

איפיון רצפים ב- *Grapevine virus A*
האחראיים על דיכוי מנגנון השתקת RNA
ופתוגניות בצמחים

עבודת הגמר

מוגשת לחוג העל-פקולטאי לביוטכנולוגיה
של האוניברסיטה העברית בירושלים
לשם קבלת תואר "מוסמך בביוטכנולוגיה"

מאת

סטוקלוב סבטלנה

עבודה זו נעשתה בהדרכתו של

דר' מוניר מוואסי

העבודה בוצעה במעבדה ע"ש טולקובסקי

המחלקה לפתולוגיה של צמחים, היחידה לוירולוגיה

מנהל המחקר החקלאי

בית דגן.

**עבודה זו מוקדשת להוריי היקרים ולדימיר וגלינה
ולבעלי האהוב, ולדימיר**

ברצוני להודות למספר אנשים אשר תרמו ועזרו בעבודתי זו :

תודה מיוחדת לדר' מוניר מוואסי על היחס הנפלא, סבלנותו, הדרכתו הצמודה ותמיכתו המתמדת

לפרופ' Valerian V. Dolja על מעורבותו ועצותיו המאירות

לדר' ידידיה גפני ודר' David Baulcombe על סיפוק דני"א משובט של מדכאים

לאדי בלאוסוב על העזרה והצילום במיקרוסקופ הקונפוקלי

לפסח קציר על שעסק בטיפול צמחי הבנטמיינה בחממות

תודה אישית לכל אחד מחברי המעבדה בעבר ובהווה על העזרה והאווירה הנהדרת : פרופ' משה בר יוסף, אני פינגשטיין, לנה ביר, סברינה חביב, מרינה ברומין, תומר גרשון, אהרון בללו, יוני מוסקוביץ, M. Muruganatham, אוזגור בטומן, הילה יחזקל, תמר חורש.

חלק מתוצאות עבודה זו הוצגו בכנס הבינלאומי ה-15 לחקר מחלות ויראליות ומחלות דמויי וירוס של הגפן :

15TH Meeting of the international council for the study of virus and virus-like diseases of grapevine (2006), Stellenbosch, South Africa.

עבודת זו זכתה במלגת הצטיינות מטעם החברה הישראלית לפיטופתולוגיה לתלמידים המתמחים בתחום מחלות הצמחים ותודותי להם.

תוכן עניינים

1		רשימת קיצורים
3		תקציר
6	1.1 השתקת ביטוי גנים בצמחים	1. סקירת ספרות
6	1.1.1 עיקרון ההשתקה (PTGS)	
7	1.1.2 משרים למנגנון השתקת גנים	
8	1.1.3 תנועת הסיגנל להשתקה בצמח	
9	1.2 דיכוי מנגנון השתקת ה-RNA	
9	1.2.1 מנגנוני פעולה של חלבוני ה-RSSs	
10	1.2.2 דיכוי מנגנון ההשתקה ע"י וירוסים של DNA	
10	1.2.3 אנליזות פונקציונליות לצורך זיהוי RSSs פוטנציאליים	
11	1.2.4 האם כל הוירוסים הפתוגניים לצמחים מקודדים לגן מדכא של מנגנון ההשתקה הצמחי?	
12	1.2.5 דיכוי מנגנון ההשתקה בתור כלי מחקרי	
12	1.3 תפקיד פוטנציאלי של ההומולוג היראלי של AIKB בתיקון DNA ו-PTGS RNA ודיכוי מנגנון	
13	מאפיינים בולטים שנחשפו באנליזות השוואתיות באתרים דמויי AIKB בגנום של וירוסים צמחיים	
13	מקורו של אתר ה-AIKB בוירוסים	
14	1.4 מחלות וירוסים בגפן	
14	1.4.1 מחלות וירוסים עיקריות בגפן	
14	1.4.2 מחלת הניקרון של הגפן (RW-Rugose Wood disease)	
15	Vitiviruses 1.5	
15	1.5.1 GVA (<i>Grapevine Virus A</i>)	
16		מטרות המחקר
17	שיטות עבודה עם חיידקים	2. שיטות וחומרים
17	2.1 מצעים לגידול חיידקים	
17	2.2 טרנספורציה של פלסמידים לחיידקים	
18	שיטות עבודה עם DNA פלסמידי	
18	2.3 הפקת DNA פלסמידי מהחיידקים	
18	2.4 החלקת קצוות ה-DNA ע"י Klenow Fragment	
19	2.5 זיהוי והפרדה של DNA בגיל אגרוז	
19	2.6 ליגציית DNA לפלסמיד	

19	שיטות עבודה עם DNA גנומי
19	2.7 הכנת cDNA
19	2.8 הגברת מקטעי DNA ע"י PCR (Polymerase Chain Reaction)
20	Overlapped PCR 2.9
20	2.10 טרנסקריפציה (ריאקציית שיעתוק)
20	שיטות עבודה עם צמחים
20	2.11 הדבקת צמחי <i>N. benthamiana</i> בתעתיק של ה-GVA
20	2.12 הדבקת צמחי <i>N. benthamiana</i> בריאים במיצוי צמח נגוע ב-GVA
20	2.13 בידוד פרוטופלסטים והדבקתם עם תעתיק (RNA סינטטי)
22	2.14 אגרו-אינפילטרציה וזיהוי eGFP
23	שיטות עבודה עם RNA
23	2.15 מיצוי של Total RNA מפרוטופלסטים
23	2.16 הפקת Total RNA
23	2.17 Northern Blotting
25	2.18 זיהוי מקטעי siRNA
27	שיטות עבודה עם חלבונים
27	2.19 הפרדת חלבונים בג'ל אקרילאמיד בנוכחות SDS (SDS- PAGE)
	2.19.1 הפקת חלבונים
	2.19.2 אלקטרופורזה
	2.19.3 אנליזת Western blot
28	2.20 פלסמידים (וקטורים המשמשים לשיבוט קטעי DNA)
30	3.1 בניית שבט pGVA-GFP-252
32	3.2 שיבוט של pGVA-GFP-252 לתוך פלסמיד pCAMBIA (יצירת שבט pGVA-GFP-256)
33	3.3 בניית מערכת מינירפליקון (שבט pGVA-GFP-260) לבחינת דיכוי מנגנון ההשתקה הצמחי
35	3.4 שיבוט של pGVA-GFP-260 לתוך פלסמיד ה-pCAMBIA
36	3.5 בחינת מדכאים שונים במערכת של מינירפליקון
36	3.6 בחינת דיכוי מנגנון ההשתקה הצמחי ע"י תוצר ORF5
38	3.7 בחינת דיכוי מנגנון ההשתקה הצמחי ע"י הוירוס השלם של GVA (שבט pGVA-174)
38	3.8 בחינת הפעילות המדכאת ע"י תוצר ORF5 במערכת של מינירפליקון
39	אנליזת תוצאות דיכוי ההשתקה שהתקבלו עם המדכאים השונים

3. תוצאות

40	3.9 בדיקת ספציפיות רצף ה- enhancer לוירוס ה-GVA
40	3.10 נסיונות לאפיון המרכיבים במינירפליקון האחראיים להגברת הפעילות המדכאת של ORF5 :
	3.10.1 בדיקת חשיבות ORF1 להגברת הדיכוי
	3.10.2 בדיקת חשיבות ORF2 להגברת הדיכוי
45	3.11 siRNA
47	3.12 בחינת מעורבותו של ההומולוג הויראלי של חלבון ה-AlkB בפתוגנזה :
	3.12.1 שלבי שיבוט המוטנטים בתוך רצף השבט pGVA-GFP-252
	3.12.2 בחינת אינפקטיביות השבטים של GVA עם המוטציות באתר ה- AlkB
54	
55	4.1 בניית שבט אינפקטיבי של GVA המבטא גן מדווח של eGFP בצמחי <i>N. benthamiana</i>
55	4.2 דיכוי מנגנון ההשתקה הצמחי (PTGS) ע"י וירוס ה- GVA
57	4.3 בחינת המרכיבים במינירפליקון pGVA-GFP-269 התורמים להגברת הפעילות של תוצר ORF5 בדיכוי PTGS
58	4.4 siRNA
59	4.5 בחינת מעורבותו של ההומולוג הויראלי של ה-AlkB בפתוגנזה של וירוס ה- GVA
61	4.6 קיימת חשיבות בהבנת ולימוד מנגנון ה-PTGS אשר טומן בחובו פתרונות ביוטכנולוגיים רבים

4. דיון ומסקנות

63	<u>נספח 1</u> : רצף 20 אתרים של הומולוגים ויראליים דמויי AlkB	רשימת ספרות
	<u>נספח 2</u> : רשימת תחלים כללית לבניית שבטים ובדיקתם	נספחים
	<u>נספח 3</u> : רשימת תחלים ששימשו ליצירת מוטציות נקודתיות באתר ה-AlkB	
	<u>נספח 4</u> : דוגמא ליצירת מוטציה נקודתית בחומצת אמינו Q באתר ה-AlkB	

תקציר-אנגלית

רשימת קיצורים

ALB	Agarose loading buffer
AMV	<i>Avian myeloblastosis virus</i>
AP	Alkaline phosphatase
APS	Ammonium per sulphate
ARM	Arginine reach motif
<i>A.tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
BCIP	5-bromo-1-chloro-3-indonil phosphate
bp	Base pairs
BYV	<i>Beet yellow virus</i>
cDNA/cRNA	Complementary DNA/RNA
CP	Coat protein
CSPD	Chemiluminescence substrate
DCL	Dicer-like
ddH ₂ O	Double-distillated water
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DIG	Digoxigenin
DNase	Deoxyribonuclease
dNTP	Deoxynucleoside triphosphate
dsRNA	Double-stranded RNA
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylenediamine tetra acetic acid
eGFP	Enhanced green fluorescent protein
EtBr	Ethidium bromide
FLB	Formaldehyde loading buffer
g	Gravitation constant
gr	Gram
gRNA	Genomic RNA
GTP	Guanine tri- phosphate
GVA	<i>Grapevine Virus A</i>
GVB	<i>Grapevine Virus B</i>
GVD	<i>Grapevine Virus D</i>
HC-Pro	Helper component protein
HLT	<i>Heracleum Latent Virus</i>
IAA	3- indoleacrylic acid\indole acetic acid
IR	Inverted repeat
kDa	Kilodalton
Kb	Kilo base pairs
L	Liter
LB	Luria-Bertani broth
mA	Milliamper
MCS	Multiple cloning site
MES	4-Morpholineethanesulfonic acid
MICA	Multi-image quantification analysis system
MOPS	3-(N-morpholino) propane sulfonic acid
MP	Movement protein
mRNA	Messenger RNA
MS	Murashige and Skoog

NaOAc	Sodium acetate
NBT	Nitro blue tetrazolium
O.D	Optical density
ORF	Open reading frame
PCR	Polymerase chain reaction
PEG	Polyethylene glycol
PIM	Protoplast inoculation medium
35S	CaMV 35s promoter
PTGS	Post-transcriptional gene silencing
PVX	<i>Potato virus X</i>
PVY	<i>Potato virus Y</i>
RCNMV	<i>Red clover necrotic mosaic virus</i>
RdRp	RNA-dependent RNA polymerase
RISC	RNA-induced silencing complex
RNAi	RNA interference
RNase	Ribonuclease
rpm	Round per minute
RSS	RNA silencing suppressor
RT	Reverse transcriptase
RW	Rugose wood
SB	Sample buffer
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis
sgRNA	Sub-genomic RNA
siRNA	Small-interfering RNA
SSC	Standard Saline Citrate
TAE	Tris acetate EDTA
TBE	Tris boric acid EDTA
TBST	Tris buffered saline tween
TBSV	<i>Tomato bushy stunt virus</i>
T-DNA	Transfer DNA
TEMED	Teramethylethilenodiamine
TGS	Transcriptional gene silencing
Ti-plasmid	Tumor inducing plasmid
TYLCV	<i>Tomato yellow leaf curl virus</i>
UTP	Uridine-5-triphosphate
U.V	Ultra violet
v	Volt
VIGS	Virus-induced gene silencing
v/v	Volume per volume
w/v	Weight per volume
ZYMV	<i>Zucchini yellow mosaic virus</i>

תקציר

בדומה לבעלי חיים, צמחים פיתחו מנגנונים לצורך התגוננות בפני "פולשים" זרים של DNA או RNA. אחד מבין המנגנונים ואולי החשוב ביותר הוא השתקת גנים Gene Silencing. כללית, השתקת גנים בצמחים יכולה להתרחש בשני שלבים: (1) בטרם התרחש תהליך השעתוק Post-transcriptional gene silencing (TGS), (2) לאחר תהליך השעתוק Post-transcriptional gene silencing (PTGS). בעבודה זו בחנתי את מנגנון ההגנה הצמחי, ה-PTGS אשר מהווה תהליך של השתקת גנים הנובע מעיכול מוקדם של RNA המשועתק בגרעין. במהלך ההדבקה הויראלית מתרחש בנוסף להפעלת מנגנון ההשתקה תהליך נוסף והוא דיכוי ההשתקה ע"י חלבונים ויראליים. חלבונים אלו, בנוסף לאפשרות היותם מעורבים בתפקידים נוספים במהלך התרבות הוירוס, הם מדכאים את מנגנון ההשתקה הצמחי ולכן כונו בשם: RNA silencing suppressors (RSSs). עד היום נמצאו מגוון RSSs המקודדים ע"י וירוסים של DNA ו-RNA של צמחים, חרקים ובעלי חיים. וירוסים פיתחו RSSs השונים מוירוס אחד למשנהו, ופעילותם מכוונת אל שלבים שונים בתהליך ההשתקה, אך ברור כי רובם הם חלבונים קושרי dsRNA.

בנוסף, DNA של אורגניזמים חיים חשוף באופן מתמיד לנזקים הנגרמים בעקבות מתילציה (הוספת קבוצות CH_3) אשר יכולה להביא לאפקטים חמורים כדוגמת שיפעול מוטציות ועד הרס הגנום ומוות תאי. תיקון DNA פגום הינו אחד התהליכים החיוניים שדרושים לתפעול תקין של המערכות הגנטיות. תאים מצויידים במגוון של חלבונים אשר התפתחו לפתרון בעיה זו ולתיקון מודיפיקציות כימיות שונות ב-DNA. אחד מהחלבונים הללו הינו חלבון ה-*AlkB*. חלבון ה-*AlkB* נתגלה לראשונה בחיידק *E. coli* בשנת 1983 ומאז נחשב כמעורב בתיקון של נזקי אלקילציה ב-DNA ו-RNA. רצפים של *AlkB* אובחנו עד כה ביותר מ-20 וירוסים צמחיים מסוג RNA וביניהם וירוס ה-GVA שתוקף את הגפן. כיוון שמתילציה מפריעה לתפקוד של RNA, תירגום ושיכפול, מניחים כי חלק מהוירוסים רכשו רצפים של *AlkB* אשר מתקנים נוקלאוטידים ממותלים בתבנית ה-RNA במהלך השיכפול או השעתוק ובכך פועלים בהגנה על הוירוס כנגד מנגנון השתקת RNA (PTGS) הקיים בצמחים. אם זה אכן המקרה, אתר של *AlkB* יכול לתפקד בתור מדכא של השתקת RNA תלוי מתילציה.

גידול גפן למאכל וליין מהווה חלק חשוב בתוצרת החקלאית בארץ ובעולם. צורת הריבוי הווגטטיבי של הגפן, הרכבה על כנות, והפצה בינלאומית של חומר הריבוי הביאו במשך השנים לתפוצה רחבה של מחלות וירוס או דמויות וירוס המהוות אחד הגורמים העיקריים בהתנוונות הגפן. מחלות אלו גורמות לירידה בכמות ואיכות הפרי ובתנאים מסויימים אף לתמותת גפנים. עד כה נמצאו לפחות 60 וירוסים היכולים להדביק גפן. מבין המחלות העיקריות בגפן הנגרמות ע"י וירוסים נמנה קומפלסק הניקרונות (Rugose wood disease). בקומפלסק הניקרונות מעורבים בעיקר וירוסים מקבוצת ה-*Vitivirus*. נגיף הגפן GVA שהוא הכלי הנחקר בעבודה זו, שייך

לקבוצה זו. התפקיד האטיולוגי של GVA במחלת הניקרון טרם נקבע. הקושי נובע מכך שבמרבית המקרים מוצאים בגפנים נגועות בניקרון הדבקה משולבת של מספר וירוסים.

GVA שייך לקבוצת ה- *Vitivirus* ולמשפחת *Flexiviridae*. הוירוס מכיל גנום ssRNA חיובי שאורכו כ- 7.4Kb אשר לאחרונה נקבע רצף הבסיסים המלא שלו. גנום הוירוס מכיל חמש מסגרות קריאה (ORFs) (Open reading frames; ORFs). ORF1 מקודד לחלבון המכיל רצפים שמורים המופיעים בחלבוני שיכפול (הליקאז ו-RdRp) ומכיל את אתר ה- AlkB ו-ORF5 מקודד לחלבון p10 אשר לאחרונה התגלה כבעל תכונות קשירה של RNA. כמו כן, נתגלה כי חלבון זה של GVA בעל פעילות חלשה של RSS בנוסף לחשיבותו והשפעתו על הפתוגנזה של הוירוס ועל יכולתו להדביק את הגפן.

לוירוס ה-GVA אין פונדקאים נוספים בטבע פרט לגפן, אך נמצא כי הוירוס מסוגל להתרבות בצמחים ובפרוטופלסטים של טבק, ביניהם *Nicotiana benthamiana*. במחקרי עבדתי עם הצמח בוחן *N. benthamiana* במטרה לממש שתי מטרות: (1) איפיון רצפים ב-GVA המעורבים בדיכוי מנגנון ההגנה הצמחי - RNA gene silencing. (2) בחינת מעורבותו של ההומולוג הויראלי של חלבון ה-AlkB בפתוגנזה של ה-GVA.

להשגת מטרות העבודה בנינו וירוס אינפקטיבי של GVA (pGVA-GFP-252) המבטא גן מדווח של eGFP. וירוס זה שימש אותנו למטרת אבחון יעילות ההדבקה, האינפקטיביות והשיכפול הויראלי ברמת תא וברמת הצמח השלם. כמו כן, שבט זה שימש ככלי יעיל לבניית מינירפליקון (-pGVA-GFP-269) בתור אסטרטגיה לעורר את מערכת ההשתקה הצמחית על מנת לאפיין רצפים בוירוס ה-GVA המעורבים בדיכוי מנגנון ההגנה הצמחי-PTGS. בעבודה שלי בוצעו ניסויים שהדגימו כי p10 לבדו הוא מדכא חלש של PTGS וכי לצורך תיפקוד יעיל יותר ומוגבר דרושה מעורבות של עוד פקטור/ים נוסף/ים מגנום הוירוס.

כשהתברר לנו כי מערכת המינירפליקון הוכיחה את עצמה כיעילה ורגישה לזיהוי מדכאים ידועים שונים, הוחלט לאפיין בעזרתה רצפים בתוך גנום ה-GVA בעלי פעילות פוטנציאלית של דיכוי מנגנון ההשתקה. מצאנו כי הגברת הפעילות של תוצר ORF5 כמדכא למערכת השתקת הגנים היא תוצאה של ביטוי גורם ספציפי ממערכת המינירפליקון של ה-GVA. המסקנה הסופית מניסויים שביצענו הייתה שלא יכולנו להצביע באופן חד-משמעי על מעורבותו של פקטור אחד בפעולת הגברת הדיכוי ע"י p10 וכי יכול להיות כי בהליך זה מעורבים ביחד וב- cis התוצרים או הרצפים של ORF1, ORF2 והליך השיכפול של ה-RNA הויראלי. בעתיד נרצה למפות באופן ממוקד את הרצפים במינירפליקון התורמים להגברת פעילות הדיכוי של p10 שנתגלתה בעבודתי.

מהתוצאות שנתקבלו לגבי הורדת ריכוזי מקטעי siRNA במערכת של מינירפליקון בתוספת ORF5, אנו מניחים כי מנגנון הפעולה של p10 בדיכוי ההשתקה הוא בשלב בו ה-Dicer חותך את ה-dsRNA. המנגנון האפשרי לכך הוא ע"י קישור בצורת קומפלקס בין ה-p10 ופקטור/ים נוסף/ים המצויים במינירפליקון לבין ה-dsRNA הויראלי. קישור כזה, באם מתרחש, מונע מה-Dicer לעכל את ה-dsRNA ובכך יצירת מקטעי ה-siRNA נפגעת.

לאחר שהגענו למסקנה כי מדובר בפקטור/ים נוסף/ים המצויים בתוך רצף המינירפליקון אשר תורם/ים להגברת דיכוי ההשתקה של p10, החלטנו לבדוק אתר של AlkB כפקטור חשוד. השוואת רצף חומצות האמינו ב-20 אתרים ויראליים של AlkB (כולל זה המופיע בוירוס ה-GVA) הראתה מספר חומצות אמינו שמורות. על מנת לנסות ולאתר את מידת החשיבות של חלק מהן בפעילותו של AlkB, ביצעתי 9 מוטציות נקודתיות באיזור המשוער של AlkB בגנום ה-GVA המבטא eGFP (GVA-GFP-252) בהם החלפתי בכל פעם חומצת אמינו אחת בחומצת אמינו אלנין (Ala). 3 מוטציות כווננו כלפי חומצות אמינו שמורות בהומולוגים של חלבון ה-AlkB כולל הומולוגים ויראליים, 3 מוטציות אחרות כווננו כלפי חומצות אמינו שמורות בהומולוגים ויראליים בלבד של AlkB ו-3 מוטציות כווננו כלפי חומצות אמינו לא שמורות בהומולוגים של AlkB, וזאת למטרת ביקורת. בוירוס עם המוטציה בשייר H_1 , נמצא כי המוטציה שיתקה לחלוטין את יכולת ההדבקה של הוירוס כמו גם את יכולת השיכפול שלו הן בצמח והן ברמת התא. על סמך ממצא זה ניתן להניח כי המוטציה בשייר H_1 פגעה בפעילות חלבון הרפליקאז ואולי ניתן גם להסיק כי המוטציה בשייר זה פגעה בתיפקוד המשוער של ה-AlkB. אף על פי זאת, חקר מעורבתו של השייר H_1 הוא נושא מעניין וחשוב להמשך המחקר. בוירוס עם המוטציה בשייר R_2 ניצפתה ירידה בכל הפרמטרים שנבדקו ולכן ניתן להניח כי השייר R_2 חשוב לפעילות חלבון הרפליקאז וואו לפעילות המשוערת של AlkB. בוירוס עם המוטציה בשייר Q מצד אחד לא נראה הבדל ברמת ההתרבות שלו וברמת הביטוי של הגנום הויראלי, יחסית לביקורת pGVA-GFP-252, אך מצד שני, הוא גרם להופעת תסמינים מאוד חלשים של מחלה. מוטנט כזה יכול לשמש אותנו בעתיד לפיתוח וקטור ויראלי לביטוי של גנים זרים בתוך הצמח. נמצא גם כי חומצות אמינו שאינן שמורות בהומולוגים של AlkB יכולות גם הן להשפיע על פעילות הרפליקאז או על פעילות חלבון ה-AlkB המשוער בלהגן על הוירוס. יתכן וכי בשל המוטציות שהוכנסו בשיירים הלא שמורים חלה פגיעה בחלבון הרפליקאז עצמו, אך על אף זאת יתכן וכי קיימת אפשרות אחרת של פגיעה באתר הפעיל של ה-AlkB עקב הפרעה ביצירת מבנה מרחבי תקין המאפשר פעילות תקינה של חלבון או אתר ה-AlkB. כמגמה להמשך העבודה יש צורך למפות את אתר ה-AlkB ולבטא את מקטעי ה-AlkB עם המוטציות שהוכנסו במערכת המבוססת על השימוש בחיידקי *E. coli* במטרה ללמוד על הפעילות הביוכימית של דה-מתילציה המיוחסת ל-AlkB במערכת *in vitro*.

1. סקירת ספרות

1.1 השתקת ביטוי גנים בצמחים

בדומה לבעלי חיים, צמחים פיתחו מנגנונים לצורך התגוננות בפני "פולשים" זרים של DNA או RNA. אחד מבין המנגנונים ואולי החשוב ביותר הוא השתקת גנים - Gene Silencing. השתקת גנים בצמחים יכולה להתרחש בשני שלבים: (1) בטרם התרחש תהליך השיעתוק Transcriptional gene silencing, (2) לאחר תהליך השיעתוק Post-transcriptional gene silencing.

1. **TGS (Transcriptional gene silencing)**: תופעה זו נצפתה בעיקר בצמחים, אם כי הופיעה גם בבע"ח. ביטוי הגנים מצומצם ע"י חסימה ברמת השיעתוק. הוכחות לכך מראות כי הסיבה לכך נובעת ממודיפיקציות במבנה הכרומטין או מתילציה של DNA. ההשתקה מתבצעת ע"י מתילציה של הפרומוטור ושינוי במבנה הכרומטין. במקרה זה אין כלל שיעתוק של RNA מהגן המושתק. השתקת גנים ברמת השיעתוק כנראה נובעת מאינטראקציות בין הגן הטרנסגני לגן המושתק. אינטראקציות אלו גורמות לשינוי במבנה הכרומטין כגון מתילציות כך שהשיעתוק מדוכא (Baulcombe&English, 1996).

2. **PTGS (Post-transcriptional gene silencing)**: מדובר בהשתקת גנים הנובעת מעיכול מוקדם של RNA המשועתק בגרעין. השיעתוק של הגן לא נפגע; עם זאת, ביטוי הגן אובד מכיוון שמולקולות mRNA הופכות לבלתי יציבות ועוברות עיכול מהיר בציטופלסמה. מערכת עיכול זו הינה מערכת המבוססת על הרס סלקטיבי של RNA בעל רצף ייחודי. מנגנון ה-RNA Silencing או RNA interference (RNAi) ביונקים, בנוסף להיותו מנגנון הגנה אדפטיבי כנגד וירוסים ומולקולות RNA פולשניות, הוא מתפקד בין היתר בבקרת ביטוי גנים ובקרת התפתחות האורגניזם (Ratcliff *et al.*, 1999; Vance&Vaucheret, 2001; Voinnet, 2001; Ding *et al.*, 2004).

1.1.1 עיקרון ההשתקה (PTGS)

אנזים מפתח בתהליך ההשתקה הוא נוקלאז המכיר ספציפית dsRNA וחותך אותו למקטעים קצרים בעלי גודל קבוע. אנזים ציטופלסמטי זה מכונה בשם הכללי Dicer (DCL). זהו אנזים ממשפחת RNase III, היחיד שמבקע RNA דו-גדילי באתרים ספציפיים ומשאיר 2-3 נוקלאוטידים חופשיים בקצות ה-3' של מולקולות ה-dsRNA הקטנות הנוצרות מהחיתוך והנקראות siRNA (small interfering RNA) (Bass, 2000). תהליך זה של יצירת מולקולות siRNA ע"י Dicer דורש אינטראקציות עם חלבונים אחרים הכוללים חלבון דמוי Argonuate (Tabara *et al.*, 2002).

מולקולות דו-גדיליות קטנות אלה שנוצרות הן באורך 21-26 נוקלאוטידים. מניחים כי מולקולות siRNA קצרות (21-22 נוקלאוטידים) משמשות כסיגנל להשתקה כשהן נעות מתא לתא (השתקה מקומית) ואחראיות גם על מתילציית DNA הומולוגי בגרעין על גבי גן באיזור מקודד (לא באיזור הפרומוטור) (Himber *et al.*, 2003; Waterhouse *et al.*, 2001) וליצירת הטרוכרומטין

לצורך השתקה שלפני שיעתוק או יצירת RNA "חריג" (Dernburg&Karpen,2002) (Martienssen&Colot, 2001; 2001; 24-26 נוקלאוטידים) משמשות להתפשטות הסינגל באופן סיסטמי (Hamilton *et al.*, 2002).

בתהליך נוסף, מולקולות ה-siRNA נפרדות וגדיל ה-antisense נכנס לתוך קומפלקס חלבוני בשם: **(RISC)** RNA-induced silencing complex. באופן כזה, מולקולת ה-siRNA מובילה את הקומפלקס להרס ספציפי התלוי ברצף של ה-mRNA המשלים בציטופלסמה. בשלב זה חלבון ה-slicer, המהווה חלק מקומפלקס ה-RISC, קוטע את ה-mRNA באתר יחיד במרכז הקומפלקס שנוצר כ-10 נוקלאוטידים מתחילת ה-siRNA. חיתוך זה יוצר מולקולת mRNA בלתי פעילה ביולוגית (Elbashir *et al.*, 2001).

בנוסף, מולקולות ה-siRNA נקשרות אל רצפי ה-mRNA המשלימים ויכולות לשמש כתחל לאנזים **(RdRp)** RNA dependent RNA Polymerase ממקור צמחי (Martinez&Tuschl, 2004). אנזים זה מסנתז את הרצף המשלים של ה-RNA (cRNA) על בסיס התבנית של ה-mRNA. קעת מתקבלת שוב מולקולת dsRNA שמועמדת לעיכול. באופן כזה, מולקולות siRNA קצרות וארוכות עוברות הגברה דרך יצירה של dsRNA ארוך ע"י RdRp צמחי (Dalmay *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 2000) ומהם נוצרות מולקולות siRNA חדשות ע"י פעילות של אנזימי DCLs. כך, התהליך מגביר את עצמו ונשמר פעיל בתאים (עיקרון ההשתקה מוצג בתרשים 1).

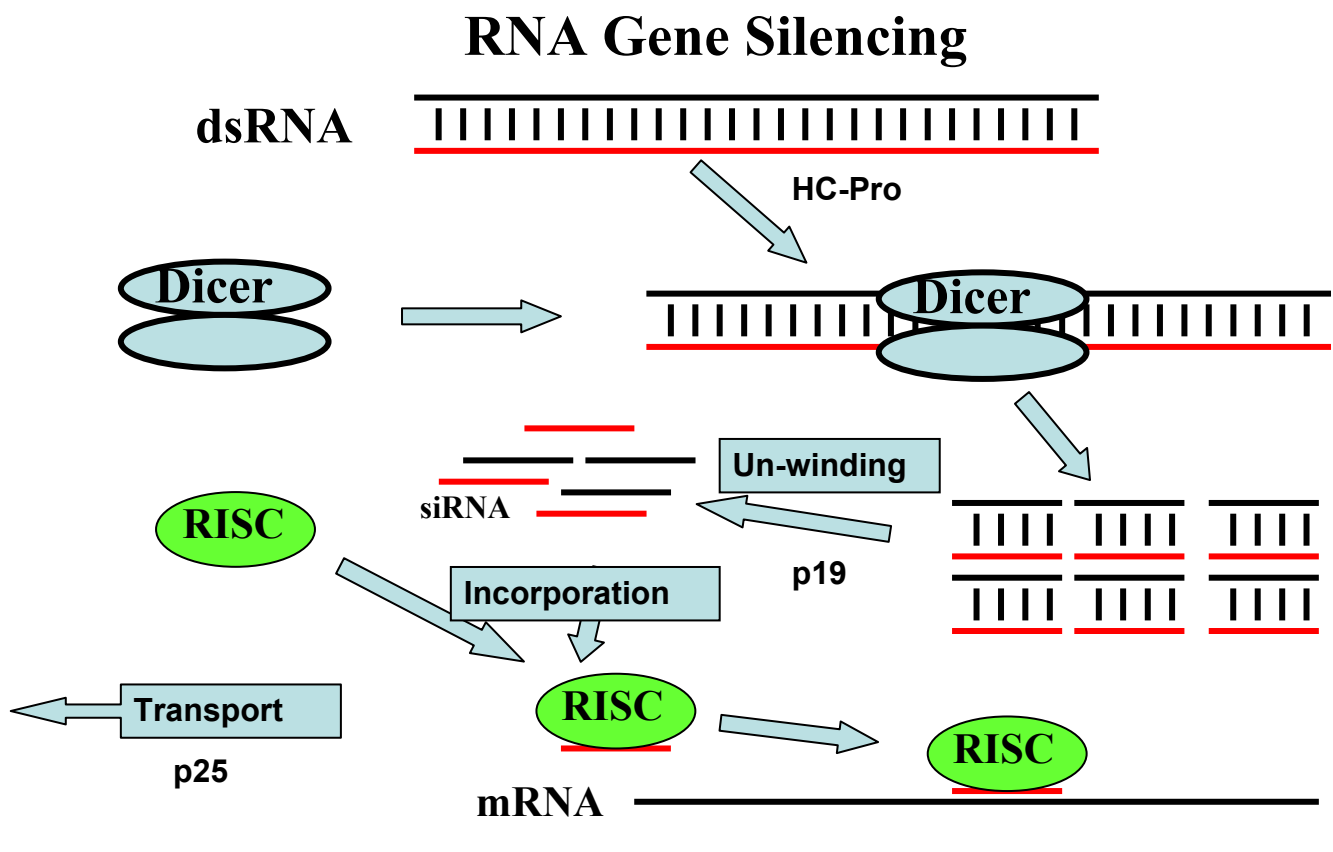
1.1.2 משרים למנגנון השתקת גנים

1. **Transgene-induced silencing**: ההשתקה נובעת מנוכחות של טרנסגן בתוך הגנום. הדיכוי מיוחס בד"כ לכמות העותקים של הגן. טרנסגנים ערוכים בזה אחר זה מהווים משפיעלים יעילים יותר של ההשתקה מאשר טרנסגנים מפוזרים. ישנה אפשרות של החדרת טרנסגן שיוצר dsRNA כתוצאה מכניסתו סמוך לפרומוטור פנימי בכיווניות הפוכה, דבר המביא להיווצרות מבנה של Inverted repeat (IR). כאשר רצף כזה ישועתק יתקבל מבנה של hairpin ("ראש סיכה") ויתקבל dsRNA אשר בתורו משרה את מנגנון השתקת הגנים בצמח (Waterhouse *et al.*, 1998).
2. **Virus-induced gene silencing (VIGS)**: השתקה הנובעת מנוכחות של RNA גנומי של וירוס. רק וירוסים המסוגלים לעבור שיכפול גורמים להשתקה, הכוונה שמולקולות dsRNA, המהוות תוצר ביניים של שיכפול, משמשות בתור גורמי שיפעול ובעקבות כך מתפתחת מערכת ההשתקה כנגד הוירוס.
3. **Cosuppression**: השתקה של גן פנימי עקב נוכחות של טרנסגן הומולוגי או וירוס הנושא גן צמחי הומולוגי.
4. **טרנספוזונים פנימיים**: מעקבות DNA מוטגניות הנוודות מאתר אחד למשנהו בגנום התאי.

5. **RNA "חריג"**: כתוצאה משינויים במבנה הכרומטין, עקב מתילציות, עשוי להיווצר RNA "חריג" המהווה תבנית לפעילותו של האנזים RdRp לקבלת dsRNA המהווה משרן למנגנון ההשתקה (Fire *et al.*, 1998; Hannon, 2002).

1.1.3 תנועת הסיגנל להשתקה בצמח

במחקרים שונים נמצא כי כאשר מזריקים מקטעי dsRNA לאיזור מסויים באורגניזם, מתפתח תהליך השתקה ברקמות רחוקות מאיזור ההזרקה (Fire *et al.*, 1998; Lohmann *et al.*, 1999), כלומר ישנו סיגנל שיוצר תגובה סיסטמית. קיומו של סיגנל סיסטמי העובר בין רקמות הצמח הוכח בבירור בניסויי הרכבות. סיגנל ההשתקה עבר ביעילות של 100% והיקנה השתקה לרוכב המבטא טרנסגן הומולוגי. מה שמלמד על כך שהסיגנל העובר הינו ספציפי לרצף וגורם להשתקת הגן הנדון בכל רקמות האורגניזם. נמצא כי הסיגנל יכול לנוע לפחות למרחק של 30 ס"מ מהכנה של צמח מושתק לכיוון הרוכב. כמו כן, נמצא כי המעבר של הסיגנל הוא מבסיס הצמח כלפי מעלה (Palauqui *et al.*, 1997). מאידך, במחקר אחר דווח כי המעבר של אלמנט ההשתקה היה דו-כיווני אם כי היעילות הייתה גבוהה יותר כאשר המעבר היה מכיוון הכנה לכיוון הרוכב (Sonda&Nishiguch, 2000).



תרשים 1: מסלול השתקת RNA בצמחים (PTGS).

1.2 דיכוי מנגנון השתקה ה-RNA

RNA silencing suppressors (RSSs)

במהלך ההדבקה הויראלית מתרחש בנוסף להפעלת מנגנון ההשתקה תהליך נוסף והוא דיכוי ההשתקה ע"י חלבונים ויראליים (Sijen&Kooter, 2000). חלבונים אלו, בנוסף לאפשרות להיותם מעורבים בתפקידים נוספים במהלך התרבות הוירוס, הם מדכאים את מנגנון ההשתקה הצמחי ולכן כונו בשם: **RNA silencing suppressors (RSSs)**. עד היום נמצאו מגוון RSSs המקודדים ע"י וירוסים של DNA ו-RNA של צמחים, חרקים ובעלי חיים (Voinnet, 2005). חלבון Helper component proteinase (HC-Pro) המקודד ע"י potyviruses הוא חיוני לשיכפול הגנום הויראלי, פועל כפרוטאזה, מעורב בהעברת הוירוס ע"י הכנימות וממלא תפקיד בתנועת הוירוס בתוך הצמח, והוא המדכא הראשון של מנגנון ההשתקה שנתגלה (Pruss *et al.*, 1997; Kasschau *et al.*, 1997).

וירוסים פיתחו RSSs השונים מוירוס אחד למשנהו, ופעילותם מכוונת אל שלבים שונים בתהליך ההשתקה, אך ברור כי רובם הם חלבונים קושרי dsRNA (Silhavy *et al.*, 2002). מאפיין מעניין של עיקר ה-RSSs הצמחיים הידועים כיום הוא שאף אחד מהם אינו חולק זהות ברצף נוקלאוטידים או ברמת החלבון והמבנה בין המשפחות והקבוצות הויראליות הקיימות, ולכן משערים כי הם התפתחו במהלך האבולוציה באופן עצמאי. עם זאת, המשותף בין ה-RSSs הוא שלרוב הם אופיינו תחילה כגורם המשפיע על פתוגניות הוירוס או על טווח הפונדקאים וכי מוטציות בגנים אלה גורמות להורדה ניכרת בפתוגניות של הוירוס.

1.2.1 מנגנוני פעולה של חלבוני ה-RSSs

1. דיכוי של ייצור מולקולות siRNA

במנגנון זה חל קישור בין ה-RSS לבין ה-dsRNA הויראלי, וזה גורם למניעת גישתו של ה-Dicer אל ה-dsRNA ובכך חל דיכוי של יצירת siRNAs המעורבים בתהליך ההשתקה. דוגמא ל-RSS שפועל בדיכוי ייצור siRNAs הוא **HC-Pro (PVY)**. ביטוי של חלבון **P25 (PVX)** מדכא באופן ספציפי הצטברות siRNAs באורך 24 נוקלאוטידים והינו בעל אפקט מופחת משמעותית על הצטברות siRNAs באורך 21 נוקלאוטידים (Hamilton *et al.*, 2002).

2. הרחקת מולקולות siRNA מקומפלקס ה-RISC

P19 (TBSV) קושר דופלקסים של siRNA באורך 21 נוקלאוטידים באפיונות גבוהה אך האפיונות שלו יורדת משמעותית בעבור קישור דופלקסים באורך 22 נוקלאוטידים או יותר.

הוכח כי **P19** נקשר לדופלקסים של siRNA למניעת כניסת מולקולה זו אל תוך קומפלקס ה-RISC (Lakatos *et al.*, 2004). מכיוון שמולקולות siRNA באורך 21 נוקלאוטידים נמצאות בשיפה ובעלות פוטנציאל לגרום להתפשטות ההשתקה מתא לתא (Dunoyer *et al.*, 2005), הרחקת

מולקולות אלו ע"י P19 יכולה למנוע את כניסתן אל תוך מערכת ההובלה הכוללת בעלים המודבקים וואו כניסתן לעלים החדשים המודבקים באופן סיסטמי.

3. דיכוי של השתקה סיסטמית

מדובר בדיכוי התפשטות הסינגל להשתקה לאורך צינורות ההובלה. המנגנון הודגם לראשונה בחלבון P25. ביטוי של P25 גורם לדיכוי של הצטברות siRNAs ארוכים בצמחי *N. benthamiana* (Hamilton *et al.*, 2002), מה שמלמד כי מדכא זה יכול לפעול באחד מהמנגנונים: דיכוי סינטזה או פינוי siRNAs מטיפוס זה. לאחרונה נתגלה כי דיכוי השתקה ה-RNA ע"י P25 דרוש ברמת התנועה של וירוס ה-PVX מתא לתא (Bennasser *et al.*, 2005). הסינגל להשתקה RNA לטווח קצר הינו בעל פוטנציאל לדכא תנועת וירוס מתא לתא וכנגד, P25 יכול לחסום את הפעילות של siRNAs קצרים באורך 21 נוקלאוטידים בתאים מודבקים בוירוס ה-PVX ובכך לחסום את מנגנון ההגנה האנטי-ויראלי.

1.2.2 דיכוי מנגנון ההשתקה ע"י וירוסים של DNA

קיימים וירוסים מקבוצת *Geminivirus* בעלי גנום DNA חד-גדילי מעגלי. אחד מהוירוסים המשוייכים לקבוצה זו הינו TYLCV המקודד בגנום שלו לחלבון מדכא השתקה V2. בבחינת מנגנון הפעולה של המדכא נצפתה עלייה ברמות התעתיק והחלבון של הגן המדווח eGFP, אך לא נצפתה השפעה על הצטברות מולקולות siRNA, תוצרי הפירוק של הגן המדווח. תוצאה זו מצביעה על כך שחלבון זה מכווון כנגד השלב העוקב לביקוע ה-dsRNA ע"י ה-Dicer במסלול ההשתקה - הרחקת מולקולות siRNA מקומפלקס ה-RISC (Zrachya *et al.*, 2007).

1.2.3 אנליזות פונקציונליות לצורך זיהוי RSSs פוטנציאליים

Agrobacterium-mediated transient expression system

ביטוי חולף של גנים, בניגוד לביטוי קבוע ויציב, זו גישה מהירה, גמישה וניתנת לשיחזור של ביטוי חלבונים יעילים. בצמחים, נעשה שימוש בפתוגן בקטריאלי נפוץ: *Agrobacterium tumefaciens*. גזעים רקומביננטיים של החיידק יכולים לשמש למטרת ביטוי חולף של גנים שהוחדרו לאיזור ה-T-DNA של הפלסמיד הבינארי Ti. התרבית של החיידקים מוזרקת לתוך העלים ומעבר להעברת ה-T-DNA, קיים ביטוי של הגן הרצוי בתוך תאי הצמח. כעיקרון, שיטה זו מאפשרת רמות גבוהות של ביטוי גנים. עם זאת, השימוש בשיטה זו מוגבל מכיוון שהביטוי של הגן דועך אחרי ימים בודדים. השתקה ה-RNA זו הסיבה העיקרית להיעדר יעילות ולכן צפוי כי הזרקה משולבת של תרביות *Agrobacterium* המכילות את הגן הרצוי בשילוב עם גן ל-RSS, תגביר את רמות הביטוי של הגן הרצוי (Johansen&Carrington, 2001; Voinnet *et al.*, 2003).

שיטה זו, מספקת בדיקה מהירה וקלה לבדיקת פעילות חלבון כמדכא למנגנון ה-RNA Silencing ומהווה טכניקה שימושית לזיהוי מדכאים ויראליים (Llave *et al.*, 2000; Voinnet *et al.*, 2000). בשיטה זו משתמשים בגזע אחד של החיידק המכיל גן מדווח (בד"כ GFP) במטרה

להשרות את מנגנון ה-RNA Silencing וגזע אחר המבטא מדכא פוטנציאלי. מבצעים הזרקה משולבת של שני הגזעים של החיידק לתוך עלה הצמח ולאחר תקופה מוגדרת של זמן בודקים את ההשתקה של הגן המדווח בעלים.

בניסוי טיפוס, האזור המוזרק תחילה מבטא רמות גבוהות של גן ה-GFP שניתן לזהות את הזהירה שלו באור UV, עם זאת, תוך כשבוע ימים התהליך מעורר השתקה מקומית ונצפית ירידה בזהירה של תוצר הגן המדווח. אם המדכא הפוטנציאלי, המתבטא בהזרקה המשולבת, מתערב במנגנון ההשתקה, העלה יבטא רמה זהה של הגן ואם לא, רמת הביטוי תפחת משמעותית. וריאציה אחרת של בדיקה כזו, הוא השימוש בצמחי *N. benthamiana* טרנסגניים המבטאים GFP (Line 16c, Ruiz *et al.*, 1998). כך ניתן לעקוב אחר תנועת הסיגנל להשתקה אל רקמות חדשות שלא הוזרקו המבטאות גן הומולוגי. שיטה זו של הזרקה משולבת היא הפופולארית ביותר לזיהוי מדכאים, כיוון שהיא המהירה והפשוטה ביותר. עם זאת, בשיטה זו לא ניתן לזהות חלבונים שמדכאים את תנועת הסיגנל הסיסטמי להשתקה, אך לא מדכאים השתקה מקומית. זאת מכיוון שמדכאים מסוג זה מבוטאים ברמות נמוכות רק באזור ההזרקה.

ניסויי היפוך ההשתקה (Reversal of silencing assays)

השיטה מבוססת על הדבקת צמח טרנסגני מושתק עם וירוס ובדיקה אם פנוטיפ ההדבקה שוחזר. הגירסה הנפוצה ביותר בשיטה זו עושה שימוש בצמחי *N. benthamiana* טרנסגניים מסוג 16c-GFP. מיד לאחר הנביטה (כשיש מינימום 4 עלים בצמח), הצמח מוזרק עם חיידק אגרובקטריום המבטא GFP, אשר מעורר השתקה מקומית מלווה בהשתקה סיסטמית. בסופו של דבר, כל הצמח הופך מושתק ל-GFP. בשלב הזה הצמח עובר הדבקה עם וירוס שנבדק לפעילות מדכאת. אם ההדבקה הויראלית מאפשרת לצמח לבטא GFP, הוירוס המדביק ככל הנראה מקודד לגן בעל פעילות מדכאת (Voinnet *et al.*, 1999).

בשיטה זו גנים יחידים יכולים להיבדק לגבי יכולתם לשמש כמדכאים ע"י שימוש בוירוס ה-PVX. משמש בתור וקטור יעיל לביטוי סיסטמי של גנים מגוונים בצמחי *N. benthamiana* מכיוון שעצמו אינו מקודד למדכא העובד בשיטת ה-Reversal of silencing assay. לפיכך, מדכאים פוטנציאליים מוירוסים שונים יכולים להיבדק בשיטה זו ע"י ביטויים בוקטור ה-PVX.

1.2.4 האם כל הוירוסים הפתוגניים לצמחים מקודדים לגן מדכא של מנגנון ההשתקה הצמחי?

למרות שזוהו הרבה מדכאים ויראליים, העובדה שחלבון ה-HC-Pro עוזר לשיכפול של וירוסים רבים ומגוונים מצביעה על כך שוירוסים רבים לא מדכאים ביעילות את מנגנון ההשתקה הצמחי. יתכן שוירוסים אלו פיתחו מנגנונים אחרים כדי להתחמק מההשתקה לדוגמה ע"י שיכפול בספרולות של הרשתית האנדופלסמטית (Schwartz *et al.*, 2002), היכן שמולקולות ה-dsRNA מוחבאות, או ע"י שיכפול ותנועה מהירה מספיק כדי לברוח מהסיגנל הסיסטמי של ההשתקה. בנוסף, לצמחים יש מנגנוני הגנה נוספים, כך שהשתקה יכולה לא להוות את הסכנה העיקרית של רוב הוירוסים. לכן, חלק מהוירוסים יכולים להכיל מדכאים של מנגנוני הגנה אחרים.

1.2.5 דיכוי מנגנון ההשתקה בתור כלי מחקרי

עצם הגילוי כי חלבונים ויראליים מסוימים מדכאים את ההשתקה, מספק כלי חדש לטכנולוגיות המשתמשות בצמחים מהונדסים ולכך יש חשיבות רבה. הרבה יישומים ביוטכנולוגיים נפגעים עקב מנגנון ההשתקה ומדכאי השתקה יכולים לשמש ככלי על מנת להשיג רמה גבוהה ועקבית של ביטוי טרנסגנים בצמחים (Mallory *et al.*, 2002; Voinnet *et al.*, 2003).

1.3 תפקיד פוטנציאלי של ההומולוג הויראלי של AlkB בתיקון DNA ו-RNA

דיכוי מנגנון PTGS

DNA של אורגניזמים חיים חשוף באופן מתמיד לנזקים הנגרמים בעקבות מתילציה (הוספת קבוצות CH₃) אשר יכולה להביא לאפקטים חמורים כדוגמת שיפעול מוטציות ועד מוות תאי ועיכול של הגנום. קבוצות מתיל אלו מקורן מתורמים תאיים כגון S-adenosylmethionine או מזיהומים סביבתיים כגון עישון טבק (Begley&Samson, 2003).

תיקון DNA פגום הינו אחד התהליכים החיוניים שדרושים לתפעול תקין של המערכות הגנטיות. תאים מצויידיים במגוון של חלבונים אשר התפתחו לפתרון בעיה זו ולתיקון מודיפיקציות כימיות שונות ב-DNA. אחד מהחלבונים הללו הינו חלבון ה-AlkB (Falnes *et al.*, 2002; Trewick *et al.*, 2002) אשר נתגלה לראשונה בחיידק *E. coli* בשנת 1983 ומאז נחשב כמעורב בתיקון של נזקי אלקילציה ב-DNA (Katoka *et al.*, 1983; Katoka&Sekiguchi, 1985).

השוואות ממוחשבות של רצפי חלבונים הראו נוכחות הומולוגים של AlkB בחיידקים אחרים כגון: אקטינובקטריה ופרוטאובקטריה וגם באאוקריוטים רב תאיים כולל צמחים ובני אדם (Aravind&Koonin, 2001). בעוד שלבקטריות באופן נורמלי יש 1-2 הומולוגים של AlkB, לאאוקריוטים רב תאיים יש מספר גדול יותר של הומולוגים. בגנום הומני מצאו לפחות 8 הומולוגים שונים של AlkB (ABHs) בעלי מאפיינים מעט שונים לגבי העדפתם לסובסטרטים ומידור תוך-תאי (Kurowski *et al.*, 2003; Falnes *et al.*, 2003).

תחזית נוספת, ואף מפתיעה עוד יותר, בוצעה על בסיס קיום אתרים הומולוגיים לחלבון ה-AlkB בפוליפרוטאינים של מספר וירוסים ויראליים (Aravind&Koonin, 2001). ההנחה היתה כי חלבונים ממשפחת AlkB יכולים לתקן פגיעה של אלקילציה לא רק ב-DNA אלא גם ב-RNA. לאחרונה, (Aes *et al.*, 2003) אישרו תחזית זו בכך שהראו ש-AlkB ואחד ההומולוגים ההומניים שלו hABH3 היו מסוגלים לתקן לא רק DNA אלא גם RNA. שני החלבונים היו מסוגלים לשפעל מחדש RNA של בקטריופאגי MS2 שעבר מתילציה *in vivo* ו-*in vitro*. תוצאות אלו הראו חשיבות ביולוגית בתיפקוד חלבוני AlkB והציעו כי תיקון RNA יכול להוות מכניזם הגנתי חשוב (Begley&Samson, 2003).

אתרים של AlkB אובחנו עד כה ביותר מ-20 וירוסים צמחיים מסוג RNA השייכים לקבוצות: *Carlavirus, Trichovirus, Vitivirus, Foveavirus, Potexvirus, Ampelovirus, Allexivirus* (Aravind&Koonin, 2001) (ראה נספח 1).

מאפיינים בולטים שנחשפו באנליזות השוואתיות באתרים דמויי AlkB בגנום של וירוסים צמחיים

1. אתרים אלו אובחנו רק בוירוסים של RNA עם פולריות חיובית בעלי ויריונים פילמנטיים ובעיקר בוירוסים ממשפחת *Flexiviridae*.
2. עד כה ידוע כי אתרים של AlkB ממוקמים בתוך רפליקאז ויראלי במעלה הזרם לאתר ההליקאז.
3. למרות שאתרים דמויי AlkB מצויים ב-7 קבוצות של וירוסים פילמנטיים, הם קיימים רק בחלק ולא בכל אחד מהוירוסים השייכים לכל אחת מהקבוצות.
4. רוב הוירוסים המקודדים לאתרים של AlkB מדביקים צמחים רב שנתיים.

מקורו של אתר ה-AlkB בוירוסים

ישנן קבוצות רבות של אורגניזמים היכולים לשמש בתור וקטורים להפצת וירוסים. קבוצות אלו כוללות: בקטריות, פטריות, נמטודות, פרוקי רגליים וכל חבר במשפחת העכבישיים. וירוסים של צמחים יכלו לרכוש את האתר או מהוקטור או מהמאכסן עצמו. אנליזות חלבונים עברו אתרים של AlkB הראו בעיקר רצפים בקטריאליים לכן, סביר כי אתרים אלו מקורם מ-mRNA בקטריאלי.

אתרים של AlkB מצויים לרוב בוירוסים הפוגעים בגידולי ענבים, תפוחים, דובדבנים, הדרים ואוכמניות- גידולים אשר קיים בהם שימוש נפוץ בקוטלי מזיקים. ידוע כי כמה מקוטלים נפוצים אלו (מתיל ברומיד ומרכיבים אורגניים של זרחן) עלולים לגרום למתילציה של DNA או RNA (Zayed & Mahdi, 1987; Starratt & Bond, 1988; Wiaderkiewicz *et al.*, 1986; Braun *et al.*, 1982). לכן, האתר של AlkB המתקן נזקי מתילציה, הקיים בקומפלקס השיכפול של הוירוס, ייתן לוירוס כזה יתרון תחרותי בסביבה עוינת שגורמת למתילציה.

כיוון שמתילציה מפריעה לתיפקוד של RNA, תירגום ושיכפול, מניחים כי חלק מהוירוסים רכשו אתרים של AlkB אשר מתקנים נוקלאוטידים ממותלים בתבנית ה-RNA במהלך השיכפול או השיעתוק ובכך פועלים בהגנה על הוירוס כנגד מנגנון השתקת RNA (PTGS) הקיים בצמחים. אם זה אכן המקרה, אתר של AlkB יכול לתפקד בתור מדכא של השתקת RNA תלוי מתילציה. כתוצאה מכך יגביר שיכפול, תירגום ופיתוגנה של הוירוס בפונדקאי.

במידה וזה נכון, אז סביר להניח כי הרס הפעילות של AlkB עלולה להשפיע על הפתוגנה של הוירוס למשל ע"י כך שתחול ירידה ברמת השיכפול של ה-RNA הויראלי ו/או הפרעה בתנועה של הוירוס בצמח.

1.4 מחלות וירוסים בגפן

גפן היא אחד מגידולי הפרי הנפוצים בארץ ובעולם אשר חשיבותם הכלכלית רבה. צורת הריבוי הווגטיבי של הגפן, הרכבה על כנות, והפצה בינלאומית של חומר הריבוי הביאו במשך השנים לתפוצה רחבה של מחלות וירוס או דמויות וירוס המהוות אחד הגורמים העיקריים בהתנוונות הגפן. מחלות אלו גורמות לירידה בכמות ואיכות הפרי ובתנאים מסויימים אף לתמותת גפנים. עד כה נמצאו לפחות 60 וירוסים היכולים להדביק גפן, אם כי לא כולם מוכרים כגורמי מחלה וחלקם הם פתוגנים חשובים בגידולים אחרים ונמצאים רק לעיתים רחוקות בגפן. בגפנים נגועות, במקרים רבים מוצאים הדבקה משולבת של מספר וירוסים היכולים לחולל מחלות קשות.

1.4.1 מחלות וירוסים עיקריות בגפן

1. מחלת עלה המניפה (Grapevine fanleaf disease) הנגרמת ע"י וירוסים מקבוצת ה-*Nepovirus*.
2. מחלת קיפול העלים של הגפן (Grapevine leafroll disease). במחלה זו מעורבים בעיקר וירוסים ממשפחת ה-*Closteroviridae*.
3. קומפלקס מחלות הניקרונות בגפן (Rugose wood disease). מעורבים בו בעיקר וירוסים מקבוצת ה-*Vitivirus*. נגיף הגפן GVA שהוא הכלי הנחקר בעבודה זו, שייך לקבוצה זו. התפקיד האטיולוגי של GVA במחלת הניקרון טרם נקבע. הקושי נובע מכך שבמרבית המקרים מוצאים בגפנים נגועות בניקרון הדבקה משולבת של מספר וירוסים (Garau et al., 1994; Chvalier et al., 1995).

1.4.2 מחלת הניקרון של הגפן (RW-Rugose Wood disease)

מדובר בקומפלקס של מחלות הנפוצות ביותר בכרמים בארץ ובעולם. לא ניתן להבדיל בין המחלות עפ"י סימני המחלה בשדה. ההבחנה נעשית עפ"י סימפטומים המופיעים לאחר הרכבה של הגפן החשודה על אינדיקטורים רגישים מסוג *Vitis*. הסימפטומים האופייניים לקומפלקס המחלות הם: שינויים בצילינדר העצי של הגפן הנגועה; התעבות הגזע בכנה, ברוכב או בשניהם; מתחת לקליפה ימצאו נקרים או חריצים לאורך השיפה; נינוס של הגפנים; הקטנת נוף הצמיחה ולפעמים קיים עיכוב של פתיחת ניצנים באביב. עם הזמן, הגפנים הנגועות מתנוונות וניכרת ירידה בכמות היבול ובאיכותו. הבדיקות הוירואליות לגילוי מחלות וירוסים בגפן הן חשובות, אך אין בהן די כדי לאבחן את גורם המחלה. בחלק מזני הגפן המחלה הינה סמויה, ללא הופעת סימפטומים ובאחרים תתקיים תקופה לטנטית ארוכה עד להתפרצות. כמו כן, הסימנים עלולים להיות בלתי ספציפיים בגלל שילוב של מספר גורמי מחלה בגפן או כתוצאה מגורמים אביוטיים.

בשל סיבות אלה קיימת חשיבות רבה להיעזר בשיטות אבחון מתאימות ומדויקות. מבין השיטות המשמשות לגילוי ואבחון וירוסים בגפן ניתן למנות הרכבה על צמחי בוחן מתאימים המבטאים סימני מחלה ספציפיים לוירוסים מסוימים, שיטות סירולוגיות כמו ELISA ו-Western blots המבוססות על שימוש בנוגדנים סגוליים לוירוס, ושיטות מולקולריות (כמו PCR) המבוססות על זיהוי החומר הגנטי של הוירוסים.

Vitiviruses 1.5

זוהי קבוצה טקסונומית חדשה אשר בעבר שוייכו חבריה לקבוצת ה-*Trichovirus* (Martelli et al., 1994) אבל עקב הבדלים משמעותיים במבנה הגנום, תכונות ביולוגיות ואפידמיולוגיה, הוחלט להגדיר קבוצה של וירוסים אשר נקראה בשם: *Vitivirus* (Martelli et al., 1997) אשר שייכת למשפחת ה-*Flexiviridae*.

לקבוצת ה-*Vitivirus* נמנים לפחות ארבעה וירוסים: *Grapevine Virus A (GVA)*, *GVB*, *GVD*, *Heracleum Latent Virus (HLV)*.

GVA (Grapevine Virus A) 1.5.1

GVA שייך לקבוצת ה-*Vitivirus* ולמשפחת *Flexiviridae*. זהו וירוס חוטי שקוטרו 11-12 nm ואורכו 800 nm (Martelli, 1993; Conti et al., 1980). הוירוס מועבר ע"י מספר מינים של כנימות קמחיות מהסוגים: *Planococcus* ו-*Pseudococcus*. ההעברה הינה באופן חצי מתמיד (Semipersistent) וכן ע"י חומר הריבוי. הוירוס מצוי בשיפה בריכוז נמוך, הפיזור בצמח אינו אחיד וישנן תנודות עונתיות בריכוז הוירוס ברקמות. כמו כן, ניתן להדביק פונדקאים עשבוניים באופן מלאכותי ב-*GVA* ע"י העברה מכאנית.

הוירוס מכיל גנום ssRNA חיובי שאורכו כ- 7.4Kb (Minafra et al., 1997), עטוף בסוג אחד של חלבון מעטפת (Martelli, 1993). לאחרונה נקבע רצף הבסיסים המלא של *GVA* (Minafra et al., 1994; 1997) ונמצא כי בקצה 3' ישנו זנב polyA ובקצה 5' ישנו CAP (Minafra et al., 1994). צמחים המודבקים בוירוס ה-*GVA* מכילים בנוסף ל-RNA גנומי, שתי אוכלוסיות של RNA תת גנומי (sgRNA): האחד מורכב מלפחות שלושה 3' terminal sgRNA אשר תפקידם בביטוי גנים ויראליים והשני מורכב משלושה 5' terminal sgRNA שלגביהם הפונקציה עדיין לא ידועה (Galiakparov et al., 2003a).

גנום הוירוס מכיל חמש מסגרות קריאה (Open reading frames = ORFs), המקודדות לפחות לחמישה תוצרי חלבון שונים, אשר חלקן חופפות אחת לשנייה (תרשים 2).

ORF1 - מסגרת קריאה זו נמצאת בקצה 5' טרמינלי, חופפת בחלקה ל-ORF2 ומקודדת לתוצר חלבוני בעל משקל מולקולרי של 194KDa. חלבון זה מכיל רצפים שמורים המופיעים בחלבוני שיכפול (הליקאז ו-RdRp) ואת אתר ה-*AlkB*.

ORF2 - מסגרת קריאה זו חופפת בחלקה ל- ORF1 ו- ORF3. גודל החלבון הפונקציונלי הינו 19KDa. תפקידו אינו ידוע ואין הומולוגיה בינו לבין וירוסים אחרים. יתכן שיש לו חשיבות להדבקה של הגפן וואו העברה של הוירוס באמצעות הוקטור הטבעי שלו - mealybug.

ORF3 - מסגרת קריאה זו חופפת בקצוותיה ל- ORF2 ו- ORF4. מקודדת לחלבון בגודל 31KDa אשר אופייני כחלבון התנועה (Minafra *et al.*, 1994).

ORF4 - מסגרת קריאה זו חופפת בחלקה ל-ORF3 ומקודדת לחלבון המעטפת בגודל 21.5KDa (Minafra *et al.*, 1994).

ORF5 - מסגרת קריאה זו אינה חופפת למסגרות אחרות. מקודדת לחלבון קטן בגודל 10KDa ומכאן שמו של התוצר החלבוני: p10. החלבון מכיל 2 אתרים: האחד עשיר בחומצות אמינו ארגינין (KRRRARRR; ARM) והשני אתר של zink finger domain (C-X-C-X₄-H-X₄-C), כאשר X זו כל חומצת אמינו). כמו כן, נמצא כי p10 מכיל מוטיבים אופייניים לחלבונים קושרי RNA (RNA binding protein) וכי הוא קושר חומצות גרעין באופן לא ספציפי (Galiakparov *et al.*, 2003b). אנליזה של מוטציות בשני האתרים הנ"ל הראתה שרק איזור ARM מעורב בקישור חומצות גרעין. בנוסף, נמצא כי מוטציות ב-ORF5 מגבילות משמעותית את ההצטברות של הוירוס, מונעות היווצרות סימפטומים ותנועת הוירוס בצמח מוגבלת חלקית, (Galiakparov *et al.*, 2003b). לכן, ORF5 נחשב כגורם דומיננטי המשפיע על הפתוגנזה של הוירוס ועל יכולתו להדביק את הגפן ובכך מבקר תגובות פונדקאי להדבקת הוירוס.

בעבודה זו אתמקד בפעילות פוטנציאלית מדכאת של מנגנון ההשתקה המיוחס ל-ORF1, ORF2 ו-ORF5.



תרשים 2: דיאגרמת מבנה הגנום של וירוס ה-GVA.

מטרות המחקר

- (1) איפיון רצפים בוירוס ה-GVA המעורבים בדיכוי מנגנון ההגנה הצמחי -RNA gene silencing.
- (2) בחינת מעורבתו של ההומולוג הויראלי של חלבון ה-AlkB בפתוגנזה.

2. שיטות וחומרים

שיטות עבודה עם חיידקים

2.1 מצעים לגידול חיידקים (1 L)

LB (Luria - Bertani Medium) מצע לגידול חיידקי *E. coli*. המצע מכיל: Bacto trypton 1%, Bacto yeast extract 0.5% ו-NaCl 0.5% (w/v). מצעי הגידול עוקרו באוטוקלב למשך 20 דק'. למצעי הגידול הוספה האנטיביוטיקה Ampicillin sodium או Kanamycin monosulfate (שניהם נרכשו מחברת Dushefa biochemie) בריכוז סופי של 0.1mg/ml לפני קרישתו ולמצע נוזלי לפני זריעת החיידקים בו.

Yep מצע לגידול חיידקי אגרובקטריום. המצע מכיל Bacto yeast extract 10gr (Difco), Bacto 10gr, peptone (Difco) ו-NaCl 5gr, pH הותאם לערך 7 בעזרת NaOH. לשם הכנת מצע גידול מוצק הוסף לתמיסה Bacto agar 1.5%. מצעי הגידול עוקרו באוטוקלב למשך 20 דק'. למצעי הגידול הוספו האנטיביוטיקות Rifampicin (Dushefa biochemie) במצע מוצק בריכוז של 0.03mg/ml ובמצע נוזלי בריכוז 0.015mg/ml (משמשת לסלקציית חיידק אגרובקטריום) ו-Kanamycin monosulfate, במצע מוצק בריכוז 0.1mg/ml ובמצע נוזלי בריכוז 0.5mg/ml, לפני קרישתו ולמצע נוזלי לפני זריעת החיידקים בו.

Soc מצע לחיידקי אגרובקטריום לאחר אלקטרופורציה. המצע מכיל Bacto Tryptone 20gr (Becton, Dickinson and company), Bacto Yeast Extract 5gr (Difco), NaCl 0.5gr (lab), 1M KCl 2.5ml ו-Glucose 1M 20ml. pH הותאם לערך 7 בעזרת NaOH. מצעי הגידול עוקרו באוטוקלב למשך 20 דק'. לפני השימוש יש להוסיף 1M MgCl₂ 10ml.

2.2 טרנספורציה של פלסמידים לחיידקים

2.2.1 טרנספורמציה לתאי *E. coli*

תאים קומפוטנטיים של חיידקי *E. coli* מהגזע DH5 α הוכנו לפי Sambrook et al., 1989. התאים הקומפוטנטיים חולקו למנות של 80 μ l ונשמרו בהקפאה ב-80°C. DNA 1 μ l פלסמידי או לחילופין 10 μ l תוצר ליגציה עברו טרנספורמציה לתאים קומפוטנטיים של DH5 α לפי Sambrook et al., 1989.

2.2.2 טרנספורמציה לתאי *Agrobacterium tumefaciens*

תרבית של אגרובקטריום מהגזע EHA105 גודלו בתמיסת Yep שמכילה Rifampicin ו-Kanamycin monosulfate בטלטול ב-28°C עד ל-OD₆₀₀=0.5-0.9. לאחר מכן אוספים את התאים ע"י סירכוז במהירות 4000rpm בטמפ' של 4°C למשך 15 דק'. מרחיפים את המשקע עם 30ml מים קרים וסטריליים ולאחר מכן מסרכזים במהירות 4000rpm בטמפ' של 4°C למשך 15 דק'. שוטפים עם 20ml Glycerol 15% ומסרכזים שוב. מרחיפים בנפח של 2-3ml Glycerol 10%. התאים מחולקים למנות של 50 μ l ונשמרים בהקפאה ב-80°C.

לצורך טרנספורמציה, התאים הופשרו בקרח, אליהם הוסף $1\mu\text{l}$ DNA פלסמידי. מערבבים את התאים עם ה-DNA ומעבירים לתוך קיווטת אלקטרופורציה. מפעילים זרם חשמלי ע"י מכשיר האלקטרופורציה למשך מסי' שניות בתנאים: 1.5 kv , 3000Hm , $50\mu\text{f}$ אשר מעורר את ממברנות החיידקים וגורם להיווצרות נקבוביות שדרךן חודרות מולקולות של DNA. לאחר הוצאת הקיווטה מהמכשיר, התאים מורחפים ב- $800\mu\text{l}$ soc ומועברים לטילטול למשך מינימום 3 שעות ב- 28°C . לאחר גמר הטילטול זורעים $50\mu\text{l}$ של התאים שעברו אלקטרופורציה על מצע מוצק Yep שמכיל Rifampicin ו-Kanamycin monosulfate, ומגדלים במשך 48 שעות ב- 28°C .

סריקה ושימור של חיידקי אגרובקטריום לאחר טרנספורמציה

התהליך מתבצע במספר שלבים:

(א) בוחרים במושבות ומגדלים אותן למשך לילה ב- 28°C במצע נוזלי Yep שמכיל Rifampicin ו-Kanamycin monosulfate בנפח של 3ml .

(ב) ממחצית הנפח מפיקים DNA פלסמידי בשיטת Miniprep (המתוארת בסעיף 2.3.1), על מנת לוודא שיש מחדר. לתרבית החיובית משלימים את הנפח ל- 50ml מצע נוזלי Yep שמכיל Rifampicin ו-Kanamycin monosulfate ומגדלים עוד 3 שעות ב- 28°C . לאחר מכן מעבירים את התמיסה לתוך מבחנה ועושים הדגרה בקרח למשך חצי שעה. עושים סירכוז ב- 4°C במהירות $5,000\text{rpm}$ למשך 15 דקי, שופכים נוזל עליון ואת המשקע מרחיפים ב- 0.9% NaCl קר, שוב עושים סירכוז בתנאים הנ"ל שופכים נוזל עליון ואת המשקע מרחיפים ב- 1ml Glycerol 15% קר, מחלקים למנות של $100\mu\text{l}$ ושומרים בהקפאה ב- 80°C (סטוק גליצרול).

שיטות עבודה עם DNA פלסמידי

2.3 הפקת DNA פלסמידי מהחיידקים

2.3.1 בשיטה אלקאלית (Miniprep)

DNA פלסמידי של חיידקים הופק בשיטה אלקאלית כפי שמתואר ב-Sambrook et al., 1989. את ה-DNA המופק מרחיפים ב- $40\mu\text{l}$ ddH₂O.

2.3.2 הפקת פלסמיד (Midiprep)

הפקת DNA פלסמידי בכמות גדולה (מ- 50ml תרבית חיידקים שגודלה ממושבה בודדת במשך הלילה) ההפקה בוצעה ע"י ערכה מסחרית Nucleobond Ax Midi (Macherey Nagek) לפי הוראות היצרן.

2.4 החלקת קצוות ה-DNA ע"י Klenow Fragment

זהו פרגמנט גדול של אנזים בעל פעילות פולימראז מקצה 5' לקצה 3' ואקסונוקלאז מקצה 3' לקצה 5' אך לא להיפך. באופן כזה נוצר Blunt end. מבחנת הריאקציה כוללת את המרכיבים הבאים:

$10\text{-}15\mu\text{l}$ תוצר חיתוך מנוקה מהגיל (לפי סעיף 2.5)

$2\mu\text{l}$ Klenow Buffer (x10)

$0.5\mu\text{l}$ 2mM each dNTPs (Bio lab) (בריכוז סופי של 0.05 mM)

Klenow fragment 0.1-0.5 μ l

משלימים את נפח הריאקציה ל-20 μ l עם ddH₂O
מבצעים הדגרה בטמפ' חדר למשך 20 דק' ומפסיקים את הפעילות האנזימטית ע"י הדגרה בטמפ'
75°C למשך 10 דק'.

2.5 זיהוי והפרדה של DNA בגיל אגרוז

ה-DNA נבדק ע"י הרצה בגיל אגרוז (1-2%) מוכן ב-TAE (לפי Sambrook et al., 1989). ה-DNA
זוהה בגיל ע"י צביעה באתידיום ברומיד והסתכלות באור UV.

2.6 ליגצית DNA לפלסמיד

מקטע DNA חתוך באנזימי הגבלה חובר לפלסמיד החתוך באותם האנזימים ע"י ריאקציה בנפח
של 10 μ l. הריאקציה הכילה וקטור DNA לינארי ומחדר DNA ביחסים מולריים של 3:1
בהתאמה, T4 DNA ligase 1 μ l ו- 1 μ l Buffer(X10) (Promega). מבחנות הריאקציה הודגרו
למשך הלילה ב-4°C.

שיטות עבודה עם DNA גנומי

2.7 הכנת cDNA

המטרה כאן להפוך את מולקולת mRNA למולקולת cDNA.
9 μ l mRNA טופלו ע"י 1 μ l Methyl mercury (0.1M), בוצעה הדגרה של 10 דק' בטמפ' חדר,
לאחר מכן הוסף 1 μ l β -mercaptoethanol (1.4M) ו-1 μ l תחל באוריינטציה (-).
לריאקציית ה-cDNA הוספנו את המרכיבים הבאים:
1 μ l Buffer(X10), 1 μ l DTT (0.1M), 1 μ l dNTPs (10Mm each) (Takara), RNase inhibitor
0.5 μ l (Biomedicals) (מעכב פעילות RNase), 1 μ l Enzyme AMV-RT (Promega). המבחנה
הודגרה למשך שעה בטמפ' של 42°C.

2.8 הגברת מקטעי DNA ע"י PCR (Polymerase Chain Reaction)

Polymerase Chain Reaction (PCR) הינה שיטה של הגברת מקטעי ה-DNA בעזרת התחלים
הספציפיים לקצוות המקטע. PCR המתבצע על תבנית של cDNA נקרא RT-PCR.
תערובת הריאקציה כללה את המרכיבים הבאים:
1.5 μ l של כל אחד משני תחלים לפי הנדרש
2 μ l DNA המשמש כתבנית (template)
1 μ l Deep Vent Polymerase (New England Biolabs Inc.)
2 μ l 10mM dNTPs
5 μ l Pfu Buffer (X10)
37 μ l ddH₂O

ריאקציית ה-PCR כללה בדרך כלל 30 מחזורים אשר כללו את השלבים הבאים: דנטורציה: 30
שניות ב-94°C, זיווג גדילים (קישור התחלים): 30 שניות (הטמפ' נקבעה בהתאם לגודל התחלים)

וסינתזה של הגדילים המשלימים: ב-72°C למשך זמן בהתאם לגודל ה-DNA המוגבר. תוצר הריאקציה הועמס ע"ג גיל אגרוז 1% מומס ב-TAE והמכיל EtBr והורץ בשדה חשמלי ב-100v כ-20 דק'. תוצר ה-PCR עבר ניקוי מהגיל ע"י ערכה מסחרית לניקוי תוצר PCR: Intron PCR clean kit, לפי הוראות היצרן.

2.9 Overlapped PCR (Ho et al., 1989)

שיטה זו נועדה לחבר ולהגביר מספר מקטעים של DNA. שני תוצרים של PCR החופפים באחד הקצוות שלהם נמהלו 1:50 ו-1µl מכל דוגמא שימש כתבנית לריאקציית Overlapped PCR שבעיקרה מתבצעת כמו ריאקציית PCR רגילה. תוצר הריאקציה הורץ בגיל אגרוז 1% והתוצר הרלוונטי חולץ כמתואר בסעיף 2.5.

2.10 טרנסקריפציה (ריאקציית שיעתוק)

הריאקציה הכילה: 10µl DNA (mini או midi) לינארי, 10µl Transcription buffer (x5), 1µl MgCl₂, 15µl dNTPs+cap analog (Epicentre Technologies), 5µl DTT, (Fermentas), 2µl T7 RNA Polymerase, 1µl RNase inhibitor, (Fermentas), 6µl מים שטופלו ב-DEPC. מערבבים את המרכיבים ומבצעים הדגרה של 15 דק' ב-37°C. לאחר מכן מוסיפים 1.5µl 16mM GTP, מערבבים בעדינות וממשיכים בעוד הדגרה של שתיים ב-37°C. לבדיקה מריצים 1µl בגיל אגרוז (סעיף 2.5) במתח של 55V.

שיטות עבודה עם צמחים

2.11 הדבקת צמחי *N. benthamiana* בתעתיק של ה-GVA

הדבקה בתעתיק נעשית על צמחים צעירים בגיל של כשבועיים ובעלי כ-5 עלים. להדבקה של צמחים מוסיפים 75µl מים שטופלו ב-DEPC ל-25µl תעתיק ועושים הדבקה מכנית של שני עלים מטופלים באבקת קרבורנדום (הפוצעת את שכבת האפידרמיס על מנת להקל על ההדבקה). אחרי 5 דק' שוטפים בעדינות את העלים המודבקים עם זרם חלש של מים. את הצמחים ממקמים בחממה בתנאים מתאימים ומבוקרים.

2.12 הדבקת צמחי *N. benthamiana* בריאים במיצוי של צמח נגוע ב-GVA

הדבקה במיצוי צמחי נעשית על צמחים צעירים בגיל של כשבועיים ובעלי כ-5 עלים. גרם אחד של עלי *N. benthamiana* נגועים בוירוס רוסקו ב-3ml בופר הדבקה (אשלגן פוספט) בריכוז 0.1M. לאחר מכן פוצעים 2 עלים בכל צמח המיועד להדבקה ע"י אבקת קרבורנדום. מורחים 50µl מהמוהל שהתקבל על 2 העלים ואחרי 5 דק' שוטפים בעדינות את העלים המודבקים עם זרם חלש של מים. את הצמחים ממקמים בחממה בתנאים מתאימים ומבוקרים.

2.13 בידוד פרוטופלסטים והדבקתם עם תעתיק (RNA סינטטי) (Navas-Castillo et al., 1997)

(al., 1997)

החדרה ישירה של RNA (ללא וקטור) לתוך תאים צמחיים שלמים היא פעולה קשה, משום שהתאים מוקפים בדופן שעשויה מתאית. את הדופן הזאת אפשר להסיר אם משתמשים באנזימים שמפרקים את התאית (צלולאזות ופקטינאזות). לתאים שמתקבלים לאחר פירוק הדופן קוראים

פרוטופלסטים. ה-RNA חודר לפרוטופלסטים בקלות רבה יותר מאשר לתאים שלמים, משום שהמחסום היחיד שעומד בדרכו הוא קרום התא. אבל כדי שה-RNA יעבור את הקרום השומני ויכנס לציטופלסמה, צריך להגביר את חדירות הקרום ע"י הגדלת מספר הנקבים בקרום או ע"י הרחבה זמנית של הנקבים הקיימים בעזרת PEG.

תמיסות להכנת פרוטופלסטים: כל התמיסות עוברות תהליך עיקור באוטוקלב בטמפ' 121°C למשך 30 דקי.

13%MMC

13%D-Mannitol 130gr

5mM MES 0.976gr

10mM CaCl₂ 1.47gr

pH=5.8 with 1M KOH

0.6MM

0.6M D-Mannitol 109.3gr

5mM MES 0.976gr

pH=5.8 with 1M KOH

סוכרוז 20.5%

205 gr sucrose in 1L ddH₂O

1% אגרוז

10 גרי אגרוז בתוך תמיסת 13% D-Mannitol

PEG

Polyathylene-Glycol 8000 (Sigma) 3gr

0.75MMC 7.5ml

0.6MMC

0.6M D-Mannitol 109.3gr

10mM CaCl₂ 1.47gr

5mM MES 0.976gr

pH=5.8 with 1M KOH

PIM (Protoplasts Incubation Medium)

13%D-Mannitol 130gr

2% sucrose 20gr

MES 0.8gr

Micro MES 1gr

Macro MES 1.652gr

Ammonium nitrate 1.65gr

0.7Xantibiotic antimycotic solution (Sigma)

at pH=5.6

adjust to pH=5.8 with 1M KOH

0.75MMC

0.75M D-Mannitol 136.6gr

5mM MES 1.2gr

10mM CaCl₂ 0.55gr

pH=5.8 with 1M KOH

2.13.1 תמיסת אנזימים מפרקי דופן (ממיסים אנזימים בנפח הרצוי של תמיסת הבופר MMC

13%): את תמיסת האנזימים יש לערבב כ- 20 דקי בחושך ולאחר מכן לסנן על מנת לשמור על סטריליות.

30ml	אנזים
0.15gr	0.5% צלולאז (Dushefa Biochemie)
0.075gr	0.25% פקטינו, מצראז (Yakult Honsha CO.LTD)

2.13.2 הפקת פרוטופלסטים: אוספים 8-10 עלים של בנטמינה ומבצעים סטריליזציה עם תמיסה 10% אקונומיקה, שוטפים 4-5 פעמים עם ddH₂O. חותכים את העלה עם סקלפל בחיתוכים צמודים במרווח של 1-2mm ומניחים אותם בתוך צלחת בקוטר של 15 ס"מ המכילה 30ml תמיסת אנזימים מפרקי דופן. מדגירים את העלים בתמיסה למשך הלילה בחושך בטמפ' של 25-26 °C. מערבבים בעדינות את תוכן כל צלחת ומעבירים אותו למבחנת 50ml סטרילית, מסרכזים למשך 4 דק' במהירות 100g. לאחר מכן מרחיפים בזהירות את משקע התאים ב- 10ml תמיסת 0.6MM ומסרכזים את התרחיף למשך 3 דק' במהירות 100g. את התאים שוב מרחיפים ב- 10ml תמיסת 0.6MM ומניחים אותם על גבי 10ml תמיסת סוכרוז 20.5% במבחנת 50ml סטרילית. לאחר מכן מסרכזים למשך 10 דק' במהירות 100g. יש לאסוף למבחנות 50 ml סטריליות חדשות, רק את שכבת הפרוטופלסטים האמצעית (תאים חיים), ולמהול פי 3 בתמיסת 0.6MM ע"י טפטוף. לאחר מכן שוב מסרכזים את התרחיף למשך 4 דק' במהירות 100g, מוציאים את הנוזל העליון ואת המשקע שוב מרחיפים ב- 5ml תמיסת 0.6MM בעדינות. מסרכזים למשך 2 דק' נוספות, מוציאים את הנוזל העליון ומרחיפים את המשקע בנפח סופי השווה ל-200 µl x מספר דוגמאות ה-RNA המיועד להדבקה.

2.13.3 הדבקה של פרוטופלסטים עם RNA: שמים 200 µl של פרוטופלסטים במבחנת 50ml סטרילית, מוסיפים 25µl תעתיק, מערבבים בעדינות ומוסיפים 500µl PEG טרי שעבר סינון. אחרי הוספתו מערבבים למשך חצי דק' ומיד מוסיפים 5ml תמיסת 0.6 MMC. משאירים בטמפ' חדר למשך 10-20 דק'. מסרכזים למשך 3 דק' במהירות 100g, מוציאים את הנוזל העליון ואת המשקע מרחיפים ב- 5ml תמיסת PIM עם יחס של 1:150 אנטיביוטיקת (Sigma) 0.7Xantibiotic antimycotic solution. מסרכזים למשך 3 דק' במהירות 100g ושוב מרחיפים את המשקע ב- 3ml תמיסת PIM. שמים בעדינות את הפרוטופלסטים בשתי באריות של פלטת (Test plate, Zellkultur testplatte 6, made in Europe/Switzerland) מכוסים בשכבה של 1% אגרוז. סוגרים עם פרפילם ושומרים באור בטמפ' 26 °C.

את הפרוטופלסטים אוספים אחרי 3 ימים לבדיקה במיקרוסקופ קונפוקלי ואו להפקת RNA.

2.14 אגרו-אינפילטרציה וזיהוי eGFP (Johansen&Carrington, 2001)

תרבית של חיידקי אגרובקטריום גודלה ל-OD=0.65, סורכזה והורחפה בתמיסת MS salt (Murashige&Skoog medium). את התרחיף מזריקים ל-2 עלי בנטמינה בגודל בינוני (שתילים בגיל של שבועיים). את ביטוי הגן המדווח ניבחנו במיקרוסקופ קונפוקלי. ההסתכלות נעשתה על תאי האפידרמיס ועל תאי המזופיל בהגדלה של x20, x60 ו-x10 בתנאי excitation של Argon laser של 25mW באורך גל של 488nm ומסנן קרינה נפלטת באורכי גל של 505-525nm אור ירוק. אנליזה של תוצאות פלורסנציה בוצעה באמצעות תוכנת MICA (Multy-image Quantification Analysis System) המבצעת חישובים סטטיסטיים של עוצמת פלורסנציה ממוצעת (ללא יחידות), שפותחה ע"י: Cytoview Ltd., P.O.BOX 3942, Petach Tikva 49130, Israel, 2003.

שיטות עבודה עם RNA

2.15 מיצוי של Total RNA מפרוטופלסטים

מעבירים את תמיסת הפרוטופלסטים לאפנדורף של 2ml ומסרכזים במהירות 13,000rpm בטמפי של 4°C למשך 1 דק'. שופכים בעדינות את הנוזל העליון ומוסיפים 450 µl Buffer Buffared (M NaCl) (1:1) Phenol:Chloroform 400µl-ו (50mM Tris-HCl PH=9, 10mM EDTA, SDS 2%, 0.1 (חברת גדות), עושים וורטקס קצר ומסרכזים בטמפי החדר למשך 5 דק'. את הפאזה העליונה מעבירים לאפנדורף חדש ומוסיפים 40µl 2.5M NaOAC PH=5.2 ו-1ml אתנול 100%. שמים את התמיסה למשך 1 שעה בטמפי -80°C או למשך הלילה בטמפי -20°C על מנת לשקע את ה-RNA, לאחר מכן מבצעים סירכוז במהירות 13,000rpm בטמפי 4°C למשך 15 דק'. שופכים את האתנול ומוסיפים 500µl אתנול 75%, מסרכזים במהירות 13,000rpm בטמפי של 4°C למשך 20 דק'. שופכים את הנוזל ומייבשים בעזרת וואקום למשך 5 דק' לסילוק שאריות אתנול. מרחיפים את המשקע ב- 50µl מים שטופלו ב- DEPC.

2.16 הפקת Total RNA

הפקת Total RNA ע"י Tri-reagent

ריקמת צמח צעירה במשקל 0.1 gr נכתשה בנוכחות חנקן נוזלי ו-RNA הופק בעזרת ערכה מסחרית RNA Tri-reagent (Molecular research center INC, Talron), לפי הוראות היצרן. ריכוז ה-RNA נקבע במכשיר Nano-drop. לאחר ההפקה ה-RNA נשמר בטמפי של -80°C. במקרה של שימוש ב-RNA למטרת זיהוי siRNAs, נעשה שיקוע במשך הלילה ב- -20°C בשונה מהוראות היצרן.

(Lewandowski and Dawson, 1998) Northern Blotting 2.17

תמיסות

<u>Hybridization buffer</u>	<u>MOPS X 10</u>
20% Blocking solution (0.1gr/ml casein in maleate acid)	50mM Sodium acetate
25% SSCx20	10mM EDTA
0.2% SDS	20mM MOPS
1% N-Lauroylsarcosine	pH=7
50% Formamid	<u>Maleate acidx5(1L)</u>
3.8% ddH ₂ O	Maleate acid 58gr
<u>Transfer Buffer X2 (SSC X 20)</u>	NaCl 43.85gr
30mM Tri-sodium citrate	pH=7.5
3M NaCl	<u>Blocking Solution</u>
pH= 7-8	Casein 50gr
	Maleate acidX1 500ml

Agarose loading buffer- ALB (50% Glycerol, 50% Bromophenol blue)

Formaldehyde loading buffer –FLB (69% Formamide, 24% Formaldehyde-37%, 7% MOPSx10)

2.17.1 הכנת גלאים

הכנת הגלאי מתבצעת ע"י שיעתוק (Transcription) של DNA וסינתזה של מולקולות ssRNA. לצורך הריאקציה השתמשנו בריבונוקלאוטידים של חברת Roche Applied Science כאשר כ-35% ממולקולות ה-UTPs מסומנות ב-Digoxigenin. הפלסמיד המכיל את ה-cDNA המשמש כגלאי נחתך עם אנזים הגבלה מתאים לשם קבלת פלסמיד לינארי. הריאקציה התבצעה לפי הוראות היצרן Roche Applied Science. הגלאי המוכן נשמר בתוך 50ml Hybridization buffer ב-20°C.

הגלאי בו השתמשתי למחקר הוא: קצה 5' של GVA ספציפי לגדיל חיובי של הוירוס מבוסס על שבת GR28 שנבנה במעבדתינו.

Blotting 2.17.2

הרצת הדוגמאות ו-Blotting

ל-5µl RNA (שהופק לפי סעיף 2.16) מוסיפים 2 נפחים של FLB ומדגירים את התמיסה ב-65°C במשך 10 דקות על מנת לפתוח את המבנה השניוני של ה-RNA. מיד לאחר מכן מניחים את הדוגמאות על קרח, מוסיפים 1/2 נפח ALB ומטעינים בתוך הגיל. אלקטרופורזה של RNA נעשתה בגיל אגרוז דנטורטיבי: 0.9% Agarose, 10% MOPSx10, 1.9% Formaldehyde. הפרדת הדוגמאות נעשית בבופר הרצה MOPS X 1 למשך 15 דק' במתח של 100 V ולמשך 50 דק' במתח של 75 V. לאחר מכן מערבבים את בופר ההרצה ומריצים עוד שעה במתח של 75 V. לאחר ההרצה וההפרדה של ה-RNA בשדה חשמלי מעבירים את ה-RNA מהגיל לממברנת ניילון (Roche) לפי Sambrook et al., 1989. קיבוע ה-RNA לממברנה נעשה ע"י חשיפה ל-UV למשך 3 דקות מלווה בהדגרה למשך חצי שעה ב-80°C.

2.17.3 קדם-היברידיזציה

חסימת האתרים הפנויים בממברנה (פנויים מחומצות גרעין), במטרה למנוע קישור לא ספציפי של הגלאי, נעשתה ע"י טילטול הממברנה בתנור הברידיזציה עם תמיסת היברידיזציה (Hybridization buffer) למשך שעה ב-68°C.

2.17.4 היברידיזציה

תמיסת הקדם-היברידיזציה הורחקה מהממברנה והוחלפה בגלאי המסומן, מורחף בתמיסת היברידיזציה, ותגובת ההיברידיזציה בין ה-RNA לגלאי מתרחשת תוך טילטול בתנור הברידיזציה, למשך הלילה, ב-68°C.

2.17.5 שטיפות

הגלאי נאסף לשימוש חוזר והממברנה נשטפה לשם הסרת שאריות הגלאי שנשאר בכלי, וכן גלאי שנקשר באופן לא ספציפי. שתי שטיפות ראשונות בוצעו עם 0.1% SDS, SSCx2 למשך 20 דקי כל אחת. שתי שטיפות נוספות בוצעו עם 0.1% SDS, SSCx0.1 למשך 20 דקי כל אחת. כל השטיפות בוצעו בטמפי של 68°C. בהמשך בוצעו שתי שטיפות עם Maleate Acid + Tween מלוות בשתי שטיפות עם Maleate Acid בטמפי החדר בכדי להסיר את שאריות ה-SSC וה-SDS.

2.17.6 הגבה עם נוגדן פלורסנטי וחשיפה לפילם

הגבת הממברנה לנוגדן כנגד Digoxigenin ופיתוח עם הסובסטרט Chemiluminescent substrate (CSPD) נעשו לפי הוראות החברה המייצרת Roche Applied Science. הממברנה נחשפה לפילם Biomax של חברת Kodak עד לקבלת תמונה באיכות הרצויה (פרק זמן שבין 5 דקות ללילה שלם). הפילם פותח בהתאם להוראות היצרן, תגובה עם developer למשך 1-2 דקי, נשטף במים ותגובה עם fixer למשך 1 דקי מלווה בייבוש של הממברנה.

2.18 זיהוי מקטעי siRNA

2.18.1 שבירת גלאי ע"י הידרוליזת אלקלין לזיהוי מקטעי siRNA בגודל של 21-26 bp

בתהליך זיהוי siRNAs הגלאי עובר הברידיזציה עם מולקולות קצרות של RNA ולכן יש צורך לשבור את הגלאי למקטעים קצרים. לצורך כך מוהלים את תכולת ריאקציית הגלאי (במקרה שלנו גלאי של קצה 5' GVA) בנפח אקוויוולנטי של מים ושני נפחים של בופר קרבונאט, 60mM Na₂CO₃, pH=10.2 (40mM NaHCO₃) ושמים להדגרה ב-60°C במשך 10-60 דקי. על מנת לעצור תגובת ההידרוליזה, מוסיפים בופר נייטרליזציה (200mM sodium acetate, 1%(v/v) acetic acid, pH=) הורחף ב-100µl מי DEPC. את הגלאי השבור שומרים בתמיסת היברידיזציה (לפי סעיף 2.17) בטמפרטורה של 20°C-.

2.18.2 הרצת הדוגמאות לזיהוי מקטעי siRNA

תוצרי הפקת כלל ה-RNA שהופק מצמחי בנטמינה בשיטת Tri-reagent (לפי סעיף 2.16) נבדקו לגבי ריכוזם במכשיר Nano-drop (ריכוז הנע בין 500-1000 ng\UL) והורצו בגיל פוליאקרילאמיד דנטורטיבי בריכוז 15% המורכב מ-2 שכבות של גילים המפורטים עפ"י סדר הכנתם: גיל הפרדה (תחתון) Separating gel ו- גיל הטענה (עליון) Stacking gel.

Separating gel

5ml ddH₂O
3.75ml Acrylamide 40%
0.7gr Urea
0.5ml TBEX10
75µl 10% APS
10µl TEMED

Stacking gel

4.75 ml ddH₂O
0.75 ml 40% Acrylamide
0.5ml TBEX10
50µl 10% APS
5µl TEMED

Sample buffer (SB)

1ml Formamide
200µl TBE X 10

TBEX10

Tris base	108gr
Boric acid	55gr
0.5M EDTA pH=8	40ml
ddH ₂ O→	1L

שלבי הרצת הדוגמאות

1. הכנת הגיל פוליאקרילאמיד 15% : ממיסים את ה-Urea במים תוך כדי חימום ולאחר ההמסה מוסיפים את שאר המרכיבים. משתמשים במערכת Mini Gel של חברת Bio-Rad ו-spacers בעובי 1.5mm. בשלב ראשון יוצקים את השכבה התחתונה ומעליה תמיסת בוטאנול על מנת לשטח את הגיל. לאחר שהגיל נקרח שופכים את הבוטאנול, מייבשים, יוצקים את השכבה העליונה ומכניסים את המסרק ליצירת באריות.

2. הכנת הדוגמאות: ל-10µl RNA מוסיפים נפח אחד של בופר הטענה SB (83.3% Formamid בתוך בופר TBEX10) ומכניסים להדגרה ב-70°C ל-5 דק'. מיד לאחר מכן מעבירים את הדוגמאות על קרח ומוסיפים 3µl ALB.

3. אלקטרופורזה של הדוגמאות נעשית במתח של 150V במשך 45 דק' בתוך תמיסת בופר הרצה TBEX0.5.

לאחר ההרצה הגיל נצבע ב-EtBr וצולם על מנת לבדוק את טיב ההרצה וריכוז הדוגמאות.

2.18.3 Blotting – העברת חומצות גרעין מהגיל לממברנה בשיטה רטובה

לאחר ההרצה הונח הגיל על שלושה ניירות Watman הטבולים בבופר TBE X0.5, על הגיל הונחה ממברנת ניילון טעונה חיובית של חברת Roche Applied Science ספוגה בבופר, עליה עוד שלושה ניירות Watman ספוגים, ומעל ומתחת לערימה של ניירות העוטפים את הגיל והממברנה (בצורת סנדויץ') מניחים ספוגים גם הם ספוגים בבופר. מכניסים הכל לתוך קסטה המוכנסת למכשיר Electrotransfer רטוב ומריצים למשך 30 דק' בזרם של 200mA בתוך בופר TBEX0.5 (מכשיר ההרצה, מכשיר ה-Electrotransfer והקסטה הם תוצרת חברת Bio-Rad). עם תם העברת חומצות

הגרעין לממברנה, בוצע קיבוע שלהן לממברנה ע"י חשיפה לאור UV למשך 3 דקי מלווה בהדגרה למשך חצי שעה ב-80°C.

2.18.4 קדם-היברידיזציה: כמו בסעיף 2.17.3 רק בטמפי 37°C.

2.18.5 היברידיזציה: כמו בסעיף 2.17.4 רק בטמפי 37°C.

2.18.6 שטיפות: ההסבר זהה לסעיף 2.17.5 רק ששתי שטיפות בוצעו רק עם 0.1% SDS SSCx2 למשך 20 דקי כל אחת. השטיפות בוצעו בטמפי החדר.

2.18.7 הגבה עם נוגדן פלורסנטי וחשיפה פילם: כמו בסעיף 2.17.6

שיטות עבודה עם חלבונים

2.19 הפרדת חלבונים בג'ל אקרילאמיד בנוכחות SDS (SDS-PAGE)

2.19.1 הפקת חלבונים

שוקלים 0.2gr עלים, מוסיפים 1ml בופר ESB וכותשים, מעבירים את הנוזל לאפנדורף ומרתיחים בטמפי 100°C למשך 5 דקי. מבצעים צנטריפוגה של 10 דקי במהירות 14,000rpm ואת הנוזל העליון מעבירים לאפנדורף חדש ומוסיפים (x4) Loading Buffer ביחס של 3:1. את החלבונים שומרים בהקפאה ב-20°C.

ESB buffer (100ml):

75 mM Tris pH=6.8

0.9gr

9M Urea 54.1gr

4.5% SDS 4.5gr

7.5% β-mercaptoethanol 7.5ml

92.5ml ddH₂O

2.19.2 אלקטרופורזה (Laemmli, 1970)

שיטה זו מתבססת על הפרדת החלבונים השונים בשדה החשמלי ע"פי גודלם. החלבונים מוטענים ע"י גיל פוליאקרילאמיד ומופרדים בשדה חשמלי לאחר שעברו דנטורציה עם SDS והרתחה.

ההפרדה מתבצעת במכשיר Mini-Protean של חברת Bio-Rad. נעשה שימוש בגיל בריכוז של 12% אקרילאמיד המורכב משתי שכבות של גילים המפורטים עפ"י סדר הכנתם: גיל הפרדה (תחתון) Separating gel ו- גיל הטענה (עליון) Stacking gel.

Separating gel

1.25ml Separating buffer X4: (0.125M Tris-HCl pH 8.8, 4ml 10% SDS, 78ml ddH₂O)

2.1ml ddH₂O

1.6ml 40% Acrylamide

50 μl 10% APS

5μl TEMED

Stacking gel

0.76ml Stacking buffer X4: (0.125M Tris-HCl pH 6.8, 4ml 10%SDS , 90ml ddH₂O)

1.93ml ddH₂O

0.3ml 40% Acrylamide

35µl 10% APS

3µl TEMED

לתמיסות החלבונים הנבדקות הוסף (Laemmli Sample buffer) בופר דוגמא ביחס של 1:3 (Laemmli, 1970). התערובת הורתחה למשך 5 דק' והוטענה על הגיל. ההרצה נעשתה עם בופר

הפרדה Running buffer X1: (Tris 15.132gr/l, Glycine 71.31gr/l, SDS 5gr/l pH= 8.3) : 15 דק' ראשונית ב- 15mA, ו- 1 שעה ב- 20mA. בהתאם לתוכנית הבאה:

2.19.3 אנליזה Western blot (Towbin et al., 1979)

שיטה זו מאפשרת זיהוי של החלבון הנבדק באמצעות שימוש בנוגדן ספציפי כנגדו.

העבודה בשיטה זו נעשתה בהתאם לשלבים הבאים:

1. הרצת גיל SDS-PAGE עם דוגמאות החלבון.
2. העברת החלבונים לממברנת ניטרולולו (NC) בזרם של כ- 40mA במשך 60 דק' ע"י מכשיר BioTrans Midi של חברת Gelman Sciences.
3. חסימת האתרים הפנויים בממברנה (blocking) על ידי טלטול הממברנה למשך שעתיים בטמפ' החדר בתמיסה המכילה 5% אבקת חלב בבופר Tris-buffered saline-Tween 20 (TBST).
4. הגבת הממברנה עם הנוגדן הראשוני (*) מהול ב- TBST למשך הלילה ב- 4°C.
5. שלוש שטיפות של 5 דק' כל אחת והעברה של הממברנה אל תמיסת TBST אליה הוסף הנוגדן השניוני anti-rabbit (Sigma) במיחול 1: 10,000 שיוצר בעכבר, לנוגדנים אלה קשור האנזים אלקלין פוספטאז (AP).
6. טילטול למשך 1 שעה בטמפ' החדר ושטיפת הממברנה שלוש פעמים למשך 5 דק' לסילוק שאריות הנוגדן שלא נקשרו. העברת הממברנה לתמיסה המכילה בופר סובסטרט (NBT) + סובסטרט (BCIP) (Promega) לאנזים אלקלין פוספטאז.
7. פיתוח הריאקציה נעשה בחושך תוך כדי טלטול איטי במשך 2-10 דק', הריאקציה מופסקת ע"י שטיפה של הממברנה במים.

תאור הנוגדן ששימש למחקר: (*) נוגדן במיחול 1: 500 כנגד חלבון ה-MP של וירוס ה-GVA, זהו נוגדן שהוכן במעבדתנו כנגד חלבון MP רקומבננטי (נוגדן פוליקלונלי שיוצר בארנבת).

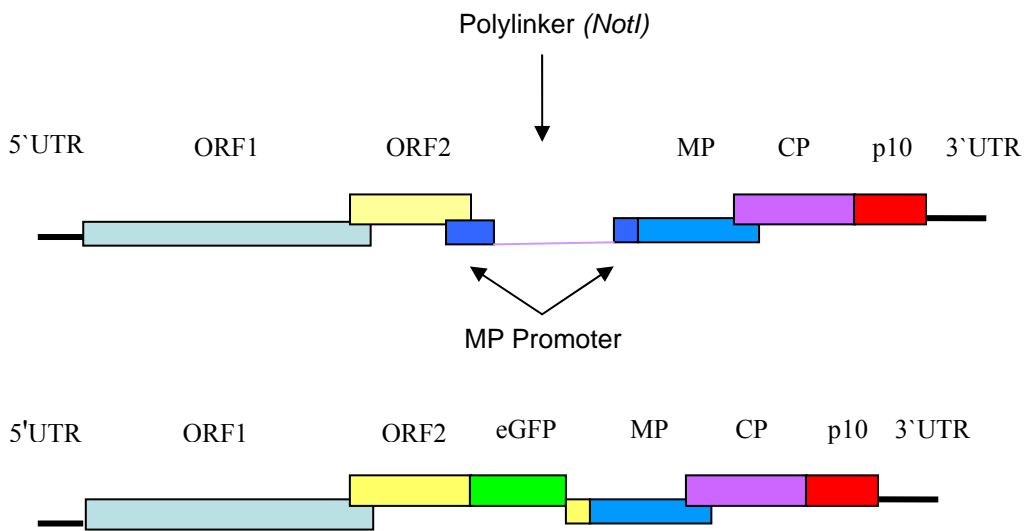
2.20 פלסמידים (וקטורים המשמשים לשיבוט קטעי DNA)

1. הפלסמיד pGEM T-easy (Promega), מכיל גן עמידות ל-Ampicillin ומבוצעת סלקציה כחול לבן לנוכחות המחדר.

2. השבט הויראלי pGVA-GFP-252 מאוחה לגן מדווח eGFP, מכיל את הרצף השלם של ה-GVA משובט בתוך Puc57 המכיל גן עמידות ל-Ampicillin.

אופן בניית שבט המכיל איחוי בין וירוס ה-GVA לבין גן מדווח eGFP

תוצרי ה-PCR עברו ניקוי מהגיל (עפ"י סעיף 2.5) ושימשו כתבנית ל- Overlapped PCR. לאחר ביצוע Overlapped PCR התוצר נוקה מהגיל וביצענו חיתוך עם אנזימי הגבלה *NotI* (הנמצא בפוליילינקר בשבט pGVA-66-3 ובסוף eGFP) ו-*AvrII* (הנמצא ב-ORF2), לתוצר המנוקה ולשבט pGVA-66-3, ליגציה (לפי סעיף 2.6) וטרנספורמציה לתוך תאי DH5 α (לפי סעיף 2.2.1). כך שובט הגן המדווח eGFP, כשהוא מאוחה לקצה ORF2 בשבט pGVA-66-3 והשבט שנבנה נקרא pGVA-GFP-252.



תרשים 1: עליון: pGVA-66-3 - שבט ביניים אליו הכנסתי את רצף ORF2 מאוחה ל-eGFP ובעזרתו בניתי את השבט pGVA-GFP-252. **תחתון: pGVA-GFP-252** - הרצף השלם של GVA-eGFP בתוך פלסמיד ה-PUC57 תחת בקרת T7 RNA promoter.

3. הפלסמיד pCAMBIA, מכיל גן עמידות ל-Kanamycin (ראה בהמשך אופן בניית פלסמיד בינארי pGVA-69-2 בפרק התוצאות סעיף 3.2).

4. שבט GR28 שימש לבניית גלאי קצה 5' של GVA ספציפי לגדיל החיובי של הוירוס. הגלאי מכיל 1000 בסיסים של קצה 5' של הוירוס בתוך פלסמיד pGEM T-easy.

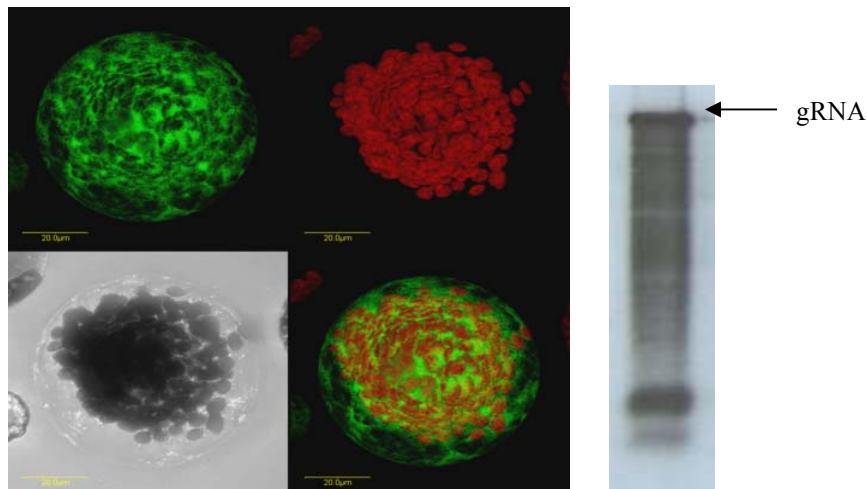
3. תוצאות

3.1 בניית שבט pGVA-GFP-252

להשגת מטרות העבודה היה צריך להכין שבט אינפקטיבי (בעל יכולת הדבקה) של GVA המבטא גן מדווח של eGFP. הגנום של GVA מורכב מחמישה גנים אשר, מלבד הגן הקיים ב- ORF2, נמצאו חיוניים לצורך קבלת הדבקה בוירוס וסביר להניח כי שינוי מהותי בגנים אלה עלול להשפיע על יכולתו של הוירוס להדביק צמחים. בהתאם לכך, בחרנו להכין שבט אינפקטיבי של GVA המבטא את הגן המדווח eGFP מאוחה לגן הקיים ב- ORF2 אשר תפקידו טרם נקבע. על מנת לקבל איחוי בין הגנים של ORF2 ו-eGFP נעשו בהתחלה שתי ריאקציות של PCR להגברת כל אחד מהגנים האלה בנפרד. בשלב השני, שני התוצרים שימשו באותה מבחנה כתבנית להגברת תוצר PCR אחד אשר יכיל את שני הגנים מחוברים. התוצר של ה- Overlapped PCR שובט בשבט ביניים pGVA-66-3, כפי שתואר בשיטות העבודה, על מנת לייצר את השבט pGVA-GFP-252 (סעיף 2.20, תרשים 1 בשיטות עבודה). אימות השבט המתקבל נעשה ע"י חיתוך באנזימי ההגבלה *NotI*, ו- *BglIII* וקביעת רצף של המקטע עם איחוי הגנים.

3.1.1 בדיקת הביטוי של GVA-GFP-252 בפרוטופלסטים של *N. benthamiana*

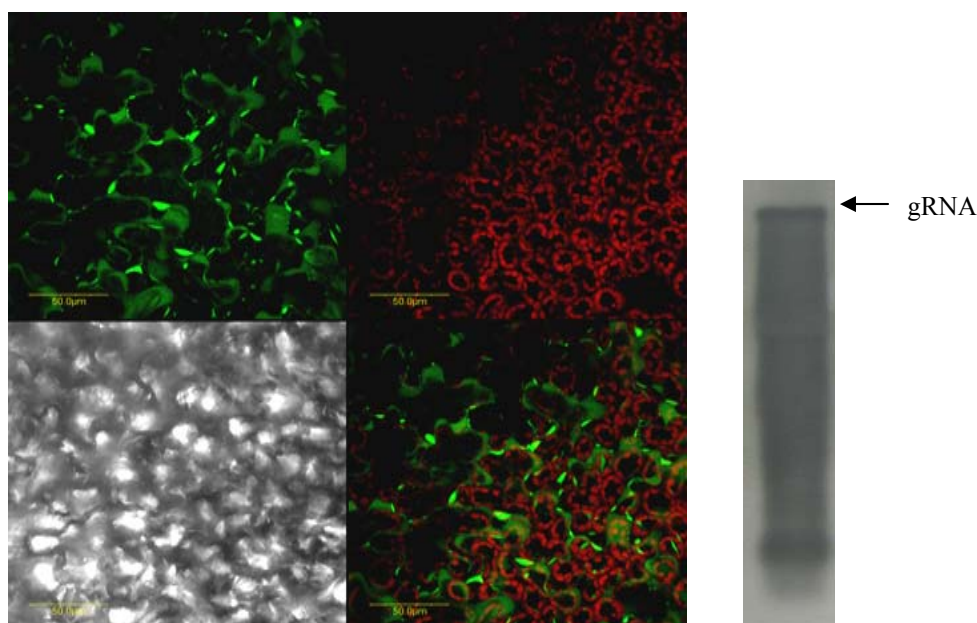
על מנת לבדוק באם איחוי גן ה-eGFP עם הגן של ORF2 לא פוגע באינפקטיביות של הוירוס המוטנט, בדקנו את השיכפול שלו בהתחלה במערכת של פרוטופלסטים של בנטמינה. RNA תוצר ריאקציית שיעתוק (לפי סעיף 2.10) של השבט pGVA-GFP-252 הודבק לפרוטופלסטים (לפי סעיף 2.13) והשיכפול של ה-RNA הויראלי נבדק שלושה ימים לאחר ההדבקה בעזרת ריאקציית Northern blot והיברידיזציה עם גלאי ספציפי (לפי סעיף 2.17) וע"י הסתכלות במיקרוסקופ קונפוקלי לצורך בחינת ביטוי ה-eGFP. לפי התוצאות המוצגות בתמונה 1 רואים ביטוי של eGFP (שמאלי) ושיכפול של RNA ויראלי (ימני), ולכן ניתן היה להסיק כי יכולת השיכפול של הוירוס המוטנט בתא לא נפגעה.



תמונה 1: שמאלי: תמונת מיקרוסקופ קונפוקלי המציגה ביטוי של eGFP 3 ימים לאחר הדבקת פרוטופלסטים עם השבט האינפקטיבי pGVA-GFP-252. **ימני:** פילם של Northern blot המציג שיכפול של RNA של הגנום הויראלי שהופק מהפרוטופלסטים (לפי סעיף 2.15) 3 ימים לאחר ההדבקה בהגבה עם גלאי של קצה 5' GVA ספציפי לגדיל החיובי של הוירוס.

3.1.2 הדבקת צמחים בתעתיק (RNA סינטטי) של GVA-GFP-252

איחוי גן ה-eGFP לנגן של ORF2 לכאורה אינו פוגע בשיכפול של ה-RNA הויראלי ברמת התא. בשלב הבא רצינו לבדוק באם האיחוי הזה פוגע באינפקטיביות של הוירוס המוטנט בצמח התלויה בגורמים נוספים כמו יכולת תנועה בין התאים ובתוך הרקמות הצמחיות והעטפות ע"י חלבון המעטפת. צמחי *N. benthamiana* בגיל של כשבועיים הודבקו ע"י RNA תוצר ריאקציית שיעתוק (לפי סעיף 2.10 ו-2.11) של השבט pGVA-GFP-252. כעבור 10 ימים לאחר ההדבקה, הצמחים המודבקים החלו להראות סימפטומים אופייניים לנגיעות ב-GVA המתבטאים בקימוט עלים וכלרוזה באיזור העורקים (תמונה 3 שמאלי). על מנת לבחון את הביטוי של הגן המדווח הנישא בתוך גנום ה-GVA בדקנו את ביטוי ה-eGFP בצמחים המודבקים בשבט pGVA-GFP-252 תחת מיקרוסקופ קונפוקלי. התוצאות הצביעו על ביטוי eGFP בתאים של הצמחים תוך 10-14 יום ממועד ההדבקה (תמונה 2 שמאלי). כמו כן, על מנת לבדוק באם שיכפול הוירוס המוטנט לא נפגע ברמת הצמח, הופק RNA (לפי סעיף 2.16) מאותם הצמחים המודבקים ב-GVA-GFP-252 והשיכפול של ה-RNA הויראלי נבדק בריאקציית Northern blot והיברידזציה עם גלאי ספציפי (לפי סעיף 2.17), (תמונה 2 ימני). התוצאות המוצגות בתמונה 2 מעידות על ביטוי של eGFP ושיכפול של RNA ויראלי, ולכן ניתן היה להסיק כי יכולת השיכפול של הוירוס המוטנט בצמח לא נפגעה.



תמונה 2: שמאלי: ריקמה מצמח *N. benthamiana* מודבקת בשבט pGVA-GFP-252 10-14 ימים מיום האילוח. **שמאלי עליון- חלבון ה-eGFP** המבוטא בחללים הבין תאיים כפי שנצפה במיקרוסקופ קונפוקלי. **ימיני עליון- אוטופלורנסציה של הרקמה, שמאלי תחתון-** תמונה של הרקמה. **ימיני תחתון-** אוטופלורנסציה וביטוי eGFP על מנת להראות שאין חפיפה בין השניים. **ימני:** פילם של Northern blot המציג שיכפול RNA של הגנום הויראלי בהגבה עם גלאי של קצה 5' ספציפי לגדיל החיובי של הוירוס, בהפקה של RNA שבועיים לאחר הדבקת צמח הבנטמינה עם השבט pGVA-GFP-252.



תמונה 3: צמח *N. benthamiana* מודבק ע"י תתיק של שבט pGVA-GFP-252 (משמאל) מראה סימפטומים של מחלה האופייניים לנגיעות ב-GVA, 10-14 ימים לאחר ההדבקה בהשוואה לצמח *N. benthamiana* בריא (מימין).

3.1.3 בחינת יציבות ביטוי הגן המדווח לאורך זמן

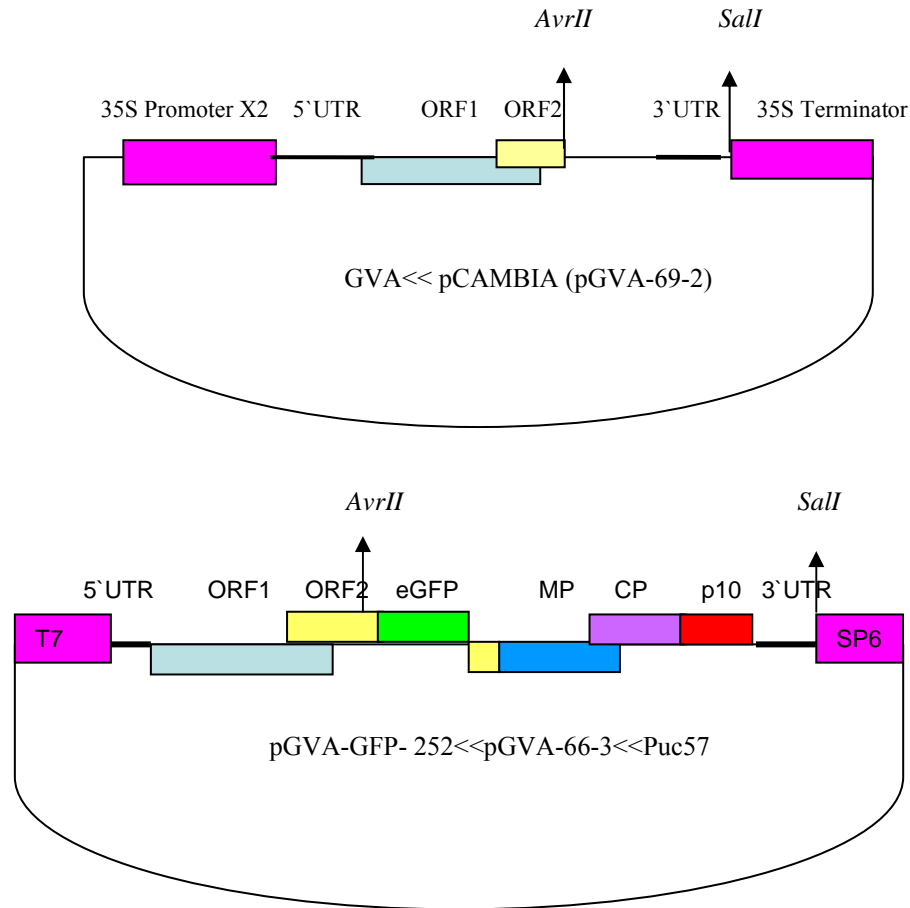
היות והגן של eGFP אינו ויראלי ואינו חיוני לשיכפול הוירוס, קיימת אפשרות כי הוירוס המוטנט GVA-GFP-252 "יוותר" עליו והגן לא יהיה יציב בגנום הוירוס לזמן ארוך. על מנת לבדוק את יציבות הגן eGFP בגנום בוירוס נעשתה סדרה של העברות של הוירוס בין צמחים ע"י כתישת עלה מצמח מודבק עם בופר פוספט והדבקת המיצוי לצמח בריא (לפי סעיף 2.12). הצמחים המודבקים בכל מחזור העברה נבדקו במיקרוסקופ קונפוקלי. נמצא כי הגן eGFP היה יציב בתוך גנום הוירוס עד ל-6 העברות; בהעברה השביעית ביטוי ה-eGFP היה מזערי. בנוסף, מצאנו כי צמח המקור הראה ביטוי של eGFP גם בהיותו בוגר ולמשך כ-5 חודשים לאחר ההדבקה. תוצאות אלו מלמדות על יציבות ניכרת של רצף ה-eGFP בתוך גנום GVA-GFP-252.

3.2 שיבוט של pGVA-GFP-252 לתוך פלסמיד pCAMBIA (יצירת שבט

pGVA-GFP-256

בכדי לבטא את ה-GVA המשובט בצמחי *N. benthamiana* באמצעות מערכת אגרובקטריום, יש צורך להשתמש בפלסמיד המכיל פרומוטור 35S. במעבדה נבנה שבט, הנקרא pGVA-69-2, המכיל חלק של גנום ה-GVA בתוך וקטור בינארי (פלסמיד pCAMBIA2301, אשר הוחדרו אליו שני עותקים של הפרומוטור 35S). שבט זה, מכיל את הרצף השלם של ORF1 (חלבוני השיכפול), מחצית של ORF2 (עד לאתר ההגבלה *AvrII* במיקום 5307 bp) ואת קצה 3' של הגנום (תרשים 1 עליון). על ידי חיתוך עם האנזימים *AvrII* ו-*Sall* של שבט pGVA-69-2, וחילוור המקטע התחום בין האתרים של אותם האנזימים בשבט pGVA-GFP-252 (תרשים 1 תחתון), התקבל השבט pGVA-GFP-256, המכיל את הגנום השלם של וקטור ה-GVA מאוחה לגן המדווח eGFP בתוך pCAMBIA. השבט הוחדר לתוך חיידקי אגרובקטריום מהזן EHA105 ע"י אלקטרופורציה (לפי סעיף 2.2.2). צמחי בנטמינה בגיל של שבועיים הודבקו באמצעות הזרקה (אגרו-אינפלטרציה) והצמחים נבדקו ויזואלית להופעת סימפטומים ובמיקרוסקופ קונפוקלי לביטוי eGFP. סימפטומים

אופייניים להדבקה ב- GVA החלו להתפתח כ- 10-14 יום לאחר ההדבקה. בדומה, אובחן ביטוי של eGFP בצמחים המודבקים, אם כי ברמה פחותה מאשר זו המתקבלת מהדבקת הצמחים עם RNA של GVA-GFP-252.



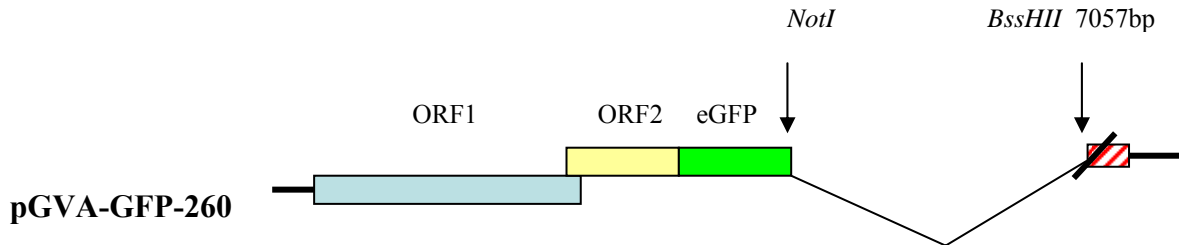
תרשים 1: עליון: תרשים סכמטי של שבת pGVA-69-2, **תחתון:** תרשים סכמטי של שבת pGVA-GFP-252. השבת pGVA-GFP-252 מכיל את הגנום השלם של GVA עם הגן המדווח eGFP משובט בתוך פלסמיד Puc57. בעזרת חיבור המקטעים בין 2 אתרי החיתוך ניתן לקבל שבת המכיל את הגנום השלם של GVA מאוחה ל-eGFP בתוך pCAMBIA תחת בקרה של 35S promoter (שבת pGVA-GFP-256).

3.3 בניית מערכת מינירפליקון (שבת pGVA-GFP-260) לבחינת דיכוי מנגנון

ההשתקה הצמחי

בתור אסטרטגיה לעורר את מערכת ההשתקה הצמחית פיתחנו מערכת הדומה לזו של Chiba, *et al.* המערכת מבוססת על החדרה של מינירפליקון הכולל רצפים חיוניים לשיכפול של נגיף ה-BYV מאוחה לגן מדווח בעזרת אגרובקטריום. מערכת זו דווחה כיעילה ורגישה לאבחון ואנליזה השוואתית של מדכאים חלשים וחזקים למנגנון ההשתקה הצמחי. על מנת לזהות מרכיבים בגנום ה-GVA המעורבים בדיכוי ההשתקה הצמחית, פיתחנו מערכת דומה המבוססת על גנום ה-GVA המבטא גן מדווח eGFP. כבסיס למערכת זו השתמשנו בשבת pGVA-GFP-252 שפורט בסעיף 3.1. ה-DNA של pGVA-GFP-252 נחתך עם אנזימי הגבלה *BssHIII* (מצוי בתוך ORF5) ו-*NotI*

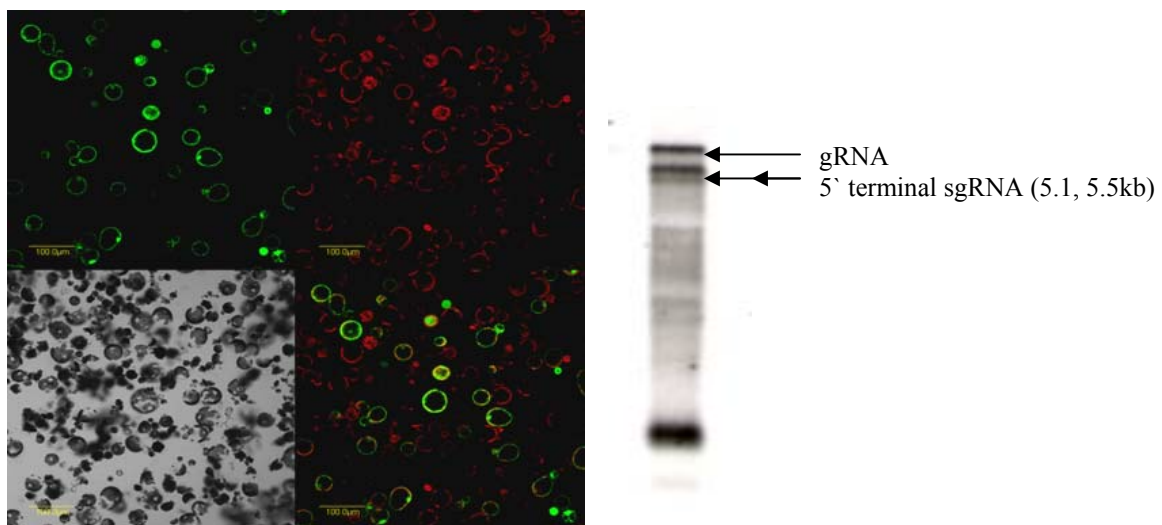
(נמצא מיד אחרי הגן ל-eGFP), ולאחר שקצוות ה-DNA החתוך טופלו ב-Klenow Fragment (לפי סעיף 2.4), נעשתה ליגציה לצורך יצירת השבט pGVA-GFP-260 (כתוצאה מפעילות Klenow ורה-ליגציה מחדש נוצר אתר *AvrII* נוסף באיזור החיבור pGVA-GFP-260). השבט pGVA-GFP-260 מכיל את רצף של ORF1 החיוני לשיכפול ו-ORF2 באיחוי עם גן ה-eGFP אך חסר את הרצפים של ORF3 (MP), ORF4 (CP) ו-ORF5 (p10) (תרשים 2).



תרשים 2: תרשים סכמטי למינירפליקון pGVA-GFP-260 בתוך פלסמיד PUC57 תחת בקרת T7 RNA Promoter.

בדיקת שיכפול של השבט בפרוטופלסטים של *N. benthamiana*

על מנת לבדוק באם הוצאת הגנים המקודדים ל-CP, MP, p10 לא פגעה ביכולת השיכפול של הוירוס המוטנט, בדקנו את השיכפול שלו במערכת של פרוטופלסטים של *N. benthamiana*. RNA תוצר ריאקציית שיעתוק (לפי סעיף 2.10) של השבט pGVA-GFP-260 הודבק לפרוטופלסטים (לפי סעיף 2.13) והשיכפול של ה-RNA הויראלי נבדק שלושה ימים לאחר ההדבקה ע"י ריאקציית Northern blot והיברידזציה עם גלאי ספציפי (לפי סעיף 2.17) וע"י הסתכלות במיקרוסקופ הקונפוקלי לצורך בחינת ביטוי ה-eGFP. התוצאות המוצגות בתמונה 4 מעידות על ביטוי של eGFP ושיכפול של RNA ויראלי, ולכן ניתן להסיק כי יכולת השיכפול של הוירוס המוטנט בתא לא נפגעה וכי האיזורים שהוחסרו מהרצף השלם של הוירוס אינם דרושים לשיכפול של הגנום בתא.



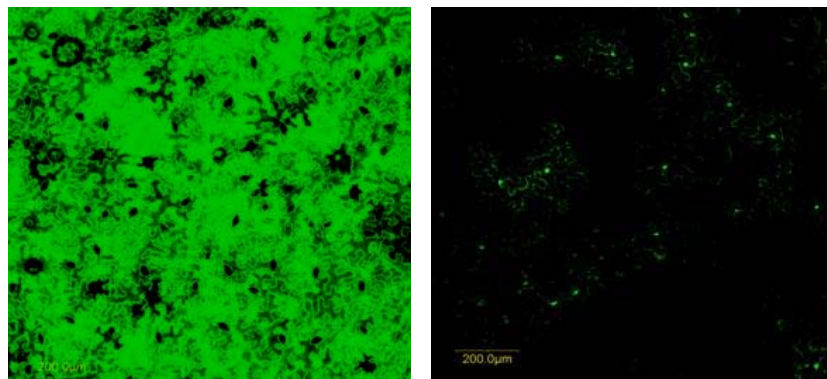
תמונה 4: שמאלי: תמונת מיקרוסקופ קונפוקלי המציגה ביטוי של eGFP 3 ימים לאחר הדבקות פרוטופלסטים עם השבט pGVA-GFP-260. **ימני:** פילם של Northern blot המציג שיכפול RNA של הגנום הויראלי (gRNA) ו-RNA תת-גנומי (sgRNA) שהופק מהפרוטופלסטים (לפי סעיף 2.15) 3 ימים לאחר ההדבקה בהגבה עם גלאי של קצה ה-5' ספציפי לגדיל החיובי של הוירוס.

3.4 שיבוט של pGVA-GFP-260 לתוך פלסמיד ה-pCAMBIA

במטרה לבטא את המינירפליקון pGVA-GFP-260 בצמח ע"י מערכת של אגרובקטריום, יש צורך להשתמש בפלסמיד המכיל פרומוטור 35S. לשם כך ביצעתי חיתוך של השבט pGVA-GFP-260 והשבט pGVA-69-2 (תרשים 1) בעזרת האנזימים *SalI* ו-*AvrII* וביצעתי ליגציה בין המקטעים המתאימים שמתקבלים (בדומה לשיבוט שביצעתי לפי סעיף 3.2). השבט שהתקבל, pGVA-GFP-269, מכיל ORF1 ו-ORF2 מאוחה לגן המדווח eGFP בתוך pCAMBIA. השבט הוכנס לתוך אגרובקטריום מהזן EHA105 ע"י אלקטרופורציה (לפי סעיף 2.2.2). צמחי בנטמינה בגיל של שבועיים הודבקו באמצעות הזרקה (אגרו-אינפלטרציה) והצמחים נבדקו במיקרוסקופ קונפוקלי לביטוי eGFP.

השבט pGVA-GFP-269 אינו מכיל את הרצפים של CP, MP ו-p10 (שאינו מתבטא כי רוב הרצף שלו הוחסר). המינירפליקון מתבטא רק באותם תאים בעלים אליהם הוזרק ואיננו יכול לנוע בין התאים בעלה המוזרק ולא סיסטמית לעלים חדשים. כמו כן, בניגוד לוירוס של GVA, המינירפליקון אינו משרה סימפטומים בצמח ולכן ניתן לבחון את האינפקטיביות שלו במיקרוסקופ קונפוקלי לפי רמת ביטוי הגן המדווח, או לחילופין באנליזת Northern blot לבחינת שיכפול ה-RNA הויראלי.

באגרו-אינפלטרציה של שבט pGVA-GFP-269 לצמחי בנטמינה, 4 ימים לאחר ההדבקה, ניתן היה להבחין בתאים פלורסנטיים בודדים (תמונה 5 ימני) ואילו אגרו-אינפלטרציה של pCAMBIA המבטאת eGFP הראתה רמה גבוהה של פלורסנציה באיזורים המוזרקים (תמונה 5 שמאלי). הרמה הנמוכה של הפלורסנציה שהתקבלה מהזרקה המינירפליקון לצמח נובעת כנראה משיפעול חזק ויעיל של מנגנון ההשתקה הצמחי (Gene silencing) ע"י המינירפליקון. רמת הביטוי של ה-eGFP בצמחים המוזרקים עם pGVA-GFP-269 פחתה עם הזמן וביום ה-6-7 כמעט ולא ניתן היה לגלותה במיקרוסקופ הקונפוקלי.



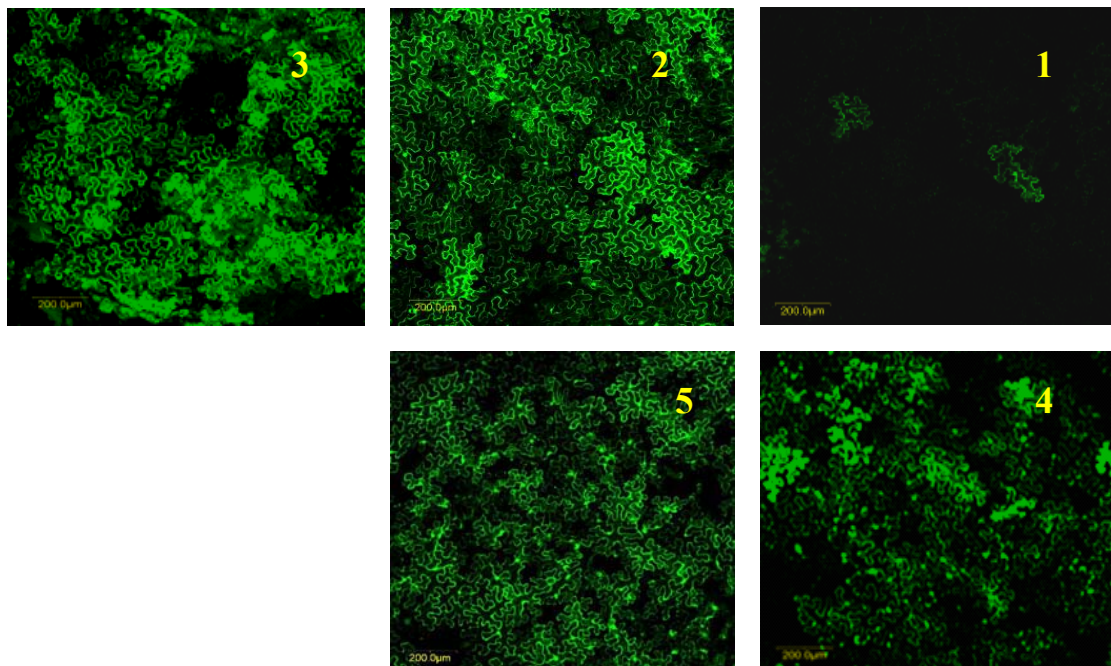
תמונה 5: תמונת מיקרוסקופ קונפוקלי של ריקמת צמח *N. benthamiana* מעלה מוזרק, 4 ימים לאחר ההדבקה. **ימני-** הפלורסנציה החלשה שהתקבלה עקב הזרקה שבט pGVA-GFP-269. **שמאלי-** הפלורסנציה החזקה שהתקבלה עקב הזרקה eGFP.

3.5 בחינת מדכאים שונים במערכת של מינירפליקון

על מנת לבחון את האפשרות כי הביטוי הנמוך של ה-eGFP בצמחים המוזרקים עם המינירפליקון pGVA-GFP-269 הוא תוצאה של שיפעול לתגובת ההשתקה הצמחית (Gene silencing), החלטנו להזריק תערובת של תרבית חיידק אגרובקטריום הנושא את השבט pGVA-GFP-269 עם תרבית חיידק אגרובקטריום אחר המבטא אחד מהגנים המוכרים כמדכאים (suppressor of gene silencing) למנגנון ההשתקה הצמחי: p19, p25, HC-Pro, אותם קיבלנו ממעבדה של David UK, Baulcombe, ו-V2 אותו קיבלנו ממעבדה של דר' ידידה גפני ממנהל המחקר החקלאי. בניסוי בדקנו את עוצמת ביטוי ה-eGFP באמצעות המינירפליקון עקב הוספת כל אחד מהגנים האלה, 7 ימים לאחר ההדבקה (לפי סעיף 2.14).

התוצאות המוצגות בתמונה 6 וגרף 3 (המופיע בהמשך) מראות כי חלה עליה ברמת ביטוי ה-eGFP בתוספת כל אחד מהגנים המדכאים את מנגנון ההשתקה הצמחי.

מסקנה מהתוצאות הנ"ל: מנגנון ההשתקה הצמחי השפיע על האינפקטיביות של המינירפליקון ולכן קיים ביטוי נמוך מאוד של eGFP. כמו כן, מערכת זו של מינירפליקון היתה יעילה לבדיקת חלבונים שונים המוכרים כמדכאים למנגנון ההשתקה הצמחי.

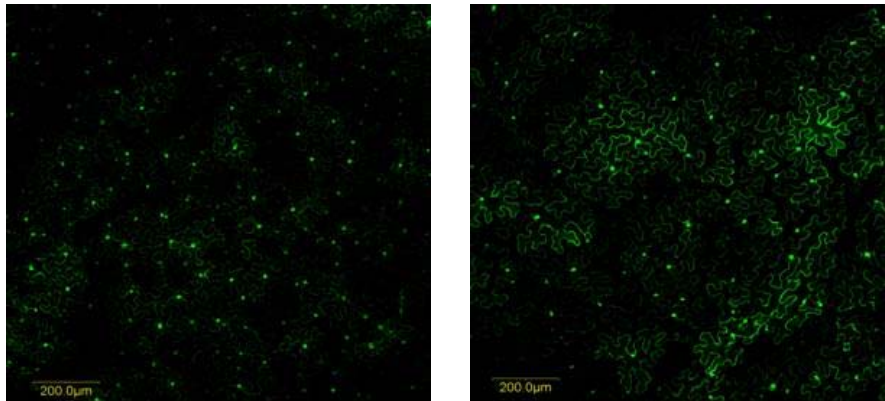


תמונה 6: תמונת מיקרוסקופ קונפוקלי של ריקמת עלה מוזרק מצמח *N. benthamiana*, 7 ימים לאחר ההדבקה. 1: 269 + HC-Pro; 2: 269 + p19; 3: 269 + p25; 4: 269 + V2; 5: 269 + V2.

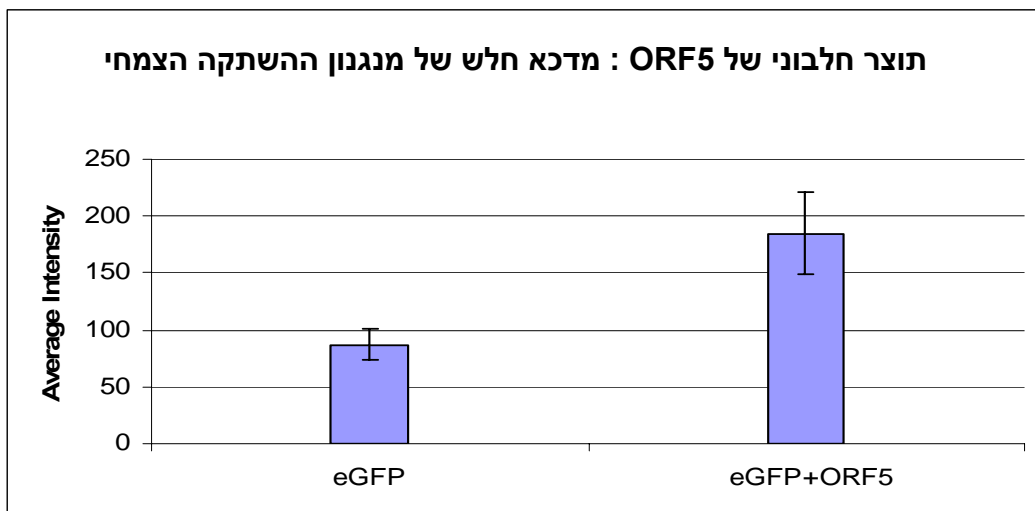
3.6 בחינת דיכוי מנגנון ההשתקה הצמחי ע"י תוצר ORF5

במשך תקופת העבודה שלי, פורסמו שני מחקרים המראים כי ORF5 של GVA מקודד לחלבון הפועל כמדכא למנגנון ההשתקה הצמחי, אם כי הפעילות הזאת היתה חלשה בהשוואה למדכאים של וירוסים אחרים (Zhou et al., 2006; Chiba et al., 2006). הבדיקה במחקרים הנ"ל בוצעה

ע"י השימוש במערכת קונבנציונלית המבוססת על שימוש בשתי תרביות של חיידקי אגרובקטריום, כאשר האחת מבטאת גן מדווח eGFP והשנייה מבטאת את ORF5 של GVA. בעבודה שלנו, רצינו לבצע בדיקה דומה תוך כדי השימוש בתערובת של תרבית חיידק אגרובקטריום הנושא את הגן ל-eGFP בתוך פלסמיד בינארי pCAMBIA תחת בקרת 35S promoter עם תרבית חיידק אגרובקטריום אחר המבטא את הגן ל-ORF5 (שבט pGVA-158 שיפורט בהמשך) של GVA, גם הוא בתוך פלסמיד בינארי pCAMBIA תחת בקרת 35S promoter. החיידקים משתי התרביות הוזרקו לתוך צמחי בנטמינה מטיפוס הבר (לפי סעיף 2.14). לאחר 4 ימים ניצפתה פלורסנציה חזקה הן בצמחים שהוזרקו רק עם תרבית חיידקים המבטאת eGFP והן בתערובת התרביות המבטאת את שני הגנים eGFP ו-ORF5. מאידך כאשר בדיקת התוצאות נעשתה 11 ימים לאחר ההזרקה, נמצאה עליה ברמת הפלורסנציה פי 2 בלבד בהזרקה משולבת של eGFP עם ORF5 יחסית להזרקה עם eGFP כביקורת (עוצמת פלורסנציה של 185 לעומת 87 המוצגת בגרף 1 ותמונה 7). מכאן ניתן להסיק כי: תוצר ORF5 של וירוס ה-GVA הינו מדכא חלש של מנגנון ההשתקה הצמחי.



תמונה 7: תמונה של מיקרוסקופ קונפוקלי של ריקמה מודבקת מצמח *N. benthamiana*, 11 ימים לאחר ההדבקה. **ימני:** תערובת של ORF5 + eGFP, **שמאלי:** ביקורת של eGFP.



גרף 1: אנליזת MICA של יכולת דיכוי ההשתקה המיוחסת לתוצר ORF5, 11 ימים לאחר ההדבקה.

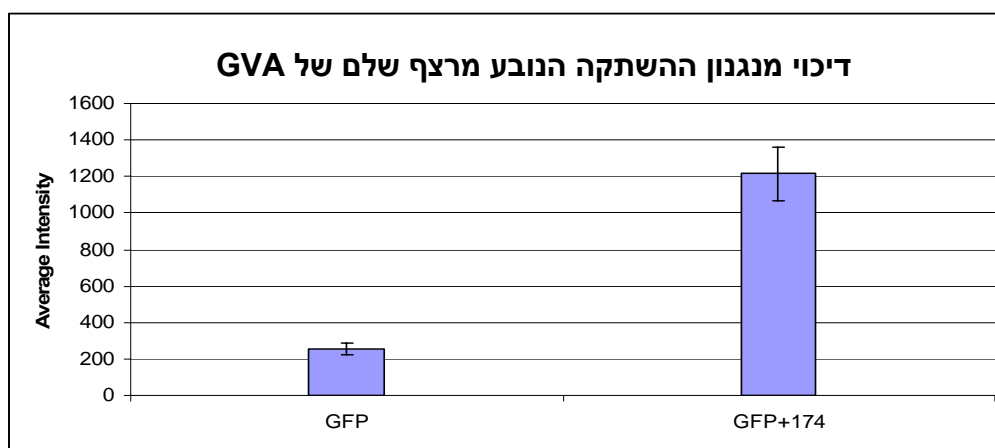
3.7 בחינת דיכוי מנגנון ההשתקה הצמחי ע"י הוירוס השלם של GVA (שבט)

(pGVA-174)

עקב הפעילות החלשה של תוצר ORF5 בתור מדכא של מנגנון ההשתקה, החלטנו לבדוק האם הדבקה של צמחי בנטמינה עם וירוס ה-GVA גורמת לדיכוי חלש של ההשתקה בדומה לזו שניצפתה ע"י תוצר ה-ORF5. ה-cDNA השלם של GVA הוחדר לתוך וקטור בינארי pCAMBIA תחת בקרת פרומוטור 35S והפלטמיד שנבנה (pGVA-174) עבר אלקטרופורציה לתוך חיידק האגרובקטריום (לפי סעיף 2.2.2).

לפני בדיקת דיכוי ההשתקה, השבט נבדק לגבי היכולת האינפקטיבית שלו, ע"י הזרקתו לתוך צמחי בנטמינה בשיטת אגרו-אינפילטרציה. אחרי 10-14 ימים, ההדבקה אושרה ע"י הופעת סימפטומים אופייניים להדבקה ב-GVA, וכמו כן, ע"י הצטברות ה-RNA ויראלי בעלים חדשים שלא הוזרקו. לאחר מכן, נבדקה יכולת של השבט pGVA-174 לדכא את השתקת ה-RNA ע"י אגרו-אינפילטרציה משולבת עם eGFP. בבחינת עלים מוזרקים 11 ימים לאחר ההדבקה ניתן היה לראות פלורסנציה חזקה לפחות פי 5 בעלים בהם בוצעה ההזרקה המשולבת של pGVA-174 עם eGFP, לעומת צמחי ביקורת שהוזרקו עם eGFP בלבד (עוצמת פלורסנציה של 1215 לעומת 254 המוצגת בגרף 2).

מכאן ניתן להסיק כי: ה-RNA הגנומי של וירוס ה-GVA גורם לדיכוי של ההשתקה ביעילות גבוהה יותר מאשר תוצר ORF5 לבדו ולכן ניתן להסיק כי כנראה שישנם מרכיבים נוספים המעורבים בדיכוי ההשתקה.



גרף 2: אנליזת MICA של יכולת דיכוי ההשתקה של eGFP ע"י שבט pGVA-174, 11 ימים לאחר ההדבקה.

3.8 בחינת הפעילות המדכאת ע"י תוצר ORF5 במערכת של מינירפליקון

עקב היותה של מערכת המינירפליקון של ה-GVA יעילה לזיהוי מדכאים שונים, החלטנו להשתמש בה על מנת לבחון את מידת הפעילות של p10 של GVA כמדכא למערכת השתקת הגנים. בוצעה הדבקה משולבת של שתי תרביות חיידקי אגרובקטריום, האחת שמבטאת את תוצר הגן ORF5 (גן שבוודד מ-cDNA של גזע GVA אלים, p-GR5 המשרה סימפטומים חזקים בצמח, וניתן

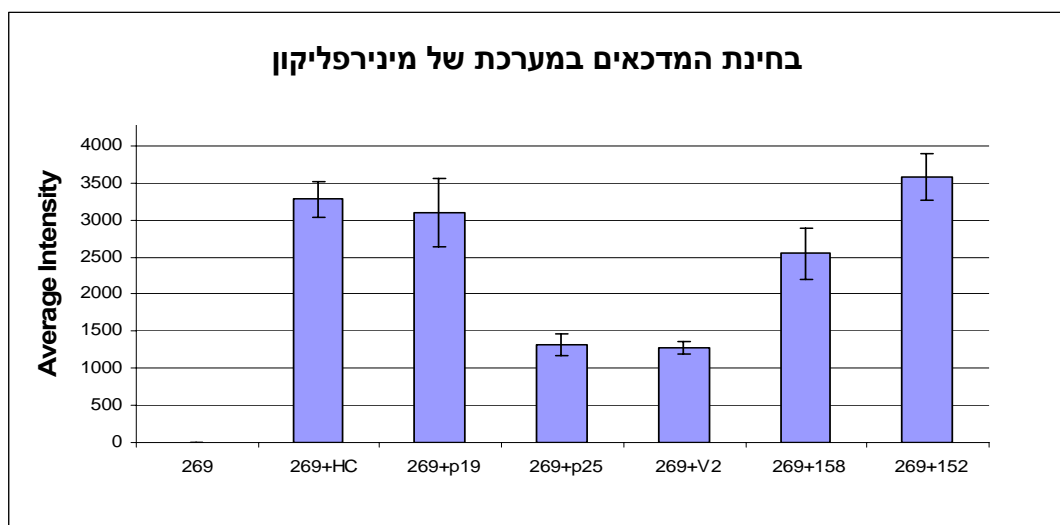
לו השם pGVA-158) והשניה שמבטאת את המינירפליקון pGVA-GFP-269. תוצאות מידת הפלורסנציה והדיכוי המתקבלות 7 ימים לאחר ההדבקה, מוצגות בגרף 3. לפי התוצאות ניתן לראות כי ORF5 (שבט pGVA-158) בתוספת של pGVA-GFP-269 בצמחי הבר מראה פלורסנציה חזקה פי 1,500 מזו של המינירפליקון pGVA-GFP-269 המשמש כביקורת שלילית. מכאן הסקנו כי: התוצר של ORF5 מתפקד כמדכא של מנגנון ההשתקה, אך הפעילות שלו מוגברת ע"י פקטור/ים הנוכח/ים במינירפליקון של ה-GVA.

בהמשך רצינו לבדוק אם ORF5 שבודד מ-cDNA של גזע GVA מוחלש, p-GTR1-1 המשרה סימפטומים חלשים יותר בצמח (שבט pGVA-152), גם הוא מתפקד כמדכא של מנגנון ההשתקה ופעילותו מוגברת ע"י פקטור/ים הנוכח/ים במינירפליקון של ה-GVA. תוצאות מידת הפלורסנציה והדיכוי המתקבלות 7 ימים לאחר ההדבקה, מוצגות בגרף 3. לפי התוצאות ניתן לראות כי ORF5 (שבט pGVA-152) בתוספת של pGVA-GFP-269 בצמחי הבר מראה פלורסנציה חזקה פי 2,300 מזו של המינירפליקון pGVA-GFP-269. ההבדלים במידת ההגברה של שני גזעי ORF5 (1,500 לעומת 2,300) נובעים כנראה מריכוז הפלסמיד ומרמת הביטוי באגרו-אינפילטרציה.

מתוצאות אלה ניתן להסיק כי: התוצר של ORF5, הן מהגזע האלים והן מהגזע המוחלש, מתפקד כמדכא של מנגנון ההשתקה והפעילות שלו מוגברת ע"י פקטור/ים הנוכח/ים במינירפליקון של ה-GVA. יתר על כן, יכולתו של p10 להשפיע על מידת הפתוגניות ולהשפיע על דיכוי מנגנון ההשתקה, הן כנראה שתי פעולות שאינן קשורות אחת בשניה. הערה: בניסויי המשך נעבוד עם ORF5 תוצר הגזע האלים (שבט pGVA-158).

אנליזה של תוצאות דיכוי ההשתקה שהתקבלו עם המדכאים השונים בהזרקה לתוך צמחי

N. benthamiana מטיפוס הבר

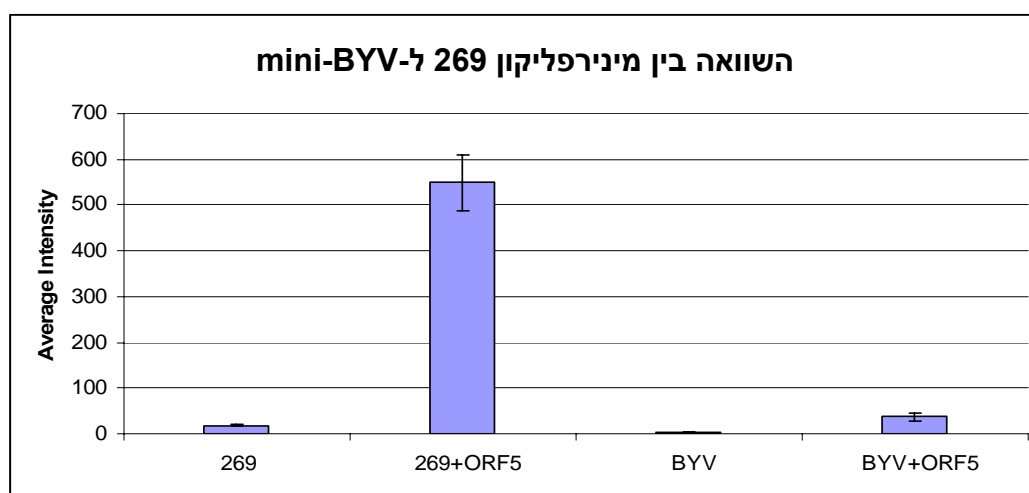


גרף 3: אנליזת MICA של המדכאים השונים שנבדקו במערכת של מינירפליקון, 7 ימים לאחר ההדבקה.

3.9 בדיקת ספציפיות רצף ה- enhancer לוירוס ה-GVA

על מנת להוכיח כי הגברת הפעילות של תוצר ORF5 כמדכא למערכת השתקת הגנים היא תוצאה של ביטוי גורם ספציפי ממערכת המינירפליקון של ה-GVA ולא בשל הדבקה לא ספציפית של התא ב-RNA ויראלי, ביצענו הזרקה משולבת של ORF5 ומינירפליקון על בסיס וירוס אחר, BYV (*Beet yellow virus*) אותו קיבלנו ממעבדה של Valerian Dolja מאוניברסיטת Oregon, USA והישונו את תוצאות הדיכוי שהתקבלו 4 ימים לאחר ההדבקה לאלו שהתקבלו עם מינירפליקון על בסיס וירוס ה-GVA. לפי התוצאות בגרף 4 ניתן לראות כי העליה בעוצמת הפלורסנציה בשילוב של mini-BYV+ORF5 לעומת הביקורת של mini-BYV אינה משמעותית, בהשוואה לעליה של פי 30 בשילוב של 269+ORF5 לעומת הביקורת של 269 (עוצמה של 550 מול 18 בהתאמה).

מכאן הסקנו כי: הגברת הפעילות של תוצר ORF5 כמדכא למערכת השתקת הגנים היא תוצאה של ביטוי גורם ספציפי ממערכת המינירפליקון של ה-GVA.



גרף 4: אנליזת MICA של שני המינירפליקונים בתוספת של ORF5, 4 ימים לאחר ההדבקה.

3.10 נסיונות לאפיון המרכיבים במינירפליקון האחראיים להגברת הפעילות

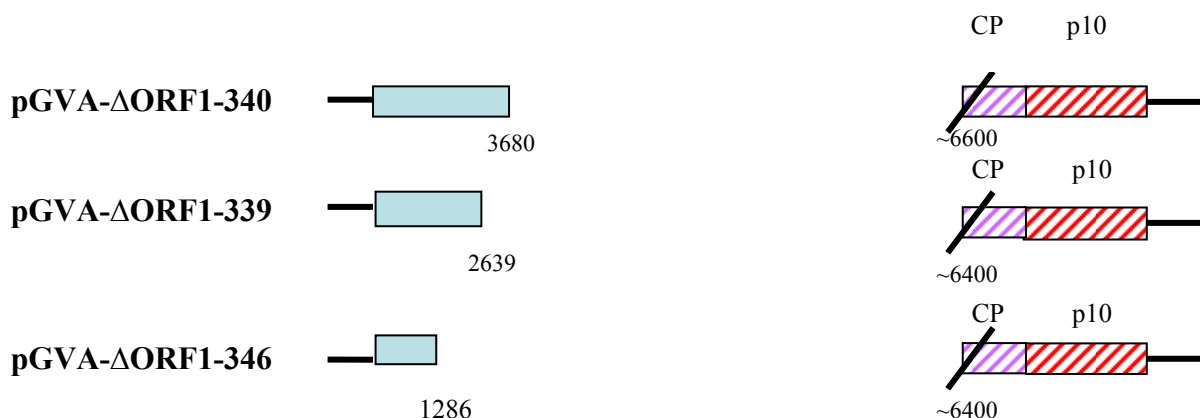
המדכאת של ORF5

התוצאות שתוארו מצביעות על כך שהפעילות המדכאת של ORF5 מוגברת בזכות מרכיב אחד או בזכות שילוב של מספר מרכיבים המצויים ברצף המינירפליקון, כגון: ORF1, ORF2, ORF1 + ORF2, או השיכפול של גנום הוירוס. על מנת לבחון אפשרויות אלה בוצעו הניסויים שיתוארו בהמשך.

3.10.1 בדיקת חשיבות ORF1 להגברת הדיכוי

בתחילה התמקדנו ב-ORF1 כמרכיב פוטנציאלי להגברת הדיכוי. לצורך כך בנינו שבטים עם חסרים באורכים שונים ברצף ORF1. השבטים ששימשו אותנו למטרה זו הם: pGVA-ΔORF1-340, pGVA-ΔORF1-339, pGVA-ΔORF1-346 (מוצגים בתרשים 3), בנויים על בסיס הפלסמיד

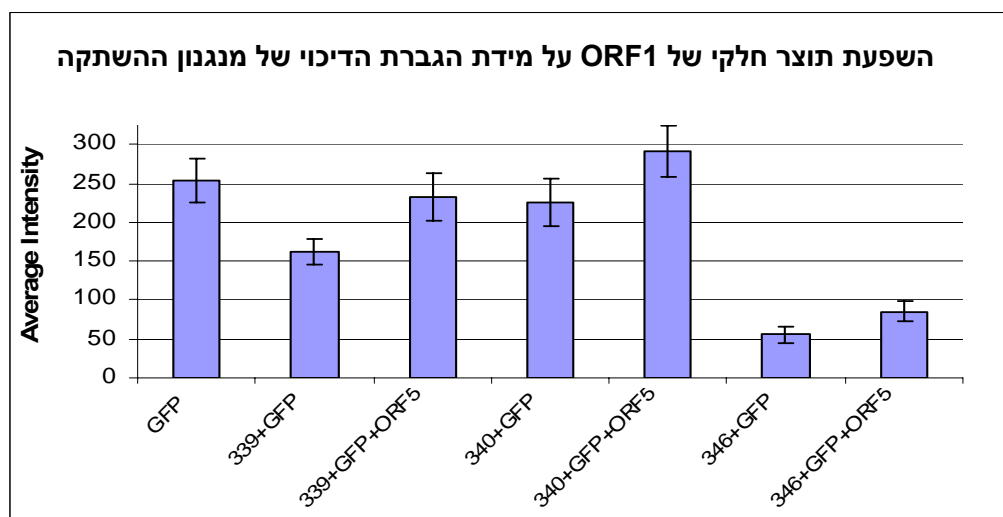
הבינארי pCAMBIA תחת בקרת 35S promoter. השבטים עברו אלקטרופורציה לתוך חיידקי אגרובקטריום (לפי סעיף 2.2.2).



תרשים 3: תרשים סכמטי של שלושת השבטים המכילים חסרים ברצף ORF1 בתוך pCAMBIA.

החיידקים המכילים כל אחד מהשבטים הוזרקו לצמחי בנטמינה ביחד עם חיידקים המבטאים eGFP וחיידקים המבטאים p10 של GVA. העלים המוזרקים נבדקו לגבי רמת ביטוי ה-eGFP 10 ימים לאחר ההדבקה. התוצאות המוצגות בגרף 5 מראות כי אף אחד מהשבטים הנ"ל לא נתן עליה בפלורסנציה בהדבקה משולבת עם eGFP ו-ORF5. תוצאות דומות ניצפו בהזרקה לתוך צמחי בנטמינה טרנסגניים מטיפוס eGFP-16c.

מכאן הסקנו כי: ביטוי של תוצר חלקי של ORF1 אינו גורם להגברת הפעילות של p10 כמדכא למערכת ההשתקה הצמחית.



גרף 5: אנליזת MICA של תוצאות פלורסנציה שהתקבלו במיקרוסקופ קונפוקלי בצמחי *N. benthamiana* 10 ימים לאחר שהודבקו עם שבטים המכילים חסרים ב-ORF1 בתוספת של ORF5 ו-eGFP.

אחרי שראינו כי ביטוי של תוצר חלקי של ORF1 אינו גורם להגברת הפעילות של p10 כמדכא למערכת ההשתקה הצמחית, החלטנו לבדוק באם ביטוי ORF1 בשלמותו יכול לייעל את פעילות p10 ולהגביר את ביטוי ה-eGFP. לצורך כך בנינו שבט pGVA-ORF1-354 (תרשים 4) המכיל

ORF1 וקצה ה-3' UTR (החשוב לתהליך השיכפול) בתוך pCAMBIA תחת בקרת 35S promoter. את השבט בנינו ע"י כך שחתכנו את השבט pGVA-GFP-269 עם אנזים ההגבלה *AvrII* וביצענו ליגציה של הפלסמיד על עצמו (רצף ה-DNA של השבט pGVA-GFP-269 מכיל שני אתרים של *AvrII*).

מכיוון ש-GVA-ORF1-354 מכיל את האלמנטים המינימליים החיוניים לשיכפול אנו מצפים שהגנום שלו יעבור שיכפול במערכת של פרוטופלסטים. על מנת לוודא זאת שובט ה-cDNA של GVA-ORF1-354 לתוך הווקטור PUC57 תחת הפרומוטור של T7. השבט שהתקבל, והנקרא pGVA-ORF1-363, שימש לצורך ריאקציית שיעתוק. שלושה ימים לאחר הדבקת הפרוטופלסטים עם התעתיק (לפי סעיפים 2.10, 2.13) של שבט pGVA-ORF1-363, הופק מהם RNA (לפי סעיף 2.15) ובוצעה אנליזת Northern blot (לפי סעיף 2.17). לפי התוצאות שהתקבלו (תוצאות לא מוצגות) בהגבה עם גלאי קצה 5' של GVA ניצפה שיכפול חזק של השבט בדומה לשבט ביקורת של pGVA-GFP-260. תוצאה זו מעידה על ביטוי ORF1 לתוצר פעיל.

בשלב הבא בוצעו נסיונות של הזרקת ORF5+pGVA-ORF1-354 לתוך צמחי בנטמינה מטיפוס הבר (בתוספת של eGFP) ומטיפוס 16c-eGFP. התוצאות שהתקבלו הראו כי באף מקרה לא ניצפתה הגברה משמעותית ברמת ביטוי ה-eGFP. מזה ניתן להסיק כי ביטוי תוצר ORF1 בשלמותו לא תרם לפעילות p10.



תרשים 4: תרשים סכמטי של שבט pGVA-ORF1-354 בתוך pCAMBIA.

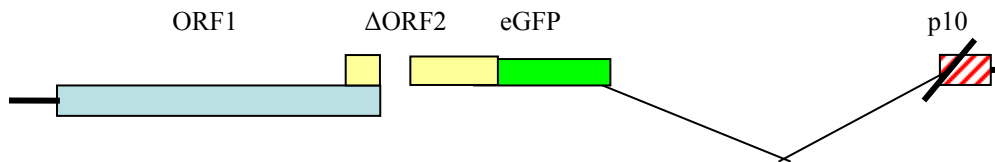
3.10.2 בדיקת חשיבות ORF2 להגברת הדיכוי

3.10.2.1 על מנת לבדוק את האפשרות ש-ORF2 מעורב בהגברת הדיכוי של מנגנון ההשתקה, יצרנו מוטציה חסר ב-ORF2 (Δ ORF2) בין ח"א 1736-1797, תוך כדי שמירת המשכיות מסגרת הקריאה. תוצר PCR על שבט pGVA-GFP-260 עם תחלים GVA177 ו-GVA35, בודד ונחתך ע"י אנזימי הגבלה: *NcoI* (המצוי באתר 3628bp ו-*Kpn2I* (המצוי בסוף רצף התחל GVA177 וברצף הוירוס באתר 5387bp) ועבר ליגציה לתוך שבט pGVA-GFP-260 תוך באותם האנזימים. כך נוצר השבט pGVA-GFP- Δ ORF2-338 המכיל את החסר ב-ORF2 בתוך פלסמיד PUC57 תחת בקרת RNA T7 promoter.

בכדי לוודא שאכן לא פגענו בהמשכיות מסגרת הקריאה של ORF2 ו-eGFP, בדקנו את השבט הנוצר pGVA-GFP- Δ ORF2-338 בפרוטופלסטים וניתן היה להבחין בפלורסנציה חלשה של תאים בודדים (תוצאות לא מוצגות). ז"א שהגן המדווח eGFP מתבטא ואין פגיעה במסגרת הקריאה. במטרה לבטא את השבט pGVA-GFP- Δ ORF2-338 בצמח ע"י מערכת של אגרובקטריום, שבט זה עבר חיתוך עם אנזימי הגבלה: *Eco47III* (באתר של 1168bp) ו-*SalI* ועבר ליגציה לתוך שבט

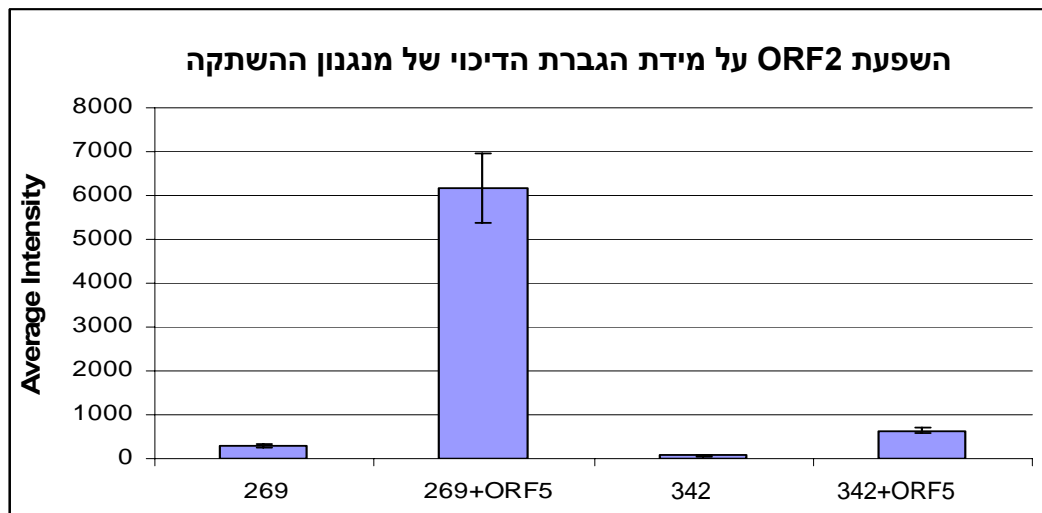
pGVA-GFP-2 חתוך באותם האנזימים. השבט בתוך הפלסמיד הבינארי נקרא: pGVA-GFP- Δ ORF2-342 (מוצג בתרשים 5) הוחדר ע"י אלקטרופורציה לתוך חיידק אגרובקטריום (לפי סעיף 2.2.2).

pGVA-GFP- Δ ORF2-342



תרשים 5: תרשים סכמטי של שבט pGVA-GFP- Δ ORF2-342 בתוך pCAMBIA.

על מנת לבחון את השפעת החסר הנוצר ב-ORF2 על מידת הפגיעה בהגברת דיכוי ההשתקה, הזרקנו תערובת חיידקי אגרובקטריום המכילה תרבית של השבט pGVA-GFP- Δ ORF2-342 ותרבית המבטאת ORF5. התוצאות הושוו לביקורת שלילית בה השתמשנו בתרבית של pGVA-GFP- Δ ORF2-342 ולביקורת חיובית של תערובת חיידקי אגרובקטריום המכילה תרבית של השבט pGVA-GFP-269 ותרבית המבטאת ORF5. תוצאות מידת הפלורסנציה והדיכוי שהתקבלו 5 ימים לאחר ההדבקה מוצגות בגרף 6. לפי התוצאות, עוצמת הפלורסנציה של 342+ORF5 לעומת 342 הייתה חזקה פי 9 (עוצמה של 644 לעומת 72, בהתאמה). לעומת זאת, עוצמת פלורסנציה זו הייתה חלשה פי 10 מזו של 269+ORF5 (עוצמה של 6174 לעומת 644, בהתאמה). התוצאות מצביעות כי: ORF2 עם המוטציה תורם במעט להגברה של פעילות תוצר ה-ORF5 ולכן ניתן להסיק כי ORF2 (התוצר המקודד או רצף הגן עצמו) משפיע על פעילות p10 בדיכוי מנגנון ההשתקה הצמחי.



גרף 6: אנליזת MICA של תוצאות פלורסנציה שהתקבלו במיקרוסקופ קונפוקלי בצמחי *N. benthamiana*, 5 ימים לאחר שהודבקו ע"י 269+ORF5, 342+ORF5, 342, 269.

3.10.2.2 ניסוי השלמה (קומפלימנטציה)

בהמשך החלטנו לבדוק בניסוי קומפלימנטציה אם נקבל ביטוי חזק יותר של eGFP כאשר נספק למערכת המבטאת 342+ORF5 שבט נוסף המבטא ORF2. לצורך כך בנינו שבט חדש הנקרא pGVA-ORF2-352 המכיל את רצף ORF2 בפלסמיד בינארי pCAMBIA תחת בקרת promoter 35S. שבט pGVA-ORF2-352 נבנה ע"י כך שבצענו PCR עם תחלים GVA181 ו-GVA182 על תבנית של pGVA-GFP-269. תחל GVA181 מכיל אתר הגבלה *SmaI* ואילו תחל GVA182 מכיל אתר הגבלה *Sall*. החדרנו תוצר PCR חתוך ע"י אנזימים אלו ל-pCAMBIA (אשר בנינו והמכיל פרומוטור 35S) חתוך באותם האנזימים.

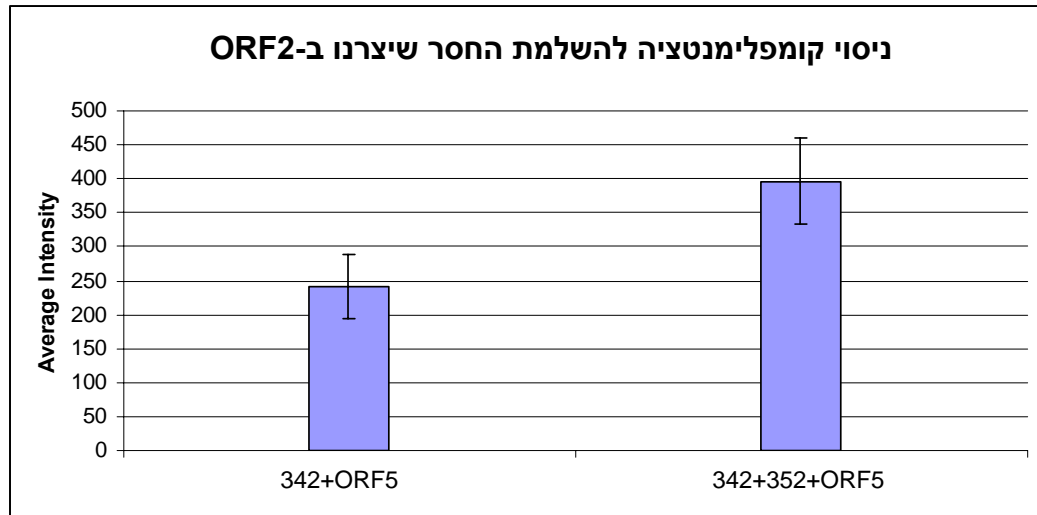
על מנת לבדוק אם ORF2 בשבט pGVA-ORF2-352 עובר ביטוי בצמח, בנינו שבט המכיל את ORF2 בתוך pCAMBIA כשהוא מאוחה לגן מדווח eGFP וכך קיבלנו שבט pGVA-GFP-ORF2-369. בשבט זה אנו יכולים לבדוק ביטוי חלבון עפ"י ביטוי הגן המדווח. שבט pGVA-GFP-ORF2-369 נבנה ע"י כך שבוצע PCR על תבנית של שבט pGVA-GFP-269 עם תחלים GVA181 ו-GFP197. תוצר ה-PCR כולל ORF2 מאוחה ל-eGFP. תוצר ה-PCR נחתך ע"י אנזימי הגבלה: *AvrII* ו-*Sall*. כמו כן, השבט pGVA-ORF2-352 נחתך גם הוא עם אותם האנזימים ובוצעה ליגציה בין המקטעים המתאימים כך שקיבלנו את השבט הסופי: pGVA-GFP-ORF2-369. ע"י מעקב במיקרוסקופ קונפוקלי בהזרקת השבט ניתן לבדוק אם יש ביטוי של ORF2. 4 ימים לאחר ההדבקה ראינו כי יש ביטוי טוב של הגן המדווח ומכאן ניתן להסיק כי תוצר הגן ORF2 מתבטא בצמח (תוצאות לא מוצגות).

בניסוי קומפלימנטציה ביצענו הזרקה של תערובת של שלוש תרביות חיידקי אגרובקטריה כאשר כל אחת מכילה שבט אחר: pGVA-ORF2-352, pGVA-GFP-ΔORF2-342, ORF5 והישונו את התוצאות למערכת מקבילה של pGVA-GFP-ΔORF2-342+ORF5. לפי התוצאות שקיבלנו 5 ימים לאחר ההדבקה (גרף 7) ראינו כי ישנה עליה מזערית בפלורסנציה אשר נאמדה בכמעט פי 2 כאשר מבטאים במערכת את השבט pGVA-ORF2-352 לעומת הפלורסנציה של pGVA-GFP-ΔORF2-342+ORF5 (עוצמה של 396 מול 240).

בהמשך בוצעו נסיונות של הזרקת ORF5+pGVA-ORF2-352 עםובלי eGFP לתוך צמחי בנטמינה מטיפוס הבר וואו מטיפוס 16c-eGFP ולא ניצפתה הגברה יחסית לביקורת של eGFP בצמחי בר וצמחי 16c-eGFP לא מודבקים, בהתאמה.

כמו כן, נבדקה האפשרות כי שילוב in trans 352+354+ORF5 יגרום להגברה חזקה. גם כאן לא ניתן היה להבחין כלל בהגברה כמו זו שניצפתה במערכת המקורית של 269+ORF5 בה ORF1 ו-ORF2 מצויים in cis למערכת המינירפליקון.

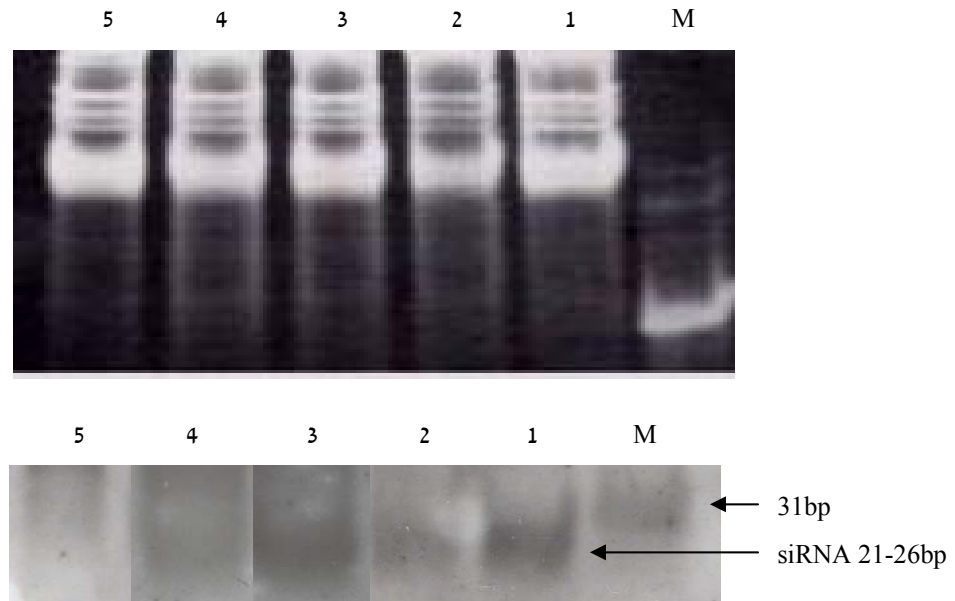
מכאן הסקנו כי: ביטוי ORF2 במערכת in trans לא השפיע משמעותית על ביטוי ה-eGFP ולכן, יתכן כי יש חשיבות לכך ש-ORF2 יבוטא במערכת in cis.



גרף 7: אנליזת MICA של תוצאות פלורסנציה שהתקבלו במיקרוסקופ קונפוקלי בצמחי *N. benthamiana*, 5 ימים לאחר שהודבקו ע"י 342+ORF5, 342+352+ORF5.

siRNA 3.11

ידוע שהשתקת גנים לאחר שיעתוק נובעת מעיכול של ה-RNA המשועתק. תוצרי העיכול הם מקטעי RNA קטנים בגודל של 21-26bp הנקראים small interfering RNA או siRNA. במטרה לבדוק באם בהדבקת צמחים במינירפליקון של ה-GVA נוצרים מקטעי siRNA, הופק RNA מהעלים המוזרקים בעזרת Tri- reagent (לפי סעיף 2.16). ריכוז גבוה של ה-RNA המופק הופרד בגיל אקריל אמיד, הועבר לממברנה והוגב עם גלאי ספציפי ל-GVA (קצה 5' של הגנום) לפי סעיף 2.18. לפי התוצאות המוצגות בתמונה 8 ניתן לראות כי בעלים המוזרקים במינירפליקון של ה-GVA (pGVA-GFP-269) ניתן לזהות siRNAs. ביטוי של ORF5 ביחד עם המינירפליקון הן בצמחי בנטמיינה מטיפוס 16c-eGFP והן בצמחי הבר הביא להפחתה בריכוז מקטעי ה-siRNA. כמו כן נמצא כי בצמחים המודבקים בוירוס השלם (שבט pGVA-174) לא מזהים מקטעי siRNA.



תמונה 8: אנליזה של מקטעי siRNA בגיל דנטורטיבי. כגלאי RNA, שימש קצה 5' GVA שבור וספציפי לגדיל החיובי. **חלק עליון:** צביעת EtBr של הגיל. **חלק תחתון:** פילם לאחר היברידיזציה.

M- תחל בגודל 31bp: שימש בתור מרקר גודל

1- בנטמינה מטיפוס הבר מודבקת בשבט pGVA-GFP-269

2- בנטמינה מטיפוס הבר מודבקת בתערובת של 269+ORF5

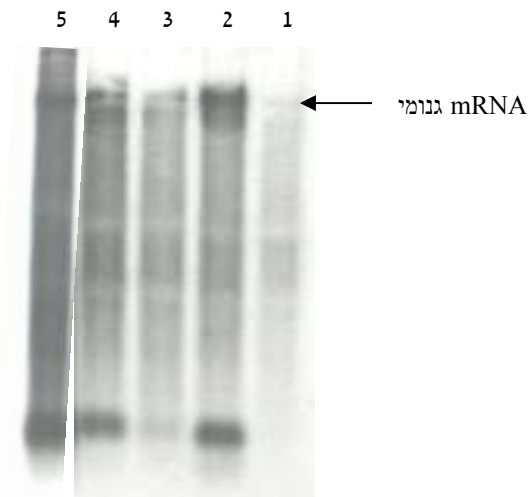
3- בנטמינה טרנסגנית מטיפוס 16c-eGFP מודבקת בשבט pGVA-GFP-269

4- בנטמינה טרנסגנית מטיפוס 16c-eGFP מודבקת בתערובת של 269+ORF5

5- בנטמינה מטיפוס הבר מודבקת בתערובת של 174+eGFP

הערה: ערוצים 1-4 מכילים דוגמאות RNA שהופקו 7 ימים לאחר ההדבקה ואילו ערוץ 5 מכיל דוגמת RNA שהופקה 11 ימים לאחר ההדבקה עם הוירוס.

במקביל לבדיקת ה-siRNA תוצר הפירוק של ה-RNA הויראלי בעלים המוזרקים, רצינו לבדוק את ה-RNA הגנומי של הוירוס. בבדיקות אלו אנו מצפים שכאשר ניצפות רמות גבוהות של siRNA יהיו רמות נמוכות של אותו ה-RNA הגנומי. לפי התוצאות המוצגות בתמונה 9 ניתן לראות כי רמות mRNA אכן נמוכות כאשר רמות siRNA גבוהות ולהיפך. ניתן לראות בבירור כי כאשר יש דיכוי חזק של השתקה במערכת של 269+ORF5 בצמחי הבר וצמחי 16c-eGFP ובהדבקה עם 174+eGFP יש רמה גבוהה של RNA גנומי, ואילו כאשר יש השתקה חזקה במערכת המינירפליקון בלבד בשני טיפוסים הצמחים, יש רמה גבוהה של siRNAs ורמה נמוכה של ה-RNA הגנומי.



תמונה 9: פילם Northern blot בהגבה עם גלאי קצה 5' GVA לא שבור וספציפי לגדיל החיובי.

1- בנטמינה מטיפוס הבר מודבקת בשבט pGVA-GFP-269

2- בנטמינה מטיפוס הבר מודבקת בתערובת של 269+ORF5

3- בנטמינה טרנסגנית מטיפוס 16c-eGFP מודבקת בשבט pGVA-GFP-269

4- בנטמינה טרנסגנית מטיפוס 16c-eGFP מודבקת בתערובת של 269+ORF5

5- בנטמינה מטיפוס הבר מודבקת בתערובת של 174+eGFP

הערה: ערוצים 1-4 מכילים דוגמאות RNA שהופקו 7 ימים לאחר ההדבקה ואילו ערוץ 5 מכיל דוגמת RNA שהופקה 11 ימים לאחר ההדבקה עם הוירוס.

3.12 בחינת מעורבותו של הומולוג ויראלי של חלבון ה-AlkB בפתוגנזה

תיקון DNA פגום זהו אחד התהליכים החיוניים לשימור הפעילות התקינה של האורגניזם. תאים מצויידים במגוון נרחב של חלבונים שפותחו במהלך האבולוציה על מנת לפתור בעיה זו ולתקן מודיפיקציות כימיות של DNA. אחד החלבונים האלו הינו AlkB. תפקידו של חלבון זה הוא תיקון DNA דרך דה-מתילציה. גנום וירוס ה-GVA, וגם של וירוסים אחרים הנמנים לאותה משפחה *Flexiviridae*, מכיל רצפים דמויי AlkB. תפקידו של האתר AlkB של וירוסים אלה טרם נקבע אך סביר להניח כי כנראה והוא מעורב בתיקון מוטציות של מתילציה ב-RNA של הוירוס בצמח. במידה והנחה זו נכונה, פגיעה באתר של AlkB בגנום הוירוס עלולה להביא לפגיעה ב-RNA של הוירוס היכולה להתבטא בירידה בהכפלת RNA ויראלי, פגיעה בתנועת הוירוס בצמח, ירידה ברמת האינפקטיביות של הוירוס או שילוב של כמה מהאפשרויות האלה.

בעבודה שלנו בדקנו את מעורבות אתר AlkB בהתרבות הוירוס ובפתוגנזה. לצורך זה, בנינו תשעה מוטנטים של GVA כאשר בכל אחד הכנסנו מוטציה באיזור המקודד של AlkB בשיטת Overlapped PCR תוך שימוש בתחלים המכילים את המוטציה הנקודתית. בכל אחד מהמוטנטים שנבנו החלפנו חומצה אמינית אחת בחומצת אמינו אלנין (שהינה נייטרלית מבחינת מטען והינה קטנה יחסית, במטרה למזער עד כמה שניתן את השינויים המרחביים בתוך האתר). שלוש מוטציות כווננו כלפי חומצות אמינו שמורות בהומולוגים של חלבון ה-AlkB כולל הומולוגים ויראליים (מסומנות בכחול: **H₁**, **H₂**, **D**), שלוש מוטציות נוספות כווננו כלפי חומצות אמינו שמורות בהומולוגים ויראליים בלבד של AlkB (מסומנות באדום: **Q**, **R₁**, **R₂**), ושלוש מוטציות כווננו כלפי

חומצות אמינו לא שמורות בהומולוגים של AlkB של הממשות לנו בתור ביקורת (מסומנות בשחור בולט : E, K, R₃).

להלן רצף חומצות אמינו שמורות באתר AlkB של וירוס ה-GVA:

GVA QRYTAGGSIGF **HAD** DEPCYLPGGSVVTVNLHG **E**ATFEVKENQSGKi ----- 697

GVA -EKKE**LK**DGDVYVMGPGM **Q**QTHK **H**RVTSHTD**GRC**sIT**LR**NKTVDYEA **R**KGDED Seyeedk 756

רשימת חומצות אמינו שהוחלפו באתר ה-AlkB כולל מיקומן ותחלים (המכילים את המוטציות הנקודתיות) אשר שימשו לצורך החלפה זו, מתוארים בטבלת תחלים בנספח 3. בכל מוטנט ביצענו שינוי של חומצת אמינו אחת הקיימת ברצף המקורי לח"א אלנין GCT → XXX. בתור תבנית לריאקציית PCR1 ו-PCR2 שימש שבט p-GR5 (הרצף השלם של GVA בתוך פלסמיד PUC57 תחת בקרת T7 RNA Promoter).

3.12.1 שלבי שיבוט המוטנטים בתוך רצף השבט pGVA-GFP-252

במטרה לעקוב אחר השפעת כל מוטציה ומוטציה על הפעילות הביולוגית של הוירוס, יש צורך לשבט את המוטנטים לתוך השבט האינפקטיבי המבטא גן מדווח eGFP. באופן כזה ניתן לבחון את השפעת המוטציות גם במיקרוסקופ קונפוקלי. תחילה בוצעו ריאקציות PCR ו-Overlapped PCR, עפ"י הדוגמא של ח"א Q המתוארת בנספח 4. תוצרי ה-Overlapped PCR נוקו מהגיל (לפי סעיף 2.5), שובטו בפלסמיד pGEM T-easy (Promega) ויצירת המוטציות הנקודתיות אומתו ע"י ריצוף המחדר. לאחר מכן מקטע ה-AlkB הקיים בשבט pGVA-GFP-252 (המכיל גנום שלם של GVA בתוספת eGFP מאוחה ל-ORF2) הוחלף בזה של מקטע ה-AlkB עם המוטציה מתוך הווקטור pGEM T-easy. כך קיבלנו שבטים המכילים רצף cDNA שלם של GVA מאוחה לגן מדווח eGFP אך עם מוטציות במקטע ה-AlkB.

3.12.2 בחינת אינפקטיביות השבטים של GVA עם המוטציות באתר ה-AlkB

3.12.2.1 בחינת הסימפטומים המושרים בעלים סיסטמיים

צמחי בנטמינה הודבקו בתעתיק (לפי סעיף 2.11) של השבטים המכילים את המוטציות במקטע ה-AlkB. כביקורת שימש לנו תעתיק של השבט pGVA-GFP-252. על מנת לוודא כי המוטציות הנקודתיות אשר הוכנסו בגנום ה-GVA נשמרו בצמח לאחר ההדבקה ולא עברו "תיקון" חוזר לח"א המקוריות, הפקנו RNA מהצמחים המודבקים וביצענו ריאקציות cDNA (לפי סעיף 2.7) עם תחל GVA166 והגברת RT-PCR עם זוג התחלים: GVA166 ו-GVA165. תוצרי PCR שובטו בפלסמיד pGEM T-easy (Promega) והרצף שלהם נקבע. לפי התוצאות מסתבר כי כל המוטציות נשמרו בגנום הוירוס לאחר ההדבקה.

בצמחי הביקורת המודבקים ב- GVA-GFP-252 (ביקורת חיובית) הופיעו סימפטומים אופייניים להדבקה בוירוס ה-GVA כ-10 ימים לאחר ההדבקה (תמונה 10). בצמחים המודבקים במוטנטים נמצא כי המוטציה בח"א R_1 גרמה לדחיית מועד הופעת הסימפטומים. הסימפטומים הופיעו לאחר 3 שבועות מההדבקה אך אחר כך הסימפטומים התחזקו כמו בצמחי הביקורת. המוטציה בח"א R_2 הביאה להופעת סימפטומים מתונים 3 שבועות לאחר ההדבקה. הסימפטומים נשארו חלשים במשך הזמן. המוטציה בח"א R_3 הביאה לירידה ברמת הסימפטומים לרמה חלשה ביותר והסימפטומים הופיעו לאחר כ- 3 שבועות. מוטציה בח"א K השפיעה על הופעת הסימפטומים באופן משמעותי בכך שהורידה את רמתם בצורה משמעותית והם הופיעו לאחר כ-3 שבועות. מוטציה בח"א Q הורידה את רמת הסימפטומים לרמה חלשה; הסימפטומים הופיעו 2-3 שבועות לאחר ההדבקה ולא התחזקו עם הזמן. מוטציות בח"א D וח"א H_2 גרמו לדחייה של שבוע בהופעת הסימפטומים, אך הסימפטומים שהופיעו היו חזקים כמו בביקורת GVA-GFP-252. מוטציות בח"א H_1 וח"א E הביאו לאי הופעת סימפטומים במשך כל הזמן בו בחנו את הצמחים.

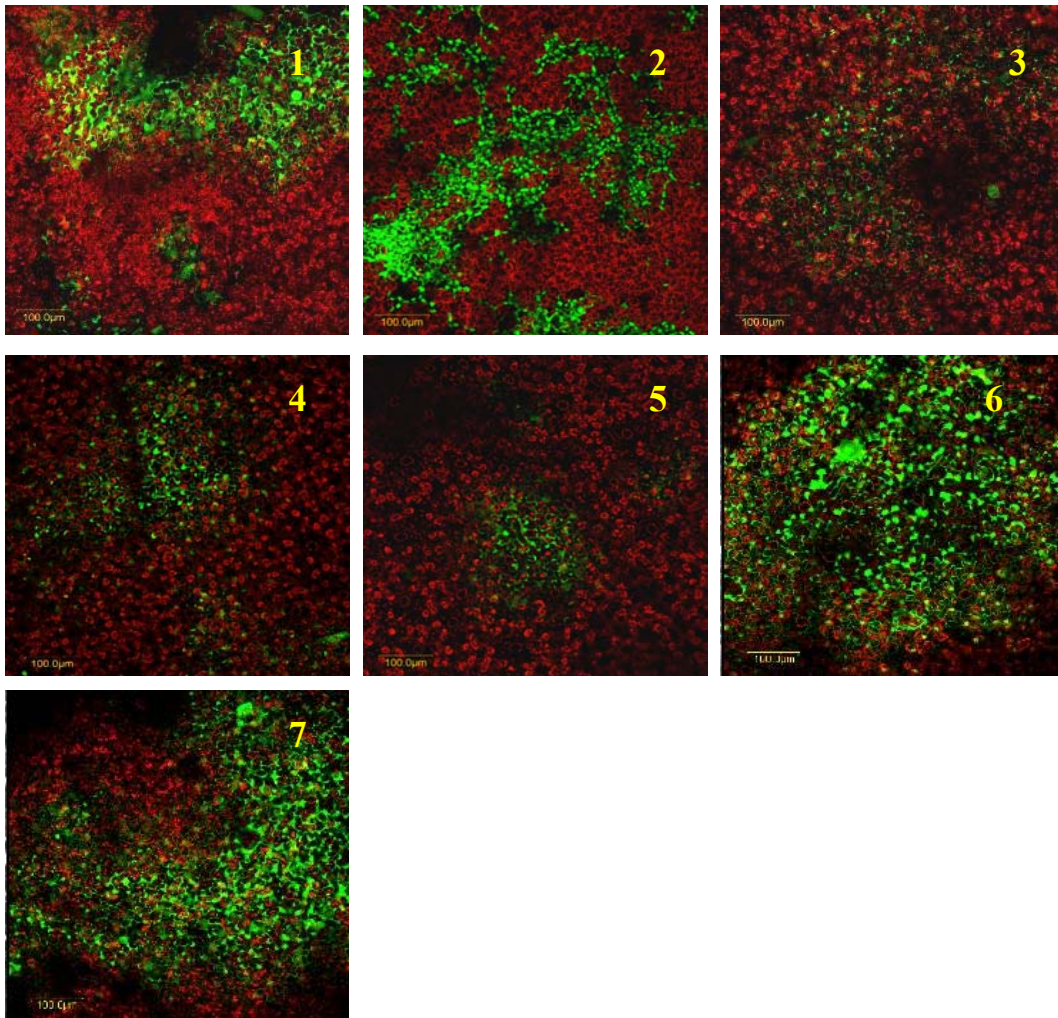
הערה: מוטנטים שלא השפיעו על התפתחות סימפטומים או לא ביטאו eGFP לא צולמו.



תמונה 10: סימפטומים המושרים בצמחי *N. benthamiana* לאחר הדבקה עם שבטים שונים המכילים מוטציות באתר ה-*AlkB* בתקופה של 2-4 שבועות לאחר ההדבקה. 1: *pGVA-GFP-252* (ביקורת חיובית), 2: ח"א R_1 , 3: ח"א R_2 , 4: ח"א R_3 , 5: ח"א K , 6: ח"א Q .

3.12.2.2 בחינת ביטוי הגן המדווח eGFP

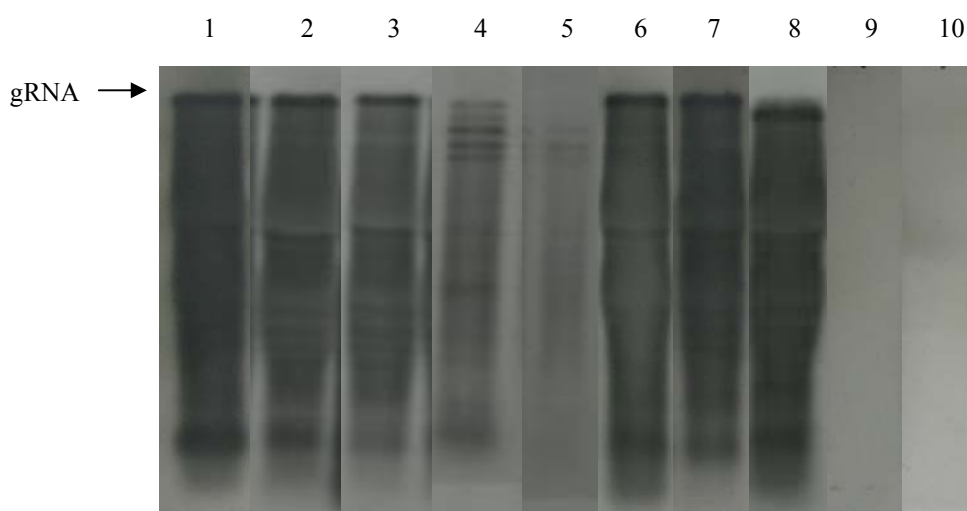
בצמחי הביקורת המודבקים ב- GVA-GFP-252 (ביקורת חיובית) הופיע ביטוי חזק של הגן המדווח כ-10 ימים לאחר ההדבקה (תמונה 11). במוטנט בח"א R₁ ניצפה ביטוי חזק של eGFP כשבועיים לאחר ההדבקה, הביטוי היה חזק בדומה לזה שניצפה בביקורת. במוטנט בח"א R₂ ניצפתה ירידה בביטוי של הגן המדווח יחסית לביקורת, כמו כן מוטנט זה גרם לדחיית מועד הופעת ביטוי הגן המדווח שניצפה כשבועיים לאחר ההדבקה. במוטנטים בח"א R₃ ו- K גם כן ניצפתה ירידה משמעותית בביטוי הגן המדווח יחסית לביקורת, ביטוי הגן המדווח נדחה וניצפה כשבועיים-שלושה לאחר ההדבקה. במוטנטים בח"א D ו- H₂ ניצפה ביטוי חזק של eGFP 10 ימים לאחר ההדבקה, בדומה לביקורת. במוטנטים של ח"א H₁, Q, ו- E : לא ניצפה ביטוי של eGFP במשך הזמן בו בחנו את הצמחים.



תמונה 11: תמונת מיקרוסקופ קונפוקלי של ריקמת עלה מוזרק מצמח *N. benthamiana* המדגימה ביטוי של eGFP בתקופה שבין 10 ימים ועד 3 שבועות לאחר הדבקה עם השבטים השונים המכילים מוטציות באתר AlkB. 1 : pGVA-GFP-252 (ביקורת חיובית), 2 : ח"א R₁, 3 : ח"א R₂, 4 : ח"א R₃, 5 : ח"א K, 6 : ח"א D, 7 : ח"א H₂.

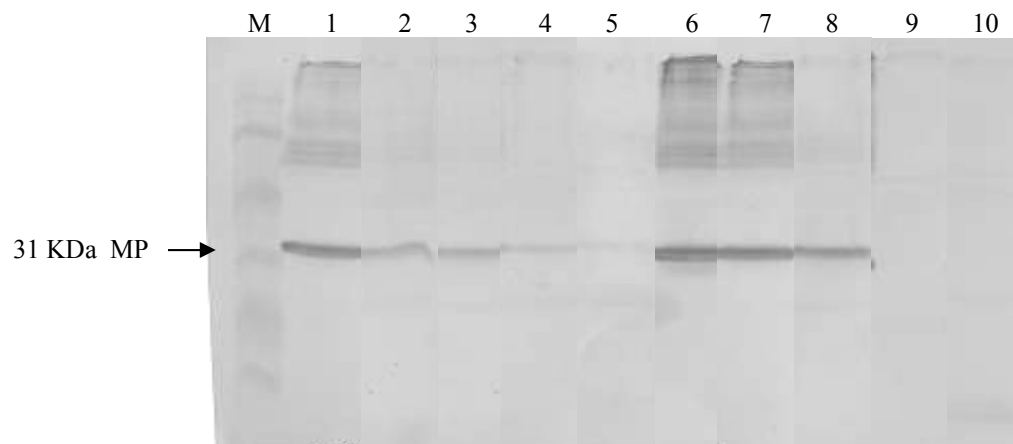
3.12.2.3 בחינת יכולת ההתרבות של הוירוסים המוטנטים

השבטים המכילים את המוטציות במקטע ה-AlkB נבדקו לגבי יכולת השיכפול שלהם בצמח המודבק ע"י אנליזה של ה-RNA הויראלי בשיטת Northern blot והיברידיזציה עם גלאי ספציפי ל-GVA וע"י אנליזה של חלבון ויראלי (חלבון התנועה) בשיטת Western blot עם נוגדן ספציפי. כ-4-5 שבועות לאחר ההדבקה הופק RNA מעלים סיסטמיים בשיטת Tri-reagent (לפי סעיף 2.16). ה-RNA נבדק ב-Northern blot (לפי סעיף 2.17) תוך כדי השימוש בגלאי ספציפי לקצה ה-5' של גנום ה-GVA. לפי תוצאות ההיברידיזציה המוצגות בתמונה 12 ניתן לראות שרוב המוטנטים הראו שיכפול של RNA ויראלי מלבד המוטנטים בח"א H₁ ו-E שלא הראו כלל שיכפול של RNA ויראלי (ערוצים 9 ו-10 בהתאמה). המוטנטים בח"א R₃ ו-K הראו ירידה ברמת השיכפול (ערוצים 4 ו-5 בהתאמה). לפי התוצאות המוצגות בתמונה ניתן גם לראות כי ב-GVA המכיל מוטציה בח"א Q נשמט חלק מהגנום (אולי חלק מגן ה-eGFP מה שתואם את העובדה כי במוטנט זה לא ניצפה ביטוי של הגן המדווח במיקרוסקופ הקונפוקלי). הגודל של ה-RNA הגנומי של המוטנט הזה היה קטן מזה של המוטנטים האחרים בניסוי (ערוץ 8).



תמונה 12: פילם של תוצאות אנליזת Northern blot בהגבה עם גלאי קצה 5' GVA וספציפי לגדיל החיובי. 1 : pGVA-GFP-252 (ביקורת חיובית), 2 : R₁, 3 : R₂, 4 : R₃, 5 : K, 6 : D, 7 : H₂, 8 : Q, 9 : H₁, 10 : E.

כ-4-5 שבועות לאחר ההדבקה הופקו חלבונים מעלים סיסטמיים ובוצעה בדיקת Western blot (לפי סעיף 2.19). בתור נוגדן השתמשנו בנוגדן ספציפי לחלבון ה-MP של וירוס ה-GVA (חלבון זה מתבטא ברמה החזקה ביותר מבין כלל החלבונים של הוירוס). לפי תוצאות המוצגות בתמונה 13 ניתן לראות כי כל המוטנטים הראו ביטוי של חלבון ה-MP (חזק או חלש יותר), מלבד אלו של ח"א H₁ וח"א E (ערוצים 9 ו-10 בהתאמה). אציין כי בשני המוטנטים האחרונים לא ניצפה שיכפול של RNA ויראלי (לפי התוצאות המוצגות בתמונה 12). המוטנטים בח"א R₃ וח"א K (ערוצים 4 ו-5 בהתאמה) הראו רמה נמוכה של ביטוי חלבון ה-MP בדומה לרמה הנמוכה אשר מוטנטים אלה הראו באנליזת ה-Northern blot (תמונה 12 ערוצים 4 ו-5).



תמונה 13: ממברנה של אנליזת Western blot לחלבונים אשר הופקו מצמחים מודבקים ב-GVA המכיל מוטציות נקודיות במקטע ה-AlkB תוך כדי השימוש בנוגדן פוליקלונלי ספציפי לחלבון ה-MP של הוירוס. M - מרקר גדלים לחלבונים. 1: pGVA-GFP-252 (ביקורת חיובית), 2: R₁, 3: R₂, 4: R₃, 5: K, 6: D, 7: H₂, 8: Q, 9: H₁, 10: E.

4. דיון ומסקנות

כיום ידועות 72 קבוצות שונות של וירוסי צמחים המכילות יותר מ-500 וירוסים ובקושי קיימים צמחים שאינם משמשים כפונדקאים לפחות לוירוס אחד. אולם, לא כל הוירוסים תוקפים כל צמח. צמחים בד"כ עמידים לרוב הוירוסים עקב מנגנון הגנה צמחי הנקרא: Gene Silencing, אך עקב העובדה שוירוסים פיתחו RSSs המתגברים על מנגנון הגנה צמחי זה, קיימת הדבקה ויראלית של הצמח ואף וירוסים נוספים מסתמכים על וירוסים קיימים בצמח וכך נוצרת הדבקה מעורבת של כמה וירוסים בצמח מאכסן אחד.

צמח הגפן הוא דוגמא למאכסן של מספר רב של וירוסים. גפן היא אחד מגידולי הפרי הנפוצים בארץ ובעולם אשר חשיבותם הכלכלית רבה. צורת הריבוי הווגטטיבי של הגפן, הרכבה על כנות, והפצה בינלאומית של חומר ריבוי הביאו במשך השנים לתפוצה רחבה של מחלות וירוס או דמויות-וירוס המהוות אחד הגורמים העיקריים בהתנוונות הגפן. מחלות אלו גורמות לירידה בכמות ואיכות הפרי ובתנאים מסוימים אף לתמותת גפנים. עד כה, נמצאו לפחות 60 וירוסים היכולים להדביק גפן, אם כי לא כולם מוכרים כגורמי מחלה וחלקם הם פתוגנים חשובים בגידולים אחרים ונמצאים רק לעתים רחוקות בגפן.

פריצת הדרך לבידוד ואיפיון של הוירוסים גורמי המחלות בגפן באה עם היכולת להעביר את המחלה לצמח עשבוני, לבודדו ולאפיינו מתוך הצמח העשבוני. אין כיום הרבה מידע על הוירוסים המעורבים במחלת הניקרונות בגפן. אחד מגורמי הניקרון העיקריים הינו וירוס ה-GVA אשר הרצף והתפקיד של הגנים השונים שלו נחקרו במעבדה לוירולוגיה במכון וולקני. במחקר שלי עבדתי עם צמח עשבוני *N. benthamiana* במטרה לאפיין רצפי GVA המעורבים בדיכוי מנגנון ההגנה הצמחי.

הסיבות לכך שאנו עובדים עם צמח טבק במקום בצמח הפונדקאי הטבעי של הוירוס, גפן הן:

(1) טרם נמצאה גישה יעילה להדבקת גפן בוירוס מנוקה של ה-GVA ולא בשבט האינפקטיבי, לעומת זאת בצמחי *N. benthamiana* קיימות מערכות הדבקה יעילות.

(2) בדרך כלל הגפנים לא מבטאים תסמינים לנגיעות ב-GVA. תסמינים של הדבקה יכולים להתפתח על אינדיקטורים רגישים של *Vitis* אבל לאחר פרק זמן של 3-4 שנים. במצב זה, הסימפטומים המופיעים באינדיקטורים מתבטאים לרוב בגזע ומתחת לקליפה ולא על העלים. לעומת זאת, בצמחי *N. benthamiana*, ה-GVA מתרבה בקצב מהיר וסימפטומים מופיעים ומאובחנים ויזואלית על גבי העלים כעבור 7-10 ימים מההדבקה.

(3) בצמחי *N. benthamiana* אנליזה של ה-RNA היא קלה יחסית בהשוואה לזו של צמחי הגפן כיוון שאין בצמח זה חומרים פנוליים מעכבים.

למרות שהדבקת צמחי *N. benthamiana* בוירוס ה-GVA משרה התפתחות סימפטומים שונים מאלו המושרים בצמחי הגפן, אנו מאמינים כי ביצוע אנליזות של הגורמים המשפיעים על מידת הפתוגניות והסימפטומים תוך שימוש בצמח עשבוני כצמח מודל יכול לתרום להבנת אספקטים חשובים בביולוגיה של וירוס ה-GVA ומחלות גפנים.

4.1 בניית שבט אינפקטיבי של GVA המבטא גן מדווח של eGFP בצמחי *N. benthamiana*

מיקרוסקופ קונפוקלי הינו כלי יעיל המאפשר הסתכלות בשכבות שונות של רקמה עבה. בעזרת מיקרוסקופ קונפוקלי ניתן להסתכל באופן ישיר במתרחש בתאים בודדים ברזולוציה גבוהה כאשר הוא מכוון לרגישות של פרמטר ספציפי, כדוגמת פלורסנציה.

שיטות שונות ומגוונות משמשות לזיהוי ואיפיון פעילות הקשורה בגן כזה או אחר. בין שיטות אלו נמנה ביטוי הגן הנבדק באיחוי עם גן מדווח. באופן כזה, הגן המדווח מאפשר מעקב אחר ביטוי החלבון הנחקר ואיתור מיקומו בתוך התא. בשנים האחרונות ניתן להבחין בשימוש הולך וגובר בחלבון ה-GFP. הפלורסנציה מתבטאת בתאים בהם נמצא ה-GFP ועוצמת הפלורסנציה היא בהתאם לכמות ה-GFP המתבטא בתא או בריקמה. מוטציות הכרוכות בהחלפת חומצה אמינית אחת באחרת הביאו לקבלת וריאנטים סינטטיים משופרים של GFP בעלי יכולת פליטה בעוצמה גבוהה יותר ובעלי יכולת קיפול טובה השומרים על יציבות (Chalfie, 1995). אחד החלבונים הסינטטיים הללו הוא eGFP (enhanced green fluorescent) בעל בליעה באורך גל של 490 nm ופליטה באורך גל של 509nm. מוטנט זה נפוץ בשימוש מסחרי (Clontech).

בעבודה זו ביצעתי איחוי של הגן המדווח eGFP לקצה הקרבוקסילי של תוצר ORF2 של GVA. התוצאה הייתה קבלת וירוס מהונדס (GVA-GFP-252) המבטא eGFP אשר שימש אותנו למטרת אבחון יעילות הדבקה וההתרבות של הוירוס ברמת התא הבודד וברמת הצמח השלם, תוך מעקב אחר רמת הפלורסנציה ע"י שימוש במיקרוסקופ קונפוקלי. כמו כן, הכלי הזה שימש אותנו לאפיון רצפים בגנום ה-GVA המעורבים בדיכוי מנגנון ההגנה הצמחי - RNA gene silencing.

4.2 דיכוי מנגנון ההשתקה הצמחי (PTGS) ע"י וירוס ה-GVA

גנום ה-GVA מורכב מ-5 מסגרות קריאה (ORFs). ORF5 מקודד לחלבון בעל משקל מולקולרי של 10 kDa (p10), אשר לאחרונה התגלה כבעל תכונות קשירה של RNA. כמו כן, נתגלה כי חלבון זה של GVA בעל פעילות של RSS בנוסף לחשיבותו והשפעתו על הפתוגנזה של הוירוס ועל יכולתו להדביק את הגפן (Chiba *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2006).

במחקר שלי בוצעו ניסויים המדגימים כי p10 לבדו הוא מדכא חלש ל-RNA gene silencing (התוצאות מוצגות בפרק התוצאות בסעיף 3.6, תמונה 7 גרף 1) וכי לצורך תיפקוד יעיל יותר ומוגבר דרושה מעורבות של עוד פקטורים נוספים מגנום הוירוס. תוצאה זו התקבלה כאשר בחנו את יכולת הוירוס השלם של GVA (שבט pGVA-174) לדכא PTGS. בבדיקות אלה נמצא כי הפעילות של הוירוס השלם בדיכוי PTGS היתה חזקה פי 7 יותר מהפעילות של תוצר ORF5 לבדו (התוצאות מוצגות בפרק התוצאות בסעיף 3.6 גרף 1 ובסעיף 3.7 גרף 2). מתוצאות אלה ניתן להסיק כי בנוסף לתוצר ORF5 דרושים מרכיבים נוספים מגנום הוירוס להגברת הפעילות של דיכוי ה-PTGS.

בתור אסטרטגיה לעורר את מערכת ההשתקה הצמחית פיתחנו מערכת הדומה לזו של Chiba, 2006, *et al.* והמבוססת על השימוש במינירפליקון הכולל גנים המקודדים לרפליקאז של נגיף ה-Beet *yellow virus, Closterovirus* (BYV) והמבטא גן מדווח GFP. מערכת זו דווחה כיעילה לאבחון

ואנליזה השוואתית של חלבונים ויראליים שונים עם פעילות דיכוי PTGS. בעבודת המחקר שלי פיתחנו מערכת דומה המבוססת על גנום ה-GVA ומבטאת גן מדווח eGFP אשר שימשה לנו לאיפיון מרכיבים בגנום ה-GVA המעורבים בדיכוי מערכת PTGS. שבט pGVA-GFP-269 נבנה על בסיס שבט pGVA-GFP-252 תוך כדי הוצאת הרצפים של ORF3(MP), ORF4(CP) וחלק מ-ORF5(p10) כך שהמינירפליקון שהתקבל הכיל את הרצף של ORF1 המקודד לתוצרי השיכפול של הוירוס ו-ORF2 שתפקידו אינו ידוע, מאוחה ל-eGFP בקצה C' טרמינלי.

לפי התוצאות שקיבלנו (המוצגות בפרק התוצאות בסעיף 3.3, תמונה 4) ראינו כי השיכפול של מינירפליקון ה-GVA (pGVA-GFP-269) ברמת התא לא נפגע וכי האיזורים שהוחסרו מהרצף של גנום הוירוס השלם אינם דרושים לצורך שיכפול של הגנום בתא. 4 ימים לאחר הדבקת צמחים עם המינירפליקון, אובחן ביטוי של eGFP בעלים המודבקים. רמת הביטוי של ה-eGFP פחתה עם הזמן וביום ה-7 כמעט ולא ניתן היה לגלותה במיקרוסקופ הקונפוקלי. ההסבר האפשרי שהצענו לירידה בביטוי ה-eGFP הוא עיכול ה-RNA של GVA-GFP-269 ע"י הצמח עקב הפעלת מנגנון ההשתקה הצמחי (RNA gene silencing) ע"י ה-dsRNA הנוצר בזמן השיכפול של המינירפליקון.

על מנת לבחון את האפשרות כי הירידה בביטוי ה-eGFP היא בגלל מערכת ההשתקה הצמחית PTGS המעוררת ע"י המינירפליקון, השתמשנו במערכת המבטאת בנוסף למינירפליקון גם חלבונים של וירוסים המוכרים כמדכאים ל-PTGS (בחרנו ב-4 חלבונים שונים כאלה: HC-Pro, V2, p19, p25). בניסוי השונו את עוצמת הביטוי של ה-eGFP המבוטא באמצעות המינירפליקון בנוכחות ובהיעדר חלבון מדכא ל-PTGS, 7 ימים לאחר ההדבקה תוך כדי השימוש במיקרוסקופ קונפוקאלי ותוכנת MICA המבצעת אנליזה השוואתית לכימות ה-eGFP בין הדוגמאות הנבדקות. מהתוצאות נמצא כי בנוכחות חלבון מדכא ל-PTGS נצפתה עליה בעוצמת הביטוי של ה-eGFP המבוטא מהמינירפליקון אשר יכולה להגיע עד פי 1900 (תלוי בסוג החלבון המדכא בו השתמשנו) מזו של המינירפליקון לבדו. בנוסף, נוכחנו לדעת כי מערכת המינירפליקון שפיתחנו הייתה יעילה לבדיקת חלבונים שונים המוכרים כמדכאים את מנגנון ההשתקה הצמחי PTGS (התוצאות מוצגות בפרק התוצאות בסעיף 3.5 תמונה 6 ובסעיף 3.8 גרף 3). מתוצאות אלה ניתן היה להסיק כי הדעיכה עם הזמן בביטוי ה-eGFP המבוטא מהמינירפליקון היא תוצאה של תגובת הצמח (PTGS) וכי ניתן להשפיע על רמת הביטוי של ה-eGFP, הווה אומר מידת הביטוי והשיכפול של המינירפליקון, ע"י ביטוי בו זמני של חלבונים הפועלים כמדכאים ל-PTGS.

בדיקות אלו בוצעו הן בצמחי *N. benthamiana* מטיפוס הבר והן בצמחים טרנסגניים 16c-eGFP המבטאים בתוך הגנום הצמחי את הגן ל-eGFP (תוצאות לא מוצגות). זו גם הסיבה להבדלים בעוצמת דיכוי ההשתקה שנצפו בין שני טיפוסים הצמחים, בהדבקה עם חלבון מדכא זהה. מכיוון ש-eGFP זהו גן זר לפונדקאי הצמחי אשר מתבטא בעודף, במהלך השעתוק של הגן, ה-RdRp הצמחי מסנתז על גדיל ה-sense גדיל ה-antisense כך שנוצר מבנה של dsRNA המהווה משרן של מנגנון ההשתקה הצמחי. בהמשך, ה-Dicer מעכל את הדו-גדיל למקטעי siRNA. בצורה כזו מנגנון ההשתקה בצמחים הטרנסגניים כבר פעיל. מולקולות ה-siRNA שנוצרו הן בעלות רצף הומולוגי

לרצף ה-eGFP הקיים במינירפליקון. לכן, בעת הדבקה של הצמח הטרינסגני עם המינירפליקון בתוספת מדכא, מולקולות ה-siRNA מזהות את הוירוס, נקשרות אליו באופן הומולוגי ספציפי וגורמות לעיכולו. בצורה כזו עד שהמדכא מתחיל להתבטא בצמח, קיים כבר עיכול של המינירפליקון כך שמנגנון הדיכוי מופחת משמעותית יחסית לצמחי הבר.

כשהתברר לנו כי מערכת המינירפליקון הוכיחה את עצמה כיעילה ורגישה לבחינת תיפקוד חלבונים שונים בעלי פעילות של דיכוי PTGS, החלטנו לבחון בעזרתה רצפים בתוך גנום ה-GVA בעלי פעילות פוטנציאלית של דיכוי מנגנון ההשתקה. תחילה בחנו את הפעילות המדכאת של תוצר ORF5 של ה-GVA. כאמור, המערכת הרגילה (ביטוי החלבון p10 בתוספת של eGFP) הצביעה על פעילות חלשה של p10 בדיכוי PTGS. לעומת זאת, במערכת המבוססת על השימוש במינירפליקון התוצאות שהתקבלו הראו כי 7 ימים לאחר ההדבקה רמת הביטוי של ה-eGFP מהמינירפליקון עלתה פי 1500 בנוכחות ORF5. התוצאה הזו מעידה כי התוצר של ORF5 פועל כמדכא חזק ל-PTGS כאשר ישנו ביטוי של מינירפליקון, וכי כנראה קיים פקטור/ים במינירפליקון המעורבים בהגברת הפעילות של ה-p10.

הרצפים של ORF5 ושל המינירפליקון מקורם באותו גזע GVA (הנקרא p-GR5). על מנת לבחון באם המינירפליקון יכול גם להשפיע על הפעילות של ה-p10 אשר מקורם מגזעים אחרים של GVA, בדקנו בצורה דומה p10 אשר מקורו בגזע p-GTR1-1. גזע ה-GVA p-GTR1-1, להבדיל מהגזע האלים p-GR5, ידוע כי הוא גזע בלתי אלים ומשרה בצמחי בנטמינה תסמיני מחלה חלשים. לפי התוצאות שקיבלנו ניתן היה להסיק כי p10 של שני הגזעים מגביר את ביטוי ה-eGFP מהמינירפליקון באותה מידה וכי לשניהם ישנה פעילות חזקה בדיכוי PTGS (התוצאות מוצגות בסעיף 3.8 גרף 3).

4.3 בחינת המרכיבים במינירפליקון pGVA-GFP-269 התורמים להגברת הפעילות של תוצר

ORF5 בדיכוי PTGS

הניסויים שערכנו הראו שתוצר ORF5, בנוכחות ביטוי של המינירפליקון pGVA-GFP-269 מצביע על פעילות חזקה בדיכוי מנגנון ההשתקה הצמחי, PTGS. בהתאם לכך ניתן להסיק על מעורבותו(ם) של מרכיב(ים) נוסף(ים) הנוכחים במינירפליקון של ה-GVA בהגברת הפעילות של p10 בדיכוי מנגנון ה-PTGS. מסקנה זו יכולה להתאים להשערה כי וירוסים המדביקים עצי פרי רב שנתיים, כדוגמת הגפן, סביר שפיתחו מערכת חזקה לדיכוי מנגנון ההגנה הצמחי PTGS ולא מסתמכים רק על תוצר חלבוני אחד. למשל בדיכוי ה-PTGS ע"י וירוס הטריסטזה של ההדר מעורבים לפחות תוצרים של שלושה גנים שונים הפועלים הן בתוך התא והן בין התאים (Lu et al., 2004). במקרה של הדבקה ב-GVA, ומכיוון ש-p10 לבדו הוכח להיות מדכא חלש של מנגנון PTGS, ניתן להניח כי דרושים עוד פקטורים נוספים להגברת הפעילות של p10 הקיימים במינירפליקון. כאמור, המינירפליקון מכיל את הרצפים של ORF1 המקודד לתוצרי השיכפול של הוירוס, ORF2 המקודד לחלבון אשר תפקידו טרם נקבע וחלק מ-ORF5.

בהתאם לכך, נעשו ניסויים נוספים במטרה למקד את מקור ההגברה לדיכוי ה-PTGS (תוצאות הניסויים הרלוונטיים מוצגים בפרק התוצאות בסעיף 3.10). אף על פי זאת, המסקנה הסופית מניסויים אלו הייתה שלא יכולנו להצביע באופן חד-משמעי על מעורבותו של פקטור אחד בפעולת הדיכוי וכי יכול להיות כי בהליך הדיכוי מעורבים ביחד וב-*in cis*: ORF1, ORF2 והליך השיכפול של ה-RNA הויראלי. ראוי לציין כי כאשר בחנו את ההשפעה של תוצר ORF2 בהגברת הפעילות של p10 בדיכוי ה-PTGS נמצא כי ORF2 עם המוטציה תורם במעט להגברה של פעילות תוצר ה-ORF5 ולכן ניתן להסיק כי ORF2 (התוצר המקודד או או רצף הגן עצמו) משפיע על פעילות p10 בדיכוי מנגנון ההשתקה הצמחי.

המעורבות של יותר מגורם אחד בדיכוי מנגנון ההגנה הצמחי PTGS היא תופעה אשר לכאורה אינה ספציפית רק ל-GVA. בעבודה אשר נעשתה עם נגיף ה-*Red clover necrotic mosaic virus* (RCNMV) (Takeda *et al.*, 2005) נמצא כי בדיכוי ה-PTGS מעורבים שלושה מרכיבים ויראליים: 2 חלבוני שיכפול: p27 ו-p88 ופקטור RNA ויראלי הפועל *in cis*. דיכוי ההשתקה היה תלוי בשיכפול או בסינתזה של RNA ויראלי. בדומה לתוצאות מחקר הנ"ל גם במחקר שלנו הגענו למסקנה דומה שלצורך פעילות מוגברת של ה-p10 של ה-GVA בדיכוי מנגנון ההשתקה הצמחי דרושים כנראה מספר מרכיבים ויראליים: ORF1 ו-ORF2 המבוטאים *in cis*, ושיכפול של ה-RNA הויראלי.

siRNA 4.4

במערכות בהן מופעל מנגנון ההשתקה זוהו מקטעי RNA קצרים הנקראים Small interfering RNA (siRNA). מקטעים אלו שאורכם נע בין 21-26 נוקלאוטידים, מקורם ב-dsRNA העובר ביקוע ע"י האנזים Dicer לקבלת מקטעי ה-siRNA. מקטעים אלו בשילוב עם קומפלקס ה-RISC מזהים את רצף ה-mRNA הספציפי המיועד לביקוע, מאפשרים את ביקועו וע"י כך נמנע תרגום הגן לחלבון. מקטעים אלו זוהו בכל המערכות בהן זוהה מנגנון השתקה פעיל.

במערכת בה מזריקים לעלה הצמח RNA וחלבון החשוד כבעל פעילות בדיכוי PTGS, בדרך כלל היווצרות siRNAs במערכת מעידה על פירוק ה-mRNA ע"י מנגנון ההגנה הצמחי, ואילו העדר או הפחתה בהיווצרות siRNAs היא תוצאה המעידה על פעילות החלבון הנבדק בדיכוי ה-PTGS. בעבודה שלי נעשה ניסיון לזהות את מקטעי ה-siRNA באמצעות גלאי ספציפי לקצה 5' של גנום ה-GVA. התוצאות שהתקבלו (לפי סעיף 3.11 תמונה 8) הראו כי המינירפליקון (pGVA-GFP-269) שעובר שיכפול בתוך הצמח ויוצר מבנה של dsRNA, עובר עיכול ע"י הצמח ומתקבלים מקטעי siRNA (הן בצמחי הבנטמינה הלא-טרנסגניים והן בצמחים מטיפוס 16c-eGFP). לעומת זאת, בתוספת של p10 (ORF5+pGVA-GFP-269), קיבלנו הפחתה בריכוז ה-siRNAs. ראוי לציין כי בצמחים המודבקים בוירוס שלם של GVA (שבט pGVA-174) לא נמצאו מקטעי siRNA. הסיבה האפשרית להבדלים בין תוצאות רמות ה-siRNA שזוהו במקרה של וירוס שלם (pGVA-) (eGFP+174) לבין אלו של מינירפליקון בתוספת של p10 (ORF5+pGVA-GFP-269) יכולה לנבוע

מהעובדה כי ההשוואה בין התוצאות לא בוצעה על RNA שהופק לאחר תקופה זהה מיום ההדבקה. בצמחים שהודבקו עם שבט pGVA-174, ה-RNA הופק 11 ימים לאחר ההדבקה ואילו בצמחים שהודבקו עם מינירפליקון pGVA-GFP-269 בתוספת/בלי p10, ה-RNA הופק 7 לאחר ההדבקה. הסיבה לכך שה-RNA שהופק מצמח שהודבק בשבט pGVA-174, הופק 4 ימים מאוחר יותר נעוצה בעובדה כי בצמח כזה ה-eGFP שהוזרק עם השבט pGVA-174, עובר השתקה ניכרת רק כ-10 ימים לאחר ההדבקה ורק בשלב כזה היינו יכולים לבחון את פעילות הדיכוי האמיתית שמקנה הוירוס השלם. הסיבה לכך נובעת מהעובדה שגן ה-eGFP לא יוצר מבנה של dsRNA באופן עצמאי (בניגוד למערכת המינירפליקון). רק לאחר שנוצרים עותקים רבים של RNA של eGFP, הצמח מזהה נוכחות של גורם זר ומפעיל את המערך ההגנתי שלו. כלומר, ה-RdRp הצמחי מזהה את מולקולות ה-RNA שהצטברו כתוצאה משיעתוק גן ה-eGFP, נקשר אל ה-RNA הזר ומסנתז גדיל משלים ליצירת מבנה dsRNA, בהמשך מבנה זה נחתך עם אנזים ה-Dicer למקטעים קצרים של siRNA.

לעומת זאת, צמח שמודבק עם מינירפליקון pGVA-GFP-269, מכיל רצף ויראלי שעובר שיכפול ויוצר מבנה של dsRNA כבר 3-4 ימים מיום ההדבקה, כך שההשתקה בצמח כזה מתרחשת מוקדם יותר. כתוצאה מכך, כבר 3-7 ימים אחרי ההדבקה ניתן היה לבחון את הפעילות של p10 בתוספת של מינירפליקון.

באופן כללי, ככל שהזמן שעובר מיום ההדבקה הוא ארוך יותר, המדכא מצליח לגבור באופן משמעותי יותר על מערכת ההשתקה הצמחית ורמות ה-siRNA פוחתות. לכן, אני צופה שאם היינו מפקים את ה-RNA מצמחים המודבקים ב-pGVA-GFP-269 + ORF5 ביום ה-11 לאחר ההדבקה, לא היינו מוצאים מקטעי siRNA בדומה לתוצאות שהתקבלו עם שבט pGVA-174. מהתוצאות הנ"ל ניתן להניח כי מנגנון הפעולה של p10 בדיכוי ההשתקה PTGS הוא בשלב בו ה-Dicer חותך את ה-dsRNA. המנגנון האפשרי לכך הוא ע"י קישור בצורת קומפלקס בין ה-p10 ופקטורים נוספים המצויים במינירפליקון לבין ה-dsRNA הויראלי. קישור כזה, באם מתרחש, מונע מה-Dicer לעכל את ה-dsRNA ובכך יצירת מקטעי ה-siRNA נפגעת.

4.5 בחינת מעורבותו של ההומולוג הויראלי של ה-AlkB בפתוגנזה של וירוס ה-GVA

תפקידו של חלבון ה-AlkB הוא תיקון DNA דרך דה-מתילציה. גנום ה-GVA מכיל רצף דמוי AlkB אשר ניתן להניח שהוא אחראי על תיקון מוטציות ב-RNA של הוירוס הנגרמים כנראה ע"י הצמח לצורך ניטרול הוירוס. במידה והשערה זו נכונה, אז פגיעה ברצף או האתר של ה-AlkB בגנום הוירוס יכולה לגרום לירידה בהכפלת ה-RNA הויראלי, לפגיעה בתנועת הוירוס בצמח, לירידה ביכולת ההדבקה של הוירוס או לשילוב של כמה מהפגיעות הנ"ל. השוואת רצף חומצות האמינו ב-20 אתרים ויראליים של AlkB (כולל זה המופיע בוירוס ה-GVA) הראתה מספר חומצות אמינו שמורות. על מנת לנסות ולאתר את מידת החשיבות של חלק מהחומצות אמינו האלה בפעילותו של AlkB ביצתי 9 מוטציות נקודתיות באיזור המשוער של AlkB בגנום ה-GVA המבטא eGFP (GVA-GFP-252) בהם החלפתי בכל פעם חומצת אמינו אחת בחומצת אמינו אלנין (Ala). 3

מוטציות כווננו כלפי חומצות אמינו שמורות בהומולוגים של חלבון ה- AlkB כולל הומולוגים ויראליים, 3 מוטציות כווננו כלפי חומצות אמינו שמורות בהומולוגים ויראליים בלבד של AlkB ו-3 מוטציות נוספות כווננו כלפי חומצות אמינו שאינן שמורות בהומולוגים של AlkB, וזאת למטרת ביקורת. כל אחד מהמוטנטים הודבק לצמחי בנטמינה וכעבור 10-14 יום התחלנו בבדיקת הצמחים ע"י: (1) הסתכלות במיקרוסקופ קונפוקלי לגילוי ביטוי של eGFP; (2) מעקב אחרי הופעת הסימפטומים המתפתחים על הצמחים המודבקים והשוונו את מידת עוצמתם יחסית לביקורת (שבט pGVA-GFP-252); (3) הפקת RNA מהצמחים המודבקים ובדיקת יעילות השיכפול הויראלי באמצעות Northern blot; (4) הפקת חלבונים מהעלים של הצמחים המודבקים ובדיקות בעזרת Western blot.

תוצאות בדיקת המוטנטים השונים (המוצגות בפרק התוצאות בסעיף 3.12.2) הצביעו על מגמה מעניינת. בשני המוטנטים בחומצות האמינו H_2 ו- D שכווננו כלפי חומצות אמינו שמורות בכלל ההומולוגים של חלבוני ה- AlkB, לא נמצאה השפעה משמעותית על הפתוגנזה, מלבד העובדה שהתסמינים של המחלה התפתחו בצמחים כ- 14-20 ימים לאחר ההדבקה לעומת 7-10 ימים בצמחים המודבקים בוירוס ללא מוטציות (GVA-GFP-252). מאידך, בוירוס עם המוטציה בשייר H_1 , נמצא כי המוטציה שיתקה לחלוטין את יכולת ההדבקה של הוירוס כמו גם את יכולת השיכפול שלו הן בצמח והן ברמת התא (בפרוטופלסטים; התוצאות לא מוצגות). על סמך ממצא זה ניתן להניח כי המוטציה בשייר H_1 פגעה בפעילות חלבון הרפליקאז ואולי ניתן גם להסיק כי המוטציה בשייר זה פגעה בתיפקוד המשוער של ה- AlkB. אף על פי זאת, חקר מעורבתו של השייר H_1 הוא נושא מעניין וחשוב להמשך המחקר.

התוצאות שהתקבלו לגבי המוטציות אשר כווננו כלפי חומצות אמינו שמורות בהומולוגים ויראליים בלבד של AlkB הראו מגמה מעורבת. בוירוס עם המוטציה בשייר R_1 לא נצפתה כל השפעה על מידת הפתוגנזה של הוירוס המוטנט חוץ מהעובדה שהסימפטומים אותם השרה הוירוס על הצמח הופיעו בעיכוב של שבוע (התוצאות היו זהות לאלו שהתקבלו בביקורת החיובית של שבט pGVA-GFP-252). בוירוס עם המוטציה בשייר R_2 נצפתה ירידה בכל הפרמטרים שנבדקו ולכן ניתן להניח כי השייר R_2 חשוב לפעילות חלבון הרפליקאז וואו לפעילות המשוערת של AlkB. בוירוס עם המוטציה בשייר Q התקבלו תוצאות מעניינות. וירוס מוטנט זה מצד אחד לא הראה הבדל ברמת ההתרבות שלו וברמת הביטוי של הגנום הויראלי, יחסית לביקורת pGVA-GFP-252, אך מצד שני, הוא גרם להופעת תסמינים מאוד חלשים של מחלה. ההסבר האפשרי לתוצאה זו הוא שהוירוס המכיל מוטציה בשייר Q אינו פוגע בתהליכים המעורבים בבקרת התפתחות הצמח כמו מסלול יצירת ה- miRNA. במצב רגיל, הדבקה ויראלית יכולה לגרום לפגיעה או להפרעה במנגנון ההתפתחות הטבעי של הצמח המבוקר ע"י מסלולים של יצירת miRNA. כתוצאה מפגיעה או הפרעה במסלול יצירת miRNA, הצמח אינו מתפתח באופן טבעי ותסמינים של מחלה מופיעים על הצמח המודבק. מצד שני הדבקה ויראלית שאינה משפיעה על מסלול יצירת ה- miRNA הצמחי, סביר להניח שאינה גורמת להופעת סימפטומים של מחלה. תוצאה דומה לתוצאה אשר התקבלה

בעבודה שלי ניתן למצוא במקרה של ה- *Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV)*. נמצא כי בוירוס הזה החלפת חומצת אמינו בודדת בחלבון ה- HC-Pro, (שהוא גם חלק מהרפליקאז וגם מדכא את מנגנון ההשתקה הצמחי) הורידה באופן חד את מידת הסימפטומים המושרים בצמחי מלפפון מודבקים מבלי להשפיע על מידת ההתרבות של הוירוס בצמח (Gal-On & Raccach, 2000). מוטנט כזה יכול לשמש אותנו בעתיד אם נרצה לפתח וקטור ויראלי לביטוי של גנים זרים בתוך הצמח. בוקטור מסוג זה חשוב שלא תהיה פגיעה בשיכפול הויראלי וכמו כן שהצמח יתפתח באופן טבעי.

התוצאות שהתקבלו לגבי שלושת הוירוסים עם המוטציות שכוונו כלפי חומצות אמינו לא שמורות בהומלוגים של AlkB הראו מגמה דומה. בוירוסים עם המוטציות בשיירים K ו-R₃, הייתה ירידה ניכרת בכל הפרמטרים שנבדקו ולכן כנראה שמוטציות אלו פוגעות אך לא משתקות לחלוטין את פעילות הרפליקאז. בוירוס עם המוטציה בשייר E, המוטציה שיתקה לחלוטין את היכולת הפתוגנית של הוירוס כמו כן גם את יכולת ההתרבות הויראלית וכנראה שיתקה את פעילות הרפליקאז.

התוצאות האלה מראות כי חומצות אמינו שאינן שמורות בהומלוגים של AlkB יכולות גם הן להשפיע על פעילות הרפליקאז או על פעילות חלבון ה-AlkB המשוער בלהגן על הוירוס. יתכן וכי בשל המוטציות שהוכנסו בשיירים הלא שמורים חלה פגיעה בחלבון הרפליקאז עצמו, אך על אף זאת יתכן וכי קיימת אפשרות אחרת של פגיעה באתר הפעיל של ה-AlkB עקב הפרעה ביצירת מבנה מרחבי תקין המאפשר פעילות תקינה של חלבון או אתר ה-AlkB.

כמגמה להמשך העבודה יש צורך למפות את אתר ה-AlkB ולבטא את מקטעי ה-AlkB עם המוטציות שהוכנסו במערכת המבוססת על השימוש בחיידקי *E.coli* במטרה ללמוד על הפעילות הביוכימית של דה-מתילציה המיוחסת ל-AlkB במערכת *in vitro*.

4.6 קיימת חשיבות רבה בהבנת מנגנון ה-PTGS אשר טומן בחובו פתרונות ביוטכנולוגיים רבים

1) במצב של בקרה על ההשתקה, צמחים טרנסגניים יכולים להיות מהונדסים כך שייצרו טווח של ביטוי גנים: רמות מתונות של ביטוי לייצור תכונות רצויות בצמח או רמות גבוהות של ביטוי על מנת להשתמש בצמח בתור בית חרושת לייצור של תרופה, תרכיב או תוצרי גנים אחרים רבי ערך.

2) ניתן ליצור צמחים עמידים לוירוסים ספציפיים (Bruening, 1998).

3) למולקולות siRNA יש יכולת תירפואטית גבוהה. ע"י החדרה של מולקולות אלו כתרופה ניתן ליצור השתקה של גן שביטוי אינו רצוי (Semizarov *et al.*, 2003).

4) כיום רותמים את מערכת ההשתקה הגנטית, במסגרת טיפול בגנים, לעיכוב ביטוי של גנים המקודדים למחלות חשוכות מרפא. שימוש רפואי אפשרי הינו השתקת גנים המתבטאים ביתר וגורמים להתפתחות מחלת הסרטן (Tuschl & Borkhardt, 2002).

5) יתכן, כי החשוב מכל, שחלבונים ויראליים המדכאים את מנגנון ההגנה הצמחי מספקים כלי ייחודי להבנת המכאניזם של השתקת ה-RNA. מדכאים ויראליים, שרבים מהם פועלים במורד

הזרם של dsRNA, מספקים כלי חדש לכניסה אל תוך חלקי מסלול ההשתקה, דבר הקשה לביצוע ע"י שימוש בכלים גנטיים. מדכאים הידועים לנו כיום פועלים בנקודות שונות של מסלול ההשתקה, לכן מספקים לנו גישה למספר נקודות בקרה במסלול זה. כמו כן, זיהוי של חלבוני מאכסן הנמצאים באינטראקציה עם מדכאים ויראליים של מנגנון ההשתקה מהווה גישה מאוד מבטיחה להבהרת מנגנון זה. עצם זה שנוכל לדעת את המנגנון בו המדכא מתערב בתהליך ההשתקה של הפונדקאי, נוכל בעתיד לפתח אסטרטגיות להדבקות הוירוס כך שנוכל להתערב במנגנון דיכוי של מערכת ההגנה הצמחית.

רשימת ספרות

1. Aas, P.A., Otterlei, M., Falnes, P.O., Vagbo, C.B., Skorpen, F., Akbari, M., Sundheim, O., Bjoras, M., Slupphaug, G., Seeberg, E., Krokan, H.E., 2003. Human and bacterial oxidative demethylases repair alkylation damage in both RNA and DNA. *Nature*. 421, 859–863.
2. Aravind, L. & Koonin, E.V., 2001. The DNA-repair protein AlkB, EGL-9, and leprecan define new families of 2-oxoglutarate- and iron-dependent dioxygenases. *Genome Biology*. 2(3), Research0007.
3. Bass, B.L., 2000. Double-stranded RNA as a template for gene silencing. *Cell*. 101, 235-238.
4. Baulcombe, D.C. & English, J.J., 1996. Ectopic pairing of homologous DNA and post-transcriptional gene silencing in transgenic plants. *Current Opinion in Biotechnology*. 7, 173-180.
5. Begley, T.J. & Samson, L.D., 2003. A fix for RNA. *Nature*. 421, 795-796.
6. Bennasser, Y., Le, S.Y., Benkirane, M., Jeang, K.T., 2005. Evidence that HIV-1 encodes a siRNA and a suppressor of RNA silencing. *Immunity*. 22, 607–619.
7. Bratlie, M.S. & Drabløs, F., 2005. Bioinformatic mapping of AlkB homology domains in viruses. *BioMed Central Genomics*. 6, 1-15.
8. Braun, R., Schoneich, J., Weissflog, L., Dedek, W., 1982. Activity of organophosphorus insecticides in bacterial tests for mutagenicity and DNA repair – direct alkylation vs. metabolic activation and breakdown. I. Butonate, vinylbutonate, trichlorfon, dichlorvos, demethyl dichlorvos and demethyl vinylbutonate. *Chemico-Biological Interactions*. 39, 339-350.
9. Bruening, G., 1998. Plant gene silencing regularized. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 95, 13349-13351.
10. Chalfie, M., 1995. Green fluorescent protein. *Photochemistry and Photobiology*. 62, 651-656.
11. Chevalier, S., Greif, C., Clauzel, J.M., Walter, B., Fritsch, C., 1995. Use of an immunocapture-polymerase chain reaction procedure for the detection of *Grapevine virus A* in Kober stem grooving-infected grapevines. *Journal of Phytopathology*. 143, 369-373.
12. Chiba, M., Jonathan, C.R., Prokhnovsky, A.I., Chapman, E.J., Mawassi, M., Koonin, E.V., Carrington, J.C., Dolja, V.V., 2006. Diverse suppressors of RNA silencing enhance agroinfection by a viral replicon. *Virology*. 346, 7-14.
13. Conti, M., Milne, R.G., Luisoni, E., Boccardo, G., 1980. A closterovirus from a stem-pitting-diseased grapevine. *Phytopathology*. 70, 394-399.

14. Dalmay, T., Hamilton, A., Rudd, S., Angell, S., Baulcombe, D.C., 2000. An RNA dependent RNA polymerase gene in *arabidopsis* is required for post transcriptional gene silencing mediated by transgene but not by a virus. *Cell*. 101, 543-553.
15. Dernburg, A.F. & Karpen, G.H., 2002. A chromosome RNAissance. *Cell*. 111, 159-162.
16. Ding, S.W., Li, H., Lu, R., Li, F. & Li, W.X., 2004. RNA silencing: a conserved antiviral immunity of plants and animals. *Virus Research*. 102, 109–115.
17. Dunoyer, P., Himber, C., Voinnet, O., 2005. DICER-LIKE 4 is required for RNA interference and produces the 21-nucleotide small interfering RNA component of the plant cell-to-cell silencing signal. *Nature Genetics*. 37,1356–1360.
18. Elbashir, S.M., Lendeckel, W., Tuschl, T., 2001. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes and Development*. 15, 188–200.
19. Falnes, P.O., Johansen, R.F., Seeberg, E., 2002. AlkB-mediated oxidative demethylation reverses DNA damage in *Escherichia coli*. *Nature*. 419, 178-182.
20. Falnes, P.O., Rognes, T., 2003. DNA repair by bacterial AlkB proteins. *Research in Microbiology*. 154, 531-538.
21. Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 391, 806–811.
22. Galiakparov, N., Goszczynski, D.E., Che, X., Batuman, O., Bar-Joseph, M., Mawassi, M., 2003a. Two classes of subgenomic RNA of *Grapevine virus A* produced by internal controller elements. *Virology*. 312, 434-448.
23. Galiakparov, N., Tanne, E., Mawassi, M., Gafny, R., Sela, I., 2003b. ORF 5 of *Grapevine virus A* encodes a nucleic acid-binding protein and affects pathogenesis. *Virus Genes*. (27) 3, 257-262.
24. Gal-On, A., Raccah, 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.
25. Garau, R., Prota, V.A., Piredda, R., Boscia, D., Prota, U., 1994. On the possible relationship between Kober stem grooving and *Grapevine virus A*. *Vitis*. 33, 161-163.
26. Goszczynski, D.E., Jooste, A.E.C., 2003. Identification of divergent variants of *Grapevine virus A*. *European Journal of Plant Pathology*. 109, 397–403.
27. Hamilton, A.J., Voinnet, O., Chappell, L., Baulcombe, D.C., 2002. Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO Journal*. 21, 4671–4679.
28. Hannon, G.J., 2002. RNA interference. *Nature*. 418, 244–251.
29. Himber, C., Dunoyer, P., Moissiard, G., Ritzenthaler, C., Voinnet O., 2003. Transitivity-dependent and independent cell-to-cell movement of RNA silencing. *EMBO Journal*. 22, 4523-4533.

30. Ho, S.N., Junt, H.D., Horton, R.M., Puller, J.K., Pease, L.R., 1989. Site-directed mutagenesis by overlap extension using polymerase chain reaction. *Gene*. 77, 51-59.
31. Johansen, L.K. & Carrington, J.C., 2001. Silencing on the spot. Induction and suppression of RNA silencing in the *Agrobacterium*-mediated transient expression system. *Plant Physiology*. 126, 930–938.
32. Kasschau, K.D., Cronin, S., Carrington, J.C., 1997. Genome amplification and long-distance movement functions associated with the central domain of tobacco etch *Potyvirus* helper component proteinase. *Virology*. 228, 251–262.
33. Kataoka, H. & Sekiguchi, M., 1985. Molecular cloning and characterization of the *alkB* gene of *Escherichia coli*. *Molecular Genetics and Genomics*. 198, 263–269.
34. Kataoka, H., Yamamoto, M., Sekiguchi, M., 1983. A new gene (*alkB*) of *Escherichia coli* that controls sensitivity to methyl methane sulfonate. *Journal of Bacteriology*. 153, 1301–1307.
35. Kurowski, M.A., Bhagwat, A.S., Papaj, G., Bujnicki, J.M., 2003. Phylogenomic identification of five new human homologs of the DNA repair enzyme AlkB. *BioMed Central genomics*. 4, 48.
36. Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227, 680-685.
37. Lakatos, L., Szittyá, G., Silhavy, D., Burgyan, J., 2004. Molecular mechanism of RNA silencing suppression mediated by p19 protein of tombusviruses. *EMBO Journal*. 23, 876–884.
38. Lewandowski, D.J., Dawson, W.O., 1998. Deletion of internal sequences results in *Tobacco mosaic virus* defective RNAs that accumulate to high levels without interfering with replication of the helper virus. *Virology*. 251, 427–437.
39. Lewsey, M., Robertson, F.C., Canto, T., Palukaitis, P., Carr, J.P., 2007. Selective targeting of miRNA-regulated plant development by a viral counter-silencing protein. *The Plant Journal*. 50(2), 240–252.
40. Llave, C., Kasschau, K.D., Carrington, J.C., 2000. Virus-encoded suppressor of posttranscriptional gene silencing targets a maintenance step in the silencing pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 97, 13401–13406.
41. Lohmann, J.U., Endl, I., Bosch, T.C.G., 1999. Silencing of developmental genes in hydra. *Developmental Biology*. 214, 211-214.
42. Lu, R., Folimonov, A., Shintaku, M., Li, W.X., Falk, B.W., Dawson, W.O., Ding, S.W., 2004. Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20-kb viral RNA genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 101, 15742–15747.

43. Mallory, A.C., Parks, G., Endres, M.W., Baulcombe, D.C., Bowman, L.H., Pruss, G.J., Vance, V.B., 2002. The amplicon-plus system for high-level expression of transgenes in plants. *Nature Biotechnology*. 20, 622–625.
44. Martelli, G.P., 1993. Rugose wood complex. *In* Graft-transmissible diseases of grapevines, handbook for detection and diagnosis. *Edited by* Martelli, G.P.. Food and Agriculture Organization, Rome. pp. 45-53.
45. Martelli, G.P., Candresse, T., Namba, S., 1994. *Trichovirus*, a new genus of plant viruses. *Archives of Virology*. 134, 451-455.
46. Martelli, G.P., Minafra, A., Saldarelli, P., 1997. *Vitivirus*, a new genus of plant viruses. *Archives of Virology*. 142, 1929–1932.
47. Martienssen, R.A. & Colot, V., 2001. DNA ethylation and epigenetic inheritance in plants and filamentous fungi. *Science*. 293, 1070-1074.
48. Martinez, J. & Tuschl, T., 2004. RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease. *Genes and Development*. 18 (9), 975-980.
49. Minafra, A., Saldarelli, P., Grieco, F., Martelli, G.P., 1994. Nucleotide sequence of the 3' terminal region of the RNA of two filamentous grapevine viruses. *Archives of Virology*. 137, 249–261.
50. Minafra, A., Saldarelli, P., Martelli, G.P., 1997. *Grapevine virus A*: nucleotide sequence, genome organization, and relationship in the *Trichovirus* genus. *Archives of Virology*. 142, 417–423.
51. Mishina, Y. & He, C., 2006. Oxidative dealkylation DNA repair mediated by the mononuclear non-heme iron AlkB proteins. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 100, 670-678.
52. Mullis, K.B., 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*. 262, 56-65.
53. Navas-Castillo, J., Albiach-Marti, M.R., Gowda, S., Hilf, M.E., Garnsey, S.M., Dawson, W.O., 1997. Kinetics of accumulation of *Citrus tristeza virus* RNAs. *Virology*. 228, 92–97.
54. Palauqui, J.C., Elmayan, T., Pollien, J.M., Vaucheret, H., 1997. Systemic acquired silencing: transgenespecific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *EMBO Journal*. 16, 4738–4745.
55. Pruss, G.J., Ge, X., Shi, X.M., Carrington, J.C., Vance, V.B., 1997. Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broadrange pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. *Plant Cell*. 9, 859–868.
56. Ratcliff, F., MacFarlane, S., Baulcombe, D.C., 1999. Gene silencing without DNA: RNA-mediated cross protection between viruses. *Plant Cell*. 11, 1207–1215.

57. Ruiz, M.T., Voinnet, O., Baulcombe, D.C., 1998. Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell*. 10, 937–946.
58. Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T., 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY.
59. Scholthof, H.B., Scholthof, K.B.G., Jackson, A.O., 1995. Identification of *Tomato bushy stunt virus* host-specific symptom determinants by expression of individual genes from a *Potato virus X* vector. *Plant Cell*. 7, 1157–1172.
60. Schwartz, M., Chen, J., Janda, M., Sullivan, M., den Boon, J., Ahlquist, P., 2002. A positive-strand RNA virus replication complex parallels form and function of retrovirus capsids. *Molecular Cell*. 9, 505–514 .
61. Semizarov, D., Frost, L., Sarthy, A., Kroeger, P., Halbert, D.N., Fesik, S.W., 2003. Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 100, 6347–6352.
62. Silhavy, D., Molnar, A., Lucioli, A., Szittyá, G., Hornyik, C., Tavazza, M., Burgyan, J., 2002. A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated 21 to 25 nucleotide double-stranded RNAs. *EMBO Journal*. 21, 3070–3080.
63. Sijen, T. & Kooter, J.M., 2000. Post-transcriptional gene silencing: RNAs on the attack or the defence? *BioEssays*. 22, 520-531.
64. Sonda, S. & Nishiguch, M., 2000. Graft transmission of post transcriptional gene silencing: target specificity for RNA degradation is transmissible between silenced and non-silenced plants, but not between silenced plants. *The Plant Journal*. 21(1), 1-8.
65. Starratt A.N. & Bond E.J., 1988. In vitro methylation of DNA by the fumigant methyl bromide. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*. 23, 513-524.
66. Tabara, H., Yigit, E., Siomi, H., Mello, C.C., 2002. The dsRNA binding protein RDE-4 interacts with RDE-1, DCR-1, and a DEXH-box helicase to direct RNAi in *C. elegans*. *Cell*. 109, 861–871.
67. Takeda, A., Tsukuda, M., Mizumoto, H., Okamoto, K., Kiado, M., Mise, K., Okuno, T., 2005. A plant RNA virus suppresses RNA silencing through viral RNA replication. *EMBO Journal*. 24, 3147-3157.
68. Tang, G., Reinhart, B.J., Bartel, D.P., Zamore, P.D., 2003. A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes and Development*. 17, 49-63.
69. Thomas, C.L., Leh, V., Lederer, C., Maule, A.J., 2003. *Turnip crinkle virus* coat protein mediates suppression of RNA silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Virology*. 306, 33–41.
70. Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 76, 4350-4354.

71. Trewick, S.C., Henshaw, T.F., Hausinger, R.P., Lindahl, T., Sedgwick, B., 2002. Oxidative demethylation by *Escherichia coli* AlkB directly reverts DNA base damage. *Nature*. 419, 174-178.
72. Tuschl, T. & Borkhardt, A., 2002. Small interfering RNAs. *Molecular Interventions*. 2, 158-167.
73. Vance, V. & Vaucheret, H., 2001. RNA silencing in plants—defense and counterdefense. *Science*. 292, 2277–2280.
74. Voinnet, O., 2001. RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends in Genetics*. 17, 449–459.
75. Voinnet, O., 2005. Induction and Suppression of RNA silencing: Insights from viral infections. *Nature*. 6, 206-220.
76. Voinnet, O., Lederer, C., Baulcombe, D.C., 2000. A viral movement protein prevents systemic spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell*. 103, 157–167.
77. Voinnet, O., Pinto, Y.M., Baulcombe, D.C., 1999. Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 96, 14147–14152.
78. Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P., Baulcombe, D.C., 2003. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of *Tomato bushy stunt virus*. *Plant Journal*. 33, 949–956.
79. Waterhouse, P.M., Graham, M.W., Wang, M.B., 1998. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 95, 13959–13964.
80. Waterhouse, P.M., Wang, M.B., Lough, T., 2001. Gene silencing as an adaptive defense against viruses. *Nature*. 411, 834-842.
81. Wiaderkiewicz, R., Walter, Z., Reimschuessel, W., 1986. Sites of methylation of DNA bases by the action of organophosphorus insecticides in vitro. *Acta Biochimica Polonica*. 33, 73-85.
82. Zayed, S.M. & Mahdi, F.M., 1987. Methylation of guanine in vivo by the organophosphorus insecticide methamidophos. *Zeitschrift fur Naturforschung C: Journal of Biosciences*. 42, 17-20.
83. Zhou, Z.Sh., Dell'Orco, M., Saldarelli, P., Turturo, C., Minafra, A., Martelli, G.P., 2006. Identification of an RNA-silencing suppressor in the genome of *Grapevine virus A*. *Journal of General Virology*. 87, 2387-2395.
84. Zrachya, A., Glick, E., Levy, Y., Arazi, T., Citovsky, V., Gafny, Y., 2007. Suppressor of RNA silencing encoded by *Tomato yellow leaf curl virus-Israel*. *Virology*. 358(1), 159-165.

GVB	-SVVPLSDGDVLIIMPKGFQKTHKHAVTGTSAGRISLTFRNGINAPDEGSDKMSEyeethr	754
CNRMV	-MEITLSHGEYILMPRGFQSYKHGVKDTQAGRISLTFRLQSRDLAGKKIPTLNnsnlep	902
GRSPV	-CSLTIGPNEFFEMPRGMQCNYPHGVSNCTPGRVSLTFRRQKLEDDDLIFINPQvpieln	895
ACLSV	-EIIDLRLQDEILMPGGYQKMNKHAVEVASEGRTSVTLRVHKRDFSFEKSLRF-----	847
GLV	-TGFYMEAPKQFMMPDGFQSNHVAHVRECTPGRISATFRRAKIAPGVAGGSADVgsastd	790
BSV	-QYTTLRGNVQFTMPSGFQETHKHAVRNTTAGRVSYTFRRLAKKDESRVIEEVveetkd	859
HLV	-GSVHLRGPQQFEMPAGFQVTHKHSVWGCSRQRESVTFRCLRKSRAIAQSVPASaapell	850
ALV	-SFRVLNGPLQFTMPMGFQADHKHCVRGCTAGRASLTFRCLKRTQLPQAIEVSAtkqsqs	867
CMLV	-NTMELDSGDELLMPEDFQRKFRHGVKSITDGRMSVTLRVHERDFSFEKRF-----	847
CVX	-HKQLLSGPIIYTMPSGFQETHQHSVRSLQKNRLSITFRTSVHCNQEDTLPWHKwlpils	723

(Bratlie&Drabløs, 2005; Mishina&He, 2006)

הערה: אתר ה-AlkB השמור מודגש כולו בצבע אפור. 3 חומצות אמינו המעורבות בקשרי ברזל ופעילות אנזימטית ואשר שמורות בכל ההומולוגים של AlkB מסומנות בחול. חומצות אמינו אחרות השמורות בהומולוגים ויראליים בלבד מסומנות באדום.

נספח 2: רשימת תחלים כללית לבניית שבטים ובדיקתם

הערות ותוספות	רצף 5' → 3'	שימש לבניית/בדיקת שבת	מיקום ברצף (bp)	שם התחל ואוריינטציה
תחל זה כולל רצף הפוך ומשלים לקצה 3' של CP ומכיל את אתר הגבלה <i>Sall</i>	catgtgtcgacTATCTCGACAGC CTGCTC	269	6987-7004	GVA005(-)
תחל זה כולל רצף זהה לקצה 5' של GVA ומכיל אתר הגבלה <i>EcoRI</i>	catgtgaattcGAATATTTAACT TGATTCCC	שימש להגברה של קצה 5' (+) של GVA ושיבוט ל-pGEM- T-easy להכנת הגלאי	1-19	GVA008(+)
תחל זה כולל רצף זהה לקצה 5' של ORF2 ומכיל את אתר הגבלה <i>Avr II</i>	atctgccctaggATATCAGAGTA TAGATAGCAT	252, 269, 256, 260	5313-5333	GVA14(+)
תחל זה כולל רצף זהה לקצה 5' UTR בתוספת T7 RNA Promoter ומכיל אתר הגבלה <i>SpeI</i>	cgttacactagtTAATACGACTC ACTATAGAATATTTAACTTGATT CCC	363	2-20	GVA24(+)
תחל זה כולל רצף זהה לאמצע ORF1	CGTGTCTCATTACCTTCATGAG	338	3433-3455	GVA35(+)
תחל זה כולל רצף ה-Poly T בסוף ה-GVA ומכיל אתר הגבלה <i>Sall</i>	tcagcagtcgactacgtattTTT TTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTTTTTTTTTTT	260, 363	כולל את זנב ה-Poly T בסוף רצף ה-GVA	GVA50(-)
תחל זה כולל רצף הפוך ומשלים ל- <i>mcs</i> בשבת 118 (שנבנה במעבדתינו) ותחילת ORF4, וכולל אתרי הגבלה: <i>ApaI</i> , <i>NotI</i> , <i>SpeI</i> , <i>splI</i> , <i>KspAI</i>	gggccc gttaac gtacg actagt gcggccgc TTGTCTTCAACCCAAGTC	שימש לבדיקת יציבות רצף eGFP בשבטים: 256, 252	6393-6420	GVA51(-)
תחל זה כולל רצף הפוך ומשלים של קצה 3' באתר של <i>AlkB</i> בוירוס GVA	TTTATGGGTTTGCTGCATT	שימש לריצוף מוטציות באתר <i>AlkB</i> בשבת 252	2221-2240	GVA81(-)
תחל זה כולל רצף זהה בתוך אתר של <i>AlkB</i> בוירוס GVA	TTCCACGCCGATGATGAG	שימש לריצוף מוטציות באתר <i>AlkB</i> בשבת 252	2067-2084	GR5M13-2047(+)
תחל זה משמש להגברת רצף ה-eGFP מקצה 5' וזהה לרצף זה	ctctcagatcccaaggaaatATG GTGAGCAAGGGCGAG	,269, 260, 342, 252, 256	1-18	GVA123(+)
תחל זה הפוך ומשלים לקצה 3' של ORF2	ATTTTCCTTGGGATCTGAGAG	252	5687-5706	GVA124(-)
תחל זה משמש להגברת רצף ה-eGFP מקצה 3', הפוך ומשלים לרצף ומכיל אתר הגבלה <i>Not I</i>	aactggcgccgcTTACTTGATC AGCTCGTCC	,256, 260, 342, 252, 269	702-720	GVA125(-)

תחל זה משמש להגברת רצף ה- AlkB מקצה 5', זהה לרצף ומכיל אתר הגבלה <i>SmaI</i>	ctagttcccgggATGGGGGCACGC AAATTGG	שימש להגברת רצף AlkB לצורך ביצוע RT-PCR על cDNA של הפקות RNA מצמחים מודבקים בשבטים המכילים מוטציות באתר זה	1842-1860	GVA165(+)
תחל זה משמש להגברת רצף ה- AlkB מקצה 3', הפוך ומשלים לרצף ומכיל אתר הגבלה <i>Sall</i>	tgacagtcgacCTAGTCCAGTGC TGCTACATC	שימש להגברת רצף AlkB לצורך ביצוע RT-PCR על cDNA של הפקות RNA מצמחים מודבקים בשבטים המכילים מוטציות באתר זה	2346-2363	GVA166(-)
תחל זה הפוך ומשלים לקצה 5' של ORF2 ומכיל אתר הגבלה <i>Kpn21</i>	cacgttccggaCAACCAACTCTG TACAACTTTG	338	5185-5206	GVA177(-)
תחל זה משמש להגברת קצה 5' של ORF2 וזהה לרצף ומכיל אתר הגבלה <i>SmaI</i>	ctagttcccgggATGACATCGCAA AGTTGTA	369	5176-5194	GVA181(+)
תחל זה משמש להגברת קצה 3' של ORF2, בעל רצף הפוך ומשלים ומכיל אתר הגבלה <i>Sall</i>	tgacagtcgacTTAATTTCTTG GGATCTG	352	5691-5709	GVA182(-)
תחל זה משמש להגברת רצף ה- eGFP מקצה 3', הפוך ומשלים לרצף ומכיל אתר הגבלה <i>Sall</i>	aactggtcgacTTACTTGTACAG CTCGTCC	369	702-720	GFP197(-)

רצפים באותיות קטנות: רצף לא ספציפי בתחל

רצפים באותיות קטנות מודגשים בקו תחתון: אתרי חיתוך לאנוימי הגבלה

רצפים באותיות גדולות: רצף ספציפי של GVA

נספח 3: רשימת תחלים ששימשו ליצירת מוטציות נקודתיות באתר ה-AlkB

רצף 5' → 3'	מיקום ברצף (bp) GVA	שם התחל ואוריינטציה	מוטציה ומיקומה
<i>CACCTCACTCACTAACGGGGGCTTG</i> TAGTATCACTCTG	2249-2285	GVA87(+)	ח"א R1 CGA→GCT 756 aa
CCTTACTTATGACTCCATC	2652-2670	GVA75(-)	
<i>CCCGTTAGTGAGTGAGGTG</i>	2249-2267	GVA88(-)	
GCAAGCCGCTATACTTGAGA	991-1010	GR5M13-1042(+)	
<i>CGATGTAGTATCACTCTGGCTAACAAGACAGTGGAC</i>	2268-2304	GVA89(+)	ח"א R2 AGG→GCT 762 aa
CCTTACTTATGACTCCATC	2652-2670	GVA75(-)	
<i>CAGAGTGATACTACATCG</i>	2268-2285	GVA90(-)	
GCAAGCCGCTATACTTGAGA	991-1010	GR5M13-1042(+)	
<i>CAATGGGCGCAGGAATGCTCAAACCCATAAACAC</i>	2209-2243	GVA85(+)	ח"א Q CAG→GCT 742 aa
CCTTACTTATGACTCCATC	2652-2670	GVA75(-)	
<i>CATTCCTGCGCCCATTG</i>	2209-2025	GVA86(-)	
GCAAGCCGCTATACTTGAGA	991-1010	GR5M13-1042(+)	
<i>CAGTGGACTACGAGGCAGCTACGGAGGCAATCAATTC</i>	2296-2333	GVA95(+)	ח"א R3 AGG→GCT 771 aa
CCTTACTTATGACTCCATC	2652-2670	GVA75(-)	
<i>TGCCCTCGTAGTCCACTG</i>	2296-2312	GVA96(-)	
GCAAGCCGCTATACTTGAGA	991-1010	GR5M13-1042(+)	
<i>CCGAGTCAAAAAGATTAGCTGATGGTGATGTGTTC</i>	2173-2208	GVA93(+)	ח"א K AAG→GCT 730 aa
CCTTACTTATGACTCCATC	2652-2670	GVA75(-)	
<i>TAATCTTTTTGACTCGG</i>	2173-2189	GVA94(-)	
GCAAGCCGCTATACTTGAGA	991-1010	GR5M13-1042(+)	
<i>GACGGTGAATTTGAATGGGGCTGCAATCTTTGAGTTG</i>	2114-2150	GVA91(+)	ח"א E GAA→GCT 711 aa
CCTTACTTATGACTCCATC	2652-2670	GVA75(-)	
<i>CCCATTCAAATTCACCGTC</i>	2114-2132	GVA92(-)	
GCAAGCCGCTATACTTGAGA	991-1010	GR5M13-1042(+)	
<i>GGGTGGCAGTATCAATTTCCACGCCGCTGATGAGCCCTGC</i>	2051-2090	GVA78(+)	ח"א D GAT→GCT 692 aa
CCTTACTTATGACTCCATC	2652-2670	GVA75(-)	
<i>GAAATTGATACTGCCACCC</i>	2051-2075	GVA79(-)	
GCAAGCCGCTATACTTGAGA	991-1010	GR5M13-1042(+)	
<i>GGGTGGCAGTATCAATTTGCTGCCGATGATGAGCCC</i>	2051-2087	GVA77(+)	ח"א H1 CAC→GCT 690 aa
CCTTACTTATGACTCCATC	2652-2670	GVA75(-)	
<i>GAAATTGATACTGCCACCC</i>	2051-2069	GVA79(-)	
GCAAGCCGCTATACTTGAGA	991-1010	GR5M13-1042(+)	
<i>CAGCAAACCCATAAAGCTAAGGTCACCTCACTC</i>	2226-2258	GVA80(+)	ח"א H2 CAC→GCT 747 aa
CCTTACTTATGACTCCATC	2652-2670	GVA75(-)	
<i>TTTATGGGTTTGCTGCATTC</i>	2221-2240	GVA81(-)	
GCAAGCCGCTATACTTGAGA	991-1010	GR5M13-1042(+)	

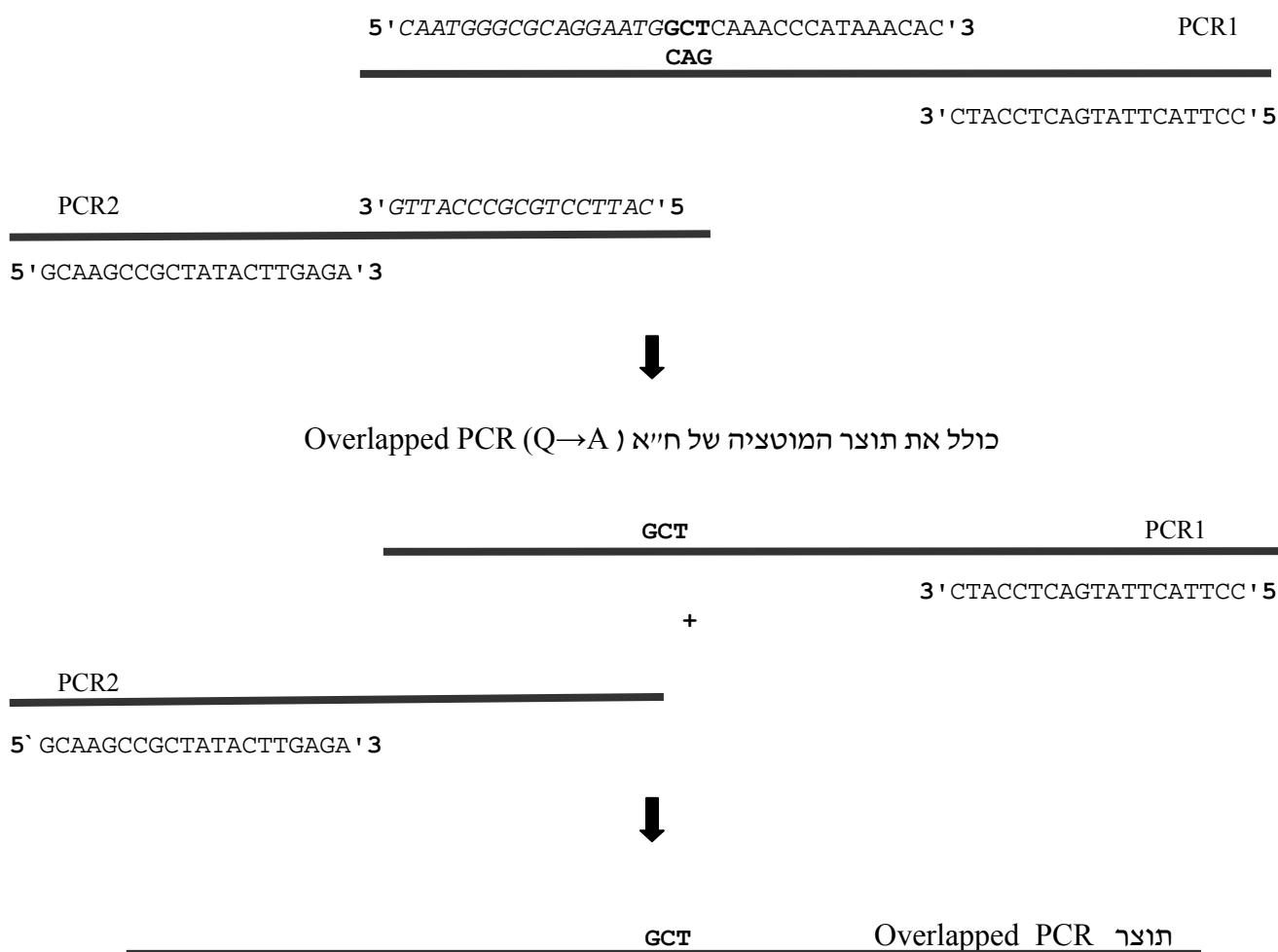
הרצף בכתב *Italic* מסמל רצף חופף בין 2 תחלים בריאקציית Overlapped PCR

הרצף המודגש בשחור מסמן ח"א מקורית ששונתה לח"א אלנין (GCT)

הערה: כל התחלים הספציפיים אשר שימשו לעבודה זו סונתזו ב-IDT DNA Technologies.

נספח 4: דוגמא ליצירת מוטציה נקודתית בחומצת אמינו Q באתר AlkB

רצף התחל 5'→3'	שם התחל ואוריינטציה	
5' CAATGGGCGCAGGAATGGCTCAAACCCATAAACAC ' 3	GVA85(+)	ח"א Q CAG→GCT 742aa
5' CCTTACTTATGACTCCATC ' 3	GVA75(-)	
5' CATTCCCTGCGCCCATG ' 3	GVA86(-)	
5' GCAAGCCGCTATACTTGAGA ' 3	GR5M13-1042(+)	



Abstract

Similar to animals, plants have evolved protection mechanisms from viral attacks. One of the mechanisms is gene silencing. In general, there are two kinds of processes that affect the expression of a certain gene: 1) processes that regulate transcription - Transcriptional Gene Silencing (TGS), 2) processes that act after the transcription - Post Transcriptional Gene Silencing (PTGS). In my research I investigated the process of PTGS which is caused by an early degradation of RNA transcribed in nucleus. During viral infection, in addition to gene silencing, another process occurs, suppression of gene silencing by viral proteins. Those proteins function as RNA silencing suppressors (RSSs) in addition to their other roles in viral infection. Today are known a variety of RSSs encoded by viruses of DNA and RNA of plants, insects and animals. Viruses have developed RSSs that are different from one virus to another and their functionality directed to various stages in the RNA silencing process.

In addition, the DNA of all living organisms is constantly exposed to damages caused by aberrant methylation- the addition of CH₃ groups, which can have profound effects ranging from the induction of mutations to cell death and concomitant genome degradation. Cells are equipped with a variety of proteins which have evolved to solve this problem and to repair different chemical modifications of DNA. One of those is the AlkB. The AlkB protein was discovered in *E.coli* in 1983 and since then has been thought to be involved in repair of alkylation damages in DNA and RNA. AlkB-related domains were identified in more than 20 plant RNA viruses, among them GVA that infects grapevine. Because methylation is detrimental to RNA functions in translation and replication, some viruses acquired AlkB domain that is believed to repair methylated nucleotides in the template RNA during replication or transcription. Intriguing possibility is a role of viral AlkB domains in suppression of RNA silencing.

Grapevine is an important crop for food and wine industry. Vegetative growth of the grapevine, grafting on stocks and international distribution of the propagation materials caused to a wide distribution of viral diseases that cause to a reduction in yield and quality of the crop all over the world. There are known at least 60 viruses that can infect grapevine. A rugose wood complex disease (RW) is amongst one of grapevine main viral diseases. RW is a complex of four diseases which is caused mainly by vitiviruses. GVA is a member of the genus *Vitivirus* and the *Flexiviridae* family. The complete nucleotide sequence of GVA has been determined. The virus has a single-

stranded RNA genome of about 7.4 kb. The genome consists of five open reading frames (ORFs) that encode to at least 5 proteins. ORF1 encodes a polypeptide with conserved motifs of replication-related proteins (helicase and RdRp) and contains AlkB domain and ORF5 encodes a small protein of 10 kDa. This protein interacts with nucleic acids in a sequence-non-specific manner. Recently, it was suggested that the GVA p10 possesses activity as a RSS in addition to its significance and influence on viral pathogenicity and infection of grapevine.

In addition to its natural woody host, grapevine, GVA is capable of infecting a convenient herbaceous host *Nicotiana benthamiana* plants and protoplasts. In my research I utilized *N. benthamiana* plants in order to achieve two aims:

- 1) Characterization of GVA sequences involved in suppression of RNA gene silencing.
- 2) To reveal functions of the virus-coded homolog of AlkB in GVA pathogenesis.

In order to achieve those aims I constructed an infectious GVA clone tagged with the eGFP reporter gene (pGVA-GFP-252). The eGFP-tagged GVA RNA transcribed from pGVA-GFP-252 was examined for its ability to replicate and to express eGFP in *N. benthamiana* protoplasts and plants. This clone was afterward used for construction of a mini-GVA replicon (pGVA-GFP-269), which was used as a tool to trigger plant gene silencing and to characterize sequences responsible for suppression of PTGS. The results obtained from my research indicated that the genomic GVA RNA induced suppression of gene silencing stronger than that induced by p10 alone. This indicates that for efficient activity of p10, another factor/s within the GVA genome is (are) required.

We examined p10 activity and other sequences within GVA genome as RSSs with the use of the GVA-GFP-minireplicon system, which apparently appeared to be an efficient system to examine the ability of candidate viral genes to suppress the plant silencing machinery. We found that the activity of p10 as a RSS was enhanced by a component, or multi-components, provided by the GVA-GFP-minireplicon, which might be the product/s or sequence/s of ORF1, ORF2, in cis or by replication of GVA. As a future purpose, we would like to determine the sequence/product within the minireplicon that is/are responsible for enhancement of the p10 activity as a RSS.

Experiments conducted in my work showed siRNA reduction in pGVA-GFP-269 system with addition of p10. This result would suggest that p10 activity as a RSS occurs

prior the step in which the Dicer digests the dsRNA. If this is the case, then it is believed that p10, together with another viral factor(s), binds to viral dsRNA and prevents the Dicer from digesting the viral dsRNA.

Later on, we decided to examine the possibility that AlkB is the component within the pGVA-GFP-269 minireplicon that enhances the activity of p10 as a RSS. AlkB-related domains were identified in more than 20 plant RNA viruses (including GVA) and revealed several conservative amino acids. Mutation analysis of the AlkB function in GVA infection were conducted. Eight alanine-scanning mutations were introduced into the AlkB-coding region of the eGFP-tagged GVA (pGVA-GFP-252).

Three of these mutations were directed to each of the amino acid residues that are invariant among all AlkB homologues including viral ones. Three additional mutations replaced residues that are invariant among all viral AlkB domains but that are not conserved among nonviral AlkB homologues. Three other mutations were directed to non-conserved amino acid residues among AlkB homologues, as a control. Mutation at **H₁** residue abolished the infectivity of the virus and its replication within the inoculated plant and protoplasts. We assume that this residue interrupts either replicase or AlkB function. Mutation at **R₂** residue caused a decrease in all parameters that we examined, suggesting that this residue is important for either replicase or AlkB function. Mutation at **Q** residue, on one hand didn't show any difference in viral replication in comparison to the positive control (pGVA-GFP-252), however, on the other hand this mutation caused very mild symptoms. Such mutated-virus can be used in the future for developing GVA-based vectors for expression of foreign genes within plants without induction of disease symptoms. Mutations that were directed to non-conserved amino acid residues along AlkB homologues also had an affect, and it is believed that these mutations resulted in non-functional replicase proteins. Alternatively, it is possible that these mutations affected the the structure of the AlkB domain and thereby affected the enzymatic activity of AlkB. Nevertheless, further research regarding biochemical analysis of the demethylation activity of the recombinant GVA AlkB is needed to be done. We propose to overexpress GVA AlkB mutants in *E. coli*, to isolate the resulting recombinant proteins and to examine their demethylation activity using available *in vitro* assays.

**This work was carried out under the supervision of
Dr. Munir Mawassi
At the S. Tolkowsky Laboratory,
Department of Plant Pathology, The Virology Unit,
Agricultural Research Organization,
The Volcani Center,
Bet-Dagan.**

**Characterization of *Grapevine virus A*
sequences involved in suppression of
RNA silencing and pathogenicity**

M. Sc. Thesis

**Submitted to the Inter-Faculty Graduate Biotechnology
Program**

Of the Hebrew University of Jerusalem

For the degree of

“Master of Science in Biotechnology”

by

Stukalov Svetlana

September, 2007

Rehovot