

בנושא:

איפיון הקשרים והשפעות הגומלין בתוך קבוצת בקרי שיעתוק המעורבים בבקרת התפתחות פרי העגבניה

Study of the interplay among a defined set of transcription regulators in the control of the fleshy tomato fruit development

מוגש ע"י:

רבקה ברג- המכון למדעי הצמח, מכון וולקני, מינהל המחקר החקלאי
יחיעם זלץ - המכון למדעי הצמח, מכון וולקני, מינהל המחקר החקלאי
עינת שדות המכון למדעי הצמח, מכון וולקני, מינהל המחקר החקלאי
שרה שבתאי - המכון למדעי הצמח, מכון וולקני, מינהל המחקר החקלאי

Rivka Barg- Inst. Plant Sciences, Volcani center, ARO. – rivkab@volcani.agri.gov.il
Yehiam Salts - Inst. Plant Sciences, Volcani center, ARO – ysalts@volcani.agri.gov.il
Einat Sadot - Inst. Plant Sciences, Volcani center, ARO, vhesadot@volcani.agri.gov.il
Sara Shabtai - Inst. Plant Sciences, Volcani center, ARO - saras@volcani.agri.gov.il

תקציר

הצגת הבעיה: נפח התאים מהווה מדד חשוב בקביעת הגודל הסופי של פרי העגבניה, ומהווה מטרה חשובה להשבחה, אולם הידע אודות הבקרה של תהליך זה עדין לוקה. **מטרות המחקר:** לאפיין את הקשרים והשפעות הגומלין בתוך קבוצת בקרי שיעתוק MYBI/FSM1/FSB1 בבקרת התפתחות תאי הפרי. **שיטות העבודה:** מבחני קישור בין חלבונים, ציטולוקליזציה, ואיפיון צמחים טרנסגנים לביטוי ביתר והשתקת הגנים הנחקרים, וכן ניסויי Chromatin immunoprecipitation (CHIP) **התוצאות העיקריות:** אופיינו האתרים השמורים המעורבים בהתקשרות בין בקר השעתוק MYBI לבין FSB1. ובין FSB1 ל-FSM1 אופיינו האתר ב FSB1 האחראי למיקום החלבון בגרעין התא, ונמצא שלאחר ה- extDUF3755. תפקיד ביצוב החלבון. אנליזה פנוטיפית של צמחים המבטאים ביתר MYBI-GFP הראתה שגם בהם חל עיכוב בהתארכות תאים בהיפוקוטילים ובפרי, אבל ההשפעה פחותה מזו של ביטוי ביתר של FSM1 מבחני מכלואים עם הגן המדווח DR5-YFP מעידים כי OEX-FSM1 מפחית את רמות האוקסין בתאים, מה שמתישב עם השינוי במופע הפנוטיפי. כיוון השפעה דומה, דהיינו עיכוב בתארכות תאים גם בתגובה לביטוי ביתר של FSM1 וגם בתגובה לביטוי ביתר של MYBI, אם כי עיכוב מתון יותר, מצביעה על כך ש-MYBI חופשי מקשירה ל-FSB1 פועל כבקר עיכוב התארכות התאים. הפנוטיפ המתון של צמחי OEX-MYBI רומז שחברים אחרים במשפחה הם בעלי תרומה גדולה יותר לבקרת התארכות התאים. לאחר השלמת ההתאמה של פרוטוקול ניסויי Chromatin immunoprecipitation לעלים צעירים של עגבניה שמוצאם מצמחים בוגרים, נעשו מספר ניסויי CHIP. בחלקם הושו צמחים OEX-FSB1-GFP לקו לביקורת תוך שימוש בנוגדן כנגד GFP, ובאחרים הושו צמחים OEX-FSM1 לקו הביקורת לביקורת תוך שימוש בנוגדן כנגד רצף של 14 ח"א מהחלבון FSB1. הוכנו ספריות ריצוף משלושה ניסויים. אנליזה ביואינפורמטית של תוצרי ריצוף של שני זוגות סיפריות, הצביעה על כ-1000 אתרי ד.נ.א מועשרים באופן מובהק בצמחים הטרנסגניים. לאחר ביצוע מבחני qPCR לגבי אתרים נבחרים מתוך הרשימה הזו, ניתן יהיה להצביע על גנים מועמדים כמבוקרים ישירות ע"י רשת זו. **מסקנות:** יש להרחיב את האנליזה הפנוטיפית של השפעת מודולציית ביטוי MYBI על גודל התאים והפרי, ולנצל את החומר הגנטי שהוכן, ואת תוצרי ניסויי ה-CHIP השונים לאיתור הגנים המבוקרים ע"י קבוצת החלבונים MYBI/FSM1/FSB1.

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: /לא (מחק את המיותר *)

* חתימת החוקר . רבקה בויג

מבוא, ותיאור הבעיה

איכות וגודל הפרי נקבעים בין היתר עפ"י מספר התאים וגודלם. מספר שכבות התאים נקבע עפ"י מספר החלוקות המתרחשות בשחלה ופרי עד לסיום שלב II של התפתחות הפרי, כשבעה ימים לאחר אנטזיס. וגודל התאים שהוא בעל תרומה משמעותית ביותר נקבע עפ"י מידת הגדלת ניפחם, תהליך שנמשך עד קרוב לסיום שלב III של התפתחות הפרי, ומלווה במספר משתנה של מעגלי אנדורדופליקציה בשכבות התאים השונות (Gillaspy et al 1997, Cheniclet et al 2005). התאים שגדילתם בעלת התרומה הגדולה ביותר לגודל הפרי הסופי הם אלו המאופיינים בכושר הגדלת הנפח הגבוה ביותר. במחקר קודם זהינו את הגן SIFSM1 המקדד לחלבון קטן המכיל אתר דמויי MYB, והראנו שהוא מתקשר פיסיית לחלבון שכינינו SIFSB1 וכן הראנו ש-SIFSM1 פועל כבקר שלילי על ההתארכות הדיפרנציאלית של התאים בעלי כושר הגדילה הגבוה ביותר ברקמה (Machemer et al 2011) מחקר זה בא להרחיב את הידע אודות רשת הגנים המעורבים בקביעת גדילת תאים בכלל, ובפרי בפרט, ובמיוחד ללמוד את תפקידם ומהות האינטראקציות בין שלושה החלבונים: SIFSM1, SIFSB1, SIMYBI, כולם חלבונים המכילים אתרים דמויי MYB, אם כי לא כולם אתרים קאנוניים. בתכנית המחקר הוצע לחקור באופן ספציפי את היחסים האפיסטטים בין שלושה גנים/חלבונים אלו לבין שני חלבונים נוספים שדווחו כבעלי תפקיד בבקרת גודל תאים Ovate (שמוטציה בו משפיעה על מבנה הפרי בעגבניה ככל הנראה בגלל השפעה מקומית על התארכות התאים Liu et al 2002), ובקר שיעתוק ממשפחת homeodomain protein family (TALE) 3-aa loop extension שאליו בארבידופסיס נקשר הומולוג של Ovate, ומודיפיקציה של הביטוי שלו השפיעה על גדילת תאים בארבידופסיס (Hackbusch et al 2005). למרות שאנליזה ראשונית של ניסויי RNA-seq שהשוותה בין ספריות שמקורן מפירות המבטאים ביתר את הגן SIFSM1 לבין פרי ביקורת הצביעה עליה בביטוי הגן ovate, בחינה באמצעות semi-qRT לא איששה ממצא זה. על כן במקום זאת החלטנו לשנות גישה ולנסות לאתר את הגנים המבוקרים ע"י הרשת SIFSM1, SIFSB1, SIMYBI באמצעות אנליזת Chromatin immunoprecipitation-sequencing (CHIP-SEQ) תוך שימוש בצמחים המבטאים ביתר את הטרנסגן FSB1-GFP. להבדיל מהמטרה הפרטנית שצוינה בהצעת המחקר, זוהי גישה לא מוטת (unbiased) שאמורה להצביע באופן ישיר על כלל האתרים / הגנים המבוקרים באופן ישיר על ידי רשת חלבונים זו. הרחבת הידע אודות הבקרה הגנטית של גדילת תאים בכלל, וגדילה דיפרנציאלית בפרט, תציע גנים נוספים כיעדים למודיפיקציה לקראת השפעה על גודל וכיווניות התארכות תאים ברקמות צמחיות בעלות רלוונטיות לאיכות היבול החקלאי.

מטרות המחקר כפי שהוצגו בתכנית המחקר המקורית הן:

1. לימוד הקשרים הפיסיים בין חמשת החלבונים FSM1, FSB1, MYBI, OVATE, TALE
2. אנליזה פונקציונאלית של פעילות FSB1, MYBI, OVATE בהקשר של גדילה והתפתחות הפרי.
3. לימוד הקשרים הרגולטוריים בין הגנים המקדדים לחלבונים אלו.

כאמור, לאור הממצאים שהתקבלו במהלך העבודה, המחקר התמקד בהרחבת פיענוח הקשרים הפיסיים בין החלבונים FSM1, FSB1, MYBI, וננקטה גישה שונה לזיהוי הגנים המבוקרים על-ידי רשת חלבונים זו.

1) זיהוי האתרים החלבוניים (domains) המעורבים באינטראקציה הפיסית בין SIFSB1 לבין פקטור השיעתוק SIMYBI: לאחר שמצאנו באמצעות אנליזת CoIP (co-immunoprecipitation) של חלבונים שהופקו מעלי טבק אליהם נעשתה אגרו-אינפילטרציה, שהחלבון SIFSB1 מתקשר פיסית עם החלבון SIMYBI, בנוסף להתקשרותו עם SIFSM1 (תמונה 1A), בחנו באמצעות אנליזת Yeast 2-hybrids (Y2H) אלו משני האתרים השמורים של SIFSB1 ושל SIMYBI מעורבים באינטראקציה ביניהם. לשם כך נבנו פלסמידים שמכילים בהתאמה את החלקים ה-N-terminal או ה-C-terminal של כל אחד מהם במצומד ל-AD או BD של GAL4 (תמונה 1B). כפי שמודגם בתמונה 1D,C ההתקשרות ביניהם התרחשה בין החלק ה-Nter של FSB1 הכולל את האתר דמוי MYB לבין החלק ה-Nter של MYBI שכולל את אתר ה-MYB הראשון (R1-MYB). ממצא זה נמצא בהתאמה עם הדווח של Rose et al (1999) שראו שההתקשרות של MYBI ל- I-box cis element DNA מתרחשת באמצעות אתר ה-MYB השני (R2-MYB) שנמצא בחלק ה-C-ter של החלבון, מה שמשאיר את האתר ראשון (R1-MYB) להשתתף באינטראקציה עם חלבונים בקרי שיעתוק, וכפי שהראנו זהו החלבון FSB1. אנליזה זו לא הצביעה על תפקיד אפשרי של האתר השמור השני extDUF3755 באינטראקציה בין שני החלבונים הללו.

2) אנליזת האזור המעורב במיקום התוך תאי של FSB1: האנליזות הקונפוקאליות הראו שהמיקום המועדף של SIFSB1 בגרעין התא לא מושפע מנוכחות פקטור השיעתוק SIMYBI, לעומת זאת, בנוכחות SIFSM1 החלבון נמצא גם בגרעין וגם בציטופלסמה. במטרה לבחון את התרומה של כל אחד מחלקי החלבון FSB1 להצטברות שלו בגרעין נערכה אנליזה קונפוקאלית של מיקום שני החלקים של החלבון כשהם מאוחדים ל-GFP, ומוזרקים בהעדר או בנוכחות FSM1-RFP. כפי שמודגם בתמונה 2A, חלבון הכולל את 209 ח"א הראשונות (FSBN-ter) ובכללן אתר ה-MYB, מוקם בגרעין כמו החלבון השלם (לוחות עליונים בהשוואה ללוחות האמצעיים). בעוד החלק הכולל את 104 ח"א האחרונות ובכללן האתר השמור extDUF3755 ממוקם הן בגרעין והן בציטופלסמה. ובדומה לחלבון השלם גם מיקום החלק ה-N-ter של FSB1 מושפע מנוכחות FSM1 שגורם לחלק להישאר בציטופלסמה. (תמונה 2 לוח אמצעי החלק הימני). ממצא זה מתיישב עם ההשערה שהמעקובת המסומנת באדום (תמונה 2, חלק ב') משמשת כ-bi-partite nuclear localization signal ושהאינטראקציה עם FSM1 עשויה למסך אותו לפחות באופן חלקי ובכך להפריע את כניסת החלבון לגרעין. לעומת זאת הזרקה של FSB1-GFP ביחד עם MYBI אינה משפיעה על מיקומו בגרעין בלבד (תמונה 2B).

ממצאים מאנליזות Y2H רמזו שחלבון ממשפחת ה-DELLA עשוי להשתתף ברשת הגנים הנחקרת, על-כן נעשה מאמץ לשבט את הגן מעגבניה. למרות אי-התאמה בין מעקובת ה-mRNA המופקדת לבין המעקובת הצפויה עפ"י הגירסא 2.4 של גנום העגבניה הצלחנו לשבט מ-cDNA שהוכן מעלים של נבטים צעירים את מלוא ה-CDS של הגן Solyc11g011260.1.1. באנליזת Y2H שנעשתה על הומולוג של ארבידופסיס נמצאה אינטראקציה בין חלבון ה-DELLA לבין הומולוג של FSB (תמונה 3). יתרה מזו, מצאנו שהאינטראקציה הזו לא מבוססת על החלק ה-FSB Nter שמכיל את האתר דמוי ה-MYB, אלא על האזור שכולל את האתר השמור extDUF3755 ובכך לכאורה ניתן ליחס לו משמעות ביולוגית מעניינת. הבעיה היא שבמספר ניסויי CoIP מעלי טבק שביטאו את שני הגנים בעיקבות co-agroinfiltration לא מצאנו ש-AtDELLA-GFP עובר אינטראקציה עם AtFSB1-MYC. באופן דומה, בסדרת ניסויי CoIP שבוצעה על חלבונים שהופקו מעלי טבק אליהם נעשתה co-agroinfiltration של פלסמידים המקודדים לחלבונים ההומולוגיים מעגבניה בשני הצדדים, כלומר:

SIDELLA-MYC +SIFSB1-GFP (2) , SIDELLA-GFP + SIFSB1-MYC (1) לא מצאנו כל עדות שחלבונים אלו נקשרים *in-vivo*, ממצא שיכול להיגרם כתוצאה מאי-יציבות חלבון ה- DELLA, בעיקר בנוכחות ג'יברלין (Davière & Achar 2013). במטרה לעכב את פירוק חלבון ה- DELLA, נערכו בהמשך ניסויי אגרו-אינפילטרציה לעלים שרוססו בפקלובוטרוזול (PAC) המעכב סינטזת ג'יברלין, או כאשר הוסף מעכב הפרוטאזום MG132. כאמור בשום מקרה לא נמצאה עדות לקישור בין החלבונים. אמנם לא שללנו את האפשרות שהוספת התג לקצה ה-C של החלבונים היא שהפריעה לאינטראקציה ביניהם *in-planta* (אף שנבחן גם צרוף שבו התג הוסף לחלבון ה- DELLA בקצה ה-N שלו), אולם סביר יותר שכמו בהרבה מקרים אחרים, האינטראקציה שנמצאה באנליזת Y2H אמנם מתרחשת במערכת השמרית אך אינה מייצגת התקשרות הקיימת גם בתאים צמחיים.

רמז לתפקיד אפשרי של החלק ה-C-טרמינאלי של חלבון ה-FSB1, התקבל מניסויי אגרו-אינפילטרציה של גירסאות קטועות של חלבון ה-FSB1, בהשוואה לחלבון השלם. במספר רב של ניסויים נמצא באופן הדיר שהכמות של החלבון FSB1 המתקבלת מעלים בעקבות אגרו-אינפילטרציה קטנה בהרבה משל חלבון ה-FSM או MYBI שהוזרקו באותם תנאים. יתרה מזו, החלבון מאד לא יציב לאחר הפקתו, ומדוגמא שהופשרה יותר מפעם אחת לא ניתן לקבל סיגנאל של נוכחות החלבון באנליזות Western, בעוד שהחלבונים MYBI-MYC וכן FSM1-MYC נשארים יציבים (קוקטייל של מעכבי פרוטאזות נכלל בכל ההפקות). כשהשוותה כמות החלבון השלם לזו של כל אחד משני חלקיו נמצא שהמקטע ה-C טרמינאלי (ח"א 204-307) המאוחד ל-10x MYC נמצא בכמות גדולה בהרבה מאשר המקטע ה-N טרמינאלי (ח"א 1-207) ומכמות מהחלבון השלם (כמות החלבון p19 שימשה כביקורת פנימית למספר התאים לתוכם התפשטו החיידקים) (תמונה 4). ממצא זה מעיד על יציבות נמוכה מאד של החלבון, מה שמתיישב עם העובדה שמתוך עשרות צמחים מותמרים באופן יציב ל-FSB1-GFP, לא נמצא אף צמח שניתן היה לראות בו זהירה של החלבון. זאת למרות שלצמחים יש פנוטיפ מובחן ונמצאו בהם טרנסקריפטים של הטרנסגן. כלומר נראה שלאזור הכולל את האתר השמור extDUF3755 יש תפקיד בבקרת יציבות החלבון, מה שחשוב כנראה בעיקר כל עוד החלבון נמצא מחוץ לגרעין. לעומת זאת, למרות שבאופן קבוע נמצא שבהזרקת FSB1 ביחד עם FSM1 רמת הזהירה גבוהה משמעותית מאשר בטיפול שבו-FSB1 מוזרק לבדו לעלי הטבק (תמונה 2, לוחות עליונים), לא נמצאה עדות לכך שנוכחות החלבון FSM1 מגבירה את יציבות החלבון FSB1, לפחות זה שהופק לאנליזות Western (תמונה 4, ערוץ 1 לעומת ערוץ 2).

(3 אנליזה פנוטיפית של צמחים המבטאים ביתר את החלבון SIMYBI-GFP : רגנרציה של צמחים טרנסגנים כאלו הייתה קשה ביותר, מה שחייב היקף גדול של ניסויי טרנספורמציה. בשנה האחרונה התקבלו צאצאים בדור R1 (ונאספו לאחרונה גם זרעי דור R2) מארבעה צמחים טרנסגנים בלתי תלויים, בהם נמצאה זהירות GFP ברורה בשורשים. בכל הארבעה נמצא באנליזה קונפוקאלית שהחלבון זוהר רק בגרעינים, כצפוי מבקר שיעתוק, ולהבדיל מהמופע שהתקבל בעקבות אגרו אינפילטרציה אז נמצאה זהירה ברורה גם בציטופלסמת התאים (תמונה 5). באופן כללי, ובזהירות הראויה כל זמן שלא יוצבו קוים הומוזיגוטיים לטרנסגן, ניתן לומר שהצמחים המותמרים מראים שינויים פנוטיפיים מתונים. העלים שלהם קצת יותר קטנים ועבים, וקצת פחות משוננים בהשוואה לקו ההורה.

השפעת הטרנסגן על התארכות היפוקוטיילים: מכיוון שביטוי ביתר של החלבון FSM1 "המתחרה" עם MYBI על התקשרות עם החלבון FSB1 גורם לקיצור מובהק של ההיפוקוטיילים בעיקר משום שהוא מפחית את התארכות התאים, בעיקר במרכז ההיפוקוטייל (Machemer et al 2011), בחנו את השפעת הביטוי ביתר של MYBI על ההתארכות ההיפוקוטיילים ואורך תאי האפידרמיס שלהם במרכז ההיפוקוטייל. כפי שמוצג בתמונה 6, ביטוי ביתר של

SIMYBI-GFP גורם להתקצרות מובהקת, אף כי מתונה של ההיפוקוטילים בהשוואה לקו ההורה, ובמקביל גם להתקצרות מובהקת, אך מתונה, של תאי האפידרמיס שנמדדו במקטע של הס"מ האמצעי של ההיפוקוטיל. הממצא הזה הדיר, ואומת בלפחות שני ניסויים שנעשו כ"א בשלוש חזרות, ולגבי חלק מהקוים בשלושה ניסויים שונים (בתלות בכמות זרעי ה- R1 שנאספו עד למועד ביצוע הניסויים). על-פניו, ממצא זה רומז ש- MYBI חופשי מקשירה ל-FSB1 הוא שמאט/ מעכב את התארכות התאים. העובדה שההיפוקוטילים של צמחים המבטאים ביתר SIMYBI-GFP אינם קצרים כמו אלו של צמחים המבטאים ביתר את החלבון FSM1 (תמונה 6 לוחות תחתונים), רומזת ש-MYBI אינו החבר החשוב ביותר במשפחה (שכוללת בעגבניה 7-9 חברים) מבחינת הבקרה על התארכות תאים, ויתכן שהתקשרות FSM1 עם חברי משפחה אחרים תורמת יותר לעיכוב ההתארכות.

השפעת הטרנסגן על הפרי: האנליזות שנערכו עד כה בהחלט ראשוניות. הן נערכו על צמחים מדור R1 מהם היה חשוב, בראש ובראשונה, לקבל זרעים כדי לייצב קווים הומוזיגוטיים. במשך חודשים ארוכים צמחים אלו יצרו רק פירות קטנים וחסרי זרעים (אף שנראה שהכילו זרעים מופלים), למרות שצמחי ביקורת שגודלו באותה חממה נשאו זרעים. האפשרות שהעדר זרעים נובע מפגיעה ביצור או נביטת אבקה נשללה. להפך, במבחן נביטת אבקה בתמיסת הנבטה נמצא שמהירות ההתארכות ואורך הנחשונים היו הרבה יותר גבוהים מאשר באבקת צמחי הביקורת. (אף שאין לשלול את האפשרות שגם תופעה זו עלולה לפגוע בהפריה). משהזדקנו הצמחים, התחילו להתקבל פירות נושאי זרעים. ורק פירות כאלו נכון להשוות לפרי הביקורת משום שהעדר זרעים כשלעצמו משפיע על מבנה הפריקרב (הפירות חסרי הזרעים צולמו ונבחנו, תוצאות לא מוצגות). פירות אדומים נושאי זרעים נשקלו וחתך דק של הפריקרב מהמישור האקוואטוריאלי של הפרי צולם (במיקרוסקופ אפי-פלורסנטי). מכיוון שלא נעשה דילול של הפירות לפרי אחד לתפרחת (כדי לא לפגוע ביצור זרעים) הפירות לא מבטאים את מלוא פוטנציאל הגדילה. ועל כן, על אף שנבחנו הרבה מאד פירות, המסקנות הן הקדמיות בלבד. ההתרשמות הכללית היא שבשלב של פרי אדום לא נראית השפעה בולטת של הטרנסגן על מבנה הפריקרב (תמונה 7, לוחות א', ב', ג'). אבל נראה שיש פחות התארכות של תאי המזוקרפ בשכבות שפנימה לצינורות ההובלה מאשר בפירות הביקורת, ובאופן כללי תאי הפריקרב יותר מעוגלים מאשר בפירות קו הביקורת בעלי משקל דומה. זהו אותו כיוון שינוי, אף כי במידה פחות בולטת מאשר בצמחים המותמרים ל-FSM1.

השפעת הטרנסגן על השחלה: מכיוון שהגן המקדד לחלבון המתחרה FSM1 כלל לא מתבטא בשלב השלישי של גדילת הפרי, יתכן שלביטוי ביתר של MYBI בשלבים מאוחרים של התפתחות הפרי אין כמעט השפעה של הפעילות הבקרתית שלו. לעומת זאת, ביטוי ביתר של MYBI שלבים המוקדמים של התפתחות הפרי, כאשר רמת ביטוי הגן FSM1 היא הגבוהה ביותר (אף שאינה גבוהה במונחים מוחלטים), עשוי להשפיע במידה משמעותית יותר על הפרי המתפתח. עדין לא נסרקו מספיק פרחים, אבל בחתכי רוחב של שחלות שחולצו מפרחים פתוחים, נראה שבטרנסגנים עובי הפריקרב קטן יותר, ומספירה של מספר שכבות התאים בחלק החיצוני של הפריקרב נראה שיש לפחות שכבה אחת נוספת באקזו-קרפ של צמחי הביקורת (תמונה 8). אישוש סטטיסטי של הממצאים הראשוניים מחייב אנליזה של הרבה יותר פרחים, וכאלו שיבואו מתפרחות מדוללות לפרח אחד בתפרחת.

הוכנו כבר צמחים טרנסגניים להשתקת הגן MYBI באמצעות מבנה RNAi, בדור R0 לא הובחן שינוי פנוטיפי ברור. אנליזה פנוטיפית תעשה לאחר שייוצבו כהומוזיגוטיים ארבעת הקווים שעל פי העמידות לקנמיצין בדור R1 מכילים לוקוס אחד של הטרנסגן.

4 אנליזת CHIP-SEQ לקראת איתור הגנים המבוקרים על-ידי רשת החלבונים FSM1-FSB1-MYBI

החלטנו לנסות לקדם איתור גנים שביטויים מבוקר באופן ישיר (primary target genes) על ידי רשת חלבונים זו

באמצעות מבחני CHIP-SEQ & CHIP-PCR . באמצעות Chromatin immunoprecipitation for plant materials with Dynabeads (בעקבות פרוטוקול שפותח במעבדה של E. Grotewold שמתואר ב- Morohashi et al 2009). במהלך השבתון שלי (ר.ב) במעבדה זו, לאחר שנמצא שפרוטוקול זה לא הניב יכול מספק של דנא מעלי עגבניה, שונה הפרוטוקול שפותח עבור נבטי ארבידופסיס, כך שיתאים להפקת כרומטין מעלים צעירים של צמחי עגבניה בוגרים, ממנו ניתן לשחרר (reverse cross-linking) במלואו אחרי קיבוע הכרומטין (cross linking) וסוניקציה, את הדנא הקשור לקומפלקסים חלבוניים. לאחר שנמצאו התנאים שהניבו יכול מספק של דנא קטוע לאורך הרצוי (~ 2500 bp), נעשו מספר ניסויי Chromatin immunoprecipitation (CHIP) כאשר מקור העלים היה מקו עגבניה מותמר ל- OEX-FSB1-GFP (line OEX-FSB1-GFP-58) ובמקביל מצמחי ביקורת שאינם מותמרים, ונוגדנים כנגד GFP שישמשו להשקעת הכרומטין. כל ניסוי נעשה בשלוש חזרות ביולוגיות שבסיומן נתקבל דנא שהורחף ב- 30 μ L. ניסויי זה נערך שלוש פעמים. מערכת ניסויים שניה נעשתה באופן דומה הפעם הושו עליו קויים טרנסגנים המבטאים ביתר את גן המקדד ל- FSM1 לעומת צמחי ביקורת, כאשר ההשקעה בוצעה בעזרת נוגדנים פוליקלונאליים (שהוכנו בחברת Genescript) כנגד פוליפפטיד של 14 ח"א מתוך החלבון FSB1 . ד.ג.א. שהושקע עם הנוגדנים הללו, יאפשר לזהות ביתר ודאות אלו מהרצפים שיתגלו בהשקעה עם נוגדנים ל-GFP הם אכן מטרה מיידית אמיתית המבוקרת על-ידי רשת גנים זו. במערכת ניסויים שלישית הנוגדן ל-FSB1 שימש להשקעת כרומטין מהיפוקוטיילים של קו טרנסגני המבטא ביתר את גן המקדד ל- FSM1 לעומת היפוקוטיילים של צמחי ביקורת. משניים מהניסויים בהם ההשקעה בוצעה עם נוגדן כנגד GFP ומניסוי אחד של השקעה עם הנוגדן למעקובת מתוך החלבון FSB1 הוכנו סיפריות לריצוף עמוק (סה"כ 6 ספריות). הספריות מכל אחד מהניסויים הוכנו מ- 30 μ L של דנא שמקורם בצרוף 10 μ L מכל אחת משלוש החזרות הביולוגיות (10 μ L x3) כאשר 20 μ L הנתרים ישמשו לאימות האתרים שיוצרו ע"י אנליזה ביואינפורמטית של הרצפים שהעלה הריצוף העמוק (נעשה ריצוף חד-כיווני באורך 50 בסיסים). האנליזה הביואינפורמטית (נעשתה ע"י W. Ouma ממעבדתו של E. Grotewold) הצביעה על 1034 אתרים עם יצוג מועשר באופן מובהק בספריות שהוכנו מהצמחים המותמרים. 50 האתרים שהופיעו ברמת ההעשרה הגבוהה ביותר (עפ"י signal Value) ממוקמים בקרבת 74 גנים (נבחרו רק כאלו שנמצאים במרחק עד 5000 בסיסים משני צדי אתרי התחלת שיעתוק של גנים) (טבלה 1). על פי ההגדרות (האנוטציות) הקיימות עבור גנים בעגבניה, 34 מהם מוגדרים כבעלי פונקציה לא ידועה (unknown protein). מבין האחרים מעניין לציין גנים המקדדים לפקטורי שיעתוק, גנים המעורבים בחלוקת התא, גן SAUR המושרה ע"י אוקסין, וכן מספר גנים המקדדים לאנזימים ובהם פוספוטאזות וקינאזות. אימות האתרים הללו באמצעות מבחני CHIP-qPCR על דוגמאות הדנא בחזרות השונות משני ניסויי ה-CHIP עדין לא נעשה. אבל חשוב לציין, שבחנו האם יש העשרה לאזורי הפרומוטר הכוללים אתר I-box של מי מהגנים ממשפחת ה- RUBISCO שהודגמו בעבר כאתר המטרה של MYBI במערכת in-vitro (Rose et al 1999), ולא מצאנו כל העשרה לאזורי הפרומוטר של אף אחד מהם. במידה וגנים אלו כן מבוקרים ע"י MYBI, יתכן ובעלים הצעירים חלבון זה אינו מקושר ל- FSB1 ולכן לא נמצא ייצוג מוגבר של אתרים בתנאי הניסוי.

5) בחינת היחסים בין הגנים הנחקרים לאוקסין: מכיוון שאוקסין ממלא תפקיד חשוב בבקרת חלוקה וגדילת תאים יצרנו מכלואים בין צמחים המבטאים ביתר SIFSM1 לבין צמחים מדווחים לרמות אוקסין (DR5-YFP), (זרעים מהקו M82 מותמרים ל- DR5-YFP ששימש כהורה בהכלאות, התקבלו בתודה מפרופ' נעמי אורי, הפקולטה לחקלאות, האוניברסיטה העברית). כפי שמוצג בתמונה 9, בצמחי המכלוא הטרנסגנים רמת הזהירה של הגן המדווח

YFP שנמצא תחת בקרת הפרומוטר DR5 נמוכה מאשר בצמחי הביקורת המקבילים. יש לציין שההבדלים הללו הם דינאמיים, ומשתנים עם התפתחות הצמחים. ההבדל הברור ברמת הזהירה בקצות השרשים נעלם בהמשך התפתחות הנבטים לעומת זאת ההבדלים נראים ברורים מספר ימים מאוחר יותר בפרימורדיות העלים המתפתחים. רמת הזהירה בשחלות לפני אנטזיס ובשחלות של פרחים פתוחים מצביעה אף היא על רמת זהירה נמוכה יותר בשחלות המכלוא הטרנסגני. מעניין לציין שאחד הגנים שעלו כאתר מטרה מאנליזת ה-CHIP-SEQ הוא Solyc10g054760.1 המקודד ל- Auxin-induced SAUR-like protein (טבלה 1). מעניין יהיה לבחון את ההשפעה של ביטוי ביתר של כל אחד מחברי הקבוצה FSM1-FSB1-MYBI, על רמת הביטוי שלו ושל גנים אחרים המושרים ע"י אוקסין.

6) אנליזת in-situ של שלד ה- Microtubulin בצמחים המבטאים ביתר את הגן FSM1

מאחר ומצאנו שביטוי ביתר של הגן SIFSM1 פוגע בהתארכות התאים, ובמיוחד בהתארכות התאים בעלי הפוטנציאל הגבוה ביותר להתארך, דוגמת אלו השוכנים בחלק האמצעי של ההיפוקוטיל וברקמת הפריקרב של הפרי, בשכבות התאים הממוקמות פנימה לרדיוס בו ממוקמים צינורות ההובלה (Machemer et al 2011), ומכיוון שקיימים דיווחים בספרות המצביעים על חשיבות הדינמיות וכיוון ההרבצה של סיבי שלד המיקרוטובולין בקביעת כיוון הגדילה של התאים (Wasteneys et al 2009), החלטנו לאפיין את מבנה שלד סיבי המיקרוטובולין ברקמות ושכבות התאים שבשלב קודם של המחקר מצאנו שהם המושפעים ביותר מביטוי ביתר של החלבון FSM1. הפרוטוקול שיושם בהצלחה עבור ארבידופסיס (Chaimovitch et al 2012) נמצא לא מתאים לרקמות עגבניה, ועל כן הושקע מאמץ בהתאמת הפרוטוקול כך שיתאים להיפוקוטיילים ופירות עגבניה (כולל שינוי זמני מצרציה, ריכוז האנזימים, משטרי אינקובציה ושטיפות). בתמונה 10 מוצגים הממצאים הראשונים שנתקבלו מאנליזת תת-פסיגים שנקצרו מצמחים שגודלו בתערובת קרקע. התמונות מראות בבירור שתאי האפידרמיס במרכז ההיפוקוטייל של צמחי הביקורת ארוכים מאלו של הצמחים המותמרים. אולם השערת העבודה שההבדל הזה ישתקף גם בכיווניות סיבי המיקרוטובולין בשלב זה של התארכות ההיפוקוטיילים לא התאמתה. שערנו שכיווניות הסיבים בתאים הטרנסגנים תהיה הרבה יותר אלכסונית או אפילו מקבילה לכיוון התארכות הרקמה. אולם כפי שרואים בלוחות התחתונים של זוגות התמונות, למרות שהתאים הטרנסגנים בבירור יותר קצרים ורחבים מתאי צמחי הביקורת, סיבי המיקרוטובולין נראים ממוקמים במקביל לכיוון ההתארכות, לא פחות, ואפילו יותר מאשר בצמחי הביקורת (הפוך ממה שהיה צפוי). אלו הם אמנם הממצאים הראשונים, אבל יש לשקול את האפשרות ששלד האקטין ולא הטובולין מעורב במקרה זה בקביעת השוני בכיווניות גדילת התאים. מעניין לציין שאחד הגנים המוצעים מאנליזת ה-CHIP-SEQ, כמבוקר ע"י הקומפלקס (טבלה 1) הוא Solyc00g023470.1 המקודד ל- Pectinesterase שלו תפקיד חשוב בגדילת התאים (Pelloux et al 2007).

דיון מסקנות והמלצות לגבי יישום התוצאות:

המחקר הזה הרחיב את ההבנה על אופי ההתקשרות בתוך רשת החלבונים FSM1-FSB1-MYBI: בקצרה, ביססנו את הבנת הבסיס להתקשרות האלטרנטיבית של FSB1 עם FSM1 וגם עם MYBI. לשני האחרונים אתר MYB מאד דומה ודרכו מתבצעת ההתקשרות לשניהם. אולם בנוכחות FSM1, FSB1 ממוקם גם מחוץ לגרעין, כך ש-FSB1 משמש כנראה כ"מלכודת" עבורו, מה שכמובן משפיע על יכולתו להתקשר עם MYBI שממוקם בגרעין. לעומת זאת ל-MYBI, שהוא עצמו ממוקם בגרעין (תמונה 5) אין השפעה על המיקום התוך הגרעיני של FSB1 (תמונות 1, 2). מה שמבטיח שבהעדר החלבון FSM1 ההתקשרות ביניהם תתרחש בגרעין. במערכת הומולוגית שנחקרה לגבי חלבוני לוע הארי, הראו בניסויי Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) שהחלבון

DIV (ההומולוג של MYBI) בקומפלקס עם הומולוג של FSB1 נקשר למעקובת דנא סינטטית של רצפי I-box (Raimundo et al 2013), מה שהוצע בעבר כרצף אליו נקשר MYBI בפרומוטר של הגנים המקודדים ל-RUBISCO (Rose et al 1999). כאמור בניסויי CHIP-qPCR שערכנו בעגבניה לא מצאנו כל עדות להתקשרות in vivo של קומפלקס הכולל את החלבון FSB1 אל אף מעקובת של פרומוטרים של RUBISCO שמכילה את אתר ה-I-box. מבחני ה-Western של חלבונים שהופקו לאחר אגרואינפילטרציה, מציעים תפקיד לאתר ה-extDUF3755 בבקרת יציבות החלבון FSB1 (תמונה 4). בהמשך צריך יהיה לברר כיצד ובאלו תנאים האתר הזה משפיע על יציבות / תפקוד החלבון.

השאלה המרכזית שהמחקר נועד לברר היא, האם ההתקשרות בין MYBI ל-FSB1 מביאה לכך שפקטור השיעתוק MYBI פעיל או חסום. לדוגמא, באנלוגיה לקשירת AUX/IAA לחלק מחברי משפחת ה-ARF, Guilfoyle et al (1998, Hayashi 2012). לאחר שהראנו שיש ל-FSB1 העדפה לקשירה עם FSM1 ושביטוי ביתר של FSM1 מעכב את התארכות התאים (Machemer et al 2011), ובהנחה הסבירה שביטוי ביתר של MYBI מביא למצב שיש בתאים כמות עודפת של החלבון, נראה שלפחות לגבי בקרת תהליכים הקשורים להתארכות תאים, המצב "החופשי" מקישור הוא הפעיל ומוביל לעיכוב התארכות התאים (תמונות 6-8). מסקנה זו עולה מהמצאים ההיסטולוגיים שהראו עיכוב בהתארכות תאי האפידרמיס בהיפוקוטילים, ולפי אנליזה לא מלאה, גם בפרי. כלומר כיוון ההשפעה דומה לזה שנמצא בצמחים המבטאים ביתר את החלבון במתחרה FSM1. לפי מודל זה רמה גבוהה של FSM1 תביא לקשירה מועדפת של FSB1 אליו, מה "שמשחרר" את חלבון ה-MYBI לפעילות כמעכב התארכות, מה שחיוני לקואורדינציה של התפתחות רקמות הפרי השונות במהלך השלבים המוקדמים של התפתחות הפרי (Machemer et al 2011). העובדה שעוצמת השינוי הפנוטיפי הייתה יותר מתונה דווקא בביטוי יתר של פקטור השיעתוק עצמו, עשויה לנבוע מכך שחברים אחרים במשפחת ה-MYBI (המונה 7-9 חברים בעגבניה) הם שחקנים יותר חשובים בעיכוב התארכות התאים, וביטוי ביתר של FSM1 משחרר אותם מקישור עם FSB1 ו/או הומולוגים שלו ועל-כן מוביל לשינוי פנוטיפי יותר קיצוני. במשותף, אנליזה פנוטיפית של צמחים במבטאים ביתר את החלבון FSM1 או MYBI מצביעה על התפקיד של רשת זו בקרת התארכות תאים, ובכך מהווה חלק ממנגנון הבקרה של התפתחות הצמח בכלל והפרי בפרט. עם זאת, יתכן שלא בכל התנאים ובכל הרקמות זהו כיוון פעילותו של MYBI. כיווני בקרה שונים ע"י אותו גורם שיעתוק בעקבות השתתפות בקומפלקסים שונים מתואר בספרות (לדוגמא Chinenov & Kerppola 2001). הממצא המפתיע של גדילה מהירה מאד של נחשוני האבקה הטרנסגניים בהשוואה לאבקה מצמחי הביקורת (תמונה 11), מצביע על האפשרות שבהקשרים מסוימים ו/או ברקמות מסוימות הוא יכול לפעול דווקא כמעודד התארכות תאים. אמנם רוב המחקרים הראו שהפרומוטר 35S CaMV לא מתבטא בתאי האבקה, ואזי ההסבר הזה נדחה, אלא אם כן בכל זאת יש ביטוי נמוך של פרומוטר זה באבקה, כפי שדווח לעיתים בספרות (Szwacka et al 2009, and references therein).

כדי לקבל באופן ישיר ולא מוטה תמונה רחבה של הגנים המבוקרים באופן ישיר ע"י קבוצת החלבונים FSM1-FSB1-MYBI, הוחלט לותר על חקר אפשרות האינטראקציה של בקרים אלו עם הבקרים מקבוצות Ovate ו- TALE ולנקוט בטכנולוגיה של CHIP-SEQ, שהיא "הדרך הארוכה-הקצרה". התאמת הפרוטוקולים עד לקבלת הפקה טובה של דנא מעלים צעירים של צמחי עגבניה בוגרים, באופן הדיר, דרשה שינויים שונים ולכן ערכה די הרבה זמן. למרות זאת הצלחנו להשלים ששה ניסויי CHIP ומתוך שלשה מהם הוכנו שלושה זוגות ספריות שרוצפו ואיפשרו ביצוע אנליזה ביו-אינפורמטית שהצביעה על כ-1000 רצפי דנא שהושקעו עם נוגדנים כנגד GFP באופן

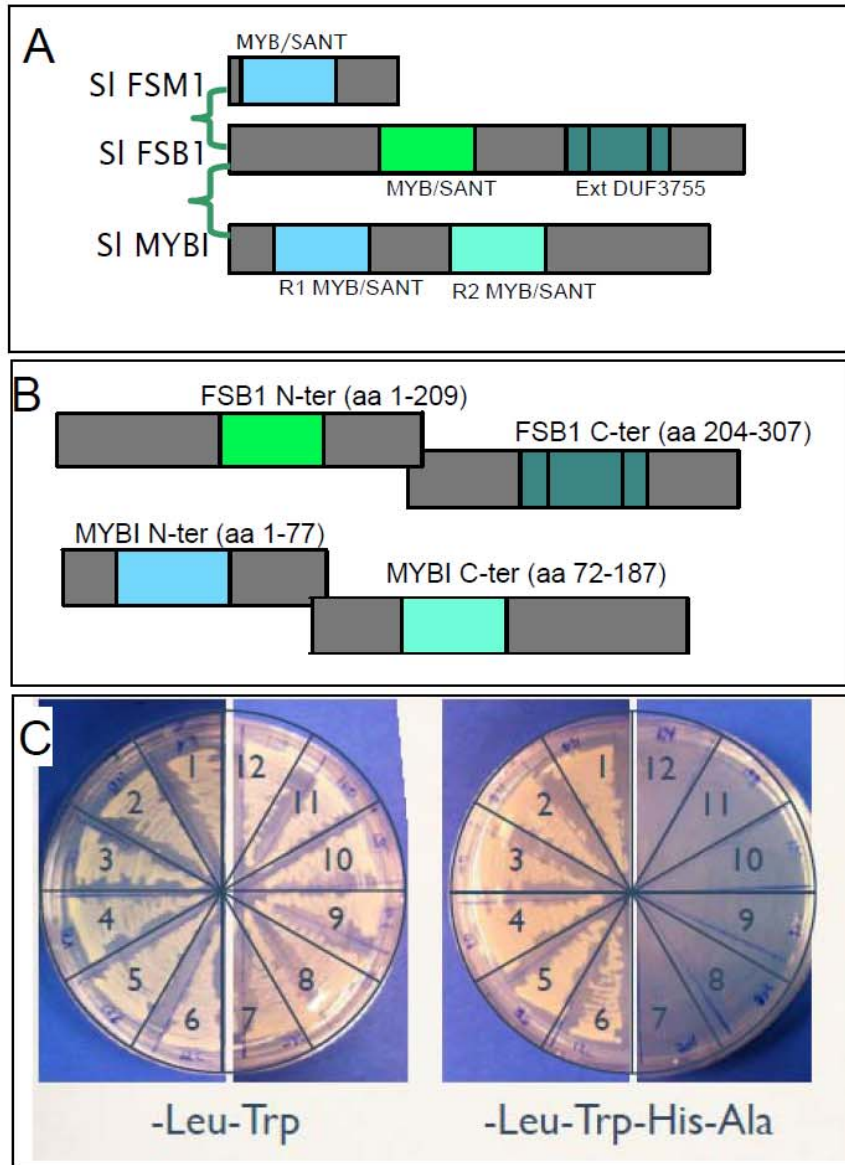
מועשר מהכרוםטין שהופק מעלי צמחים המבטאים ביתר את הגן FSB1-GFP, כלומר אלו רצפים אליהם קשורים קומפלקסים המכילים את החלבון FSB1 (רשימה חלקית מוצגת בטבלה 1). מכיון שהאנליזה הביואינפורמטית מבוססת על שני ניסויים בלתי תלויים שנערכו כל אחד בשלוש חזרות ביולוגיות, הסבירות גבוהה שחלק מהאתרים המועמדים שהתקבלו הם אכן אתרי-מטרה אמיתיים. ניתן יהיה להצביע על גנים וודאיים כאלו רק לאחר האימות של אתרים מועמדים באמצעות אנליזת CHIP-qPCR, שיבוצעו על דוגמאות הד.נ.א. שהתקבלו מניסויי ה-CHIP השונים. חלק זה יושלם רק לאחר מועד הדיווח, אבל לא חסר כל חומר ניסויי הדרוש להשלמתו הקרובה. המלצות להמשך המחקר:

1. השלמת ניסויי ה-CHIP-qPCR

2. האנליזות הפנוטיפיות של צמחי OEX-MYBI, בהשוואה לצמחי OEX-FSM1, מצביעות על כך שברור מקיף של הפונקציות הביולוגיות המבוקרות ע"י רשת זו דורשת לבחון את ההשפעה של השתקה בו-זמנית של מספר חברים ממשפחת ה-MYBI. רק מודיפיקציה כזו תגדיל את הסיכוי לקבל שינוי פנוטיפי ברור. היום עם פיתוח טכנולוגיות ה-gene editing באמצעות מערכת ה-CRISPR (Bortesi & Fischer 2014) ניתן יהיה לקבל בקלות ובמהירות צמחים כאלו.

פרוט מלא של הפרסומים – אין עדין

תמונה 1: אנליזה Y2H לזיהוי האתרים השמורים שמעורבים באינטראקציה הפיסית בין FSB1 לבין MYBI.

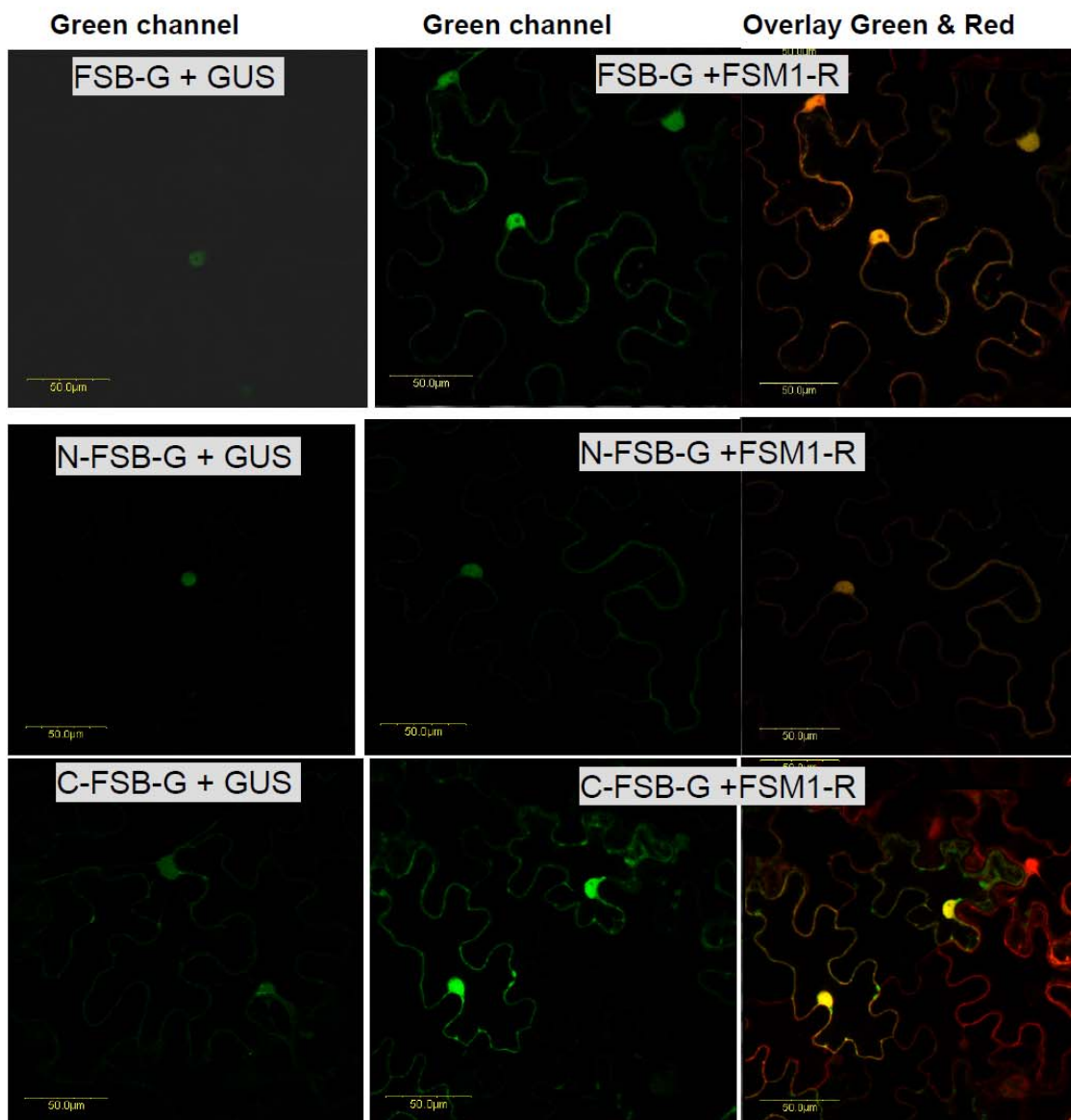


	-L, -T	-L, -T, -H	-L, -T, -H-A	Remarks
SIMYBI-Nter + SI FSB1 FL (1-3)	+++	+++	+++	Shown in Panel C
SIMYBI Nter + SI FSB1 Nter (4-6)	+++	+++	+++	
SIMYBI Nter + SI FSB1 Cter (7-9)	+++	-	-	
SIMYBI Nter + SI FSM1 (10-12)	+++	-	-	
SIMYBI Cter + SI FSB1 FL	+++	-	-	Data Not shown
SIMYBI Cter + SI FSB1 Nter	+++	-	-	
SIMYBI Cter + SI FSB1 Cter	+++	-	-	
SIMYBI Cter+ SI FSM1	+++	-	-	

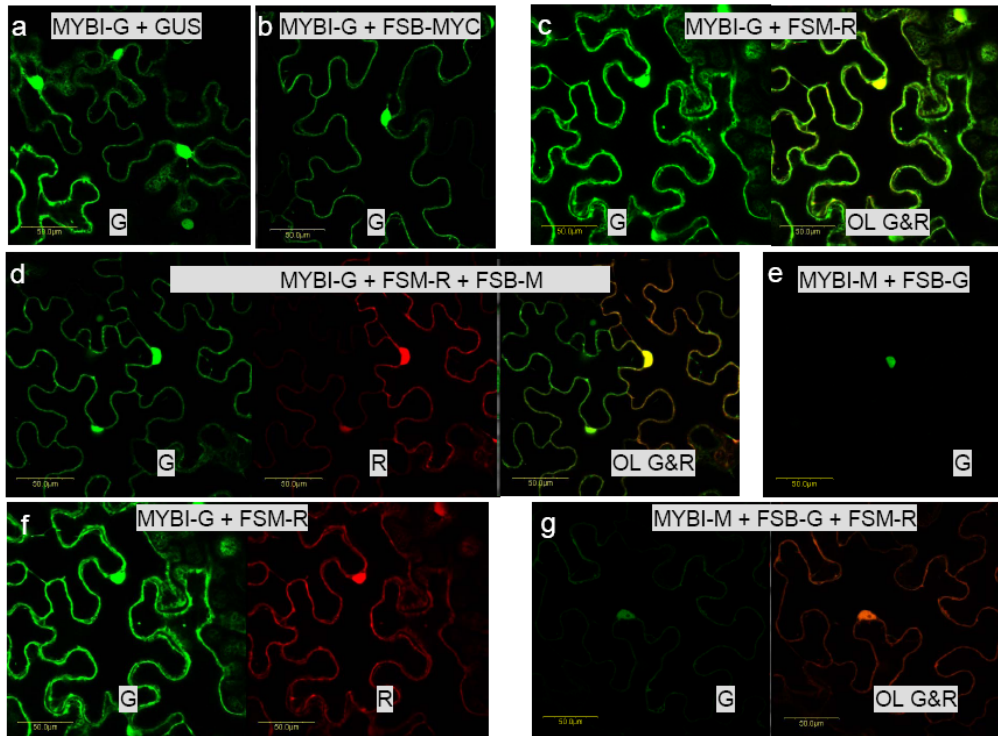
תמונה 2: אנליזה קונפוקאלית לזיהוי חלקי החלבון FSB1 המעורבים בקביעת מיקומו בגרעין ושינוי הפיזור התוך תאי בנוכחות FSM1 (לוה A) אך לא בנוכחות MYBI (לוה B). התמונות צולמו 72 שעות לאחר אגרואינפילטרציה של חיידקי אגרובקטריום מותמרים לפלסמידים המבטאים את צרופי הגנים הכימראליים המצוינים בלוחות השונים לעלי טבק (N. benthamiana). בלוה A התחתון ביותר מצויינים האתרים השונים של FSB1 הנחקרים. מקרא

מקרא : = MYBI-G =MYBI-GFP, MYBI-M= MYBI-MYC, FSM-R = FSM1-Red-FP, FSB-G =FSB1-GFP, FSB-M= FSB1-MYC
 G=green channel, R=red channel, OL G&R= overlay of green & red channels

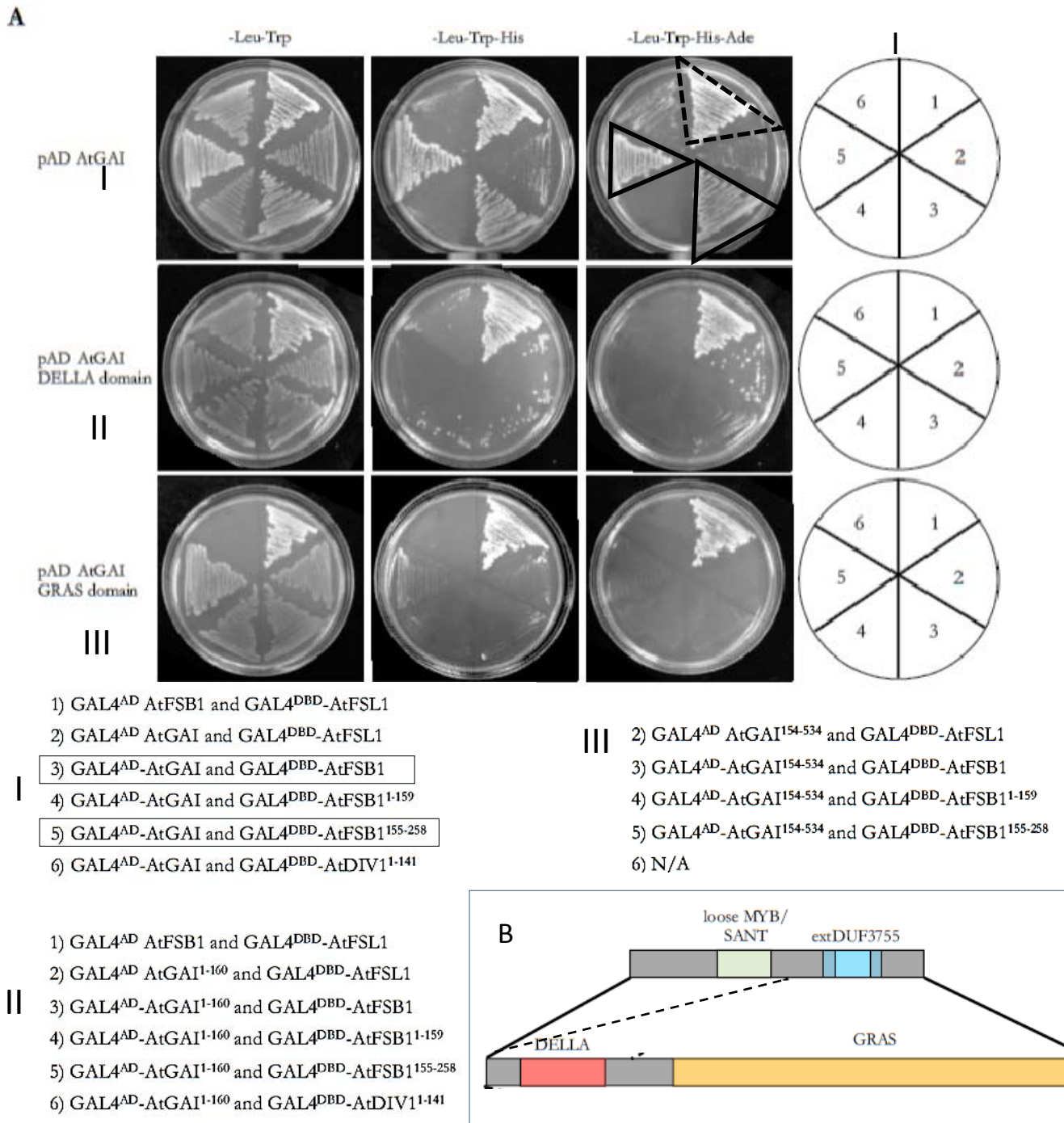
לוה A:



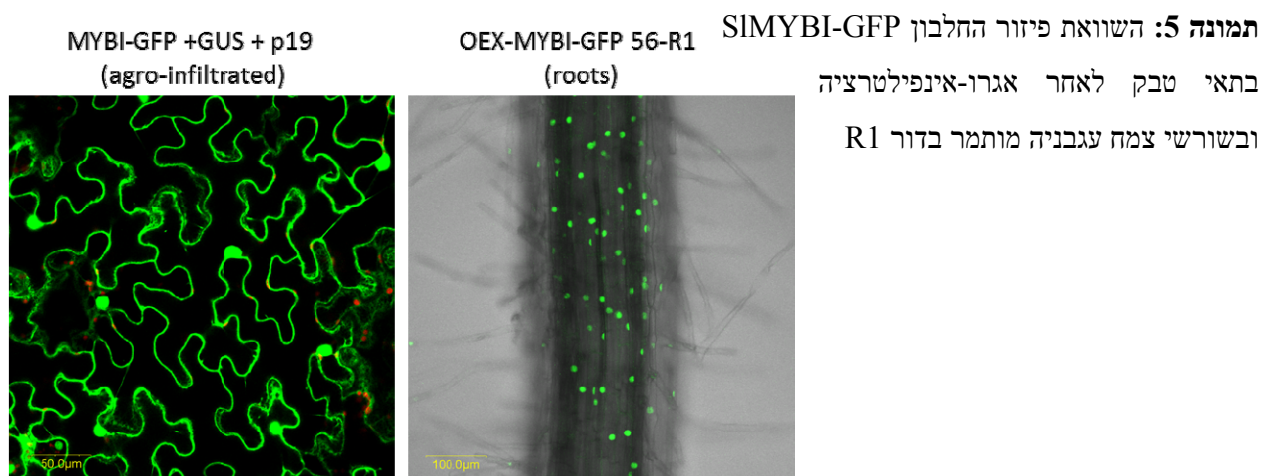
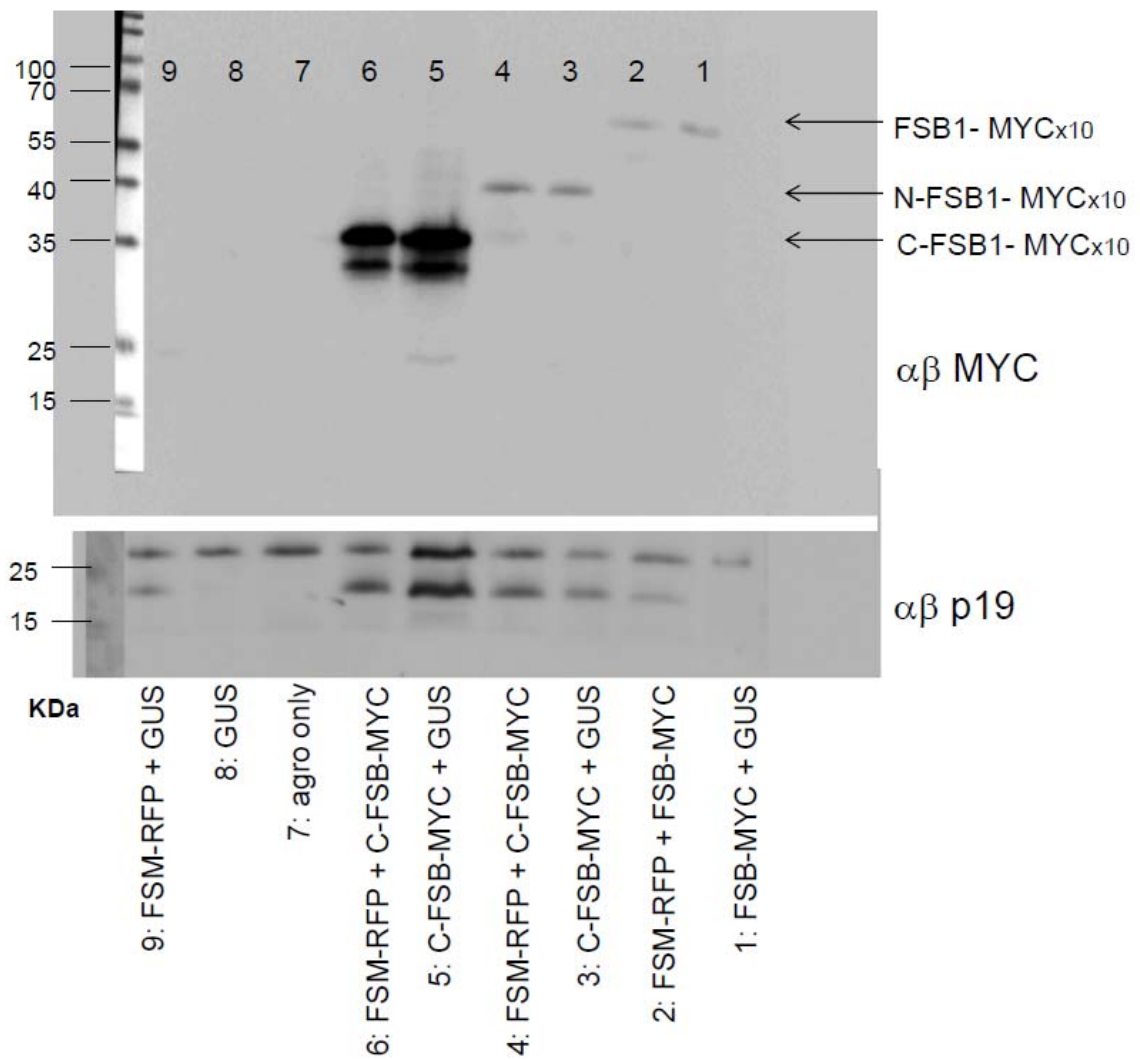
<p>N-FSB1-GFP (aa 1-207)</p>	<pre>MEMVAGSNTGFHHQSLSTQSCAIGSSSSRMMLMCNYYSSLGQVNTVNVNNGGRCMLY SGNP:SVITSGVRSSSNPGMSQSCSCSSSPLTDSVPGKHDITGAVEWTVEEQYKLEDE GLIKFANEPSIMKYIKIAASLRDKTVRDVALRCRWMTKRRKQEDYNLCKKVKDRKE KSAEVPVKAQSSSALPLSTIPNSLSKRYRQHGQVTPSA-GFP</pre>
<p>In green: MYB-like In Red: putative bi-partite NLS</p>	
<p>C-FSB1-GFP (aa 204-307)</p>	<pre>DVTPSAALLIITRRHLLEENNQALNQISANLS TVKFQDNINLFI RTRNNITAILNDRNMPG IMSQMPPLPVLLNEELA SSVLPSTTQDMMP ASTSGIQLKQEPGC-GFP</pre>
<p>In blue: extDUF3755</p>	



תמונה 3: עדות להתקשרות בין חלבון AtGAI ל-AtFSB1FSB1 במערכת Y2H. A) רק חלבון AtGAI, שלם יכול להתקשר עם חלבון AtFSB1 שלם או עם האזור ה-C-טרמינאלי שלו (לוחות עליונים I) מספרים 3 ו-5, התקשרות AtFSB1 & AtFSL1 (1) שימשה כביקורת חיובית). B) מודל המראה את האזורים המתקשרים, נראה שגם אתר ה-DELLA וגם אתר ה-GRAS נחוצים לשם ההתקשרות של AtAGI עם AtFSB1 (אין התקשרות בלוחות II, III).

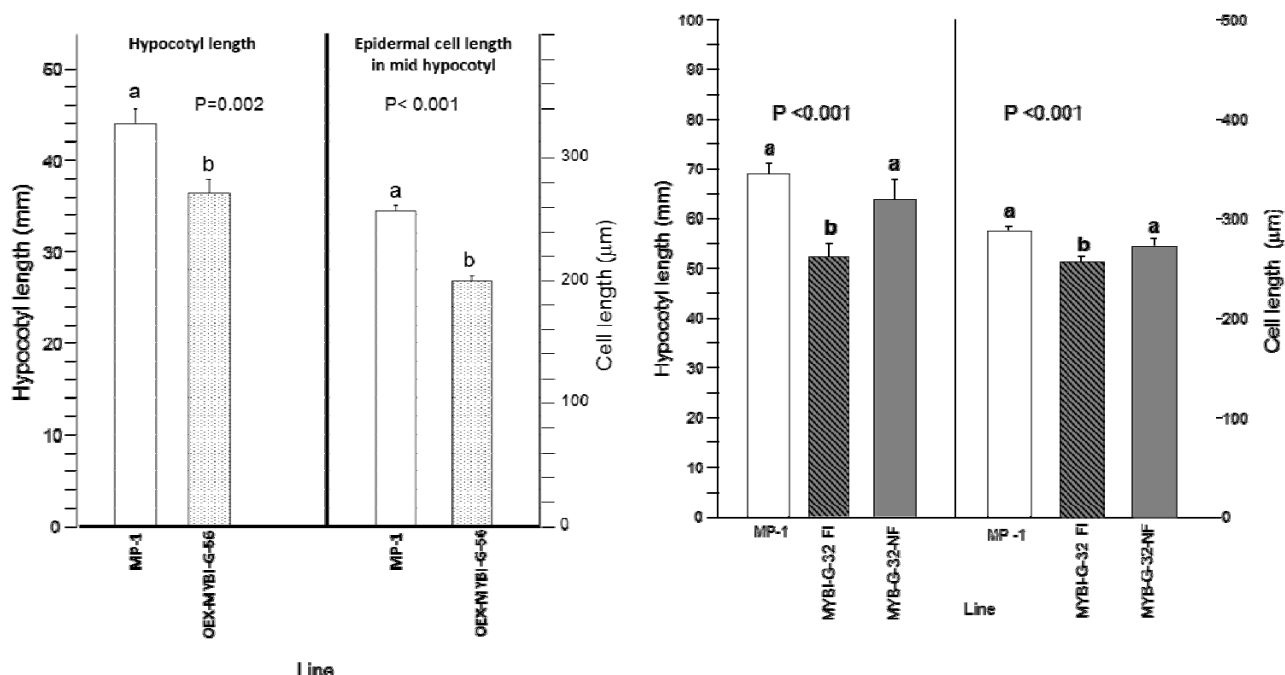


תמונה 4: אנליזה להערכה כמותית של החלבון SIFSB1 השלם ושל גרסאות מקוטעות שלו (המתוארות בתמונה 2) בעלי טבק לאחר אגרו-אינפילטרציה של צרופי הפלסמידים המצויינים עבור כל ערוץ. כל ההזרקות נעשו בתוספת p19 לעיכוב השתקת הגנים הזרים.

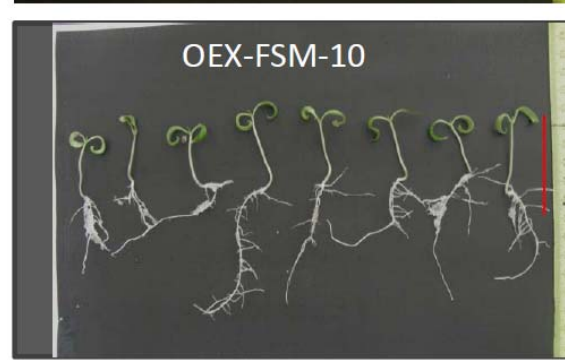
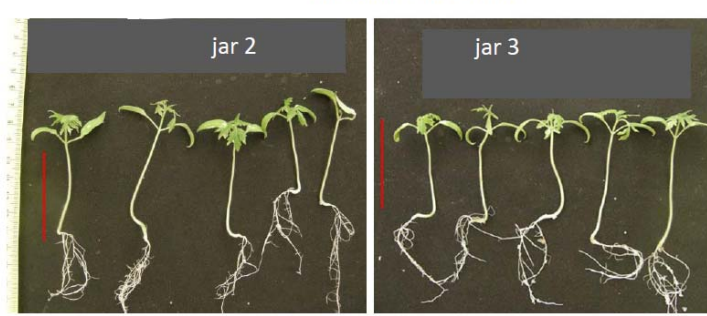


תמונה 6: השפעת OEX-MYBI-GFP על התארכות היפוקוטילים, ותאי האפידרמיס במרכז ההיפוקוטייל.
 לוח עליון שמאלי: ההיפוקוטילים של הצמחים הטרנסגניים (עפ"י זהירות השורשים) מהקו OEX-MYBI-GFP-56-R1 קצרים במובהק ותאי האפידרמיס במרכז ההיפוקוטייל (נדגמו ב-1 ס"מ האמצעי) קצרים במובהק מאשר בקו ההורה MP-1. הנבטים גדלו בצננות זוכית מאוררות ע"ג glass beads טבולים מצע נוזלי (1/2MS+1.5% sucrose) במשך 10 ימים. (הניסוי נעשה ב-3 חזרות, 5 נבטים בכל צננות).

לוח עליון ימני: ניסוי כמו בלוח השמאלי, ניבחו הקו OEX-MYBI-GFP-32-R1. רקע אפור- צאצאים מדור R1 לא טרנסגניים (אין זהירות GFP), רקע אפור ומקוקו- צאצאי R1 טרנסגניים (יש זהירות GFP), הטרנסגניים קצרים במובהק מהביקורת ומאחיהם שאינם טרנסגניים, ותאי האפידרמיס במרכז ההיפוקוטייל קצרים במובהק.
 לוח תחתון שמאלי: תמונות הצמחים שהאנליזה שלהם מסוכמת בלוח העליון הימני. הצמחים נקצרו 14 יום לאחר שזרעם מונבטים במים מהם הציץ השורשון הועברו למצע המתואר למעלה. השפעת הטרנסגן על הפנוטיפ מבחינת התארכות ההיפוקוטייל מובהקת אך מתונה, בהשוואה להשפעת ביטוי ביתר של SIFSM1 (לוח תחתון ימני).



OEX-MYBI-GFP 32-R1



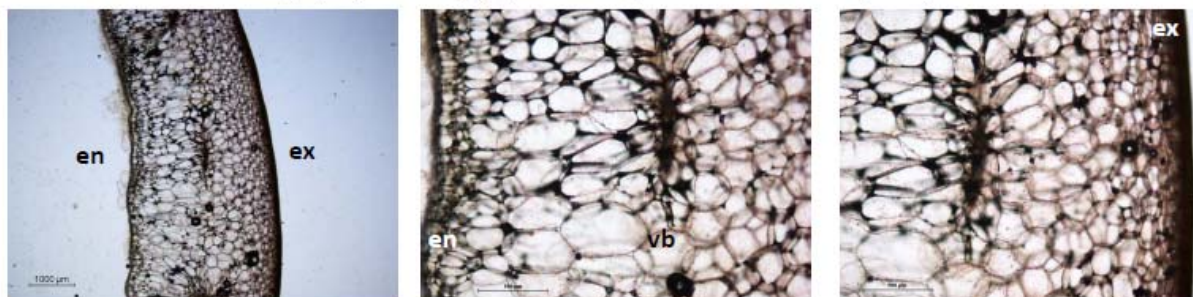
תמונה 7: השפעת OEX-MYBI-GFP על מבנה תאי הפריקרפ, בשלב פרי אדום, כל הפירות נושאי זרעים.
 בתמונה המורכבת הראשונה (לוח א) מושוים פירות ביקורת (MP-1) ופירות מצמחי R1 שונים, כמצויין בראש כל שורת תמונות. ובעלי משקל דומה (כ- 14.2 גרם), בתמונה המורכבת השנייה, (לוח ב) בעלי משקל דומה (כ- 15 גרם), בתמונה המורכבת השלישית, (לוח ג') בעלי משקל דומה (כ- 17.5 גרם), נראה שברוב הפירות הטרנסגנים התאים באזור שפנימה ל- VB, כלומר לכיוון ה- en, פחות מאורכים ויותר עגולים מאשר בפירות הביקורת, אבל ההשפעה לעומת פרי הביקורת מתונה.

מקרא:

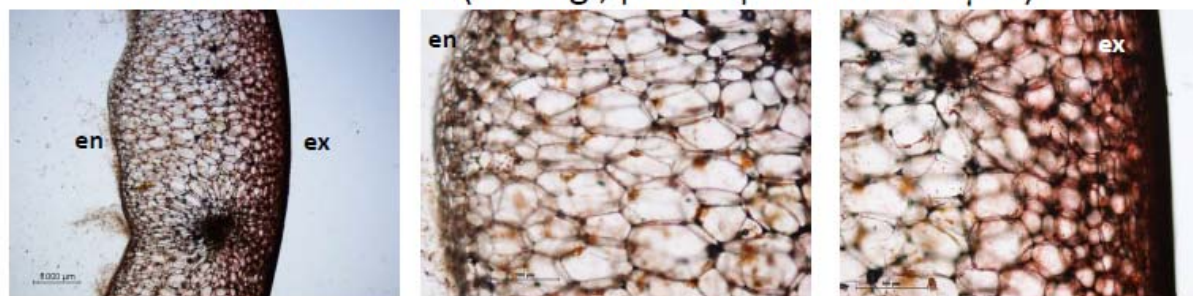
En- internal side of the pericarp (endodermis), Ex- externalside of the pericarp (exodermis), vb-vascular bundles

לוח א:

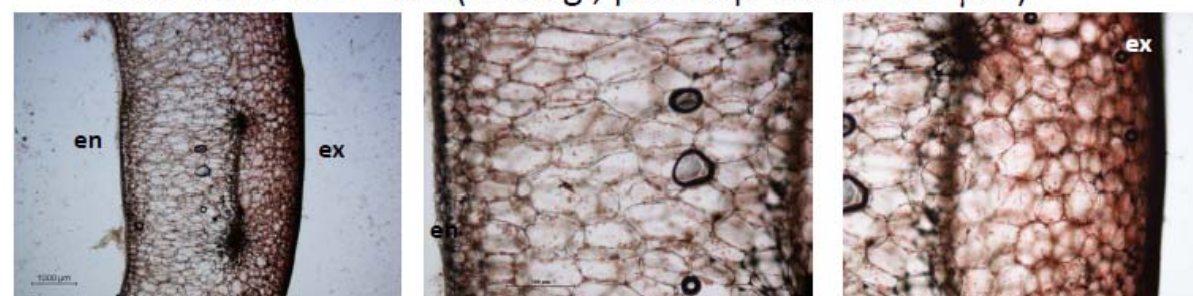
MP-1(2) (14.13g , pericarp width 3488 μm)



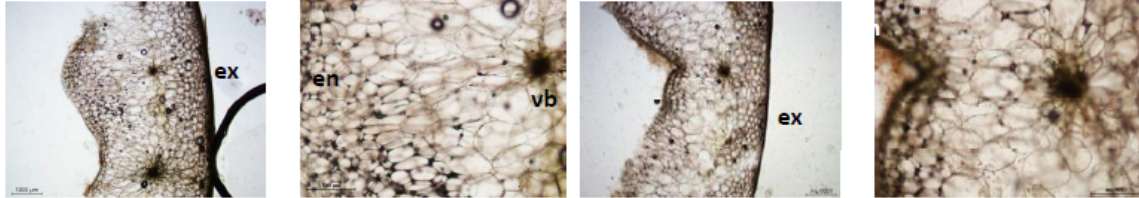
OEX-MYBI-GFP-40-9 (14.21g , pericarp width 4070 μm)



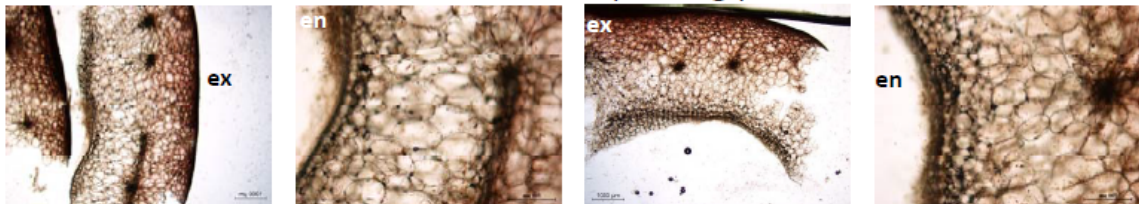
OEX-MYBI-GFP-40-1 (14.89g , pericarp width 4184 μm)



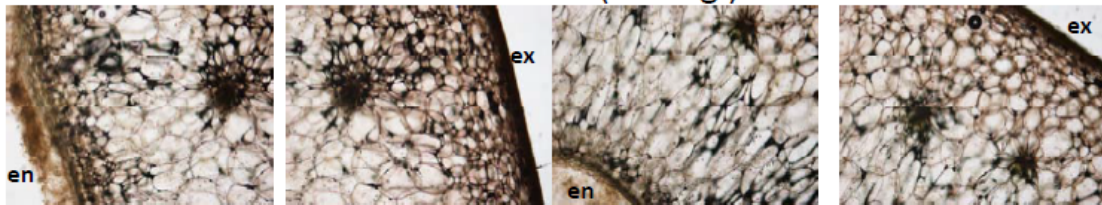
MP-1 (3) (15.16g)



OEX-MYBI-GFP 32-8 (15.33g)



OEX-MYBI-GFP 32-8 (14.93g)



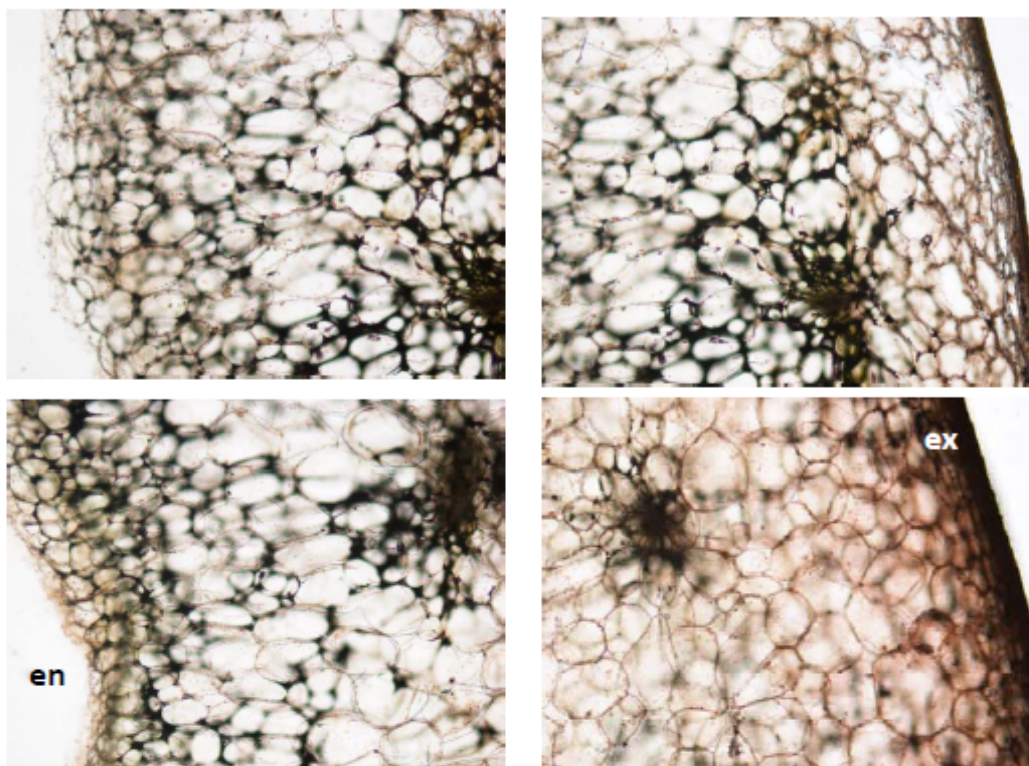
OEX-MYBI-GFP 32-3 (15.15g)



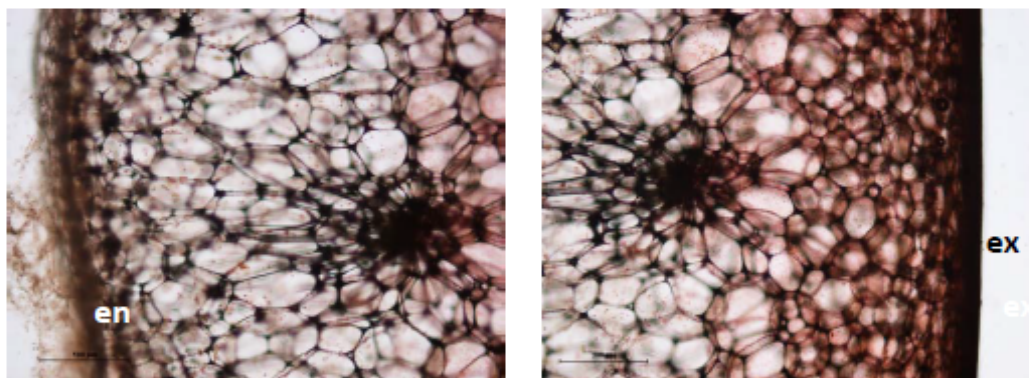
OEX-MYBI-GFP 33-3 (14.95g)



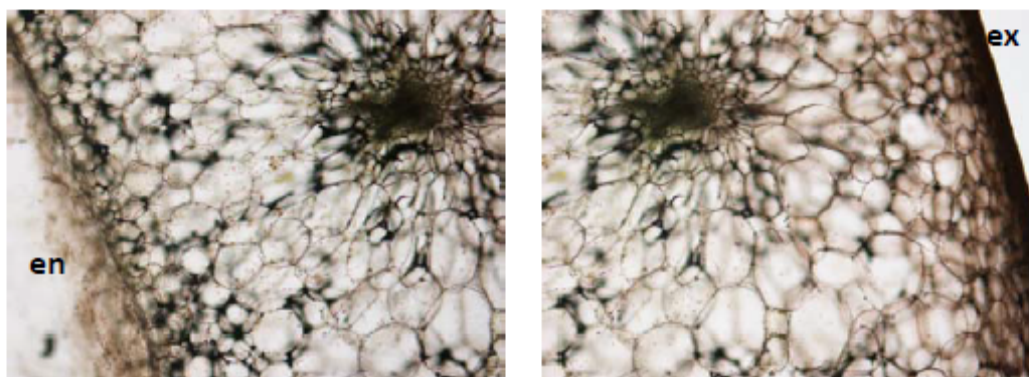
MP-1(5) (17.32g)



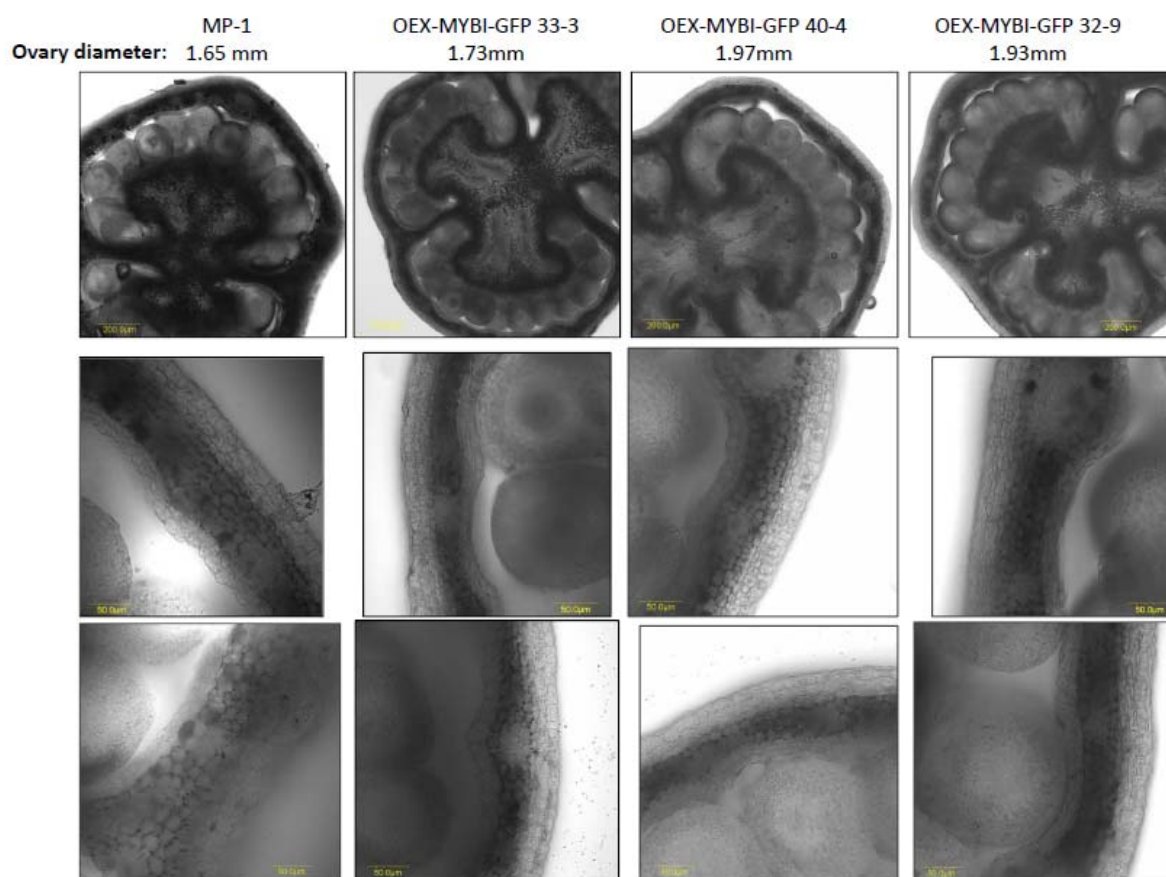
OEX-MYBI-GFP 40-1 (17.56g)



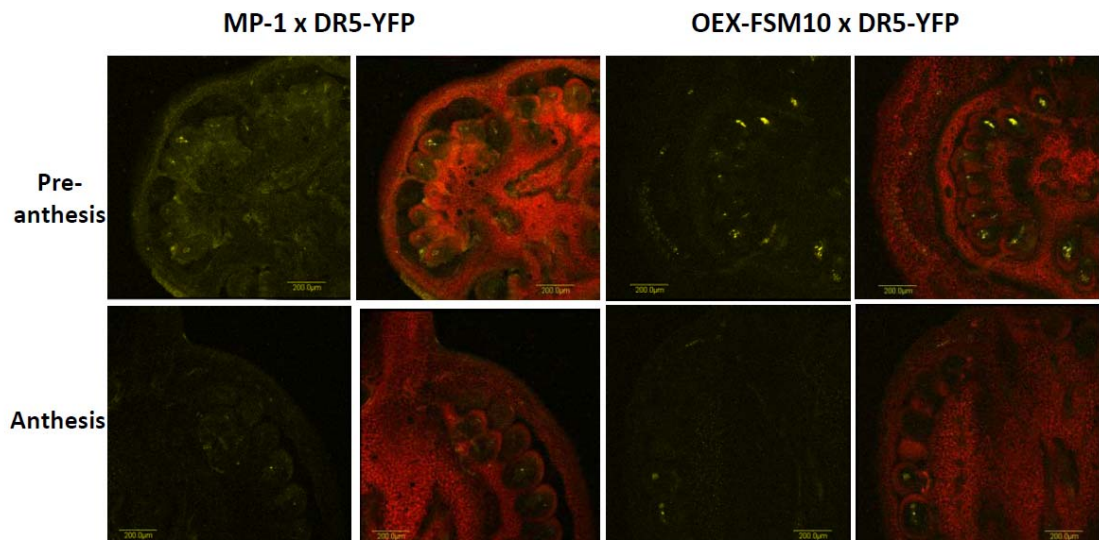
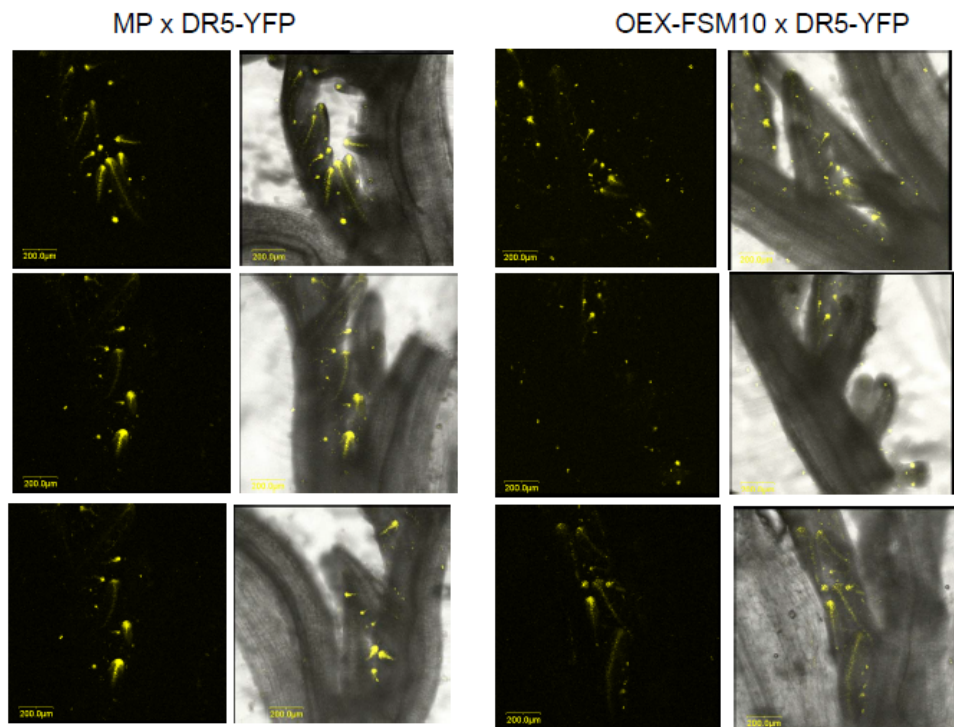
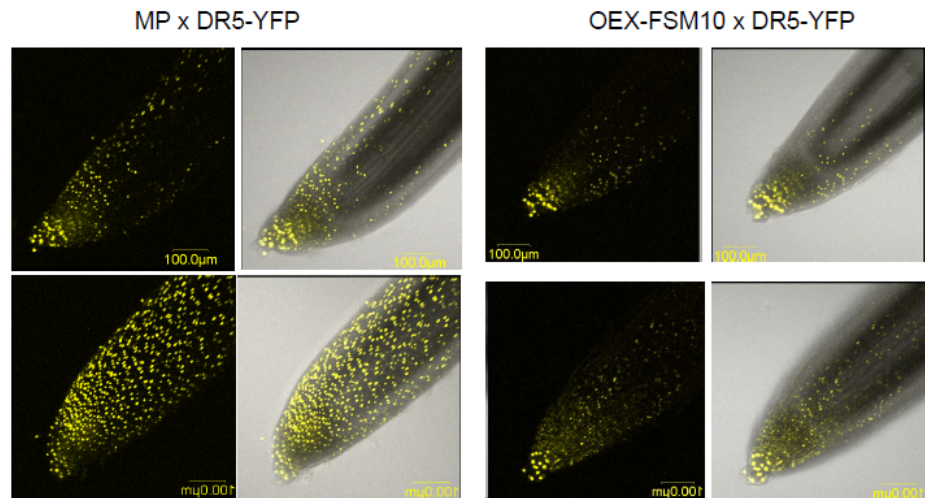
OEX-MYBI-GFP 33-3 (17.46g)



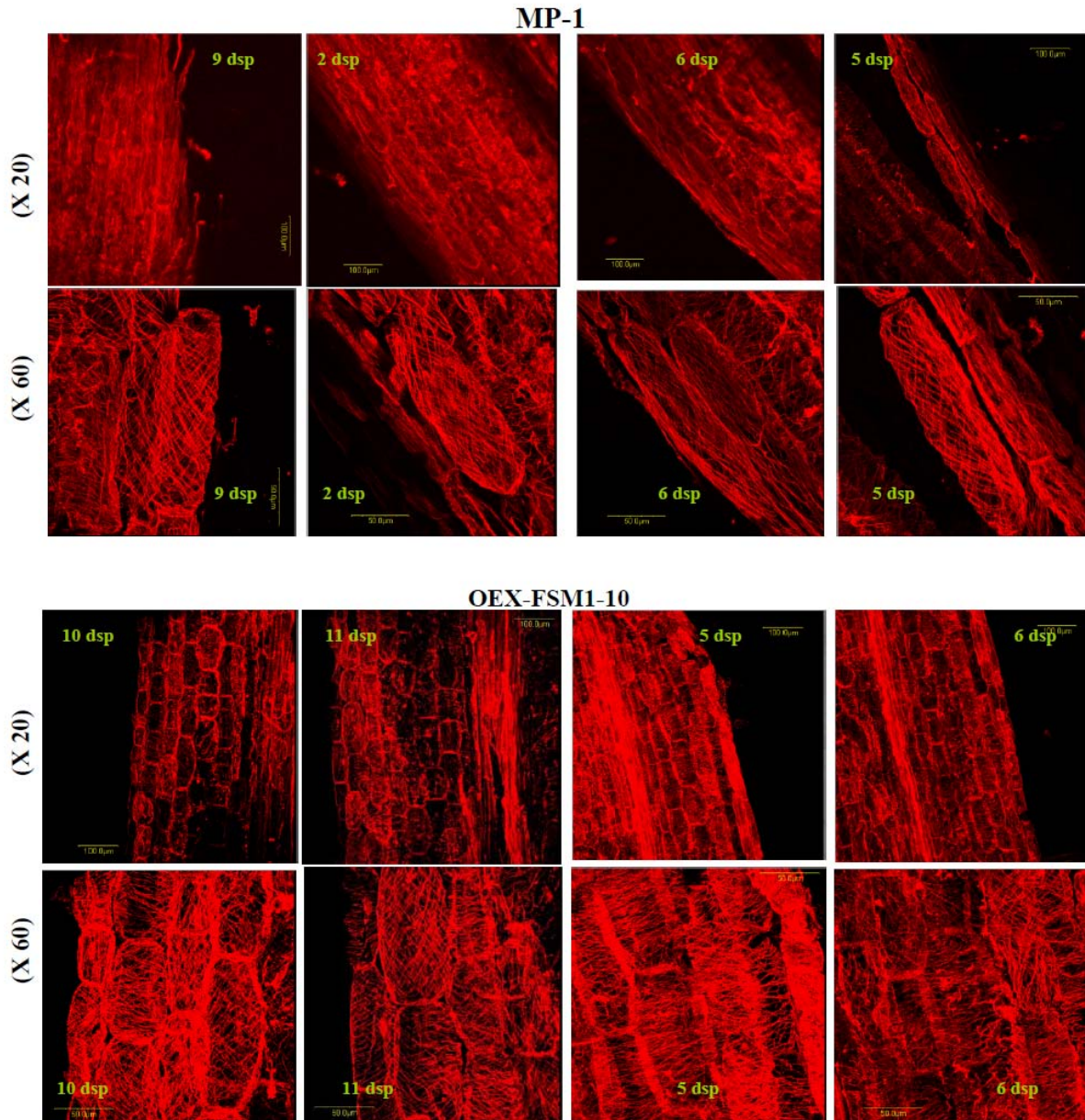
תמונה 8: השפעת OEX-MYBI-GFP על רוחב הפריקורפ, בשחלות של פרחים פתוחים.



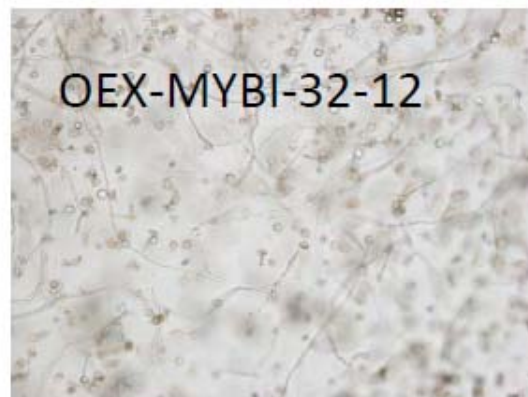
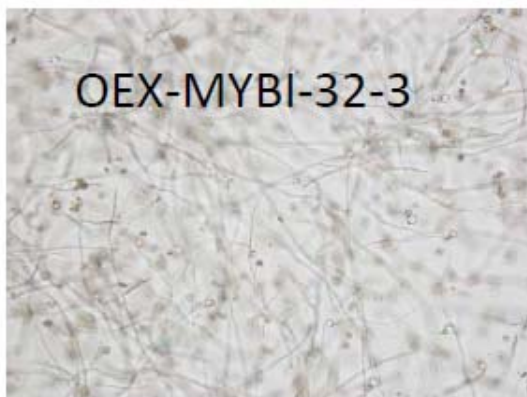
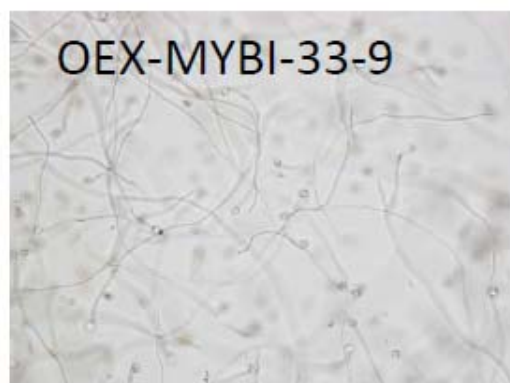
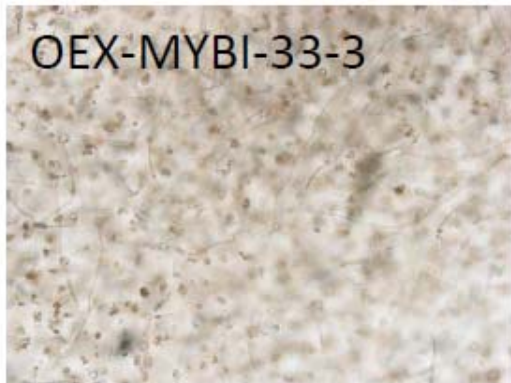
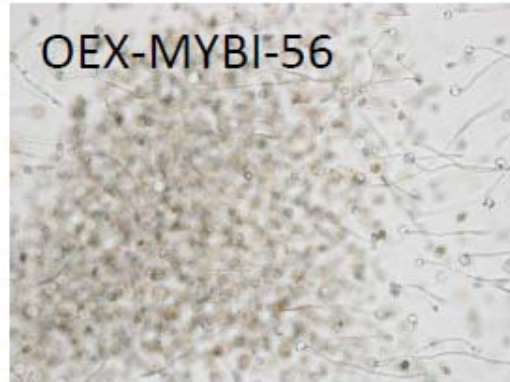
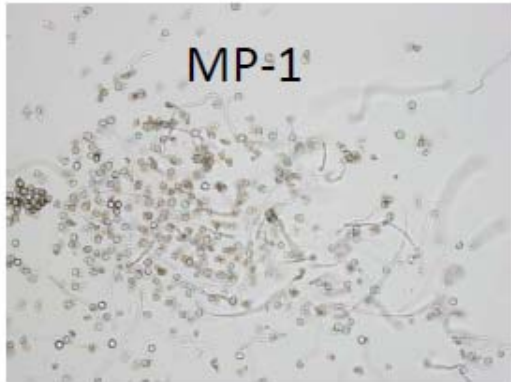
תמונה 9: ביטוי הגן המדווח לאוקסיין DR5-YFP במכלוא עם קו הביקורת ובקו הטרנסגני OEX-FSM-10. לוח עליון - קצוות שרשים של נבטים שצולמו 10 ימים לאחר הנבטה סטרילית במים, לוח אמצעי-עלים במריסטמה קודקודית צולמו 17 ימים לאחר הנבטה הזו, לוח תחתון-שחלות בשלב pre-anthesis (מפרה סגור) ומשלב פתוח.



תמונה 10: הדמיית שלד המיקרוטובולין של תאי אפידרמיס בחלק האמצעי של היפוקוטילים של צמחים המבטאים ביתר FSM1 (OEX-FSM1-10) בהשוואה לצמחי ביקורת MP-1. הצביעה נעשתה באמצעות הגבת מקטעי היפוקוטיל מקובעים עם α -MT antibodies conjugated to Alexa fluor 555, RFP והאנליזה קונפוקאלית. האנליזה נעשתה על היפוקוטילים של צמחים שגודלו בתערובת קרקע ונדגמו 12 יום לאחר הזריעה. עבור כל קו, זוגות תמונות המלוות באותו מספר dsp צולמו באותו אזור של התמונה, כאשר הלוח העליון צולם בהגדלה נמוכה (20 X) והלוח התחתון בהגדלה גבוהה (60 X) להדגמת כיוון סיבי שלד המיקרוטובולין בתאי האפידרמיס באותו אזור.



תמונה 11: נביטת אבקה והתארכות הנחשונים מצמחי OEX-MYBI-GFP בהשוואה להורה MP-1, האבקה נאספה והונבטה בתמיסת הנבטה באותו יום מצמחים שונים שגודלו באותה חממה.



טבלה 1: גנים המטרה המוצעים מניסויי ה-CHIP-SEQ בקרבכם נקשר החלבון FSB1, עפ"י השוואת האזורים המועשרים בספריית הריצוף מהעלים של צמחי EX-FSB1-GFP בהשוואה לספרייה מעלים של צמחי ביקורת. מוצגים 74 הגנים המוצעים ע"י 50 האזורים שקיבלו את ערכי ה- signal value הגבוהים ביותר. 34 מהם מוגדרים עדין כ- unknown protein.

Signal Value	pValue	qValue	targetGene	annotation
7.52803	10.6140	4.8080	Solyc09g056330.1	Unknown Protein (AHRD V1)
7.52803	10.6140	4.8080	Solyc09g056300.1	Unknown Protein (AHRD V1)
7.52803	10.6140	4.8080	Solyc09g056310.1	Maturase (Fragment) (AHRD V1 ***- O79414_SOLTU)
7.52803	10.6140	4.8080	Solyc09g056320.1	Unknown Protein (AHRD V1)
7.19865	10.1279	4.4747	Solyc01g014220.1	cDNA clone J075118M20 full insert sequence (AHRD V1 ***- B7F980_ORYSJ); contains Interpro domain(s) IPR006852 Protein of unknown function DUF616
6.95141	9.7764	4.2328	Solyc05g021580.2	Unknown Protein (AHRD V1)
6.95141	9.7764	4.2328	Solyc10g054520.1	FAD-binding domain-containing protein (AHRD V1 ***- D7MMH8_ARALY); contains Interpro domain(s) IPR012951 Berberine/berberine-like
6.95141	9.7764	4.2328	Solyc10g054530.1	FAD-binding domain-containing protein (AHRD V1 ***- D7MFH6_ARALY); contains Interpro domain(s) IPR006094 FAD linked oxidase, N-terminal
6.95141	9.7764	4.2328	Solyc10g054540.1	FAD-binding domain-containing protein (AHRD V1 ***- D7MMH5_ARALY); contains Interpro domain(s) IPR012951 Berberine/berberine-like
6.67580	9.2230	3.8391	Solyc01g106660.1	Ulp1 protease family C-terminal catalytic domain containing protein (AHRD V1 *- *- Q60D46_SOLDE); contains Interpro domain(s) IPR015410 Region of unknown function DUF1985
6.67580	9.2230	3.8391	Solyc01g106670.1	Mutator-like transposase (AHRD V1 ***- Q9SKM2_ARATH); contains Interpro domain(s) IPR004332 Transposase, MuDR, plant
6.67580	9.2230	3.8391	Solyc11g073060.1	Zinc finger family protein (AHRD V1 ***- D7LJS8_ARALY); contains Interpro domain(s) IPR007087 Zinc finger, C2H2-type
6.49966	9.0801	3.7364	Solyc03g045120.1	Unknown Protein (AHRD V1)
6.07439	9.9476	4.3482	Solyc00g007960.1	Unknown Protein (AHRD V1)
6.07439	9.9476	4.3482	Solyc00g007970.1	Unknown Protein (AHRD V1)
6.06400	8.3671	3.2233	Solyc03g083940.1	Unknown Protein 89aa very basic
6.06400	8.3671	3.2233	Solyc03g121660.2	Zinc finger protein
6.06400	8.3671	3.2233	Solyc03g121670.2	Beta-lactamase domain protein
6.06400	8.3671	3.2233	Solyc09g018900.1	Unknown Protein, 35 aa
6.06400	8.3671	3.2233	Solyc09g018890.2	genomic contig
6.06400	8.3671	3.2233	Solyc09g018910.1	Unknown Protein ,26 aa
6.06400	8.3671	3.2233	Solyc10g054570.1	V-type proton ATPase 16 kDa proteolipid subunit (AHRD V1 ***- VATL_SOLLG); contains Interpro domain(s) IPR011555 ATPase, V0 complex, proteolipid subunit C, eukaryotic
6.04244	8.3217	3.2154	Solyc01g028870.2	N utilization substance protein B homolog (AHRD V1 *- *- D5S311_CLODI); contains Interpro domain(s) IPR006027 NusB/RsmB/TIM44
6.04244	8.3217	3.2154	Solyc01g028880.1	Unknown Protein, 136aa
6.04244	8.3217	3.2154	Solyc12g077510.1	HAT family dimerisation domain containing protein (AHRD V1 ***- Q2QPA8_ORYSJ); contains Interpro domain(s) IPR007021 Protein of unknown function DUF659
6.02148	8.0378	3.0053	Solyc12g014410.1	Ribonuclease III family protein (AHRD V1 *- ** D7MAI2_ARALY); contains Interpro domain(s) IPR000999 Ribonuclease III
5.94968	12.6839	6.1660	Solyc10g061880.1	Unknown Protein (AHRD V1),145aa
5.89970	7.9979	2.9836	Solyc02g090520.1	Unknown Protein (AHRD V1) 65aa
5.89970	7.9979	2.9836	Solyc02g090510.2	Calcium-dependent protein kinase-like (AHRD V1 **** Q9LET1_ARATH); contains Interpro domain(s) IPR002290Serine/threonine protein kinase
5.89970	7.9979	2.9836	Solyc08g066380.1	Mutator-like transposase (AHRD V1 ***- Q8W3H2_ORYSA); contains

				Interpro domain(s) IPR018289 MULE transposase, conserved domain
5.89970	7.9979	2.9836	Solyc08g066370.1	Serine/threonine-protein phosphatase 7 long form homolog (AHRD V1 **-- PPP7L_ARATH); contains Interpro domain(s) IPR019557 Aminotransferase-like, plant mobile domain
5.89970	7.9979	2.9836	Solyc12g098150.1	Voltage-gated potassium channel beta subunit (AHRD V1 **-- B6T7A1_MAIZE); contains Interpro domain(s) IPR005399 Potassium channel, voltage-dependent, beta subunit, KCNAB-related
5.71399	7.9235	2.9357	Solyc07g017350.1	Lariat debranching enzyme (AHRD V1 ***- B6U6X4_MAIZE)
5.71399	7.9235	2.9357	Solyc07g017360.1	Unknown Protein (AHRD V1) 80aa
5.67727	7.5207	2.6591	Solyc00g023470.1	Pectinesterase (AHRD V1 **** D8SCRO_SELML); contains Interpro domain(s) IPR000070 Pectinesterase, catalytic
5.65215	7.4245	2.5943	Solyc05g046110.2	Glycosyltransferase-like protein (AHRD V1 **-- D8QTD2_SELML); contains Interpro domain(s) IPR006740 Protein of unknown function DUF604
5.63248	9.2344	3.8400	Solyc11g064950.1	BZIP transcription factor (AHRD V1 **** Q9SQK1_TOBAC); contains Interpro domain(s) IPR011616 bZIP transcription factor, bZIP-1
5.62001	7.4878	2.6431	Solyc04g028600.1	Unknown Protein (AHRD V)1 129aa
5.62001	7.4878	2.6431	Solyc05g015010.2	Unknown Protein (AHRD V) 21aa
5.62001	7.4878	2.6431	Solyc09g064780.2	At2g23590-like protein (Fragment)
5.53304	9.3188	3.8988	Solyc06g005340.2	Unknown Protein (AHRD V1), 38aa
5.53304	9.3188	3.8988	Solyc06g005350.2	Ras-related protein Rab-8A (AHRD V1 ***- C1BPQ4_9MAXI); contains Interpro domain(s) IPR003579 Ras small GTPase, Rab type
5.43020	7.1413	2.3745	Solyc05g051050.2	Glycogen synthase kinase (AHRD V1 **** Q1AMT7_ORYSJ); contains Interpro domain(s) IPR002290 Serine/threonine protein kinase
5.43020	7.1413	2.3745	Solyc05g051060.2	Myb family transcription factor-like (AHRD V1 *- * Q84NK2_ORYSJ); contains Interpro domain(s) IPR006447 Myb-like DNA-binding region, SHAQKYF class
5.43020	7.1413	2.3745	Solyc09g042410.1	Unknown Protein (AHRD V1) ,41aa
5.43020	7.1413	2.3745	Solyc10g049340.1	CCHC-type integrase
5.43020	7.1413	2.3745	Solyc11g020420.1	tRNA dimethylallyltransferase (AHRD V1 *- * MIAA_LYSSC); contains Interpro domain(s) IPR002627 tRNA isopentenyltransferase
5.43020	7.1413	2.3745	Solyc11g020430.1	tRNA dimethylallyltransferase (AHRD V1 ***- C6HGS0_AJECH); contains Interpro domain(s) IPR002627 tRNA isopentenyltransferase
5.41192	7.1087	2.3510	Solyc07g053630.2	Response regulator (AHRD V1 *--- A1A6A6_ORYSJ); contains Interpro domain(s) IPR006447 Myb-like DNA-binding region, SHAQKYF class
5.34971	10.9285	5.0336	Solyc05g025700.1	Cytochrome c biogenesis FC (AHRD V1 ***- B9U3K4_CARPA)
5.29973	6.9530	2.2350	Solyc09g037130.1	Unknown Protein (AHRD V) 50aa
5.29973	6.9530	2.2350	Solyc10g047670.1	Receptor expression-enhancing protein 2 (AHRD V1 *--- B2WDX2_PYRTR); contains Interpro domain(s) IPR004345 TB2/DP1 and HVA22 related protein
5.27603	9.4000	3.9608	Solyc05g021450.1	Unknown Protein (AHRD V1)
5.25278	6.8297	2.1579	Solyc00g006010.1	Unknown Protein (AHRD V) 193aa
5.25278	6.8297	2.1579	Solyc00g006020.1	Endonuclease/exonuclease/phosphatase (
5.25278	6.8297	2.1579	Solyc01g094820.2	ARID/BRIGHT DNA-binding domain-containing protein/ELM2 domain-containing protein/Myb-like DNA-binding domain-containing protein (AHRD V1 **-- Q1PEAO_ARATH); contains Interpro domain(s) IPR001606 AT-rich interaction region
5.25278	6.8297	2.1579	Solyc07g041090.1	Unknown Protein (AHRD V) 143aa
5.25278	6.8297	2.1579	Solyc10g036730.1	Unknown Protein (AHRD V) 87aa
5.25278	6.8297	2.1579	Solyc10g054760.1	Auxin-induced SAUR-like protein (AHRD V1 ***- Q8S351_CAPAN); contains Interpro domain(s) IPR003676 Auxin responsive SAUR protein
5.17660	5.7075	1.3778	Solyc01g044440.1	Mutator-like transposase (AHRD V1 *- * Q9SKL7_ARATH); contains Interpro domain(s) IPR018289 MULE transposase, conserved domain
5.17660	5.7075	1.3778	Solyc01g044480.2	Elongation factor P (AHRD V1 ***- B6TAH3_MAIZE); contains Interpro domain(s) IPR008991 Translation protein SH3-like
5.17660	5.7075	1.3778	Solyc01g044490.2	Elongation factor P family protein expressed (AHRD V1 ***- Q10BS5_ORYSJ); contains Interpro domain(s) IPR015365 Elongation factor P, C-terminal
5.17660	5.7075	1.3778	Solyc01g056570.2	Regulator of chromosome condensation (RCC1)-like protein (AHRD V1

				*--- DONM06_PHYIN); contains Interpro domain(s) IPR009091 Regulator of chromosome condensation/beta-lactamase-inhibitor protein II
5.17660	5.7075	1.3778	Solyc01g059830.2	Enoyl-CoA hydratase (AHRD V1 ***- C1K4P1_ELAOL); contains Interpro domain(s) IPR001753 Crotonase, core
5.17660	5.7075	1.3778	Solyc01g087400.2	PHD finger family protein (AHRD V1 *- *- D7LU24_ARALY)
5.17660	5.7075	1.3778	Solyc01g087410.2	Zinc finger protein (AHRD V1 *--- Q4H2K2_CIOIN); contains Interpro domain(s) IPR011011 Zinc finger, FYVE/PHD-type
5.17660	5.7075	1.3778	Solyc02g031690.1	Unknown Protein (AHRD V) 55aa
5.17660	5.7075	1.3778	Solyc02g032960.2	Cell division protease FtsH homolog (AHRD V1 *--- C5NVJ0_9BACL); contains Interpro domain(s) IPR003959 ATPase, AAA-type, core
5.17660	5.7075	1.3778	Solyc02g091880.2	Cytochrome c oxidase subunit VIa family protein expressed (AHRD V1 **** Q7XZW4_ORYSJ); contains Interpro domain(s) IPR001349 Cytochrome c oxidase, subunit VIa
5.17660	5.7075	1.3778	Solyc02g091890.1	MRNA complete cds clone RAFL24-22-E06 (AHRD V1 *- *- Q67YL8_ARATH),MDN1 domain, dentin sialophosphoprotein-like isoform X2 [Solanum tuberosum]
5.17660	5.7075	1.3778	Solyc02g091900.2	Cysteine desulfurase (AHRD V1 **** B6T4S0_MAIZE); contains Interpro domain(s) IPR000192 Aminotransferase, class V/Cysteine desulfurase
5.17660	5.7075	1.3778	Solyc03g061600.2	Cell division cycle protein 27/anaphase promoting complex subunit 3 (AHRD V1 *--- A8NH71_COPC7); contains Interpro domain(s) IPR011990 Tetratricopeptide-like helical
5.17660	5.7075	1.3778	Solyc03g082850.2	3''5'' exonuclease family protein (AHRD V1 *--- Q23B12_TETTH); contains Interpro domain(s) IPR002782 Protein of unknown function DUF82

References

- Bortesi L, Fischer R. (2014) The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnol Ad.* Dec 20. [Epub ahead of print] Review
- Chaimovitch, D., Rogovoy, O., Altshuler, O., Belausov, E., Abu-Abied, M., Rubin, B., Sadot, E. Dudai, N. (2012) The relative effect of citral on mitotic microtubules in wheat roots and BY2 cells. *Plant Biology*, 14: 354-364.
- Cheniclet C, Rong WY, Causse M, Frangne N, Bolling L, Carde JP, Renaudin JP. (2005) Cell expansion and endoreduplication show a large genetic variability in pericarp and contribute strongly to tomato fruit growth. *Plant Physiol* 139:1984-94.
- Chinenov Y, Kerppola TK. (2001) Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity. *Oncogene*. 30;20:2438-2452.
- Davière JM, Achard P. (2013) Gibberellin signaling in plants. *Development*. 140:1147-1151.
- Gillaspy G, Ben-David H, Gruissem W (1993) Fruits: A Developmental Perspective. *Plant Cell* 5:1439-1451.
- Guilfoyle TJ, Ulmasov T, Hagen G. (1998) The ARF family of transcription factors and their role in plant hormone-responsive transcription. *Cell Mol Life Sci*. 54:619-627.
- Hackbusch J, Richter K, Müller J, Salamini F, Uhrig JF. (2005) A central role of Arabidopsis thaliana ovate family proteins in networking and subcellular localization of 3-aa loop extension homeodomain proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102:4908-4912.
- Hayashi K. (2012) The interaction and integration of auxin signaling components. *Plant Cell Physiol* 53:965-9675.
- Liu J, Van Eck J, Cong B, Tanksley SD (2002) A new class of regulatory genes underlying the cause of pear-shaped tomato fruit. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:13302-13306.
- Machemer K, Shaiman O, Salts Y, Shabtai S, Sobolev I, Belausov E, Grotewold E, Barg R. (2011) Interplay of MYB factors in differential cell expansion, and consequences for tomato fruit development. *Plant J*. 68:337-350.
- Micheli F. (2001) Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends Plant Sci*. 6(4):414-419. Review.
- Morohashi K, Xie Z, Grotewold E. (2009) Gene-specific and genome-wide ChIP approaches to study plant transcriptional networks. *Methods Mol Biol*. 553:3-12.
- Pelloux J, Rustérucchi C, Mellerowicz EJ. (2007) New insights into pectin methylesterase structure and function. *Trends Plant Sci*. 12:267-277.
- Raimundo J, Sobral R, Bailey P, Azevedo H, Galego L, Almeida J, Coen E, Costa MM. (2013) A subcellular tug of war involving three MYB-like proteins underlies a molecular antagonism in *Antirrhinum* flower asymmetry. *Plant J*. 75:527-538.
- Rose A, Meier I, Wienand U. (1999) The tomato I-box binding factor LeMYBI is a member of a novel class of myb-like proteins. *Plant J*. 20:641-652
- Szwacka M, Siedlecka E, Zawirska-Wojtasiak R, Wiśniewski Ł, Malepszy S. (2009) Expression pattern of the pre-prothaumatin II gene under the control of the CaMV 35S promoter in transgenic cucumber (*Cucumis sativus* L.) flower buds and fruits. *J Appl Genet*. 50:9-16
- Wasteneys GO, Ambrose JC. (2009) Spatial organization of plant cortical microtubules: close encounters of the 2D kind. *Trends Cell Biol*. 19: 62-71

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.

מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה.
<p>(1) לימוד הקשרים הפיסיים בין חמשת החלבונים (FSM1, FSB1, MYBI, OVATE, TALE). (2) אנליזה פונקציונאלית של פעילות FSB1, MYBI, OVATE בהקשר של גדילה והתפתחות הפרי. (3) לימוד הקשרים הרגולטוריים בין הגנים המקודדים לחלבונים אלו. לאור הממצאים שהתקבלו במהלך העבודה, המחקר התמקד יותר בהרחבת פיענוח הקשרים הפיסיים בין החלבונים FSM1, FSB1, MYBI. ונגקטה גישה שונה לזיהוי הגנים המבוקרים על-ידי רשת חלבונים זו.</p>
עיקרי התוצאות.
<p>ההתקשרות האלטרנטיבית של FSB1 עם FSM1 ו-MYBI מתרחשת בין האתר דמויי ה-MYB שלו לבין אתרי ה-MYB הדומים של שניהם, ואתר extDUF3755 תורם ליציבות החלבון. ביטוי ביתר של MYBI, מעכב התארכות תאים בדומה להשפעת OEX-FSM אבל הפנוטיפ פחות קיצוני. מבחני CHIP-seq שכוונו לאיתור רצפי דנא אליהם קשור FSB1, כנראה בקומפלקס עם בקרי שעתוק ממשפחת ה-MYBI, הצביע על כ-1000 רצפים כאלו הממופים במרחק קטן מ-5kb מהתחלת הטרנסקריפטי.</p>
מסקנות מדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר לתקופת הדו"ח?
<p>רשת החלבונים FSM1, FSB1, MYBI משתתפת בבקרת התפתחות הצמח בכלל והפרי בפרט בעיקר באמצעות מודולציה של התארכות התאים. ולכן מודיפיקציה של ביטויים יכולה להשפיע על מבנה הפרי. הממצאים מצביעים על כך שיש לחקור גם חברים נוספים של משפחות גנים אלו שלהם עשויה להיות תרומה יותר גדולה, או יותר ספציפית על הכיוונויות ומידת גדילת התאים. לא כל המטרות המקוריות הושגו, לחילופין התקבל מידע הרבה יותר מקיף אודות הגנים שבבקרתם משתתפים שלושת החלבונים הללו.</p>
בעיות שנותרו לפתרון ו/או שינויים (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים) שחלו במהלך העבודה; התייחסות המשך המחקר
<p>כאמור הגישה לזיהוי התפקיד הרגולטורי של החלבונים שונתה, וניסויי ה-CHIP-seq הצביעו על גנים מועמדים המבוקרים באופן ישיר על רשת הבקרים FSM1, FSB1, MYBI. המשך אנליזת הצמחים המותמרים שיוצרו במהלך המחקר. ירחיב את הידע אודות תפקודם וחשיבותם בבקרת בהתפתחות הפרי.</p>
פרסום הדו"ח: אני ממליץ לפרסם את הדו"ח: (סמן אחת מהאופציות) X
<
האם בכוונתך להגיש תוכנית המשך בתום תקופת המחקר הנוכחי?