

**משרד החקלאות - דו"ח לתוכניות מחקר  
לקרן המדען הראשי**

<b>קוד זיהוי</b>	<b>א. נושא המחקר (בעברית)</b>
837 – 0140-15	קומפלקסים המתווכים את פעילות מעכב התגובה לאוקסין ENTIRE בעגבנייה

<b>ג. כללי</b>			
<b>מוסד מחקר של החוקר הראשי</b>			
האוניברסיטה העברית			
<b>סוג הדו"ח</b>		<b>תאריכים</b>	
מסכם מתוקן	תקופת המחקר עבודה מוגש הדו"ח	תאריך משלוח הדו"ח למקורות	
		המימון	
		סיום	התחלה
		שנה חודש	שנה חודש
		2/2017	02/2016
		03/2013	

<b>ב. צוות החוקרים</b>		
חוקר ראשי	שם משפחה	שם פרטי
	אורי	נעמי
<b>חוקרים משניים</b>		
1	אשל טפר-במנולקר	דני פאולה
2		
3		
4		
5		
6		
7		

ד. מקורות מימון עבורם מיועד הדו"ח		
שם מקור המימון	קוד מקור מימון	סכום שאושר למחקר בשנת תיקצוב הדו"ח
		בשקלים
משרד החקלאות –קרן המדען הראשי, ביוטכנולוגיה	02-3782	170,000

<b>ה. תקציר</b> שים לב - על התקציר להיכתב בעברית לפי סעיף ה' שבהנחיות לכתיבת דיווחים
<p>החלבון ENTIRE (E) מעגבנייה הוא מעכב תגובה לאוקסין המעורב בבקרת התפתחות העלה ותזמון חנטת הפרי, אך לא ידוע מי החלבונים שאתם הוא עובר אינטראקציה לצורך בקרה זו. מטרת המחקר הייתה לבודד קומפלקסים המכילים את החלבון E, לזהות את החלבונים המרכיבים את הקומפלקס, ולהשוות בין הקומפלקסים בעלה ובפרי. בשנת המחקר הראשונה יצרנו צמחים טרנסגנים המבטאים את החלבון מאוחה לתג GS בעלה, אך ראינו כי כמות החלבון שניתן להפיק מעלים של צמחים אלה אינה מספיקה לצורך זיהוי החלבון והקומפלקס ולכן בשנה השנייה פנינו לגישה חליפית לביטוי חולף של החלבון בצמחי טבק או ביטוי שלו בתרביות תאי טבק. בגישה זו אכן הצלחנו לקבל כמויות גבוהות של חלבון ולזהות את החלבון באנליזת Western blot. האפשרות למצות כמות גבוהה של חלבון יחד עם כיוול תנאי ההפקה אפשרו במהלך השנה השלישית לזהות את החלבון יחד עם חלבונים נוספים שיתכן ויוצרים קומפלקס עם E באנליזת LC-MS/MS. בנוסף, לאחר סיום המחקר, בצענו מספר נסיונות לבטא כמויות מספיקות של חלבון על ידי ביטוי חולף בעלים ופירות של עגבנייה. עד כה, מספר פרוטוקולים שניסינו טרם הובילו לזיהוי של ביטוי מספק בעלים ופירות צעירים בעגבנייה.</p>

**ו. אישורים**  
הנני מאשר שקראתי את ההנחיות להגשת דיווחים לקרן המדען הראשי והדו"ח המצ"ב מוגש לפיהן

חוקר ראשי	מנהל המחלקה	מנהל המכון (פקולטה)	אמרכלות (רשות המחקר)	רשות המחקר	תאריך (שנה) (חודש) (יום)
-----------	-------------	---------------------	----------------------	------------	--------------------------

דו"ח שנתי לתוכנית מחקר מספר 837-0140-14

תקציב מספר 0390046

שנת מחקר 3 מתוך 3 שנים

קומפלקסים המתווכים את פעילות מעכב התגובה לאוקסין ENTIRE בעגבנייה.

**Protein complexes that mediate the activity of the auxin response inhibitor ENTIRE in tomato.**

מוגש לקרן מדען הראשי של משרד החקלאות

ע"י:

נעמי אורי, המכון למדעי הצמח וגנטיקה בחקלאות, הפקולטה לחקלאות ע"ש רוברט סמית, האוניברסיטה העברית, דני אשל ופאולה טפר - במנולקר, המחלקה לחקר תוצרת חקלאית לאחר קטיף, מנהל המחקר החקלאי מרכז וולקני.

Naomi Ori, the Robert H. Smith institute of Plant Sciences and Genetics in Agriculture, the Faculty of Agriculture, Rehovot, the Hebrew University of Jerusalem [ori@agri.huji.ac.il](mailto:ori@agri.huji.ac.il), Dani Eshel, Agricultural Research Organization - the Volcani Center [dani@agri.gov.il](mailto:dani@agri.gov.il) and Paula Teper Bamnolker, Agricultural Research Organization - the Volcani Center [paula@agri.gov.il](mailto:paula@agri.gov.il).

#### תקציר

החלבון ENTIRE (E) מעגבנייה הוא מעכב תגובה לאוקסין המעורב בבקרת התפתחות העלה ותזמון חנטת הפרי, אך לא ידוע מי החלבונים שאתם הוא עובר אינטראקציה לצורך בקרה זו. מטרת המחקר הייתה לבודד קומפלקסים המכילים את החלבון E, לזהות את החלבונים המרכיבים את הקומפלקס, ולהשוות בין הקומפלקסים בעלה ובפרי. בשנת המחקר הראשונה יצרנו צמחים טרנסגנים המבטאים את החלבון מאוחה לתג GS בעלה, אך ראינו כי כמות החלבון שניתן להפיק מעלים של צמחים אלה אינה מספיקה לצורך זיהוי החלבון והקומפלקס ולכן בשנה השנייה פנינו לגישה חליפית לביטוי חולף של החלבון בצמחי טבק או ביטוי שלו בתרביות תאי טבק. בגישה זו אכן הצלחנו לקבל כמויות גבוהות של חלבון ולזהות את החלבון באנליזת Western blot. האפשרות למצות כמות גבוהה של חלבון יחד עם כיוול תנאי ההפקה אפשרו במהלך השנה השלישית לזהות את החלבון יחד עם חלבונים נוספים שיתכן ויוצרים קומפלקס עם E באנליזת LC-MS/MS. בנוסף, לאחר סיום המחקר, בצענו מספר ניסיונות לבטא כמויות מספיקות של חלבון על ידי ביטוי חולף בעלים ופירות של עגבנייה. עד כה, מספר פרוטוקולים שניסונו טרם הובילו לזיהוי של ביטוי מספק בעלים ופירות צעירים בעגבנייה.

הצהרת החוקר הראשי: הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים. הניסויים אינם מהווים המלצות לחקלאים.

נאמי אורי

## תוכן עניינים:

3.....	תוכן עניינים
4 .....	מבוא ומטרות
5-10.....	פירוט הניסויים שבוצעו והתוצאות שהתקבלו
5.....	- יצירת צמחים טרנסגניים המבטאים את E, מאוחה לתג המאפשר בידוד בשיטת TAP
5 .....	- בידוד והשוואת קומפלקסים המכילים את E מעלים ומשחלות בוגרות
	- ביטוי חולף של E מאוחה לתג GS או GFP, בצמחי טבק ( <i>Nicotiana benthamiana</i> )
6.....	או במערכת תאי טבק BY2
	- ביצוע טרנספורמציה וביסוס קו תאי BY2 המבטא $35S::E^{dII}-GS$ וקו תאים נוסף המבטא $35S::E^{dII}-GFP$
8.....	- בידוד וזיהוי חלבונים היוצרים קומפלקס עם E ב-FPLC בשיטת TAP, ממיצוי חלבונים מעלי טבק או מתאי טבק (BY2), המבטאים את $35S::E^{dII}-GS$ באופן קבוע או בביטוי חולף
9.....	- הפקת חלבון משלב התפתחותי מוקדם של העלה של צמחי $BLS:E^{dII}-TAP$ וביטוי של החלבון באמצעות פרומוטרים חליפיים בפרי
11-15.....	איורים
15-17.....	סיכום ודיון
18.....	רשימת ספרות
19.....	סיכום עם שאלות מנחות

## **מבוא**

צורת העלה, חנטת הפרי ורגישות החנטה לטמפרטורות קיצון הן תכונות חקלאיות חשובות המשפיעות על מידת ההסתגלות של גידול העגבנייה לתנאי סביבה משתנים. החלבון ENTIRE (E) מעגבנייה הוא מעכב של התגובה לאוקסין מקבוצת ה Aux/IAA, המשפיע ספציפית על צורת העלה ועל התלות של חנטת הפרי בהפריה. במוטנט *entire (e)* העלים פשוטים לעומת העלים המורכבים של טיפוס הבר, והפירות פרתנוקרפים בשל אבדן התלות של החנטה בהפריה. כדי להבין כיצד E משפיע ספציפית על תהליכים אלה, ולזהות גורמים נוספים המעורבים בבקרה על צורת העלה ועל חנטת הפרי, יש לזהות את החלבונים הנקשרים ל E ומאפשרים את פעולתו, או מבוקרים על ידו. מטרת המחקר הייתה לבודד קומפלקסים המכילים את E כדי לזהות חלבונים נוספים המתווכים את פעילותו ומעורבים בבקרת התפתחות העלה וחנטת הפרי. במחקר זה השתמשנו בשיטת tandem affinity purification (TAP), המבוססת על תהליך מיפוי אינטראקציות חלבוניות בשני שלבים ע"י שימוש בקולונות זיקה, תוך שימוש בתנאים עדינים, קרובים עד כמה שניתן לתנאים הפיסיולוגיים השוררים בתא, על מנת לשמור על שלמותם של הקומפלקסים. במהלך השנה הראשונה נתקלנו בקושי לבודד כמות מספיקה של חלבון מהצמחים הטרינסגניים ולכן במהלך השנה השנייה בחנו גישות חליפיות לבידוד הקומפלקסים והתחלנו לייצר כלים על מנת לבחון שלוש גישות: א. ביטוי חולף של חלבון מאוחה לתג תחת בקרת פרומוטר חזק וקונסטיטוטיבי בעלי טבק. ב. ביטוי בתרביות תאי טבק BY2. ג. הפקת חלבון מאוחה לתג תחת הטרינסגניים מרקמות שונות מאלה שנוסו בעבר. בשנה השלישית בודדנו את החלבון E וחלבונים נוספים בעלי פוטנציאל ליצור אתו קומפלקס, מעלי טבק שביטאו באופן חולף את החלבון ומתרבית תאי טבק. בנוסף, עשינו מספר ניסיונות לבטא כמות מספיקה של חלבון בעלים צעירים ופירות של עגבנייה, אך עד כה ללא הצלחה.

## **מטרות המחקר המקוריות:**

מטרת המחקר היא לבודד, לאפיין ולהשוות קומפלקסים חלבוניים המכילים את E מהעלה ומהפרי.  
מטרות ספציפיות:

1. יצירת צמחים טרינסגניים המבטאים את E מאוחה לתג המאפשר בידוד בשיטת ה TAP.
2. בידוד והשוואת קומפלקסים המכילים את E מעלים ומשחלות בוגרות.
3. בחינת השפעת חלבונים העוברים אינטראקציה עם E על התפתחות העלה ועל חנטת הפרי.

**1. יצירת צמחים טרנסגניים המבטאים את E, מאוחה לתג המאפשר בידוד בשיטת ה TAP.**

בשנה הראשונה יצרנו צמחים טרנסגניים המבטאים את החלבון E בצורתו העמידה לפירוק במסלול הפרוטאזום בנוכחות אוקסין ( $E^{dIII}$ ), מאוחה לתג GS המאפשר בידוד קומפלקסים בשיטת TAP. תג GS מורכב משני אתרים: protein-G (ProtG) ו-streptavidin-binding peptide (SBP), המופרדים ע"י אתר החיתוך של הפרוטאז TEV. הצמחים הטרנסגניים יוצרו בשיטת הטרנס-אקטיבציה, בה מיוצרים קווי תגובה המבטאים את גן המטרה תחת בקרת רצף ה *OPERATOR (OP)* החיידקי, אשר אין בצמחים פקטורי שעתוק הנקשרים אליו. קווים מפעילים מבטאים את פקטור השעתוק הסינטי LhG4 תחת בקרת פרומוטרים שונים המבטאים באזורים שונים בצמח. הכלאה של קו התגובה לקו מפעיל גורמת לביטוי גן המטרה באזור הביטוי המוכתב על ידי הפרומוטר שבקו המפעיל בצמחי F1. כדי להבטיח פעילות תקינה של החלבון, התג אוהה בקונסטרקטים שונים לקצה הקרבוקסילי ולקצה האמיני של החלבון  $E^{dIII}$ . יוצרו קווי תגובה טרנסגניים עבור כל אחת מצורות האחי, ומספר קווים בלתי תלויים עבור כל טרנסגן הכולאו למספר קווים מפעילים. לצורך ביטוי בעלה קווי התגובה הכולאו לשלושה קווים מפעילים: (1) הפעלה על ידי הפרומוטר *FIL*, הגורם לביטוי חזק יחסית בכל העלה והחל משלבים מוקדמים של התפתחות העלה. צמחים שביטאו את החלבון  $E^{dIII}$  המאוחה לתג בקצה הקרבוקסילי או האמיני ע"י פרומטר *FIL* היו בעלי פנוטיפ חזק מאוד ולא ניתן היה להשתמש בהם לצורך בידוד קומפלקסים. (2) הפעלה על ידי הפרומוטר *BLS*, המתבטא בשלבים מאוחרים יותר של התפתחות העלה. צמחי  $E^{dIII}$ -GS ו-  $BLS$  >>  $GS-E^{dIII}$  היו בעלי פנוטיפ עלה ברור אך ייצור העלים לא נפגע, כך שניתן היה להשתמש בהם לבידוד קומפלקסים. הפנוטיפ שהתקבל היה דומה לזה שהתקבל מביטוי של הצורה הלא מאוחה לתג של  $E^{dIII}$ , מה שמצביע על חלבון פעיל למרות נוכחות תג חלבוני גדול יחסית (איור 1). (3) פרומוטר E, שהוא הפרומוטר האנדוגני של E, והביטוי בעזרתו עשוי להיות אינפורמטיבי יותר. קווי התגובה עם פרומוטר E יוצרו רק במהלך השנה השלישית למחקר, ולכן רק עתה מתבצעות ההכלאות לפרומוטר זה. לצורך ביטוי בפרי קווי התגובה הכולאו לשני קווים מפעילים: (1) פרומוטר *CRC* המתבטא בשלבים המוקדמים של התפתחות הפרי. (2) פרומוטר *TPRP* שהוכן במעבדתו של דר' צחי ארזי במכון וולקני ואופיין כבעל ביטוי חזק בהשוואה לפרומוטרים לפרי הקיימים בעגבניה.

**2. בידוד והשוואת קומפלקסים המכילים את E מעלים ומשחלות בוגרות של צמחי עגבניה**

**טרנסגניים.**

בשנה הראשונה הפקנו חלבון מעלים של צמחי  $BLS$  >>  $GS-E^{dIII}$  בני חודש. תהליך המיצוי והבידוד בקצרה:  
18 גרם רקמה שהוקפאה בחנקן נוזלי נכתשה והחלבונים הופקו בכופר אשר מדמה תנאים פיסולוגיים ומכיל מעכבי פרוטאזות ( 25mM Tris-HCl pH 7.6, 15 mM  $MgCl_2$ , 5mM-EGTA, 150mM NaCl, 0.1% (v/v) Nonidet P-40, 1mM DTT, 1 mM PMSF, 1 $\mu$ M E64, 5% (v/v) ethylene glycol, 25, 10.000 rpm) complete EDTA-free protease inhibitor, 0.5gr PVPP). אחרי ביצוע צנטריפוגה

דקות,  $4^{\circ}\text{C}$ ) וסינון הדוגמא בפילטר  $0.45\mu\text{m}$ , החלבונים המסיסים הוטענו על גבי קולונת IgG (1 מ"ל). בתום ההטענה הקולונה נשטפה בבופר (25 mM Tris-HCl, pH 7.6, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM EGTA, ) (150 mM NaCl, 0.1% (v/v) Nonidet P-40, 5% (v/v) ethylene glycol) להרחקת כלל החלבונים הלא קשורים. האילוציה בוצעה ע"י שימוש ב-1M Citric Acid pH-3.84, ותוצרי האילוציה נאספו בבאריות המכילות 1M Tris pH-11 250 $\mu\text{l}$  על מנת שה-pH הסופי בפרקציה יהיה ניטרלי. במהלך האילוציה התקבל פיק יחיד המעיד על שחרור החלבונים שנקשרו לקולונה (איור 2A) ולאחר השקעה אצטונית נעשתה אנליזת Western blot עם נוגדני IgG לדוגמא שנלקחה מהמיצוי לפני ההטענה (Load), לחלבונים שלא נקשרו לקולונה (U.B.) ולפרקציות שנאספו לאחר האילוציה. באנליזת Western blot זוהה בנד בגודל של כ-57kD, שהוא הגודל הצפוי עבור החלבון המאוחד, בפרקציות שנאספו מהאילוציה בלבד (איור 2B). למרות זאת, החלבון לא זוהה באנליזת LC-MS/MS. בנוסף, בודדנו את החלבון בשני שלבים תוך שימוש בשני מרכיבי התג. המיצוי בוצע מ-36 גרם רקמה באופן זהה למתואר לעיל. במקרה זה, בתום תהליך ההטענה ושטיפת קולונת IgG החלבון שוחרר עם AcTEV protease 300U במשך שעה ב- $16^{\circ}\text{C}$ . תוצרי האילוציה טולטלו עם כדוריות-זיקה של Streptavidin במשך שעה ב- $4^{\circ}\text{C}$  והאילוציה בוצעה בעזרת 20mM Desthiobiotin. במהלך האילוציה התקבל פיק חלבוני (תמונה 2C,D) אשר אוחד והושקע עם 25%TCA. לאחר ביצוע שטיפה עם אצטון והרצה בג'ל החלבונים נשלחו הדוגמאות לאנליזת LC-MS/MS בטכניון, אולם החלבון E לא זוהה. תוצאות אלה העידו על כך שהחלבון הרצוי נקשר לקולונה, אולם ריכוז החלבון היה נמוך יחסית למרות המוטציה המייצבת.

בשנה השנייה בוצעו ניסויים רבים, שמטרתם היתה לאתר דרך לשיפור ניקוי החלבון והעלאת ריכוזו, תוך שימוש בצמחים המבטאים את התג מאוחד ל- $E^{dII}$  בקצה הקרבוקסילי או בקצה האמיני. למרות פעילות נמרצת בנושא, לא עלה בידינו להפיק ריכוז חלבון גבוה מספיק לצורך זיהוי באנליזת LC-MS/MS. כל זאת למרות שביטאנו את הצורה העמידה לאוקסין המכילה מוטציה המקנה עמידות לפירוק במערכת הפרוטאזומים, ולמרות שהשתמשנו בכמות רקמה גדולה יחסית (מעל 18 גרם).

לכן, כדי להתגבר על הקושי בביטוי כמות מספיקה של חלבון בצמח, בחנו מערכות חלופיות שיאפשרו ביטוי גבוה של חלבון. לצורך כך הגדרנו מספר מטרות נוספות:

4. ביטוי חולף של  $E^{dII}$  מאוחד לאחד משני התגים: GS או GFP:

א. בעלים של צמחי טבק (*Nicotiana benthamiana*).

ב. במערכת תאי טבק BY2.

ג. בעלי עגבנייה צעירים.

ד. בפירות עגבנייה צעירים.

#### 4. ביטוי חולף של $E^{dII}$ מאוחה לתג GS או GFP, בצמחי טבק (*Nicotiana benthamiana*) ועגבנייה

##### *(Solanum lycopersicum)* או במערכת תאי טבק BY2:

בחרנו להשתמש במערכת ביטוי חולף בטבק (*Nicotiana benthamiana*) כיוון שמערכת זו מאפשרת ביטוי גבוה של חלבון ושימוש בפרומוטר החזק והקונסטיטוטיבי 35S, שבו לא יכולנו להשתמש בביטוי קבוע בעגבנייה משום שהיה גורם לפנוטיפ חזק מדי שלא יאפשר את התפתחות הצמח. בנוסף, הטבק משתייך למשפחת הסולניים (Solanaceae), כמו העגבניה (*Solanum lycopersicum*), ועל כן יש סבירות גבוהה ש-E עובר אינטראקציות עם חלבונים דומים בשני המינים. כמו כן, אחוזי הזהות (identity) של החלבון E מעגבנייה (*Solanum lycopersicum*) בהשוואה לטבק (*Nicotiana benthamiana*) הם 87.78%.

הפלסמידים שנבחרו לייצור הקונסטרוקטים מאפשרים ביטוי גם בתרבית תאי טבק וגם ביטוי חולף בעלי טבק תחת הפרומוטר הוירלי הקונסטיטוטיבי 35S. יצרנו קונסטרוקט של  $E^{dIII}$  (בעל המוטציה המייצבת) מאוחה בקצה הקרבוקסילי שלו לתג GS, אשר כפי שתואר בהצעת המחקר מאפשר בידוד קומפלקסים בשני שלבים תוך שימור שלמות הקומפלקסים. בנוסף, יצרנו קונסטרוקט של  $E^{dIII}$  מאוחה בקצה הקרבוקסילי שלו לתג GFP שגם עבורו דווח בספרות המחקרית שימוש לצורך בידוד קומפלקסים והוא מאפשר גם מעקב אחרי הביטוי בעזרת מיקרוסקופ פלואורסנטי (Gadeyne et al., 2014; Pauwels et al., 2010; Dedecker et al., 2015; Smaczniak et al., 2012). השיבוטים נעשו במערכת Gateway, עבור התג GFP השתמשנו בפלסמיד pGWB5 (Nakagawa et al., 2007) והשיבוט של התג GS נעשה לפלסמיד pK7WG2D (Karimi et al., 2002).

בשלב הראשון, בחנו האם מערכת הביטוי החולף בעלי טבק אכן מאפשרת ביטוי חלבון גבוה יותר מזה שהתקבל בעלי עגבנייה טרנסגניים. התחלנו בבחינת הביטוי של  $35S::E^{dIII}-GFP$ . חיידקי אגרובקטריום המבטאים  $35S::E^{dIII}-GFP$  גודלו למשך הלילה ולמחרת הורחפו בבופר (10mM MgSO<sub>4</sub>, 10mM MES, 150μM Acetosyringon) והוזרקו לעלי טבק ( $OD_{600}=1$ ). יומיים לאחר ההדבקה נבחנו העלים במיקרוסקופ קונפוקלי. סיגנל GFP נראה חזק וממוקד לגרעין התא באופן המתאים למיקום הביטוי הצפוי של E (איור 3A-C). לצורך הפקת חלבון נאספו שתי דיסקיות עלים בקוטר של כ-0.7 ס"מ והוקפאו בחנקן נוזלי. הרקמה נכתשה והוספה לבופר (0.5% NP-40, 10% glycerol, 150mM NaCl, 50mM Tris pH 7.5). לאחר צנטריפוגה הנוזל הועבר לתוך 20% sample buffer (0.25M Tris pH6.8, 15% SDS, 50% glycerol, 25% β-mercaptoethanol). באנליזת Western blot זוהתה כמות גדולה של חלבון באמצעות נוגדנים ל-GFP (איור 3D). על-פי עוצמת הסיגנל נראה כי הצלחנו לקבל ריכוז גבוה מאוד של החלבון בשיטה זו: בעוד שמעלי עגבנייה טרנסגניים נדרש ריכוז חלבון גבוה מ-18 גרם של עלים כדי לזהות את החלבון ב-Western blot, בשיטה זו החלבון זוהה בקלות מכמות רקמה קטנה לאין שיעור, וללא ריכוז ובידוד. עשינו ביטוי חולף בעלי טבק באופן דומה גם עבור  $35S::E^{dIII}-GS$ . הפלסמיד המבטא את הקונסטרוקט (pK7WG2D) מבטא גם GFP שאינו מאוחה ל-E, דבר המאפשר מעקב אחרי יעילות הביטוי. ואכן, נצפה ביטוי בולט של GFP לאחר ההדבקה (איור 4A,B). באנליזת Western blot זיהינו את החלבון המאוחה באמצעות נוגדן IgG (איור 4C) ובאמצעות Streptavidin (איור 4D), ושוב נראה, על-פי עוצמת הבנד, שהתקבלה כמות גדולה של חלבון.

במקביל החלטנו לבטא את הקונסטרוקטים גם בתרבית תאי טבק BY2 כיוון ששימוש בתרבית תאים דווחה בספרות כבעלת יתרון לעומת שימוש ברקמה צמחית, בבידוד קומפלקסים בשיטת TAP, בעיקר בשל הכמות הזמינה של הרקמה והביטוי הגבוה של חלבון המטרה (Van Leene *et al.*, 2015; Van Leene *et al.*, 2007). מערכת לטרנספורמציה ועבודה עם תאים אלה כוילה בשנת המחקר השנייה במעבדתו של דר' דני אשל.

בשנה השלישית התמקדנו במשימות הבאות:

- 4.1. ביצוע טרנספורמציה וביסוס קו תאי BY2 המבטא  $35S::E^{dIII}-GS$  וקו תאים נוסף המבטא  $35S::E^{dIII}-GFP$ .
- 4.2. בידוד וזיהוי חלבונים היוצרים קומפלקס עם E ב-FPLC בשיטת TAP, ממיצוי חלבונים מתאי טבק (BY2) ומעלי טבק, לאחר ביטוי חולף של  $35S::E^{dIII}-GS$  או  $35S::E^{dIII}-GFP$ .
- 4.3. כיוול מערכת לביטוי חולף של  $35S::E^{dIII}-GS$  בעלים צעירים ו/או בפירות עגבנייה.

#### 4.1. ביצוע טרנספורמציה וביסוס קו תאי BY2 המבטא $35S::E^{dIII}-GS$ וקו תאים נוסף המבטא $35S::E^{dIII}-GFP$

ביצענו טרנספורמציה של הקונסטרוקט  $35S::E^{dIII}-GS$  והצלחנו לייצב קו תאים המבטא קונסטרוקט זה (איור 5A,B). במקביל עשינו גם טרנספורמציה של הקונסטרוקט  $35S::E^{dIII}-GFP$  (איור 5E). תאים אלה ביטאו את E בגרעין התא, כמצופה, אולם קו תאים זה לא היה יציב מספיק, כנראה בשל זן חיידק האגרובקטריום בו השתמשנו, ולכן בחרנו לא להמשיך עם הקו.

תהליך הטרנספורמציה וייצוב הקו  $35S::E^{dIII}-GS$  בקצרה: תרבית תאי BY2 גודלה בטלטול של 130rpm ב-26°C ותוחזקה ע"י מיהול שבועי (400µl תרבית תאים ב-20ml מדיום) במצע Linsmaier and Skoog (LS), שעבר התאמה על פי התנאים המתוארים ב-(Nagata *et al.*, 1992). טרנספורמציה לתאי BY2 בוצע ע"פ תאור קודם (Shaul *et al.*, 1996). תיאור התהליך בקצרה: 4ml מ"ל תאי BY2 בני 6 ימים גדלים בשלב האקספוננציאלי הורחפו ב-250 מ"ל ועברו אינקובציה במשך 30 דקות בטמפרטורת החדר עם 40 מ"ל תרחיף חיידקי *Agrobacterium tumefaciens* EHA105, אשר גודלו במשך הלילה, ומכילים את הפלסמיד הבינארי יחד עם 500µM acetosyringone ו-10mM MgSO<sub>4</sub>. לאחר יומיים של קו-קולטיבציה, התאים נשטפו במדיום גידול אשר מכיל 250µg/ml claforan ו-50µg/ml kanamycin. לאחר שבועיים, תרחיפי התאים הטרנסגניים גודלו במדיום אשר מכיל 50µg/ml kanamycin. במקביל קווי התאים הטרנסגניים נשמרו בצלחות (LS מדיום עם 2.5% phytagel) אשר חודשו אחת לחודש.

הפלסמיד המבטא את הקונסטרוקט (pK7WG2D) מבטא גם GFP שאינו מאוחה ל-E, דבר המאפשר מעקב אחרי יעילות הביטוי. ואכן, נצפה ביטוי בולט של GFP בתאי BY2 טרנסגניים (איור 5A,B). נתקבלו 3 קווים בלתי תלויים עמידים לאנטיביוטיקה בהם נצפה החלבון הפלואורסנטי GFP ולאחר ביצוע אנליזות Western blot הוחלט להמשיך את תהליך הבידוד עם הקו המבטא את החלבון הרקומביננטי  $E^{dIII}-GS$  ברמות



הגבוהות ביותר לעומת תאי WT, כפי שזוהה באמצעות נוגדן IgG ובאמצעות Streptavidin בתאים בני 7 ימים (איור 5C,D). החלבון הופק בבופר הפקה המתאים לבידוד קומפלקסים חלבוניים המתואר מעלה (סעיף מס' 2), מכ-100 מ"ג רקמת תאים, אשר יובשה מהמדיום, עברה לאופיליזציה, נשמרה ב-80 מעלות ונכתשה בחנקן נוזלי. נראה, על-פי עוצמת הבנד, שהתקבלה כמות חלבון מתאימה לבידוד, וזאת מכמות רקמה קטנה מאוד בהשוואה לכמות החלבון שנתקבלה מהפקה שבוצעה מ 18 גרם עלי עגבנייה טרנסגניים, ללא ריכוז או בידוד (איור 5C,D).

#### **4.2. בידוד וזיהוי חלבונים היוצרים קומפלקס עם E ב-FPLC בשיטת TAP, ממיצוי חלבונים מעלי טבק או מתאי טבק (BY2), המבטאים את GS::E<sup>dIII</sup> 35S באופן קבוע או בביטוי חולף.**

בשלב ראשון הופק חלבון מכ-12 גרם עלי טבק שביטאו באופן חולף את GS-<sup>dIII</sup> לאחר שהודבקו ב-GS::E<sup>dIII</sup> 35S (באופן המתואר למעלה) והוקפאו בחנקן נוזלי. בשלב שני, לאחר ייצוב קו תאי טבק המבטאים באופן קבוע את GS-<sup>dIII</sup>, הופק חלבון מ-40 גרם רקמה אשר יובשה והוקפאה בחנקן נוזלי, מתאים בני 7 ימים. בשני המקרים הרקמה נכתשה ומיצוי החלבונים (הפקת חלבונים נעשתה באופן המתואר מעלה) הורץ ב-FPLC עם קולונה אחת המכילה נוגדני IgG.

בשני תהליכי הבידוד הנפרדים, בתום הטענת הקולונות עם הדוגמאות, הקולונות נשטפו בשלב ראשון בבופר (25mM Tris-HCl, pH 7.6, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM EGTA, 150mM NaCl, 0.1% (v/v) Nonidet P-40 (NP-40), 5% (v/v) ethylene glycol) להרחקת כלל החלבונים הלא קשורים, בדומה למתואר מעלה. בשלב שני, על מנת לשפר את תהליך הריכוז וזיהוי החלבונים הקולונה נשטפה עם 25mM Tris pH 7.6 ללא או עם 150mM NaCl, בתהליך הבידוד מעלי טבק או מתאי טבק, בהתאמה. לאחר קשירה לקולונות IgG ואילוציה בחומצה נתקבל בשני המקרים פיק יחיד (איור 6). פראקציות הפיק שנתקבלו מעלי טבק C9-C12 (איור 6B) ומתאי טבק E8-F10 (איור 6D) נאספו ונשלחו לאנאליזת LC-MS/MS במכון וויצמן. בעלי טבק ובתאי טבק החלבון GS-<sup>dIII</sup> זוהה, ואיתו זוהו בהתאמה 712 או 256 חלבונים נוספים בעלי פוטנציאל ליצירת קומפלקס עם E. באנאליזה ביואינפורמטית נעשתה השוואה בין רשימות החלבונים שהתקבלו בשני הניסויים למציאת חלבונים חופפים. נמצאו כ-47 חלבונים חופפים בין שני הניסויים (טבלה 1).

בהמשך (לאחר סיום המחקר), ערכנו ניסוי נוסף של ביטוי חולף בעלי טבק, כאשר בניסוי זה בודדנו את החלבון בשני שלבים תוך שימוש בשני מרכיבי התג, כמתואר לעיל בסעיף 2. גם בניסוי זה זוהה החלבון GS-<sup>dIII</sup> באנליזת LC-MS/MS וחלבונים נוספים בעלי פוטנציאל ליצירת קומפלקס אתו. חלבונים שזוהו בכל שלושת הניסויים מוצגים בטבלה 2.

### 4.3. ניסיון לכיול מערכת ביטוי חולף של חלבון בעלים צעירים ופירות עגבנייה

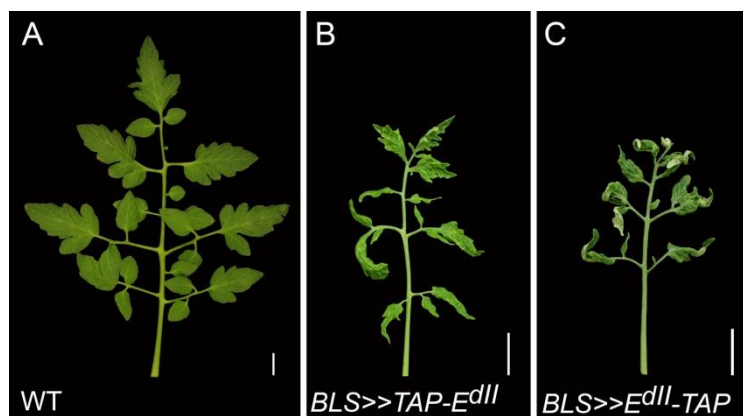
כיוון שלאחר שביצענו את הניסוי כפי שהוצע בעגבנייה התברר שכמות החלבון אינה מספיקה לבידוד קומפלקסים, פנינו לטבק כמערכת חלופית שמהווה את הפתרון הטוב ביותר האפשרי כרגע כדי להתקדם במחקר. אנו סבורים שיש סבירות גבוהה שהקומפלקסים שזוהו בטבק יוכחו כרלוונטיים לעגבנייה, בשל הדמיון הרב בגנום ובסינתיות בין שני המינים, ואנו מקווים למצוא מקורות מימון על מנת להמשיך לבחון זאת. כיוון שצפוי שגם בגידולים אחרים וגם עם חלבונים אחרים לעתים תהיה בעיה דומה, אנחנו סבורים שההצלחה שלנו להתגבר על הקשיים ולבטא חלבון מעגבנייה בטבק בכמויות גדולות ולהפיק קומפלקסים מהווה תשתית חשובה למחקר החקלאי בישראל, כיוון שהיא עשויה להוות פתרון במקרים דומים בעתיד.

עם זאת, ולמרות שהמימון למחקר הסתיים לפני יותר משנה, עשינו מספר ניסיונות לכייל מערכת לביטוי חולף של חלבון בעלים צעירים ובפירות עגבנייה. בניסוי הראשון נעשה ביטוי חולף בעלים צעירים ופירות, ובניסוי השני בעלים. ניסוי נוסף נערך עם קונסטרקט ביקורת על מנת להשוות בין היעילות של ביטוי חולף בטבק ובעגבנייה.

בניסויים אלה, השתמשנו בפרומוטר החזק והקונסטיטוטיבי 35S שבו לא יכולנו להשתמש בביטוי היציב בעגבנייה משום שהיה גורם לפנוטיפ חזק מדי שלא יאפשר את התפתחות הצמח. תרבית חיידקי אגרובקטריום המבטאים  $35S::E^{dII}-GFP$  או  $35S::ARF10-GFP$  גודלה למשך הלילה.

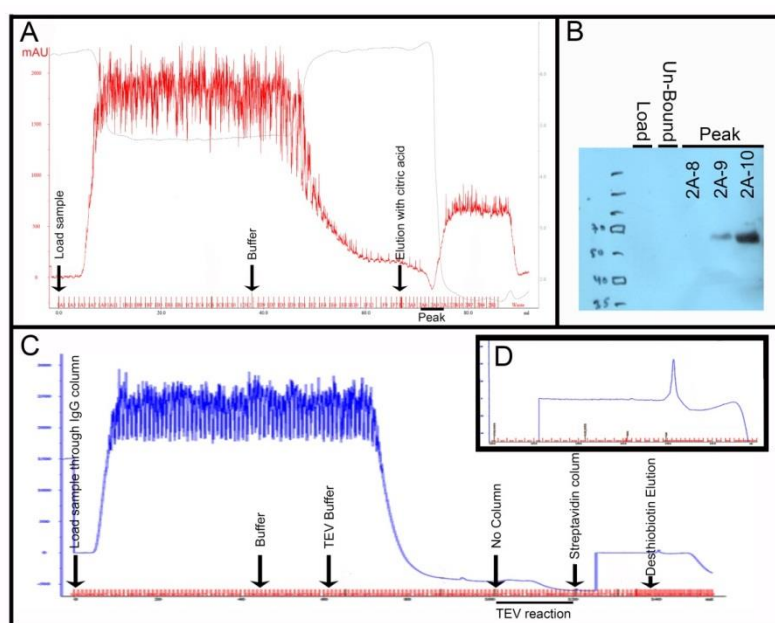
ניסוי ראשון (פרוטוקול הזרקה לפירות אותו ניסינו גם על עלים): 5 מ"ל מהתרבית הועברה לתמיסת MES+LB (pH=5.6 בתוספת של MES 0.01M) וגודלה לילה נוסף. התרבית סורכזה והפלט הורחף בבופר הזרקה (MES 10mM, acetoseringone 200uM, pH=5.6), נעטף ברדיד אלומיניום וטולטל למשך שעותיים. הזרקה לפירות (בשלים ושאינם בשלים) נעשתה לעומק 3-4 מ"מ והזרקה לעלים (עלים בגילאים שונים) נעשתה לאחר יצירת חריץ. יומיים לאחר ההדבקה נבחנו העלים בבינקולר פלואורסנטי. לא ניתן היה לראות סיגנל GFP בעלים או בפירות של עגבנייה.

ניסוי שני: התרבית סורכזה והפלט שהתקבל הורחף בתמיסת 5% סוכרוז וריכוז החיידקים נקבע על פי קריאת בספקטרופוטומטר. על מנת להגיע לריכוז תמיסת אגרו סופית בריכוז  $OD_{600}=0.2$ , הוכן בופר הזרקה המורכב מ  $15\mu l$   $MgSO_4$  [1M],  $30\mu l$  MES [0.5M],  $1.5\mu l$  AS [150mM] והשלמה ל 1.5 מ"ל עם מים. יומיים לאחר ההדבקה נבחנו העלים בבינקולר פלורוסנטי. לא ניתן היה לראות סיגנל GFP בעלים או בפירות של עגבנייה. בניסוי השלישי הוזרק לעלי טבק ועלי עגבנייה הקונסטרקט 35S:GS שהכיל גם GFP, על מנת להשוות את היעילות בין שני המינים, התוצאות מוצגות בתמונה 7. ניתן לראות כי באותו ניסוי ניתן היה לראות סיגנל GFP בביטוי החולף בעלי טבק אך לא בעלי עגבנייה. כיוון שלא הצלחנו לקבל ביטוי מספק עד כה, טרם התקדמנו לבידוד קומפלקסים.



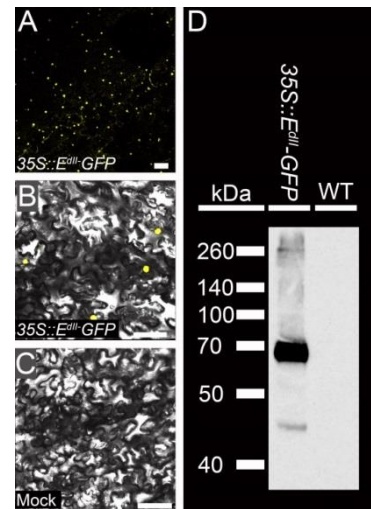
**איור 1.** עלה חמישי פרוש של הגנוטיפים המצוינים.

$BLS>>GS-E^{dII}$  ו-  $BLS>>E^{dII}-GS$  צמחים המבטאים במערכת הטרנס-אקטיבציה איחוי של  $E^{dII}$  לתג בקצה האמיני והקרבוקסילי, בהתאמה, תחת בקרת הפרומוטר  $BLS$ , במערכת הטרנס-אקטיבציה. הפנוטיפ המתקבל דומה לזה המתקבל מביטוי של  $E^{dII}$  ללא איחוי. הבר מציין 2cm.



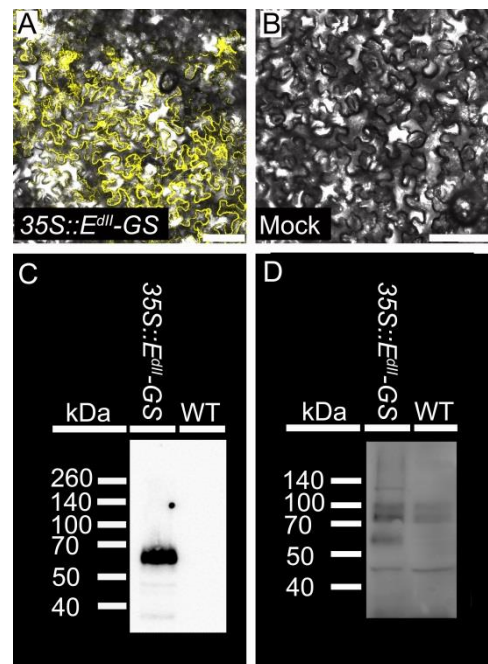
**איור 2.** בידוד חלבונים היוצרים קומפלקסים עם E מעלי עגבניה המבטאים את  $E^{dII}$  מאוחה לתג GS באמצעות פרומוטר  $BLS$ .

(A-B) בידוד מצמחי  $BLS>>GS-EdII$ . (A) כרומטוגרמה של תהליך הבידוד ב-FPLC לשימוש בקולונת-זיקה IgG בלבד ושחרור בחומצה. (B) אנליזת Western blot עם נוגדני IgG לפרקציות: Load - חלבונים שהופקו והוטענו על גבי הקולונה, Un-Bound - פרקציות המכילות חלבונים שלא נקשרו לקולונה, Peak - הפרקציות ששוחררו מהקולונה לשימוש חוזר והיו בפי. (C-D) בידוד חלבונים היוצרים קומפלקסים עם E תוך שימוש בשני מרכיבי התג -  $ProtG$  ו- $SBP$ . (C) כרומטוגרמה של תהליך הבידוד לשימוש בקולונת-זיקה IgG. חיתוך ל-TEV ותהליך בידוד נוסף בקולונת-זיקה (D) Streptavidin הגדלה של אזור ה-Peak שנראה בפאנל C.



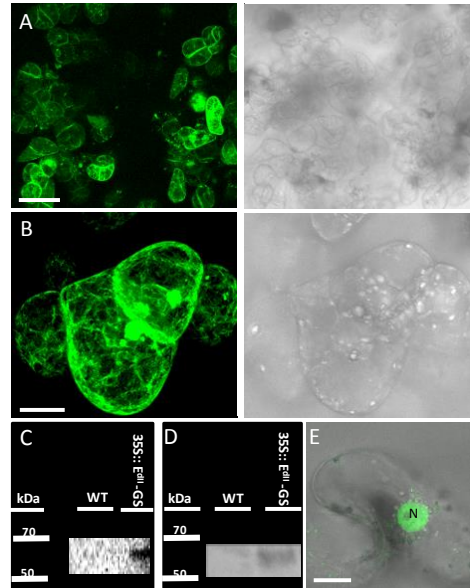
### איור 3. ביטוי חולף של $35S::E^{III}$ -GFP בעלי טבק.

(A-C) תמונות מיקרוסקופ קונפוקלי של ביטוי  $E^{III}$ -GFP (בצהוב) בתאים של עלי טבק שהודבקו ב- $35S::E^{III}$ -GFP. (A) פלואורסנציה בעלים שהודבקו נראה הסיגלל ממוקד לגרעין התא (A,B) ובתאים שלא הודבקו לא נראה סיגלל (C). (A) פלואורסנציה בלבד, (B,C) תמונות סופרפוזיציה של פלואורסנציה ואור לבן. קנה מידה =  $100\mu m$ . (D) אנאליזת Western blot של  $E^{III}$ -GFP: חלבון הופק לאחר ביטוי חולף של  $35S::E^{III}$ -GFP בעלי טבק ומצמחים שלא הודבקו לצורך זיהוי החלבון  $E^{III}$ -GFP: חלבון הופק לאחר ביטוי חולף של  $35S::E^{III}$ -GFP בעלי טבק ומצמחים שלא הודבקו (WT). האנאליזה נעשתה באמצעות נוגדן ל-GFP. גודל החלבון המאוחד  $E^{III}$ -GFP =  $64kDa$ .



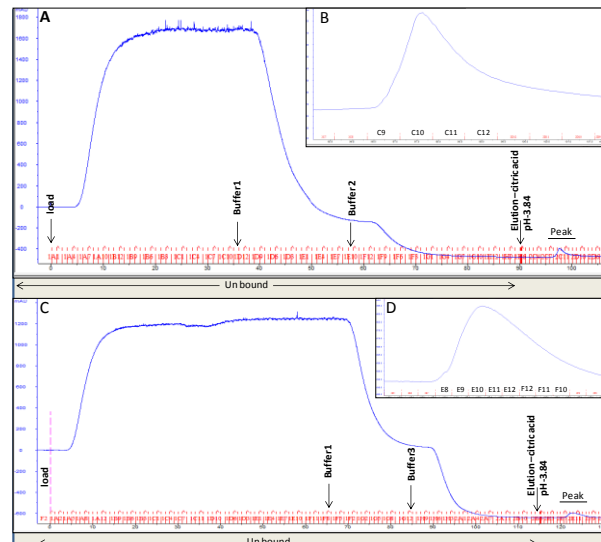
### איור 4. ביטוי חולף של $35S::E^{III}$ -GS בעלי טבק.

(A,B) תמונות סופרפוזיציה של סיגלל פלואורסנטי וסיגלל אור לבן שצולמו במיקרוסקופ קונפוקלי, של ביטוי הגן  $GFP$  (בצהוב) שמקורו בפלסמיד  $pK7WG2D$  והוא אינו מאוחד ל- $E^{III}$ -GS, המאפשר את ויזואליזציה הצלחת הטרנספורמציה. ניתן לראות כי תאים שהודבקו מבטאים  $GFP$  (בצהוב) (A), לעומת תאים שלא הודבקו ואינם מראים סיגלל (B). תמונות סופרפוזיציה של סיגלל פלואורסנטי וסיגלל אור לבן שצולמו במיקרוסקופ קונפוקלי. קנה מידה =  $100\mu m$ . (C,D) זיהוי החלבון  $E^{III}$ -GS באנאליזת Western blot. החלבון הופק לאחר ביטוי חולף של  $35S::E^{III}$ -GS בעלי טבק או מעלים שלא הודבקו (WT). האנאליזה נעשתה לשני חלקי התג באמצעות נוגדן IgG (C) ו-Streptavidin (D). גודל החלבון המאוחד  $E^{III}$ -GS =  $57kDa$ .



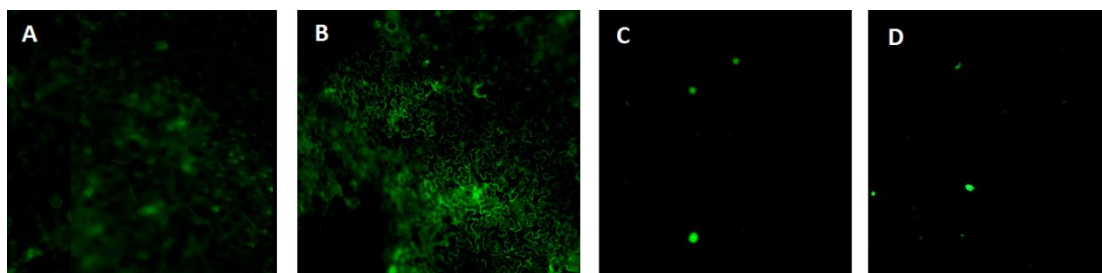
#### איור 5. ביטוי $35S::E^{dll}$ -GS או $35S::E^{dll}$ -GFP בתאי טבק.

תאים בני 7 ימים המבטאים  $35S::E^{dll}$ -GS (A-D). (A,B) תמונת של סיגנל פלואורסנטי ואור לבן שצולמו במיקרוסקופ קונפוקלי, של ביטוי הגן GFP (ירוק) שמקורו בפלסמיד pK7WG2D והוא אינו מאוחה ל- $E^{dll}$ -GS, המאפשר את ויזואליזציה הצלחת הטרנספורמציה. בתאים אלה זוהה החלבון  $E^{dll}$ -GS באנליזת Western blot בהשוואה ל-WT. האנליזה נעשתה לשני חלקי התג באמצעות נוגדן IgG (C) ו-Streptavidin (D). גודל החלבון המאוחה  $E^{dll}$ -GS = 57kDa. (E) תאים בני-11 יום המבטאים את  $35S::E^{dll}$ -GFP (ירוק) בגרעין התא (N), תמונת סופרפוזיציה של סיגנל פלואורסנטי ואור לבן אשר צולם במיקרוסקופ קונפוקלי. קנה מידה ב-A=100μm, ב-B,E=20μm.



#### איור 6. בידוד חלבונים היוצרים קומפלקסים עם E מעלי טבק ומתאי טבק BY2.

כרומטוגרמת בידוד FPLC של  $E^{dll}$ -GS מעלי טבק בהם בוטא החלבון בביטוי חולף (A-B) ומתאי טבק (C-D), בקולונת זיקה IgG. Load - חלבונים שהופקו והוטענו על גבי הקולונה, Un-Bound - פרקציות המכילות חלבונים שלא נקשרו לקולונה, Buffer1 - 25mM Tris pH-7.6 + 150mM NaCl (NP-40 ו-ethylene glycol) + 25mM Tris pH-7.6, Buffer2 - 25mM Tris pH-7.6 + 150mM NaCl, Buffer3 - 25mM Tris pH-7.6 + 150mM NaCl, Peak - הפרקציות ששוחררו מהקולונה ע"י חומצה והיו בפיק (peak). (B-D) הגדלה של אזור ה-Peak הנראה בפאנל A ו-C, בהתאמה.



**איור 7 ביטוי חולף בטבק *N.Benthamiana* ובעגבניה *S. lycopersicum*.**  
A, ביקורת, הזרקת לעלה טבק של מצע אינפילטרציה. B, הזרקת לעלה טבק של 35S:GS, הוקטור כלל גם GFP. C, ביקורת, הזרקת לעלה עגבניה של מצע אינפילטרציה. D, הזרקת לעלה עגבניה של 35S:GS, הוקטור כלל גם GFP. ניתן לראות כי יש ביטוי רק בעקבות הזרקת לעלי טבק המכילים את הקונסטרקט, אך לא בביקורת עלי טבק או בהזרקת לעלי עגבניה המכילים את הקונסטרקט.

### **טבלה 1: חלבונים שזוהו באנליזת LC-MS/MS**

לאחר השוואת התוצאות משני הניסויים (ביטוי חולף בעלי טבק וביטוי בתאי טבק BY2) נבחרו ה-Accessions המשותפים. מציאת הרצף של כל accession נעשתה באמצעות מאגר המידע uniprot. לאחר מכן נעשה blast של הרצפים מול מאגר מידע של חלבוני עגבניה.

	Accession	Organism	Tomato Accession	Description
1	E <sup>all</sup> -GS			
2	O80362	RK10_TOBAC	Solyc04g009540.1	50S ribosomal protein L10
3	O82702	VATG1_TOBAC	Solyc05g056020.2	V-type proton ATPase subunit G 2
4	O82802	SIR1_TOBAC	Solyc11g065620.1	Sulfite reductase
5	P24091	CHI2_TOBAC	Solyc10g055810.1	Endochitinase (Chitinase)
6	P43643	EF1A_TOBAC	Solyc11g069700.1	Elongation factor 1-alpha
7	P93768	PSMD3_TOBAC	Solyc01g111710.2	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3
8	Q03685	BIP5_TOBAC	Solyc03g082920.2	Heat shock protein
9	Q285L8	RS3A_TOBAC	Solyc03g097900.2	40S ribosomal protein S1
10	Q40450	EFTUA_NICSY	Solyc03g112150.1	Elongation factor Tu
11	Q40460	RCA1_TOBAC	Solyc09g011080.2	Ribulose-1 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase 1
12	Q40546	KPYG_TOBAC	Solyc08g077180.2	Pyruvate kinase
13	Q56E62	NDK1_TOBAC	Solyc01g089970.2	Nucleoside diphosphate kinase
14	Q8RX97	FRI1_TOBAC	Solyc06g050980.2	Ferritin
15	Q9SMC2	ILVH_NICPL	Solyc11g008780.1	Acetolactate synthase small subunit
16	A0A088FCE7	A0A088FCE7_NICB E	Solyc12g042060.1	ATP-dependent clp protease ATP-binding subunit
17	A1YUL9	A1YUL9_NICBE	Solyc01g060470.2	Importin alpha-1b subunit
18	B2BF99	B2BF99_TOBAC	Solyc06g076970.2	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
19	B5M4V6	B5M4V6_TOBAC	Solyc05g054480.2	Actin
20	C3PTS5	C3PTS5_TOBAC	Solyc07g051850.2	Aspartic proteinase
21	C5MQG8	C5MQG8_NICGU	Solyc06g074980.2	26S protease regulatory subunit 6B homolog
22	D2CFI9	D2CFI9_TOBAC	Solyc11g056680.1	LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase, RLP
23	E1APE9	E1APE9_TOBAC	Solyc08g043170.2	Gamma-glutamyl phosphate reductase
24	E2F3S8	E2F3S8_TOBAC	Solyc07g045240.2	RNA-binding protein-like
25	E2F3S9	E2F3S9_TOBAC	Solyc07g045240.2	RNA-binding protein-like
26	E5LLE7	E5LLE7_NICBE	Solyc07g066610.2	Phosphoglycerate kinase
27	G4XTD4	G4XTD4_NICBE	Solyc06g019170.2	Gamma-glutamyl phosphate reductase
28	H9CCH6	H9CCH6_TOBAC	Solyc01g008330.2	Acetyl-CoA carboxylase biotin carboxylase
29	I7GV55	I7GV55_TOBAC	Solyc09g010630.2	heat shock protein

30	O65852	O65852_TOBAC	Solyc08g077930.2	Isocitrate dehydrogenase
31	O82151	O82151_TOBAC	Solyc11g071640.1	Beta-D-glucosidase
32	O82161	O82161_TOBAC	Solyc04g074450.1	Phi-1 protein (Fragment)
33	Q076B1	Q076B1_NICBE	Solyc09g090720.2	26S proteasome regulatory subunit
34	Q1MSG9	Q1MSG9_NICBE	Solyc04g014460.2	RNA binding protein
35	Q1MSH0	Q1MSH0_NICBE	Solyc10g086400.1	THO complex subunit 4
36	Q6F4H4	Q6F4H4_TOBAC	Solyc01g104770.2	Actin
37	Q75ZE5	Q75ZE5_TOBAC	Solyc04g012120.2	14-3-3 protein beta/alpha-1
38	Q84QX4	Q84QX4_TOBAC	Solyc06g049080.2	Superoxide dismutase
39	Q8LP28	Q8LP28_TOBAC	Solyc02g092640.2	Casein kinase
40	Q947H4	Q947H4_TOBAC	Solyc02g087810.2	Aldose-1-epimerase-like protein
41	Q94IA7	Q94IA7_TOBAC	Solyc03g096730.2	GDP-D-mannose pyrophosphorylase 1
42	Q9SAQ0	Q9SAQ0_NICSY	Solyc05g008460.2	ATP synthase subunit beta
43	Q9ZP36	Q9ZP36_TOBAC	Solyc05g007830.2	Expansin 2
44	T2BQ67	T2BQ67_TOBAC	Solyc04g078540.2	Cathepsin B-like cysteine proteinase
45	T2BRU8	T2BRU8_TOBAC	Solyc12g088670.1	Cathepsin B-like cysteine proteinase
46	U5PY93	U5PY93_NICBE	Solyc11g006460.1	DNAJ chaperone
47	V9HZ10	V9HZ10_NICAT	Solyc01g097270.2	Chitinase (Fragment)
48	W8R6U0	W8R6U0_TOBAC	Solyc05g012270.2	Argininosuccinate synthase

### טבלה 1: חלבונים שזוהו באנליזת LC-MS/MS

חלבונים משותפים לשלושת הניסויים: תאי טבק, ביטוי חולף בעלי טבק ובידוד עם תג אחד, ביטוי חולף בעלי טבק ובידוד עם שני תגים.

Description	Tomato Accession
ATP-dependent clp protease ATP-binding subunit	Solyc12g042060.1
Aspartic proteinase	Solyc07g051850.2
26S protease regulatory subunit 6B homolog	Solyc06g074980.2
LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase, RLP	Solyc11g056680.1
Gamma-glutamyl phosphate reductase	Solyc06g019170.2
Beta-D-glucosidase	Solyc11g071640.1
V-type proton ATPase subunit G 2	Solyc05g056020.2
Elongation factor Tu	Solyc03g112150.1
Ribulose-1 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase 1	Solyc09g011080.2
Pyruvate kinase	Solyc08g077180.2
Casein kinase	Solyc02g092640.2
Cathepsin B-like cysteine proteinase	Solyc04g078540.2
Cathepsin B-like cysteine proteinase	Solyc12g088670.1
Chitinase (Fragment)	Solyc01g097270.2
Argininosuccinate synthas	Solyc05g012270.2

### סיכום ודין:

למרות שנעשו ניסיונות רבים לא הצלחנו לזהות את החלבון E שהופק מעלים של צמחי עגבנייה טרנסגניים המבטאים  $E^{dIII}$ -GS >BLS באנליזת LC-MS/MS. הקושי בזיהוי נובע ככל הנראה מכמות קטנה מידי של חלבון המטרה ביחס לחלבונים אחרים שיצרו מיסוך. כל זאת למרות שנראתה קשירה לקולונה והחלבון זוהה ב-Western blot, בכדי להתגבר על בעיה זו עברנו למערכת של ביטוי חולף בעלי טבק וביטוי בתאי טבק

BY2 של  $35S::E^{dII}-GFP$  ושל  $35S::E^{dII}-GS$ . בשני המקרים התקבל ביטוי גבוה של החלבון E המאוחה לתג והוא זוהה ב-western blot (איורים 3 ו-4). לצורך זיהוי חלבוני הקומפלקס בחרנו להמשיך עם  $E^{dII}$  GS בשל היתרון שלו בניקוי בשני שלבים בשיטת TAP. בשלב ראשון עשינו ניסוי FPLC רק עם קולונת IgG. מיצוי חלבונים הופק מעלי טבק לאחר ביטוי חולף של  $35S::E^{dII}-GS$ , נראתה קשירה לקולונת IgG. ואכן, באנליזת LC-MS/MS החלבון  $E^{dII}-GS$  זוהה ואתו זוהו 712 חלבונים נוספים. מערכת נוספת שבה השתמשנו בכדי לקבל כמות גדולה של חלבון היא טביק BY2 המבטאים  $35S::E^{dII}-GS$ . גם במקרה זה הועבר מיצוי החלבונים דרך קולונת IgG, נראתה קשירה והחלבון  $E^{dII}-GS$  זוהה ויחד איתו זוהו 256 חלבונים נוספים בעלי פוטנציאל ליצור איתו קומפלקס. בהשוואת רשימת החלבונים משני הניסויים הנ"ל נמצאו 50 חלבונים חופפים. אחד החלבונים המעניינים שנמצאו הוא החלבון אלפא-אקספנסין (Alpa-) EXPANSIN. חלבוני אקספנסין מצויים בדופן התא וגורמים לשחרור של סיבי הצלולוז בדופן התא ובכך מאפשרים את התארכות התא. חלבוני אקספנסין הם גם בעלי תפקיד בהתרככות פירות וכן בחדירה של נחשון האבקה אל הצלקת והעלי. נמצא גם, כי אפליקציה מקומית של אוקסין או של אקספנסין במריסטמה האפיקלית של הנצר (Shoot Apical Meristem; SAM) משרה התפתחות של עלה אקטופי במקום האפליקציה (Fleming, 1997). במידה והתפתחות של עלעלים תלויה בהתארכות מקומית של תאים באזור בו גדל העלעל ובעיכוב של התארכות תאים באזור בו יתמיין הרווח בין העלעלים, מעניין לבדוק האם חלבון זה מבוקר על-ידי ENTIRE. כמו כן, המוטנט *entire* מאופיין גם בפירות פרתנוקורפים, פירות המתפתחים ללא הפרייה, ולכן מעניין לבדוק האם גם כאן יש קשר לאקספנסין המעורב בבקרת התארכות נחשון האבקה במהלך תהליך ההפרייה.

בהמשך, ביצענו ניסוי מלא (ניקוי בשני שלבים) של חלבונים שמוצו לאחר ביטוי חולף בעלי טבק ובתאי טבק BY2 של  $E^{dII}-GS$ . כמו כן נבצע בהמשך ניסוי ביקורת בו נמצא חלבונים מרקמה המבטאת את התג GS בלבד.

נראה כי הבחירה בטבק לצורך ביטוי החלבון E אפשרה בידוד של החלבונים היוצרים אתו קומפלקס בשל רמת הביטוי הגבוהה. בנוסף לכך הצלחנו לכויל את המערכת כך שבסיום תהליך המיצוי הקולונה נשטפת עם בופר ללא דטרגנטים (NP-40 ו-ethylene glycol) אשר מפריעים לריכוז הרקמה, וכן ריכוז החלבון בצנטריקון ע"י אנשי היחידה לפרוטאומיקה במכון ויצמן. כל אלה שיפרו מאוד את תהליך הבידוד והריכוז של הדוגמא ואפשרו לנו לזהות את החלבון E יחד עם חלבונים בעלי פוטנציאל ליצירת קומפלקס. כל זאת בזמן קצר יותר מבלי שיהיה צורך בהשקעה אצטונית ו/או בהרצת החלבון בג'ל, שני שלבים אשר גורמים לאיבוד חלק מדוגמת החלבונים המבודדים. כמו כן הצלחנו לקבוע גבול החמרה אפשרי בבופר השטיפה (150mM NaCl) שהוריד באופן ניכר את מספר החלבונים הבלתי ספציפיים אשר שזוהו בדוגמא (712 לעומת 256), ועל כן יאפשר זיהוי אינטראקציות חלבוניות עם E יותר ספציפיות.

אנו סבורים כי לתוצאות בטבק רלוונטיות לשאלות המחקר, כיוון שהטבק (*Nicotiana benthamiana*) שייך למשפחת הסולניים (Solanaceae) כמו העגבניה (*Solanum lycopersicum*). למרות זאת, השאיפה היא להצליח לבודד את החלבונים העוברים קומפלקס עם E מעגבניה. עד כה, הנסיונות לקבלת כמות חלבון מספיקה לבידוד קומפלקסים מביטוי חולף או קבוע בעגבניה לא צלחו. אנו מקווים שנצליח להשיג מימון כדי



להמשיך בנסיונות אלה. להערכתנו, רמת החלבון הנמוכה מקורה מביטוי לא גבוה מספיק של החלבון, ולא מבעיה טכנית. ואכן, בעלי הטבק, ובעזרת פרומוטר חזק, הצלחנו לקבל ביטוי ולבודד קומפלקסים. השלב הבא הוא לנסות לקבל ביטוי מספיק גם בביטוי חולף בעלי ופירות עגבנייה, ואולי גם בצמחים טרנסגנים. המטרה השלישית במטרות המקוריות הייתה לבחון את ההשפעה של החלבונים העוברים אינטראקציה עם E על התפתחות העלה ועל חנטת הפרי. נראה כי מטרה זו תושג בטווח הזמן הרחוק יותר. בנוסף לזיהוי חלבונים שעוברים אינטראקציה בעגבנייה בעזרת המידע מטבק, כמוסבר לעיל, אנו רואים חשיבות יישומית גדולה גם בבניית הפלטפורמה, שתוכל לשמש לבידוד קומפלקסים של חלבונים נוספים מעגבנייה וסולניים אחרים, ואף מצמחים אחרים. אנו סבורים כי לאור הקשיים הבלתי צפויים שנתקלנו בהם, ולאור העובדה שיש מעט מחקרים לבידוד קומפלקסים עם חלבונים מצמחים בעלי חשיבות חקלאית, קיימת חדשנות בתוצאות שיאפשרו מחקרים שלא התאפשרו עד כה. המחקר הוביל לתובנות לגבי הגישות האפשריות לבודד קומפלקסים חלבוניים מצמחים. תובנות אלה והשיטות שפותחו יוכלו בעתיד הקרוב לשמש לטווח רחב של מחקרים בגידולים שונים.

- Dedecker, M., Leene, J. Van and Jaeger, G. De** (2015) Unravelling plant molecular machineries through affinity purification coupled to mass spectrometry. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **24**, 1–9.
- Fleming, a. J.** (1997) Induction of Leaf Primordia by the Cell Wall Protein Expansin. *Science.*, **276**, 1415–1418.
- Gadeyne, A., Sánchez-Rodríguez, C., Vanneste, S., et al.** (2014) The TPLATE adaptor complex drives clathrin-mediated endocytosis in plants. *Cell*, **156**, 691–704.
- Karimi, M., Inzé, D. and Depicker, A.** (2002) GATEWAY<sup>TM</sup> vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.*, **7**, 193–195.
- Leene, J. Van, Eeckhout, D., Cannoot, B., et al.** (2015) An improved toolbox to unravel the plant cellular machinery by tandem affinity purification of Arabidopsis protein complexes. *Nat. Protoc.*, **10**, 169–187.
- Leene, J. Van, Stals, H., Eeckhout, D., et al.** (2007) A tandem affinity purification-based technology platform to study the cell cycle interactome in Arabidopsis thaliana. *Mol. Cell. Proteomics*, **6**, 1226–38.
- Leene, J. Van, Witters, E., Inzé, D. and Jaeger, G. De** (2008) Boosting tandem affinity purification of plant protein complexes. *Trends Plant Sci.*, **13**, 517–20.
- Nagata, T., Yasuyuki, N. and Seiichiro, H.** (1992) Tobacco BY-2 cell line as the “HeLa” cell in the cell biology of higher plants. *Int. Rev. Cytol.*, **132**, 1–30.
- Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., et al.** (2007) Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *J. Biosci. Bioeng.*, **104**, 34–41.
- Orzaez, D., Mirabel, S., Wieland, W.H. and Granell, A.** (2006) Agroinjection of Tomato Fruits. A Tool for Rapid Functional Analysis of Transgenes Directly in Fruit. *Plant Physiol.*, **140**, 3–11.
- Pauwels, L., Barbero, G.F., Geerinck, J., et al.** (2010) NINJA connects the co-repressor TOPLESS to jasmonate signalling. *Nature*, **464**, 788–91.
- Shaul, O., Mironov, V., Burssens, S., Montagu, M. Van and Inze, D.** (1996) Two Arabidopsis cyclin promoters mediate distinctive transcriptional oscillation in synchronized tobacco BY-2 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **93**, 4868–4872.
- Smaczniak, C., Li, N., Boeren, S., America, T., Dongen, W. van, Goerdal, S.S., Vries, S. de, Angenent, G.C. and Kaufmann, K.** (2012) Proteomics-based identification of low-abundance signaling and regulatory protein complexes in native plant tissues. *Nat. Protoc.*, **7**, 2144–58.
- Spolaore, S., Trainotti, L. and Casadoro, G.** (2001) A simple protocol for transient gene expression in ripe fleshy fruit mediated by Agrobacterium. *J. Exp. Bot.*, **52**, 845–850.

## • סיכום עם שאלות מנחות

נא להתייחס לכל השאלות בקצרה ולעניין, ב-3 עד 4 שורות לכל שאלה (לא תובא בחשבון חריגה מגבולות המסגרת המודפסת).  
שיתוף הפעולה שלך יסייע לתהליך ההערכה של תוצאות המחקר.  
**הערה:** נא לציין הפנייה לדו"ח אם נכללו בו נקודות נוספות לאלה שבסיכום.

<b>מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה.</b>
יצירת צמחים טרנסגניים המבטאים את E מאוחה לתג המאפשר בידוד בשיטת ה TAP.
בידוד והשוואת קומפלקסים המכילים את E מעלים ומשחלות בוגרות.
בחינת השפעת חלבונים העוברים אינטראקציה עם E על התפתחות העלה ועל חנטת הפרי.
<b>אילו מטרות המחקר הושגו עד כה:</b> יצרנו צמחים טרנסגניים המבטאים את E המאוחה לתג. כיילנו בידוד קומפלקסים אך בשל קושי בקבלת כמות מספיקה של חלבון הצבנו מטרות משנה של כיוול מערכות חליפיות. יצרנו קונסטרוקטים והראינו התכנות של ביטוי חולף בעלי טבק ובתאי טבק. ביצענו בידוד ראשוני של קומפלקסים מעלי טבק ותאי טבק, והאנליזה הראתה את קיום החלבון E בקומפלקס וכן את נוכחותם של חלבונים נוספים שכנראה עוברים אתו אינטראקציה. נעשו מספר נסיונות לביטוי חולף בעלים ופירות עגבנייה, עד כה ללא הצלחה.
<b>עיקרי התוצאות.</b>
1. יוצרו צמחים טרנסגניים המבטאים איחוי של E עם תג.
2. בניסויים לבידוד הקומפלקסים נראה פיק שזוהה בחלק מהמקרים באנליזת Western blot אולם כמות החלבון הייתה קטנה מדי ולא זוהתה באנליזת MS.
3. יוצרו קונסטרוקטים לביטוי החלבון במערכות חליפיות של ביטוי חולף בטבק ותרבויות תאי טבק המאפשרים ביטוי חזק יותר של החלבון.
4. ביטוי חולף בעלי טבק וביטוי בתאי טבק הוביל לייצור כמויות חלבון מספיקות לבידוד קומפלקסים, ואנליזת Western Blot זיהתה את החלבון המאוחה.
5. בודד קומפלקסים משתי המערכות הנ"ל ובאנליזת MS זוהה החלבון E וחלבונים נוספים שעוברים אינטראקציה עם E בשתי המערכות.
<b>מסקנות מדעיות והשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר לתקופת הדוח?</b>
בשל קשיים בבידוד קומפלקסים מצמחים שלמים המחקר התעכב, והמטרות הותאמו והוגדרו ככיוול מערכת שתאפשר ביטוי גבוה מספיק של החלבון, בידוד קומפלקסים המכילים את E ממערכות אלה, ובחינת הפקה מרקמות שונות של הצמח. מטרות אלה הושגו. עם זאת, בדעתנו להמשיך במחקר על מנת להשלים את התהליך עם בידוד כפול. תוצאות המחקר מהוות תרומה חשובה ככלי לבידוד קומפלקסים בעתיד מעגבנייה וגידולים אחרים, והחלבונים שזוהו בעלי פוטנציאל לשימוש בעתיד להבנת תהליכי התפתחות העלה והפרי והשפעה על חנטת פירות בתנאי עקה.
<b>בעיות שונות לפתרון ו/או שינויים (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים) שחלו במהלך העבודה; התייחסות המשך המחקר לגביהן, האם יושגו מטרות המחקר בתקופה שנוטרה לביצוע תוכנית המחקר?</b>
ראה תשובה לעיל
<b>הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח: פרסומים בכתב - ציטט ביבליוגרפי כמקובל בפרסום מאמר מדעי; פטנטים - יש לציין שם ומס' פטנט; הרצאות וימי עיון - יש לפרט מקום, תאריך, ציטוט ביבליוגרפי של התקציר כמקובל בפרסום מאמר מדעי.</b>
Ben-Gera, H., Dafna, A., Alvarez, J.P., Bar, M., Mauere, M. and Ori, N. (2016). Auxin-mediated lamina growth in tomato leaves is restricted by two parallel mechanisms. Plant J.,86, 443-457.
<b>פרסום הדוח: אני ממליץ לפרסם את הדוח: (סמן אחת מהאופציות)</b>
<input type="radio"/> ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט)
<input type="radio"/>
<input type="radio"/>
<input type="radio"/>

