהם רכיבים של מערכת בקרה זו. תיבת FRNK שמורה מאוד בכל הוירוסים מקבוצת ה- *Potyvirus* שרופו (איור 28). רק בארבע וירוסים מקבוצה זו (מ-44) ישנם שינויים בתיבת FRNK והשינויים משמרים תמיד את המטען החיובי (K/R) ואת ה' אמינית הארומטית (F/Y) ואת מיקומם. ממצא זה מחזק את ההשערה כי למטען ולח' הארומטית חשיבות לפעילותו של HC-Pro. תיבת ה-FRNK נמצאת בקצהו השמאלי של מתחם שמור מוגן- טריפסין בתוך אזור שהוגדר "קושר RNA חד גדילי A" (Plisson et al. 2003). הפחתת מטען התיבה, ע"י המוטציה FINK (R₁₈₀I) ב-ZYMV (Gal-On and Raccah 2000) גורמת לפחיתה קיצונית באלימות הוירוס והחלשה , עד כמעט העלמות, של רוב התסמינים (איור 2), בלא השפעה מהותית על חיוניות הוירוס (איורים 3, 4). ידועות מוטציות באתרים אחרים ב-ZYMV המחלישות את התסמינים, האחת לא רחוקה מאתר FRNK, F₂₀₅L, השניה קרובה לקצה ה- C' טרמינלי, Q₃₆₉D (Lin et al. 2007b). גם בוירוסים אחרים בקבוצת ה- *Potyvirus* נמצאו מוטציות היכולות להאיר אתרים חשובים ב- HC-Pro. בוירוס *Plum pox virus* (PPV) המוטציות K₁₀₇Q ו-S₂₃₁G באזור המרכזי משפיעות על חומרת תסמינים בלא השפעה על הצטברות הוירוס בצמח (Saenz et al. 2001).

| | | a + + | + | + | + | a a + + + aa | aa |
|--------|-----|---------------------------------------|------|------------|-------------------|-------------------------|-------------------------|
| ZYMV | 144 | LVTQDELDAALKQLLEMTQWFRNHMHLTGEEALM | FRNK | box | SKAMINP | SLCDNQLDKNGNFWG | RGYHSKRFLKKNFEE 223 |
| BCMNV | 145 | SATQEDLKKASEQLLAMTRWVKNHMTLTNEDALKT | FRNK | RSSKALINP | SLCDNQLDRNGNFWG | RGYHSKRFFENFEE 224 | |
| BCMV | 145 | SVTQEEELDALSQLKMTQWKNHMSLTEIDPLKS | FRNK | RSSKALLNP | SLCDNQLDKNGNFWG | RGYHSKRFFSNFED 224 | |
| BYMV | 145 | SLSNEEVGGASKHLLLEVRYIRNRDTSQRNDLSK | FRNK | ISSKTHVNL | DLCDNQLDKNANFWG | QRAYHAKRFLSNYFN 224 | |
| BtMV | 145 | TATPSEISDASGLLEITRFWNHLSVIDKGLSLA | FRNK | RSSKALVNP | SLCDNQLDKNGNFWG | RGYHSKRFFASHED 224 | |
| ChiVMV | 145 | RATSEEFSRASDCLLELARFHKNRVESLKKGSLHL | FRNK | VTSKSHINP | SLMCDNQLDANGNFWG | KRGYHAKRFFSNYFE 224 | |
| CIYVV | 145 | SLTNDDEVGASASLLEITRYIRNRDTSQRNDLSK | FRNK | ISSKTHINL | DLCDNQLDKNANFWG | QRAYHAKRFLSNYFN 224 | |
| CSV | 145 | VSDAEKCIDISKNLLLVANFIKNRDGLVRGDVVK | FRNK | ISNKAHVNP | VLCDNQLDANGNFWG | RGSHHAKRFFDNFYM 224 | |
| CABMV | 144 | SASKQELDQALKQLLAMTQWKNHMDLTGEDALKT | FRNK | RASKAILNP | SLCDNQLDKNGNFWG | RGYHSKRFFSNFEE 223 | |
| DVY | 147 | RLSSEDFSKTKSLLOVVRWVKNRDTSIKQNDLSK | FRNK | ISSKALINP | SLMCDNQLDKNGNFWG | RGYHAKRFFNNFEE 226 | |
| DsMV | 146 | TVSQADLDKASQQLLHMTQWFKHLSLIGEGNLES | FRNK | RASKALLNP | SLCDNQLDKNGNFWG | RGYHSKRFFSNYFE 225 | |
| EAPV | 145 | SVTQEEELDQATKQLLEMTRWVKHMHMLTDEDALRV | FRNK | RSSKALLNP | SLCDNQLDRNGNFWG | RGYHAKRFFANFEE 224 | |
| JYMV | 146 | SATAEELSEATRNLLEIVRYLKNRTESEKGTLKT | FRNK | TSOKAHLNP | ALMCDNQLDANGNFWG | RGYHAKRFFNKYFE 225 | |
| JGMV | 149 | VSDQLQMVSVGQNLLEIAKWFSKRHKAGPSSDDLSTY | KNK | VAARGVVG | NALMCDNQLDKNGD | ELWQRAYHAKRFLSNFYD 228 | |
| KoMV | 144 | RSSQEDLSDATKALLEVARWFKNRKEGIESGSAVA | FRNK | ISSAKTQINP | TLCDNQLDEG | GNFWG | RGYHAKRFFNNYFE 223 |
| LYSV | 144 | SISSPAIQRLODDLEEVRYTKKRTSSIDRDELQHY | FRNK | IASKTHFN | LDLCDNQLDKNGNFWG | RGYHAKRFFLNFD 223 | |
| LMV | 146 | QATSDEMAQASNHVLEIARYFKNRNTEIKGSLK | FRNK | ISSKAHLNP | SLMCDNQLDKNGG | FEWQORYHAKRFFDGYFE 225 | |
| LMoV | 146 | DMSNLEIYECSDCIRELARFQKNRDNIKKGLDVS | FRNK | RSSKASYFN | NLLMCDNQLDKNGNFWG | RGYHAKRFFANFEE 225 | |
| MDMV | 148 | TLTPSDALKASAALEELSRWYKNRKESTKEDNLST | FRNK | ISPKSTIN | LALMCDNQLDSNGNFWG | KREYHAKRFFSNYFE 227 | |
| OYDV | 148 | VMSTEQELALSNLKSLLTWYKRLLEAQVGDLS | FRNK | ISAKTHIN | LALMCDNQLDVNG | TFWQORYHAKRFFEKYFI 226 | |
| PLDMV | 147 | KLVSEDFEASDQQLLELTVRWHKNRSDSFKKGIH | FRNK | RSSKALQFN | FALMCDNQLDKNGNFWG | RGYHAKRFFANFEE 227 | |
| PRSV | 145 | LATGYEFERASNSLREIVRWHLKRTESIKAGSVES | FRNK | RSSKKAHFN | PALCDNQLDKNGNFWG | RGYHAKRFFANYFE 224 | |
| PSbMV | 147 | GSSSTLEWESMNESELELARWHNKRTEIASSGISS | FRNK | ISAKAQIN | FALMCDNQLDRNGNFWG | RGYHAKRFFSEFYT 226 | |
| PeMoV | 145 | VATSEEFSDATQQLLEVTFRWYAKHLSLVDGESS | FRNK | RSSKSLINP | SLCDNQLDRNGNFWG | RGYHAKRFFNNYFE 224 | |
| PepMoV | 144 | ENTSGEWLTARQHLRELVRQKNRDNIKKGDLSA | FRNK | LSARAQYN | LYLSCDNQLDKNAS | FLWQORYHAKRFFLNFPQ 223 | |
| PTV | 144 | QNRPEQWQDAFDDRELVRQKNRDNIKKGDITAF | FRNK | LSKANYN | LYLACDNQLDKNAN | FLWQORYHAKRFFTKFQ 223 | |
| PPV | 146 | MMSAQDYIEASDHLRELARYQKNRNTEIRSGSIKA | FRNK | ISSKAHVNM | QMLMCDNQLDRNGNFWG | RGYHAKRFFRNYFD 225 | |
| PVA | 145 | RATPEQLGSASAHLEITRFVNRDNIKKGSLAL | FRNK | ISSAKAHVN | TALMCDNQLDRNGNFWG | RGYHAKRFFSNYFD 224 | |
| PVV | 144 | QNRPDQWKEAFEALELAWFQKNRTRNIKKGNLAA | FRNK | LSKANIOY | VLSLCDNQLDQEC | FPVPEGTPCYKIFHKFQ 223 | |
| PVY | 144 | ENTAHWEVQAQLSLELARFQKNRDNIKKGDLSA | FRNK | ISSKANWN | LYLSCDNQLDKNAN | FLWQORYHAKRFFSNFEE 223 | |
| SVY | 145 | QASSLEFSEATKNLLEIARYLNRNTEIEKGSLSK | FRNK | ISSKSHIN | TALLCDNQLDKNGNFWG | RGYHAKRFFSNYFE 224 | |
| SYSV | 147 | LVCNDETEAALKQLLELTNWYRKRLEAQMGGLES | FRNK | ISSKTHIN | LALMCDNQLDVNGM | FEWQORYHAKRFFLANYFT 226 | |
| SrMV | 148 | TLKVEEAVKASASLLEISRWYKNRKESKEDTLGS | FRNK | ISSPKSTI | KMALMCDNQLDSNGD | ELWQORYHAKRFFNTYFE 227 | |
| SMV | 145 | SVTQSELEQASKQLLAMTQWKNHMTLTDEDALKV | FRNK | RSSKALLNP | SLCDNQLDKNGNFWG | RGYHAKRFFANYFE 224 | |
| SCMV | 148 | TLTPDDAVKASVALLEVARWYKNRKESLKTDTLDS | FRNK | ISPKSTIN | AALMCDNQLDKNAN | FWGNREYHAKRFFANYFE 227 | |
| SPFMV | 146 | RAKPDDELKASENLEELARYLKNRTEINRNGSLK | FRNK | ISSKSSVN | LALMCDNQLDKNGN | FLWQORYHAKRFFANYFD 225 | |
| TFV | 147 | EATNADLFEMATHHLEIVTRYLKNRDTIAESKTAR | FRNK | RSSKAKTH | FNADLCDNQLDKNGN | FLWQORYHAKRFFLLNYFE 226 | |
| TEV | 147 | KLTGADLEEAETHMLEIARFLNRRNTEINRIGHLS | FRNK | ISSKAHVNM | LALMCDNQLDQNGN | FLWQORYHAKRFFLKGFT 226 | |
| TVMV | 145 | RANPDSLAKASDLSLEELARYLNNRTEINRNGSLK | FRNK | ISSKAHSN | LALS | CDNQLDQNGN | FLWQORYHAKRFFLNNYFE 224 |
| TuMV | 146 | TVTGEEFSQATKHLLEIARYLKNRTEIEKGSLSK | FRNK | ISSKAHIN | P | TLCDNQLDRNGN | FLWQORYHAKRFFSNYFE 225 |
| WMV | 145 | SVTQDELERASRQLLAMTQWKNHMHMLTDEDALKV | FRNK | RSSKALLNP | SLCDNQLDRNGNFWG | RGYHAKRFFANYFE 224 | |
| WPMV | 144 | QNGPEQWQDAFNALRELARFQKNRDNIKKGDIA | FRNK | LSKANYN | LYLACDNQLDKNAN | FLWQORYHAKRFFTKFQ 223 | |
| WVMV | 145 | SVSQADLEQASKQLLAMTQWKNHMTLTNEDALKV | FRNK | RSSKALLNP | SLCDNQLDKNGNFWG | RGYHAKRFFSNYFE 224 | |
| YMV | 146 | ELKRTDLERASTLVLELARYHRNRTENIKKGLSVS | FRNK | RSSKAKTHIN | TALMCDNQLDANGN | FMWQORYHAKRFFSTQK 225 | |

איור 28. תיבת FRNK שמורה ב-Potyviruses. השוואת רצפים באזור המרכזי של HC-Pro מארבעים וארבע Potyviruses שונים. תיבת FRNK ושתי אזורים סמוכים עשירים בחומצות אמיניות טעונות חיובי (+) או ארומטיות (a) מודגשות בקו. מודגשות בשחור ח' אמיניות שרמת הדמיון ביניהן מעל 80%. מספור הוא מהח' אמינית הראשונה של כל HC-Pro.

Zucchini yellow mosaic virus gi|118566318 (ZYMV); *Bean common mosaic necrosis virus* gi|25013913 (BCMNV); *Bean common mosaic virus* gi|25013490 (BCMV); *Bean yellow mosaic virus* gi|25013500 (BYMV); *Beet mosaic virus* gi|40254030 (BtMV); *Chilli veinal mottle virus* gi|45004657 (ChiVMV); *Clover yellow vein virus* gi|25013510 (CIYVV); *Cocksfoot streak virus* gi|25014039 (CSV); *Cowpea aphid-borne mosaic virus* gi|25013520 (CABMV); *Daphne virus Y* gi|96980663 (DVY); *Dasheen mosaic virus* gi|25013784 (DsMV); *East Asian passiflora virus* gi|85539887 (EAPV); *Japanese yam mosaic virus* gi|25013883 (JYMV); *Johnsongrass mosaic virus* gi|25013809 (JGMV); *Konjak mosaic virus* gi|90093254 (KoMV); *Leek yellow stripe virus* gi|25013893 (LYSV); *Lettuce mosaic virus* gi|25013530 (LMV); *Lily mottle virus* gi|39163617 (LMoV); *Maize dwarf mosaic virus* gi|25013540 (MDMV); *Onion yellow dwarf virus* gi|32493289 (OYDV); *Papaya leaf-distortion mosaic potyvirus* gi|32493279 (PLDMV); *Papaya ringspot virus* gi|25013550 (PRSV); *Pea seed-borne mosaic virus* gi|25013560 (PSbMV); *Peanut mottle virus* gi|25013833 (PeMoV); *Pepper mottle virus* gi|25013570 (PepMoV); *Peru tomato mosaic virus* gi|28519942 (PTV); *Plum pox virus* gi|25013580 (PPV); *Potato virus A* gi|25013590 (PVA); *Potato virus V* gi|25013850 (PVV); *Potato virus Y* gi|25013600 (PVY); *Scallion mosaic virus* gi|25013997 (SVY); *Shallot yellow stripe virus* gi|76803358 (SYSV); *Sorghum mosaic virus* gi|25013823 (SrMV); *Soybean mosaic virus* gi|25013610 (SMV); *Sugarcane mosaic virus* gi|25013620 (SCMV); *Sweet potato feathery mottle virus* gi|25013774 (SPFMV); *Thunberg fritillary virus* gi|68989219 (TFV); *Tobacco etch virus* gi|25013634 (TEV); *Tobacco vein mottling virus* gi|25013639 (TVMV); *Turnip mosaic virus* gi|25013650 (TuMV); *Watermelon mosaic virus* gi|51949948 (WMV); *Wild potato mosaic virus* gi|25141239 (WPMV); *Wisteria vein mosaic virus* gi|116723233 (WVMV) and *Yam mosaic virus* gi|48249198 (YMV).

סינרגיה (synergism) בין וירוסים היא התופעה בה הדבקה בו זמנית של שני וירוסים גורמת לעליה ברמתו ואלימותו של אחד מהם ביחס להדבקתו לבדו . אובדן בו זמני של סינרגיה (RNA-silencing) עם *Potyvirus / Potato virus X* (suppressor, RSS) נקשרו למוטציה L₁₃₄H ב-PPV (González-Jara *et al.* 2005), ואובדן בו זמני של RSS וסינרגיה עם *Comovirus* נמצאו גם ב-*Soybean mosaic virus* (K₁₄₂I) וב-TEV (K₁₄₄I) (Ghabrial and Zhang 2005). לכן, אפשר שסינרגיה היא מדד נוסף לפעילות RSS של HC-Pro ותומך בכך הממצא כי הוירוס המוחלש ZYMV^{FINK}, שה- HC-Pro שלו פעיל כ-RSS, פעיל בסינרגיה עם CMV (Wang *et al.* 2004). מכאן שאתר FRNK אינו המוטיב היחיד ב-HC-Pro הקשור לפעילות RSS או לתסמינים. החלבון HC-Pro הוא מעכב חזק של מערכת ההשתקה האנטי- ויראלית המבוססת RNA (Anandalakshmi *et al.* 1998), גורם לשינויים בהצטברות smRNA ומשבש את התפתחות הצמח (Kasschau *et al.* 2003; Chapman *et al.* 2004; Mlotshwa *et al.* 2005). כדי לבחון את מעורבות תיבת FRNK בחלבון זה ביצירת תסמינים נעשתה השוואה בין צמחי קישוא מודבקים בוירוס האלים ZYMV^{FRNK} לבין צמחים מודבקים בוירוס המוחלש ZYMV^{FINK}, השונה ממנו בח' אמינית יחידה (Gal-On and Raccach 2000). נעשתה השוואה בין פעילותם של חלבוני ה-HC-Pro הנ"ל כמעכבי השתקה (RSS), פעילותם בקישור דופלקס smRNA, והושוו הרמות המצטברות של smRNA, והרמות המצטברות של גני-מטרה של miRNA ו-ta-siRNA בצמחים מודבקים בוירוסים אלו . ההשוואה נעשתה בטרם הופעת התסמינים בצמח המודבק בוירוס האלים, בעלה האמינית הראשון המנוגע סיסטמית, חמישה ימים לאחר הדבקתו על הפסיגים . בשלב זה, היתה הצטברות ה-RNA הויראלי (איור 3) וחלבון ה-HC-Pro (איור 4) זהה בין התבדיד האלים למוחלש . מכאן שההבדלים בהצטברות smRNA הנצפים בשלב זה אינם תוצאה של הבדלים בכמות הוירוס או ה-HC-Pro בצמח. נשאר פתוחה השאלה אם ההבדל בתסמינים המתפתחים בשלב מאוחר בין תבדידי הוירוס נובעים מהבדל ראשוני זה בהצטברות smRNA או משילוב של תופעה זו עם הירידה ברמת הוירוס בצמח המודבק בתבדיד המוחלש בשלבים מאוחרים של הדבקה (איור 3). סביר שלא כל התסמינים קשורים בתהליכים התפתחותיים . בפרוטופלסטים של *Arabidopsis* מודבקים ב-PPV (Babu *et al.* 2008) ניתן לזהות עליה

בביטוי גנים הקשורים בסוכרים מסיסים, יצירת עמילן וח' אמינו, גנים הקשורים בכלורופלסט, גורל חלבונים ועוד, וירידה בביטוי גנים הקשורים להתפתחות, תשמורת, סינטיזת חלבונים ותרגום ובמרכיבים של דופן התא. ב-TuMV (Yang et al. 2007) נמצאה עליה בגנים הקשורים בסינטיזה ופירוק חלבונים וירידה בביטוי גנים הקשורים בתפקוד הכלורופלסט, מטבוליזם של גופרית ודופן התא. יתכן ששיבוש בגנים אלה יגרום לתסמינים כגון כלורוזה ועיכוב גידול ואפשר שגם יתרמו לעוות העלה.

כדי לבחון את תפקידו של אתר FRNK במניעת השתקה (RSS), נבחנו ההבדלים בפעילות של RSS של HC^{FRNK} (שמקורו ב-ZYMV מטיפוס הבר האלים) לעומת HC^{FINK} (שמקורו ב-*N. benthamiana* בעלי ניסויים בהם בוטאו חלבונים אלה בעלי *N. benthamiana* (איורים 6, 9) במנותק מהוירוס באמצעות אגרובקטריום. בניסויים אלה נבחנה יכולתו של החלבון המבוטא לעכב את השתקתו של GFP, קרי למנוע את חיתוכו של mRNA של GFP או למנוע את עיכוב תרגומו ע"י מערכת ההשתקה הצמחית. להפתעתנו נמצא, כי למרות ששינויים מסויימים אחרים באתר יכולים לגרום לביטול פעילותו כ-RSS (א. חרונסקי, טרם פורסם), וכי המוטציה HC^{FINK} בוירוס TEV (איור 9) מבטלת את פעילותו כ-RSS (ואת האינפקטיביות של הוירוס הנושא אותה), לא נמצאו הבדלים בעוצמת ה-RSS בין HC^{FRNK} ו- HC^{FINK} (איור 6) של ZYMV. HC-Pro, למרות שעכב היטב את השתקת GFP, לא עיכב את יצירתם של siRNA שניוניים מ-GFP (איור 6C), (ואולי אף גרם להצטברות קלה ברמתם כאשר כמותו גדולה) ולכן אינו מעכב את פעולתם של Dicer או של RDR, אלא מונע את פעולת RISC, כפי הנראה, ע"י קישור והפקעה של תצמיד (duplex) siRNA/siRNA* . כיוון שמערכת זו, הכוללת הזרקה של חיידקים, הינה מלאכותית, נבדקו גם תוצאותיה של מערכת מניעת ההשתקה בצמח מודבק ב-ZYMV ע"י בחינת הצטברותם של viral siRNA (vsiRNA) שמקורם בגנום הוירוס ובניסיון הצמח להשתיק אותו. נערך ניסוי microarray מקיף ובו נבחנו הצטברותם של מאות vsiRNA תיאורטיים לכל אורך הגנום (גדיל פלוס) והגדיל המשלים לו (גדיל מינוס) בעלי קישור 5 ימים לאחר הדבקה באחד משני התבדידים (איור 5). באופן תיאורטי, היו יכולים להווצר vsiRNA ראשוניים מחיתוך בידי Dicer של dsRNA הנוצר מקיפול עצמי של ה-RNA הגנומי או של גדיל המיניוס (hairpin), או ע"י תוצר ביניים של תעתוק RNA על גבי RNA במחזור הריבוי של הוירוס (replicative form)

dsRNA). לחלופין, יכולים להווצר vsiRNA שניוניים ע"י חיתוך בידי Dicer של dsRNA מושלם הנוצר ע"י RDR צמחי על גבי חתיכות מגנום הוירוס או גדיל המינוס. מתוצאות הניסוי (איור 5) עולה כי הצטברות ה- vsiRNA הינה מאוד סלקטיבית ולא מחולקת שווה לאורך הגנום, וכי ישנם vsiRNAs שזוהו בעוצמה יחסית רבה ("hotspots") וכאלו שלא זוהו כלל. כמו כן נמצא כי הצטברו משמעותית מספר גדול יותר של vsiRNA שמקורם בגדיל פלוס מאלו של גדיל מינוס וכי גם רמתם היתה גבוהה יותר. ממצא דומה בו שובטו יותר vsiRNA מגדיל פלוס התקבל גם ב- *Brassica juncea* מודבקת ב- TuMV potyvirus (Ho et al. 2007). מהתוצאות עולה באופן מודגש, כי לא היתה חפיפה בין vsiRNA שהצטבר לבין בן- הזוג הפוטנציאלי שלו מהגדיל המשלים. בניגוד למידע המקובל לוירוסים אחרים (Molnar et al. 2005), קיפול ממוחשב של ה- RNA הויראלי של ZYMV לא הציב את ה- vsiRNA באזורים בעלי מבנה שניוני דוקא. ממצאים דומים לגבי הקיפול התקבלו גם בארבידופסיס וטבק מודבקים ב- *Tobacco rattle virus* (TRV) (Donaire et al. 2008), גם שם הצטבר יותר vsiRNA מגדיל פלוס, למרות שכאן כן נמצאו כמה בני זוג פוטנציאליים מהגדיל המשלים. בעבודה זו ב- TRV נמצאה מעורבות של שלושה (מ-4) Dicers ביצירת ה- vsiRNA משני הגדילים: DCL2, DCL3, ו-DCL4, כאשר ל- DCL4 חשיבות מכרעת בהגבלת ההתרבות של וירוס זה. בתהליך יצירת ה- vsiRNA יכולים תיאורטית להיות שני גורמי "סינון" (או שילוב ביניהם ...) הגורמים לתופעת ה- hotspots, האחד סלקטיביות והעדפה של Dicer לסובסטרט דו גדילי מסויים עשיר ב- G-C על פני אחר (Ho et al. 2007), והשני סלקטיביות של RISC בקליטת גדיל חד גדילי של siRNA בעל נוקלאוטיד מסויים בקצה 5' (Mi et al. 2008), אך השאלה מיהו הגורם המסנן נותרה ללא מענה בשלב זה. מעניין לציין כאן את הניגוד בין תופעת ה- hotspots לבין מצב שבו מצטברים יחדיו miRNA ו-miRNA* (ואולי גם לזה של siRNA/siRNA* שניוניים כמו בניסוי ה- GFP) בגלל קישורם יחד ע"י HC-Pro. כמו כן, ניתן לפרש תוצאה זו כך שבהדבקה בוירוס (בשלב המוקדם של 5 ימים לאחר הדבקה), בניגוד לטרנסגן, נמנעת מראש יצירה של vsiRNA שניוני (שהוא דופלקס מושלם). בדומה לתוצאה שהתקבלה בניסוי ה- GFP בו לא נמצא הבדל בפעילות ה- RSS בין HC^{FRNK} ל- HC^{FINK}, נמצא כי 5 ימים לאחר הדבקה היתה זהות בהצטברות ה- vsiRNA בין צמחים מודבקים ב- ZYMV^{FRNK} ו- ZYMV^{FINK}, גם בגדיל, גם

במיקום וגם בעוצמה. תוצאה זו, יחד עם המידע כי ZYMV^{FINK} מתרבה בצמח באופן נורמלי, מצביעה על כך שה מוטציה אינה פוגעת בפעילות RSS *in-vivo*, לפחות בשלבים מוקדמים לאחר ההדבקה.

במהלך עבודה זו, נתגלה כי גם חלבון HC-Pro של הוירוס TEV קושר תצמידי smRNA דו גדיליים (Lakatos *et al.* 2006; Merai *et al.* 2006), כפי שהתברר ל-RSS של וירוסים אחרים (ראה טבלה 1). קישור זה, אפשר להניח, עשוי לגרום להפקעת ה-smRNA מידי RISC ולמנוע את הטענתו ואת פעילותו ובכך לפגוע בהתפתחותו התקינה של הצמח. כדי לברר האם הבדלים בעוצמת קשירת smRNA ע"י HC-Pro עומדים מאחורי ההבדל בתסמינים בין ZYMV^{FRNK} ו-ZYMV^{FINK}, נערכו ניסויי קשירה *in-vitro* (EMSA) גם בתמציות עלי קישוא מודבקים ב-ZYMV (איור 8) וגם בעלי *N. benthamiana* המבטאים את החלבון במנותק מהוירוס (איורים 8, 9). בניסויי הקשירה נמצא כי HC^{FRNK} קושר גם siRNA-like duplex וגם miRNA-like duplex בעוצמה חזקה בהרבה מאשר HC^{FINK}. בקישור ע"י HC^{FINK} לעיתים לא נראתה קשירה ולעיתים היתה זו חלשה מאוד, קרובה לסף הזיהוי של השיטה. גם במוטנט נוסף פעיל כ-RSS, המופחת מטען במיקום חדש, HC^{FRNA}, לא נראתה קשירה או שזו היתה מתחת לסף הזיהוי. וירוס הנושא מוטציה זו, ZYMV^{FRNA}, הוא בעל תסמינים מוחלשים בדומה ל-ZYMV^{FINK} (חרונסקי א. עבודת מסטר). בהתאם לכך, קשר המוטנט HC^{FRNK}, שהוא בעל מטען שווה ל-HC^{FRNK} וגורם לתסמינים אלימים (חרונסקי א. עבודת מסטר), siRNA בצורה דומה ל-HC^{FRNK}. בוירוסים TEV (ארזי צ. לא פורסם) ו-TuMV (Whitham S.) (לא פורסם) המוטציה HC^{FINK} גרמה לאובדן אינפקטיביות. TEV-HC^{FINK} גם לא היה פעיל כ-RSS (איור 9). מכאן, ניתן לנבא כי שני מטענים חיוביים (+) בצמוד לח' אמינית ארומטית (a) במבנה a+N+ מאפשרים קשירת דופלקס miRNA/miRNA* או ta-siRNA חזקה ותסמינים אלימים, ומטען חלקי גורם לקשירה חלשה (או אובדן קשירה) ולתסמינים מתונים (או לאובדן פעילות RSS ואובדן אינפקטיביות בוירוסים אחרים). כיוון ששיטת ה-EMSA אינה רגישה דיה, אין ביכולתנו לקבוע האם הקישור לתצמידי smRNA באותם וירוסים בהם המוטציה FINK פוגעת ביכולת ה-RSS שלהם, דומה או חלשה עוד יותר מזו של ZYMV^{FINK}.

הממצא כי שילוב של חומצות אמיניות ארומטיות וחומצות אמיניות טעונות במטען חיובי חשוב לקישור תצמיד ה- smRNA תואם את הידוע לגבי קישור חלבונים ל- RNA (van Tilbeurgh et al. 1997). גם ב-RSS של וירוסים אחרים, כגון P19 (Vargason et al. 2003) ו-P21 (Ye et al. 2003) נמצא כי לחומצות אמיניות טעונות וארומטיות תפקיד ישיר בקישור. מכאן שתיבת FRNK היא נקודת מגע פוטנציאלית של החלבון עם תצמדי smRNA ותורמת ליכולתו של HC-Pro להפקיע miRNA ולגרום לתסמינים. בכל הוירוסים מקבוצת ה- *Potyvirus* שמורים מלבד תיבת FRNK שני אזורים משני צידי האתר שהם בעלי מטענים חיוביים וחומצות אמיניות ארומטיות (איור 27), ואפשר לשער כי יתכן שגם להם תפקיד בקישור smRNA.

ניתן להכליל כי כאשר ישנה פגיעה באתר FRNK אשר פוגעת בפעילות RSS, נפגעת גם הקשירה של הדופלקס ונפגעת האינפקטיביות, אך פגיעה בקישור אינה בהכרח מבטלת את פעילות ה-RSS והאינפקטיביות. ממצא אחרון זה הוא יחודי ל- ZYMV-HC-Pro (מהוירוסים והחלבונים שנבדקו) ולא ברור מדוע וירוס זה יוצא דופן. יתכן שמעורבים בכך אתרים נוספים על ZYMV-HC-Pro שאינם שמורים ב- *Potyviruses* האחרים ושלא נבדקו בעבודה זו. כדי לבחון האם תיבת FRNK מעורבת בשינויים בהצטברות של smRNA נבדקו RNA מצמחי קישוא מודבקים בוירוס האלים ZYMV^{FRNK} לבין צמחים מודבקים בוירוס המוחלש ZYMV^{FRNK}. בעזרת microarray ו-northern-blot זוהו לראשונה מספר miRNA ומספר miRNA* מקישואים עפ"י רצפים שמורים מצמחים אחרים. הדבקה ב-ZYMV גרמה לעליה של רוב ה- miRNA שזוהו יחד עם ה- miRNA* המתאימים (איור 11). העליה ברמת ה- miRNA דומה לזו שנצפתה בעלי ארבידופסיס טרנסגני המבטא P1-HC-Pro מ- *Turnip mosaic virus* (Kasschau et al. 2003) ולזו שנצפתה בסויה המבטא HC-Pro של *soybean mosaic virus* (Lim et al. 2007). miRNA* בצמח בלתי מודבק מתפרקים לעיתים קרובות במהירות אל מתחת לסף הזיהוי, ורמתם היתה אכן נמוכה בעלי הקישואים הבלתי מודבקים. לעומת זאת, בצמחים מודבקים בוירוס הצטברו רמות גבוהות מאוד כפי שנצפה בצמחים אחרים מודבקים ב- *Potyvirus* (Chapman et al. 2004). בניגוד ל- vsiRNA שרמתם נמצאה דומה בין תבדידי הוירוס באותו microarray (איור 5), רמות miRNA* בצמחים מודבקים ב- ZYMV^{FRNK} היו תמיד גבוהות מאלה המודבקים ב-

ZYMV^{FINK} בטווח שבין פחות מ- פי 2 לבין פי 20, וזאת בטרם הופעת התסמינים (5 ימים לאחר הדבקה). מהבדל זה אפשר להסיק כי יתכן ש- HC^{FRNK} גורם להצטברות של תצמיד דו-גדילי *in-vivo* ע"י ייצובו והפקעתו יחד עם ה- miRNA, וכי HC^{FINK} מייצב את התצמיד באופן יותר סלקטיבי ובמידה פחותה. ממצא זה מתאים לממצאים ש- HC^{FRNK} קושר תצמידי smRNA סינתטיים באפיניות גבוהה מאשר HC^{FINK} (איורים 8, 9, 10). כדי לבחון מדוע ישנם הבדלים בסלקטיביות בין תצמידי miRNA/miRNA* שונים קובצו אלה לשתי קבוצות (איור 13), האחת בהם ההבדלים בין HC^{FRNK} ו- HC^{FINK} אינם עולים על פי 3, והשניה בהם ההבדלים גדולים מ- פי 3. נתקבל מתאם בין מבנה התצמיד החזוי לחלוקתם לשני הקבוצות (איור 13), אך יש לזכור כי הקיפול מייצג תחזית ממוחשבת על סמך תוצאות היברידיזציה ולא רצפים מרוצפים אמיתיים. נראה כי כאשר ההתאם ה בין הגדילים טובה יותר והמבנה ההליקלי "מושלם", כגון ב-miRNA168, גם HC^{FINK} קושר את התצמיד היטב, וכאשר ישנן מספר אי התאמות ברצף או שבירה של המבנה ההליקלי, HC^{FRNK} קושר הרבה יותר חזק מ- HC^{FINK}. למבנים הליקליים של dsRNA ישנם שני מגרעות לאורך המולקולה, ה- major-groove ו- minor-groove (Rich 1956). ל-dsRNA "מושלם" יש minor-groove רחב ורדוד שגישתם של חלבונים אליו קלה ו- major-groove צר ועמוק שהוא בלתי נגיש לחומצות אמיניות. כיוון שה- major-groove ב-RNA מכיל את רוב האינפורמציה הרצף הספציפית, dsRNA "מושלם" אינו מאפשר אינטראקציה ספציפית לרצף עם חלבונים. לעומת זאת, שבירות מבנה הנובעות מאי-התאמות, לולאות ובליטות מרחיבות את ה- major groove ומאפשרות חדירה של חומצות אמיניות ואת הפוטנציאל להיכרות ספציפית בין הרצף לחלבונים (Tian et al. 2004). אפשר גם שההבדל בעוצמות הקישור שהתקבלו לתצמידים הסינתטיים בין miRNA/miRNA* לבין siRNA/siRNA* המושלם הנקשר חזק יותר (איור 9 השווה 9B ל-9C) מרמזים שיצירת אי-התאמות בתצמידי miRNA במהלך האבולוציה היא מנגנון של הצמח להתחמק מפגיעתם של RSS קושרי תצמידים. ממצאים אלה עשויים ללמד כי אפשר ול- miRNA המשתתפים בתצמידים בלתי מושלמים כגון miR166 ו-miR159, והנקשרים ע"י ה- HC-Pro האלים אך פחות ע"י HC^{FINK}, תפקיד חשוב יותר ביצירת התסמינים.

ישנה סתירה בין התוצאה בה נראה כי בצמח *in-vivo*, יש הצטברות של תצמידים בעלי התאמה טובה גם בעת הדבקה ב-ZYMV^{FINK}, לבין ההבדל הגדול בין HC^{FINK} לבין HC^{FRNK} באפיניות הקשירה (פי 33) הנצפית במבחן ה-EMSA *in-vitro* גם לדופלקס סינטטי מושלם. אין בעת זו הסבר מספיק לתופעה זו אך סביר כי המבחן *in-vitro* אינו מדמה במלואו את המצב *in-vivo*.

כאמור, רמתם המצטברת של חלק מה-miRNA (ולא רק ה-miRNA*) עלתה אף היא בהדבקה בשני תבדידי הוירוסים ולעיתים באופן דרמטי, כגון miR168 ו-miR396 (איור 11). רמתם המצטברת של שני האחרונים (יחד עם miR171) ידועה כמושפעת משלוש עקות א-ביוטיות שונות (Liu et al. 2008), אף כי הבדלים אלו היו נמוכים מההבדלים שהתקבלו בעבודה הנוכחית. יתכן שרמות גבוהות אלה, גם בהדבקה ויראלית, אינן תוצאה של ייצוב תצמיד בלבד אלא של שעתוק מוגבר של הגן המקודד ל-pre-miRNA ו/או עיבוד מוגבר שלו ע"י DCL1. רמתו של DCL1 עצמו מבוקרת ע"י miR162 כך שירידה בזמינות ה-miRNA (ע"י הפקעתו ב-HC-Pro) תגרום לעליה בכמות DCL1 (Xie et al. 2003). צמחי ארבידופסיס בעלי מוטציה *hen1* או *dcl1* וצמחים טרנסגניים המבטאים P1/HC-Pro, היו כולם בעלי רמה גבוהה של תעתיק DCL1 שלם (Xie et al. 2003; Mlotshwa et al. 2005; Zhang et al. 2006b).

הצטברותו הגבוהה ביותר של miR168 (שהינה שווה בשתי תבדידי הוירוס, איורים 11, 12) מאפשרת לנו להתבונן אל קטע ממערכת רב-רמתית מרשימה של היזון חוזר, ומערכת חישה אנטי-ויראלית לוירוסים שהם בעלי RSS הפועל באמצעות מניעת חיתוך ע"י RISC. miR168 מבקר את רמתו של ARGONAUTE1 (AGO1) שהוא החלבון הפעיל ב-RISC ומכאן מבקר את רמת ה-mRNA [ואולי את רמת החלבון? (Brodersen et al. 2008)] של AGO1 עצמו ע"י היזון חוזר (Vaucheret et al. 2004; Vaucheret et al. 2006). התצמיד miR168/miR168* הוא הליקס "מושלם" (איור 13) ולכן, לפי ההנחה, נקשר היטב (יחסית) גם ל-HC^{FINK}. אף על פי כן, ב-ZYMV^{FRNK} אפשר שהוא נקשר מעט יותר כיוון שכמות miR168* בטיפול זה גבוהה יותר באופן מובהק (אף כי במידה מועטת), למרות שאין הבדל ברמת miR168 (איור 11). אפשר שהפרש זה בין כמות miR168 ל-miR168* הוא miR168 "חופשי" הנמצא ב-miR168-RISC. מכאן, היתה הנחה, כי בעת הדבקה בוירוס

תהיה הפקעה של miR168, ה-mRNA של AGO1 יחתך פחות / יתורגם יותר ולכן ייווצר יותר חלבון AGO1 הפועל לחיתוך ה-RNA של הוירוס הפולש.

כדי לבחון אם ה דבקה ב-ZYMV אכן גורמת לעליה ברמת התעתיק השלם (הבלתי חתוך) של AGO1, אם ע"י בקרה ברמת השעתוק (DNA→RNA) ואם ברמת הבקרה שלאחר שעתוק (post-transcriptional mRNA cleavage), בוצע ניסוי RT-Q-PCR (איור 26). מתוצאות ניסוי זה עולה באופן ברור כי היחס בין כמות התעתיק השלם לתעתיק חתוך נשמר (איור 26D) בכל הטיפולים ובכל הזמנים. לעומת זאת הכמות הכללית של תעתיק AGO1 שלם ושל התעתיקים חתוכים עלתה בעת הדבקה בוירוס האלים ועלתה לרמת ביניים בוירוס המוחלש (איורים 26B, C). היחס של רמות התעתיקים החתוכים לרמת התעתיק השלם משקפת את שווי המשקל בין קצב יצירת תעתיק חדש, קצב חיתוכו ע"י RISC וקצב הדגרדציה של המקטעים. "מקטעי-3'" החתוכים מעוכלים ע"י האקסו-ריבנוקלאזה הציטופלסמטית XRN4/EIN5 המעכלת מ-5' ל-3' (Gregory *et al.* 2008) (ראה איור 26A). "מקטעי 5'" מעוכלים או ע"י האקסוזום (Voinnet 2008) המעכל RNA מ-3' ל-5' או ע"י מנגנון לא ידוע המעכל את "מקטעי 5'" מ-5' ל-3' (Shen and Goodman 2004).

עליה ברמת AGO1 תוך שמירת היחס בין AGO1 חתוך לשלם מלמדת כי רמת השעתוק של הגן AGO1 היא זו המוגברת בהדבקה בוירוס וכי הוירוס אינו מונע את חיתוכו של גן זה ע"י RISC.

ניתן לצייר תרחיש בו העליה ברמת mRNA בלתי חתוך של AGO1 עקב ההדבקה גורמת לעליה בכמות חלבון AGO1 פעיל הגורמת להצטברותו של miR168 ב-miR168-RISC, הגורם לחיתוך עצמי מוגבר. בצמחי ארבידופסיס בהם מוטציה ב-AGO1 מבטלת את אתר המטרה של miR168, AGO1 מצטבר מאוד כצפוי, אך במקביל נמצאה הצטברות גדולה גם של miR168. הוכח כי הצטברות זו אינה נובעת לא משעתוק מוגבר של miR168-precursor ולא מעיבוד מוגבר של פרקורסור זה (ע"י DCL1), אלא כנראה, מהצטברותו כרכיב ב-miR168-RISC עצמו (Vaucheret *et al.* 2006). מכאן שרמתו של AGO1 מהווה גורם מגביל לרמתו של miR168 הניתן לזיהוי בצמח מטיפוס הבר. בניסוי זה גם היתה עליה מסויימת ברמתם של miR159 ושל miR165/6. לעומת זאת, ביטוי יתר של miR168 בארבידופסיס גורם לירידה בכמות AGO1 ולפנוטיפים של פגיעה התפתחותית חריפה דומה

ל-ago1 ולמוטנטים בבקרה על PHAVOLUTA, PHABULOSA ו-REVOLUTA (Vaucheret *et al.* 2006) מלווה בירידה ברמתם של miR159 ו-miR165/6.

מכאן אפשר, שבהדבקה ויראלית, כל שיווי-המשקל מועתק כולו מעלה, לרמה בה AGO1 יכול (לפחות ב-ZYMV^{FINK}) להתחרות ב-RSS. אין בידנו תשובה לשאלה כיצד מבוקרת רמת השעתוק של AGO1. כמו כן, אין בידנו נוגדן ל-AGO1 לבדוק את רמת הבקרה שלאחר-שעתוק על התרגום, גם בה מעורב AGO1 (Brodersen *et al.* 2008).

בניגוד לממצא שהתקבל מניתוח תוצאות רמת התעתיקים של AGO1, כי "מקטע 5'" מצטבר יותר מ-"מקטע 3'", מקובל כי הדגרדציה של "מקטע 5'" מהירה יותר, כדוגמת SCL6 בארבידופסיס הנחתך בידי miR171-RISC (Llave *et al.* 2002). כמו כן, כפי שנתגלה ב-MYB33 הנחתך בידי miR159-RISC בארבידופסיס (Shen and Goodman 2004), לאחר החיתוך בידי RISC ולפני עיכולו, תיתכן תוספת של זנב oligoU₍₁₋₉₎ ל-"מקטע-5'" בקצה 3' שלו, ללא עיכול בקצה זה. "מקטעי 5'" מזונבים אלה נמצאו חלקם בעלי 5'-cap תקין, וחלקם חסרי 5'-cap ומעוכלים בדרגות שונות מקצה 5' שלהם, מה שאינו מתאים לעיכול ע"י האקסוזום המעכל מ-3' ל-5'. לעומת זאת, באצה כלמידומונס נמצאה תוספת של זנב oligoA בקצה 3' של "מקטע 5'" הנחתך מגן מטרה ל-siRNA מלאכותי, הקצה המקוצר היה קצה 3' שלו, והוכיחו שמעורב בכך עיכול אקסוזומלי (Ibrahim *et al.* 2006). למרות שמסקנות שני מאמרים אלה סותרות לגבי כיוון הדגרדציה של "מקטע-5'", יתכן כי בשל העובדה שהתחלים בהם נבדקה רמתו של "מקטע-5'" מ-AGO1 בעבודה הנוכחית קרובים לאתר החיתוך, יוגברו גם מקטעים המעוכלים חלקית מקצה 5' שלהם. השערה זו נתמכת ע"י התצפית כי לא ניתן לזהות תוצר חיתוך נפרד ברור ב-northern-blot (איור 27) על אף שרמתו גבוהה מרמת התעתיק השלם (לפי ניסויי ה-Q-PCR).

אפשר כי העליה ברמתו של AGO1 משמשת כגורם ממתן (buffer) בעת הדבקה בוירוס, שמאפשרת לא רק את הורדת כמות הוירוס אלא גם תחרות עם ה-RSS על miRNA וע"י כך חיתוך תקין של גני מטרה אחרים של miRNA. על מנת לאשש היפותיזה זו נבחנו ההבדלים ברמתם של עשרה גני מטרה, ששובטו בעבודה הנוכחית מצמחי קישוא, בעת הדבקות הצמחים בכל אחד משתי התבדידים.

בארבידופסיס טרנסגני המבטא את החלבון HC-Pro וגם בצמח נגוע ב- TuMV (אף כי במידה פחותה מבצמח הטרנסגני) נמצא כי היתה הצטברות של תעתיק שלם של SCL6 (גן מטרה של miR171) וירידה בכמות תעתיק חתוך של אותו גן, למרות עליה לכאורה בכמות miR171 (מופקע ע"י HC-Pro ובלתי פעיל יש להניח) (Kasschau *et al.* 2003). בצמחי ארבידופסיס טרנסגניים דומים (Zhang *et al.* 2006b), רמתם של גני מטרה שונים (miRNA מבקר בסוגריים) נמצאה מוגבהת, כולל NAC1 (miR164), PHAVOLUTA (PHV) ו-PHABULOSA (PHB) (miR165/6), Auxin response factor-(ARF)8 (miR167), DCL1 (miR162), AGO1 (miR168), וגן מטרה של ta-siR480/255. רמתו של ta-siRNA זה עצמו היתה מעט מופחתת אך היתה הצטברות של ה-siRNA* שלו מה שמלמד שמחד, הוא סונטז פחות, ומאידך, נקשר כתצמיד.

בעבודה זו נבדקה רמתם של תעתיקים בלתי-חתיכים של 10 גני-מטרה של miRNA או ta-siRNA ורמתו של ta-siRNA אחד בעלי קישור מודבקים ב-ZYMV^{FRNK} או מודבקים ב-ZYMV^{FINK} או בלתי-מודבקים. מהתוצאות עולה כי בשלוש מגנים אלה, AGO1, PHV ו-INCURVATA-4, נמצאו הבדלים מהותיים בין צמחים מודבקים בוירוס האלים, הוירוס המוחלש, והצמח הבריא. גם רמתו של ה-ta-siRNA, TAS3-D7/D8, השתנתה עקב ההדבקה בוירוס. רמתם של שניים מהגנים, REVOLUTA (REVO)-1 ו-UM159t הייתה נמוכה מדי לניתוח בעלי הקישור שנבדקו. בחמש הנותרים, REVO2, sq5707, ARF3, ARF4 ו-ARF3A, או שלא נמצאו הבדלים או שההבדלים בין החזרות הביולוגיות היו גדולים מההבדלים בין הטיפולים.

הגנים בהם נמצאו הבדלים ברמת התעתיק הבלתי חתוך היו AGO1 שנידון בהרחבה בסעיף הקודם, ושני גני מטרה של miR166, PHV ו-INCURVATA-4. גנים אלה הם גורמי שעתוק ממשפחת Class III homeodomain-leucine zipper (HD-Zip). ממשפחה זו שובטו מקישור ה-mRNA של גנים הדומים ל-INCURVATA-4, שלושה פאראלוגים של PHV ושתי פאראלוגים של REVO. לבני משפחה זו (בארבידופסיס) עשויים להיות תפקידים חופפים או אנטגוניסטיים בהתפתחות העובר, קוטביות איברים, יצירת מריסטמות ויצירת מערכת ההובלה (Prigge *et al.* 2005). ביטוי יתר של miR166 (במוטנט jabba 1D בארבידופסיס) גורם לירידה ברמה המצטברת של PHV, PHB, ו-INCURVATA-4 ולעליה

ברמה של REVO. צמחים אלה הם בעלי מריסטמות מרובות ומוגדלות, ראדיאליזציה (radialization) של העלים, פגיעה במערכת הרבייה הנקבית ועוותים במערכת ההובלה (Williams *et al.* 2005b). במהופך, ביטול פעילות בו-זמנית של PHV, PHB ושל REVO גורם לאבקסיאליזציה (abaxialization) של פסיגים, מבטל היווצרות מריסטמה קודקודית ומפר סימטריה דו-צדדית, ומכאן מלמד על תפקידם בהתפתחות העובר והצמח הבוגר (Emery *et al.* 2003). INCURVATA-4 (הידוע גם כ- ATHB15, Icu-4, CORONA [CNA]) הוא גן המעורב בארבידופסיס בין היתר בהתפתחות צינורות ההובלה בתפרחת (Kim *et al.* 2005), ומוטנטים בלתי רגישים ל-miR166 הם בעלי שינויים בסידור העלים (phylotaxis), אדקסיאליזציה (adaxialization) של איברים צדדיים, שינויים במבנה ואורך השורש ובעלי גידול מוגבר של עצה בגבעול (Ochando *et al.* 2006).

מתוצאות בדיקת רמת ההצטברות של ה-mRNA הבלתי-חתוך של sqINCURVATA-4 (איור 22) עולה כי בעלה האמיתי הראשון, 5 ימים לאחר הדבקה, רמתו המצטברת הממוצעת של Incurvata היתה מעט נמוכה בצמחים בריאים מאלה המודבקים בוירוס המוחלש אך רמתו בצמחים מודבקים בוירוס האלים היתה גבוהה פי 3.4 בממוצע. בעלה השני, 7 ימים מהדבקה, רמתו המצטברת בצמח הבריא היתה גבוהה מזו של העלה הראשון, וגם כאן, כמו בעלה הראשון, הדבקה בוירוס האלים גרמה לעליה פי 3.9 ברמתו, בעוד הוירוס המוחלש לא גרם לעליה משמעותית. 14 ימים לאחר הדבקה היתה רמתו של INCURVATA-4 בעלה הצמח הבריא דומה לזו שבעלה הראשון, דומה גם בצמח המודבק בוירוס המוחלש, ובדומה לזמנים האחרים, גבוהה פי 2.5 בצמח המודבק בוירוס האלים.

כאמור, רמתו של miR166 (המבקר את INCURVATA-4), הושפעה מעט מהדבקה בוירוס אך היה הבדל גדול בין HC^{FRNK} ל- HC^{FINK} בהצטברות miR166* (איורים 11, 12), כאשר רמתו ב- HC^{FINK} היתה רק מעט גבוהה מזו של צמח בריא. נראה שהתוצאה בה יש עליה מתונה ב- INCURVATA-4 בנוכחות HC^{FINK} ועליה גדולה בנוכחות HC^{FRNK} , מתאימה להנחה היסודית ובה הפקעה רבה יותר של miR166 בידי HC^{FRNK} , אולי בשל היותו תצמיד "בלתי-מושלם", תגרום לירידה בכמות miR166-RISC פעיל ולפחיתה בחיתוך של התעתיק של INCURVATA-4. קיימת אפשרות שבדומה ל-AGO1 עליה זו נובעת מעליה בשעתוק ולא מירידה בחיתוך שלאחר שעתוק, אך אפשרות זו טרם נבדקה.

Nicotiana sylvestris (PHV) PHAVOLUTA הוא גן המבקר את כיווניות צמיחת הקמביום ברקמות ההובלה ואת מבנה מריסטמות הקודקוד והתפרחת ומונע את הכרעת הגורל ההתפתחותי של רקמות אלה (McHale and Koning 2004). מוטנטים בלתי רגישים ל-miR165/166 מאבדים את הבקרה על קוטביות המריסטמה וגורמים לאדקסיאליזציה של העלה (McConnell et al. 2001; Emery et al. 2003). הגן PHV, כמו גם (PHB) PHABULOSA המקורב לו, בנוסף להיותם מבוקרים שלאחר שעתוק ע"י miR166-RISC, מבוקרים גם ע"י מערכת של RNA dependant DNA methylation (RdDM). במערכת זו הכרומטין ב-DNA הגנומי ממותל מאוד במורד הזרם מאתר ההכרות של ה-miRNA ברוב הרקמות בצמחי ארבידופסיס מטיפוס הבר, אך לא במוטנטים בלתי רגישים ל-microRNA של גנים אלו שבהם רמתם עולה בצורה לא מבוקרת (Bao et al. 2004). מתוצאות בדיקת רמת ההצטברות של ה-mRNA הבלתי-חתוך של אחד משלושה גנים מקישוא הדומים ל-PHV, sqPHV-SP (איור 23), עולה כי בעלה האמיתי הראשון, 5 ימים לאחר הדבקה, רמתו המצטברת הממוצעת של PHV היתה דומה בצמחים בריאים לבין אלה המודבקים בוירוס המוחלש אך רמתו בצמחים מודבקים בוירוס האלים היתה גבוהה פי 2.4 בממוצע. בעלה השני, 7 ימים לאחר הדבקה, נמצא שרמתו המצטברת בצמח הבריא היתה גבוהה מזו של העלה הראשון, וגם כאן, כמו בעלה הראשון, הדבקה בוירוס האלים גרמה לעליה פי 2.1 ברמתו, בעוד הוירוס המוחלש לא גרם לעליה כזו. לעומת זאת 14 ימים לאחר הדבקה, רמתו המצטברת של PHV ירדה בצמחים הבריאים ביחס לעלה השני, ורמתו בצמחים המודבקים בוירוס המוחלש והאלים היתה אף נמוכה מכך.

מכאן שבדומה ל-INCURVATA-4, גם רמתו של תעתיק PHV בלתי חתוך עלתה במקביל לירידה המשוערת ב-miR166 זמין. גם כאן לא נבדקה האפשרות שבדומה ל-AGO1 עליה זו נובעת מעליה בשעתוק ולא מירידה בחיתוך שלאחר שעתוק, וישנה אפשרות סבירה שזהו המצב לאור המידע שגן זה, נוסף על בקרתו שלאחר שעתוק ביד י miR166, מבוקר גם ב-RdDM ע"י miR166.

הדמיון הרב ברמת התעתיקים של PHV ו-INCURVATA-4 (50-400 עותקים ל-ng total RNA), ובהשפעת הוירוסים האלים והמוחלש על הצטברות תעתיקים אלו מתאימה להנחה כי בקרתם ע"י miR166 מושפעת בצורה דומה מההדבקה הויראלית. עליה זו התרחשה

למרות העלייה שנצפתה ברמתו של AGO1 הצפוי למתן את התופעה. נוסף על כך, יתכן כי ישנם הבדלים ברמת התרגום של mRNA אלו בין צמחים מודבקים ללא מודבקים, בגלל מעורבותו של RISC גם בבקרת התרגום (Brodersen *et al.* 2008), אך אין ביכולתנו לברר סוגיה זו בהעדר נוגדנים לגנים הרלוונטיים מקשוא. תפקידם החשוב של חלבוני HD-ZIP בבקרת התפתחות הצמח, יחד עם הממצא כי רמתם עולה בהדבקה בוירוס האלים, מתאימה להנחה כי עליה לא מבוקרת ברמת הביטוי של גנים אלו (אם מבחינת הזמן ואם מבחינת הרקמה) עשויה לתרום לתסמינים המתקבלים בהדבקה בוירוסים. הנחה זו מתיישבת עם הנחתה של (Kasschau *et al.* 2003) שהחלבון HC-Pro גורם לתסמינים בגלל שינויים בהצטברות miRNA וגני-המטרה שלהם המשבשים את התפתחות הצמח.

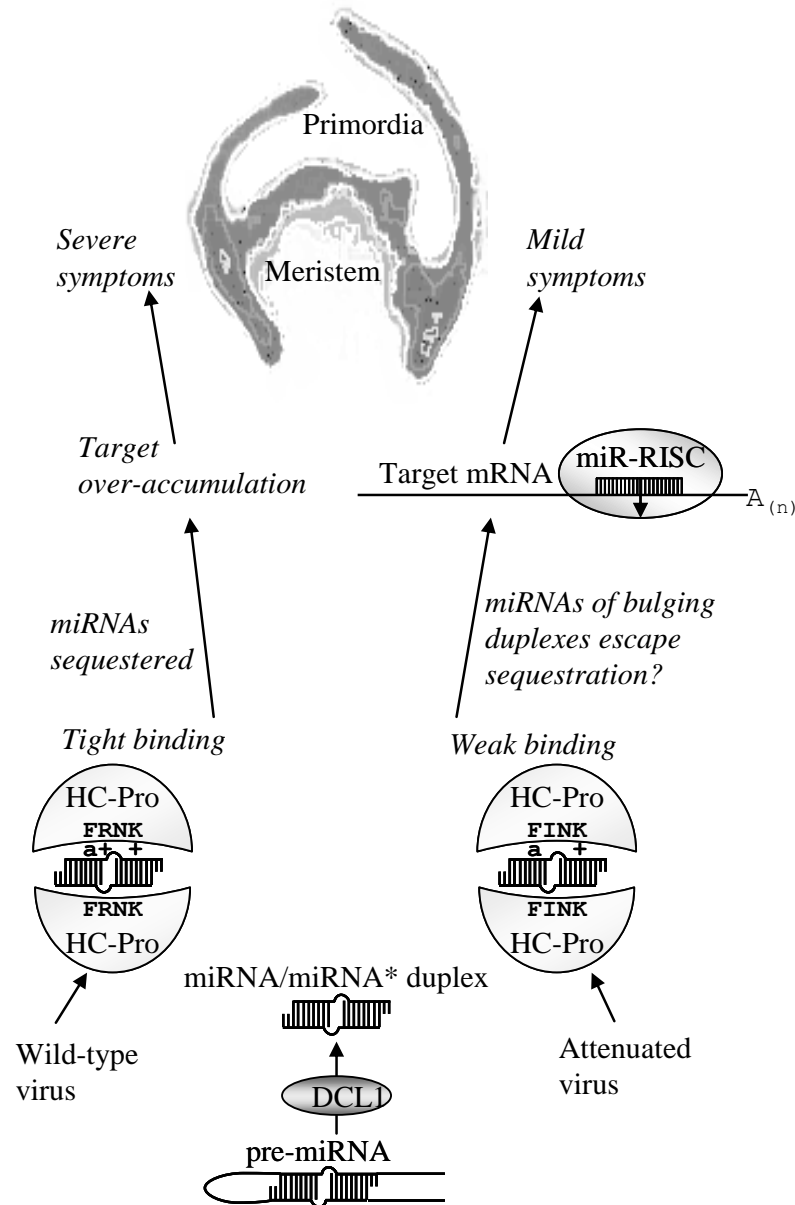
הם RNA קצרים המבקרים גני-מטרה באופן דומה משהו ל-miRNA. TAS3 הוא גן המבטא את ה-ta-siRNA D7/D8 המבקרים את רמתם של גורמי שעתוק ממשפחת ה-Auxin Response Factors (ARF). לשם יצירתו של D7/D8 תקין דרוש קישור של miR390 ל-TAS3 בשתי אתרים (Axtell *et al.* 2006). בניגוד ל-miRNA נקשר miR390 ל-AGO7 ולא ל-AGO1 (Montgomery *et al.* 2008). AGO7 אינו (ככל הידוע) מבוקר ע"י miRNA. כיוון שנמצא שרמתו של miR390 ובמיוחד של miR390* מושפעים באופן דיפרנציאלי מהדבקה בשתי תבדידי הוירוס (איור 11), ציפינו כי רמתו של D7/D8 תרד עקב הפקעת תצמיד miR390/miR390* ע"י HC-Pro ומחסור ב-miR390 פעיל. תוצאה זו אכן התאמתה (איור 25), ובצמחי קישוא 7 ימים לאחר הדבקה נמצאה ירידה בכמות D7/D8 בצמחים מודבקים בשתי תבדידי הוירוס ביחס לצמח הבריא, ו-14 ימים לאחר הדבקה נמצא כי ZYMV^{FRNK} גורם לירידה גדולה ביחס לצמח הבריא ול-ZYMV^{FINK}. למרות שלא נבדקה רמתו של ta-siRNA* מתאים, מהספרות ידוע על מקרה בו במקביל לירידה בכמות ta-siRNA הצטבר ta-siRNA* בצמח טרנסגני המבטא חלבון HC-Pro של *Sugarcane mosaic virus* (Zhang *et al.* 2006b), ולכן יש לנו סיבה להניח שגם כאן HC-Pro עשוי לקשור את תצמיד ta-siRNA/ta-siRNA* שנוצר.

תוצאה זו, של ירידה בכמות ta-siRNA בנוכחות וירוס, העשויה להיות מוסברת מחד ע"י עיכוב החיתוך של miR390-AGO7-RISC בידי HC-Pro הגורמת לאי-יצירת D7/D8, יכולה

מאיך להיות מוסברת בדרך אלטרנטיבית. אפשר כי ישנם הבדלים אחרים המושרים בידי הוירוס כגון השפעה על רמת השעתוק של TAS3 או השפעה על רמת השעתוק ו/או התרגום של גורמים אחרים בביוסינטיזה של D7/D8 כגון RdR6 (Zhang et al. 2008). מראה שרמת התעתיק של RdR6 מדוכאות ע"י HC-Pro, (במנגנון לא ידוע). נעשה ניסיון לבדוק השערה זו בעבודה הנוכחית בעזרת RT-Q-PCR. נמצא כי רמתו של RdR6 בעלי קישוא (ששובט בעבודה הנוכחית, לא מוצג) היתה נמוכה מסף הגילוי גם בצמח בריא וגם בצמח מודבק (תוצאות לא מוצגות). בעבודה של (Zhang et al. 2008) היתה רמתו של RdR6 בעלי *N. benthamiana* נמוכה גם היא, והפכה לברת זיהוי רק כאשר ייצורו הושרה ע"י הזרקת DNA המשעתק hairpin כלשהו. כאמור, בנוכחות HC-Pro דוכאה השראה זו לחלוטין, ומכאן שממילא קשה היה להבדיל בין צמח בריא ל מודבק ולהבין אם יש לתופעה זו משמעות בהדבקה ויראלית.

לאור הממצא כי כמותו של ta-siRNA-D7/D8 יורדת בהדבקה בוירוס האלים היינו מצפים לראות עליה ברמתם של ARF עקב אובדן הבקרה שלאחר שעתוק. לבדיקת השערה זו בדקנו בעזרת RT-Q-PCR את רמתם של ARF3, ARF3A, ו-ARF4 ששובטו מקישוא ומכילים אתר מטרה ל-D7/D8. מהתוצאות עולה כי לא נראתה השפעה ברורה על רמתם של התעתיקים הבלתי-חטוכים של גנים אלו בהדבקה בוירוסים המוחלש או האלים (לא מוצג). בין הסברים האפשריים לתוצאות אלה אפשר למנות את ההשערות כי הבדיקה נערכה לעלים שלמים בזמנים מסויימים ולגנים אלה יש איזורי זמני ביטוי ספציפיים אחרים, ושישנם בקרות נוספות לרמת התעתיק שאינן מושפעות מ-smRNA.

ממצאי העבודה הנוכחית מאפשרים להציע מודל (איור 29) ובו ניסיון לפשט את כל הידוע עד כה. מודל זה יוצא מהנתון כי רמתו של ZYMV והחלבון HC-Pro כבר גבוהים בעלה האמיתית הראשון 5 ימים לאחר הדבקה, אך התסמינים מופיעים רק לאחר מכן. במודל, תסמינים אלה נובעים מפגיעת הוירוס בבקרה של גנים מבוקרי miRNA בעלים צעירים פרימורדיאליים. ככל הידוע, הוירוס לא מצוי במריסטמה ובמפרקים הקרובים אליה (או שרמתו מאוד נמוכה) (Lin et al. 2007a) ואין עבודות המראות ש-HC-Pro יכול לנוע בצמח ולתוך תאים באופן עצמאי. יתכן והעלה הראשון (והשני) המתפתחים באופן נורמלי ונותרים חסרי (או מעוטי) תסמינים, כבר חצו סף התפתחותי כאשר HC-Pro מגיע אליהם. HC-Pro אינו יכול למנוע את פעילותו



איור 29. מודל של השפעת HC-Pro על יצירת תסמינים. miRNA מיוצרים מפרקורסור מקופל (pre-miRNA) ע"י Dicer-like 1 (DCL1) החותך אותו לתצמיד miRNA/miRNA*. בצמחים בלתי מודבקים miRNA מוטען ל-RISC ו-miRNA* מושמד. RISC מבקר-מטה את רמתו של mRNA של גן-מטרה (target) המכיל אתר מטרה ל-miRNA או של חלבון המתורגם ממנו. בצמחים מודבקים ב-Potyvirus החלבון HC-Pro קושר את התצמיד וכפועל יוצא מפקיע את ה-miRNA וגורם לביטוי בלתי מבוקר של גן-המטרה. ב-HC-Pro מטיפוס הבר האתר FRNK מכיל ח'אמינית ארומטית (a) ושתי ח'אמיניות טעונות חיובית (+) המעורבות בקישור התצמיד. הפחתת המטען ב-ZYMV^{F1NK} גורמת לפחיתה באפיניות לתצמיד, ובמיוחד לתצמידים בעלי מבנה הלי קלי בלתי מושלם או בעל אי-התאמות רבות, ומאפשרת פעילות RISC מספיקה, וכך תסמינים מתונים.

של RISC שהוטען טרם הגעתו (Lakatos *et al.* 2006; Merai *et al.* 2006) כיוון ש-RISC משופעל מכיל RNA חד-גדילי שאינו נקשר ע"י HC-Pro. לעומת זאת, העלים הבאים הם בעלי תסמינים חריפים יותר ויותר. ניתן להציע כי HC-Pro קושר ומפקיע תצמיד miRNA/miRNA* בעלים הצעירים מאוד ובפרימורדיות העלה הגדלות בהם הוירוס נוכח וע"י כך מוציא מכלל פעולה את ה-miRNA הדרושים לבקרתם של גני-מטרה חשובים להתפתחות המוקדמת של הצמח. הפחתת המטען באתר FRNK הגורמת לקישור חלש יותר של התצמיד ומותיר די miRNA הדרושים לבקרה תקינה של אותם גני-מטרה.

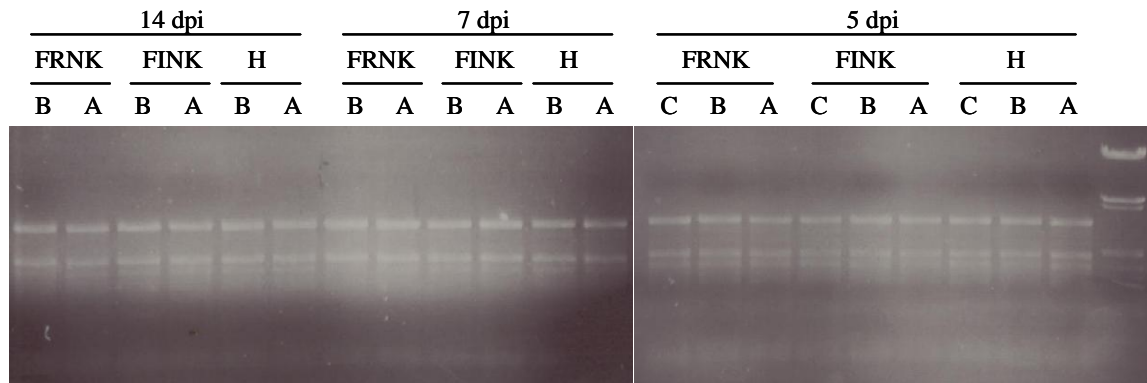
לסיכום, נעשו מבחנים ביוכימיים אשר הראו ש-HC-Pro של ZYMV קושר גם siRNA-duplex בדומה ל-HC-Pro של TEV, וגם miRNA/miRNA*-duplex סינטטיים. קישור זה אופיין בפרמטרים ביוכימיים והראה לראשונה כי הפחתה במטען בתיבת FRNK גורם לירידה בעוצמת הקישור, וזו מתאימה לירידה בעוצמת התסמינים בצמח. לעומת זאת ובניגוד למצופה, מוטציות בעלות עוצמת קישור נמוכה לא הפחיתו את עוצמת עיכוב מערכת ההשתקה (RSS).

בעזרת microarray ו-northern-blot זוהו לראשונה מספר miRNA ומספר miRNA* מקישואים, ונמצא כי למטען בתיבת FRNK השפעה רבה על הצטברותם בצמחים מודבקים בוירוס וכי לא כל תצמיד ה-miRNA/miRNA* מצטברים בצורה דומה. לראשונה הוצע מודל המנבא את הצטברותם של תצמידים miRNA/miRNA* שונים בצמחים מודבקים בוירוס עפ"י תכונות מבניות של ההליקס.

שובטו מקישוא מספר גנים החזויים להיות מטרה (targets) ל-miRNA. נעשתה השוואה של רמות התעתיק של אלה בין צמחים בריאים או מודבקים ב-ZYMV אלים או מוחלש, ונמצא כי חלקם מצטבר ביתר בעת הדבקה בוירוסים, וכי הפחתת המטען בתיבת FRNK מפחיתה השפעה זו.

מוצע מודל מקדמי בו בעת הדבקה בוירוס יש עליה בשעתוקו של AGO1 כחלק ממנגנון ההגנה של הצמח להפחתת הנזק הנגרם מוירוסים.

נספחים



איור S1. ג'ל אלקטרופורזה דנטורטיבי של total-RNA מְקִישׁוּאִים בלתי מודבקים (H), מודבקים בִּירוס המוחלש $ZYMV^{FINK}$ (FINK) או בִּירוס האלים $ZYMV^{FRNK}$ (FRNK), ב-3 זמנים שונים לאחר הדבקה (dpi), במספר חזרות ביולוגיות נפרדות (A,B,C). כל באר מכילה $0.5 \mu\text{g}$ של RNA מטופל ב-DNaseI. תמונה זו היא של RNA לאחר 3 שנים בהקפאה, אותו RNA ששימש לכל הניסויים הכמותיים בעבודה. כל דוגמא היא תערובת של RNA מכ-8 צמחים.

ביבליוגרפיה

- Adai, A., Johnson, C., Mlotshwa, S., Archer-Evans, S., Manocha, V., Vance, V., and Sundaresan, V. 2005. Computational prediction of miRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Res* **15**: 78-91.
- Adenot, X., Elmayan, T., Lauressergues, D., Boutet, S., Bouche, N., Gascioli, V., and Vaucheret, H. 2006. DRB4-dependent TAS3 trans-acting siRNAs control leaf morphology through AGO7. *Curr Biol* **16**: 927-932.
- Anandalakshmi, R., Marathe, R., Ge, X., Herr, J.M., Jr., Mau, C., Mallory, A., Pruss, G., Bowman, L., and Vance, V.B. 2000. A calmodulin-related protein that suppresses posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* **290**: 142-144.
- Anandalakshmi, R., Pruss, G.J., Ge, X., Marathe, R., Mallory, A.C., Smith, T.H., and Vance, V.B. 1998. A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 13079-13084.
- Arazi, T., Lee Huang, P., Huang, P.L., Zhang, L., Moshe Shibolet, Y., Gal-On, A., and Lee-Huang, S. 2002. Production of antiviral and antitumor proteins MAP30 and GAP31 in cucurbits using the plant virus vector ZYMV-AGII. *Biochem Biophys Res Commun* **292**: 441-448.
- Arazi, T., Slutsky, S.G., Shibolet, Y.M., Wang, Y., Rubinstein, M., Barak, S., Yang, J., and Gal-On, A. 2001. Engineering zucchini yellow mosaic potyvirus as a non-pathogenic vector for expression of heterologous proteins in cucurbits. *J Biotechnol* **87**: 67-82.
- Arazi, T., Talmor-Neiman, M., Stav, R., Riese, M., Huijser, P., and Baulcombe, D.C. 2005. Cloning and characterization of micro-RNAs from moss. *Plant J* **43**: 837-848.
- Axtell, M.J., Jan, C., Rajagopalan, R., and Bartel, D.P. 2006. A two-hit trigger for siRNA biogenesis in plants. *Cell* **127**: 565-577.
- Babu, M., Griffiths, J.S., Huang, T.S., and Wang, A. 2008. Altered gene expression changes in *Arabidopsis* leaf tissues and protoplasts in response to Plum pox virus infection. *BMC Genomics* **9**: 325.
- Ballut, L., Drucker, M., Pugniere, M., Cambon, F., Blanc, S., Roquet, F., Candresse, T., Schmid, H.P., Nicolas, P., Gall, O.L., and Badaoui, S. 2005. HcPro, a multifunctional protein encoded by a plant RNA virus, targets the 20S proteasome and affects its enzymic activities. *J Gen Virol* **86**: 2595-2603.
- Bao, N., Lye, K.W., and Barton, M.K. 2004. MicroRNA binding sites in *Arabidopsis* class III HD-ZIP mRNAs are required for methylation of the template chromosome. *Dev Cell* **7**: 653-662.
- Bartel, B. and Bartel, D.P. 2003. MicroRNAs: at the root of plant development? *Plant Physiol* **132**: 709-717.
- Bartel, D.P. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**: 281-297.
- Baumberger, N. and Baulcombe, D.C. 2005. *Arabidopsis* ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 11928-11933.
- Baumberger, N., Tsai, C.H., Lie, M., Havecker, E., and Baulcombe, D.C. 2007. The Polerovirus silencing suppressor P0 targets ARGONAUTE proteins for degradation. *Curr Biol* **17**: 1609-1614.
- Blanc, S., Lopez-Moya, J.J., Wang, R., Garcia-Lampasona, S., Thornbury, D.W., and Pirone, T.P. 1997. A specific interaction between coat protein and helper component correlates with aphid transmission of a potyvirus. *Virology* **231**: 141-147.

- Borsani, O., Zhu, J., Verslues, P.E., Sunkar, R., and Zhu, J.K. 2005. Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in Arabidopsis. *Cell* **123**: 1279-1291.
- Brigneti, G., Voinnet, O., Li, W.X., Ji, L.H., Ding, S.W., and Baulcombe, D.C. 1998. Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Embo J* **17**: 6739-6746.
- Brodersen, P., Sakvarelidze-Achard, L., Bruun-Rasmussen, M., Dunoyer, P., Yamamoto, Y.Y., Sieburth, L., and Voinnet, O. 2008. Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science* **320**: 1185-1190.
- Brodersen, P. and Voinnet, O. 2006. The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends Genet* **22**: 268-280.
- Broholm, S.K., Tahtiharju, S., Laitinen, R.A., Albert, V.A., Teeri, T.H., and Elomaa, P. 2008. A TCP domain transcription factor controls flower type specification along the radial axis of the *Gerbera* (Asteraceae) inflorescence. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Carrington, J.C. and Ambros, V. 2003. Role of microRNAs in plant and animal development. *Science* **301**: 336-338.
- Chapman, E.J., Prokhnovsky, A.I., Gopinath, K., Dolja, V.V., and Carrington, J.C. 2004. Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes Dev* **18**: 1179-1186.
- Cheng, Y.Q., Liu, Z.M., Xu, J., Zhou, T., Wang, M., Chen, Y.T., Li, H.F., and Fan, Z.F. 2008. HC-Pro protein of sugar cane mosaic virus interacts specifically with maize ferredoxin-5 in vitro and in planta. *J Gen Virol* **89**: 2046-2054.
- Cronin, S., Verchot, J., Haldeman-Cahill, R., Schaad, M.C., and Carrington, J.C. 1995. Long-distance movement factor: a transport function of the potyvirus helper component proteinase. *Plant Cell* **7**: 549-559.
- Csorba, T., Bovi, A., Dalmay, T., and Burgyan, J. 2007. The p122 subunit of Tobacco Mosaic Virus replicase is a potent silencing suppressor and compromises both small interfering RNA- and microRNA-mediated pathways. *J Virol* **81**: 11768-11780.
- Desbiez, C. and Lecoq, H. 1997. Zucchini yellow mosaic virus. *Plant Pathol* **46**: 809-829.
- Dombrovsky, A., Gollop, N., Chen, S., Chejanovsky, N., and Raccach, B. 2007. In vitro association between the helper component-proteinase of zucchini yellow mosaic virus and cuticle proteins of *Myzus persicae*. *J Gen Virol* **88**: 1602-1610.
- Donaire, L., Barajas, D., Martinez-Garcia, B., Martinez-Priego, L., Pagan, I., and Llave, C. 2008. Structural and genetic requirements for the biogenesis of tobacco rattle virus-derived small interfering RNAs. *J Virol* **82**: 5167-5177.
- Dugas, D.V. and Bartel, B. 2004. MicroRNA regulation of gene expression in plants. *Curr Opin Plant Biol* **7**: 512-520.
- Dunoyer, P., Lecellier, C.H., Parizotto, E.A., Himber, C., and Voinnet, O. 2004. Probing the microRNA and small interfering RNA pathways with virus-encoded suppressors of RNA silencing. *Plant Cell* **16**: 1235-1250.
- Ebhardt, H.A., Thi, E.P., Wang, M.B., and Unrau, P.J. 2005. Extensive 3' modification of plant small RNAs is modulated by helper component-proteinase expression. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 13398-13403.
- Elbashir, S.M., Lendeckel, W., and Tuschl, T. 2001. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* **15**: 188-200.
- Emery, J.F., Floyd, S.K., Alvarez, J., Eshed, Y., Hawker, N.P., Izhaki, A., Baum, S.F., and Bowman, J.L. 2003. Radial patterning of Arabidopsis shoots by class III HD-ZIP and KANADI genes. *Curr Biol* **13**: 1768-1774.
- Epel, B.L., Padgett, H.S., Heinlein, M., and Beachy, R.N. 1996. Plant virus movement protein dynamics probed with a GFP-protein fusion. *Gene* **173**: 75-79.

- Eshed, Y., Pekker, I., Peled, D., Amsellem, Z., Saban, M., Alvarez, J., and Yifhar, T. 2007. THE TOMATO WIRY SYNDROME RESULTS FROM IMPAIRED SILENCING OF SLARF3/4. In *International Plant Growth Substances Association 19th Annual Meeting*, Puerto Vallarata, Mexico.
- Gal-On, A. 2007. Zucchini yellow mosaic virus: insect transmission and pathogenicity; the tails of two proteins. *Molecular Plant Pathology* **8**: 139-150.
- Gal-On, A., Antignus, Y., Rosner, A., and Raccach, B. 1991. Infectious in vitro RNA transcripts derived from cloned cDNA of the cucurbit potyvirus, zucchini yellow mosaic virus. *J Gen Virol* **72 (Pt 11)**: 2639-2643.
- Gal-On, A., Antignus, Y., Rosner, A., and Raccach, B. 1992. A zucchini yellow mosaic virus coat protein gene mutation restores aphid transmissibility but has no effect on multiplication. *J Gen Virol* **73 (Pt 9)**: 2183-2187.
- Gal-On, A., Meiri, E., Huet, H., Hua, W.J., Raccach, B., and Gaba, V. 1995. Particle bombardment drastically increases the infectivity of cloned DNA of zucchini yellow mosaic potyvirus. *J Gen Virol* **76 (Pt 12)**: 3223-3227.
- Gal-On, A. and Raccach, B. 2000. A Point Mutation in the FRNK Motif of the Potyvirus Helper Component-Protease Gene Alters Symptom Expression in Cucurbits and Elicits Protection Against the Severe Homologous Virus. *Phytopathology* **90**: 467-473.
- Gal-On, A. and Shibolet, Y.M. 2005. Cross Protection. in *Natural Resistance Mechanisms of Plants to Viruses* (ed. G. Loebenstein and J.P. Carr), pp. 261-288. Springer, Dordrecht, Netherlands.
- Ghabrial, S. and Zhang, C. 2005. A single amino acid change in potyvirus HcPro abolishes its function as a suppressor of RNA silencing. *Abstracts of the XIII International Congress of Virology* **V-5.182** :54
- Glick, E., Zrachya, A., Levy, Y., Mett, A., Gidoni, D., Belausov, E., Citovsky, V., and Gafni, Y. 2008. Interaction with host SGS3 is required for suppression of RNA silencing by tomato yellow leaf curl virus V2 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 157-161 :105
- González-Jara, P., Atencio, F.A., Martínez-García, B., B., D., T., F., and Díaz-Ruiz, J.R. 2005. A single amino acid mutation in the Plum pox virus helper component-Proteinase gene abolishes both synergistic and RNA silencing suppression activities. *Phytopathology* **95**: 894-901.
- Goto, K., Kobori, T., Kosaka, Y., Natsuaki, T., and Masuta, C. 2007. Characterization of silencing suppressor 2b of cucumber mosaic virus based on examination of its small RNA-binding abilities. *Plant Cell Physiol* **48**.1050-1060 :
- Gregory, B.D., O'Malley, R.C., Lister, R., Urich, M.A., Tonti-Filippini, J., Chen, H., Millar, A.H., and Ecker, J.R. 2008. A link between RNA metabolism and silencing affecting Arabidopsis development. *Dev Cell* **14**: 854-866.
- Himber, C., Dunoyer, P., Moissiard, G., Ritzenthaler, C., and Voinnet, O. 2003. Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing. *Embo J* **22**: 4523-4533.
- Ho, T., Wang, H., Pallett, D., and Dalmay, T. 2007. Evidence for targeting common siRNA hotspots and GC preference by plant Dicer-like proteins. *FEBS Lett* **581**: 3267-3272.
- Huet, H., Gal-On, A., Meir, E., Lecoq, H., and Raccach, 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 (Pt 6)**: 1407-1414.
- Ibrahim, F., Rohr, J., Jeong, W.J., Hesson, J., and Cerutti, H. 2006. Untemplated oligoadenylation promotes degradation of RISC-cleaved transcripts. *Science* **314**: 1893.

- Kadouri, D., Peng, Y., Wang, Y., Singer, S., Huet, H., Raccach, B., and Gal-On, A. 1998. Affinity purification of HC-Pro of potyviruses with Ni²⁺-NTA resin. *J Virol Methods* **76**: 19-29.
- Kasschau, K.D. and Carrington, J.C. 1995. Requirement for HC-Pro processing during genome amplification of tobacco etch potyvirus. *Virology* **209**: 268-273.
- Kasschau, K.D. and 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., and Carrington, J.C. 2003. P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA function. *Dev Cell* **4**: 205-217.
- Katiyar-Agarwal, S., Morgan, R., Dahlbeck, D., Borsani, O., Villegas, A., Jr., Zhu, J.K., Staskawicz, B.J., and Jin, H. 2006. A pathogen-inducible endogenous siRNA in plant immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 18002-18007.
- Kim, J., Jung, J.H., Reyes, J.L., Kim, Y.S., Kim, S.Y., Chung, K.S., Kim, J.A., Lee, M., Lee, Y., Narry Kim, V., Chua, N.H., and Park, C.M. 2005. microRNA-directed cleavage of ATHB15 mRNA regulates vascular development in Arabidopsis inflorescence stems. *Plant J* **42**: 84-94.
- Kimalov, B., Gal-On, A., Stav, R., Belausov, E., and Arazi, T. 2004. Maintenance of coat protein N-terminal net charge and not primary sequence is essential for zucchini yellow mosaic virus systemic infectivity. *J Gen Virol* **85**: 3421-3430.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lakatos, L., Csorba, T., Pantaleo, V., Chapman, E.J., Carrington, J.C., Liu, Y.P., Dolja, V.V., Calvino, L.F., Lopez-Moya, J.J., and Burgyan, J. 2006. Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *EMBO J* **25**: 2768-2780.
- Lakatos, L., Szittyá, G., Silhavy, D., and Burgyan, J. 2004. Molecular mechanism of RNA silencing suppression mediated by p19 protein of tombusviruses. *EMBO J* **23**: 876-884.
- Li, F. and Ding, S.W. 2006. Virus counterdefense: Diverse strategies for evading the RNA silencing immunity. *Ann Rev Microbiol* **60**: 503-531.
- Li, X. and Zhang, Y.Z. 2005. Computational detection of microRNAs targeting transcription factor genes in Arabidopsis thaliana. *Comput Biol Chem* **29**: 360-367.
- Lim, H.S., Ko, T.S., Hobbs, H.A., Lambert, K.N., Yu, J.M., McCoppin, N.K., Korban, S.S., Hartman, G.L., and Domier, L.L. 2007. Soybean mosaic virus helper component-protease alters leaf morphology and reduces seed production in transgenic soybean plants. *Phytopathology* **97**: 366-372.
- Lin, M.K., Belanger, H., Lee, Y.J., Varkonyi-Gasic, E., Taoka, K., Miura, E., Xoconostle-Cazares, B., Gendler, K., Jorgensen, R.A., Phinney, B., Lough, T.J., and Lucas, W.J. 2007a. FLOWERING LOCUS T protein may act as the long-distance florigenic signal in the cucurbits. *Plant Cell* **19**: 1488-1506.
- Lin, S.S., Wu, H.W., Jan, F.J., Hou, R.F., and Yeh, S.D. 2007b. Modifications of the helper component-protease of Zucchini yellow mosaic for generation of attenuated mutants for cross protection against severe infection. *Phytopathology* **97**: 287-296.
- Liu, H.-H., Tian, X., Li, Y.-J., Wu, C.-A., and Zheng, C.-C. 2008. Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in Arabidopsis thaliana. *RNA* **14**: 836-843.
- Llave, C., Xie, Z., Kasschau, K.D., and Carrington, J.C. 2002. Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA. *Science* **297**: 2053-2056.
- Lobbes, D., Rallapalli, G., Schmidt, D.D., Martin, C., and Clarke, J. 2006. SERRATE: a new player on the plant microRNA scene. *EMBO Rep* **7**: 1052-1058.

- Lu, C., Tej, S.S., Luo, S., Haudenschild, C.D., Meyers, B.C., and Green, P.J. 2005. Elucidation of the small RNA component of the transcriptome. *Science* **309**: 1567-1569.
- Lu, R., Folimonov, A., Shintaku, M., Li, W.X., Falk, B.W., Dawson, W.O., and Ding, S.W. 2004. Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20-kb viral RNA genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 15742-15747.
- Mallory, A.C., Reinhart, B.J., Bartel, D., Vance, V.B., and Bowman, L.H. 2002. A viral suppressor of RNA silencing differentially regulates the accumulation of short interfering RNAs and micro-RNAs in tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 15228-15233.
- McConnell, J.R., Emery, J., Eshed, Y., Bao, N., Bowman, J., and Barton, M.K. 2001. Role of PHABULOSA and PHAVOLUTA in determining radial patterning in shoots. *Nature* **411**: 709-713.
- McHale, N.A. and Koning, R.E. 2004. MicroRNA-directed cleavage of *Nicotiana sylvestris* PHAVOLUTA mRNA regulates the vascular cambium and structure of apical meristems. *Plant Cell* **16**: 1730-1740.
- Merai, Z., Kerenyi, Z., Kertesz, S., Magna, M., Lakatos, L., and Silhavy, D. 2006. Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing. *J Virol* **80**: 5747-5756.
- Mi, S., Cai, T., Hu, Y., Chen, Y., Hodges, E., Ni, F., Wu, L., Li, S., Zhou, H., Long, C., Chen, S., Hannon, G.J., and Qi, Y. 2008. Sorting of small RNAs into Arabidopsis argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide. *Cell* **133**: 116-127.
- Millar, A.A. and Gubler, F. 2005. The Arabidopsis GAMYB-like genes, MYB33 and MYB65, are microRNA-regulated genes that redundantly facilitate anther development. *Plant Cell* **17**: 705-721.
- Mlotshwa, S., Schauer, S.E., Smith, T.H., Mallory, A.C., Herr, J.M., Jr., Roth, B., Merchant, D.S., Ray, A., Bowman, L.H., and Vance, V.B. 2005. Ectopic DICER-LIKE1 expression in P1/HC-Pro Arabidopsis rescues phenotypic anomalies but not defects in microRNA and silencing pathways. *Plant Cell* **17**: 2873-2885.
- Mlotshwa, S., Voinnet, O., Mette, M.F., Matzke, M., Vaucheret, H., Ding, S.W., Pruss, G., and Vance, V.B. 2002. RNA silencing and the mobile silencing signal. *Plant Cell* **14 Suppl**: S289-301.
- Molnar, A., Csorba, T., Lakatos, L., Varallyay, E., Lacomme, C., and Burgyan, J. 2005. Plant virus-derived small interfering RNAs originate predominantly from highly structured single-stranded viral RNAs. *J Virol* **79**: 7812-7818.
- Montgomery, T.A., Howell, M.D., Cuperus, J.T., Li, D., Hansen, J.E., Alexander, A.L., Chapman, E.J., Fahlgren, N., Allen, E., and Carrington, J.C. 2008. Specificity of ARGONAUTE7-miR390 interaction and dual functionality in TAS3 trans-acting siRNA formation. *Cell* **133**: 128-141.
- Ochando, I., Jover-Gil, S., Ripoll, J.J., Candela, H., Vera, A., Ponce, M.R., Martinez-Laborda, A., and Micol, J.L. 2006. Mutations in the MicroRNA Complementarity Site of the INCURVATA4 Gene Perturb Meristem Function and Adaxialize Lateral Organs in Arabidopsis. *Plant Physiol* **141**: 607-619.
- Okushima, Y., Mitina, I., Quach, H.L., and Theologis, A. 2005. AUXIN RESPONSE FACTOR 2 (ARF2): a pleiotropic developmental regulator. *Plant J* **43**: 29-46.
- Ori, N., Cohen, A.R., Etzioni, A., Brand, A., Yanai, O., Shleizer, S., Menda, N., Amsellem, Z., Efroni, I., Pekker, I., Alvarez, J.P., Blum, E., Zamir, D., and Eshed, Y. 2007. Regulation of LANCEOLATE by miR319 is required for compound-leaf development in tomato. *Nat Genet* **39**: 787-791.

- Palatnik, J.F., Wollmann, H., Schommer, C., Schwab, R., Boisbouvier, J., Rodriguez, R., Warthmann, N., Allen, E., Dezulian, T., Huson, D., Carrington, J.C., and Weigel, D. 2007. Sequence and expression differences underlie functional specialization of arabidopsis microRNAs miR159 and miR319. *Dev Cell* **13**: 115-125.
- Pall, G.S., Codony-Servat, C., Byrne, J., Ritchie, L., and Hamilton, A. 2007. Carbodiimide-mediated cross-linking of RNA to nylon membranes improves the detection of siRNA, miRNA and piRNA by northern blot. *Nucleic Acids Res* **35**: e60.
- Pekker, I., Alvarez, J.P., and Eshed, Y. 2005. Auxin response factors mediate Arabidopsis organ asymmetry via modulation of KANADI activity. *Plant Cell* **17**: 2899-2910.
- Peragine, A., Yoshikawa, M., Wu, G., Albrecht, H.L., and Poethig, R.S. 2004. SGS3 and SGS2/SDE1/RDR6 are required for juvenile development and the production of trans-acting siRNAs in Arabidopsis. *Genes Dev* **18**: 2368-2379.
- Pirone, T. and Blanc, S. 1996. Helper-dependent vector transmission of plant viruses. *Ann Rev Phytopathol* **34**: 227-247.
- Plisson, C., Drucker, M., Blanc, S., German-Retana, S., Le Gall, O., Thomas, D., and Bron, P. 2003. Structural characterization of HC-Pro, a plant virus multifunctional protein. *J Biol Chem* **278**: 23753-23761.
- Prigge, M.J., Otsuga, D., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Drews, G.N., and Clark, S.E. 2005. Class III homeodomain-leucine zipper gene family members have overlapping, antagonistic, and distinct roles in Arabidopsis development. *Plant Cell* **17**: 61-76.
- Reinhart, B.J., Weinstein, E.G., Rhoades, M.W., Bartel, B., and Bartel, D.P. 2002. MicroRNAs in plants. *Genes Dev* **16**: 1616-1626.
- Reyes, J.L. and Chua, N.H. 2007. ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during Arabidopsis seed germination. *Plant J* **49**: 592-606.
- Rich, A. 1956. Recent studies on the structure of ribonucleic acid. *Prog Neurol Psychiatry* **1**: 114-121.
- Ruiz-Ferrer, V., Boskovic, J., Alfonso, C., Rivas, G., Llorca, O., Lopez-Abella, D., and Lopez-Moya, J.J. 2005. Structural analysis of tobacco etch potyvirus HC-pro oligomers involved in aphid transmission. *J Virol* **79**: 3758-3765.
- Saenz, P., Quiot, L., Quiot, J.B., Candresse, T., and Garcia, J.A. 2001. Pathogenicity determinants in the complex virus population of a Plum pox virus isolate. *Mol Plant Microbe Interact* **14**: 278-287.
- Schwach, F., Vaistij, F.E., Jones, L., and Baulcombe, D.C. 2005. An RNA-dependent RNA polymerase prevents meristem invasion by potato virus X and is required for the activity but not the production of a systemic silencing signal. *Plant Physiol* **138**: 1842-1852.
- Shen, B. and Goodman, H.M. 2004. Uridine addition after microRNA-directed cleavage. *Science* **306**: 997.
- Shi, X.M., Miller, H., Verchot, J., Carrington, J.C., and Vance, V.B. 1997. Mutations in the region encoding the central domain of helper component-proteinase (HC-Pro) eliminate potato virus X/potyviral synergism. *Virology* **231**: 35-42.
- Shiboleth, Y.M., Arazi, T., Wang, Y., and Gal-On, A. 2001. A new approach for weed control in a cucurbit field employing an attenuated potyvirus-vector for herbicide resistance. *J Biotechnol* **92**: 37-46.
- Shiboleth, Y.M., Haronsky, E., Leibman, D., Arazi, T., Wassenegger, M., Whitham, S.A., Gaba, V., and Gal-On, A. 2007. The conserved FRNK box in HC-Pro, a plant viral suppressor of gene silencing, is required for small RNA binding and mediates symptom development. *J Virol* **81**: 13135-13148.
- Shukla, D.D., Ward, C.W., and Brunt, A.A. 1994. The Potyviridae. *CAB International*.

- Silhavy, D., Molnar, A., Lucioli, A., Szittyá, G., Hornyik, C., Tavazza, M., and Burgyan, J. 2002. A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *EMBO J* **21**: 3070-3080.
- Talbert, P.B., Adler, H.T., Parks, D.W., and Comai, L. 1995. The REVOLUTA gene is necessary for apical meristem development and for limiting cell divisions in the leaves and stems of *Arabidopsis thaliana*. *Development* **121**: 2723-2735
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673-4680
- Tian, B., Bevilacqua, P.C., Diegelman-Parente, A., and Mathews, M.B. 2004. The double-stranded-RNA-binding motif: interference and much more. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 1013-1023.
- Urcuqui-Inchima, S., Maia, I.G., Arruda, P., Haenni, A.L., and Bernardi, F. 2000. Deletion mapping of the potyviral helper component-proteinase reveals two regions involved in RNA binding. *Virology* **268**: 104-111.
- Urcuqui-Inchima, S., Walter, J., Drugeon, G., German-Retana, S., Haenni, A.L., Candresse, T., Bernardi, F., and Le Gall, O. 1999. Potyvirus helper component-proteinase self-interaction in the yeast two-hybrid system and delineation of the interaction domain involved. *Virology* **258**: 95-99.
- van Tilbeurgh, H., Manival, X., Aymerich, S., Lhoste, J.M., Dumas, C., and Kochoyan, M. 1997. Crystal structure of a new RNA-binding domain from the antiterminator protein SacY of *Bacillus subtilis*. *EMBO J* **16**: 5030-5036.
- Vargason, J.M., Szittyá, G., Burgyan, J., and Tanaka Hall, T.M. 2003. Size selective recognition of siRNA by an RNA silencing suppressor. *Cell* **115**: 799-811.
- Varrelmann, M., Maiss, E., Pilot, R., and Palkovics, L. 2007. Use of pentapeptide-insertion scanning mutagenesis for functional mapping of the plum pox virus helper component proteinase suppressor of gene silencing. *J Gen Virol* **88**: 1005-1015.
- Vaucheret, H. 2008. Plant ARGONAUTES. *Trends Plant Sci* **13**: 350-358.
- Vaucheret, H., Mallory, A.C., and Bartel, D.P. 2006. AGO1 homeostasis entails coexpression of MIR168 and AGO1 and preferential stabilization of miR168 by AGO1. *Mol Cell* **22**: 129-136.
- Vaucheret, H., Vazquez, F., Crete, P., and Bartel, D.P. 2004. The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development. *Genes Dev* **18**: 1187-1197.
- Verchot, J., Herndon, K.L., and 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.
- Voinnet, O. 2005. Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nat Rev Genet* **6**: 206-220.
- Voinnet, O. 2008. Use, tolerance and avoidance of amplified RNA silencing by plants. *Trends Plant Sci*.
- Wang, M.B. and Metzloff, M. 2005. RNA silencing and antiviral defense in plants. *Curr Opin Plant Biol* **8**: 216-222.
- Wang, Y., Gaba, V., Yang, J., Palukaitis, P., and Gal-on, A. 2002. Characterization of synergy between Cucumber mosaic virus and potyviruses in cucurbit hosts. *Phytopathology* **92**: 51-58.
- Wang, Y., Lee, K.C., Gaba, V., Wong, S.M., Palukaitis, P., and Gal-On, A. 2004. Breakage of resistance to Cucumber mosaic virus by co-infection with Zucchini yellow mosaic

- virus: enhancement of CMV accumulation independent of symptom expression. *Arch Virol* **149**: 379-396.
- Wassenegger, M. and Pelissier, T. 1998. A model for RNA-mediated gene silencing in higher plants. *Plant Mol Biol* **37**: 349-362.
- Wesley, S.V., Helliwell, C.A., Smith, N.A., Wang, M.B., Rouse, D.T., Liu, Q., Gooding, P.S., Singh, S.P., Abbott, D., Stoutjesdijk, P.A., Robinson, S.P., Gleave, A.P., Green, A.G., and Waterhouse, P.M. 2001. Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J* **27**: 581-590.
- Whitham, S.A., Quan, S., Chang, H.S., Cooper, B., Estes, B., Zhu, T., Wang, X., and Hou, Y.M. 2003. Diverse RNA viruses elicit the expression of common sets of genes in susceptible *Arabidopsis thaliana* plants. *Plant J* **33**: 271-283.
- Whitham, S.A., Yang, C., and Goodin, M.M. 2006. Global impact: elucidating plant responses to viral infection. *Mol Plant Microbe Interact* **19**: 1207-1215.
- Williams, L., Carles, C.C., Osmont, K.S., and Fletcher, J.C. 2005a. A database analysis method identifies an endogenous trans-acting short-interfering RNA that targets the *Arabidopsis* ARF2, ARF3, and ARF4 genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 9703-9708.
- Williams, L., Grigg, S.P., Xie, M., Christensen, S., and Fletcher, J.C. 2005b. Regulation of *Arabidopsis* shoot apical meristem and lateral organ formation by microRNA miR166g and its AtHD-ZIP target genes. *Development* **132**: 3657-3668.
- Winer, J., Jung, C.K., Shackel, I., and Williams, P.M. 1999. Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. *Anal Biochem* **270**: 41-49.
- Xie, Z., Allen, E., Wilken, A., and Carrington, J.C. 2005. DICER-LIKE 4 functions in trans-acting small interfering RNA biogenesis and vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 12984-12989.
- Xie, Z., Johansen, L.K., Gustafson, A.M., Kasschau, K.D., Lellis, A.D., Zilberman, D., Jacobsen, S.E., and Carrington, J.C. 2004. Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol* **2**: E104.
- Xie, Z., Kasschau, K.D., and Carrington, J.C. 2003. Negative feedback regulation of Dicer-Like1 in *Arabidopsis* by microRNA-guided mRNA degradation. *Curr Biol* **13**: 784-789.
- Yang, C., Guo, R., Jie, F., Nettleton, D., Peng, J., Carr, T., Yeakley, J.M., Fan, J.B., and Whitham, S.A. 2007. Spatial analysis of *Arabidopsis thaliana* gene expression in response to Turnip mosaic virus infection. *Mol Plant Microbe Interact* **20**: 358-370.
- Ye, K., Malinina, L., and Patel, D.J. 2003. Recognition of small interfering RNA by a viral suppressor of RNA silencing. *Nature* **426**: 874-878.
- Ye, K. and Patel, D.J. 2005. RNA silencing suppressor p21 of Beet yellows virus forms an RNA binding octameric ring structure. *Structure* **13**: 1375-1384.
- Yoo, B.C., Kragler, F., Varkonyi-Gasic, E., Haywood, V., Archer-Evans, S., Lee, Y.M., Lough, T.J., and Lucas, W.J. 2004. A systemic small RNA signaling system in plants. *Plant Cell* **16**: 1979-2000.
- Yu, B., Chapman, E.J., Yang, Z., Carrington, J.C., and Chen, X. 2006. Transgenically expressed viral RNA silencing suppressors interfere with microRNA methylation in *Arabidopsis*. *FEBS Lett* **580**: 3117-3120.
- Zechmann, B., Muller, M., and Zellnig, G. 2003. Cytological modifications in zucchini yellow mosaic virus (ZYMV)-infected Styrian pumpkin plants. *Arch Virol* **148**: 1119-1133.

- Zechmann, B., Zellnig, G., Urbanek-Krajnc, A., and Muller, M. 2007. Artificial elevation of glutathione affects symptom development in ZYMV-infected *Cucurbita pepo* L. plants. *Arch Virol* **152**: 747-762.
- Zhang, B., Pan, X., Cannon, C.H., Cobb, G.P., and Anderson, T.A. 2006a. Conservation and divergence of plant microRNA genes. *Plant J* **46**: 243-259.
- Zhang, X., Du, P., Lu, L., Xiao, Q., Wang, W., Cao, X., Ren, B., Wei, C., and Li, Y. 2008. Contrasting effects of HC-Pro and 2b viral suppressors from Sugarcane mosaic virus and Tomato aspermy cucumovirus on the accumulation of siRNAs. *Virology* **374**: 351-360.
- Zhang, X., Yuan, Y.R., Pei, Y., Lin, S.S., Tuschl, T., Patel, D.J., and Chua, N.H. 2006b. Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits Arabidopsis Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes Dev* **20**: 3255-3268.
- Zhao, T., Li, G., Mi, S., Li, S., Hannon, G.J., Wang, X.J., and Qi, Y. 2007. A complex system of small RNAs in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genes Dev* **21**: 1190-1203.
- Zilberman, D., Cao, X., Johansen, L.K., Xie, Z., Carrington, J.C., and Jacobsen, S.E. 2004. Role of Arabidopsis ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation triggered by inverted repeats. *Curr Biol* **14**: 1214-1220.
- Zuker, M. 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* **31**: 3406-3415.

**Involvement of the *Zucchini yellow mosaic virus*
Helper-Component protein in the development of
viral disease symptoms in cucurbits.**

Thesis submitted for the degree of
"Doctor of philosophy"

by
Yoel Moshe Shibolet

Submitted to the Senate of the Hebrew University

September 2008

Contents

| | |
|--|------------|
| Table of contents | c |
| Abbreviation list | e |
| Hebrew abstract | 1 |
| Introduction | 5 |
| Description of the virus..... | 5 |
| Symptoms | 6 |
| RNA-silencing | 6 |
| Post transcriptional gene silencing..... | 8 |
| Suppression of gene silencing..... | 10 |
| Helper-component protein | 11 |
| Research objectives..... | 14 |
| Materials and methods | 14 |
| Plants, virus inoculation and sample collection..... | 14 |
| Plasmids | 15 |
| Primers and probes..... | 17 |
| RNA | 20 |
| GFP suppression assay..... | 24 |
| Real-time Q-PCR | 24 |
| Protein quantitation..... | 26 |
| Electromobility shift assay (EMSA)..... | 27 |
| Results | 30 |
| Identification of amino-acids in FRNK box of HC-Pro involved in symptoms | 30 |
| Suppression of plant silencing | 34 |
| Biochemical characterization of HC-Pro- smRNA-duplex binding | 40 |
| Identification of miRNA and miRNA-targets involved in symptoms | 50 |
| Discussion | 89 |
| Apendix | 107 |
| Bibliography | 108 |
| English contents | i |
| English abstract | iii |

Abstract

Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) belongs to the *Potyvirus* group of the *Potyviridae* family. ZYMV symptoms in cucurbits include yellowing, dwarfing, fruit and seed deformities and the appearance of filamentous leaves together with mosaic and dark green islands.

In this work we examined the molecular basis for ZYMV disease formation in plants.

To this purpose we investigated activities of the potyviral Helper component proteinase (HC-Pro) protein known to be a pathogenicity factor. Overexpression of HC-Pro in transgenic *Arabidopsis thaliana* elicits phenotypes similar to viral symptoms. HC-Pro has many roles, one of the main tasks being that of RNA-silencing suppressor (RSS) which allows the potyvirus to defend itself against the plant viral defense system. The plant anti-viral RNA-silencing system and the plant self-regulatory post-transcriptional gene-silencing (PTGS) pathway share many components such as RISC, DICER, RDR and small RNAs (smRNA). Transgenic plants with disrupted biosynthesis or action of components of the silencing pathway have severe developmental defects which phenocopy symptoms appearing in virus infected plants. However, there is a gap between the knowledge that HC-Pro is a pathogenicity factor and the deficiency of information concerning its mode of action in the plant cell, and the chain of events leading to symptoms.

To investigate this question we used attenuated strains of ZYMV. A single point-mutation in the conserved motif FRNK, positioned in the central domain of the HC-Pro protein, from FRNK to FINK (R₁₈₀I), where the charged amino-acid Arginine (R) is replaced by an uncharged Isoleucine (I), causes a drastic reduction in virus symptoms in squash leaves. Squash plants are nearly symptomless 5 days post-infection (dpi) whether infected with the severe wild type ZYMV^{FRNK}, or with the attenuated ZYMV^{FINK}. We found HC-Pro protein

levels accumulate equally in leaves of plants infected with either strain at this time.

We then investigated the effect of charge reduction in the FRNK box on the role of HC-Pro in suppression of the antiviral defense system. We measured the level of small interfering RNA (siRNA) of viral-genomic origin (vsiRNA) in plants infected with either the wild type or the attenuated virus ZYMV^{FINK}, and found, that this mutation does not affect vsiRNA accumulation at 5 dpi. Moreover, utilizing an overexpression assay in absence of virus, HC-Pro action as an RSS was found similar between the wildtype HC^{FRNK} and the mutants HC^{FINK} and HC^{FRNA}. Thus we could not find a correlation between symptom attenuation and these aspects of RSS activity.

microRNA (miRNA) are a large group of smRNAs which confer specificity to the negative regulation of different "miRNA target genes", mainly post-transcriptionally. During miRNA biosynthesis, a double-stranded intermediate product, the miRNA/miRNA* duplex, is produced. miRNA is subsequently incorporated into RISC, while miRNA*, the by-product, is rapidly degraded. It was shown that HC-Pro binds siRNA duplexes. Thus we tested the possibility that the attenuating FINK mutation affects the interaction between HC-Pro and siRNA or miRNA/miRNA duplexes using an Electromobility Shift Assay. We found that these duplexes bind HC-Pro in wild-type ZYMV^{FRNK} infected squash extracts, but HC-Pro from ZYMV^{FINK} bound much less duplex. Duplexes were also bound in *N. benthamiana* leaf extracts overexpressing HC-Pro protein in absence of virus. We found that two positively charged amino-acid residues in the FRNK box are necessary for efficient duplex binding. Biochemical tests revealed that HC^{FRNK} bound siRNA-like duplexes in a non-cooperative fashion with a binding coefficient K_m of about 150 nM, and that HC^{FINK} binds duplex with an affinity about 33 times lower. Thus, we found a correlation between binding affinity and symptoms of the virus carrying the said mutation.

In view of our findings, we tested the possibility that binding by HC-Pro affects the levels of plant miRNAs thereby affecting plant disease phenotype. Using microarrays to detect known miRNAs and their predicted miRNA* partners we compared wildtype ZYMV^{FRNK}- or attenuated ZYMV^{FINK}-infected squash to uninfected controls. Results show many evolutionarily conserved miRNAs are highly expressed in squash. We discovered that infection with the severe ZYMV^{FRNK} blocks the natural degradation of miRNA*, and thus we assume that HC^{FRNK} binds miRNA/miRNA* duplexes *in-vivo*. In contrast, infection with the attenuated ZYMV^{FINK} blocked degradation to a similar level only in a subgroup of miRNA*. This group was characterized by its predicted near-perfect miRNA/miRNA* double-helix structure. Conversely, when the helix contained multiple mismatches or helix structure was deformed by insertions/deletions, a significant difference in miRNA* accumulation was observed between the two ZYMV strains. Thus, it is possible that there are duplexes that bind HC^{FINK} *in-vivo* better than others. Additionally, most miRNA and miRNA* accumulation caused by virus infection took place by 5 dpi, before symptom appearance. As there is a possibility that duplex-binding by HC-Pro causes sequestration of miRNA and reduction in RISC-accessible miRNAs, we hypothesized that miRNA target genes would accumulate in an uncontrolled manner. To test this prospect we cloned parts of 10 predicted miRNA- or trans-acting siRNA (ta-siRNA) target genes. Each of these had the appropriate smRNA binding site. Transcript levels of these genes were monitored using real-time RT-Q-PCR, utilizing primers flanking the predicted cleavage site to prevent the amplification of cleaved transcripts. ZYMV^{FRNK} infection caused a higher rise in uncleaved transcript accumulation than that of ZYMV^{FINK} in a small number of genes. The accumulative mRNA levels of INCURVATA-4 and PHAVOLUTA, both miR166-targeted HD-ZIP family transcription factors rise upon infection with the severe ZYMV^{FRNK} already in the first true leaf at 5 dpi. This, together with the importance of HD-ZIP proteins in plant developmental

control, fits the theory that an uncontrolled increase in these proteins could contribute to the symptoms seen later on in virus infections.

In this work we also assayed the level of a ta-siRNA which regulates Auxin response factor (ARF) levels and which is produced from the *TAS3* transcript. *TAS3* is a target of AGO7-miR390. We found that both virus-strains, and especially the severe ZYMV^{FRNK}, inhibit the accumulation of this ta-siRNA, especially at later times. This finding fits the assumption that miR390 sequestration by HC-Pro will reduce ta-siRNA biosynthesis. However, subsequent accumulation of ARF mRNAs could not be detected.

Due to the importance of the gene ARGONAUTE-1 (AGO1) in the silencing pathway and in virus-defense, being the protein component of RISC, it was imperative that we check how this gene's regulation by miR168-RISC is affected by virus infection. We found that infection with ZYMV^{FRNK}, and to a lesser extent with ZYMV^{FINK}, causes an increase in transcription of the AGO1 gene, and that these viruses do not block the cleavage of AGO1 transcript by RISC. Therefore, it is possible that the plant successfully compensates for the competition between AGO1 and HC-Pro for miRNA by enhancing AGO1 transcription. Thus, it is conceivable that a higher accumulation of AGO1 protein might allow a certain reduction and balancing of active target gene transcript levels despite the presence of HC-Pro.

In summary, the current work has resulted in a better understanding of the viral HC-Pro mechanism in eliciting ZYMV disease symptoms in cucurbits.

Further work is required to disentangle the effects of transcriptional, post-transcriptional and translational events modified as a result of miRNA sequestration by HC-pro.