

דו"ח מסכם לתוכנית מחקר מספר 261-0772

# אינטראקציה בין פפטידים לחלבונים: אישה חדשה להגנת הצומח מחיידקים פתולוגיים.

**Protein-peptide interactions: a new strategy to combat  
bacterial infection of crop plants.**

מוגש לקרן המדען הראשי של משרד החקלאות  
על ידי:

ידידיה גפני - גנטיקה, המכון לגד"ש, מינהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני, בית דגן  
אברהם לויטר - כימיה ביולוגית, המכון למדעי החיים, האוניברסיטה העברית, ירושלים

Yedidya Gafni, A.R.O., The Volcani Center, Bet Dagan 50250,  
[ygafni@volcani.agri.gov.il](mailto:ygafni@volcani.agri.gov.il)

Abraham Loyter, Department of Biological Chemistry, Institute of Life  
Sciences, Hebrew University, Jerusalem.  
[loyter@vms.huji.ac.il](mailto:loyter@vms.huji.ac.il)

אפריל 2013

אייר תשע"ג

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.  
הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא



חתימת החוקר:

רשימת פרסומים: אין

הצגת הבעיה: חיידקים פתוגניים מהווים בעיה משמעותית בחקלאות כמפחיתי יכול עיקריים בגידולים רבים. רב רובם של החיידקים הפתוגניים מחדירים לתא הצמחי חלבונים שמשמשים במנגנון הפתוגניות של החיידק.

מהלך ושיטות: לאחרונה, פיתחנו ספריות קומבינטוריות של פפטידים וסריקתם המאפשרת לזהות פפטידים ספציפיים שמונעים אינטראקציה בין חלבונים. הוכחנו שניתן למנוע אינטראקציה כזו בין חלבוני וירוס הומאני (HIV) בתוך תא חי. בתוכנית המוצעת אנו מבקשים לבחון אפשרות זו גם בתאי צמחים על מנת למנוע פתוגניות מחיידק אלים שישמש כמודל: חיידק האגרובקטריום. מניעת אינטראקציה כזו בין החלבון הויראלי VIRE2 לחלבון הצמחי VIP1 אמורה לפגוע בפתוגניות החיידק. הצלחתה של גישה זו תאפשר בהמשך יצירת צמחים המבטאים גנים לפפטידים ספציפיים כאלה למניעת פתוגניות מחיידקים רבים אחרים.

#### תוצאות עיקריות:

בשנת המחקר הראשונה הצלחנו לבטא הגן ל VIP1 בחיידקים ברמה כזו שמספקת לנו כמות חלבון יפה הנדרשת לניסויי ההתקשרות. כמו כן יצרנו PEPTIDE ARRAYS של פפטידים הנגזרים מהחלבון VIRE2 עליהם בדקנו את קישורו של VIP1 שהופק מחיידקים ולהיפך, פפטידים הנגזרים מ VIP1 נבדקו לקישורם לחלבון VIRE2. בנוסף, נבדק כל חלבון מהשניים ליכולת קישורו לפפטידים שנגזרו ממנו. נמצאו שמונה פפטידים סך הכל שנמצאו ככאלו המורבים בקישור בין שני החלבונים. אלו ילמדו עתה לעוצמת קישורם והאם הם יכולים להפריע IN VITRO להתקשרות VIP1 לחלבון של החיידק VIRE2.

בשנת המחקר השנייה אובחנו הפפטידים המתאימים ביותר למניעת התקשרות VIP1 עם VIRE2 בניסויים ביופיסיקליים in vitro. חמישה מהם צוינו כבעלי פוטנציאל למניעת התקשרות החלבונים VIP1 עם VIRE2, גם בצמח. אם אכן מי מביניהם יעשה זאת, תהיה לכך השפעה של ממש על יכולת חיידקי האגרובקטריום ליצור מחלה בצמחים (גידולים סרטניים). לשם בדיקה זו בנינו חמישה קונסטרוקטים מולקולאריים המבוססים על הידע שנצבר בשנה הראשונה למחקר והמקודדים לאותם הפפטידים. לקראת סוף השנה נחל בטרנספורמציות לצמחי טבק לבחינת עמידותם לחיידקים בשנת המחקר הבאה.

בשנה השלישית יצרנו צמחים טרנסגניים לביטוי פפטידים אנטי אגרובקטריום מבוססים על המפורט למחקר שנה ראשונה ושנייה. צמחים אלו, צמחי טבק, יאולחו בחיידקי אגרובקטריום ותמדד הפתוגניות של החיידק על צמחים אלו בהשוואה לצמחים בלתי מותמרים. כמצופה, שנות המחקר אינן חופפות את שנות הפעילות ואנו נמשיך בפרויקט גם מעבר לשנות המימון.

מבוא - תאור הבעיה והגישה הניסויית לפתרונה:

חיידקים פתוגניים מהווים בעיה משמעותית בחקלאות כמפחיתי יבול עיקריים בגידולים רבים. רב רובם של החיידקים הפתוגניים מחדירים לתא הצמחי חלבונים שמשמשים במנגנון הפתוגניות של החיידק. לאחרונה, פיתחנו ספריות קומבינטוריות של פפטידים וסריקות המאפשרת לזהות פפטידים ספציפיים שמונעים אינטראקציה בין חלבונים. הוכחנו שניתן למנוע אינטראקציה כזו בין חלבוני וירוס הומאני (HIV) בתוך תא חי. בתוכנית המוצעת אנו מבקשים לבחון אפשרות זו גם בתאי צמחים על מנת למנוע פתוגניות מחיידק אלים שישמש כמודל: חיידק האגרובקטריום. מניעת אינטראקציה כזו בין החלבון היראלי VIRE2 לחלבון הצמחי VIP1 אמורה לפגוע בפתוגניות החיידק. הצלחתה של גישה זו תאפשר בהמשך יצירת צמחים המבטאים גנים לפפטידים ספציפיים כאלה למניעת פתוגניות מחיידקים רבים אחרים.

מטרות המחקר: מטרת המחקר שנועדו לאפשר פיתוח גישה חדשנית לבלימת פגיעתם של חיידקים פתוגניים בצמחים הינן:

א – לאפיין פפטידים קצרים בחלבוני החיידק שמייצגים את אזור קישורו של החלבון לחלבוני הצמח ובהם נעזר החיידק בהתקפתו על התא הצמחי.

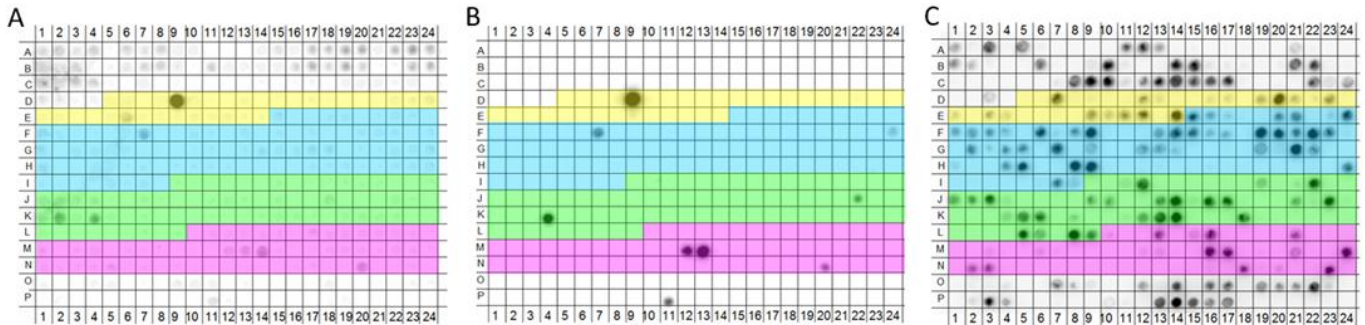
ב – לבחון האם פפטידים כאלו יכולים בצורה טובה למנוע את ההתקשרות בין החלבונים in Vitro .

ג – לבטא את הגנים הסינטטיים שיוצרו עבור פפטידים מוצלחים מסעיף ב' בצמחים ולבחון את יכולתם למנוע קישור בין החלבונים in vivo .

ד – לבחון האם שבוש התקשרות בין חלבוני הצמח לחלבוני החיידק משבש את התקפותיהם של החיידקים ומקנה לצמח עמידות נגדם.

## ניסויים ותוצאות:

בתחילת המחקר השקענו באיפיון פפטידים בחלבון VIP1 המעידים על קשר לחלבון VIRE2. מערכת של peptide array שמשה לבחינת האינטראקציה.



**Figure 9: VIP1 and VirE2 binding peptides**

Screening the peptide arrays for binding VIP1 86-341 (A), HLT-VIP1 (B) and, HLT-VirE2 (C). VIP1-derived peptides are colored in yellow, VirE2-derived peptides in cyan, VirE2-derived peptides in green and VIP2-derived peptides in pink.

השמוש במערכת חדישה זו העלה מספר פפטידים ש"עלו" בסריקה היכולים להוות אינטראקטורים עם החלבונים VIP1 ו-VirE2 ולשבש את האינטראקציה ביניהם ובכך לפגוע ביכולת החיידק להוות פתוגן.

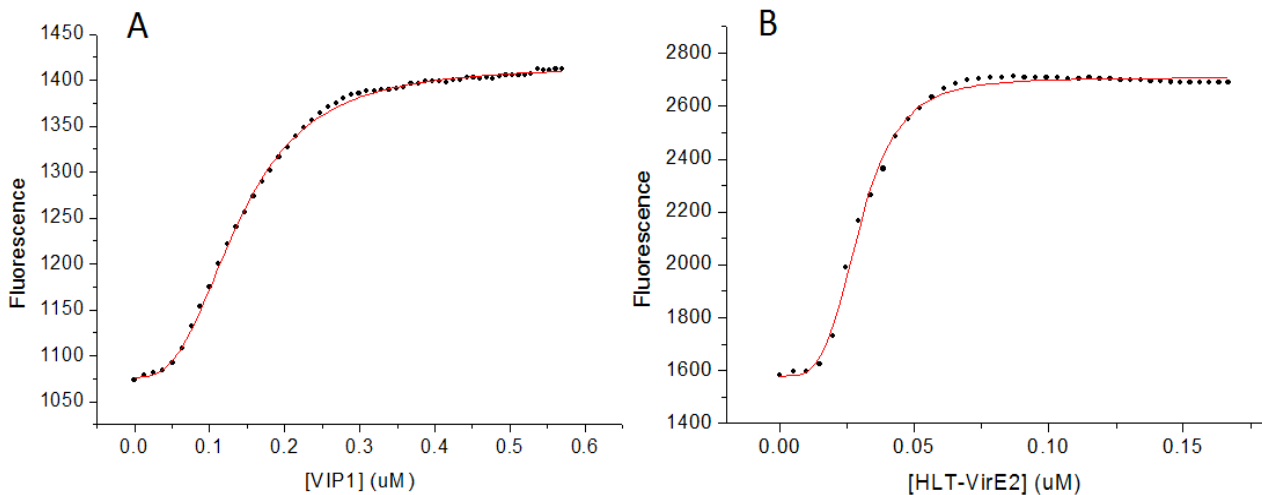
**Table 1: Peptides from the VIP1 – VirE2 interface identified in the array screening**

Peptide*	Sequence
VirE2 279-293 (J22)	WAGDAYANKRFEFER
VirE2 324-338 (K4)	WERGSADIRFAEFAGE
VIP1 96-110 (D7)	WPNSLPPKPEARFGRH
VIP1 111-125 (D9)	WVRSFSVDSDFDDLQ
VIP1 194-208 (D20)	WDPKRAKRILANRQSA
VIP1 216-230 (D23)	IRYTGELERKVQTLQ
VIP1 291-305 (E9)	EIPQGNNGNSYNRAQF
VIP1 329-341 (E14)	PSLPSYMDFTKRG
VIP1 NLS**	WKRILANRQSAARSKERKIR

\* To peptides without Trp or Tyr in their sequence, an N-terminal Trp was added to allow accurate concentration determination by UV spectroscopy.

\*\* This peptide was not included in the array but it was synthesized to test its interactions.

בשלב הבא נבדקה עוצמת הקישור של פפטידים בחלבון VIP1 לחלבון VIRE2 של אגרובקטריום על מנת לבחור את המתאימים לביטוי בצמחים



**Figure 1: VIP1- derived peptides bind VIP1 86-341 and HLT-VirE2**

Fluorescence binding curves for VIP1 111-225 with VIP1 86-341 (A) and VIP1 194-208 with HLT-VirE2 (B). In both experiments, the protein was titrated into the fluorescein labeled peptide. In red is the fit to the Hill equation. Binding affinities and Hill coefficients are shown in Table 1.

**Table 1: Binding coefficients and Hill coefficients**

Protein	Peptide	$K_d$ (nM)	Hill coefficient
VIP1	VIP1 111-125	$140 \pm 1$	$2.8 \pm 0.1$
HLT-VirE2	VIP1 194-208	$30 \pm 1$	$3.9 \pm 0.2$

על בסיס ניסויים אלו נבחרו חמישה פפטידים (D7, D20, D23, E9, E14 המתוארים בטבלה 2) שרצפיהם שובטו לתוך רצף הגן לחלבון טיורדוקסין (TRX) כדי "שיציגם" בתוך התא הצמחי המותמר. השיבוט הנ"ל המשיך לתוך וקטור בינארי להתמרת צמחים (pCAMBIA2300) ובהמשך הוחדרו קונסטרוקטים אלו לתאי טבק לשם יצירת צמחים טרנסגניים מבטאי הפפטידים.

**Table 2: Oligo sequence for the binding peptides**

Five aptamers that binding VirE2 including D7, D20, D23, E9, and E14 are used for plant expression vector constructio.

Table 1. Oligo sequence for the binding peptides

Peptide	Name	Oligo	Oligo sequence *
VIP1 96-110	D7	D7- Fw	<i><u>gtccg</u></i> cctaattctcttctccaaaacccgaagctagattcggtcgccat <i><u>g</u></i>
		D7- Rv	<i><u>gacc</u></i> atggcgaccgaatctagcttcgggtttggaggaagagaattagg <i><u>cg</u></i>
VIP1 194- 208	D20	D20- w	<i><u>gtccg</u></i> gatcctaaaagagctaaaaggatttagcgaatagacaatctgcg <i><u>g</u></i>
		D20- Rv	<i><u>gacc</u></i> cgcagattgtctattcgctaaaatccttttagctcttttaggatc <i><u>cg</u></i>
VIP1 216- 230	D23	D23- Fw	<i><u>gtccg</u></i> attaggtatactggtgagttagagaggaagggtcagacacttcag <i><u>g</u></i>
		D23- Rv	<i><u>gacc</u></i> ctgaagtgtctgaaccttctcttaactcaccagtataccta <i><u>cg</u></i>
VIP1 291- 305	E9	E9- Fw	<i><u>gtccg</u></i> gaaattcctcaggggaatggaaattctacaaccgtgctcaattc <i><u>g</u></i>
		E9- Rv	<i><u>gacc</u></i> gaattgagcacggttgtaagaattccattcccctgaggaatttc <i><u>cg</u></i>
VIP1 329- 341	E14	E14- Fw	<i><u>gtccg</u></i> ccatcgctccaagctacatggattcaccaagagagggc <i><u>g</u></i>
		E14- Rv	<i><u>gacc</u></i> gcctctcttggtgaaatccatgtagcttgggagcgatgg <i><u>cg</u></i>

\* The underlined and italicized sequences are *Rsr*II site addition to peptides for cloning into *trx*.

הצמחים המותמרים, צמחי טבק, מגודלים עתה ליצירת זרעים על מנת לעשותם הומוזיגוטיים. אלו יזרעו ויגודלו ויאולחו בפציעה בגבעול על ידי אגרובקטריום C58 עם ביקורות. ימדדו הפרמטרים הבאים:

1. מהירות הופעת הגידול הסרטני (העפץ)
2. גודל העפץ לאחר פרק זמן מסוים בכל הצמחים
3. משקל העפץ

נתונים אלו יאשרו או ידחו את האפשרות לניצול הפפטידים למניעת הפתוגניות של אגרובקטריום.

## 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.
מטרות המחקר הינן יצירה של פפטידים ייחודיים המסוגלים להפריע לחלבוני הפתוגן להקשר לחלבוני הצמח. חמישה כאלה נמצאו והגנים המקודדים להם שובטו לשם החדרתם לצחים על מנת לבחון את יכולתם להגן על הצמח מן הפתוגן.
עיקרי הניסויים והתוצאות.
בשנות המחקר נמצאו מספר פפטידים מבטיחים שקישורם נבדק ב-ELISA. גנים סינטטיים המקודדים להם שובטו לוקטורים בינאריים לשם התמרת צמחי טבק. נוצרו צמחים מותמרים שיבדקו לעמידותם לחיידק.
מסקנות מדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר לתקופת הדוח?
חלק עיקרי במטרות הושג – יצרנו קונסטרוקטים מולקולאריים נושאי הגנים לפפטידים נבחרים. הצלחנו להוכיח את יכולתם להקשר לחלבונים של החיידק ולכן הם יכולים לשמש כמעכבי פעילות. יצרנו צמחים טרנסגניים המבטאים פפטידים אלו ועתה הם יבדקו ליכולתם לשבש את פתוגניות החיידק.
בעיות שנתרו לפתרון ו/או שינויים (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים) שחלו במהלך העבודה; התייחסות המשך המחקר לגביהן, האם יושגו מטרות המחקר בתקופה שנתרה לביצוע תוכנית המחקר?
כאמור, מוטלת עלינו עתה ההוכחה שפפטידים שנמצאו בשנה הראשונה ושיייה אכן יכולים להקשר לחלבוני המטרה גם בצמח. עתה נבחנת היכולת של הצמח להתמודד עם חיידקי האגרובקטריום.
הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח: פרסומים בכתב - ציטוט 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.
עדיין אין לנו מספיק חומר לפרסום או רישום פטנט.
פרסום הדוח: אני ממליץ לפרסם את הדוח: (סמן אחת מהאופציות)
רק בספריות
XXX ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט)
חסוי – לא לפרסם
האם כוונתך להגיש תוכנית המשך בתום תקופת המחקר הנוכחי? כן* - לא -

\*יש לענות על שאלה זו רק בדוח שנה ראשונה במחקר שאושר לשנתיים, או בדוח שנה שניה במחקר שאושר לשלוש שנים

## סיכום

- מטרות המחקר לתקופת הדו"ח תוך התייחסות לתוכנית העבודה. במסגרת הדו"ח המסכם איתרנו ושיבטנו פפטידים הנקשרים לאזורים VIRE2 ובחלבון VIP1 שמשמשים לאינטראקציה בין שני חלבונים אלו. יצרנו וקטורים לביטויים בצמחים. התמרנו צמחי טבק ונבדוק את עמידותם.
- עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח. נמצאו חמישה פפטידים שמשתתפים כנראה באינטראקציה המתוארת והם כאמור שובטו. יצרנו צמחים טרנסגניים מבטאי הפפטידים שהוזכרו.

3. המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו.

מן התוצאות עולה שיש מקום לחפש פפטידים שיפריעו לחלבוני חיידקים (כל חיידק פטוגני בעיקרון, לא רק אגרובקטריום) על מנת ליצור צמחים "מחוסנים" שמבטאים פפטידים אלו. בשלב הבא למחקר תבחן יכול קישורם להפריע את הקישור הטבעי בין החלבונים המדוברים בצמח והאם הדבר ימעיט ואולי אף ימנע את הופעת תסמיני המחלה הבקטריאלית בצמח.

5. האם הוחל בהפצת הידע.

טרם.

פרסום הדו"ח: אני ממליץ לפרסם את הדו"ח:  
אין מניעה לפרסם דו"ח זה.