

261-0283-99

קוד מחקר:

נושא: שיבוש מנגנון החדירה של וירוס צהבון האמיר לגרעין התא, למניעת התרבותו של הוירוס בצמח העגבניה

מוסד: מינהל המחקר החקלאי, ת.ד. 6 בית דגן 50250

חוקר ראשי: דר' ידידיה גפני

חוקרים שותפים: 1

תקופת מחקר: 1997-1999
מאמרים:

תקציר

מטרת המחקר: לפתח גישה חדשנית במלחמה בוירוס צהבון האמיר של העגבניה. העובדה שוירוס צהבון האמיר שייך לקבוצת וירוסי הג'מיני מלמדת על היותו וירוס DNA. וירוסי ג'מיני הם בעלי גנום חד גדילי ולכן הם נדרשים לחדור לגרעין התא המאכסן לשם ריבוי. בהנחה שתהליך החדירה לגרעין הוא תהליך מבוקר ולא אקראי, הכרתו תסייע למנוע מחדירת הוירוס לגרעין ותבלום את המחלה.

במהלך המחקר: למדנו שחלבון המעטפת של הוירוס נושא סיגנל ספציפי הקרוי NLS המאפשר את חדירתו לגרעין התא. חלבון זה, לדעתנו, מאפשר לגנום הויראלי את החדירה לגרעין. ממחקרים של אחרים במערכות אנימליות למדנו שחלבונים המולכים לגרעין נעזרים ברצפטורים ציטופלסמיים המאפשרים להם חדירה זו דרך נקבים קבועים בממברנות הגרעין. במהלך המחקר שיבטנו גן לרצפטור שכזה מעגבניה המקודד לרצפטור קריופרין אלפא. בהמשך תהינו האם הגן לקריופרין מושפע מחדירת הוירוס לצמח ואם כן הניתן יהיה לשבש את פעולתו ולמנוע חדירה זו. לשם כך בודדנו מספריה גנומית של עגבניה גן גנומי ראשון של קריופרין אלפא. לאחר בידודו נעשתה אנאליזה של האזור המפעיל את הגן קרי הפרומוטור. אזור הפרומוטור חובר לגן מדוות והוחדר לפרוטופלסטים והראה פעילות. עתה אנו בעיצומה של עבודת טרנספורמציה של עגבניות שבסיומה נוכל לדווח על אופיו של הפרומוטור, רקמות מועדפות להתבטאותו, ושילבים שונים בחיי הצמח בהם הוא מתבטא. לאחרונה מצאנו גם סיגנל הוצאה מן הגרעין הקיים ברצף המקודד לחלבון המעטפת של הוירוס ובהמשך, מחוץ למסגרת הזמן של פרויקט זה, ננסה להשתמש בידע זה גם כן על מנת ולמנוע מן הוירוס הן את הכניסה והן את היציאה (במידה והחסימה לכניסה לא תהיה מוחלטת) של הוירוס מגרעין התא הצמחי המאכסן.

שיבוש מנגנון החדירה של וירוס צהבון האמיר לגרעין התא לשם מניעת התרבותו
של הוירוס בצמח העגבניה

Blocking replication of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in tomato plants by
interfering with viral import into the nucleus

דו"ח סופי

מספר תוכנית 261-0283-99

Yedidya Gafni (P.I.)

ידידיה גפני* - חוקר ראשי

Hanoch Czosnek

חנוך זוסנק**

*המחלקה לגנטיקה, המכון לגד"ש, מינהל המחקר החקלאי, מרכז

וולקני, בית דגן 50250

A.R.O., The Volcani Center, Bet Dagan 50250

vcgafni@netvision.net.il

** המחלקה לגד"ש, הפקולטה לחקלאות, האוניברסיטה העברית

בירושלים, רחובות 76100

Faculty of Agriculture, The Hebrew University of

Jerusalem, Rehovot 76100 czosnek@agri.huji.ac.il



תקציר מדעי

העבודה המתוארת בדו"ח זה נעשתה על מנת לפתח גישה חדשנית במלחמה בוירוס צהבון האמיר של העגבניה. העובדה שוירוס צהבון האמיר שייך לקבוצת וירוסי הג'מיני מלמדת על היותו וירוס DNA. וירוסי ג'מיני הם בעלי גנום חד גדילי ולכן הם נדרשים לחדור לגרעין התא המאכסן לשם ריבוי. בהנחה שתהליך החדירה לגרעין הוא תהליך מבוקר ולא אקראי, הכרתו תסייע למנוע מחדירת הוירוס לגרעין ותבלום את המחלה. במהלך המחקר המתואר, למדנו שחלבון המעטפת של הוירוס נושא סיגנל ספציפי הקרוי NLS המאפשר את חדירתו לגרעין התא. חלבון זה, לדעתנו, מאפשר לגנום הויראלי את החדירה לגרעין. ממחקרים של אחרים במערכות אנימליות למדנו שחלבונים המולכים לגרעין נעזרים ברצפטורים ציטופלסמיים המאפשרים להם חדירה זו דרך נקבים קבועים בממברנות הגרעין. במהלך המחקר שיבטנו גן לרצפטור שכזה מעגבניה המקודד לרצפטור קריופרין אלפא. בהמשך תהינו האם הגן לקריופרין מושפע מחדירת הוירוס לצמח ואם כן הניתן יהיה לשבש את פעולתו ולמנוע חדירה זו. לשם כך בודדנו מספריה גנומית של עגבניה גן גנומי ראשון של קריופרין אלפא. לאחר בידודו נעשתה אנאליזה של האזור המפעיל את הגן קרי הפרומוטור. אזור הפרומוטור חובר לגן מדווח והוחדר לפרוטופלסטים והראה פעילות. עתה אנו בעיצומה של עבודת טרנספורמציה של עגבניות שבסיומה נוכל לדווח על אופיו של הפרומוטור, רקמות מועדפות להתבטאותו, ושלבים שונים בחיי הצמח בהם הוא מתבטא.

לאחרונה מצאנו גם סיגנל הוצאה מן הגרעין הקיים ברצף המקודד לחלבון המעטפת של הוירוס ובהמשך, מחוץ למסגרת הזמן של פרויקט זה, ננסה להשתמש בידע זה גם כן על מנת ולמנוע מן הוירוס הן את הכניסה והן את היציאה (במידה והחסימה לכניסה לא תהיה מוחלטת) של הוירוס מגרעין התא הצמחי המאכסן.

מבוא - תאור הבעיה והגישה הניסויית לפתרונה:

וירוס צהבון האמיר של העגבניה (TYLCV) הוא וירוס אלים הפוגע בגידולי העגבניה בארץ ובעולם בצורה ניכרת ונפוצותו הולכת וגדלה (ראה תמונת סימפטומים בעמוד ראשון). הוירוס שייך לקבוצת וירוסי DNA חד גדיליים הקרויה וירוסי הג'מיני על שום המראה של הוירוס במיקרוסקופ אלקטרוני. בין וירוסי הג'מיני מבדילים שתי קבוצות עיקריות: כאלה שלהם גנום בודד מעגלי חד גדילי וכאלה שלהם שני גנומים חד גדיליים מעגליים. וירוסי הג'מיני נישאים על ידי חרקים בלבד וחודרים לתא בעת שהחרק ניזון מהצמח. לאחר חדירתם לתא הם חייבים לחדור לגרעין התא לשם שיכפולם. בוירוסי הג'מיני בעלי גנום כפול, כמו זה הקרוי SqLCV נמצא שחלבון המקודד על ידי הגנום B, משמש כמעבורת לגנום הויראלי אל תוך הגרעין של התא (Sanerfoot and Lazarowitz, Trends in Cell Biol. 6: 353-358, 1996). מי מהגנים המצויים בגנום היחיד של בעלי גנום אחד בלבד משמש לתפקיד זה? האם בכלל קיים חלבון כזה בבעלי הגנום היחיד? מה חשיבות יש להכרת מנגנון החדירה לגרעין של הוירוס? האם ניתן לבלום את התרבותו בתא המאכסן אם נכיר את דרך כניסתו לגרעין? בכדי לענות על שאלות אלה באופן שיאפשר בעתיד בלימת התרבותו של הוירוס צהבון האמיר של העגבניה, עלינו ללמוד את מנגנון החדירה לגרעין של וירוס זה ולדבר תהיינה מן הסתם גם השלכות על יכולתנו בעתיד למנוע ריבויים של וירוסי ג'מיני אחרים.

ככלל, מנגנון חדירת מולקולות לגרעין התא נלמד ביסודיות בעשור האחרון וממצאים רבים מאד נאספו ממחקרים אלו. נמצאנו למדים שאין חדירת חלבונים ומולקולות גדולות אחרות נעשית בדיפוסיה אלא במנגנון ייחודי המחייב רצפטורים מסיסים בציטופלסמת התא (קריופרינים) לאתר חלבונים המיועדים לגרעין והמזוהים על פי רצף חומצות אמיניות בהם הקרוי NLS. חלבון, או קומפלכס חלבוני, או קומפלכס חלבון-חומצת גרעין (T-DNA כדוגמה) שמיועדים לגרעין, מובאים על ידי הרצפטורים המסיסים לפתחים בממברנת הגרעין המכונים Nuclear pores. מכאן הם מועברים דרך ממברנת הגרעין בתהליך הדורש אנרגיה, אל תוך חלל הגרעין.

בעבודה הקדמית שביצענו, בטרם החילונו בעבודה הנכחית, הראנו שחלבון המעטפת של וירוס צהבון האמיר של העגבניה מכיל NLS והוא בעל אפיניות לגרעין התא הן בתאי צמחים והן בתאי חרקים. עבודה זו פורסמה לאחרונה (Kunik et al., *Plant J.* 13: 121-129, 1998).

מטרות המחקר:

מטרות המחקר שנועדו לאפשר פיתוח גישה חדשנית לבלימת התרבותם של וירוסי DNA בצמחים הינן:

- א - לאפיין את הרצפטורים הציטופלסמטיים המעורבים בהליך החדירה לגרעין התא של הוירוסים ו/או חלבונים של הוירוסים.
- ב - לשבט את הגנים לרצפטורים אלה. יש לידיעתנו לפחות שלשה גנים לרצפטור הקרוי קריופרין אלפא בעגבניה.
- ג - ללמוד על בקרת התבטאותם של הגנים לרצפטורים אלו, לברר את האפשרות להעדפה של חלבוני הוירוס או הוירוס השלם את אחד הרצפטורים על פני האחרים. לכך חשיבות רבה בפתיחת האפשרות לבלום את חדירת הוירוס לגרעין.
- ד - שלא במסגרת המחקר הנוכחי, יש בדעתנו ליצור צמחים טרנסגניים שיבטאו גנים הבולמים את חדירתו של הוירוס לגרעין.

ניסויים ותוצאות:

- א - איפיון הרצפטורים הציטופלסמטיים המעורבים בהליך החדירה לגרעין התא של הוירוסים ו/או חלבונים של הוירוסים ושיבוט הגנים המקודדים להם. כאמור כבר בשנה שחלפה בודדנו ושיבטנו את הגן לקריופרין אלפא מספרית cDNA של עגבניה. המידע שהשגנו מהשיבוט וקביעת הרצף הוכנס למאגר העולמי של ה GeneBank וקיבל את המספר AF017252.

CGACGGCCAGTGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAATCTGGCT
CAATGAGGGTGTGTTGAATTGTTGTTATTGTTATTAGTCCCTTCAAGTTGGTTG
GAGATAGCTGTTGGATGGACATTCATAGCCTGAGAACTAGACTTTTTTCGACA
AGGCTCCATGAAATCCGACGTTTCGAGTTCCTCCGCCACCGGAGTTTCGTTT
GCCGTCGATTCCCTCCGTCAATTCCACCTGAACTTCAGTGAGAGGGGTGCCA
TCACTTGGTGAACAAACCCCATTTGGTCAATTCCTTACAAGGTTGGCTTAAAGT
CGATCGAATTTTCAGTTCGCGACTCAAATGACGTACTCGCAGATTCTTTGAGA
GTCGCCTCTCGATTCTGGCCGATTGCGACGATAGAATTGCTTGATTTTTTGA
TATTTGGAGCTCGTGATGTGGCGAATCCCATTACCATCACCTTTTCATCTCGA
TTCATCCCATAAAATCCTTGGGAAATATTTCTAATTTCTCTGTCGAACTCCTC
TTTgTGCACAGTGTTTCATCGCCTCTTTGCACTGCGATTTTGAGGAATTCAGAG
GTAAATCATGgAGCGTGCTGCTATGGGATTTGTTGCCCTTGTCAGACGCTC
AAGGTGGCTTTGGTCCGGCGGCGTACGCGCCTGCGCAGTGGCGCGCGTGGG
TGACTGTACAGTATCCGTTGGAGGGACAGTTTAGGAAGAAAGCAAAATTATA
GAGAGAGAAGGTGCTTCATTTTAAAAAAATTATAATTCAGTTAGAGGTTTAT
GACTGATTGGTTGAAGGAAGAAACATACACGTGATTTATGGGAATCAATTAA
TTTTTGTTCATCCCTTATTTAATACTTAAACTGATAACAATAACTTAATAA
TTAAGTATCAACCGTTATTAATTAAAGTATCTGTCTACAATATTATGTATTC
GAAAAAACACTAAAAAAGAGATTTTTTAGTAATTAATGAAAGATAGGGATAAA
AAGTGATTTTTCTTTTATACTATGTGATTTACCTAATTTTTTACTTTCAATTTCA
TATTAATACTATGCGATTCCTAAAATATATCCAAAGAAAAATGGGATGAATTT
TTGCTGAAATGGGCTTGAGCTTCATGAATTGCAACTTTGGAAAATCCAACAC
ATATTTGCACTAAGCATTGCGGAATGGCCCAATAACACCCCCACCCCCTCGG
TCTCTCGACGGGAACTATATAAATAGGACACGATATACAAATAATATTTTAG
TTTGATTTTAAATACATTTCTCAAATGGTGTTTTGATTTTCGAATATATCATAAC
ACTCCAATATATCAAGCAAAGTGATATAGCTGATCGTACATTTCCATTAAGTG
ATGTATATGAATATATTATGATGATATAACCATTATAAATTTAAATAAATCTCG
AAAATATCATACTAATATATAAATATACTACAATAATATCGTAGAAATCTCTC
TAAATTATTAATACTCAATGATACCATAGAAATGTATAAATATATACTA
ACATTAATGTGTCGAAACTTACTGTACCGTAACTCTATATTTGGCGGCATATT
TTATTAATCAGTTGCATTTAGCGGGCTGCTATAGTAAAGCAAATTAATCTTC
TACTTTTAATTACTAGTTACAGGTAGAGCAGTTAGGATATGCTATTTTTTTGT
TATCTCCTCTTATTATTATACCATATCATATAGAATAGTCAGTACGTAAATTTG
CATGTATGATCATTCAATTTTTTCGACGTGACATAAAGATTTATTAATAAATAA
TTACTAATACTGAATTTCCACGTAAAAAATAAGAAATTTAAAAATAAAATAAC
TTCCTTAAATTCAAAGTTAAACTACAAAGAAAATTTATTTAATGCTTTTCGAC
ACGAATAATAATTATGAAAATGAAAGTAAGAAATTTACTACTTAGGAAAACG
AAGCCGTGGCAATATCGTAGAAAACAGCAATAATAAAGGCTACTTTCCAAAA
TCAGAACGGTGGTTGAAACAAAACCTTTTTTTTTCTTTTTAGAAACAATCCAA
ATTTTCCCCAAACCCTGATTCCACTCTCAATTGTCTTCTTCCTCATTTTCCTAT
TTAACAAAACCTCAATTTTCGCAATTTCGAATTCCTCAAACCTGAATTTTGTTTATA
GAGATTATCGATTATCGAGTTGAGTTTCAAGATTTTCGATTACCCGGAGCTATGT

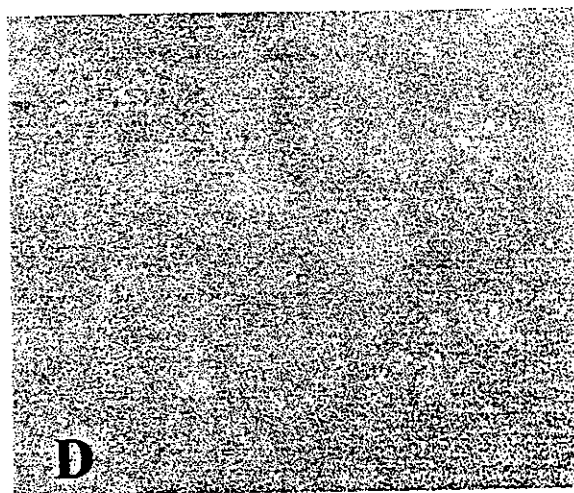
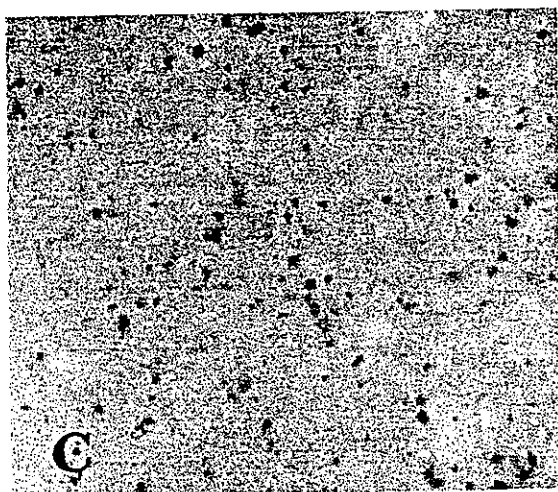
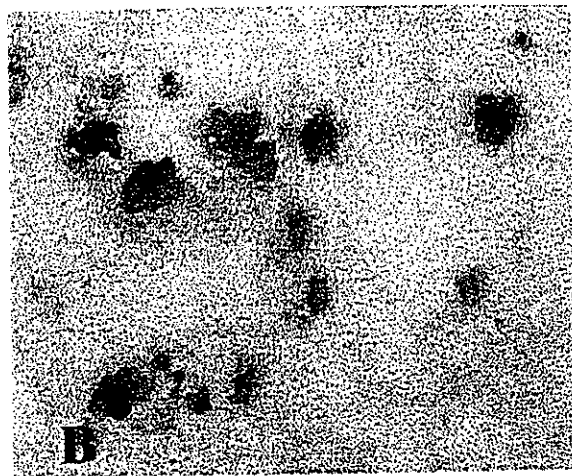
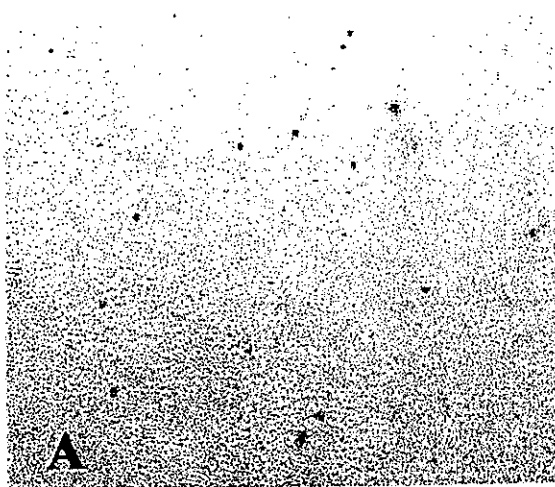
תמונה מספר 1. רצף המוקלאוטידים של הפרומוטור של גן לקריופרין אלפא

מעבדיה. הקודון הראשון של החלבון מסומן באדום נטוי.

ב - שיבוט ואיפיון אזור בקרת ההתבטאות של קריופרין אלפא בעגבניה.
על מנת ללמוד על הדרך בה מבוקרת התבטאותם של הגנים לקריופרין אלפא בעגבניה, החילונו בסריקת ספריה גנומית של עגבניה. ספריה זו שהוכנה במעבדתו של פרופ' אליעזר ליפשיץ מהטכניון בחיפה, ניתנה לנו בתוך פאג' FixII ונסרקה באמצאות גלאים אחדים שנלקחו מהגן שבודדנו לקריופרין אלפא מספרית ה cDNA. במהלך שנת הדו"ח הנוכחי בודדו מספר שבטים בהם ניתן היה למצוא אזורי DNA שמעבר לחלק המקודד (הידוע לנו כבר משנה קודמת). אחד משבטים אלו: LM118, הוא בגודל של 7000 בסיסים והוא נלמד ואופיין ורצף ה - DNA שלו נקבע. ברצף זה מצאנו חלק מאזור הקידוד של הגן ובו לפחות שני אינטרונים, ואזור DNA בגודל של למעלה מאלפיים ומאתיים נוקלאוטידים בצד ה - 5' לקודון התחלת החלבון. אזור זה (ראה תמונה מספר 1 בעמוד 5) נמצא כגדול מספיק על מנת להבחין להיותו אזור בקרת השעתוק של הגן.

ג - לימוד בקרת ההתבטאות של קריופרינים בעגבניה.
על מנת ללמוד את פעילות השעתוק ובקרתה של הגן לקריופרין אלפא בעגבניה קבענו השנה את ראשית נקודת תחילת השעתוק בטכניקת של RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends). נקודה זו נמצאת 88 נוקלאוטידים מעל תחילת התרגום. במטרה לבחון את פעילות הפרומוטור ששובט השנה, בנינו קונסטרוקטים מולקולריים בהם מחובר הרצף הנחשד כפרומוטור של הגן לקריופרין, למעקובת המקודדת לחלבון המדווח GUS. כמו כן בחנו השנה את פעילותו של הפרומוטור LM1 בפרוטופלסטים של פטוניה ומצאנו שישנה כזו ייחודית לרצף שתואר בעמוד הקודם (ראה תוצאות בתמונה 2). בהמשך תבחן הפעילות בצמחי עגבניה מותמרים בהם גם תבחן ספציפיות ההתבטאות אם אכן קיימת ספציפיות שכזו.

כמו כן יבדקו אזורים שונים בפרומוטור, תוך שימוש במוטגנזה שלהם על מנת להכיר את השפעתם הסגולית על התבטאות הגן.



תמונה 2: ביטוי בר חלוף של GUS בתאי פטוניה, תחת בקרת הפרומוטור-LM1.

- A- רצף הפרומוטור מאוחה ל GUS-LM1.
- B- תמונת תקריב של תאי פטוניה בהם יש ביטוי של GUS-LM3.
- C- ביקורת חיובית, כאשר – CaMV35S פרומוטור חזק מאוחה ל GUS-pJD330.
- D- ביקורת שלילית, כאשר רצף הפרומוטור חובר הפוך ל GUS-LM2.

סיכום

1. מטרות המחקר לתקופת הדו"ח תוך התייחסות לתוכנית העבודה.
במסגרת תוכנית המחקר הנוכחית הצבנו מטרות אחדות: הראשונה היא ניסיון להכרה של הסיגנלים בחלבון המעטפת של וירוס צהבון האמיר של העגבניה המשמשים לחדירתו לגרעין התא המאכסן ולהוצאתו ממנו. כמו כן ניסינו והצלחנו לזהות רצפטורים ציטופלסמטיים המעורבים בהחדרת החלבונים לגרעין התא. שיבטנו גן לרצפטור כזה ואיפיינו את פעולת הפרומוטור שלו.
2. עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח.
על מנת לבדוד את הפרומוטור האמור, נסרקה ספריה גנומית של עגבניה באמצעות פרובים שנלקחו מה - cDNA שבוודד שנה קודם. בספריה זו נמצא שבט שכולל בתוכו אזור שמעבר לחלק המקודד של הגן באורך של למעלה מאלפיים ומאתיים בסיסים. אזור זה המתאים להיות הפרומוטור ייבדק עתה לפעילותו. כמו כן נמצא אזור תחילת השיעתוק של הגן בשימוש בטכניקת ה - RACE.
3. המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו.
ניתן כבר עתה להסיק מהמיפוי שביצענו שישנם גנים אחדים לקריופרין בעגבניה ולכן ייתכן (כפי שהנחנו בהצעת המחקר המקורית) שיש אפיניות שונה לחלבוני וירוס צהבון האמיר אל הרצפטורים המסיסים האלה. לימוד בקרת התבטאותם של גנים אלו והקשר בין רמת התבטאותם בעת חדירת הוירוס לגרעין התא תאפשר לנו למנוע באופן ספציפי את חדירת הוירוס לגרעין התא המאכסן ובכך תמנע התרבותו.
4. הבעיות שנותרו לפתרון.
בשלב הבא למחקר נבדוד את יחידות הכקרה של הקריופרנים השונים על מנת שנכיר את דרך הבקרה על פעולתם. בכוונתנו ליצור בסופו של דבר צמחים טרנסגניים שימנעו חדירה לגרעין של הוירוס וזאת תהווה שיטה חדשה לחלוטין וגנרית (כי היא איננה תלויה בוירוס ותעבוד כנגד כל וירוס הצורך את הגרעין לריבוי) לבלימת התרבותם וחקם של וירוסים.
5. האם הוחל בהפצת הידע.

- התוצאות של קביעת הרצף לגן לקריופרין אלפא מעגבניה, הוכנסו ל GenBank תחת המספר הסידורי AF017252.
- איפיון הגן פורסם:

Kunik, T., Mizrachi, 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..
Journal of Experimental Botany 50: 731-732.

- מאמר על סיגנל הוצאה של חלבון המעטפת מן הגרעין נשלח לפרסום (ראה נספח 1):

Rhee, Y., Gurel, F., Gafni, Y., Dingwall C. and Citovsky, V. (2000).
A Genetic System for Detection of Protein Nuclear Import and Export.
Nature Biotechnology

- מאמר על התבטאותו של הפרומוטור LM1 נמצא בכתיבה.

A Genetic System for Detection of Protein Nuclear Import and Export

Yoon Rhee, Filiz Gurel, Yedidya Gafni*, Colin Dingwall†‡, and Vitaly Citovsky§

Department of Biochemistry and Cell Biology, Institute for Cell and Developmental Biology

State University of New York, Stony Brook, NY 11794-5215, (*) Department of Genetics, Agricultural Research Organization, P.O. Box 6, Bet Dagan 50250, Israel, and (†) Department of Pharmacology, State University of New York, Stony Brook, NY 11794-8651

§ - Corresponding Author: Vitaly Citovsky, tel.: 516-632-9534; fax: 516-632-8575; e-mail: vitaly.citovsky@sunysb.edu

‡ - Present Address: Neurosciences Research Department, SmithKline-Beecham Pharmaceuticals, Harlow, Essex, UK

Manuscript Information: total 20 pages of text and 4 figures

Word and character count: words in abstract – 235; characters in paper – 33,080

Abbreviations: PCR, polymerase chain reaction; mLexA, modified LexA; NIA, nuclear import assay; NEA, nuclear export assay; Gal4AD, Gal4 activation domain; HIV, human immunodeficiency virus; NLS, nuclear localization signal; NES, nuclear export signal; ORF, open reading frame; TYLCV, tomato yellow leaf curl virus; 3AT, 3-amino-1,2,4-triazole.