

**לימוד האזורים בחלבון המעטפת של וירוס צהבון
האמיר הדרושים לאינטראקציה שלו עם עצמו
במהלך בניית קופסית הווירוס**

נוגה יעקב

עבודה זו מוגשת כחלק מהדרישות לקבלת תואר מוסמך בפקולטה
למדעי החיים אוניברסיטת בר-אילן

רמת גן

תשס"ו

עבודה זו נעשתה בהדרכתם של
פרופסור ידידיה גפני,
מינהל המחקר החקלאי, בית דגן
ודר' רפי פרל-טרבס,
הפקולטה למדעי החיים, אוניברסיטת בר-אילן

תודה

ברצוני להודות לפרופסור ידידיה גפני על העזרה והתמיכה הרבה לאורך כל הדרך, הייעוץ המדעי והסובלנות.

תודה לדר' רפי פרל-טרבס על העזרה והייעוץ המדעי.

תודה ליעל לוי על העזרה הרבה התמיכה לאורך כל הדרך ובמיוחד על החברות.

תודה לחברי המעבדה קרין, אפרת, אבי, הילה ולאוקסנה על העזרה במהלך העבודה, העצות החכמות ובעיקר על החברות.

תודה לאנה מט ממעבדתו של דר' דוד גדעוני על העזרה בעבודה עם פרוטופלסטים.

תודה לאדי בלאוסוב בעבודה בתחום המיקרוסקופ.

תודה למשפחתי שתמכו ועודדו אותי לאורך כל הדרך, להורי מירב וגדעון ולאחיותיי ציונית ורוני.

תוכן העניינים

1-2	רשימת קיצורים	1
3-4	תקציר	2
5	סקירת ספרות	3
5	וירוס צהבון האמיר של העגבנייה	3.1
5-6	מחלת וירוס צהבון האמיר	3.1.1
6-7	משפחת וירוסי הג'מיני	3.1.2
8	מבנה הגנום של וירוס צהבון האמיר של העגבנייה	3.1.3
9-10	הכפלת וירוסי הג'מיני	3.1.4
10-12	חלבון המעטפת של וירוס צהבון האמיר	3.1.5
13-14	כנימת עש הטבק	3.2
14	חלבון ה-GroEL	3.3
15-16	תנועת הווירוס בצמח	3.4
17	מעבר של מטבוליטים בין הגרעין והציטופלסמה	3.5
18-20	מנגנון חדירת חלבונים לגרעין התא	3.5.1
21	רצפי הכניסה לגרעין-NLS	3.5.2
22	חדירה של וירוסים לגרעין התא	3.7
23	הרצפטור הציטופלסמטי Karyopherin	3.8
24	בידוד הגן ל-Karyopherin $\alpha 1$ בעגבנייה	3.8.1
25	מטרת המחקר	4
26	שיטות וחומרים	5
26-27	רשימת חומרים	5.1
28-32	בופרים, תמיסות ומצעים	5.2
33-43	שיטות מולקולריות ואנליזות ביוכימיות	5.3
44-46	שיטות ל-Two Hybrid System	5.4
47	טרנספורמציה ברת חלוף של DNA לפרוטופלסטים	5.5
48	תוצאות	6
48-49	יצירת מוטציות בחלבון המעטפת	6.1
51-63	תוצאות האינטראקציה של חלבון המעטפת במערכת ה-Two Hybrid	6.2
64-77	תוצאות האינטראקציה של חלבון המעטפת בשיטת ה-FRET	6.3
79-81	דיון	7
82-90	רשימת ספרות	8
91-92	תקציר לועזי	9

1. רשימת קיצורים

ACMV	African cassava mosaic virus
Amp	Ampiciline
CaMV	Cauliflower Mosaic Virus
cDNA	complementary DNA
CFP	Cyan florescent protein
CP	Coat protein
CMV	Cytomegalovirus Cucumber mosaic virus
DNA	Deoxyribonucleic acid
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
GDP	Guanosine diphosphate
GTP	Guanosine triphosphate
GUS	Glucuronidase
his	Histidine
ICMV	Indian cassava mosaic virus
IR	Intergenic region
Kb	Kilo base
KDa	Kilo Dalton
leu	Leucine
M	Molar
mg	Milligram
µg	Microgram
µl	microliter
ml	milliliter
NE	Nuclear envelop
MSV	Maize Streak Virus
NES	Nuclear Export Signal
NLS	Nuclear localization signal
nm	Nanometer

NPC	Nuclear pore complex
OD	Optical Density
ORF	Open Reading Frame
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDV	Prune dwarf virus
RdRP	RNA dependent RNA Polymerase
RNA	Ribonucleic Acid
rpm	Round per minutes
SqLCV	Squash Leaf Curl Virus
ssDNA	Single stranded DNA
SV-40	simian virus 40
TSWV	Tomato Spotted Wilt Virus
trp	Tryptophan
TYLCV	Tomato yellow leaf curl virus
ura	Uracil
YFP	Yellow florescent protein

2. תקציר

מחלת צהבון האמיר של העגבנייה (Tomato yellow leaf curl disease-TYLCD) הנגרמת על ידי וירוס צהבון האמיר (TYLCV-Tomato yellow leaf curl virus) גורמת לנזקים רבים וחמורים לגידול העגבנייה התרבותית (*Solanum lycopersicon*) בישראל ובאזורים טרופיים וסובטרופיים אחרים בעולם. המחלה מועברת ע"י כנימת עש הטבק (*Bemisia tabaci*).

חלבון המעטפת (CP-coat protein) אשר מקודד ע"י הגן V1 ממלא מספר תפקידים חשובים בתיפקוד הווירוס: בראש ובראשונה הוא משמש לבניין קופסית הווירוס אשר בנויה מ-110 העתקים של חלבון זה. כמו כן הוא עוזר לתנועת הווירוס מתא לתא בצמח, בהולכה לגרעין (על מנת להכפיל את גנום הווירוס ולשעתק גנום של הווירוס), וביציאה מהגרעין. בנוסף לתפקידים שהוזכרו, חלבון המעטפת מאפשר רכישה של הווירוס ע"י כנימת עש הטבק, וכן מגן על גנום הווירוס מפני עיכול ופירוק בהמולימפה של הכנימה, ע"י קישור לחלבון GroEL המיוצר ע"י חיידק אנדוסימביוטי בכנימת עש הטבק.

עבודת המחקר שלי עוסקת בהבנת תהליך בניית קופסית הווירוס של וירוס צהבון האמיר של העגבנייה. הדבר נעשה ע"י לימוד ההתקשרות של מולקולות חלבון המעטפת זו עם זו, וחיפוש אחר האזורים וחומצות האמינו המעורבות בתהליך בניית הקופסית. עבודתי ממשיכה מחקר קודם שהתבצע במעבדתנו ע"י Hallan, שבדק את האינטראקציה של חלבון המעטפת עם עצמו ע"י יצירת חסרים ומוטציות נקודתיות. נמצא שהקצה האמיני והקצה הקרבוקסילי של חלבון המעטפת יוצרים אינטראקציה "ראש-זנב". עבודת המחקר שלי באה לבדוק באופן מפורט ומדויק יותר את תהליך בניית קופסית הווירוס.

עבודת המחקר בוצעה בשתי מערכות שונות: מערכת שמרית- **Yeast Two Hybrid System**, ומערכת צמחית-פרוטופלסטים של טבק.

לשם כך תכננתי מוטציות נקודתיות בקצה האמיני של חלבון המעטפת. יצרתי שלוש מוטציות נקודתיות בשלוש חומצות אמינו חיוביות, המהוות חלק מסיגנל הכניסה לגרעין. כמו כן יצרתי חסרים בקצה האמיני ובקצה הקרבוקסילי, שכן בעבודה הקודמת התברר, ששני אזורים אלו מעורבים באינטראקציה בין חלבוני המעטפת. בדקתי את הקישור בין חלבוני מעטפת מוטנטים לבין חלבון המעטפת התקין ובינם לבין עצמם. כמו כן נבחן קישורם לשני חלבונים נוספים, המעורבים בתהליך ההדבקה של וירוס צהבון האמיר של העגבנייה. החלבונים הינם: Karyopherin $\alpha 1$ ו-GroEL (חלבונים אלו תורמים להמשך מחזור חיי הווירוס). Karyopherin $\alpha 1$ מכניס את גנום הווירוס לתוך גרעין התא ומאפשר לו להכפיל את עצמו, ואילו החלבון GroEL מגן על הווירוס מפני עיכול ופירוק בהמולימפה של הכנימה במהלך ה"רכישה" של הווירוס על ידי הכנימה והעברתו לצמח אחר.

במערכת השמרית האינטראקציה נבדקה ע"י ביטוי של שני גנים מדווחים. האחד בשמר, LUE2 המאפשר סינתזה של חומצה אמינית לאוצין, והשני בפלסמיד, *Lac z* המקודד לאנזים β Galactosidase. במערכת זו נבדקו מוטציות נקודתיות ומוטציות חסר. האינטראקציות שנצפו

מוכיחות שהאינטראקציה בין חלבון המעטפת לעצמו היא בין קצה אמיני של מולקולת חלבון אחת לבין קצה קרבוקסילי של האחרת. כמו כן נמצאה מוטציה נקודתית בחלבון המעטפת (החלפה של ארגנין ללאוצין בעמדה 19) שהתבררה כמוטציה קריטית, וכנראה גורמת לשינוי במבנה החלבון. כתוצאה ממנה נמנע מחלבון המעטפת ליצור אינטראקציה עם עצמו, ועם שני החלבונים הנוספים שנבדקו. מוטציה זו עלולה למנוע את הרכישה של הווירוס על ידי הכנימה ובכך תמנע את העברת הווירוס מצמח נגוע לצמח בריא. יידרשו מחקרים נוספים על מנת לבדוק הנחות אלו.

גישה שנייה שנקטתי היא שיטת ה-FRET (fluorescence resonance energy transfer). בשיטה זו בוחנים אינטראקציות בין שני חלבונים ע"י שימוש בפלסמידים, המכילים גנים לקידוד חלבונים פלורוסנטים, שאליהם מאוחדים החלבונים הנבדקים. קשר בין שני החלבונים יגרום להעברת אנרגיה עירור מחלבון פלואורסנטי אחד למשנהו. בשיטה זו נבדקו רק חלק מהאינטראקציות. תוצאות הניסויים מראים שיש אינטראקציה בין חלבון המעטפת לבין עצמו, וכך בין חלבון המעטפת לבין הרצפטור הציטופלסמתי Karyopherin $\alpha 1$ גם במערכת הצמחית.

3. סקירת ספרות

3.1 וירוס צהבון האמיר

3.1.1 מחלת צהבון האמיר של העגבנייה

מחלת צהבון האמיר של העגבנייה (Tomato yellow leaf curl disease –TYLCD) גורמת לנזקים חמורים לגידול העגבנייה התרבותית (*Solanum lycopersicon*) בישראל ובאזורים טרופיים וסובטרופיים אחרים בעולם (Moriones and Navas- Castillo 2000).

גורם המחלה הוא וירוס צהבון האמיר (TYLCV-*Tomato yellow leaf curl virus*) המועבר על-ידי כנימת עש הטבק (*Bemisia tabaci*) (Cohen and Harpaz 1964). הסימפטומים למחלה נראים לעין כ-2-3 שבועות מזמן ההדבקה (Gafni 2003) והם מתבטאים בצמחי עגבנייה קטנים, נמוכים ומנוונים בהשוואה לצמחים בריאים, הענפים מוטים כלפי מעלה והעלעלים קטנים, מצהיבים ומעוותים (ראה תמונה מס' 1), אך עיקר הנזק מתבטא במיעוט או העדר פריחה ומכאן העדר פרי ופגיעה ביבול (Cohen and Nitzany 1966).

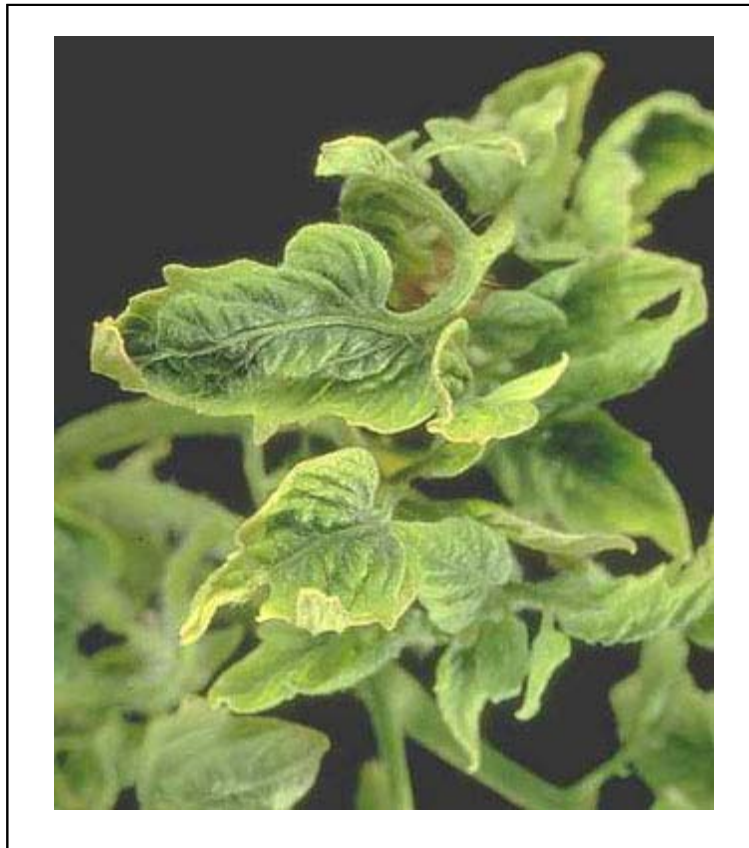
וירוס צהבון האמיר משתייך לקבוצת וירוסי צמחים המכונה וירוסי הג'מיני (Geminiviruses). הדיווחים הראשונים של נזק הנגרם ע"י נגיף זה הנם מישראל מסוף שנות השלושים של המאה ה-20 (Avidov, 1940). החל משנות הששים החלו להופיע דיווחים על נזקים גם ממספר מדינות במזרח התיכון (Cohen and Harpaz 1964).

עם השנים התפשטה המחלה, והרס בגידולי עגבניות שנגרם ע"י ה-TYLCV דווח מהמזרח התיכון ועד הרחוק, אפריקה, אירופה, האיים הקריביים ומרכז אמריקה (Czosnek and Laterrot 1997).

לאחרונה דווח על התפשטות הנגיף ביפן (Kato *et al.*, 1998), מקסיקו (Ascencio-Ibanez *et al.*, 1999), בפלורידה (Polston *et al.*, 1999), וג'ורג'יה שבארצות הברית של אמריקה (Momol *et al.*, 1999), בפורטו ריקו (Brid *et al.*, 2001) ובצפון קרוליינה שבארה"ב (Polston *et al.*, 2002). נגיף צהבון האמיר הולך ומתפשט לאזורים רבים בעולם ואיתו הנזקים הכלליים הרבים להם הוא גורם.

כיום ישנם מספר זני עגבנייה העמידים לוירוס צהבון האמיר, בניסיון לקבל זנים עמידים יצרו הכלאות עם מספר זני בר שגילו עמידות לוירוס. כתוצאה מכך ישנם כמה קווים עמידים של עגבניות מסחריות כמו למשל: TY20 (Pilowsky and Cohen 1990), (Hazera Genetics 8484) (S&G, Enkhuizen, Netherlands) Fiona Ltd., Brurim, Israel).

במקביל נעשו גם ניסיונות ליצור עמידות טרנסגנית לוירוס, על ידי החדרת גנים מהוירוס אל הצמח, למשל החדרה של חלבון המעטפת (Kunik *et al.*, 1994) או לחילופין החדרה של חלבון הרפליקציה (Y. Yang *et al.*, 2004) ההתנגדות הקיימת היום לצמחים טרנסגניים בעולם מונעת את השימוש בצמחים עמידים אלו, ורק הצמחים שהתקבלו בהכלאות משמשים את החקלאיים.



תמונה מס' 1 : צמח עגבנייה נגוע במחלת צהבון האמיר המבטא סימפטומים האופייניים למחלה : הצהבת העלים וקיפולם.

התמונה נלקחה מאתר האינטראנט : <http://www.avrdc.org/LC/tomato/tylev03.html>

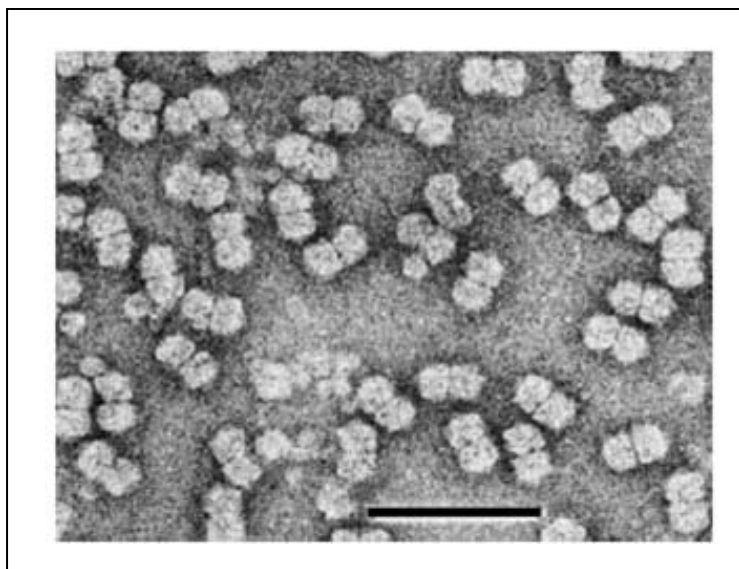
3.1.2 משפחת וירוסי הג'מיני (Geminiviruses)

וירוס צהבון האמיר משתייך למשפחת נגיפים צמחיים המכונה geminiviruses . וירוסים שונים מקבוצה זו פוגעים בצורה קשה במגוון צמחים בעלי חשיבות כלכלית רבה. כולם מאופיינים בכך שהם מועברים באופן בלעדי ע"י החרקים כנימת עש הטבק וציקדות (Cohen and Harpaz 1964). כמו כן מייחד את הוירוסים מבנה קופסית הוירוס בעל צורה איקוזהדרית (מבנה תלת מימדי של 20 פאות משולשות) כפולה דמוי אגוז אדמה, המכיל בתוכו גנום DNA חד-גדילי מעגלי סגור שגודלו נע סביב ל- 2.8kb, (תמונות מ'ס 2 ו-3).

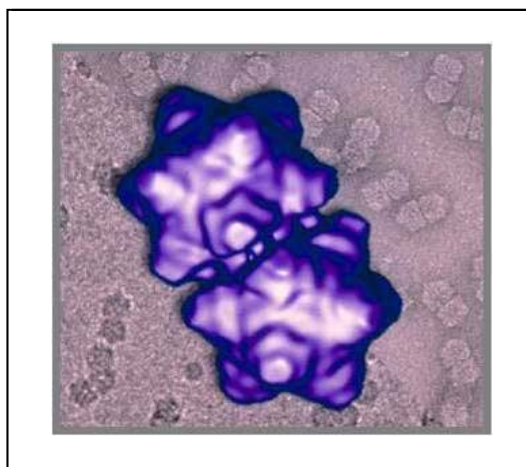
וירוסי הג'מיני מתחלקים ל-4 קבוצות על בסיס טווח הפונדקאים שלהם, הווקטור המעביר אותם ומבנה הגנום (Rybicki *et al.*, 2000). טווח הפונדקאים של וירוסי הג'מיני רחב והוא כולל צמחים חד-ודו-פסיגיים. כדי לחדור לצמח הוירוסים משתמשים באחד משני וקטורים, כנימת עש הטבק (למשל, וירוס צהבון האמיר) או ציקדות.

ארבעת קבוצות הג'מיני וירוסים הינן : Begomovirus, Mastrevirus, Curtovirus, Topocuvirus . הגנום של וירוסים המשתייכים לקבוצת ה-Begomovirus בנוי בדרך כלל משתי מולקולות DNA חד גדיליות סגורות הקרויות A ו-B. וירוס צהבון האמיר אשר משתייך לקבוצה זו, הוא חריג

בהיותו בעל גנום אחד בלבד, אך בגלל העברתו על ידי כנימת עש הטבק ובהיותו וירוס של דו פסיגיים, הוא שייך לקבוצה זו. שלושת הקבוצות האחרות הן בעלות גנום יחיד. תהליך ההכפלה של הווירוס מתרחש בגרעיני תאים צמחיים לא מתחלקים, מה שמחייב מנגנון המאפשר חדירת DNA ויראלי דרך מעטפת הגרעין.



תמונה מס' 2 : אלקטרומיקרוגרף של חלקיקי וירוס צהבון האמיר (TYLCV) קנה מידה = 100 nm, (Gafni 2003).



תמונה מס' 3 : מודל המתאר את מבנה קופסית הווירוס, מבנה בעל צורה איקוזהדרית (מבנה תלת מימדי של 20 פאות משולשות) כפולה דמוי אגוז אדמה, המכיל בתוכו גנום DNA חד-גדילי מעגלי סגור שגודלו נע סביב ל- 2.8kb, (Zhang *et al.*).

3.1.3 מבנה הגנום של וירוס צהבון האמיר של העגבנייה

נגיפי ה-TYLCV הם בעלי גנום הכולל 6 מסגרות קריאה, אשר חופפות באופן חלקי זו את זו ומאורגנות בשתי יחידות שעתוק נפרדות דו-כיווניות המופרדות ע"י intergenic region (IR) של לפחות 300 נוקליאוטידים (Rochester *et al.*, 1994) (תמונה מ'ס 4). בגדיל האחד של גנום הווירוס ישנן שתי מסגרות קריאה חופפות V1 ו-V2, ובגדיל המשלים ישנן מסגרות קריאה C1-C4 אשר חופפות באופן חלקי, ORF C4 נכלל בתוך ORF C1. החלבונים המקודדים ע"י מסגרות אלו הינם:

ORF V1 - מקודד לחלבון המעטפת (CP) אשר אחראי על אריזת הגנום, הולכתו לגרעין ותנועת הווירוס בתוך הצמח ומאפשר רכישה ע"י הכנימה.

ORF V2 - חלבון זה משפעל את שעתוק הגנים V1, ו-C4, אשר מעורבים ביצירת הסימפטומים ובתנועת הווירוס בצמח, (Rojas *et al.*, 2001).

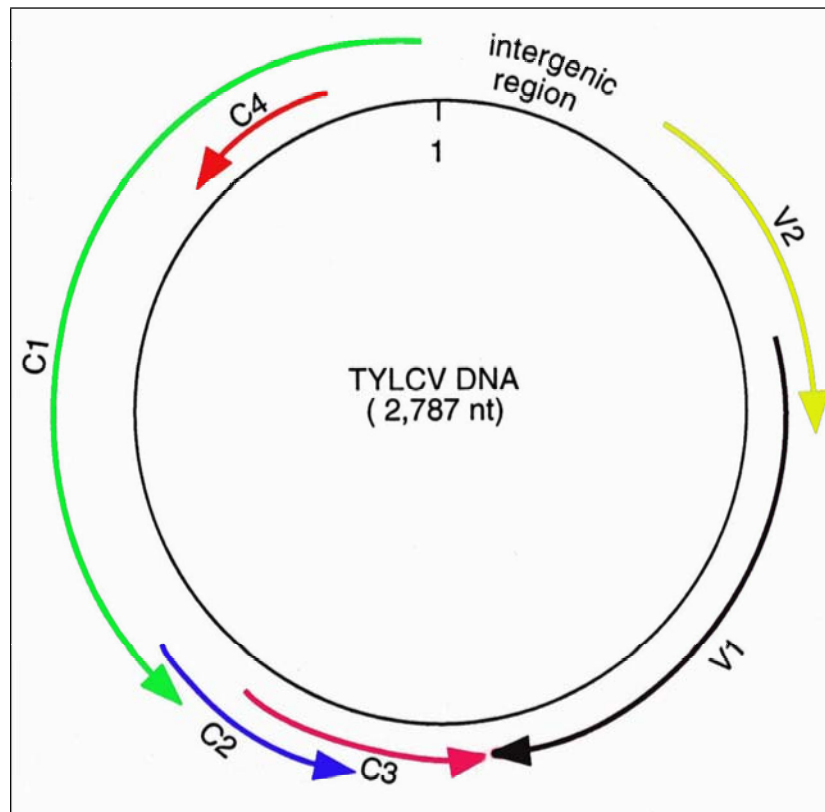
ORF C1 - מקודד לחלבון ההכפלה (Rep), איננו משמש כרפליקאז אך חיוני להכפלה, לאחרונה התברר שחלבון זה יוצר אינטראקציה עם חלבון המעטפת וייתכן שחלבון המעטפת מעורב במנגנון ההכפלה של גנום הווירוס (Malik *et al.*, 2005).

ORF C2 - תורם לפתוגניות של הווירוס, ולאחרונה התגלה שהוא מתפקד כמעכב של השתקה (Van Wezel *et al.*, 2002). כמו כן התברר שמוטציה ב-NLS (Nuclear localization signal) של חלבון זה גורמת לעיכוב מערכת ההשתקה של הצמח וביצירת נמק בצמח (Dong *et al.*, 2003).

ORF C3 - חלבון מגביר הכפלה, מגיב עם חלבון C1 ומגביר הצטברות של דני"א נגיפי.

ORF C4 - חלבון המעורב בתנועת הווירוס מתא לתא (Rojas *et al.*, 2001).

אזורי ה-IR אינם מקודדים לחלבונים אך כוללים גורמי מפתח הקשורים בהכפלה ושעתוק של הגנום הנגיפי (Jupin *et al.*, 1994).



תמונה מספר 4: סכמת מבנה הגנום של וירוס צהבון האמיר של העגבנייה, (Gafni 2003).

3.1.4 הכפלת וירוסי הג'מיני

תהליך ההכפלה של הוורוס מתרחש בגרעין התא המאכסן דרך תוצר ביניים (RF Replicating Form), במנגנון הסליל הנפרם (Rolling Circle), (Heyraud *et al.*, 1993). תחילתו של תהליך זה בסינתזת הגדיל המשלים. כל סינתזת הגדיל המשלים מתבצעת על-ידי חלבוני הצמח הפונדקאי, ולכן החדרה מלאכותית של DNA הוורוס לבד לגרעין התא המאכסן עדיין תגרום להדבקה (Harison 1985).

לחלבון הרפליקציה הויראלי (C1) פעילויות שונות (Orozco *et al.*, 1997), החלבון נקשר לאזור מסוים ב-IR (Intergenic Region). IR הינו רצף של לפחות 300 נוקליאוטידים בתוך הגנום של הוורוס אשר אינו מקודד לאף גן (תמונה מס' 4) (Arguello-Astonga *et al.*, 1994). תחילת תהליך הרפליקציה ב-ORI הממוקם גם הוא ב-IR. לחלבון הרפליקציה תפקיד חשוב גם בסוף תהליך הרפליקציה - הוא גורם לחיתוך ושחרור של DNA חד-גדילי ולסגירתו לצורה מעגלית. DNA זה יתעטף בחלבון מעטפת וימשיך את דרכו ביציאה מגרעין התא לתאים שכנים ובכך יגרום להדבקה כל הצמח. לפי ממצאים אחרונים שיתוארו בהמשך, ייתכן שחלבון המעטפת של וירוס צהבון האמיר משתתף בהכפלת גנום הוורוס ומשפיע על רמות ה-ssDNA.

לאחרונה התברר, שחלבון המעטפת של *Mung bean yellow mosaic India virus* שאף הוא וירוס ממשפחת ה-Begomoviruses, יוצר אינטראקציה עם חלבון הרפליקציה, וע"י כך שולט בהכפלה של גנום הווירוס. הדבר יכול להסביר את התופעה שמוטציות באזור ה-NLS בחלבון המעטפת של וירוס SqLCV (Qin et al., 1998) גרמו לירידה ברמת ה-ssDNA (Malik et al., 2005).

3.1.5 חלבון המעטפת של וירוס צהבון האמיר

חלבון המעטפת של וירוס צהבון האמיר מכיל 260 חומצות אמינו, מקודד ע"י הגן V1 (תמונה מס' 4) וגודלו כ- 30 KDa. החלבון עשיר בחומצות אמינו ארגינין, ולין, סרין וליזין. החלבון הוא בעל מטען חיובי ב PH ניטרלי, דבר זה יכול להסביר את הקישור ל-DNA אשר טעון שלילי. החלבון חיוני לווירוס, וממלא מספר תפקידים חשובים בחיי הווירוס. ראשית הוא משמש כחלבון המעטפת לבניית קופסית הווירוס (Lazarowitz 1992) אך מעבר לכך הוא מסייע לווירוס בהולכה לגרעין התא הצמחי בעגבנייה, ולתנועה מתא לתא בעגבנייה. חלבון המעטפת הינו חיוני לרכישה של הווירוס ע"י כנימת עש הטבק. שתי מוטציות נקודתיות אשר נמצאו בחלבון המעטפת של TYLCV מסרדיניה, איטליה (פרולין לגלוטמין, והיסטידין לגלוטמין בעמדות 129 ו-134) מנעו רכישה של הווירוס ע"י כנימת עש הטבק, אך לא מנעו את האינפקטיביות בצמח (Noris et al., 1998) דבר המצביע על נחיצותו לרכישה ע"י הכנימה. בעבודה זו השתמשנו בגן לחלבון המעטפת של TYLVC. התבדיל שבו השתמשנו בודד ברפובליקה הדומיניקאנית וקיבלנו אותו מפרופ' בוב גילברטסון (תמונה מס' 5). גן זה שונה במס' נוקלאוטידים מהגן של חלבון המעטפת TYLCV הישראלי. רוב השינויים לא משנים את החומצה האמינית, ומיעוטם גורמים לחילוף של חומצה אמינית מאותה קבוצה.

1	MSKRPGDIII	STPVSKVRRR	LNFDSPYSNR	AAVPIVQGTN
41	KRRSWTYRPM	YRKPRIYRMY	RSPDVPRGCE	GPCKVQSYEQ
81	RDDIKHTGVV	RCVSDVTRGS	GITHRVGKRF	CVKSIYFLGK
121	VWMDENIKKQ	NHTNQVMFFL	VRDRRPYGSS	PMDFGQVFNM
161	FDNEPSTATV	KNDLRDRFQV	MRKFHATVIG	GPSGMKEQAL
201	VKRFFKINSH	VTYNHQEAAK	YENHTENALL	LYMACTHASN
241	PVYATMKIRI	YFYDSISN*		

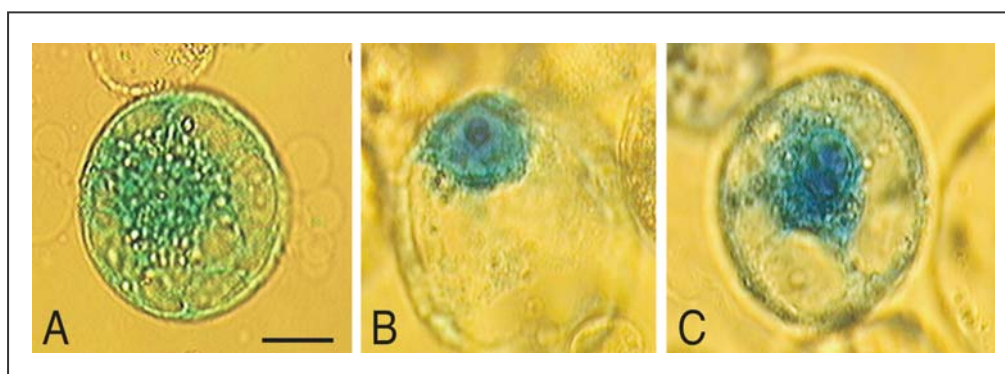
תמונה מס' 5 : רצף חומצות האמינו של חלבון המעטפת של וירוס צהבון האמיר של העגבנייה שבודד מהרפובליקה הדומיניקאנית. הרצף המודגש בכחול הינו סיגנל כניסה לגרעין – NLS, והרצפים המודגשים בצבע אדום וסגול הינם רצפים החשודים כרצפי NLS נוספים.

בעבודות קודמות הוכח שחלבון המעטפת הינו חלבון קריופילי כלומר בעל יכולת כניסה לגרעין. לשם כך החלבון נושא רצף חומצות אמינו בסיסיות ייחודי הנקרא, NLS- Nuclear Localization Signal, סוג NLS זה קרוי דו-חלקי bipartite (Robins *et al.*, 1991), כי הוא בנוי משני רצפים כמתואר בהמשך.

בעגבנייה רצף NLS זה מאפשר הכרה בין החלבון Karyopherin $\alpha 1$, המשמש להחדרת חלבונים לגרעין, לבין חלבון המעטפת. האינטראקציה בין חלבון המעטפת ל- Karyopherin $\alpha 1$, מאפשרת לו להיכנס לגרעין התא הצמחי (Kunik *et al.*, 1998). הקישור בין שני חלבונים אלו הוכח בשיטת Yeast Two Hybrid System ונמצא שאכן יש אינטראקציה ביניהם המאפשרת הכנסת גנום הווירוס לגרעין לשם הכפלתו (Kunik *et al.*, 1999).

בניסויים שנעשו במעבדתנו ע"י טלי קוניק, נבנה פלסמיד המבטא את הגן *uidA* המקודד לחלבון המדווח β -glucuronidase (GUS), שאליו אוחה רצף חלבון המעטפת של הווירוס תחת בקרת הפרומוטור הויראלי החזק 35S CaMV. הפלסמיד הוחדר לפרוטופלסטים של פטוניה באמצעות אלקטרופורציה. כביקורת הוחדר אותו פלסמיד שהכיל את הגן ל- GUS בלבד. לאחר טרנספורמציה הודגרו הפרוטופלסטים ב- 26°C בחושך למשך 48 שעות. תוצאות הניסוי הראו שהחלבון GUS לבדו הצטבר בציטופלסמה, ואילו החלבון המאוחה GUS-CP הצטבר בגרעין התא ובגרעינון (Kunik *et al.*, 1998) (תמונה מס' 6).

תוצאה דומה התקבלה כשחוברו לחלבון GUS רק 38 חומצות אמינו מהקצה האמיני של חלבון המעטפת של הווירוס. תוצאות אלו מראות שחלבון המעטפת הינו חלבון קריופילי (בעל אפיניות לגרעין), וככל הנראה מכיל NLS. על-ידי מוטציות חסר שונות אפיינו את ה- NLS בחלבון המעטפת (Kunik *et al.*, 1998) (תמונה מס' 6).



תמונה מס' 6: ביטוי חולף של החלבון המדווח GUS מאוחה לחלבון המעטפת של וירוס צהבון האמיר, בפרוטופלסטים של פטוניה, קנה מידה=10 μm (Kunik *et al.*, 1998).

A - החלבון GUS מבוטא בפרוטופלסטים של פטוניה, ניתן לראות את פעילותו מרוכזת בציטופלסמה.
B - ביטוי הגן המקודד לחלבון המאוחה: GUS-CP בפרוטופלסטים של פטוניה הביא לפעילות GUS סלקטיבית בתוך הגרעין.
C - ביטוי החלק ה- N טרמינלי של הגן ל- CP (38 חומצות האמינו הראשונות) בפרוטופלסטים של פטוניה הביא לפעילות החלבון GUS באופן סלקטיבי בגרעין.

חלבון המעטפת הינו חלבון יחסית קטן (30 kDa), תיאורטית הוא היה עשוי לחדור לגרעין התא בדיפוסיה, ללא השקעת אנרגיה. אך מתברר שחלבון המעטפת חודר לגרעין במסלול אקטיבי. כאשר נעשתה הזרקה לעוברי דרוזופילה של CP המסומן בצבע פלורוסנטי רודמין ביחד עם כמויות מתחרות (פי 30 ברמה המולרית) של פפטיד סינתטי בלתי מסומן שהכיל רצף NLS ממקור חיידקי, נחסמה לחלוטין יכולתו של CP לחדור לגרעין התא. ניסוי זה הינו ניסוי תחרות, שמטרתו לבדוק האם הפפטיד הנושא NLS בלתי מסומן יתחרה עם ה-NLS המסומן של CP על פקטורים ציטופלסמטים, באופן שיפריע ליעילות חדירתו של CP לגרעין התא.

בניסוי אחר, כאשר CP הוזרק לתאים ביחד עם $GTP\gamma S$ (אנלוג של GTP המתחרה על אתרי קישור של Ran GTPase אך אינן מהווה מקור אנרגיה), נחסמה לגמרי היכולת של CP לחדור לגרעין. תוצאה זו מעידה על כך שכניסה של CP לגרעין הינו תהליך אקטיבי הדורש GTP כמקור אנרגיה (Kunik *et al.*, 1998). למרות שבספרות הוגדר הגודל של המולקולות המסוגלות לחדור דרך NPC- (Nuclear pore complex) בדיפוסיה בין 40-60 kDa, הרי שעד כה כל החלבונים הקריופילים שנבדקו היו בגדלים שבין 25-50 kDa (Ohno *et al.*, 1998).

במקרים רבים, חלבונים אשר מתפקדים בהובלה של חומצות גרעין לגרעין התא נקשרים לחומצת הגרעין אותה הם מובילים באופן ספציפי (Robins *et al.*, 1991), ולכן היה חשוב להוכיח שחלבון המעטפת CP נקשר לגנום הווירוס, שהינו ssDNA (Palanichelvam *et al.*, 1998). ה-CP עוזר גם לתנועת הווירוס בתוך הצמח. תנועת הווירוס מתא לתא בצמח נעשית דרך הפלסמודסמה אותן תעלות החוצות את דופן התא ומקשרות בין התאים בצמח (Lucas and Gilbertson 1994). כאמור בניית קופסית הווירוס נעשית על ידי חלבון אחד בלבד ה-CP, 110 יחידות חוזרות של CP אשר עוטפות את גנום הווירוס ויוצרות את מבנה הקופסית (Lazarowitz *et al.*, 1992). ברור שלצורך בניית הקופסית חלבוני המעטפת צריכים להכיר זה את זה לבנייתה של הקופסית, ומכאן נובעת השאלה כיצד יוצרים חלבוני ה-CP אינטראקציה אחד עם השני, איך מתרחש ה-assembly. בעבודה שנעשתה במעבדתנו בדק Hallan (Hallan and Gafni 2001) תהליך זה במערכת של Yeast Two Hybrid System, והראה שחלבון המעטפת יוצר אכן אינטראקציה עם עצמו. מתברר שהחסרה של הקצה הקרבוקסילי מונעת אינטראקציה זאת. כמו כן הוא מצא שמספיקות 30 חומצות אמינו מהקצה האמיני על מנת ליצור אינטראקציה עם החלבון השלם. תוצאות אלו מדגישות את חשיבותם של שני קצוות החלבון. מתברר שהאינטראקציה של חלבון המעטפת עם עצמו היא בין קצה אמיני לקצה קרבוקסילי (Hallan and Gafni 2001).

3.2 כנימת עש הטבק - *Bemisia tabci*

וירוס צהבון האמיר מועבר על ידי וקטור יחיד, כנימת עש הטבק, שגודלה 1 מ"מ (תמונה מס' 7). כנימת עש הטבק נחשבת כחרק מזיק חשוב בגידולים חקלאיים רבים בעולם, בעיקר באזורים טרופיים וסובטרופיים (Byrne *et al.*, 1990). אחת הסיבות לכך היא היות הכנימה חרק רב פונדקאי. ידועים כ- 506 מיני צמחים מ- 74 משפחות שונות, היכולים לשמש כפונדקאים לכנימה (Greathead *et al.*, 1986). הפגיעה ביבול הנגרמת על ידי כנימת עש הטבק נובעת בחלקה מנזק ישיר לצמח כתוצאה מהזנה על צינורות השיפה והפרשת טל הדבש (Byrne *et al.*, 1990), אך עיקר הנזק נגרם על ידי מספר רב של נגיפים צמחיים המועברים על ידי כנימת עש הטבק (Duffus 1987; Cohen 1990; Brown and Bird 1992). מבין 70 מחלות הצמחים המועברות על ידי כנימות עש מעבירה כנימת עש הטבק כ- 60 (Markham *et al.*, 1994). כנימת עש הטבק היא חרק נושא לנגיפים צמחיים מהקבוצות Gemini, Carla, Poty, Clostero, Nepo וקבוצה נוספת של נגיפי DNA מקלוניים (Markham *et al.*, 1994). הקבוצה החשובה והגדולה ביותר היא קבוצת ה- Geminiviruses (Cohen 1990; Duffus 1987), הגורמים נזקים חמורים לשעועית ופלפל בדרום אמריקה, לעגבנייה בצפון מרכז ודרום אפריקה, אגן הים התיכון, דרום אירופה, אסיה ואוסטרליה, לקסבה באפריקה והודו, לכותנה בפקיסטאן, סודן, מרכז וצפון אמריקה ועוד מספר גידולי ירקות וקטניות ברחבי אסיה והמזרח הרחוק (Markham *et al.*, 1994). כנימת עש הטבק יכולה לרכוש בו זמנית יותר מווירוס אחד. כהן והרפז (Cohen and Harpaz 1964) הגדירו את יחסי הגומלין בין הכנימה לוירוס כרכישה תקופתית, וזאת משום שהחרק אינו מסוגל לרכוש את הווירוס לפני סיום התקופה האינפקטיבית הקודמת. כמו כן הווירוס מועבר לצאצאים דרך הביצה, עד שני דורות (Ghanim *et al.*, 1998). העברת הווירוס ע"י נקבות החרק יעילה הרבה יותר (פי 6) מאשר ההעברה ע"י הזכר (Cohen and Nitzany 1966). לצורך ההזנה מהצמח מחדיר החרק את החדק לנוזל השיפה ועל ידי כך רוכש את הווירוס. הווירוס עובר דרך תאים ספציפיים בדופן המעי להמולימפה שבחלל הגוף (haemocoel), שם הוא מצטבר לפני היציאה שלו מהחרק, בזמן ההזנה, דרך בלוטות הרוק. התקופה שבה הווירוס מצוי בתוך החרק מוגדרת כתקופה הלטנטית, שמסתיימת כאשר הווירוס מגיע לבלוטות הרוק של החרק, והחרק משלב זה הופך לאינפקטיבי (Markham *et al.*, 1994; Caciagli *et al.*, 1995). חלבון המעטפת של הווירוס הכרחי להכרה ע"י החרק (Azzam *et al.*, 1994). כפי שהוכח ע"י החלפת חלבון המעטפת בחלבון מעטפת מג'מיני אחר, וירוס המועבר ע"י ציקדות, בהן אין לחלבון המעטפת חשיבות ברכישה (Briddon *et al.*, 1990). החלפת חלבון המעטפת מנעה את הרכישה של הווירוס ע"י הכנימה. מוטציה בחלבון המעטפת יכולה גם לפגוע ברכישה או בהעברה של הווירוס ע"י הכנימה (Noris *et al.*, 1998). כמו כן הוכח שחלבון המעטפת נקשר לחלבון הכנימה GroEL בהמולימפה של הכנימה ובכך הווירוס מוגן מפני עיכול (Morin *et al.*, 2000).



תמונה מס' 7 : כנימת עש הטבק – וקטור המעביר את וירוס צהבון האמיר של העגבנייה (הגדלה פי 20).
 התמונה נלקחה מאתר הבית של : <http://www.infoagro.com/abonos/moscablanca.htm>

3.3 חלבון ה-GroEL

החלבון GroEL הינו חלבון מסוג צ'פרון אשר מיוצר במעי הכנימה על ידי חיידק אנדוסימביוטי *Candidatus Portiera aleyrodidarum* (Morioka and Ishikawa 1992). החלבון הינו אוליגומר הבנוי מ-14 תת יחידות זהות של 63-kDa אשר מאורגנים בצורה של שני טבעות מחומשות (הפטמר) (Braig *et al.*, 1994). הגן מקודד ל-555 חומצות אמינו, זהו גן פרוקריוטי טיפוסי. חלבוני ה-GroEL שנמצאו בכנימות הינם בעלי הומולוגיה של יותר מ-80% עם חלבון GroEL-heat shock protein בחיידק *E. coli* אשר אחראים לקיפול נכון של חלבונים בתנאי עקה, (van den Heuvel *et al.*, 1994).

חלבון זה מופיע בהמולימפה של הכנימה, (Morin *et al.*, 2000; van den Heuvel *et al.*, 1994). עבודות שנעשו על חלבון זה הראו שהוא מעורב כנראה בהגנה על חלקיקי הווירוס המגיעים להמולימפה בכנימה. מנגנון ההגנה מבוסס כנראה על קישור בין חלבונים ובכך מונע את עיכול הווירוס בהמולימפה של הכנימה. מורין הוכיח ש-GroEL יוצר אינטראקציה עם חלבון המעטפת, ובכך הווירוס מוגן מפני עיכול ופירוק בכנימה, (Morin *et al.*, 2000). האכלה של הכנימות בנוגדנים כנגד החלבון GroEL : anti-Buchnera GroEL גרמו לירידה של 80% בהעברה של וירוס צהבון האמיר על ידי הכנימה (Morin *et al.*, 1999).

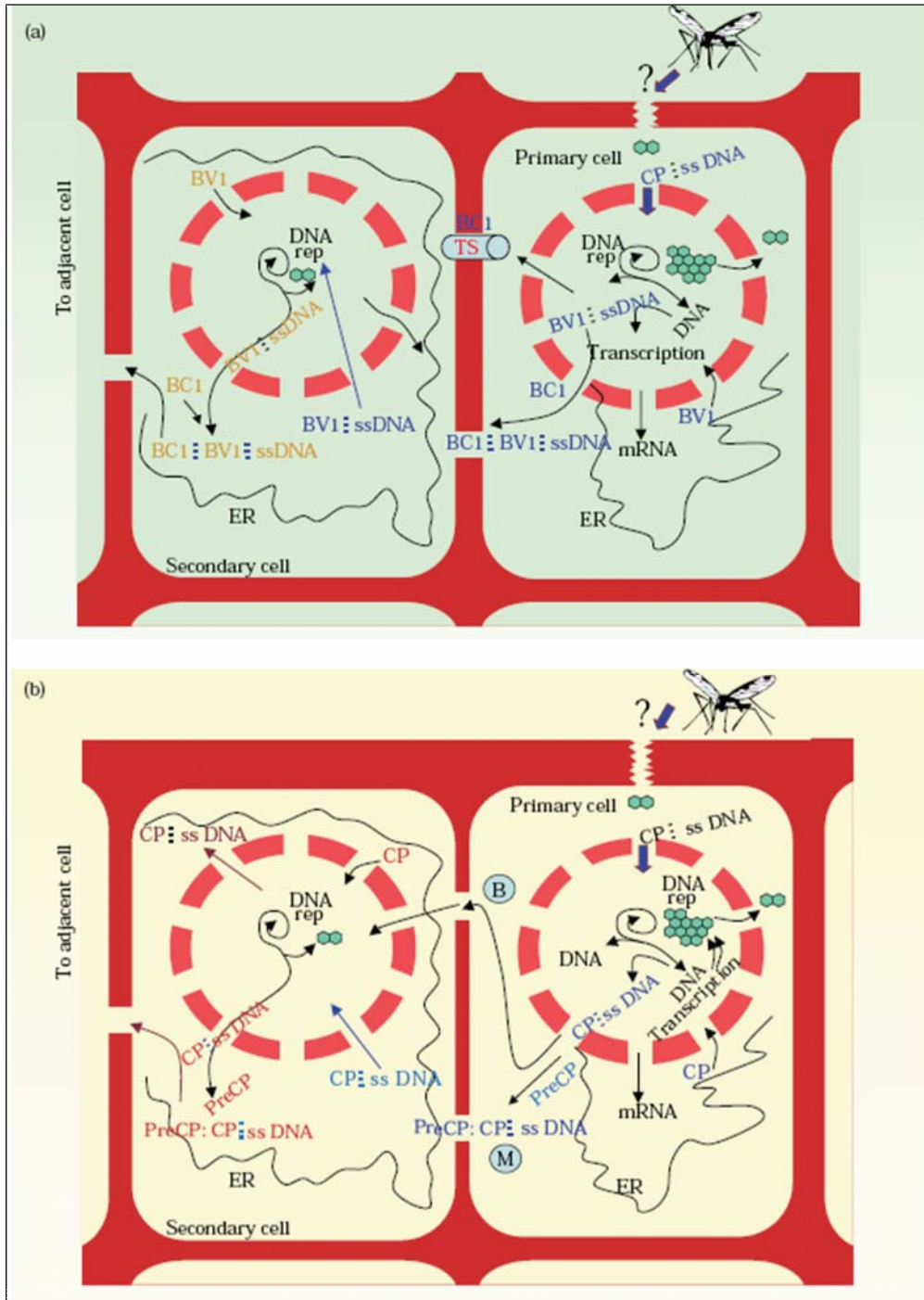
לאחרונה התגלה ש-GroEL יוצר אינטראקציה גם עם וירוסי RNA : CMV, PDV ו-TSWV, (Akad and Dotan 2004).

3.4 תנועת הווירוס בצמח

ווירוס צהבון האמיר של העגבנייה משתייך למשפחת וירוסים צמחיים, אשר נכנסים לתאים ניחים ומכפילים את עצמם. על מנת שהווירוס יצליח להיכנס לתאי הצמח ולגרום לסימפטומים, הוא חייב להיכנס לגרעין התא על מנת להכפיל את עצמו, ולהמשיך להתפשט מתא לתא וכן להתפשט סיסטמית בצמח. לשם כך הווירוס צריך חלבוני תנועה, תנועה לעבר הגרעין והחוצה מהגרעין, ותנועה מתא לתא ואולי גם חלבוניים לתנועה סיסטמית.

כנימת עש הטבק מחדירה את הווירוס לתאי הפלואם של העלים הצעירים של הצמח. הווירוס מכפיל את עצמו בתאים אלו, ולאחר מכן מתחילה תנועת הווירוס לשרשים, מהשרשים לקודקודי הצמיחה של הנצרים, ומשם לעלים ולפרחים ובצורה זו הווירוס מתפשט בכל הצמח (Ber *et al.*, 1990). המעבר מתא לתא נעשה דרך מעברים צרים הנקראים פלסמודסמה (Lucas and Gilbertson 1994). החלבוניים המעורבים בתנועת הווירוס בצמח במשפחת הג'מיני הם שונים מקבוצה לקבוצה. לדוגמה, קבוצת Begomoviruse מתחלקת לשתי תתי קבוצות על פי מבנה הגנום: bipartite, אשר מורכב משני גנומים חד גדילים השונים אחד מהשני A, B, כאשר כל גנום הוא בסביבות 2.6-2.8 kb ו- monopartite אשר מכילים גנום אחד בלבד וגודל הגנום הוא בסביבות 2.7 kb. בקבוצת ה- bipartite ישנם שני חלבוניים האחראים על התנועה של הווירוס מתא לתא המקודדים ע"י גנום B: BV1&BC1 (Sudarshana 1998; Eteessami 1998; Brough 1988), (תמונה מס' 8a). BV1 הינו חלבון הולכה לגרעין והוצאה מהגרעין בעוד ש- BC1 הינו חלבון האחראי לתנועה מתאי המזופיל, דרך הפלסמודסמה לתאים הבאים. (Rojas *et al.*, 1999; Noueir *et al.*, 1994).

ווירוס צהבון האמיר הוא אחד מבין הווירוסים המעטים המשתייכים לקבוצת ה- monopartite (Navot *et al.*, 1991). בוורוס זה חלבון המעטפת עושה את שני התפקידים יחד, הולכה לגרעין ותנועה מתא לתא (תמונה מס' 8b). עם זאת בתנועה מתא לתא מעורבים שני חלבוניים נוספים, C4 ו- V2 המסייעים לחלבון המעטפת. שני חלבוניים אלו ממוקמים בעיקר בדופן התא ובציטופלסמה, ו- V2 ב- ER, כמו החלבון BC1 בקבוצת ה- bipartite (Rojas *et al.*, 2001).



תמונה מ'ס 8 : מודל המתאר תנועת וירוסים ממשפחת הג'מיני בתוך תאי הצמח

(Gafni and Epel 2002).

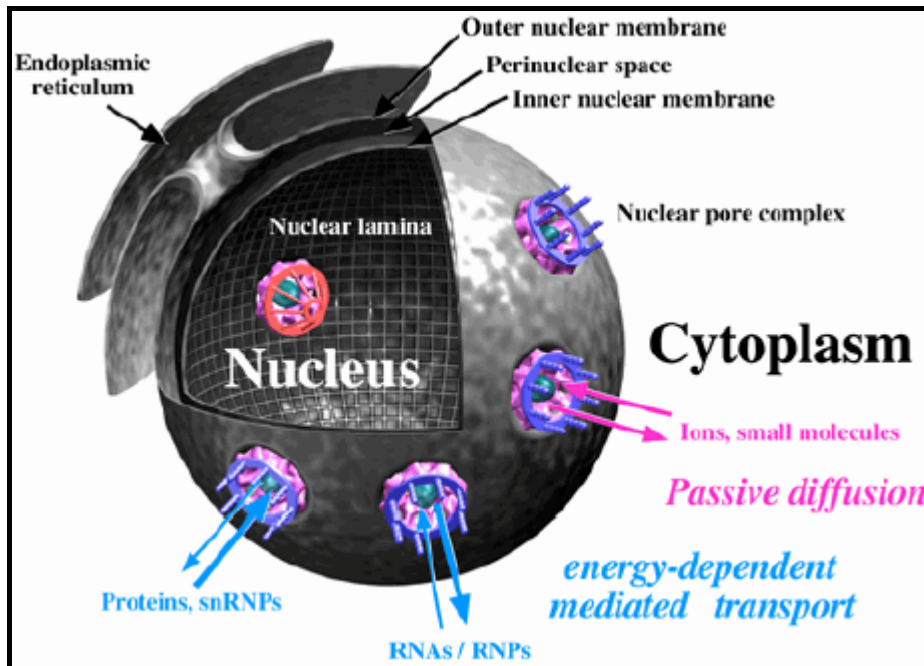
- a-** תנועת וירוסים מקבוצת ה- bipartite בקבוצה זו מעורבים בתנועה מתא לתא החלבוניים , BV1 , BC1 התנועה נעשית דרך הפלסמודסמה של הצמח.
- b-** תנועת וירוסים מקבוצת ה- monopartite : כאן יש שוני בין קבוצת ה- begomoviruses (B) אשר החלבון היחיד הדרוש לתנועה הוא ה- CP ואילו ב- mastreviruses (M) מעורבים שני חלבוניים, CP ו- Pre-CP.

3.5 מעבר של מטבוליטים בין הגרעין והציטופלסמה

בתאים בעלי גרעין, גרעין התא מופרד מהציטופלסמה ע"י ממברנה דו שכבתית הקרויה מעטפת הגרעין (Nuclear Envelope) NE. דבר זה מאפשר הפרדה בין תהליכים המתרחשים בגרעין לבין תהליכי המתרחשים בציטופלסמה, וכן מונע גישה ל-DNA של התא.

מעבר של מולקולות לתוך הגרעין נעשה בצורה סלקטיבית, דרך קומפלקסים גדולים הנקראים NPCs- nuclear pore complex, המצויים במעטפת הגרעין. קומפלקסים אלו מהווים מחסום בין הגרעין לציטופלסמה (Pante and Kann 2002). ה-NPC הוא קומפלקס חלבוני ענק אשר מאפשר חדירתם של יונים ומולקולות שונות. מולקולות קטנות, אשר גודלן אינו עולה על 40-60 kDa, ויונים, עוברים דרך ה-NPC בדיפוסיה, ללא השקעת אנרגיה (תמונה מס' 9). אך קיימים יוצאים מן הכלל כלל, היסטונים, למשל, למרות היותם קטנים מ-40-60 kDa, עוברים את ה-NPC במעבר גרעיני אקטיבי. מעבר גרעיני אקטיבי מתרחש על מנת ליצור בקרה על כניסה ויציאה מן הגרעין. לחלבונים החודרים לגרעין דרך המעברים הללו ישנה חשיבות רבה בתהליכים שונים בחיי התא והאורגניזם-מדובר בחלבונים כגון קינזות, פולימראזות, פקטורי שעתוק שונים וכו'. כמו כן מתרחש מעבר של מולקולות RNA שונות המיוצרות בגרעין, לציטופלסמה וכן חלבונים שחוזרים לציטופלסמה. מולקולות חלבון העוברות בתהליך אקטיבי דרך ה-NPC צריכות סיגנאל מיוחד אשר מאפשר את הובלתן אל תוך הגרעין באופן אקטיבי, תוך השקעת אנרגיה. סיגנאל זה מהווה חלק ממבנה החלבון, ומורכב מרצף חומצות אמינו הנקרא NLS (Nuclear localization Signal) (Pante 1996).

מספר ה-NPCs תלוי בדרישה למעבר בין גרעין התא והציטופלסמה ומשתנה באופן ניכר בהתאם לסוג התא, גודל התא ומהירות התרבותו. יש 100-200 NPCs בתא שמרי (Rout *et al.*, 1993) $\sim 5 \times 10^7$ בביציות דו-חיים בוגרות וכמה אלפים בתא אנושי משגשג (Cordes *et al.*, 1995). לפי מודל תלת מרחבי של ה-NPC המבוסס בעיקר על אנליזות מתקדמות במיקרוסקופ אלקטרוני ועל אפיונים ביוכימיים, שמונה מבנים סימטריים של חווקים (spokes) חוצים את ממברנת הגרעין ויוצרים טבעת. בחלל הטבעת עוברת התעלה המרכזית (transporter), שדרכה מתרחש מעבר פעיל בין גרעין התא והציטופלסמה. על פני האזור הציטופלסמטי והגרעיני של החווקים מצויים מבנים הנקראים הטבעות הציטופלסמטית והגרעינית. הטבעת הציטופלסמטית נושאת 8 סיבים דקים ציטופלסמטיים שבולטים לפחות 30-50 nm לתוך הציטוזול. הטבעת הגרעינית תומכת ב-8 סיבים דקים באורך של כ-100 nm המחברים יחדיו עם טבעת טרמינלית ויוצרים מבנה הנקרא הסל הגרעיני (Stoffler *et al.*, 1999).



תמונה מס' 9: תיאור המולקולות העוברות דרך ה-NPC, במעבר פסיבי ובמעבר אקטיבי. התמונה נלקחה מאתר האינטרנט: www.scripps.edu/~stoffer/ proj/NPC/npc.html

3.5.1 מנגנון חדירת חלבונים לגרעין התא

בתהליך החדירה לגרעין משתתפים פקטורים ציטופלסמטיים אשר תפקידם לזהות את "כרטיס הכניסה" NLS ולסייע לחדירה. הרצף מזוהה ע"י רצפטורים ציטופלסמטיים מסיסים הקרויים Karyopherins α , β או importins α , β (Gorlich and U. 1999). Karyopherin α נקשר לרצף ה-NLS של החלבון ונקשר ל- β karyopherin בקצה האמיני שלו. הקומפלקס שנוצר נקשר ל-nuclear pore complex על ידי קישור ספציפי של β karyopherin לחלבון גרעיני. תהליך המעבר מסתיים בתוך הגרעין ע"י קשירת מולקולת Ran GTP ל- β karyopherin (Damelin *et al.*, 2002).

אופן החדירה של חלבונים קריופילים לגרעין ידוע רק חלקית, אך ההתקדמות במחקר בנושא חושפת את המנגנון הבא אשר מורכב ממספר שלבים:

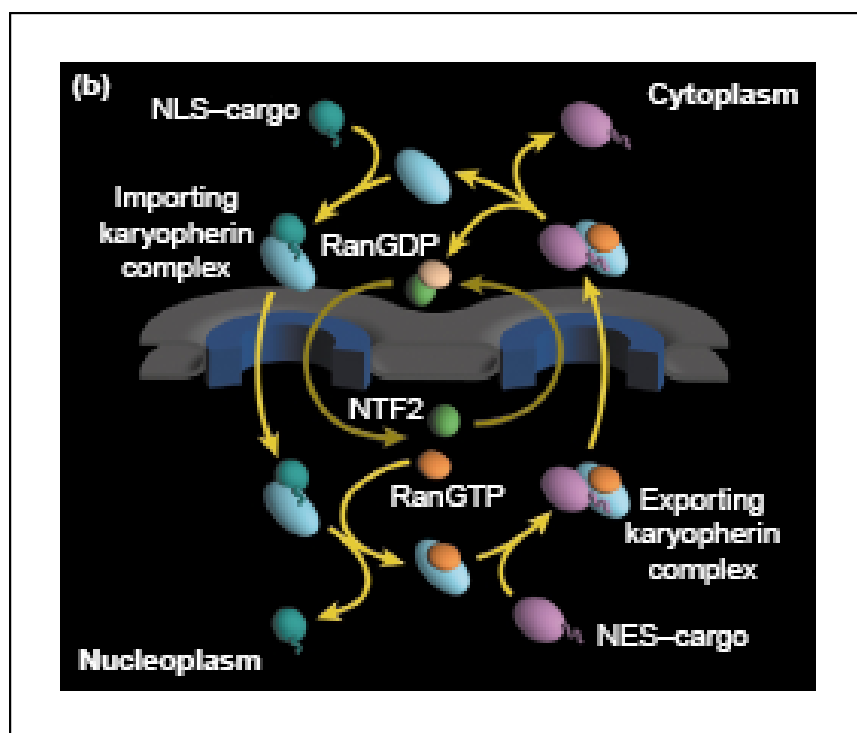
1. שלב העיגון (Docking): בתהליך זה מעורבים הפקטורים הציטופלסמטיים Karyopherin α ו-Karyopherin β . Karyopherin α הוא חלבון בגודל של 60kD שתפקידו לזהות ולקשור את החלבון שמכיל את רצף ה-NLS. לאחר הקשירה החלבון "מוצג" לפקטור הציטופלסמטי Karyopherin β , שנקשר בצידו השני לנוקלאופוריינים המהווים חלק ממבנה ה-NPC, והם בולטים אל הצד הציטופלסמטי של מעטפת הגרעין. שלב זה של עגינה בצד החיצוני אינו צורך אנרגיה (Gorlich *et al.*, 1996; Nigg 1997).

2. שלב המעבר (Transport): בשלב זה עובר קומפלקס המעבר אל החלק המרכזי של התעלה (הטרנספורטר), ולאחר מכן עובר דרך תעלת ה-NPC שרוחבה 100-200 nm ואל תוך גרעין התא. מקור האנרגיה בתהליך הן מולקולות GTP האנרגיה ממולקולות אלו מתקבלת תודות למעורבותו של החלבון - RanGTPase שמפרק את מולקולת ה-GTP. למולקולת GDP (תמונה מס' 10). פירוק של הקומפלקס נעשה ע"י קשירה של β Karyopherin אל חלבון RanGTP, וכקומפלקס הם יוצאים מגרעין התא. חלבון RanGDP מובא לגרעין התא בעזרת פקטור NTF2 (Nuclear Transport Factor) (תמונה מס' 10).

בתוך הגרעין נעשה שחלוף על גבי חלבון Ran של מולקולת GDP עם מולקולת GTP. נמצא ש- β Karyopherin מזהה את RanGTP בלבד ולא את ה-RanGDP. הקישור ביניהם חזק ואינו מאפשר פירוק של GTP ל-GDP (Cingolani *et al.*, 1999).

החלבון α Karyopherin עובר מיחזור, על-ידי קשירה לרצפטור ספציפי CAS על מנת לצאת מן הגרעין, ולהמשיך בתהליך הכנסת חלבונים חדשים לגרעין התא.

α Karyopherin נקשר ל-NLS מצד אחד ול-nucleoporin של ה-NPC (Malik *et al.*, 1997). עם זאת נמצאו מספר מקרים, בהם חלבונים חודרים לגרעין בעזרת β Karyopherin בלבד, חלבונים ריבוזומלים, CDK/cyclin complexes וחלבונים ויראליים כמו, HTLV-1 Rex, HIV-1 Tat HIV-1 Rev (Cingolani *et al.*, 1999).



תמונה מס' 10: תיאור סכמטי של מנגנון הכניסה והיציאה מהגרעין. במנגנון נדרשת אנרגיה הנצרכת מפירוק של GTP, (Rout *et al.*, 2003). Karyopherin נקשר לרצף ה-NLS של החלבון, ויחד הם נכנסים לגרעין. בגרעין נקשרת מולקולת RanGTP ל karyopherin וגורמת לשינוי במבנה המרחבי ולשיחרור הקומפלקס. karyopherin יחד עם RanGTP יוצאים מחוץ לגרעין, מולקולת ה-RanGTP מגיבה עם RanGAP לשיחרור karyopherin ולקבלת מולקולת RanGDP. מולקולה זו מוכנסת לגרעין ע"י NTF2.

3.5.2 רצפי הכניסה לגרעין - NLS

רוב רצפי ה-NLS הינם רצפים קצרים המורכבים מחומצות אמיניות בסיסיות, הטעונות מטען חיובי (ליזין וארגינין). בחלבונים אשר מיועדים לחדור לגרעין (קריופילים) ניתן למצוא עותק אחד או יותר של רצפי NLS, היכולים להיות ממוקמים בכל מקום ברצף החלבון. רוב רצפי ה-NLS המוכרים הינם מהסוג הדו-חלקי (bipartite) (Robins *et al.*, 1991), כפי שנמצא ברצפים שנתגלו לראשונה בחלבון נוקלאופלסמין מקרפדה. המבנה הדו-חלקי מאופיין באתר ראשון בעל 2 חומצות אמיניות בסיסיות, ואתר שני בהמשך הרצף (לאחר כ- 9-11 חומצות אמיניות משתנות) שבו 3-5 חומצות אמינו בסיסיות כך שמתקבל הפורמט הבא – KR-aa(X10)-KKKL (Melchoir and Gerace 1995). רוב רצפי ה-NLS בצמחים מאופיינים גם הם במבנה זה. דגם שני אשר נתגלה באנטיגן T של הווירוס SV-40 מאופיין ברצף יחיד – pKKKRKv. בנוסף לשני דגמים, אלו שהם השכיחים ביותר, ישנם גם כמה מופעים אחרים של רצפי ה-NLS כמו למשל בחלבון nucleoprotein של וירוס השפעת והחלבון השמרי Gal-4, אך מספרם מצומצם ביחס למופעים השכיחים אשר הוזכרו לעיל (טבלה מס' 1).

SV-40 T antigen	pKKKRKv
TYLCV isr	KRpgdiiistpvsKvRRR
TYLCV sar	KRtgdilistpvsKvRRR
TYLCV thai	KRpadilistpvsKvRRR
ACMV	KRpgdiiistpvsKvRRR
ICMV	KRpadiiistpvsKvRRR
Agrobacterium VirD2	KRpredddgepseRKReR
Nucleuplasmin	KRpaatkkaqqakkkkl

טבלה מס' 1: מספר דוגמאות של רצפי NLS בחלבונים שונים והשוואתם לרצף ה-NLS של חלבון המעטפת של וירוס צהבון האמיר הישראלי – TYLCV isr. רצפי NLS מסוג bipartite:

TYLCV - ישראל - isr, איטליה - sar ומתאילנד - thai.

ACMV - African cassava mosaic virus.

ICMV - Indian casava mosaic.

רצף ה-NLS בחלבון VirD2 מאגרובקטריום. רצף בחלבון הנוקלאופלסמין מקרפדה.

רצף NLS מסוג monopartite:

SV-40 - רצף של אנטיגן

3.6 חדירה של וירוסים לגרעין התא

וירוסים אנימליים רבים ומעט וירוסים צמחיים, כגון וירוס ג'מיני, חייבים לחדור לגרעין התא המאכסן על מנת שיוכלו לשכפל את הגנום שלהם ולבצע שעתוק. דוגמאות מוכרות ממערכות אנימליות הן וירוס השפעת (influenza virus) (O'Neil *et al.*, 1995), וירוס האיידס (HIV) (Gallay *et al.*, 1997), וירוס אדנו, SV-40 (Greber *et al.*, 1996).

וירוס DNA פיתחו אסטרטגיות רבות על-מנת להשתמש בפולימרוזות, טופואיזומרוזות, היסטונים, פקטורי שעתוק ופקטורי שיחבור (splicing) וכו' של תא המאכסן. אפילו וירוס DNA גדולים המקודדים לפולימרוזות משלהם משתמשים בייצור החלבונים של תא המאכסן. המנגנון בעזרתו וירוסים חודרים לגרעין משתנה בין משפחות שונות של וירוסים:

וירוסים בלי מעטפת גדולה עוברים disassembly ('התפשטות' ממעטפת הווירוס) מלא או חלקי בציטופלסמה. רוב וירוס הרטרו נכנסים לגרעין במהלך מיטוזה, בה מעטפת הגרעין אינה קיימת זמנית, חריג הוא ה-HIV אשר כמו וירוס Gemini הצמחיים, חודר לגרעין דרך ה-NPC ויכול להתרבות בתאים ניחים (Whittaker *et al.*, 2000).

בהרבה מקרים במהלך מחזור ההכפלה של הווירוס, אותו חלבון וירלי עובר את מעטפת הגרעין מספר פעמים לכל כיוון. לדוגמא, חלבון גרעיני של וירוס השפעת (influenza virus) בתחילה חודר לגרעין כחלבון חדש שסונתז, ויוצא כחלבון קשור לוורוס החדש שנוצר (viral ribonuclearprotein), לאחר מכן הוא חודר לגרעין שוב במהלך הדבקה של תא חדש על מנת לבצע פעילות של RdRNA polymerase (Lamb 1989).

צורתם המקורית של חלבוני הקופסית בד"כ עוברת שינויים. חלבונים עשויים לעבור פוספורילציה או שינוי מרחבי כתוצאה מאינטראקציה עם רצפטורים, חשיפה ל-pH נמוך וכו'. שינויים אלו הם חלק אינטגרלי מתוכנית החדירה והתפשטות הווירוס. שינויים אלו נצרכים לשמירה על יציבות מרכיבי הווירוס, אשר במבנהו החוץ תאי די דחוס, על-מנת לאפשר פתיחה של הגנום הארוז. לעיתים שינויים אלו נצרכים לביטוי של סיגנלים תוך תאיים, ולחשיפה של אתרי קשירה למגוון של פקטורים תאיים החיוניים בפאזה החדירה.

3.7 הרצפטורים הציטופלסמטיים ממשפחת ה-Karyopherin

הרצפטורים α/β Karyopherin חיוניים לתהליך חדירתם של חלבונים קריופילים נושאי רצפי NLS לגרעין התא האוקריוטי. בחלבון Karyopherin α נמצאו מוטיבים חוזרים של רצפי ARM (A Repeated amino acid Motif). לראשונה הרצפים הללו זוהו ב- *Drosophila melanogaster*, בחלבון Armadillo (Peifer and Reynolds 1994). בחלבון Karyopherin α רצפים אלו מקנים גמישות לחלבון ומאפשרים היווצרות מרחב מתאים לקשירה של ליגנדים שונים (Cingolani *et al.*, 2000). מעבדות שונות פרסמו רצפי cDNA המקודדים לפקטורים אלה ועל כן ניתנו להם מספר שמות. חלבונים ממשפחת ה-Karyopherin α נקראים בספרות גם: 54/56-kDa, PTAC, Importin α , NLS receptors, בחולייתנים ובצמחים, ו-SRP1 בשמרים. באורגניזמים עילאיים קיימת משפחה של חלבונים המכילים אלמנטים מבניים דומים ל-Karyopherin α , לעומת זאת בשמרים נמצא Karyopherin α יחיד. בפקטור Karyopherin α קיימים שלושה אתרים שמורים עיקריים, המאפשרים את פעילותו התקינה של החלבון:

1. IBB domain (Importin β Binding): אתר הקישור לפקטור Karyopherin β

(Cingolani *et al.*, 1999), שהוא רצף דמוי NLS אשר מווסת קשירה של חלבונים קריופילים בעלי רצף NLS "קלסי". IBB ממוקם סמוך לקצה ה-N טרמינלי של החלבון. רצף זה בנוי מחומצות אמינו בסיסיות ומוקף ברצפים שונים (Variable region) שאינם שמורים כמו ה-IBB. מוטיב זה יכול לגרום לעיכוב עצמי של Karyopherin α ע"י קשירה של רצף דמוי NLS אל מוטיב ARM, המכיל אתר קשירה לחלבונים בעלי רצף NLS (Kobe 1999). עיכוב עצמי של החלבון גורם לזיקה נמוכה לחלבונים קריופילים. אך קישור של Karyopherin β לרצף דמוי NLS מונע עיכוב עצמי של Karyopherin α ומאפשר לו קשירה לחלבונים קריופילים בזיקה גבוהה. בצורה זו יכול Karyopherin β לקשור את Karyopherin α ולהוביל אותו יחד עם חלבון נושא ה-NLS אל תוך הגרעין (Gorlich and Mattaj 1996; Tsuji *et al.*, 1997; Weis *et al.*, 1996).

2. ARM motifs: זהו אתר שממוקם בחלקו המרכזי של החלבון ובנוי בתצורה של שמונה רצפים הידרופוביים חוזרים (Peifer *et al.*, 1994). ככל הנראה אתר זה הינו אתר הקישור של הפקטור אל החלבון הקריופילי ברצף ה-NLS שלו (Cortes *et al.*, 1994). Karyopherin α בשמר מכיל עשרה רצפי ARM.

3. קצה ה-C טרמינלי הידרופובי אשר תפקידו עדיין לא ידוע.

3.7.1 בידוד הגן ל- Karyopherin $\alpha 1$ בעגבנייה:

תהליך איתור הגן של Karyopherin α בעגבנייה החל במציאת האנלוג מ- *Arabidopsis* ע"י דר' ויטאלי ציטובסקי מאוניברסיטת סטוניברוקס ניו יורק (Ballas and Citovsky 1999). הגן מארבידופסיס, שימש כגלאי בספריית cDNA שהופקה מעלים של עגבנייה. ספרייה זו שנבנתה בפאג' λ gt10 באתר ECOR1 נסרקה במעבדתנו (Kunik *et al.*, 1999). בסריקת הספרייה התקבלו מספר פאג'ים שהגיבו עם הגלאי מ- *Arabidopsis*. תוצר ה-PCR הגדול ביותר נשלח לקביעת רצף. הרצף שהתקבל הושווה לאינפורמציה ב- Genebank, ואכן התקבל אישור כי מדובר בגן ל- Karyopherin α (Kunik *et al.*, 1999). אזור 5' של הרצף היה חסר ולכן היה צורך להשלימו בעזרת שיטת RACE PCR. הרצף נשלח לבנק הגנים וקיבל קוד זיהוי AF017252. אח"כ בודד הפרומוטור מספרייה גנומית ע"י מזרחי (Mizrachy *et al.*, 2004).

4. מטרת המחקר

כאמור וירוס צהבון האמיר של העגבנייה הוא גורם הרסני לגידולי עגבניות. ריבוי נעשה בגרעיני התאים המודבקים, ושם גם נבנית קופסית הווירוס מ 110 העתקים של חלבון המעטפת. מטרת המחקר הייתה לאפיין ביתר פירוט את האזורים בחלבון המעטפת של וירוס צהבון האמיר הנדרשים לאינטראקציה שלו עם עצמו, אינטראקציה הנדרשת לו לבניית הקופסית. על מנת למצוא את האזורים החיוניים לאינטראקציה, יצרתי מוטציות נקודתיות ומוטציות חסר בחלבון המעטפת, ובדקתי את ההשפעה של מוטציות אלו על האינטראקציה בין חלבון המעטפת השלם ובין חלבון המעטפת המוטנט והחסר. כמו כן נבדקו מוטציות אלו לגבי השפעתן על האינטראקציה של החלבון עם שני חלבונים המעורבים במחזור החיים של וירוס צהבון האמיר: Karyopherin $\alpha 1$ ו-GroEL.

המוטציות בוצעו בקצה האמיני והקרבווקסילי של חלבון המעטפת. בעבודתו של Hallan הוכח שאיזור זה חיוני לאינטראקציה CP-CP אך לא הוברר איזה חומצות אמינו מעורבות בקשר. המחקר המתואר חשוב לרכישת ידע לגבי תהליך יצירת המעטפת החלבונית אשר עוטפת את גנום הווירוס. כמו כן יסייע מחקר זה בבדיקת השפעת המוטציות הנקודתיות על אינפקטיביות הווירוס, וכן על יכולת רכישתו ע"י הכנימה. בנוסף יש למחקר זה תרומה להבנתנו את האינטראקציה של חלבון המעטפת עם הרצפטור הציטופלסמתי Karyopherin $\alpha 1$. אם נלמד ונבין את התהליכים אשר מתרחשים בתא בעת בניית מעטפת הווירוס, ונדע אלו אזורים חיוניים לאינטראקציה עם שני החלבונים הנבדקים, אולי ניתן יהיה למצוא פיתרונות ליצירת עמידות בפני הווירוס, למשל ע"י יצירת פפטידים שיחסמו את אזורי אינטראקציה אלו בחלבון המעטפת.

5. שיטות וחומרים

5.1 רשימת חומרים

שם החומר	היצרן
Agarose	Renium
Amonium Sulfate	Mereck
Ampicillin	Duchefa
Bacto Agar	Difco
Bacto-Trypton Bacto-pepton	Difco
Bacto-Trypton	Difco
BAP	Duchefa
Bromophenol blue	Sigma
Calcium Chloride-Dihydrat	Mereck
Cupric sulfate Cellulase	Sigma
Cupric sulfate	Mereck
D- Galactose	Duchefa
D+Glucosemonohydrat	Mereck
Deoxyribonucleic acid from Salmon sperm	Sigma
Dimethyl Sulfoxide -(DMSO)	Sigma
Di-Potassium hydrogen phosphat	Sigma
D-Raftinose	Duchefa
Driselase	Sigma
Ethylenediamine Tetraacetic acid-(EDTA)	Sigma
Etidium Bromide-(EtBr)	Sigma
Glycine	Sigma
Glycerol	Biolab
Formamide	Sigma
L-Histidine	Sigma
KI	Sigma
Lauryl-Sulphate-SDS	Sigma
L-Leucine	Sigma

Lithium Acetate	Sigma
L-Tryptophan	Sigma
Macerozyme	Sigma
Manitol	Duchefa
Magnesium-Sulphate	Mereck
Magnesium-chlorid	Mereck
NAA	Duchefa
Polyethyleglycol 3500	Sigma
Potassium dihydrogen phosphate	Sigma
Pottasium nitrate	Sigma
Pottasium Chloride	Mereck
Rafinose	Duchefa
Sodium dihydrogen phosphate monohydrate	Mereck
Sodium Chloride	Biolab
Sodium Chloride Sucrose	Biolab
Ttis base	Duchefa
Trisodium citrate	Mereck
Thiamine Hcl	Sigma
Uracil	Sigma
X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-b-D galactopyranosid)	Sigma
YNB-AA	Difco
Yeast-extract	Difco
Yeast synthetic drop-out medium supplement (-ura, -his, -trp, -leu)	Sigma

5.2 בופרים, תמיסות ומצעים

5.2.1 מצעי מזון

כל המצעים עוקרו באוטוקלב בטמפרטורה של 121°C 20 דקות. מצעים שהכילו אנטיביוטיקה, גלוקוז (הגורם כרמליזציה) או חומצות אמיניות (למצעי שמרים) הותכו וקוררו לטמפרטורה של 56°C , רק אז הוספו האנטיביוטיקות, גלוקוז או החומצות אמיניות. לאחר ערבוב נמזג המצע ע"פ הצורך לצלחות פטרי או לכלי הגידול.

מצעים נוזליים לגידול חיידקי *E. coli* אולחו בחיידקים וטולטלו במהירות סיבוב של 220rpm ובטמפרטורה של 37°C .

שמרי ה- *Sacharomyces cerevisiae* טולטלו במהירות של 250rpm וגודלו בטמפרטורה של 30°C .

5.2.1.1 מצעי מזון לגידול חיידקים:

E. coli

LB – Luria Bertani medium (Sambrook *et al.*, 1989).

Bacto trypton	10 gr/l	
Bacto yeast extract	5 gr/l	
NaCl	10 gr/l	
Bacto agar	15 gr/l	למצע מוצק
H ₂ O	להשלים לליטר	

5.2.1.2 מצעי מזון לגידול שמרים

מצע מלא:

YPD

Bacto -peptone	20 gr/l	
Yeast extract	10 gr/l	
Glucose	20 gr/l	
Bacto agar	20 gr/l	למצע מוצק
H ₂ O	להשלים לליטר	

(Ausubel *et al.*, 1994)

מצעים חסרים :

CM: ura⁻, his⁻, trp⁻

Y.N.B -Yeast Nitrogene Base	6.7gr/l	
Droup out medium	1.4gr/l	
Leucine	0.06 gr/l	
Glucose	20 gr/l	
Bacto agar	20 gr/l	למצע מוצק
H ₂ O	להשלים לליטר	

(Ausubel *et al.*, 1994)

CM: ura⁻, his⁻, trp⁻, leu⁻

Y.N.B -Yeast Nitrogene Base	6.7 gr/l	
Droup out medium	1.4 gr/l	
Galactosee	20 gr/l	
Rafinose	10 gr/l	
Bacto agar	20 gr/l	למצע מוצק
H ₂ O	להשלים לליטר	

(Ausubel *et al.*, 1994)

5.1.3.4 מצע לגידול פרוטופלסטים - fMI (Takebe 1972). ל- 1 ליטר :

KH ₂ PO ₄	27.2 mg
KNO ₃	0.101 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.48 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.246 g
KI	0.16 mg
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.024 mg
Mannitol	90.0 mg
Thamine-HCL	10 mg
Glycine	2 mg
Sucrose	5 g
NAA	3.0 mg
BAP	1.0 mg
H ₂ O	להשלים לליטר

להביא ל- pH=5.8.

5.2.2 תמיסות ובופרים

5.2.2.1 תמיסת Hugness Freezing Medium לשמירת חיידקים ב-80°C-

K ₂ HPO ₄	12.6 gr/l
Trisodium citrate	0.9 gr/l
MgSO ₄	0.18 gr/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.8 gr/l
KH ₂ PO ₄	3.6 gr/l
Glycerol	88 ml/l
H ₂ O	להשלים לליטר

5.2.2.2 תמיסת מלחים CPW9M לשטיפת פרוטופלסטים (Draper et al., 1988):

ל- 1 ליטר :

KN ₂ PO ₄	27.2 mg
KNO ₃	0.101 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.48 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.246 g
KI	0.16 mg
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025 mg
Sucrose	136.8 g
Mannitol	90 g
H ₂ O	להשלים לליטר

להביא ל- pH=5.8.

5.2.2.3 תמיסת אנזימים הידרוליטיים להפקת פרוטופלסטים:

תמיסה זו שמשה לעיכול דופן התא הצמחי ולמלת הביניים בין תאים שכנים ברקמה של תאי פטוניה שהוכנו להפצה ב DNA. אופן ההכנה: 0.4% Cellulase R10 "ONOZUKA", 1%, Driselase, ו- 0.2% Macerozyme R10, הומסו בתמיסת CPW9M תוך כדי ערבול איטי למשך שעה. בשלב האחרון סוננה תמיסת האנזימים בתא סטרילי במסנן 0.2μ וחולקה למנות של 10ml שהוקפאו ב-20°C עד לשימוש.

5.2.2.4 בופר אלקטרופורציה :

10 mM HEPES buffer; 0.2 M mannitol; 150 mM sodium chloride.

להביא תמיסה ל- pH=7.2.

5.2.2.5 בופר Z (Ausubel et al., 1994)

Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	16.1 g
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	5.5 g
KCl	0.75 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.246 g
β-mercaptoethanol	2.7 ml
H ₂ O	להשלים לליטר

להביא תמיסה ל-pH=7.0.

תמיסה זו לא הועברה עיקור באוטוקלב.

5.2.2.6 בופר הרצה לג'לים (אלקטרופורזה) TAEX50:

Tris base	242 gr
Acetic acid glacial	57 ml
0.5M EDTA PH=8	100 ml
H ₂ O	השלמה לליטר

5.2.2.7 הכנת ss-DNA (2mg/ml)

1. שוקלים 200mg של DNA וממיסים עם סטירר כ-2-3 שעות בתוך בופר TE או מים.
2. שומרים דוגמאות ב-20°C.
3. לפני השימוש יש להרתיח לפחות 5 דקות ולצנן בקרח.

5.2.2.8 הכנת תמיסת ליתיום אצטאט 1M (LiAc)

1. מכינים סטוק של תמיסת 1M במים מזוקקים.
2. בודקים שה-PH=8.4-8.9.
3. מבצעים פילטרציה.

5.2.2.9 פוליאתילן גליקול (PEG 50%w/v)

1. במשך 30 דקות ממיסים ב-35ml של מים מזוקקים 50gr של PEG MW=3350.
2. מביאים לנפח של 100ml עם מים מזוקקים.
3. מבצעים סטריליזציה או אוטוקלאב.

5.3 שיטות מולקולריות ואנליזות ביוכימיות

5.3.1 שימוש באנזימי הגבלה (Restriction enzymes)

האנזימים נקנו מהחברות Boehringer-Mannheim, Bio-Lab ו-MBI. תנאי הריאקציה ע"פ הוראות היצרן. בנפח ריאקציה של 20µl הכיל:

DNA 2-3µl- (0.5-2µg)

restriction enzymes 1-2µl- 10 units

2µl- X10 reaction buffer

15µl – H₂O

5.3.2 שימוש באנזימים למודיפיקציות שונות (Modifying enzymes)

ליגציה - ריתוך מחדר לתוך פלסמיד

מחדר של DNA שנחתך בקצוות באנזימי רסטריקציה (הגבלה) חובר לפלסמיד שנחתך בהתאמה באותם האנזימים. תנאי הריאקציה: מחדר ופלסמיד ביחס מולרי 1:3, אנזים T4 DNA Ligase 1- 2 units ובופר לגציה המכיל ATP, תמיסת הריאקציה הושלמה ל-15µl והדגרה בטמפרטורה של 12°C למשך הלילה.

דפוספורילציה – הסרת זרחה מקצוות של מולקולת DNA

דפוספורילציה נעשתה בחלק מהמקרים של שיבוט DNA לפלסמידים, וזאת על מנת למנוע העדפה של סגירת הפלסמיד על עצמו במקרה של חיתוך חלקי או במקרה של חיתוך באנזים הגבלה אחד. הריאקציה נעשתה בעזרת האנזים Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) והבופר שלו מחברת Roche לפי הוראות היצרן. לאחר מכן ה-DNA הורץ על גיל על מנת להיפטר מהאנזים והמקטע הופק מהגיל.

1. לראקציית החיתוך בנפח 20µl הוספו 0.5 units של האנזים Alkaline phosphatase.
2. הריאקציה הודגרה ב-37°C למשך 30 דקות.
3. לאחר מכן הוסף עוד 0.5 units של האנזים Alkaline phosphatase למשך 30 דקות נוספות ב-37°C.
4. הריאקציה הופסקה ע"י הדגרה ב-65°C למשך 15 דקות או ע"י הרצה מיידית על הג'ל.
5. הדנ"א נשמר ב-20°C.

5.3.3 זיהוי והפרדה של DNA בג'ל אלקטרופורזה (Sambrook et al., 1989)

אלקטרופורזה ה DNA הפלסמידי נעשית בג'ל אגרוז במתח של 50-100 Volt. ריכוז הג'ל (בין 0.8-2%) נקבע בהתאם לגודל מקטעי ה DNA אותם יש להפריד, (0.8% - 1-30Kb, 0.5-10Kb - 1%, 0.05-2Kb - 2%), האגרוז מאיכות ultra pure reagent הותך בבופר הרצה TAE לצביעת ה DNA הוסף EtBr בזמן הכנתו בריכוז סופי של 0.5µg/ml, לעיתים נצבע ה DNA שבג'ל לאחר התהליך על ידי השרייתו בתמיסת EtBr בריכוז 0.01% למשך 20 דקות. הג'ל נבדק על שולחן U.V וצולם במצלמת פולרואיד.

חיתוך DNA ובידודו מג'ל אגרוז

DNA נחתך באנזים הגבלה והורץ על ג'ל אגרוז. מקטע ה DNA שזוהה על פי גודלו ומיקומו- נחתך מהג'ל ונוקה באחת מהשיטות הבאות:

1. ערכה לניקוי DNA מג'ל אגרוז:

מקטע בגודל 40bp-10kb עבר ניקוי בעזרת ערכה מסוג:

Jet Quick Gel Extraction Spin kit/50 Cat No 420050 לפי הוראות היצרן

2. הקפאה, הפשרה והשקעה:

1. קובייה של ג'ל שהכילה את מקטע ה DNA נחתכה והוקפאה בחנקן נוזלי למשך 2-3 דקות.

(איתור המקטע בג'ל נעשה בעזרת מגש UV).

2. לאחר ההקפאה הופשר המקטע בטמפרטורה של 37°C - 40°C עד להפשרה מלאה.

3. המקטע סורכז בצנטריפוגת אפנדורף למשך 20 דקות.

4. הנוזל העליון הוצא ונעשתה השקעה אתנולית.

5.3.4 השקעה אתנולית

תהליך ההשקעה שימש בהפקה של DNA מחיידקים ע"מ להגיע לריכוזים גבוהים של DNA כאשר היה מדובר ב פלסמיד שהינו בעל מספר העתקים נמוך, או לצורך טרנספורמציה לפרוטופלסטים.

1. לתמיסת ה- DNA בנוזל מוסיפים 3M NaAcet, PH 5.2 (1/10 הנפח) ו- 2-2.5 נפחים של אתאנול קר.

2. ערבוב עדין ללא וורטקס.

3. הקפאה למשך 20 דקות ב- 80°C או שעתיים עד o.n ב- 20°C.

4. סרכוז למשך 10 דקות.

5. שוטפים פעמיים באתנול 70%.

6. יבוש המשקע ע"י ואקום או בפלטה 50°C.

7. הרחפה במים או TE.

8. חימום בטמפרטורה של 55 °C למשך 10 דקות.

5.3.5 ראקצית PCR (Polymerase Chain Reaction)

השימושים ב PCR לעבודתי:

1. יצירת מקטעים מקוצרים של ה-CP המכילים אתר שיבוט לוקטורים במערכת השימרת

2. יצירת מוטציות נקודתיות ב-CP.

3. וידוא טרנספורמציות לשמר.

4. וידוא ליגציות וטרנספורמציות לחיידקים.

הראקציה בוצעה ע"פ: (Kwok and Higuchi., Ochman *et al.*, 1989) במכשיר מסוג

T-Gradient של חברת Biometra (תמר).

עיקרון השיטה: שיכפול מקטע DNA ספציפי על ידי שימוש בשני פריימרים הומולוגיים לשני קצוות המקטע. האנזים Taq DNA polymerase (שבמקור בודד מהחיידק התרמופילי *Thermophilus* ולכן עמיד ופעיל בטמפרטורות גבוהות שחיוניות לתהליך), מסנתז גדיל חדש על בסיס התבנית של מקטע ה DNA בהמשך לפריימרים (ומשתמש בנוקלאוטידים שמסופקים בתמיסת הראקציה), הגדיל החדש שסונתז משמש במחזור הבא כתבנית שעליה מסונתז גדיל נוסף וכן הלאה בהתאם למספר המעגלים שבריאקציה, כך שהעלייה היא אקספוננציאלית. בכל מעגל בריאקציה מתבצעים הצעדים הבאים:

א. Denaturation - חימום ה DNA (גורם להפרדות הגדילים) - 94 °C למשך 30-60 שניות.

ב. Annealing - הורדת הטמפרטורה בהתאם ל T_m של הפריימרים, -חיבור הפריימרים עם הגדילים המשלימים להם. למשך 30-60 שניות.

ג. Elongation - חימום לטמפרטורה האופטימלית לפעילות האנזים 72°C. בשלב זה האנזים מאריך את הפריימרים לסגירת המרווח שביניהם ולקבלת גדיל קומפלמנטרי לגדיל ששימש כתבנית. משך הריאקציה 90-120 שניות.

- בפלסמידים ובסריקה של חיידקי *E.coli* ושמרים לנוכחות של מקטע DNA נעשה שימוש בתוכנית שכללה 30 מחזורים.
- ב site directed mutagenesis מבוצעים רק 15 מעגלים ע"מ למנוע הגברה של טעויות בסינתזה מאחר שהאנזים מסנתז מקטעים ארוכים (פלסמידים שלמים).

תערובת הראקציה:

1. 1-2 μ l DNA בריכוז של 40 ng/ μ l-50ng/ μ l.

2. כ- 55 ng/ μ l מכל אחד מהפריימרים.

3. 1 μ l מתערובת 10mM dNTPs (נמהל מראש).

4. $2.5\mu\text{l}$ בופר ריאקציה (מכיל יוני Mg^{2+})
 5. 1-2 units אנזים Taq polymerase (של MBI).
 6. להשלים ב ddH_2O לנפח של $25\mu\text{l}$.
- במקרים רבים רוכזו מרכיבי תערובת הריאקציה של מספר ריאקציות (תמיסת סטוק=MIX) ורק אז נעשתה חלוקה למבחנות הריאקציה.

Site directed mutagenesis

טכניקה זו מאפשרת יצירת מוטציות נקודתיות באזורים ספציפיים על פני הפלסמיד. השלבים ביצירת המוטציה:

1. יש להעביר את קטע ה-DNA שברצוננו לשנות לווקטור קטן יותר, ע"מ למנוע שגיאות לא מכוונות.
2. יש לסנתז פריימרים משלימים בגודל של 30 bp בניקיון של HPSF כשבמרכזם הם מכילים את השינוי בנוקלאוטיד הרצוי.
3. מריצים ריאקציית PCR בסידרת מיהולים של DNA תבניתי 5-50 ng, כביקורת מעמידים ריאקציה ללא פולימראז ע"מ לוודא שתוצרי ה-PCR הם רוב במבחנה.
4. מבצעים ריאקציית חיתוך עם האנזים Dpn I של חברת Bio-Lab, החותך DNA ממותל (לא תוצר PCR=לא מכיל את המוטציה הנקודתית). $1\mu\text{l}$ אנזים מוסף לכל מבחנת ריאקציה ואינקובציה ב- 37°C למשך 90 דקות.
5. מוודאים בהרצה על ג'ל שישנו DNA במבחנות הריאקציה ובביקורת ללא פולימראז, כל ה-DNA עבר דגרדציה.
6. מבצעים טרנספורמציה ורצוי להשתמש במושבות מהמיהול הכי גבוה.
7. ע"י קביעת רצף מוודאים את המוטציה.
8. החזרת הגן עם המוטציה אל הוקטור הרצוי.

5.3.6 רשימת פריימרים

להלן פירוט רשימת הפריימרים שבהם השתמשתי לעבודה :

No	name	Sequence	שימוש	producer	Tm° c
1	cp-mut1 F	5' cga tgg gga tcc atg tcg aag cca cca 3'	יצירת CP עם מוטציה נקודתית ב-NLS	IDT	67.8
2	Cp-ApaI R	5' cca gag ggc cca cca ata act gta g 3'	יצירת CP מקוצר 1-190 aa	IDT	62.5
3	Mut3-F	5' gtc tgc aag gtt cgc cta agg ctg aag ttc gac 3'	Site directed mutagenesis	MBC	71.9
4	Mut3-R	5' gtc gaa gtt cag cct tag gcg aac ctt cga gac 3'	Site directed mutagenesis	MBC	71.9
5	HindIII 184aaCP R	5' aag ctt aaa ttt cct cat cac ttg aaa cc 3'	ליצירת CP מקוצר 1-184aa	MBC	61
6	EcoRI-F	5' caa gaa ttc cga tgg gga tcc atg tcg 3'	פריימר לשיבוט ה-CP השלם לתוך הפלסמיד pJG4-5	IDT	61.1
7	XhoI-R	5' ctt ctc gag cag ctg cag tta att tga ta 3'	פריימר לשיבוט ה-CP השלם לתוך הפלסמיד השמרי pJG4- 5	IDT	58.8
8	XhoI-184R	5' ctt ctc gag tta aaa ttt cct cat cac ttg 3'	פריימר לשיבוט CP מקוצר לתוך הפלסמיד השמרי pJG4- 5	IDT	56.1
9	EcoRI-2F	5' caa gaa ttc cga tgg gga tcc atg tcg acg cca 3'	לשיבוט CP עם שתי מוטציות נקודתיות ב-NLS	IDT	66.8
10	EcoRI- 41F	5' caa gaa ttc aag cga cga tca tgg acg 3'	לשיבוט CP החסר 40 חומצות אמינו מהקצה האמיני	IDT	59.8
11	EcoRI-53F	5' ccc gaa ttc ccc aga ata tac aga atg tat 3'	ליצירת CP החסר 53 חומצות אמינו מהקצה האמיני	IDT	57.9

12	pJG4-5 forward	5' gat gcc tcc tac cct tat gat gtg cc 3'	לקביעת רצף	IDT	62.5
14	pJG4-5 reverse	5' gga gac ttg acc aaa cct ctg gcg 3'	לקביעת רצף	IDT	62.5
14	1113+forward	5' aaa tgc ata tat ttt tta ggt aaa g 3'	לקביעת רצף של CP מחומצה אמינית 113 והלאה	IDT	52.1
14	BglIII nCP-F	5' act cag atc tgc atg tgc aag cga cca 3'	לשיבוט ה-CP ו- CP mut3 ל- CFP בפלסמיד pSAT (FRET)	IDT	62.6
15	EcoRI CP-nR	5' gca gaa ttc att tga tat tga atc 3'	לשיבוט CP ו- Cpmut3 ל- CFP בפלסמיד pSAT (FRET)	IDT	48.9
16	BglIII cCP-F	5' ctcaga tct atg tgc aag cga cca 3'	לשיבוט CP ו- CP mut3 ל- YFP בפלסמיד pSAT (FRET)	IDT	58
17	EcoRI cCP-R	5' tgc aga att cga tta att tga tat tga atc 3'	ליצירת CP ו- CP mut3 המאוחד ל- YFP בפלסמיד (FRET) pSAT	IDT	53.2
18	BglIII C4-F	5' act cag atc tgc atg ggg aac cac 3'	לשיבוט C4 המאוחד ל- CFP בפלסמיד pSAT (FRET)	IDT	60.2
19	EcoRI C4-R	5' gca gaa ttc ata tat tga ggg cct cgg 3'	לשיבוט C4 המאוחד ל- CFP בפלסמיד pSAT (FRET)	IDT	59.1
20	1-kara-US	5' gag atc tat gtc act gag gcc gaa 3'	פריימר לאיחוי Karyopherin ל- $\alpha 1$ YFP (FRET)	IDT	57.9
21	2-kara-DS	5' cga att cca tca act gaa gtt aaa tcc tcc cga 3'	פריימר לאיחוי Karyopherin ל- $\alpha 1$ YFP (FRET)	IDT	61.2
22	3-35Sprom-e-US	5' gga cgt cga gag ttc tca a 3'	לקביעת רצף לחלבונים המשובטים בקצה האמיני של פלסמיד pSAT	IDT	53.9

			(FRET)		
23	4-35Sterm-s-DS	5' gac tgg tga ttt ttg cgg ac 3'	לקביעת רצף לחלבונים המשובטים בקצה הקרבווקסילי של פלסמידי של pSAT (FRET)	IDT	54.5

5.3.7 קביעת רצף הבסיסים של DNA

קביעת רצף הבסיסים נעשה עפ"י שיטת Sanger, המבוססת על עקרון "קטיעת השרשרת" (chain termination method) (Sanger *et al.*, 1977), במכשיר Applied Biosystem 373A TaqDeoxy Terminator Cycle Sequencing Applied Biosystem 373A DNA sequencer בחברת MBC. בעבודה זו נעשה קביעת רצף לצורך אישור הליגציה ע"י שימוש בפריימרים הספציפיים מתוך רצפים הסמוכים למקום המחדר. ובשיטה זו נקבע רצף הבסיסים לאורך כל המחדר. קביעת רצף הבסיסים נעשתה בשני הכיוונים לאורך כל המחדר.

5.3.8 אנליזת מחשב של רצפי DNA

אנליזת מחשב של רצפים נעשתה בתוכנת DNAMAN (Lynnon BioSoft).

5.3.9 הפקת DNA

1. הפקה של DNA פלסמידי בכמות של מספר מיקרוגרם (מיניפרפ) מחיידקי *E. coli*:

הפקה בעזרת ערכה של חברת QIAGEN:

Mini OIAprep Spin Miniprep Kit cat:27104

לפי הוראות היצרן.

2. הפקה של DNA פלסמידי בכמות של עשרות מיקרוגרם (מידפרפ) מחיידקי *E. coli*:

הפקה בעזרת ערכה של חברת Nucleobond (Bio Lab LTD):

NucleoBond PC100 Kit (20 preps) cat:740573

לפי הוראות היצרן בשיטה A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA (Birnboim 1979).

5.3.10 החיידק ששימש אותי בעבודתי

זו החיידק, *E. coli*:

- **DH10B** חיידק זה שימש אותי להכנת חיידקים אלקטרוקומפטנטים בייעילות גבוהה מאוד ($>10^8$ colony/ μ g DNA) וע"כ איחסן פלסמידים שעברו ליגציה לחלקי ה-CP השונים.

גנוטיפ החידק:

F', endA1, hsdR17(r_k - m_k +), supE44, thi-1, recA1, gyrA, (Nal^r), relA1, D(lacZYA-argF)_{u169}, (80lacZ M15), mcrA, mcrBC, mrr, hsdRMS.

5.3.11 החדרת פלסמידים לחיידקים קומפטנטיים

במהלך העבודה נעשה שימוש בשתי שיטות להחדרה של פלסמידים לחיידקים; הראשונה -מכת חום וקור, והשנייה שימוש באלקטרופורטור.

הכנת חיידקים קומפטנטיים (*E. coli*) עם $CaCl_2$ לטרנספורמציה לחיידקים באמצעות שוק חום-

קור

1. גידול חיידקים ב- 5 ml של over night LB ב- $37^\circ C$, במבחנה סטרלית של 50 ml.
2. מוהלים את התרבית פי 100 עם מצע LB וממשיכים לגדל עד ל- $OD=0.4-0.6$ במשך כ- 2-3 שעות.

- מרגע זה מתחילים לעבוד בקרח

מקררים תמיסת $CaCl_2$ 0.1 M, גליצרול 80%.

4. מקררים צנטריפוגה ל- $4^\circ C$.

5. מחלקים את החיידקים לשני מיכלים.

6. מסרכזים 8 דקות במהירות 6000 rpm ב- $4^\circ C$.

7. שופכים בעדינות נוזל עליון.

8. מרחיפים את המשקע ב- 31 ml $CaCl_2$ 0.1 M לכל מיכל.

9. אינקובציה בקרח למשך 20 דקות.

10. מאחדים את שני המיכלים, מסרכזים 8 דקות במהירות 6000 rpm ב- $4^\circ C$.

11. שופכים נוזל עליון.

12. מרחיפים באיטיות ב 14 ml $CaCl_2$ 0.1 M.

13. מוסיפים 6.5 ml גליצרול 80% ומערבבים בעדינות.

14. מחלקים למבחנות אפנדורף בקרח וזורקים לחנקן נוזלי.

15. שומרים ב- -80 .

החדרת פלסמידים לחיידקים (טרנספורמציה) בעזרת שוק חום וקור

1. הפשרת החיידקים הקומפטנטיים בקרח.
2. $1-2\ \mu\text{l}$ של דני"א פלסמידי ($100-300\ \text{ng}$) הוספו ל $100\ \mu\text{l}$ חיידקים קומפטנטיים והונחו בקרח למשך 30 דקות.
3. החיידקים הועברו ל 42°C למשך 2 דקות ומיד אח"כ הועברו לקרח למשך 5 דקות.
4. החיידקים אוששו עם $1\ \text{ml}$ מצע LB.
5. החיידקים טולטלו למשך שעה וחצי ב 37°C .
6. החיידקים סורכזו למשך 5 דקות ב- $5000\ \text{rpm}$.
7. המשקע הורחף ב $100\ \mu\text{l}$ ונזרע על גבי צלחת פטרי עם מצע LB והאנטיביוטיקה המתאימה לסלקציה.
8. הצלחות הודגרו ב 37°C למשך הלילה.

הכנת חיידקים אלקטרוקומפטנטיים (*E. coli*)

1. גידול חיידקים ב- $5\ \text{ml}$ LB over night ב- 37°C , במבחנה סטרילית של $50\ \text{ml}$.
2. מוהלים את התרבית פי 100 עם מצע LB וממשיכים לגדל עד ל- $\text{OD}=0.5-1.0$ למשך כ- 2-3 שעות.
3. מניחים את התרבית בקרח ל- 15-30 דקות.
4. מסרכזים ב- $4700\ \text{rpm}$ למשך 15 דקות ב- 4°C .
5. שפיכת נוזל עליון והרחפה של המשקע בנפח זהה של מים סטרילים קרים.
6. מסרכזים ב- $5000\ \text{rpm}$ למשך 15 דקות ב- 4°C .
7. שפיכת נוזל עליון והרחפה של המשקע במחצית הנפח עם גליצרול 10% קר.
8. מסרכזים ב- $5800\ \text{rpm}$ למשך 15 דקות ב- 4°C .
9. שפיכת נוזל עליון והרחפה של המשקע ב- 2% מהנפח ההתחלתי עם גליצרול 10% קר.
10. מסרכזים ב- $6200\ \text{rpm}$ למשך 15 דקות ב- 4°C .
11. שפיכת נוזל עליון והרחפה של המשקע ב- 0.3% מהנפח ההתחלתי עם גליצרול 10% קר.
12. בקרח מחלקים את החיידקים למבחנות אפנדורף ($1.5\ \text{ml}$) מסומנות.
13. החיידקים מאוחסנים בטמפרטורה של -80°C .

החדרת פלסמיד לחיידקי *E. coli* אלקטרוקומפטנטיים.

הטרנספורמציה בוצעה בתנאים הבאים:

1. $50\ \mu\text{l}$ חיידקי DH10B קומפטנטיים שהופשרו בקרח עורבבו בקיווטה קרה עם $1\ \mu\text{l}$ של DNA
2. מתן פולס חשמלי בערכים הבאים: $400\ \Omega$ ו- $V1500$ (באמצעות המכשיר electroporator 2510 של חברת Ependorf).

3. מיד לאחר הפולס החשמלי מוסיפים לחיידקים 1ml תמיסת Soc (לאישוש החיידקים).
4. החיידקים מועברים לטמפרטורה של 37°C למשך 1.5 שעות בטילטול.
5. זורעים את החיידקים ע"ג צלחות פטרי עם מצע סלקציה מתאים ומגדלים במשך 16 שעות ב-37°C.

5.3.12 בדיקת יעילות החיידקים הקומפטנטיים

1. 0.01 ng של הפלסמיד Puc19 הוחדרו לחיידקים באופן שתואר קודם.
2. 100 µl מהתרבית נזרעו במיהולים של 1, 10, 100 x על גבי צלחות פטרי LB עם האנטיביוטיקה Ampicilline בריכוז סופי של 100 µg/µl.
3. התרבית הודגרה ב 37°C למשך הלילה.
4. המושבות נספרו וחושבה הקומפטנטיות עבור 1 µg של DNA.
5. כביקורת בוצע התהליך גם עם חיידקים קומפטנטיים ללא דנ"א.

5.3.13 שימור חיידקים מותמרים

1. חיידקים ממושבה בודדת גודלו ב - 5ml מצע נוזלי LB שהכיל את האנטיביוטיקה המתאימה בטמפרטורה של 37°C במשך 16 שעות .
2. 0.5 ml מהחיידקים עורבבו בעזרת וורטקס עם 0.5ml תמיסת Medium Hogness Freezin ונשמרו בטמפרטורה של -80°C.

5.3.14 פלסמידים ששימשו בעבודה זו:

עבור חיידקי *E. coli*:

שם הפלסמיד	עמידות	מקור
pSAT6-EYFP-C1	Amp	Tzfria <i>et al.</i> , 2005
pSAT6A-ECFP- N1	Amp	Tzfria <i>et al.</i> ,2005

עבור השמרים

שם הפלסמיד	עמידות בחיידיקים	סלקציה בשמרים	מקור
pJG4-5	Amp	trp	Ausubel <i>et al.</i> , 1994
pEG202	Amp	his	Ausubel <i>et al.</i> , 1994
pSH18-4	Amp	ura	Ausubel <i>et al.</i> , 1994
pSH17-4	Amp	his	Ausubel <i>et al.</i> , 1994
pRFHMI	Amp	his	Ausubel <i>et al.</i> , 1994

בחיידיקים ישנה עמידות לאנטיביוטיקה אמפיצילין ובשמרים הפלסמידים מעניקים יכולת גדילה ללא חומצות אמינו טריפטופאן (trp), היסטידין (his) והנוקלאוטיד אורציל (ura).

5.4 שיטות ל- Yeast Two Hybrid System

5.4.1 הכנת שמרים קומפטנטיים באמצעות LiAc והחדרת פלסמיד (Gietz et al., 1995)

1. גידול שמרים ב-30 ml YPD - over night ב-28°C, בארלנמייר 125 ml.
2. בבקר לגדל עד ל-1 OD=0.5 ב-600 nm.
3. חלוקה ל-2 מבחנות 15 ml כל אחת, מסרכזים ב-5000 rpm למשך 5 דקות בטמ"פ החדר.
4. שפיכת נוזל עליון והרחפה של המשקע במחצית מהנפח ההתחלתי עם מים סטריליים (לכל מבחנה 7.5 ml)
5. מסרכזים ב-5000 rpm למשך 5 דקות.
6. שפיכת נוזל עליון והרחפה של המשקע ב-2% מהנפח ההתחלתי עם 100 mM LiAc במבחנת אפנדרוף.
7. מסרכזים ב-13000 rpm למשך 15 שניות.
8. מוציאים נוזל עליון והרחפה של המשקע לנפח סופי של 1% מהנפח ההתחלתי עם 100 mM LiAc.
9. מבצעים וורטקס לתרחיף התאים ומחלקים 50 µl לכל מבחנה סטרילית סה"כ 7-8.
10. משקיעים את התאים ומוציאים LiAc.
11. לכל מבחנה מוסיפים את המרכיבים הבאים בסדר הנ"ל לקבלת תערובת הטרנספורמציה:
 1. 240 µl PEG (50%w/v)
 2. 36 µl 1M LiAc
 3. 25 µl ssDNA (2mg/ml)
 4. 50 µl water and plasmid DNA (0.1-10µg)
12. מערבבים בחוזקה כל מבחנה בוורטקס למשך דקה.
13. אינקובציה 30 דקות ב-28°C.
14. שוק חום ב-42°C למשך 20-25 דקות.
15. מסרכזים ב-6000 rpm למשך 15 שניות ומוציאים את תערובת הטרנספורמציה.
16. מרחיפים עם 500 µl מים סטריליים כל אחת מהמבחנות.
17. מורחים כ-200 µl מתערובת הטרנספורמציה על צלחות עם המצע המתאים לסלקציה של מושבות המכילות את הפלסמיד.
18. ממתינים כ-2 ימים להופעת מושבות ב-28°C.

5.4.2 הכנה לאינדוקציה

מושבות חיוביות גודלו במצע נוזלי חסר יורציל, היסטידין וטריפטופאן ובנוכחות הסוכרים גלקטוז ורפינוז over night. גלקטוז מאקטב את פעילות הפרומוטור Gal1 אשר מבקר את שיעתוק הגנים ורפינוז משמש כמקור אנרגיה. גלוקוז מדכא את הפרומוטור Gal1 אשר מבקר את הגן לשיפעול המערכת השמרית ולא יהיה שיעתוק של הגנים.

5.4.3 בדיקת הביטוי של β -galactosidase כמבחן לאינטראקציה של החלבונים.

5.4.3.1 מבחן איכותי לביטוי β -galactosidase

הגן *lacZ* של *E.coli* מקודד לאנזים β -galactosidase, אשר מבצע הידרוליזה של מגוון β -D-galactosides, כולל סובסטרטים עם תוצר פירוק בעל צבע. בגלל הקלות והרגישות של מבחן זה, ניתן לבחון (על-פי מידת ביטוי האנזים) בשיטה זאת מושבות שמר ששובטו לתוכם שלושת הפלסמידים.

ישנן שתי דרכים לבדיקה האיכותית:

א. פרוטוקול זה מתאר שיטה פשוטה ומהירה לאנליזה של מספר מושבות שמר בו-זמנית, ליכולתם לבטא β -galactosidase. שיטה זאת, מבוססת על מבחן צבע כחול/לבן של מושבות שהועברו לממברנת ניילון, הנה פחות רגישה מבחינה כמותית. בשיטה זאת שוברים את ממברנת התאים ע"י הקפאה בחנקן נוזלי. הסובסטרט בשיטה זאת הנו:

(X-Gal) Brom-4-Chlor-3-Indolyl-b-D-5 galactopyranosid.

1. מורחים מושבה בודדת של שמר המכילה את שלושת הפלסמידים בצלחת מצע:

CM: ura^- , his^- , trp^- ומגדלים 48 שעות ב- $28^\circ C$.

2. מניחים ממברנת ניילון Hybond-N של Amersham על הצלחת ולוחצים בעדינות לספיחת המושבות על הממברנה.

3. מרימים את הממברנה ומכניסים לחנקן נוזלי.

4. מוציאים את הממברנה מהמיכל עם החנקן הנוזלי ומניחים על נייר ווטמן כ-5 דקות עד להפשרת הממברנה, חוזרים על פעולה זאת 3 פעמים.

5. מכינים צלחות פטרי עם נייר ווטמן 3MM ומספיגים את הנייר בבופר Z המכיל 1mg/ml X-gal. את ממברנת הניילון מניחים מעל לוטמן ומאפשרים לבופר להיספג בממברנה.

6. מניחים את הצלחת ב- $28^\circ C$ וצבע כחול במושבות המבטאות את האנזים מופיע בביטוי מוגבר תוך מספר דקות ובמושבות עם פעילות מועטה תוך לילה. מושבות שלא מבטאות את האנזים ישארו לבנות.

ב. זריעת שמרים על גבי צלחות אינדוקציה (בנוכחות גלקטוז ורפינוז) בתוספת הסובסטרט X-Gal (20mg/ml), יגרמו לשמרים לבטא את הגן המדווח *lacZ* (במקרה ומתרחשת אינטראקציה

בין שני החלבונים הנבדקים), תוצר הגן הוא ל- β -galactosidase אשר יפרק את הסובסטרט X- (Gal). תוצר הפירוק הוא בעל צבע כחול.

5.4.4 מבחן איכותי ליכולת גזילה ללא לאוצין

בכרומוסום השמר EGY48 נמצא הגן LEU2 לסינתזה של חומצה אמינית לאוצין. גן זה אינו פעיל בשמר, כיוון שרצפי הבקרה שלו הוחלפו. מושבות שמר אשר נוצר בהם קשר חלבוני CP- CP יכולות לפיכך לגדול על מצע חסר לאוצין. לבחינת מושבות שמר ששובטו לתוכם הפלסמידים המכילים מקטעי CP, זרעתי מושבות אלו על מצעים חסרי אורציל, היסטידין, טריפטופאן ולאוצין לסלקציה של מושבות המכילות את הפלסמיד הנבחן לעומת מושבות שגודלו במצעים חסרי יורציל, היסטידין וטריפטופאן בלבד.

1. גידול מושבות שמרים המכילים את הפלסמידים ב-3ml מצע נוזלי: ura^- , his^- , trp^- CM: over night ב- $28^\circ C$, במבחנה סטרילית של 50ml.
2. מביאים את כל התרביות הנבחנות לאותה צפיפות אופטית (0.5-0.7) באורך גל 600nm.
3. מבצעים מיהולים של התרבית: ללא מיהול, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} .
4. זורעים $10\mu l$ מכל מיהול על צלחות: ura^- , his^- , trp^- , leu^- CM: ומגדלים ל 4-5 ימים ב- $28^\circ C$. זריעת השמרים במיהולים שונים מאפשרת איפיון כמותי של האינטראקציות.

שימור שמרים מותמרים

1. שמרים ממושבה בודדת גודלו ב-3 ml מצע CM ללא החומצות האמיניות טריפטופאן והיסטידין וללא הנוקלאוטיד אורציל בטמפרטורה של $30^\circ C$ במשך 16 שעות.
2. 1 ml מהשמרים עורבבו בעזרת וורטקס חזק עם $80\mu l$ DMSO, ונשמרו בטמפרטורה של $-80^\circ C$.

זן השמר ששימש אותי בעבודתי

Sacharomyces cerevisiae strain EGY48 (Ausubel *et al.*, 1994)

MAT α *trp1*, *his3*, *ura3*, 6 *lex Aopu-LEU2*.

5.5 טרנספורמציה ברת-חלוף של DNA לפרוטופלסטים

5.5.1 הפקת פרוטופלסטים (Giles 1983)

1. חותכים עלים מצמחים הגדלים בתנאים סטריליים, ודוקרים אותם ליצירת שטח פנים גדול יותר לצורך פעילות של אנזימים פרוטאוליטיים.
2. מדגירים את העלים עם אנזימים פרוטאוליטיים (mecerozyme, driselase, cellulase). אנזימים אלו יעכלו את דופן התא הצמחי ולמלת הביניים בין תאים שכנים ברקמה, וישחררו תאים בודדים חסרי דופן (פרוטופלסטים).
3. מנקים את הפרוטופלסטים בבקבוקי הצפה 3 פעמים בבופר CPW9M המכיל סוכרוז 0.4 M, אחרי סירכוז במהירות של 600 rpm במשך 10 דק'. פרוטופלסטים יצופו על פני הבופר ושיברי התאים ופרוטופלסטים מתים ישקעו אל תחתית הבקבוק.

5.5.2 טרנספורמציה ברת חלוף של DNA לפרוטופלסטים (Fromm et al., 1985)

1. הרחפה של פרוטופלסטים בבופר אלקטרופורציה.
2. הוספת DNA נעשה בעזרת אלקטרופורציה על-ידי מתן פולס חשמלי בערכים הבאים: 67Ω ו- V250 באמצעות מכשיר אלקטרופורטור ECM399 של חברת BTX (A division of Genetronic, Inc).
3. הוספת בופר התאוששות (MI) והדגרה למשך 18 שעות.

6. תוצאות

במהלך עבודתי בחנתי את תהליך יצירת קופסית הווירוס של צהבון האמיר של העגבנייה. כפי שידוע קופסית הווירוס בנויה מ-110 יחידות של חלבון יחיד, חלבון המעטפת (CP). לשם כך בדקתי אינטראקציות של חלבון המעטפת עם עצמו ועם המוטנטים בעלי מוטציות נקודתיות ומוטציות חסר שיצרתי בו וכן ועם שני חלבונים נוספים $\alpha 1$ Karyopherin ו-GroEL. שני חלבונים אלו ידועים ביכולת האינטראקציה שלהם עם חלבון המעטפת ובתרומתם להמשך קיום הווירוס והעברתו הלאה. האחד, Karyopherin $\alpha 1$, בתוך הצמח (עגבנייה) והשני, GroEL, בתוך כנימת עש הטבק.

הבדיקה התבצעה ראשית במערכת שמרית- Yeast Two Hybrid System, ולאחר מכן במערכת הצמחית, פרוטופלסטים, ע"י בדיקת FRET. המוטציות שיצרתי בחלבון המעטפת התבצעו בקצה האמיני האמיני ובקצה הקרבווקסילי של חלבון המעטפת. באזור ה-N טרמינלי התמקדתי ב-NLS.

6.1 יצירת מוטציות נקודתיות בחלבון המעטפת

מוטציות באזור ה-NLS

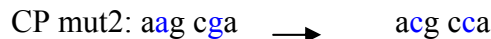
במהלך עבודתי תכננתי 4 חלבוני מעטפת מוטנטים באזור ה-NLS (תמונה מס' 5, הקטע המודגש בכחול).

חומצות האמינו אשר הוחלפו הן בעלות מטען חיובי בפלסמת התא, והן הוחלפו לחומצות אמינו ניטרליות ללא מטען.

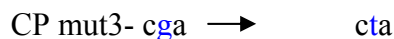
1. שינוי חומצה אמינית ארגינין בעמדה 4 לפרולין



2. שינוי חומצה אמינית ליזין בעמדה 3 לטראונין וחומצה אמינית ארגינין בעמדה 4 לפרולין.



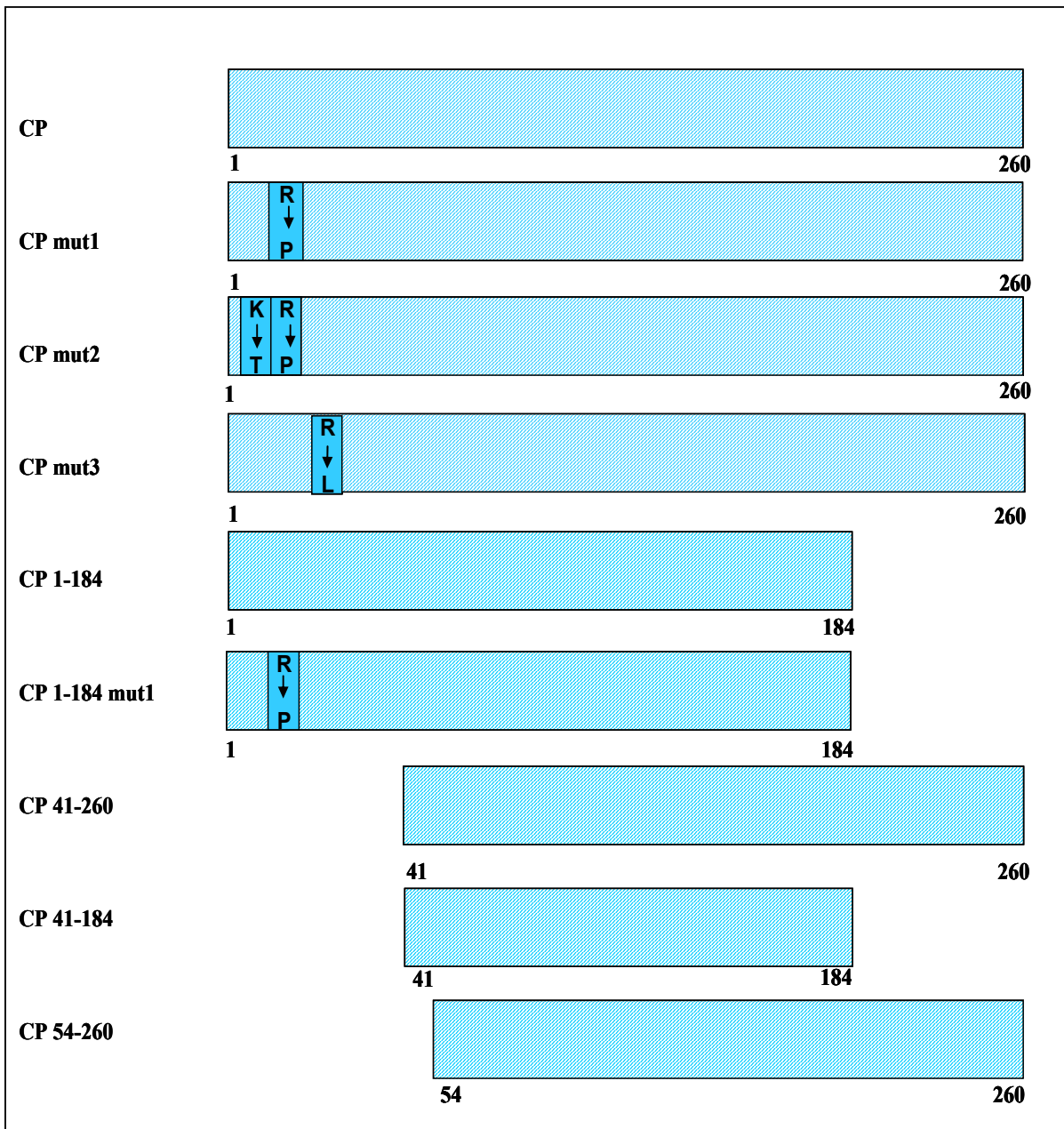
3. שינוי חומצה אמינית ארגינין בעמדה 19 ללאוצין



4. יצירת חלבון מעטפת שנקטעו ממנו 76 חומצות אמיניות מהקצה ה-C טרמינלי, כך שאורכו הנוטר 184, ובנוסף לכך מוטציה של החלפת ארגינין בעמדה 4 לפרולין, אותה מוטציה אשר תוכנה ב-CP . mute1

ג. יצירת חסרים בחלבון המעטפת

1. יצירת חלבון מעטפת החסר 76 חומצות אמינו **מהקצה הקרבוקסילי**: CP1-184.
 2. יצירת חלבון מעטפת החסר 40 חומצות אמינו **מהקצה האמיני**: CP 41-260 חלבון זה אינו מכיל את ה-NLS, החיוני לאינטראקציה של חלבון המעטפת עם עצמו.
 3. יצירת חלבון מעטפת בעל חסר בשני קצותיו, **בקצה אמיני ובקצה הקרבוקסילי** CP 41-184. חלבון זה חסר 40 חומצות אמינו בקצה האמיני וחסר 76 חומצות אמינו בקצה הקרבוקסילי. החסר כאן הוא בשני האזורים אשר חיוניים לאינטראקציה, והדבר עלול לפגוע ביכולת של חלבון המעטפת ליצור אינטראקציה עם עצמו, עם החלבון השלם ועם החלבון החסר.
 4. יצירת חלבון מעטפת החסר 53 חומצות אמינו **מהקצה האמיני** CP 54-260. החסרת 53 חומצות האמינו מורידה את רצף ה-NLS העיקרי הממוקם בתחילת החלבון (בין חומצות אמינו 20-3) וגם אזור המכיל רצף דמוי NLS המצוי בין חומצות אמינו 41-53. בעבודת המחקר של קוניק (Kunik *et al.*, 1999) נמצא אזור דמוי NLS הממוקם בין חומצות אמינו 40-53 ואשר יכול לתפקד כ-NLS כאשר ה-NLS העיקרי חסר, הנחה זו גרמה לי ליצור גן לחלבון המעטפת שיהיה חסר אזור זה ולבדוק את ההשפעה על האינטראקציה עם החלבון Karyopherin α 1.
- בתמונה מס' 11 ניתן לראות סכמה של חלבוני מעטפת מוטנטים שיצרתי במהלך עבודתי.



תמונה מס' 11 : תיאור סכמאטי למוטציות השונות שנעשו בחלבון המעטפת. מוטציות נקודתיות בקצה

האמיני ומוטציות חסר משני קצוות החלבון.

ארגינין=R, פרוליין=P, ליזין=K, טריאונין=T, לאוצין=L

Yeast Two Hybrid System 6.2

שיטה זו מתבצעת במערכת שמרית, בה ניתן לבדוק אינטראקציה בין שני חלבונים שונים לברר האם הם "מכירים" אחד את השני ויוצרים קשר ביניהם.

במקור פותחה מערכת זו על מנת לאפשר למצוא גנים של חלבונים לא ידועים הנקשרים לחלבון ידוע, מתוך ספריה של cDNA. בעבודתי משמשת המערכת על מנת לבחון קישור בין חלבון המעטפת עם חלבוני מעטפת מוטנטים של וירוס צהבון האמיר שתכננתי בעבודתי ועם שני חלבונים נוספים המעורבים באינטראקציה, GroEL ו-Karyopherin α 1.

זן השמר אשר שימש אותי הינו *Sacharomyces cerevisiae strain EGY48*. זן זה מכיל את הגן LEU2, גן לסנינתזת חומצה אמינית לאוצין המצוי בכרומוזום השמר. בגן זה הוחלפו רצפי הבקרה ע"י רצפי הבקרה של החלבון Lex A (Ebina et al, 1983), ולכן, אין השמר יכול לייצר בעצמו את החומצה האמינית לאוצין.

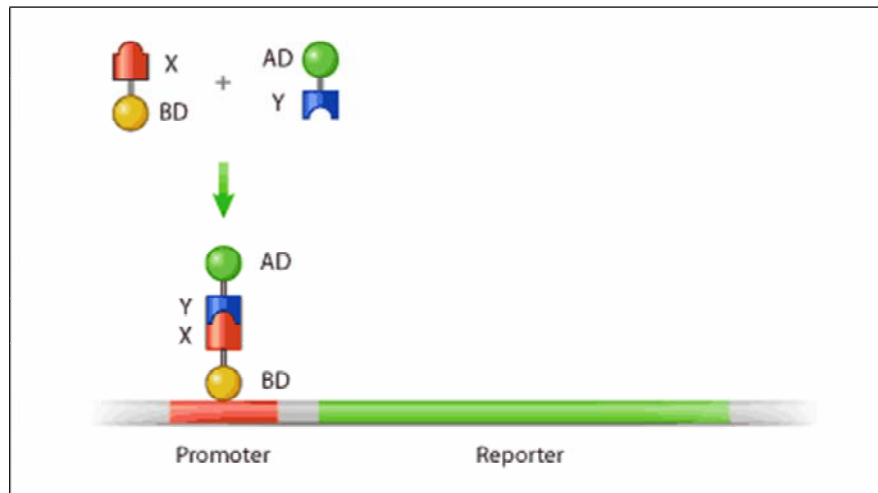
במערכת זו שלושה פלסמידים:

pEG202 – אליו שובטו: חלבון מעטפת שלם וחלבוני מעטפת מוטנטים והם מאוחים לחלבון LexA אשר מכיל את אתר הקישור **BD** (תמונה מס' 12) לאופרטור המצוי ב-pSH18-34 ובזן השמר EGY48, פלסמיד זה מכיל את הפרומוטור החזק של הגן ADH1-alcohol dehydrogenase משמרים. בנוכחות פלסמיד זה מתאפשר גידול שמרים בהיעדר חומצה אמינית היסטידין, ואילו בחיידקים הוא מקנה עמידות לאמפיצילין. פלסמיד זה מבוטא בשמר באופן תמידי.

pJG4-5 – אליו שובטו (באירועים נפרדים) החלבונים הבאים: חלבון מעטפת שלם, חלבוני מעטפת מוטנטים, הרצפטור הציטופלסמתי Karyopherin α 1 וחלבון הכנימה GroEL אשר התקבל ממעבדתו של פרופסור חנוך זוסנק מהפקולטה לחקלאות ברחובות. חלבונים אלו מאוחים לרצף B42 (מחיידקי *E. coli*) אשר מכיל את אתר השפעול **AD** (תמונה מס' 12) לסנינתזה של שני גנים מדווחים: 1. β -Galactosidase המצוי בפלסמיד pSH18-34. 2. LEU2 הנמצא על כרומוסום השמר EGY48. פלסמיד זה מקודד לרצף כניסה לגרעין (NLS) שמקורו בוירוס SV40 ונמצא תחת בקרת הפרומוטור GAL1 אשר עובר אינדוקציה בנוכחות הסוכר גלקטוז, ומדוכא בנוכחות גלוקוז. כמו כן מאפשר לשמרים גידול על מצע מזון ללא חומצה אמינית טריפטופאן, ובחיידקים מקנה עמידות לאמפיצילין.

pSH18-34 – מכיל את הגן המדווח *lacZ* שמקורו חיידקי. זהו גן לסנינתזת האנזים β -Galactosidase. פלסמיד זה מכיל כ-8 אתרי קישור לחלבון LexA. כאשר החלבון LexA יחד עם חלבון המעטפת המאוחד אליו נקשר לאופרטור בפלסמיד זה ומתרחש קישור של חלבון CP נוסף, אשר מאוחה לרצף B42 המכיל אתר שפעול, לחלבון המעטפת המאוחד ל-LexA יגרום לסנתוז הגנים המדווחים. פלסמיד זה בשמרים מאפשר גידול על מצע ללא יורציל ומקנה עמידות לאמפיצילין בחיידקים. כאשר יתבצע קישור בין שני החלבונים הנבדקים יתאפשר סנתוז של חומצה אמינית לאוצין והאנזים β -Galactosidase.

פלסמידים אלו ייחודיים בכך שהם מכילים שני Ori (אתר תחילת שיעתוק) אחד לשמר ואחד לחיידקים.



תמונה מס' 12 : תיאור סכמטי של Two Hybrid System, כאשר חלבון x המאוחה לחלבון המכיל אתר קישור (BD) מכיר חלבון y המאוחה לאקטיבטור (AD) הם נקשרים אחד לשני, וכיוון שהאקטיבטור נמצא מספיק קרוב לגן המדווח יתבצע שעתוק של הגן המדווח.

השלבים:

א. יצירת חלבוני מעטפת מוטנטים וחסרים. בריאקצית PCR. הפריימרים הוסיפו למקטע המשוכפל אתרי חיתוך לאנזימים: XhoI, EcoRI. יצירת המוטציות נעשתה בשתי שיטות:

1. גנים לחלבוני מעטפת מוטנטים נוצרו בריאקצית PCR על ידי שימוש בשני פריימרים, כאשר פריימר אחד מכיל את המוטציה הנקודתית ופריימר שני הוא פריימר קבוע, פריימר זה מכיל אתר חיתוך לאינזים ApaI אשר מצוי בגן לחלבון המעטפת עצמו, פריימר זה נותן תוצר מקוצר עם אתר רסטריקציה ל-ApaI. קיצור זה נועד למנוע מוטציות בריאקצית ה-PCR. המוטציה CPmut1 והגן לחלבון המעטפת המקוצר aa 1-184 שובטו לפלסמיד pRSET A.

2. ריאקצית PCR מיוחדת Site directed mutagenesis שבה נעשה שימוש בשני פריימרים המכילים את המוטציה, שני הפריימרים הם הופכיים ברצף על מנת לסנתז את כל הפלסמיד. המוטציה הנ"ל התבצעה בפלסמיד קטן יותר, pRSET A, אשר גודלו כ- 2.9 kb.

שיבוט החלבונים לפלסמידים שמריים

השיבוט נעשה על ידי יצירת אתרי רסטריקציה של EcoRI ו-XhoI בקצוות חלבון המעטפת ב-PCR. לאחר יצירת אתרי החיתוך, נעשה חיתוך וליגציה לתוך הפלסמידים: pJG4-5 ו-pEG202 אשר עברו חיתוך באותם אתרי רסטריקציה. תוצרי הליגציה עברו טרנספורמציה בשיטת שוק חום וקור לחיידקי *E. coli* מסוג DH10 β , החיידקים נרעו על צלחות LB עם אמפיצילין וגודלו ב-37°C למשך הלילה. לאחר הטרנספורמציה התבצעה בדיקת PCR למושבנות ובודדו המושבות

שנמצאו חיוביות. DNA מהמושבות החיוביות נשלח לקביעת רצף ולאחר קביעת הרצף הן עברו טרנספורמציה לשמר.

טרנספורמציה לשמרים.

שמרים מזן *Sacharomyces cerevisiae strain EGY48* הפכו קומפטנטים בשיטת: LiAc/sSS- DNA/PEG (Gietz *et al.*, 1995) רקטים המוכנים עברו קוטרנספרמציה אליהם, תוצרי הטרנספורמציה נזרעו על מצע מוצק: CM ura⁻, trp⁻, his⁻. ולאחר כיומיים הופיעו מושבות, המושבות עברו בדיקת PCR על ידי פריימרים ייחודיים כדי לוודא הצלחת הטרנספורמציה.

6.2.1 בדיקות האינטראקציות השונות של חלבון המעטפת אשר נבדקו ב- Two Hybrid System

להלן פירוט האינטראקציות השונות של חלבון המעטפת ומוטנטים מול עצמם ומול שני חלבונים נוספים Karyopherin α 1 ו-GroEL שבדקתי בעבודתי.
 1. אינטראקציה של חלבון המעטפת עם עצמו ומוטנטים שלו.

1	pSH18-34+ pEG202-CP+ pJG4-5- CP
2	pSH18-34+ pEG202-CP+ pJG4-5-CP mut1
3	pSH18-34+ pEG202-CP+ pJG4-5- CP mut2
4	pSH18-34+ pEG202-CP+ pJG4-5 -CP mut3
5	pSH18-34+ pEG202-CP+ pJG4-5-CP 1-184aa
6	pSH18-34+ pEG202-CP+ pJG4-5-CP 41-184aa mut1
7	pSH18-34+ pEG202-CP+ pJG4-5-CP 41-260aa
8	pSH18-34+ pEG202-CP+ pJG4-5-CP 41-184aa
9	pSH18-34+ pEG202-CP+ pJG4-5-CP 54-260aa

2. אינטראקציה של חלבוני מעטפת מוטנטים מול עצמם.

1	pSH18-34+ pEG202- CP mut1 + pJG4-5-CP mut1
2	pSH18-34+ pEG202- CP mut2 + pJG4-5- CP mut2
3	pSH18-34+ pEG202- CP mut3 + pJG4-5 -CP mut3
4	pSH18-34+ pEG202-CP1-184aa + pJG4-5-CP 1-184aa
5	pSH18-34+ pEG202-CP41-184aa mut1+ pJG4-5-CP 41-184aa mut1
6	pSH18-34+ pEG202-CP41-260aa + pJG4-5-CP 41-260aa
7	pSH18-34+ pEG202-CP 41-184aa + pJG4-5-CP 41-184aa
8	pSH18-34+ pEG202- CP 54-260aa + pJG4-5-CP 54-260aa

3. אינטראקציה של חלבון המעטפת ומוטנטים שלו עם חלבון הכנימה - GroEL

1	pSH18-34+ pEG202- CP + pJG4-5- GroEL
2	pSH18-34+ pEG202- CP mut1 + pJG4-5- GroEL
3	pSH18-34+ pEG202- CP mut2 + pJG4-5- GroEL
4	pSH18-34+ pEG202- CP mut3 + pJG4-5 - GroEL
5	pSH18-34+ pEG202-CP1-184aa + pJG4-5- GroEL
6	pSH18-34+ pEG202-CP41-184aa mut1+ pJG4-5 GroEL
7	pSH18-34+ pEG202-CP41-260aa + pJG4-5- GroEL
8	pSH18-34+ pEG202-CP 41-184aa + pJG4-5- GroEL

4. אינטראקציה של חלבון המעטפת ומוטנטים שלו עם הרצפטור הציטופלסמתי Karyopherin α 1

1	pSH18-34+ pEG202- CP + pJG4-5- Karyopherin α 1
2	pSH18-34+ pEG202- CP mut1 + pJG4-5- Karyopherin α 1
3	pSH18-34+ pEG202- CP mut2 + pJG4-5- Karyopherin α 1
4	pSH18-34+ pEG202- CP mut3 + pJG4-5 - Karyopherin α 1
5	pSH18-34+ pEG202-CP41-260aa + pJG4-5- Karyopherin α 1

בדיקות האינטראקציה נעשו בשתי דרכים :

1. על ידי פעילות הגן לאנזים β - Galactosidase: כאשר החלבונים מגיבים זה עם זה משופעל הגן

LacZ לקידוד האנזים β - Galactosidase.

זוהי בדיקה איכותית המבוססת על ריאקציית צבע, הסובסטרט הינו X Gal תוצר הפירוק נותן צבע כחול (ראה תמונה 14) .

הבדיקה לפעילות הגן נעשתה על גבי צלחות X-Gal ו-ע"י filter assay .

2. יכולת גדילה ללא לאוצין

בשיטה זו בודקים את פעילות הגן LEU 2, אשר נמצא בכרומוזום השמר EGY48. גן זה לא פעיל כיוון שרצפי הבקרה שלו הוחלפו ע"י רצפי בקרה של הגן LexA במידה ויהיה קישור בין שני החלבונים הנבדקים יתבצע שיעתוק של הגן לסינטזו חומצה אמינית לאוצין והשמרים יגדלו במצע מוצק חסר לאוצין (ראה תמונה 13) .

6.2.3 ביקורות ל- Yeast Two Hybrid System

Two Hybrid System היא שיטה מקובלת לבדיקת אינטראקציה עם שני חלבונים אך היא מחייבת ביקורות הן חיוביות והן שליליות, כדי לאמת את התוצאות.

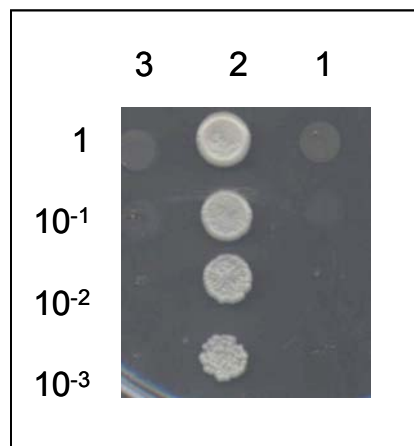
שני פלסמידים מהווים ביקורות למערכת השמרית:

1. **pSH17-4**: פלסמיד זה מכיל את החלבון Lex A (מכיל אתר קישור) אשר מאוחה לחלבון Gal4 (מכיל אתר שפעול). החלבון Lex A יחד עם החלבון Gal4 יקשרו לאופרטור ב-pSH18-34 ובכרומוסום השמר קישור זה יגרום לשעתוק של שני הגנים: *LacZ* ו-*LEU2*.

2. **pRFHM1**: פלסמיד זה מקודד לחלבון Lex A אשר מאוחה לקצה ה-C טרמינלי של חלבון Bicoid (אינו יכול לגרום לשפעול) מדרוזופילה, לפלסמיד זה אין יכולת לשפעל את המערכת. שני פלסמידים אלו כולל החלבונים משמשים באופן סטנדרטי כביקורת למערכת. לפיכך פלסמידים pSH17-4+ pSH18-34 משמשים יחדיו כביקורת חיובית ואילו הפלסמידים pRFHM1+ pSH18-34 יחדיו משמשים כביקורת שלילית (תמונות מס' 13-14). חלבון המעטפת של וירוס צהבון האמיר נבחן מול הפלסמיד pSH18-34 בלבד, על מנת לוודא שאינו משפעל את המערכת (תמונות מס' 13-14).

בתמונות מס' 13-14 ניתן לראות את הביקורות שבוצעו. הביקורות נבדקו ע"י שתי בדיקות.

1. בדיקה ליכולת גדילה על מצע חסר לאוצין (תמונה מס' 13) שם ניתן לראות שחלבון המעטפת לבד אינו יכול לשפעל את המערכת, ובביקורת החיובית ניתן לראות גדילה על המצע חסר הלאוצין בכל המיהולים. 2. בדיקת ביטוי האנזים β -Galactosidase (תמונה מס' 14), שם ניתן לראות ביטוי רק בביקורת החיובית.



תמונה מס' 13: בדיקת יכולות האינטראקציה של חלבוני הביקורת בשמרים על סמך יכולת גדילה על מצע חסר לאוצין במיהולים שונים (פקטורי מיהול בצד שמאל).

1: pRFHM1+ pSH18-34, 2: pSH17-4+pSH18-34, 3: pEG202-CP +pSH18-34



תמונה מס' 14: יכולות האינטראקציה של חלבוני הביקורת בשמרים על סמך בדיקת ביטוי האנזים β -Galactosidase.

1: pRFHMI+ pSH18-34, 2: pSH17-4+pSH18-34, 3: pEG202-CP +pSH18-34

6.2.4 האינטראקציה של חלבון המעטפת במערכת השמרית

6.2.4.1 בדיקת אינטראקציה של חלבון המעטפת של וירוס צהבון האמיר עם עצמו ועם המוטנטים

במחקר קודם שהתבצע במעבדה על ידי Hallan נמצא שחלבון המעטפת יוצר אינטראקציה עם עצמו על ידי קישור של קצה אמיני מול קצה קרבוקסילי (Hallan and Gafni 2001), על כן הנחנו שפגיעה באזורים אלו יכולה לפגוע באינטראקציה של חלבון המעטפת עם עצמו, ובכך לשבש את בניית קופסית הווירוס. פגיעה שכזו תסייע בעתיד למצוא פתרונות אשר יעזרו להילחם בוירוס צהבון האמיר, כגון חסימת אזורים בחלבון המעטפת החיוניים לאינטראקציה ע"י יצירת פפטידים כנגד אזורים אלו.

לימוד האזורים החיוניים לאינטראקציה העצמית של חלבון המעטפת נעשה ע"י שתי שיטות:

א. מוטציות נקודתיות בקצה האמיני של חלבון המעטפת.

ב. מוטציות חסר מהקצה האמיני של חלבון המעטפת, קרבוקסילי ושניהם יחד.

תוצאות האינטראקציה בין החלבון המעטפת השלם עם עצמו ועם חלבוני מעטפת מוטנטים מוצגים בתמונה מס' 15 ובטבלת הסיכום מס' 2 בעמוד 61:

1. חלבון המעטפת השלם עובר אינטראקציה עם עצמו.

2. CP mut1 (החלפה של ארגינין לפרולין בעמדה 4) נקשר לחלבון המעטפת השלם.

3. CP mut2 (החלפה של ליזין לטראונין בעמדה 3 והחלפה של ארגינין לפרולין בעמדה 4) נקשר לחלבון המעטפת השלם.

4. CP mut3 (החלפה של ארגינין ללאוצין בעמדה 19) נקשר לחלבון המעטפת השלם.

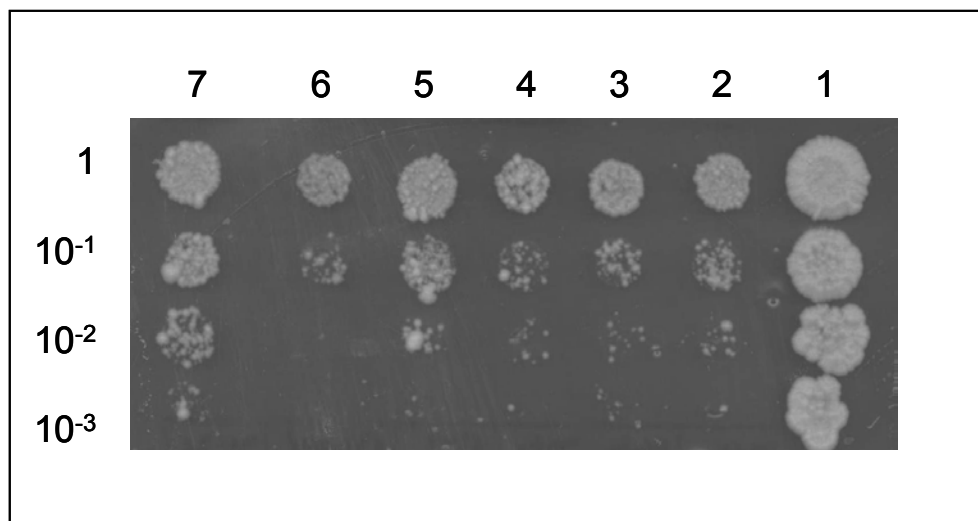
5. CP 1-184 ו-CP1-184mut1, שני חלבוני מעטפת מקוצרים, יצרו אינטראקציה עם חלבון המעטפת השלם.

7. CP 41-260 יצר אינטראקציה עם חלבון המעטפת השלם.

8. CP 41-184 לא יצר אינטראקציה עם חלבון המעטפת השלם {תמונה מס' 16 (1)}.
 חלבון המעטפת השלם נקשר לחלבון המעטפת אשר חסר 53 חומצות אמינו מהקצה האמיני
 (התוצאות אינן מוצגות).

רוב המוטנטים הצליחו לבצע קישור, והאינטראקציה היא אכן "ראש זנב" כמו שהניח Hallan,
 כלומר קצה אמיני של החלבון התקין נקשר לקצה קרבוקסילי של המוטנט ולהפך ולכן המוטציות
 הנקודתיות הממוקמות בקצה האמיני של חלבון המעטפת לא פגעו באינטראקציה עם החלבון
 התקין והדבר נכון גם לגבי מוטציות החסר פרט לחלבון המוטנטי אשר חסר חומצות אמינו משני
 קצותיו.

הצירוף היחיד בו נמנעה האינטראקציה הוא בין חלבון המעטפת השלם לבין החלבון שחסר 40
 חומצות אמינו מהקצה האמיני וחסר 76 חומצות אמינו מהקצה הקרבוקסילי (CP 41-184).



תמונה מס' 15: בדיקת האינטראקציה של חלבון המעטפת עם עצמו ועם מוטנטים שלו בשמרים, על סמך
 גדילה על מצע חסר לאוצין במיהולים שונים (פקטורי מיהול בצד שמאל).
 -1 CP+CP mut1, -2 CP+CP mut2, -3 CP+CP mut3, -4 CP+CP mut3, -5 CP+CP 1-184, -6 CP+CP 1-184 mut1, -7 CP+CP 41-260

6.2.4.2 אינטראקציה של חלבוני מעטפת מוטנטים, בינם לבין עצמם

לאור תוצאות האינטראקציה של חלבון המעטפת השלם עם המוטנטים החלטתי לבדוק
 אינטראקציה בין המוטנטים, בינם לבין עצמם.

תוצאות האינטראקציות כמוצג בתמונה מס' 16 ובטבלת הסיכום מס' 2 בעמוד 61:

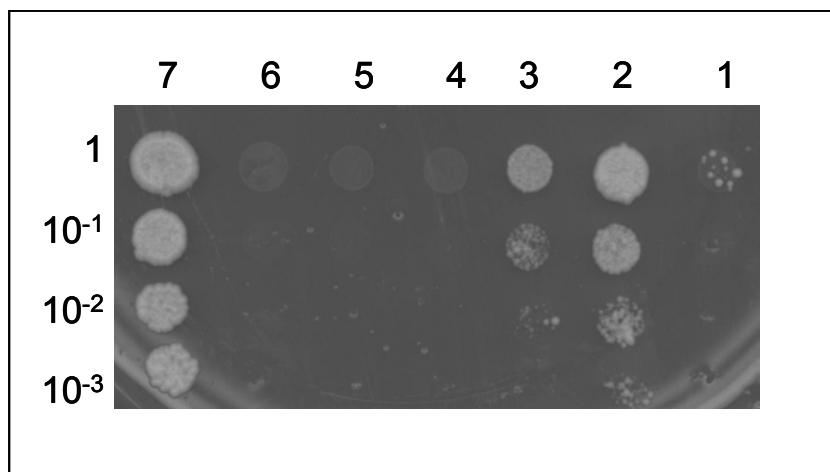
1. CP 1-184 החסר 76 חומצות אמינו מהקצה הקרבוקסילי לא הראה אינטראקציה עצמית.
 תוצאה זו צפויה עקב ההנחה שהאינטראקציה מתרחשת בין שני קצוות מנוגדים.
2. CP 1-184 mut1 החסר 76 חומצות אמינו מהקצה האמיני ובעל מוטציה נקודתית לא הראה
 אינטראקציה עצמית.
3. CP 41-260 החסר 40 חומצות אמינו מהקצה האמיני מראה אינטראקציה עצמית.
4. CP 41-184 החסר חומצות אמינו משני קצותיו לא הראה אינטראקציה עצמית.

5. CP mut1 מראה אינטראקציה עצמית אך לא כמו שנצפה באינטראקציה העצמית של חלבון המעטפת.

6. CP mut2 מראה אינטראקציה עצמית אך חלשה יותר בהשוואה ל- CP mut1.

7. CPmut3 אינו מראה אינטראקציה עצמית.

לסיכום, ניתן לומר שישנה מוטציה נקודתית אחת, CP mut3 (החלפת ארגינין ללאוצין בעמדה 19), הפוגעת ביכולת האינטראקציה של חלבון המעטפת. כמו כן החסרות מהקצה הקרבוקסילי של החלבון פגעו ביכולת האינטראקציה העצמית.



תמונה מ'ס 16: בדיקת האינטראקציה של חלבוני המעטפת המוטנטים בינם לבין עצמם בשמרים, על סמך גדילה על מצע חסר לאוצין במיהולים שונים (פקטורי מיהול בצד שמאל).
 1- CP+CP 41-184, 2- CP mut1+CP mut1, 3- CP mut2+CP mut2, 4- CP mut3+CP mut3, 5- CP1-184+CP1-184, 6- CP1-184 mut1+CP1-184 mut1, 7- CP 41-260+CP 41-260

כביקורת שלילית נבדקה אינטראקציה בין חלבון המעטפת השלם לבין חלבון אחר של וירוס צהבון האמיר, C 4, לגביו ידוע שאינו עובר אינטראקציה עם חלבון המעטפת. כמו כן נבדק חלבון המעטפת עם הפלסמיד pSH18-34 בלבד כדי לבדוק שהוא אינו משפעל את המערכת השמרית (תמונות מס' 13,14).

6.2.4.3 בדיקת אינטראקציה בין חלבון המעטפת לבין הרצפטור הציטופלסמטי Karyopherin α 1

הרצפטור הציטופלסמטי Karyopherin α 1 נקשר לחלבון המעטפת ומוביל אותו לגרעין התא. במהלך המחקר בדקתי את השפעת שלושת המוטציות הנקודתיות ב NLS על הקישור בין Karyopherin α 1 למוטנטים אלו. שתי המוטציות הראשונות הן בחלק הראשון של ה-NLS והמוטציה השלישית היא בחלקו השני של ה-NLS.

בדיקה נוספת שנערכה היא החסרת 40 חומצות אמינו מהקצה האמיני של החלבון: החסרה זו מורידה את כל רצף ה-NLS, ומשאירה את החלבון רק עם האזור דמוי ה-NLS, המצוי בהמשך. האזור הזה מתחיל מחומצה אמינית 41 ומסתיים בחומצה אמינית 53:



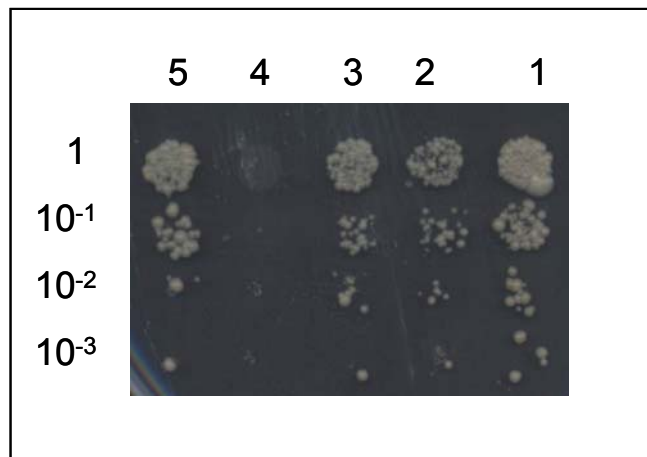
רצף זה דומה לרצף ה-NLS העיקרי, וייתכן שהוא מתפקד כסיגנל הולכה לגרעין כאשר הסיגנל הראשי חסר או חסום.

תוצאות המחקר כפי שמוצג בתמונות מס' 17-18 ובטבלת הסיכום מס' 2 בעמוד 61:

שתי המוטציות הראשונות אשר התבצעו בחלק הראשון של ה-NLS (CP mut1, CP mut2), החלפת ארגינין לפרולין וליזין לטראונין לא פגעו ביכולת של Karyopherin α 1 לקשור אליו את חלבון המעטפת, אך המוטציה הנקודתית השלישית (CP mut3), החלפת ארגינין ללאוצין בעמדה 19, מונעת את האינטראקציה עם הרצפטור הציטופלסמטי (תמונות מס' 17,18).

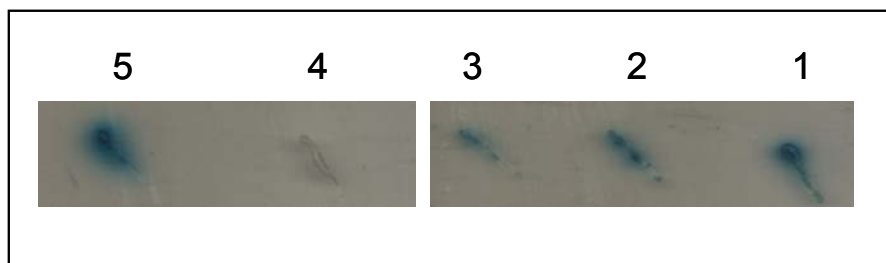
חלבון מעטפת החסר 40 חומצות אמינו מהקצה האמיני מראה אינטראקציה יפה עם Karyopherin α 1, יותר מהאינטראקציה אשר נצפתה עם המוטציות הנקודתיות (תמונה מס' 17,18), זאת למרות הורדת ה-NLS העיקרי. הדבר מוכיח שאכן קיים איזור נוסף אשר מזוהה על ידי הרצפטור הציטופלסמטי Karyopherin α 1 בהיעדר ה-NLS העיקרי.

כדי לאשש הנחה זו החלטתי להוריד את האזור דמוי ה-NLS (חומצות אמינו 41-53), ויצרתי חלבון החסר 53 חומצות אמינו מהקצה האמיני (CP 54-260). בבדיקת אינטראקציה של CP 54-260 עם Karyopherin α 1 התקבלה תוצאה חיובית (התוצאות אינן מוצגות, ראה דיון).



תמונה מס' 17: בדיקת האינטראקציה של הרצפטור הציטופלסמטי Karyopherin α 1 עם חלבון המעטפת השלם ומוטנטים שלו בשמרים, על סמך גדילה על מצע חסר לאוצין במיחולים שונים (פקטורי מיהול בצד שמאל).

1-1 CP+Karyopherin α 1, 2- CP mut1+ Karyopherin α 1, 3- CP mut2+ Karyopherin α 1, 4- CP mut3+ Karyopherin α 1, 5- CP 41-260+ Karyopherin α 1



תמונה מס' 18: בדיקת האינטראקציה של הרצפטור הציטופלסמטי Karyopherin α 1 עם חלבון המעטפת השלם ומוטנטים שלו בשמרים, על סמך ביטוי האנזים β -Galactosidase.

1-1 CP+Karyopherin α 1, 2- CP mut1+ Karyopherin α 1, 3- CP mut2+ Karyopherin α 1, 4- CP mut3+ Karyopherin α 1, 5- CP 41-260+ Karyopherin α 1

גם בבדיקת פעילות הגן β galactosidase ניתן לראות ש- CP mut3 אינו יוצר אינטראקציה עם הרצפטור הציטופלסמטי Karyopherin α 1.

6.2.4.4 בדיקת אינטראקציה בין חלבון המעטפת השלם והמוטנטים שלו לבין החלבון GroEL

החלבון GroEL מיוצר על חיידק אנדוסימביוטי במערכת העיכול של הכנימה. חלבון זה נקשר לחלבון המעטפת של וירוס צהבון האמיר בהמולימפה של הכנימה, מונע עיכול ודגרדציה של הווירוס במעי הכנימה, ובכך מגן על הווירוס (Morin *et al.*, 2000).

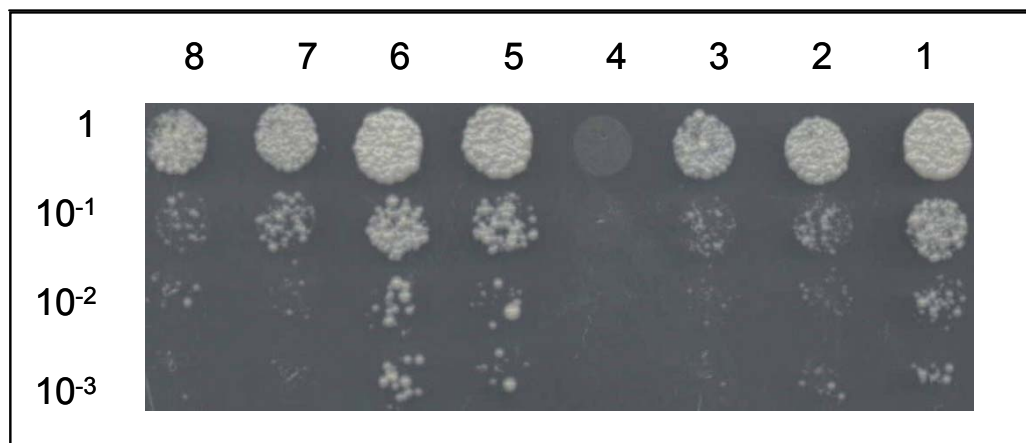
במהלך עבודתי בדקתי את האינטראקציה של החלבון GroEL עם חלבון המעטפת ומוטנטים שלו. הבדיקה התבצעה ב- Two Hybrid System. התוצאות מבוססות על יכולת גדילה של השמרים במצע החסר לאוצין, בנוסף לחומצות האמינו היסטידין, טריפטופאן והנוקליאוטיד אורציל.

כמוצג בתמונה מס' 19 ובטבלת סיכום מס' 2 בעמוד 61 מצאו האינטראקציות הבאות:

האינטראקציה בין חלבון המעטפת לבין החלבון GroEL נתנה תגובה חזקה לעומת זאת האינטראקציות GroEL+CP mut1 ו- GroEL+CP mut2 יצרו תגובה חלשה יותר. בניגוד לכך, לא התרחשה כלל אינטראקציה בין GroEL ל- CP mut3.

האינטראקציה עם חלק ממוטציות החסר (CP 41-260, CP 41-184) היו חלשות יותר מאשר האינטראקציה עם החלבון השלם, לעומת זאת האינטראקציה עם CP 1-184 mut1 ו- CP 1-184 היתה חזקה יותר.

ניתן להסיק, שהאינטראקציה בין חלבון המעטפת של וירוס צהבון האמיר של העגבנייה לבין החלבון GroEL של כנימת עש הטבק מתרחשת באמצע חלבון המעטפת באזור שבין חומצות אמינו 41-184, שהרי כל החלבונים החסרים ושני המוטנטים, CP mut1, CP mut2 נתנו אינטראקציה עם GroEL, פרט למוטציה CP mut3. מוטציה זו לא נתנה אינטראקציה גם עם הרצפטור הציטופלסמטי Karyopherin α 1 (תמונה מס' 18). ייתכן ומוטציה זו גורמת לשינויים במבנה החלבון אשר מונעים את האינטראקציה של חלבון המעטפת עם חלבונים אחרים.



תמונה מס' 19 : בדיקת האינטראקציה של חלבון הכנימה GroEL עם חלבון המעטפת השלם ומוטנטים שלו בשמרים, על סמך גדילה על מצע חסר לאוצין במיהולים שונים (פקטורי מיהול בצד שמאל).
1- GroEL+CP, 2- GroEL+CPmut1, 3- GroEL+CPmut2,

GroEL+ CP41- -7 ,GroEL+ CP1-184aa mut1 -6 ,GroEL+ CP1-184aa -5 GroEL+CPmut3 -4
 .GroEL+ CP41-184aa -8 ,260aa

6.2.4.5 סיכום תוצאות האינטראקציות השונות של חלבון המעטפת

טבלה מס' 2 מסכמת את תוצאות האינטראקציה של חלבון המעטפת עם עצמו, עם חלבוני מעטפת מוטנטים ועם שני החלבונים הנוספים Karyopherin $\alpha 1$ ו-GroEL על פי מבחן גדילה של השמרים במצע חסר לאוצין במערכת Two Hybrid System.

	CP	CP mut1	CP mut2	CP mut3	CP 1-184	CP 1-184 mut1	CP 41-260	CP 41-184	CP 54-260
CP	++++	++	+	++	++	++	+++	n.g.	++
CP mut1		+++							
CP mut2			+						
CP mut3				n.g.					
CP 1-184					n.g.				
CP 1-184 mut1						n.g.			
CP 41-260							++++		
CP 41-184								n.g.	
CP 54-260									n.g.
GroEL	+++	++	++	n.g.	+++	+++	++	++	
Karyopherin $\alpha 1$	++++	++	++	n.g.			+++		+++
C4	n.g.								

טבלה מס' 2: סיכום תוצאות האינטראקציות השונות של חלבון המעטפת מול עצמו ומול חלבונים אחרים שנבדקו במערכת השמרים.

n.g- no growth*

*סימני ה (+) והצבע מעידים על עצמת הגדילה.

6.3 תוצאות האינטראקציות השונות של חלבון המעטפת במערכת הצמחית

לאחר קבלת תוצאות האינטראקציה של חלבון המעטפת ב- Two Hybrid System החלטתי לבדוק חלק מהאינטראקציות במערכת צמחית אשר תייצג בצורה אמינה יותר את התהליכים שעוברים חלבונים אלו בתא הצמחי, ואת ההתנהגות שלכם בסביבה הטבעית.

לשם כך השתמשתי בשיטה הנקראת: **FRET- fluorescence resonance energy transfer**. שיטה זו בודקת אינטראקציה בין שני חלבונים המאוחים כל אחד לחלבון פלורוסנטי אחר בתוך תא צמחי או אנימלי. זוגות החלבונים הפלורוסנטים המתאימים ל-FRET הם:

CFP-YFP, BFP-GFP (Tsien 1998).

חלבונים אלו הם חלבוני GFP עם מוטציות נקודתיות שהעניקו לחלבונים אלו ספקטרום פלורסנציה שונה מהמקורי.

השיטה מבוססת על מעבר אנרגיה מה donor ל- acceptor המתרחש כאשר ספקטרום הפליטה של חלבון פלורוסנטי אחד חופף עם ספקטרום הקליטה של חלבון פלורוסנטי שני (תמונה מס' 20), במקרה זה יש מעבר של אנרגיה מחלבון אחד שעבר עירור לחלבון שני ע"י אינטראקציות dipole-dipole, אינטראקציה אלקטרומגנטית (Brandizzi et al., 2002), הגורמת לעלייה בעוצמת הפלורסנציה של החלבון השני (תמונה מס' 21).

יעילות העברת האנרגיה מה donor ל acceptor תלויה במרחק שבין שני החלבונים הנבדקים (Patterson et al., 2000). על מנת שיתרחש ה-FRET המרחק בין המולקולות הנבדקות צריך להיות בין 3 ל-8 ננומטר, דבר המעיד על אינטראקציה ביניהן.

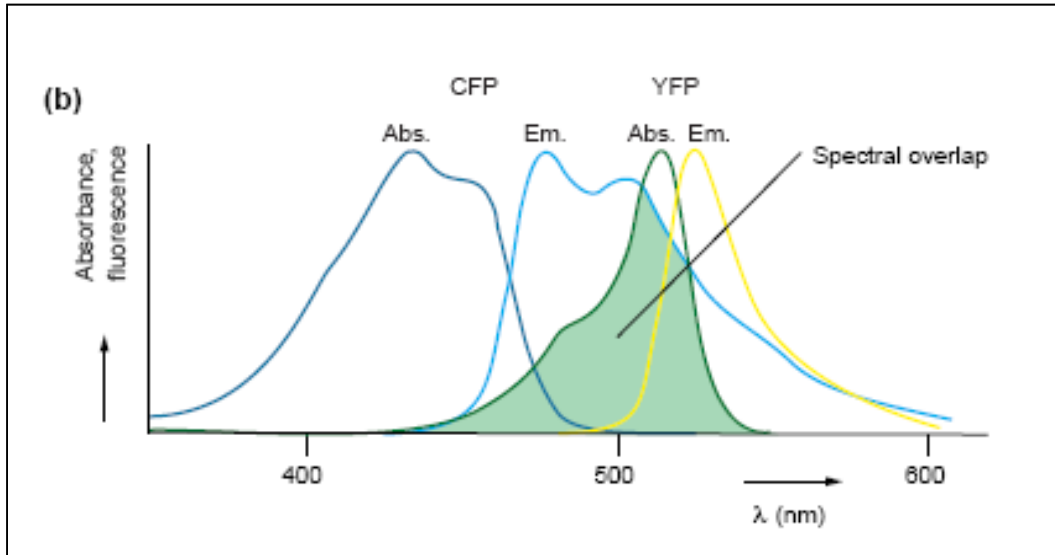
ישנן שתי שיטות לבדיקת ה-FRET:

1. עירור החלבון הפלורוסנטי CFP באורך גל של 458 ננומטר ובדיקת הפליטה של ה-YFP באורך גל של 535 ננומטר, שיטה זו בעייתית ולא מדויקת לבדיקת אינטראקציה, ולכן לא השתמשתי בשיטה זו (Gordon et al., 1998; Xia and Liu, 2001).

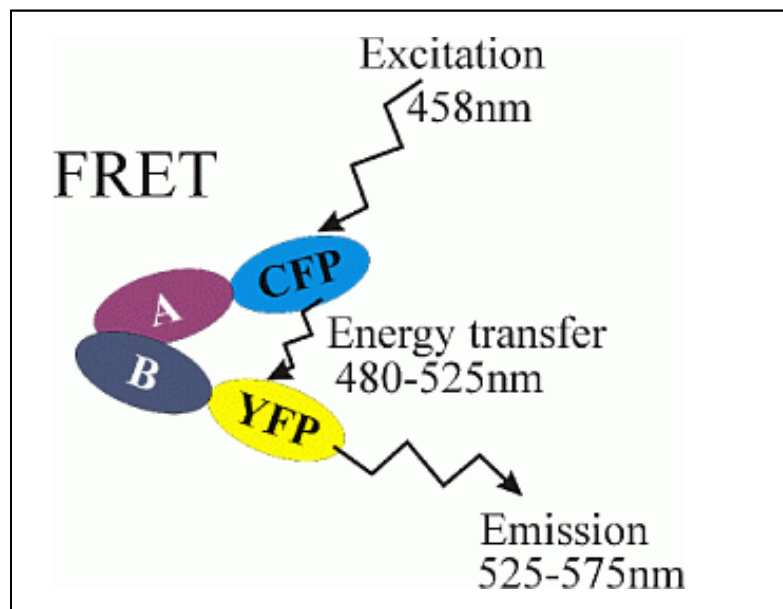
2. שיטת ה- **Acceptor Photobleaching** זוהי שיטה חדשה יחסית ויותר מדויקת. בשיטה זו מורידים או מונעים את מעבר האנרגיה מה- donor ל- acceptor.

מהלך הניסוי: מודדים את עוצמת הפלורסנציה של ה-CFP (על ידי עירור החלבון הפלורוסנטי CFP באורך גל של 458 ננומטר ובדיקת הפליטה של ה-CFP ב- 488 ננומטר) וה-YFP (עירור ב- 514 ננומטר ופליטה ב- 535) (תמונה מס' 21). לאחר מכן עושים bleaching לחלבון הפלורוסנטי YFP על ידי שימוש בקרן לייזר של ארגון (Ar) באורך גל של 514 ננומטר. סריקה של האזור על ידי קרן הלייזר מספר פעמים כ-15-5 שניות גורמת לדעיכה של ה-YFP עד לרמה של 20% מעוצמתו. דיכוי ה-YFP גורם לעליית הפלורסנציה של ה-CFP, וזה בתנאי שהמולקולות מספיק קרובות. שיטה זו תוארה לראשונה ב- 1996 (Bastiaens et al., 1996; Bastiaens and Jovin 1996).

ברגע שרמת ה-YFP נמוכה מאוד מעבר האנרגיה מה-CFP נמנע או מופחת ולכן יש עלייה בסיגנל של ה-CFP. בשיטה זו ניתן לכמת את התוצאות ולבדוק את יעילות ה-FRET, ולפי תוצאות היעילות ניתן גם למדוד את המרחק בין המולקולות הנבדקות, ולראות עד כמה הן קרובות.



תמונה מס' 20: ספקטרום הקליטה (Abs) והפליטה (Em) של החלבונים הפלורוסנטים, CFP, YFP, (Gadella et al., 1999)



תמונה מס' 21: תיאור סכמטי לתהליך מעבר האנרגיה בין המולקולות ב-FRET, כאשר שני החלבונים המעורבים הם: YFP&CFP המאוחדים לחלבונים הנבדקים (A, B). התמונה נלקחה מאתר האינטרנט: meds.queensu.ca/qcri/greer/ri_pag.htm

FRET - יעילות ה-

יעילות ה-FRET נמדדת על פי ההפרש בין סיגנל ה-CFP לפני photobleaching ואחרי ה-photobleaching (Karpova *et al.*, 2003). ככל שההפרש בניהם גבוה יותר מעיד הדבר על קירבה גדולה יותר בין המולקולות ולכן יש יותר מעבר של אנרגיה מ-CFP ל-YFP.
נוסחה לחישוב יעילות ה-FRET :

$$E_F = \frac{I_{n+1} - I_n}{I_{n+1}} * 100$$

I_n = סיגנל ה-CFP לפני ה-photobleaching

I_{n+1} = סיגנל ה-CFP לאחר ה-photobleaching

6.3.1 מהלך העבודה

יישום שיטת ה-FRET נעשה בפרוטופלסטים של טבק.

העבודה נעשתה במיקרוסקופ קונפוקלי :

OLYMPUS IX 81 (Japan) inverted laser scanning confocal microscope (FLUOVIEW 500), ההגדלה היתה פי 60.

זוג החלבונים הפלורוסנטים אשר השתמשתי בהם בעבודתי הם CFP&YFP. זוג זה נחשב לזוג מתאים למערכת ה-FRET, הודות לחפיפה טובה בין הפליטה והקליטה שלהם, תנאי הכרחי למעבר אנרגיה מחלבון אחד לחלבון שני.

את מערכת הפלסמידים הכוללים את חלבוני ה-CFP ו-YFP הנדרשים לעבודה זו קיבלנו מפרופסור צפירה שבארה"ב (Tzfira *et al.*, 2005).

פלסמידים אלו מכילים גנים לקידוד החלבונים הפלורוסנטים תחת בקרת הפרומוטור הויראלי החזק 35S CaMV, ואליהם איחיתי את החלבונים הנבדקים.

שיבוט החלבונים הנבדקים ל-CFP נעשה בצד ה-N טרמינלי שלו ואילו השיבוט לחלבון YFP נעשה בצד ה-C טרמינלי שלו (תמונה מס' 22).

החלבונים ששובטו הם :

1. חלבון המעטפת השלם - CP.

2. חלבון מעטפת עם מוטציה נקודתית בחלקו השני של ה-NLS: CP mut3 (החלפה של חומצה אמינית ארגינין ללאוצין בעמדה 19).

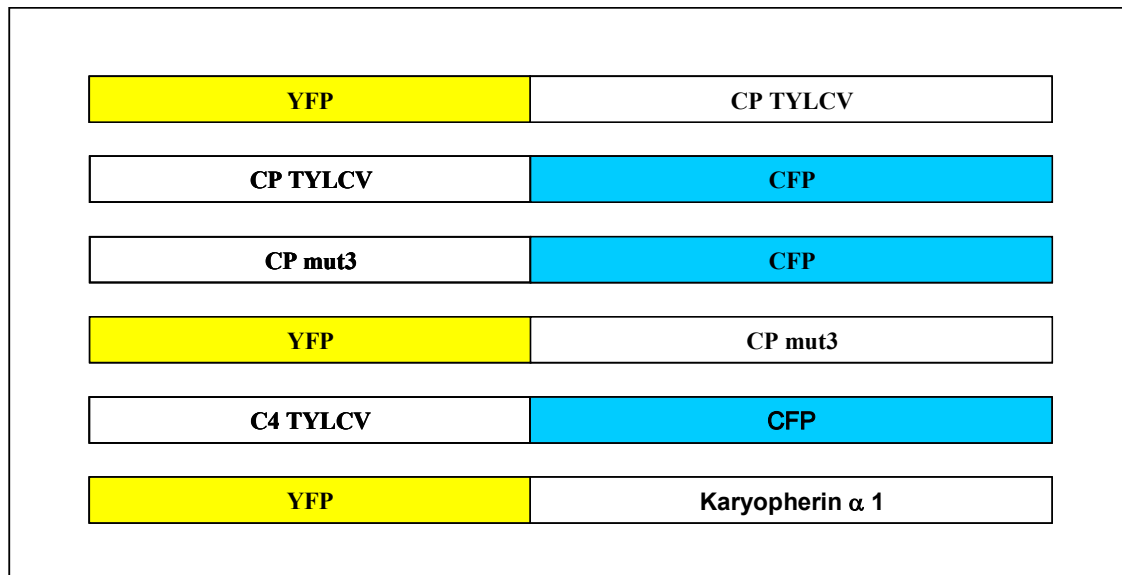
3. הפקטור הציטופלסמטי Karyopherin $\alpha 1$ מהעגבנייה.

4. החלבון C4 מהווירוס אשר מהווה ביקורת שלילית ל-FRET, שכן חלבון זה אינו יוצר אינטראקציה עם חלבון המעטפת.

חלבון המעטפת והחלבון המוטנטי שובטו לשני פלסמידים שונים, שכל אחד מכיל חלבון פלורוסנטי אחר, כדי לבדוק את האינטראקציה בניהם.

הפלסמידים הוחדרו לפרוטופלסטים בעזרת אלקטרופורציה (כמתואר בשיטות), והודגרו בחושך בטמ"פ $26^{\circ}C$ למשך 24-48 שעות. לאחר מכן הפרוטופלסטים נבחנו במיקרוסקופ קונפוקלי, ללמוד

על האינטראקציה של החלבונים בשיטת ה-FRET.



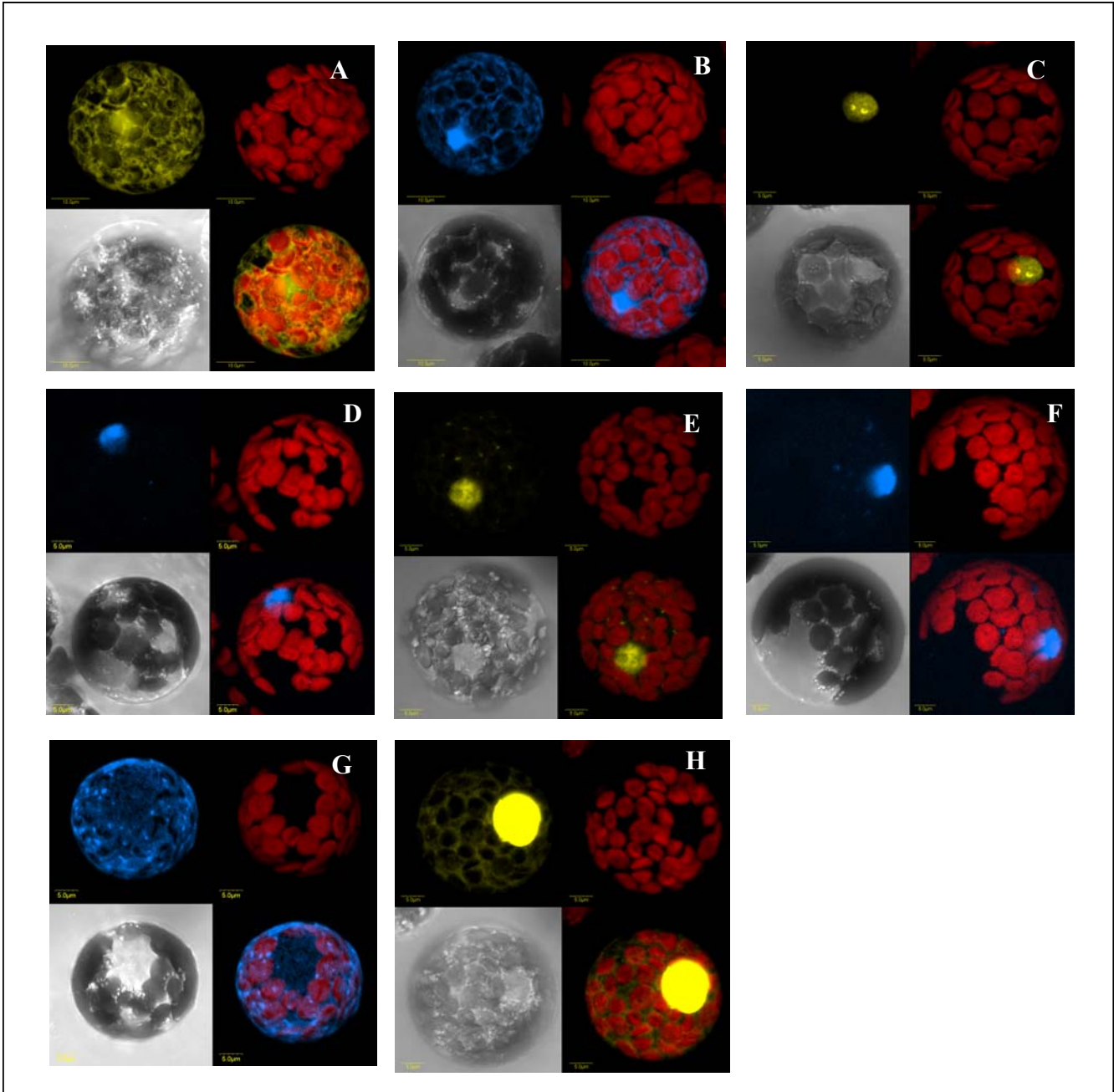
תמונה מס' 22 : תיאור סכמאטי לחלבונים הנבדקים המאוחים לחלבונים פלורוסנטים בשיטת ה-FRET

6.3.2 המיקום התוך תאי של החלבונים הנבדקים בפרוטופלסטים

כל החלבונים אשר שובטו לפלסמידי pSAT הוחדרו לפרוטופלסטים על מנת לראות את המיקום התוך תאי של החלבונים הנבדקים, שהרי מיקום של שני החלבונים באותו מדור הוא תנאי מוקדם לאינטראקציה בניהם.

החלבונים CFP ו-YFP (תמונה מס' 23A, B) מתבטאים בציטופלסמה ובגרעין.

חלבון המעטפת אשר מאוחה לחלבונים הפלורוסנטים (CFP&YFP) התבטא בגרעין התא ובגרעינון (תמונות מס' 23C,D ו-24). חלבון המעטפת המוטנטי CP mut3 המאוחה לחלבונים הפלורוסנטים התבטא בגרעין התא, בגרעינון ובציטופלסמה (תמונה מס' 23E, 23F). הרצפטור הציטופלסמטי Karyopherin α 1 התבטא בריכוז גבוה בגרעין ובציטופלסמה (תמונה מס' 23H). החלבון הויראלי C4 ששימש כביקורת בעבודה זו התבטא בציטופלסמה בלבד (תמונה מס' 23G).



תמונה מס' 23: המיקום התוך תאי של החלבונים הנבדקים בפרוטופלסטים של טבק.

A-YFP, B-CFP, C-YFP-CP, D-CP-CFP, E- YFP-CP mut3, F- CP mut3-CFP, G- C4-CFP

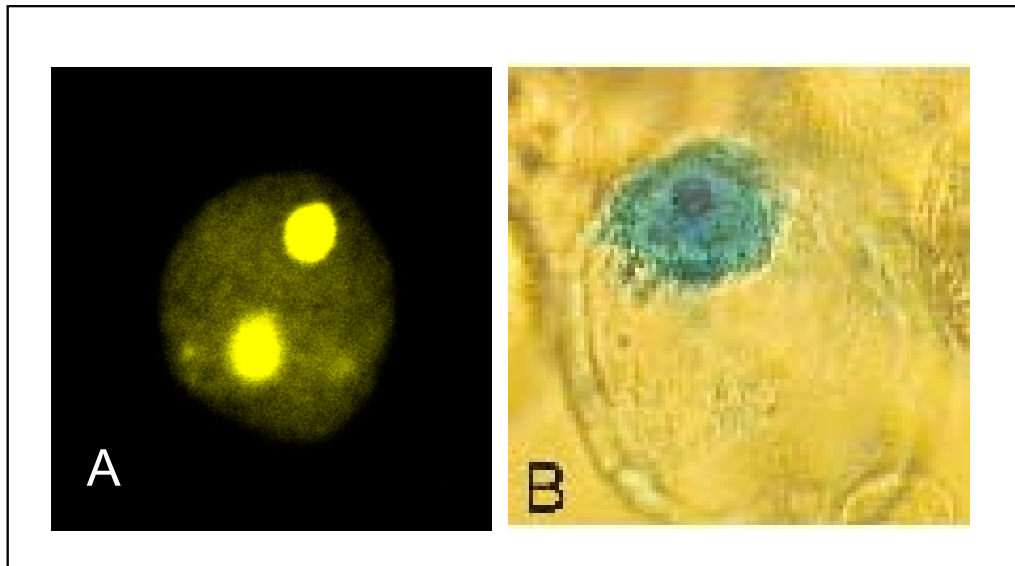
H- YFP-Karyopherin α 1

כל תמונה מחולקת ל- 4 תמונות קטנות :

צד שמאל מלמעלה מתאר את הפלורסנציה של החלבון הפלורוסנטי, צד ימין מלמעלה מתאר את הפלורסנציה של הכלורופלסטים, התמונה מצד ימין למטה מתארת את הפלורסנציה של הכלורופלסטים והחלבונים הפלורוסנטיים יחד והתמונה האחרונה מצד שמאל למטה היא תמונה באור רגיל.

6.3.3 כניסה לגרעינון

חלבון המעטפת נכנס לגרעין על מנת לאפשר לגנום הווירוס לשכפל את עצמו, אך מתברר שחלבון המעטפת נכנס גם לגרעינון. בעבודתה של Kunik (Kunik *et al.*, 1998) עם פרוטופלסטים נראה חלבון המעטפת בתוך הגרעינון. תופעה זו חזרה על עצמה בעבודתי (תמונה מס' 23A). חשוב לציין שגם החלבון המוטנטי CP mut3 נכנס לגרעינון.



תמונה מס' 24 : השוואת מיקום תוך תאי של חלבון המעטפת בשתי מערכות שונות.

A - חלבון המעטפת מאוחה לחלבון הפלורוסנטי YFP, בפרוטופלסטים של תאי טבק הוא מתבטא בגרעין וגם בגרעינונים שלו, B - חלבון המעטפת המאוחה לחלבון מדווח GUS, בפרוטופלסטים של תאי פטוניה הוא גם מתבטא בגרעין התא ובגרעינון (Kunik *et al.*, 1998).

6.3.4 האינטראקציה של חלבון המעטפת במערכת ה-FRET

האינטראקציה של חלבון המעטפת עם חלבונים נוספים נבדקה בפרוטופלסטים של טבק שהותמרו בשני פלסמידים ביחד.

תוצאות הניסויים מראים מגמה ברורה של קיום ה-FRET בשתי האינטראקציות הבאות : האינטראקציה בין חלבון המעטפת לעצמו, ובין חלבון המעטפת לרצפטור הציטופלסמטי Karyopherin $\alpha 1$ (תמונות מס' 27, 28). לעומת זאת האינטראקציה בין CP mut3 לעצמו מראה תוצאה לא ברורה. 50% מהתאים שנבדקו מראים שיש אינטראקציה ואילו 50% הנוספים לא. לפי תוצאות yeast Two Hybrid System, אין אינטראקציה בין המוטנט CP mut3 לבין עצמו. אם מתייחסים לממוצע בין תאים שונים, נראה שאין FRET בין המוטנט עם עצמו אך בפועל חלק מהתאים הראו אינטראקציה ברורה. כמו כן נבדקה האינטראקציה בין חלבון המעטפת-CP לבין המוטנט CP mut3, ונצפתה אינטראקציה ביניהם, בנייהם אך כיוון שלא בוצעו מספיק חזרות הן לא הוכנסו לתוצאות הסופיות.

בניסויי הביקורת, הביקורות השליליות שנבדקו הן :

1. CFP בלבד. ביקורת זו נועדה לבדוק שאין עלייה בסיגנל של CFP בהיעדר YFP וחלבונים המאוחים אליהם (תמונה מס' 25).

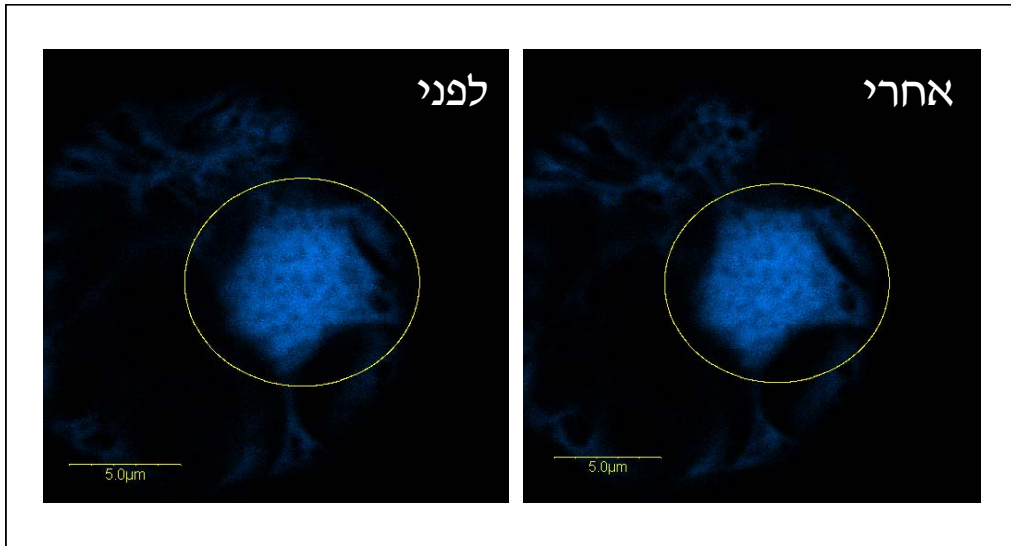
2. CFP-YFP. זוג זה נמצא באותו מיקום בגרעין ובציטופלסמה, אך זוג זה לא אמור ליצור אינטראקציה ולכן זו ביקורת שלילית טובה (תמונה מס' 26).

3. C4-CP. שני חלבונים אלו נמצאים במיקומים שונים בתא. חלבון המעטפת ממוקם בגרעין התא ואילו C4 ממוקם בציטופלסמה, ולכן לא אמורה להיות כלל אינטראקציה (ואכן לפי תוצאות yeast two hybrid system אין אינטראקציה ביניהם).

להלן פירוט התוצאות:

6.3.4.1 CFP control

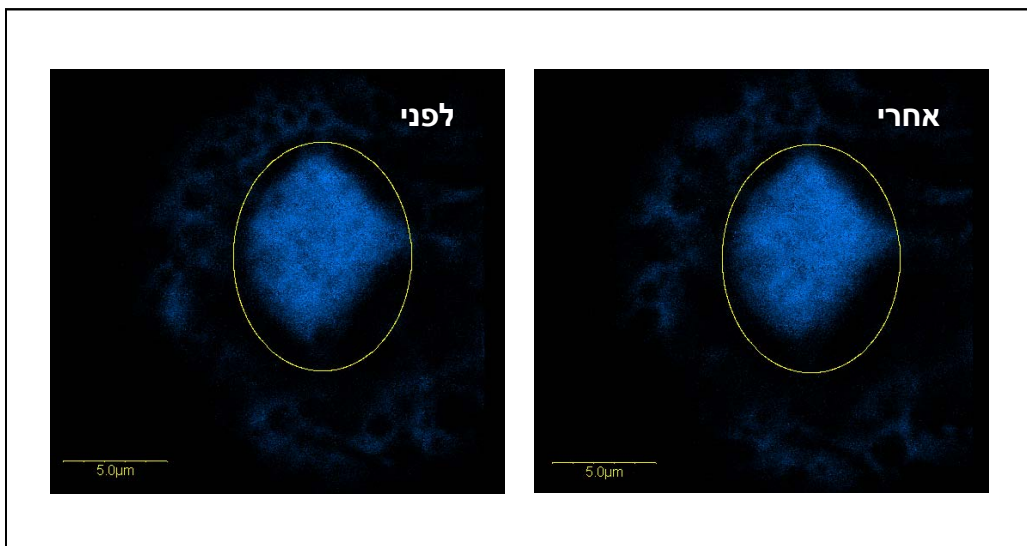
ביקורת ה-CFP היא ביקורת שלילית שנועדה לבדוק, שאין FRET בהיעדר החלבון YFP. ביקורת זו מכילה את ה-CFP בלבד ללא שום חלבון המאוחה אליו וללא ה-YFP. מעוררים את ה-CFP באורך גל של 458 ננומטר ובודקים את הפליטה באורך גל של 488 ננומטר. לאחר מכן עושים photobleaching בין 5-15 שניות ע"י קרן לייזר של ארגון (Ar) באורך גל של 514 ננומטר (אורך גל המתאים ל-YFP), מודדים את הפליטה של ה-CFP ומשווים לתוצאה שהתקבלה לפני ה-photobleaching. ביקורת זו חיונית בכל ניסוי של FRET, ותוצאותיהן העידו ש-CFP בלבד איננו מייצר FRET (תמונה מס' 25).



תמונה מס' 25 : תוצאות ה-FRET של CFP בלבד כביקורת שלילית. אחרי ה- Photobleaching אין עלייה בסיגנל ה- CFP.

CFP-YFP control 6.3.4.2

ביקורת נוספת משמשת לבדיקת אינטראקציה של CFP ו-YFP יחד ללא חלבונים שמאוחים אליהם (תמונה מס' 26). ביקורת זאת נועדה לוודא שלא מתרחש FRET בהיעדר חלבונים היוצרים אינטראקציה. תוצאות הביקורת מראות ששני החלבונים הפלורסנטים לבדם נמצאים באותו מיקום תוך תאי, אך אינם יוצרים אינטראקציה אחד עם השני על מנת לקבל FRET.



תמונה מס' 26 : תוצאות ה-FRET של CFP ו-YFP יחד אחרי ה- photobleaching אין עלייה בסיגנל ה- CFP.

תוצאות הביקורת מראות ששני החלבונים הפלורסנטים לבדם נמצאים באותו מיקום תוך תאי אינם יוצרים אינטראקציה אחד עם השני על מנת לקבל FRET.

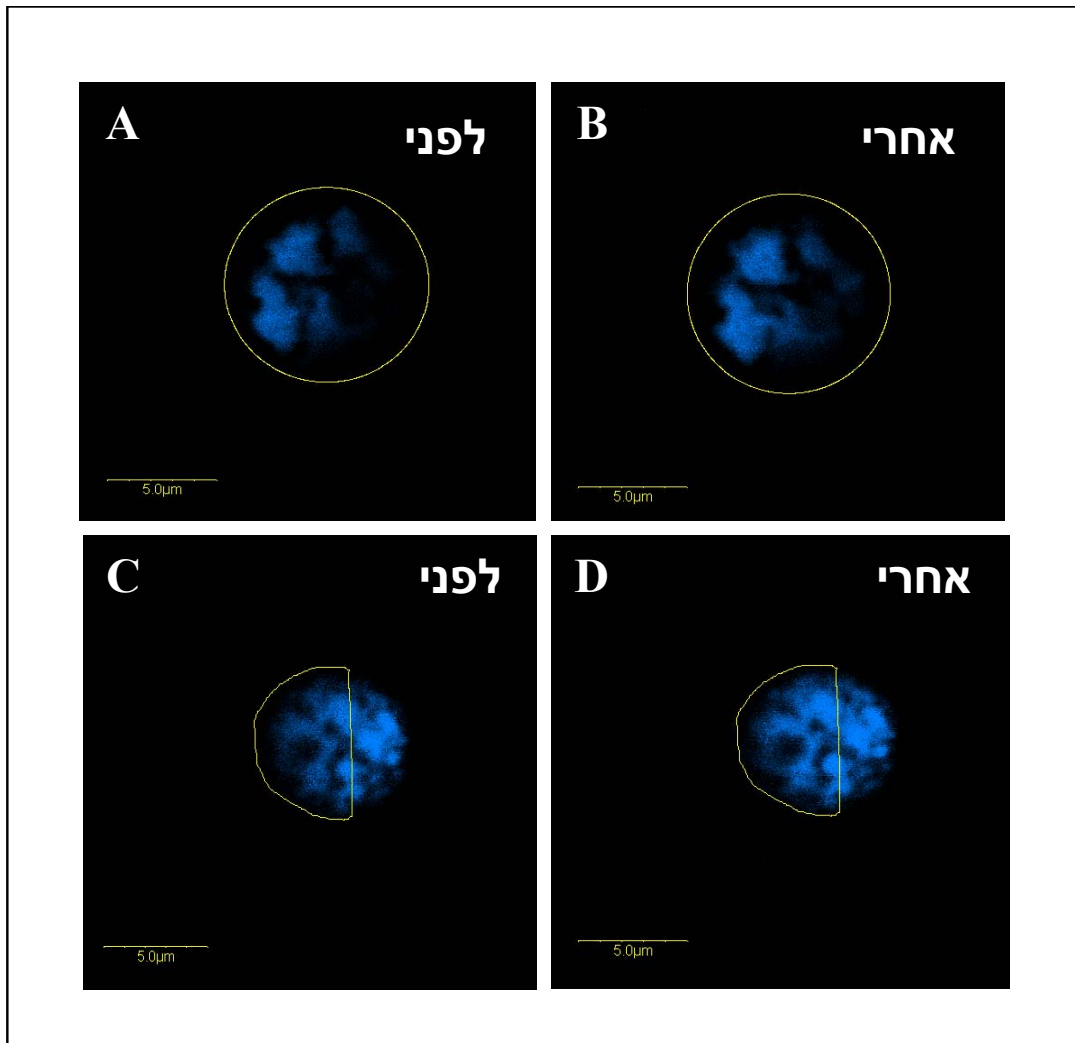
C4-CP 6.3.4.3

ביקורת נוספת שהתבצעה היא חלבון המעטפת CP המאוחה ל-YFP מול חלבון C4, המאוחה ל-CFP. C4 הוא חלבון וירלי המקודד ע"י וירוס צהבון האמיר, המתבטא בציטופלסמה ולא מתרחשת אינטראקציה בינו לבין חלבון המעטפת (התוצאות אינן מוצגות).

6.3.4.4. ביקורת נוספת שהתבצעה היא photobleaching רק על קטע מסוים בגרעין התא ולאחר מכן עורכים השוואה בין שני המקטעים, לפני ואחרי ה- photobleaching ואכן התוצאות מראות שבאזור שלא עבר bleaching אין עלייה בסיגנל ה-CFP, ואילו במקטע שעבר bleaching (בתאים בהם קיימת אינטראקציה CP-CP) ניתן לראות עלייה בסיגנל ה-CFP לאחר ה-bleaching (תמונה מס' D, 27C)

CP-CP 6.3.4.5

בניסוי זה נבדקה האינטראקציה של חלבון המעטפת עם עצמו. לפי ה- Two Hybrid System ישנה אינטראקציה עצמית בין חלבוני המעטפת. בניסוי הנוכחי נבדקה האינטראקציה בפרוטופלסטים של טבק, מערכת זו קרובה יותר למערכת הטבעית של חלבון המעטפת. בתמונה מס' 27 (A,B) רואים עלייה בפלורסנציה של ה- CFP לאחר ה- photobleaching, והביקורות (C, D) מוכיחות שהעלייה מתרחשת רק באזור בגרעין שעבר bleaching ולא באזור שלא עבר bleaching.



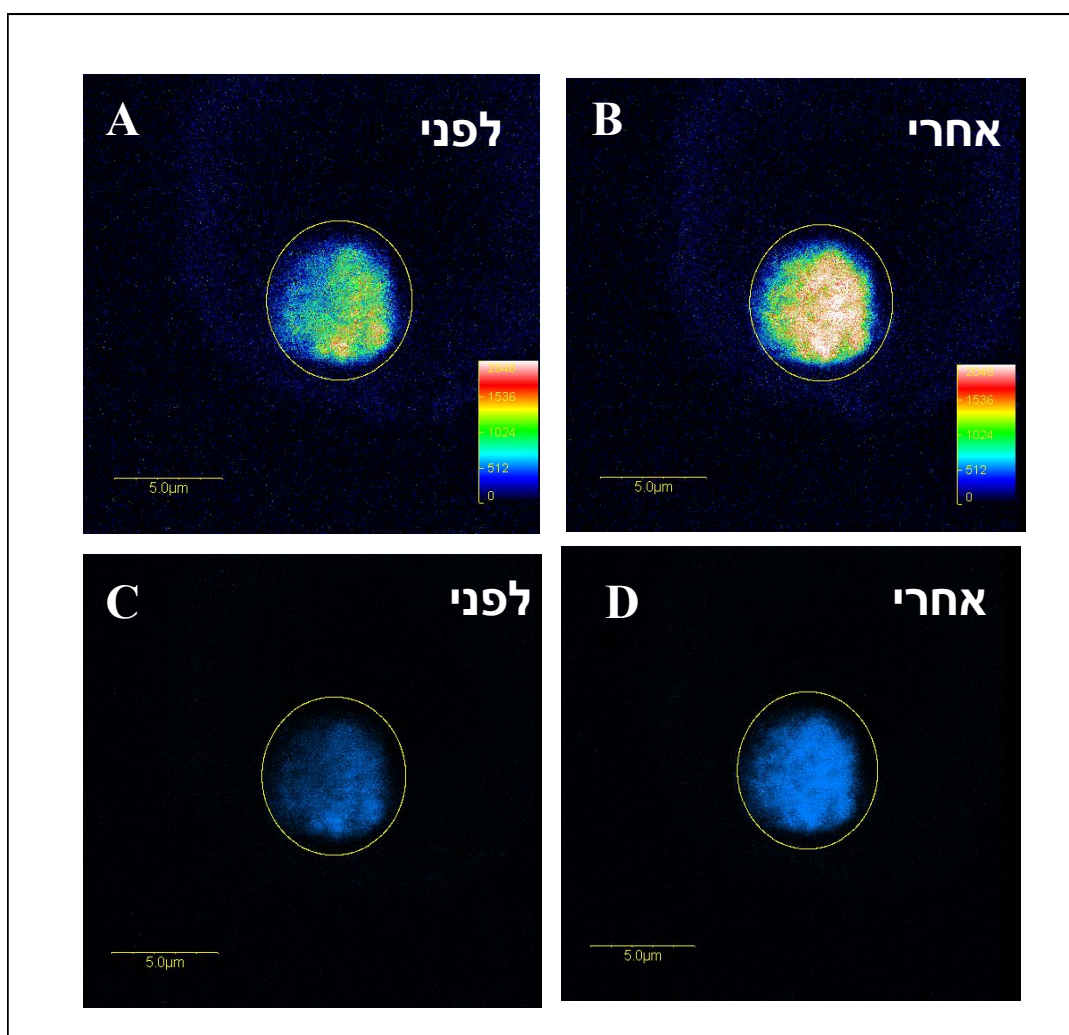
תמונה מס' 27: תוצאות האינטראקציה של חלבון המעטפת (CP) עם עצמו בפרוטופלסטים בשיטת ה- FRET.

A-B: FRET במבטאים שני חלבוני CP לפני ואחרי ה- photobleaching באזור הגרעין כולו. **C-D:** FRET של CP-CP שבוצע רק על חצי מהגרעין, ניתן לראות שישנה עלייה בסיגנל ה- CFP רק

באזור המסומן ואילו באזור הלא מסומן אין עלייה בסיגנל ה-CFP, זוהי ביקורת נוספת המראה שבאזור שלא עבר bleaching אין עלייה בפרוטסנציה.

CP-Karyopherin α 1 6.3.4.6

בניסוי זה נבדקה האינטראקציה של חלבון המעטפת עם הרצפטור הציטופלסמטי Karyopherin α 1. כאשר נבדקה אינטראקציה זו ב-Two Hybrid System התוצאות היו חיוביות. תוצאות הניסוי הנוכחי בפרוטופלסטים של טבק (תמונה מס' 28) מראות שאכן, יש FRET באינטראקציה זו.



תמונה מס' 28: תוצאות ה-FRET בפרוטופלסטים המבטאים אינטראקציה בין חלבון המעטפת (CP)

לבין הרצפטור הציטופלסמטי Karyopherin α 1.

ניתן לראות שיישנה עלייה גבוהה בסיגנל ה-CFP לאחר ה-photobleaching

A-B מראים את סיגנל ה-CFP לפי פיזור סיגנל ה-CFP בגרעין התא לפני ואחרי ה-photobleaching

C-D מראים את העלייה בסיגנל ה-CFP לאחר ה-photobleaching

CP mut3-Cp mut3 6.3.4.7

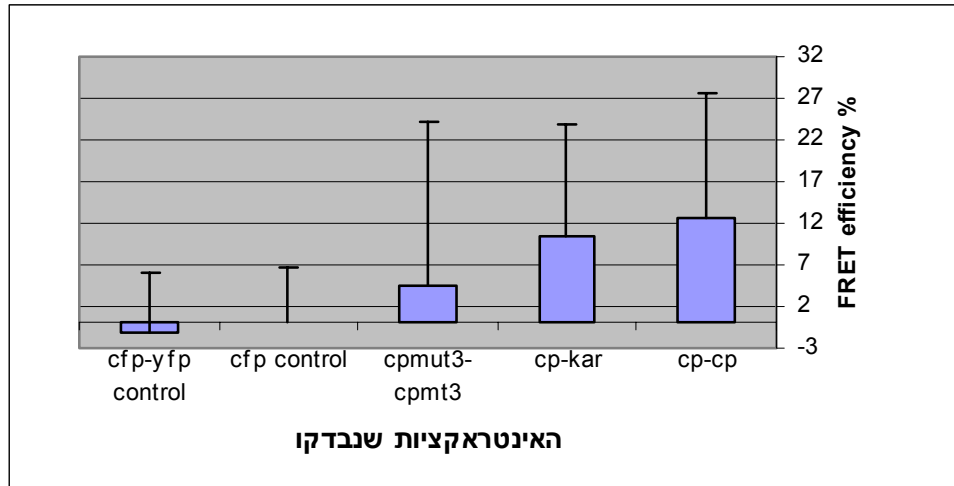
במערכת ה- Two Hybrid System מוטנט זה לא נקשר לעצמו. בניסוי הנוכחי, בפרוטופלסטים של טבק, האינטראקציה של חלבון המעטפת המוטנטי (החלפת ארגינין בעמדה 19) עם עצמו לא נתנה תשובה חד משמעית. בחלק מהתאים נצפתה אינטראקציה ובחלק מהתאים לא. מגמה זו חזרה ונצפתה בכל החזרות שבצעתי.

6.3.5 סיכום תוצאות ה-FRET

יעילות ה-FRET חושבה על פי התוצאות שהתקבלו במהלך כל הניסויים יחד (ראה עמוד 64 לשיטת חישוב יעילות ה-FRET).

והיא מוצגת בטבלה מס' 3 ובתמונה מס' 29

תוצאות יעילות ה-FRET וערכי סטיית התקן :



תמונה מס' 27: סיכום תוצאות ה-FRET בפרוטופלסטים של האינטראקציות של חלבון המעטפת והביקורות של המערכת

האינטראקציות שנבדקו	FRET efficiency %	סטיות התקן (+, -)
CP-CP	12.5%	15
CP-Karyopherin α	10.5%	13.3
CP mut3-CP mut3	4.4%	19.7
CFP control	0.2%	6
CFP-YFP	-0.106%	7.11

טבלה מס' 3: סיכום תוצאות ה-FRET

לסיכום, מתוצאות ה-FRET עולה, שהאינטראקציה בין חלבון המעטפת עם עצמו היא אינטראקציה חזקה, האינטראקציה בין חלבון המעטפת לבין הרצפטור הציטופלסמתי Karyopherin α 1 היא פחות חזקה. התוצאות לגבי האינטראקציה בין החלבון המוטנטי לעצמו (CP mut3) אינן חד משמעיות, לעיתים היה ניתן לראות FRET ולעיתים לא.

7. דיון

וירוס צהבון האמיר גורם לנזקים רבים לגידול העגבנייה התרבותית באזורים רבים בעולם. הבנת התהליכים המתרחשים בתוך הצמח בעת ההדבקה יכולה לסייע לנו להבין את המתרחש, ולהלחם בוירוס.

עבודת המחקר שלי היא המשך לעבודת מחקר שהחלה במעבדתנו ע"י Hallan. בעבודתו הוא בחן את תהליך בניית קופסית הווירוס ע"י בדיקת האינטראקציה בין חלבון המעטפת לבין עצמו, וכן בנוכחות מוטציות נקודתיות ומוטציות חסר (Hallan and Gafni 2001). מסקנות המחקר שלו היו:

א. האינטראקציה מתרחשת בצורת "ראש זנב", כלומר קצה אמיני של חלבון מעטפת מול קצה קרבוקסילי של חלבון מעטפת שני.

ב. ישנה חשיבות לקצה האמיני של חלבון המעטפת לשם האינטראקציה, מקטע ובו חומצות אמינו 1-30 יוצר אינטראקציה עם חלבון המעטפת השלם.

מטרת המחקר שלי הייתה לאפיין ביתר פירוט את האזורים בחלבון המעטפת הדרושים לאינטראקציה שלו עם עצמו, ע"י יצירת מוטציות נקודתיות בסינגל הכניסה לגרעין ומוטציות חסר בחלבון המעטפת (באזורים שונים מעבודתו של Hallan), ובדיקת השפעתן על האינטראקציה. המוטציות הנקודתיות בוצעו באזור ה-NLS מכיוון שאזור זה נמצא חיוני לפי עבודתו של Hallan. חלבונים מוטנטים אלו נבדקו גם מול הרצפטור הציטופלסמטי $\alpha 1$ Karyopherin והחלבון GroEL, אשר ידועים ביכולתם להיקשר לחלבון המעטפת, וחשובים להמשך מחזור החיים של הווירוס.

האפיון נעשה בשתי מערכות שונות, מערכת **Yeast Two Hybrid System** ובמערכת צמחית: בדיקת **FRET** בפרוטופלסטים של טבק.

בדיקת האינטראקציות של חלבון המעטפת ב - Yeast Two Hybrid System

1. בדיקת אינטראקציה של חלבון מעטפת עם עצמו ועם חלבוני מעטפת מוטנטים:

האינטראקציה של חלבון המעטפת מול עצמו יכולה להתרחש באחת מהדרכים הבאות:

א. קישור של קצה אמיני של מולקולת חלבון אחת מול קצה אמיני של מולקולת חלבון שנייה וקישור של קצה קרבוקסילי מול קצה קרבוקסילי.

ב. קישור המתבצע באמצע החלבון.

ג. קישור של קצה אמיני של מולקולת חלבון אחת מול קצה קרבוקסילי של מולקולת חלבון אחרת.

בבדיקת אינטראקציה של חלבון המעטפת השלם מול חלבונים מוטנטים בעלי מוטציות נקודתיות ומוטציות חסר נצפו אינטראקציות חיוביות בין החלבונים שנבדקו, פרט למקרה בו נבדק חלבון המעטפת מול חלבון מעטפת חסר, CP 41-184aa. ניתן להסביר את היעדר האינטראקציה בכך,

שחלבון זה חסר גם קצה אמיני וגם קצה קרבוקסילי. תוצאות אלו מעידות בבירור שהאינטראקציה של חלבון המעטפת עם עצמו מתרחשת בצורת "ראש-זנב", כלומר קצה אמיני מול קצה קרבוקסילי. ואכן לא נצפה קישור בין החלבון השלם לחלבון אשר חסר 40 חומצות אמינו מהקצה האמיני ו-76 חומצות אמינו מהקצה הקרבוקסילי. החלבונים המוטנטים אמנם הצליחו ליצור אינטראקציה עם חלבון המעטפת השלם, אך במציאות לוורוס לא תהיה תערובת של חלבון תקין וחלבון פגום ובמקרה של מוטציה יפגע תהליך בניית קופסית הוורוס, כיוון שבניית הקופסית נעשית ע"י חלבון אחד. תוצאות אלו גרמו לי לבדוק את האינטראקציה של המוטנטים מול עצמם. תוצאות האינטראקציות מראות שחלק מהמוטציות ב-NLS פוגעות באינטראקציה וחלק לא. החלפת ארגינין בעמדה 19 ללאוצין (CP mut3) גרמה להיעדר אינטראקציה, ואילו בשתי המוטציות האחרות (CP mut1, 2) היה ניתן לראות גדילה אך פחותה מזו שנצפתה עבור חלבון המעטפת באינטראקציה שלו עם המוטנטים. האינטראקציה של שני חלבוני מעטפת אשר חסרים 40 חומצות אמינו (CP41-260) מפתיעה, כיוון שלשניהם חסר הקצה האמיני. על מנת לאמת את האינטראקציה הזו כדאי לבחון אותה במערכת צמחית. האינטראקציה בין שני חלבוני מעטפת החסרים 76 חומצות אמינו מהקצה הקרבוקסילי (CP1-184) נכשלה, מה שמעיד שיש חשיבות ל-76 חומצות האמינו מהקצה הקרבוקסילי לשם אינטראקציה של חלבון המעטפת עם עצמו. על מנת לזהות את חומצות האמינו המעורבות באינטראקציה, צריך לבצע מוטציות חסר נוספות ומוטציות נקודתיות, בנוסף על אלו שנעשו בעבודתי.

2. בדיקת אינטראקציה של הרצפטור הציטופלסמתי Karyopherin $\alpha 1$ עם חלבון המעטפת השלם והמוטנטים שלו

כידוע חלבון המעטפת יוצר אינטראקציה עם הרצפטור הציטופלסמטי (Kunik Karyopherin $\alpha 1$) (Kunik *et al.*, 1999). בעבודתי בדקתי את ההשפעה של מוטציות נקודתיות באזור ה-NLS של חלבון המעטפת על יכולת הקישור ל-Karyopherin $\alpha 1$. מתוצאות המחקר עולה, ששתי מוטציות בעמדות 3 ו-4 (החלפה של ארגינין לפרולין וליזין לטריאונין) לא פגעו ביכולת הקישור לרצפטור הציטופלסמטי. בניגוד לכך, מוטציה בעמדה 19 (CP mut3), החלפה של ארגינין ללאוצין, מנעה את הקישור. בנוסף למוטציות הנקודתיות, נבחנו מול הרצפטור הציטופלסמטי גם מוטציות חסר מהקצה האמיני של חלבון המעטפת: חלבון אשר חסר 40 חומצות אמינו, וחלבון אשר חסר 53 חומצות אמינו. שני חלבונים אלו הראו אינטראקציה עם הרצפטור. תוצאות אלו יכולות להעיד על קיומם של שני רצפי NLS נוספים המתפקדים כסיגנל כניסה לגרעין (תמונה מס' 5 הקטעים המודגשים באדום וכחול) כאשר הסיגנל הראשי לא מתפקד. יידרשו מחקרים נוספים כדי לוודא שאכן הם מתפקדים כסיגנל הולכה לגרעין, ע"י מוטציות נקודתיות באזורים אלו ובחינת השפעתם על האינטראקציה עם Karyopherin $\alpha 1$. מסקנה זו נתמכת גם בעבודותיה של קוניק שהבחינה בכניסה לגרעין של חלבון החסר את ה-NLS הראשוני, ואף היא הסיקה מכך שייתכן גם שקיים NLS משני.

3. בדיקת אינטראקציה בין חלבון המעטפת לבין חלבון הכנימה GroEL

חלבון GroEL המיוצר ע"י חיידק אנדוסימביוטי במעי הכנימה חיוני להמשך קיום הווירוס בכנימה. מורין (Morin *et al.*, 2000) הראה קישור חלבון המעטפת ל-GroEL בהמולימפה של הכנימה, אך לא הראה את האזור בחלבון המעטפת אליו נקשר GroEL. בעבודתי בחנתי השפעת מוטציות נקודתיות ומוטציות חסר בחלבון המעטפת על יכולת הקישור עם GroEL. תוצאות הניסויים הראו שכל חלבוני המעטפת המוטנטים נקשרו ל-GroEL פרט ל-CP mut3. לסיכום חלבון ה-GroEL אכן עובר אינטראקציה עם חלבון המעטפת, וגם כאן, החלפת ארגינין בלאוצין בעמדה 19 משבשת לחלוטין אינטראקציה זו.

ניתן לסכם ולומר שחלבון המעטפת של וירוס צהבון האמיר, מזהה ומתחבר למספר חלבונים במהלך חייו של הווירוס. הדבר מתיישב עם העובדה הידועה זמן רב שבוירוסי ג'מיני בעלי גנום יחיד פגיעות בחלבון המעטפת פוגעות באינפקטיביות של הווירוס (Gafni and Epel 2002). עבודתי הראתה שהשמטה של כ-40 חומצות אמינו בקצה האמיני לא מנעה אינטראקציה של חלבון המעטפת עם עצמו, כמו גם עם החלבונים האחרים שנבדקו. דבר זה עומד בסתירה לממצא העיקרי בעבודתי, לפיו מוטציה נקודתית אחת החלפת ארגינין בלאוצין בעמדה 19, משבשת כל אינטראקציה של חלבון המעטפת עם החלבונים שנבדקו. אנו מניחים שההשמטים בצד ה-N הטרמינלי משנים מהותית את מבנה החלבון ולכן אינטראקציות אלו אינן משקפות אינטראקציה אמיתית המתרחשת בטבע. יתרה מכך, המערכת הבודקת של two hybrid היא מערכת הטרולוגית, ואיננה משקפת מספיק את המתרחש בתאי הצמח, ולכן בכוונתנו להמשיך ולבדוק זאת בתאי הצמח.

בדיקת אינטראקציות של חלבון המעטפת בשיטת FRET במערכת צמחית

לאחר קבלת התוצאות במערכת ה-yeast two hybrid, החלטתי לבדוק חלק מהאינטראקציות במערכת אשר קרובה יותר למיקום הטבעי של החלבונים הנבדקים, מערכת צמחית, בשיטת ה-FRET.

החלבונים עבורם נבדקה האינטראקציה עם חלבון המעטפת של וירוס צהבון האמיר הם:

CP, CP mut3, Karyopherin $\alpha 1$, C4 TYLCV

תוצאות המיקום התוך תאי מראות, שחלבון המעטפת השלם מתמקם בגרעין התא ובגרעינון. עדיין לא ידוע מה תפקיד חלבון המעטפת בתוך הגרעינון. אחד מתפקידי הגרעינון הוא מעורבות בייצור rRNA. ייתכן שהגרעינון משרת את וירוס צהבון האמיר במהלך ההכפלה (Rojas *et al.*, 2001)

CP mut3 נמצא רובו בגרעין התא ובגרעינון אבל בשונה מחלבון המעטפת השלם, הוא נמצא גם בציטופלסמה. הסיבה לכך יכולה להיות, שהוא מתקשה ליצור אינטראקציה עם הרצפטור הציטופלסמטי Karyopherin α אך, כנראה נקשר לחלבוני Karyopherin אחרים פחות ספציפיים, ומצליח להיכנס לגרעין אך לא ביעילות מיריבת כמו חלבון המעטפת התקין. בנוסף לכך,

פיזור החלבון המוטנטי בחלק מהפרוטופלסטים בגרעין התא שונה מהפיזור של חלבון המעטפת התקין.

ניסויי ה-FRET מראים שחלבון המעטפת יוצר אינטראקציה עם עצמו וגם עם הרצפטור הציטופלסמטי Karyopherin $\alpha 1$. בניגוד לכך, בדיקת האינטראקציה בין CPmut3 לעצמו היתה בעייתית. חלק מהתאים הראו מצב של FRET וחלק לא. לאחר ניתוחים סטטיסטיים המבצעים ממוצע בין תאים רבים, ניתן לטעון שאין FRET אך יידרשו ניסויים נוספים כדי לאשר או לדחות הנחה זו. בעיה נוספת שנתקלתי במהלך העבודה עם הפרוטופלסטים זו התזוזה של התאים במהלך תהליך ה-bleaching. במהלך הסריקה של הלייזר, הנמשכת 5-15 שניות, הפרוטופלסטים זזים, ולכן המדידה של עוצמת הפלורסנציה של ה-CFP לאחר ה-bleaching אינה מדויקת. לשם כך נבדקו בכל ניסוי מספר רב של תאים, עד 30, ומתוכם נבחרו רק התאים שבהם לא נראתה תזוזה. תוצאות אלו משקפות רק חלק מהאינטראקציות שבדקתי במערכת השמרית, ויש מקום להמשיך ולבדוק את השאר, כיוון שהמערכת הצמחית משקפת נכון יותר את הסביבה הטבעית לאינטראקציה של חלבונים אלו.

שלא במסגרת עבודה זו נבדקה גם אינטראקציה של חלבון המעטפת עם האנזים S-Glutathione Transferses מעגבנייה. אנזים זה עושה דטוקסיפיקציה לרעלנים בתוך הצמח כגון רדיקלים, מתכות כבדות ועוד (Kimiti *et al.*, 2004). אינטראקציה זו נלמדת עתה במעבדתנו ומסתבר שגם היא משתבשת במוטנט CP mut3. הדבר מחזק את השערתנו לגבי חשיבותה של החומצה האמינית במיקום 19 לאינטראקציות של החלבון עם חלבונים אחרים.

הצעות להמשך המחקר

מחקר זה ממשיך עבודה קודמת שנעשתה במעבדתנו. המחקר שלי שם דגש על הקצה האמיני של חלבון המעטפת, ואכן אחת מהמוטציות הנקודתיות (CP mut3) התבררה כקריטית ליכולת הקישור של החלבון עם עצמו, וכן עם שני חלבונים נוספים: Karyopherin $\alpha 1$ ו-GroEL. מכאן שמוטציה זו עשויה לפגוע בתהליך בניית הקופסית וביכולת הווירוס להתרבות ולנוע. השפעת מוטציה נקודתית זו על יצירת קופסית הווירוס ואינפקטיביות הווירוס בצמח השלם צריכה להיבדק.

יידרשו מחקרים נוספים על מנת לבחון גם את הקצה הקרבוקסילי של חלבון המעטפת. בעבודתי מצאתי שהאזור בין חומצות אמינו 184-260 הינו הכרחי לאינטראקציה עם הקצה האמיני של חלבון המעטפת. אזור זה לא נבחן בפרוטרוט, ולא ידוע היכן מתבצע הקישור.

במהלך בדיקת האינטראקציה של חלבוני מעטפת מוטנטים מול Karyopherin $\alpha 1$ נמצאו שני רצפים בחלבון המעטפת היכולים לשמש כ-NLS כאשר ה-NLS העיקרי חסר או חסום. רצפים אלו נמצאים בין חומצות אמינו 40-53 ובין חומצות אמינו 128-145 (תמונה מס' 5, הקטעים המודגשים באדום ובסגול) על מנת להוכיח שאכן רצפים אלו מתפקדים כסיגנל כניסה לגרעין צריך לבצע מוטציות נקודתיות ומוטציות חסר באזורים אלו ולבחון את השפעתן מול הרצפטור הציטופלסמטי Karyopherin $\alpha 1$.

8. רשימת ספרות

Argüello-Astorga, G.R., Guevara-González, R. G., Herrera-Estrella, L. R and Rivera-Bustamante R. F.(1994) Geminivirus Replication Origins Have a Group-Specific Organization of Iterative Elements: A Model for Replication. *Virology* **203**:90-100

Ascencio-Ibanez, J.T., Diaz-Plaza, R., Mendez-Lozano, J., Monsalve-Fonnegra, Z.I., Arguello-Astorga, G.R., Rivera-Bustamante, R.F. (1999). First report of *Tomato yellow leaf curl virus* in Yucatan, Mexico. *Plant Disease* **83**: 1178

Akad, F., N. Dotan, and H. Czosnek. (2004). Trapping of Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) and other plant viruses with a GroEL homologue from the whitefly *Bemisia tabaci*. *Arch Virol* **149**: 1481-97

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Smith JA, Seidman JG, Struhl K (1994) Current protocols in molecular biology. Greene Publishing-Wiley Interscience, New York

Avidov (Klein), Z. (1940). *Bemisia tabaci* in Israel. *Hassadeh* **20**: 84-86

Azzam, O., Frazer, J., De-La-Rosa, D., Beaver, J. S., Ahlquist, P., and Maxwell, D. P. 1994. Whitefly transmission and efficient ssDNA accumulation of bean golden mosaic geminivirus require functional coat protein. *Virology* **204**: 289 - 296

Ballas, N. and V. Citovsky (1997). Nuclear localization signal binding protein from *Arabidopsis* mediates nuclear import of *Agrobacterium* VirD2 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 10723-8

Bastiaens, P. I. and T. M. Jovin (1996). Microspectroscopic imaging tracks the intracellular processing of a signal transduction protein: fluorescent-labeled protein kinase C beta I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 8407-12

Bastiaens PI, Majoul IV, Verveer PJ, Soling HD, Jovin TM. (1996). Imaging the intracellular trafficking and state of the AB5 quaternary structure of cholera toxin. *Embo J* **15**: 4246-53

Ber R, Navot N, Zamir D, Antignus Y, Cohen S, Czosnek H. (1990). Infection of tomato by the tomato yellow leaf curl virus: susceptibility to infection, symptom development, and accumulation of viral DNA. *Arch Virol* **112**(3-4):169-80

Bird, J., Idris, A. M., Rogan, D. and Brown, J. K. (2001) Introduction of of the exotic Tomato yellow leaf curl virus-Israel in tomato to Puerto Rico. *Plant disease*, **85** : 1028

Braig, K., Otwinowski, Z., Hegde, R., Boisvert, D.C., Joachimiak, a., and Horwich, A. L. 1994. The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å. *Nature* **371**, 578 - 586

Brandizzi, F., Fricker, M and Hawes. C. (2002) A greener world: the revolution in plant bioimaging. *Biol_Nat Rev Mol Cell.* **3**:520-30

Briddon RW, Pinner MS, Stanley J, Markham PG. (1990). Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. *Virology* **177**: 85-94

Brough, C. L, R. J. Hayes, A.J. Morgan, R.H. A. Coutts and K.W. Buck. (1988). Effects of mutagenesis *in vitro* on the ability of cloned tomato golden mosaic virus DNA to infect *Nicotiana benthamiana*. *J. Gen. Virol.* **69**: 503-514

Brown, J., and Bird, J. 1992. Whitefly-transmitted geminiviruses and associated disorders in the Americas and the Caribbean basin. *Plant Dis.* **76**: 220 - 225

Byrne, D.N., Bellows, Ts. Jr. and Parrella, M.P., 1990. Whitefly in agricultural systems. In: Gerling, D. Whiteflies: their bionomics, pest status and management. Intercept, Andover, U.K. pp. 227-261

Caciagli, P., Bosco, D. and AL-Biter, L., 1995. Relationship of Sardinian isolate of Tomato yellow leaf curl geminivirus with its whitefly vector *Bemisia tabaci* *Gen. Eur.J. Plant Pathol.*, **101**: 163-170

Cingolani, G., Petosa, C., Weis, K., and Muller, C.W. (1999). Structure of importin - bound to the IBB domain of importin. *Nature* **399**: 221-229

Cingolani, G., Lashuel HA, Gerace, L., Muller, C.W. (2000). Nuclear import factors importin alpha and importin beta undergo mutually induced conformation changes upon association. *FEBS Lett* **484**: 291-298

Cohen, S. and I. Harpaz (1964). Periodic, rather than continual acquisition of a new tomato virus by its vector, the tobacco whitefly (*Bemisia tabaci* Gennadius). *Entomol. Exp. Appl.* **7**: 155-166

Cohen, S. and F. E. Nitzany (1966). Transmission and host range of the tomato yellow leaf curl virus. *Phytopathology* **56**: 1127-1131

Cohen, S., 1990. Epidemiology of whitefly-transmitted viruses. In. D. Gerling, whitefly: Their Bionomics, Pest Status and management. Intercepted Ltd., Andover ,pp. 221-225

Cordes VC, Reidenbach S, Franke WW. (1995). High content of a nuclear pore complex protein in cytoplasmic annulate lamella of *Xenopus* oocytes. *Eur. J. Cell Biol.* **68**: 240-255

Cortes, P., Ye, Z. S. and Baltimore, D. (1994). RAG-1 interacts with the repeated amino acid motif of the human homologue of the yeast protein SRP1. *Proc. Nat. Acad Sci. U.S.A.* **91**: 7633-7637

Czosnek, H., and Laterrot, H. (1997). A world-wide survey of tomato yellow leaf curl viruses. *Arch. Virol.* **142**, 1391-1406

- Damelin M, Silver PA, Corbett AH. (2002). Nuclear protein transport. *Methods Enzymol.* **351**: 587-607
- Dong X, van Wezel R, Stanley J, Hong Y. (2003). Functional characterization of the nuclear localization signal for a suppressor of posttranscriptional gene silencing. *J Virol* **77**: 7026-33
- Draper J, Scott R, Armitage P and Walden R (1988). Plant Genetic Transformation and Gene Expression. A laboratory manual. Blackwell Scientific Publications
- Duffus, J. E. 1987. Whitefly transmission of plant viruses. *In* Current Topics in Vector Research (K. H. Harris, ed). Springer Verlag, New York. **4**: 73-91
- Ebina, Y., Takahara, Y., Kishi, F., Nakazawa, A., and Bernt, R. (1983). LexA is a repressor of the colicin E1 gene. *J. Biol. Chem.* **258**: 13258-13261
- Eteessami, P., Callis, R., Ellwood, S., and Stanley, J. (1998). Delimitation of essential genes of cassava latent virus DNA 2. *Nucleic Acids Res.* **16**: 4811-4829
- Fromm M, Taylor LP, Walbot V. (1985). Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; **82**:5824-8
- Gadella TW Jr, van der Krogt GN, Bisseling T. (1999). GFP-based FRET microscopy in living plant cells. *Trends Plant Sci* **4**: 287-291
- Gafni, Y. and Epel, B.L.(2002). The role of host and viral proteins in intra- and inter-cellular trafficking of geminiviruses. *Plant Pathology.* **60**: 231-241
- Gafni, Y. (2003). Tomato yellow leaf curl virus, the intracellular dynamics of a plant DNA virus. *Mol. Plant Pathol.* **4**: 9-15
- Gallay, P., Hope, T., Chin, D. and Trono, D. (1997). HIV-1 infection of non-dividing cells through the recognition of integrase by the importin/karyopherin pathway. *Proc. Nat. Acad Sci. U.S.A.* **94**: 9825-9830
- Ghanim M, Morin S, Zeidan M, Czosnek . (1998). Evidence for transovarial transmission of tomato yellow leaf curl virus by its vector, the whitefly Bemisia tabaci. *Virology* **240**: 295-303
- Gietz RD, Schiestl RH, Willems RA, Woods RA (1995) Studies on transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* **11**:355-360
- Giles KL (1983). Plant Protoplasts. *Int. Rev. Cyt. Supplement* 16
- Gordon, G.W., G. Berry, X.H. Liang, B. Levine, and B. Herman., (1998). Quantitative fluorescence resonance energy transfer measurements using fluorescence microscopy. *Biophys J.* **74**:2702-13

- Gorlich, D., Henklein, P., Laskey, R. A., Hatmann, E. (1996). A 41 amino acid motif in importin confers binding to importin and hence transit into the nucleus. *EMBO J.* **15**: 1810-1817
- Gorlich, D and Mattaj, IW (1996). Nucleocytoplasmic transport. *Science* **271**: 171-17
- Gorlich, D and Kutay, U. (1999). Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **15**: 607-660
- Greathead, A. H., 1986i- A Literature Survey, pp. 17-25 (Cock M..J. W., ED). Ascot: FAO and CAB International Institute of biological Control
- Greber, U. F. a. K Kasamatsu., H. (1996). Nuclear targeting og SV40 and adenovirus. *Trends in Cell Biology* **6**: 189-195
- Hallan,V. and Gafni.Y. (2001). Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) capsid protein (CP) subunit interactions: implications for viral assembly. *Arch. Virol.* **146**: 1765-1773
- Harrison, B. D. (1985). Advances in geminivirus research. *Annu. Rev. Phytopathol* **23**: 55-82
- Heyraud-Nitschke F, Schumacher S, Laufs J, Schaefer S, Schell J, Gronenborn B. (1995). Determination of the origin cleavage and joining domain of geminivirus Rep proteins. *Nucleic Acids Res* **23**: 910-6
- Heyraud, F., Matzeit, V., Kammann, M., Schaefer, S., Schell, J., and Groenborn, B. (1993). Identification of the mutation sequence for viral-strand DNA synthesis Of wheat dwarf virus. *EMBO J.* **12**: 4445-4452
- Jeffrey JL, Pooma W, Petty IT. (1996). Genetic requirements for local and systemic movement of tomato golden mosaicvirus in infected plants. *Virology* **223**:208-18
- Jupin I, De Kouchkovsky F, Jouanneau F, Gronenborn B. (1994). Movement of tomato yellow curl leaf geminivirus (TYLCV): involvement of the protein encoded by ORF C4. *Virology* **204**: 82-90
- Karpova TS, Baumann CT, He L, Wu X, Grammer A, Lipsky P, Hager GL, McNally JG. (2003). Fluorescence resonance energy transfer from cyan to yellow fluorescent protein detected by acceptor photobleaching using confocal microscopy and a single laser. *J Microsc* **209**: 56-70
- Kato, K., Onuki, M., Fuji, S., Hanada, K. (1998). The first occurrence of tomato yellow leaf curl virus in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Japan. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn* **64**: 552-559
- Kimiti G. Kilili, Neli Atanassova, Alla Vardanyan, Nicolas Clatot, Khaled Al-Sabarna, Panagiotis N. Kanellopoulos, Antonios M. Makris, and Sotirios C. Kampranis. (2004) Differential Roles of Tau Class Glutathione S-Transferases in Oxidative Stress. *J. Biol. Chem.* **279**: 24540-24551

Kobe B. (1999). Autoinhibition by an internal nuclear localization signal revealed by the crystal structure of mammalian importin alpha. *Nat Struct Biol.* **6**:388-97

Kunik T, Salomon R, Zamir D, Navot N, Zeidan M, Michelson I, Gafni Y, Czosnek H. (1994). Transgenic tomato plants expressing the tomato yellow leaf curl virus capsid protein are resistant to the virus. *Biotechnology (N Y)*. **12**:500-504

Kunik,T., Palanichelvam,K., Czosnek,H., Citovsky,V. and Gafni,Y. (1998). Nuclear import of the capsid protein of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in plant and insect cells. *Plant J* **13**: 393-9

Kunik, T., Mizrachy, L., Citovsky, V and Gafni, Y. (1999). Characterization of a tomato karyopherin α that interacts with the Tomato Yellow Leaf Curl Virus (TYLCV) capsid protein. *J Exp Bot* **50**: 731-732

Kwok S, Higuchi R.(1989). Avoiding false positives with PCR. *Nature*. **18**;339:237-8

Lamb, R. A. (1989). Genes and proteins of the influenza viruses. In *The Influenza Viruses*,ed. **68**: 7993–8000

Laterrot, H. and H. Czosnek (1997). A worldwide survey of tomato yellow leaf curl viruses. *Arch Virol* **142**: 1391-406

Lazarowitz, S. G. (1992). Geminiviruses: genome structure and gene function. *Crit. Rev. Plant Sci.* **11**: 327-349

Lucas, W. J. and R. L. Gilbertson (1994). Plasmodesmata in relation to viral movement within leaf tissues. *Annu. Rev. Phytopathol.* **32**: 387-411

Lucas, W. J. and J. Y. Lee (2004). Plasmodesmata as a supracellular control network in plants. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **5**: 712-26

Malik, H. S., Eickbush, T.H, and Goldfarb, D S.(1997). Evolutionary specialization of nuclear targeting apparatus. *Proc. Nat. Acad Sci.* **94**: 13738-13742

Malik, P. S ., Kumar,V., Bagewadi, B and Mukherjee, S.K.(2005). Interaction between coat protein and replication initiation protein of *Mung bean yellow mosaic India virus* might lead to control of viral DNA replication. *Virology* **337**:273-283

Markham, P.G., Bedford, I. D.,Liu, S. and Pinner, M. S., 1994. The transmission of geminiviruses by *Bemisia tabaci*. *Pestic. Sci* ,**41**. 123-128

Mizrachy L, Dabush D, Levy Y, Aloni R, Altman A, Gafni Y. (2004). Cloning and characterization of the tomato Karyopherin $\alpha 1$ gene promoter. *Dev Growth Differ* **46**. 512-22

Melchior F, Gerace L.(1995). Mechanisms of nuclear protein import. *Curr Opin Cell Biol* **7**:310-8.

Momol, M.T., Simone, G.W., Dankers, W., Spernkel, R.K., Olson, S.M., Mimol, E.a., Polston, J.E., Heibert, E.. (1999). First report of tomato yellow leaf curl virus in tomato in south Georgia. *Plant Disease* **83**: 487

Morin S, Ghanim M, Zeidan M, Czosnek H, Verbeek M, van den Heuvel JF. (1999). A GroEL homologue from endosymbiotic bacteria of the whitefly *Bemisia tabaci* is implicated in the circulative transmission of tomato yellow leaf curl virus. *Virology* **256**: 75-84

Morin S, Ghanim M, Sobol I, Czosnek H. (2000). The GroEL protein of the whitefly *Bemisia tabaci* interacts with the coat protein of transmissible and nontransmissible begomoviruses in the yeast two-hybrid system. *Virology* **276**: 404-16

Morioka, M., and Ishikawa, H., 1992. Mutualism based on stress: selective synthesis and phosphorylation of a stress protein by an intracellular symbiont. *J. Biochem (Tokyo)*. **111**:431-5

Moriones, E. and J. Navas-Castillo (2000). Tomato yellow leaf curl virus, an emerging virus complex causing epidemics worldwide. *Virus Res* **71**: 123-34

Navot N, Pichersky E, Zeidan M, Zamir D, Czosnek H. (1991). Tomato yellow leaf curl virus: a whitefly-transmitted geminivirus with a single genomic component. *Virology* **185**: 151-61

Nigg, E. A. (1997). Nucleoplasmic transport: Signals, mechanism and regulation. *Nature* **386**: 779-787

Noris E, Vaira AM, Caciagli P, Masenga V, Gronenborn B, Accotto GP. (1998). Amino acids in the capsid protein of tomato yellow leaf curl virus that are crucial for systemic infection, particle formation, and insect transmission. *J Virol* **72**: 10050-7

Noueiry AO, Lucas WJ, Gilbertson RL. (1994). Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. *Cell*; **76**:925-3

Ohno M, Fornerod M, Mattaj IW. (1998). Nucleocytoplasmic transport: The last 200 nanometer. *Cell* **92**: 327-36

O'Neil, R. E., Jaskunas, R., Blobel, G., Palese, P. and Moroianu, J. (1995). Nuclear import of influenza virus RNA can be mediated by viral nucleoprotein and transport factors required for protein import. *The Journal of Biological Chemistry* **270**: 1-4

Orozco, B.M., Miller, A.B., Settlege, S. B., and Hanley-Bowdoin, L., (1997) Functional domains of a geminivirus replication protein. *J Biol Chem*. **272**:9840-9846

Palanichelvam, K., Kunik, T., Citovsky, V. and Gafni, Y. (1998). The capsid protein of tomato yellow leaf curl virus binds cooperatively to single-stranded DNA. *J Gen Virol* **79**: 2829-2833

Pante, N. a. U., A. (1996). Toward the molecular dissection of protein import into nuclei. *Cell Biology* **8**: 397-406

- Pante N. and M. Kann (2002). Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm. *Mol. Biol. Cell* **13**: 425-434
- Patterson GH, Piston DW, Barisas BG. (2000). Forster distance between green fluorescent protein pairs. *Anal. Biochem* **284**: 438-440
- Peifer, M., Berg, S. and Reynolds, A.B. (1994). A repeating amino acid motif shared by proteins with diverse cellular roles. *Cell* **76**: 789-791
- Pilowsky, M., and Cohen, S. (1990). Tolerance to *tomato yellow leaf curl virus* derived from *Lycopersicon peruvianum*. *Plant Dis.* **74**: 248-250
- Polston, J. E., R. J. McGovern. and Brown, L.G. (1999). Introduction of Tomato Yellow Leaf Curl Virus in Florida and Implications for the Spread of This and Other Geminiviruses of Tomato. *Plant Disease* **83**: 984-988
- Polston, J. E., Rosebrock, T. R., Sherwood, T.A., Creswell, T. and Shoemaker, P.JI. (2002). Appearance of Tomato yellow leaf curl virus in North Carolina. *Plant Disease* **86**: 73
- Qin, S.W., Ward, B.M., Lazarowirz, S.G. (1998). The bipartite geminivirus coat protein aids BR1 function in viral movement by affecting the accumulation of viral single-stranded DNA. *Virology*. **72**:9247-56
- Robins, J., Dilworth, S.M., Laskey, R.A. and Dingwall, C. (1991). Two independent basic domains in nucleoplasmic nuclear targeting sequence, Identification of class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell*. **64**:615-623
- Rochester DE, DePaulo JJ, Fauquet CM, Beachy RN. (1994). Complete nucleotide sequence of the geminivirus tomato yellow leaf curl virus, Thailand isolate. *J Gen Virol* **75**: 477-85
- Rojas, M. R. (1999). Characterization of potyvirus and geminivirus movement proteins. Ph.D. Thesis, University of California-Davis
- Rojas MR, Jiang H, Salati R, Xoconostle-Cazares B, Sudarshana MR, Lucas WJ, Gilbertson RL. (2001) Functional analysis of proteins involved in movement of the monopartite begomovirus, *Tomato yellow leaf curl virus*. *Virology* **291**: 110-25
- Rout MP, Aitchison JD, Magnasco MO, Chait BT. (2003) Virtual gating and nuclear transport: the hole picture. *Trends Cell Biol* **13**:622-28
- Rout MP and G. Blobel (1993). Isolation of the yeast nuclear complex. *J. Cell Biol.* **123**. 771-83
- Rybicki, E. P., Bridson, R. W., Brown, J.K., Fauquet, C.M., Maxwell, D.P., Harrison, B.D., Markham, P.G., Bisaro, D.M., Robinson, D. and Stanley, J. (2000). Family Geminiviridae. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. C. M. F. a. D. H. L. B. M.H.V. van Regenmortel. San Diego, Calif., Academic Press, Inc.: 285-297

Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989). Molecular Cloning. A laboratory manual. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press USA

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **74**:5463-7

Stoffler D, Fahrenkrog B, Aebi U. (1999). The nuclear pore complex: from molecular architecture to functional dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**: 391-401

Sudarshana, M. R., Wang, H. L., Lucas, W.J., and Gilbertson, R. L. (1998). Dynamics of bean dwarf mosaic geminivirus cell-to-cell and long-distance movement in *Phaseolus vulgaris* revealed using the green fluorescent protein. *Molecular Plant Microbe Interact.* **11**: 277-291

Tsien, R.Y. (1998) The green fluorescent protein, *Annu Rev Biochem.* **67**:509-544

Tsuji, L., Takumi, T., Imamoto, N., Matsuki, R., Yoneda, Y. (1997). Identification of novel homologues of mouse importin, the subunit of the nuclear pore-targeting complex, and their tissue-specific expression. *FEBS* **416**: 30-34

Tzfira T, Tian GW, Lacroix B, Vyas S, Li J, Leitner-Dagan Y, Krichevsky A, Taylor T, Vainstein A, Citovsky V. 2005. pSAT vectors: a modular series of plasmids for autofluorescent protein tagging and expression of multiple genes in plants. *Plant Mol Biol.* **57**: p. 503-16

Van den Heuvel, J. F. J.M., Verbeek, M., and van der Wilk, F. 1994. Endosymbiotic bacteria associated with circulative transmission of potato leafroll virus by *Myzus persicae*. *J. Gen. Virol.* **75**, 2559-2566

van Weazl, R., Dong, X., Liu, H., Tien, P., Stanley, J. And Hong, Y. (2002). Mutation of three cysteine residues in *Tomato yellow leaf curl virus-China C2* protein causes dysfunction in pathogenesis and posttranscriptional gene-silencing suppression. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **15**: 203-208

Weis, K., Ryder, U., Lamond, A. (1996). The conserved amino-terminal domain of for nuclear protein import. *EMBO J.* **15**: 1818-1825. hSRP1 alpha is essential

Whittaker GR., Kann M., Helenius A. (2000). Viral entry into the nucleus. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **16**:627-51

Xia, z. and Y. Liu. (2001). Reliable and global measurement of fluorescence resonance energy transfer using fluorescence microscopes. *Biophys. J.* **81**:2395-2402

Y. Yang, T. A. Sherwood, C. P. Patte, E. Hiebert, and J. E. Polston. (2004). Use of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) *Rep* Gene Sequences to Engineer TYLCV Resistance in Tomato. *Phytopathology.* **94**:490-496.

Zhang W, Olson NH, Baker TS, Faulkner L, Agbandje-McKenna M, Boulton MI, Davies JW, McKenna R. (2001). Structure of the Maize streak virus geminate particle. *Virology*. **279**:471-7

cell. GroEL protects the virus from degradation in the insect hemolymph during the virus circulation in the insect body.

In Two Hybrid System the interactions between CP and all its mutants were tested by two reporter genes, one in the yeast – LEU2 gene required for biosynthesis of leucine, and the second is in the plasmid – *LacZ* which encodes the gene for β Galactosidase.

The results obtained showed that the interaction between the CP and itself is indeed between the N terminus of one CP protein and the C terminus of the other.

In addition to these, I found a point mutation (a replacement of arginine to proline in position 19) critical for all interactions studied. I suggest that this mutation causes change in the protein structure leading to failure to interact with itself and with the two proteins that were examined. This mutation might prevent insect transmission, but this point needs to be further investigated.

As an independent approach to confirm the described interaction, I used the FRET (fluorescence resonance energy transfer) method. The results obtained indeed showed that the CP interacts with itself, and with Karyopherin α 1.

9. ABSTRACT

The Tomato yellow leaf curl disease is caused by the *Tomato yellow leaf curl virus*. Transmitted by the whitefly (*Bemisia tabaci*), the disease causes damage to the tomato yield in Israel and in tropical and subtropical regions around the world.

One of the proteins of TYLCV is the CP (coat protein) which is encoded by the v1 gene. This protein is essential for building the capsule, for the virus spread, and is involved in a number of processes that take place during the life cycle of the virus. Its primary function is the encapsidation of the virus ssDNA. The capsule is built of 110 copies of this protein. CP might be also essential for viral movement from cell to cell and for import and export of its genome from the nucleus. In addition to these, CP is also needed for insect transmission and it protects the genome in the insect from degradation by interaction with GroEL homolog produced by endosymbiotic bacteria of *B.tabaci*.

The main objective of my research was to attain an understanding of the TYLCV assembly in tomato plants by studying the self interaction of coat protein and identifying the amino acids involved in the assembly of the virus. This research continues an earlier research conducted in our lab. In former study the self interaction of the CP was examined by point mutation and deletions. The main finding was that the N terminus of one protein and the C terminus of another CP interact with each other. In my work I studied the assembly of TYLCV in a more precise way by using two different research methods:

1. The Yeast Two Hybrid System
2. FRET in protoplasts of tobacco.

First, I introduced three point mutations in the N terminus of the CP. The mutations were done in the NLS (nuclear localization signal) region, the amino acids changed from positive charge to a neutral one. In addition, I deleted amino acids in both sides of the protein, N terminus and C terminus, which were found previously to be important for the CP interaction with itself. The mutant proteins were tested for their interaction capability with the wild type CP and with themselves. Also they were tested with two other proteins: GroEL and Karyopherin $\alpha 1$ that are involved in TYLCV infection. Karyopherin $\alpha 1$ is involved in the import the virus genomes into the nucleus of the plant

Bar-Ilan University

Study of domains in *Tomato yellow leaf curl virus* capsid protein (CP) necessary for CP-CP interaction during capsule assembly

Yaakov Noga

Submitted in partial fulfillment of the
Requirements for Master's Degree in the Faculty of Life
Sciences
Bar-Ilan University

Ramat-Gan, Israel

2005