ژنتیک نوین
دوره هفتم، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۱
صفحه ۱۶۴- ۱۵۷

جایگیری درون هسته‌ای پروتئین $VirD_2$ *Agrobacterium* در مدل ژنتیکی *Saccharomyces cerevisiae*

جلال سلطانی*[۲،۱]، جاناتان آ. لل[۱]، پاول فان هویسدن[۱]، پاول هویکس[۱]

۱- گروه ژنتیک ملکولی، موسسه زیست شناسی، دانشگاه لایدن، لایدن، هلند
۲-استادیار، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی:soltani@basu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۸۹/۵/۹- تاریخ پذیرش: ۹۰/۹/۸)

چکیده

در طبیعت *Agrobacterium tumefaciens* پس از تماس با سلول‌های زخمی گیاهی از طریق سیستم ترشحی نوع *IV* بخشی از پلاسمید مولد تومور خود، *T-DNA*، و تعدادی پروتئین بیماری-زایی را بدرون سلول گیاه می فرستد. پروتئین بیماری‌زایی $VirD_2$ که بصورت کووالان به انتهای ´۵ ملکول T-DNA می‌چسبد در انتقال و ورود این ملکول بدرون هسته و ژنوم گیاهان میزبان نقش دارد. *A.tumefaciens* قادر به تراریخت موجودات غیرگیاهی نیز می‌باشد. وجود پروتئین $VirD_2$ فعال برای تراریخت اگروباکتریومی سلول‌های گیاهی و غیرگیاهی ضروری است. در این پژوهش با استفاده از پروتئین فلورسنت سبز (*yGFP*)، جایگاه درون سلولی پروتئین $VirD_2$ در سلول‌های قارچ مدل ژنتیکی *Saccharomyces cerevisiae* مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور، ابتدا ژن $virD_2$ توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تکثیر و در پلاسمید pGBDKc1 کلون شد. سپس ژن مذکور بدرون جایگاه‌های کلونینگ وکتورهای pUG35 ,pUG34 و pUG36 که حامل ژن y*GFP* تحت کنترل پروموتر *MET25* می باشند کلون شد. انتقال ژن به استرین‌های اکسوترف *S. cerevisiae* بروش شیمیایی استات لیتیوم انجام شد. نتایج مطالعات فلورسنس میکروسکوپی نشان داد که $VirD_2$ متصل شده از پایانه‌ی آمینویی‌ش به پایانه‌ی کربوکسیلی پروتئین فلورسنت سبز، بیان شده از پلاسمیدهای pUG34 و pUG36، درون هسته‌ی سلول میزبان *S.cerevisiae* جای می‌گیرد. این یافته، اهمیت توالی هسته یاب (NLS) پایانه‌ی کربوکسیلی پروتئین $VirD_2$ در جایگیری درون هسته‌ای این پروتئین در سلول غیرگیاهی مخمر را می‌رساند.

واژه‌های کلیدی

Agrobacterium،
GFP،
***Saccharomyces cerevisiae*،**
$VirD_2$.

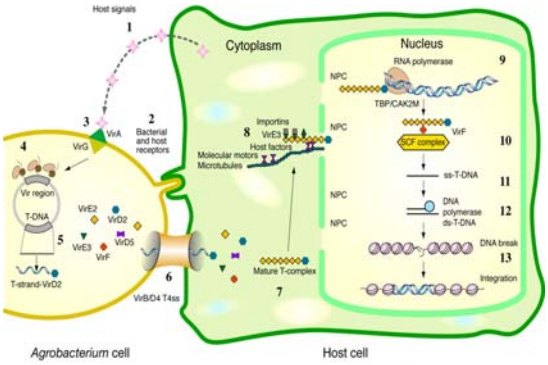
مقدمه

باکتری خاکزی *Agrobacterium tumefaciens* در طبیعت عامل بیماری‌زای گیاهی ست که در مجاورت مواد شیمیایی مترشحه از سلول‌های زخمی گیاه با انتقال بخشی از DNA خارج کروموزومی خودش به سلول گیاه باعث تراریخت ژنتیکی آن شده و سلول گیاه را وادار به ترشح مواد غذایی ای بنام اوپین می‌کند که منحصراً توسط خود این باکتری‌ها در ریزوسفر به-مصرف می‌رسند. این قابلیت بدلیل وجود پلاسمید مولد تومور (Ti-Plasmid) در باکتری *A. tumefaciens* است.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-09-01]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.2.7.4]

پلاسمید Ti تعدادی پروتئین بیماری‌زایی را رمزدهی می‌کند که با برش بخشی از خود این پلاسمید بنام T-region و انتقال تک رشته‌ی T-DNA (بنام T-strand) به سلول گیاهی و ادغام آن در ژنوم میزبان ایفای نقش می‌کنند (Citovsky et al. 2006). T-DNA حامل ژن‌هایی ست که پس از ورود بدرون ژنوم گیاه به تولید پروتئین‌هایی می‌پردازند که با ایجاد تغییر در متابولیسم سلول میزبان باعث تولید هورمون‌های گیاهی و موادی بنام اوپین می‌شوند (Zhu et al. 2000). با تحریک شدن سیستم تنظیمی virA-virG توسط مواد فنلی گیاهی مترشحه از سلول‌های زخمی، رگولون بیماری‌زایی پلاسمید مولد تومور، پروتئین‌های بیماری-زایی (Vir) مختلفی را تولید می‌کند که در فرآیند ایجاد تومور (گال) نقش‌های متفاوتی ایفا می‌کنند. در این بین، پروتئین اندونوکلئاز $VirD_2$ به‌همراه پروتئین‌های VirD1 و VirC1 در تشکیل تک رشته‌ی T-DNA نقش دارد. پروتئین $VirD_2$ که بصورت کووالان به گروه فسفات آزاد شده‌ی پایانه ی ´۵ رشته‌ی T-DNA متصل می‌شود بصورت یک پروتئین راهبر انتقال رشته‌ی T-DNA از طریق سیستم ترشحی نوع IV اگروباکتریوم را هدایت می‌کند. این سیستم ترشحی توسط پروتئین‌های VirB1-11/VirD4 پدید می‌آید. درون سلول میزبان، پروتئین اگروباکتریومی VirE2 با پوشاندن رشته‌ی T-DNA و ایجاد کمپلکس T، آنرا از دسترس نوکلئازهای سلولی خارج می‌سازد. هم $VirD_2$ و هم VirE2 دارای توالی‌های هسته یاب (NLS) هستند که احتمالاً ورود کمپلکس T بدرون هسته‌ی سلول گیاه را تسهیل می‌کنند. مشخص شده که هر دوی این پروتئین‌ها با پروتئین‌های ایمپورتین برهمکنش دارند که بیانگر نقش عوامل سلول‌های میزبان در ورود کمپلکس T بدرون هسته‌ی سلول میزبان است (Ballas and citovsky, 1997; Tzfira et al. 2001; Li et al. 2005). همچنین، پروتئین $VirD_2$ با تعدادی سایکلوفیلین گیاهی، پروتئین Cak2M و پروتئین متصل شونده به ناحیه‌ی TATA (TBP) برهمکنش دارد (Bako et al. 2003). درون هسته‌ی سلول میزبان، پروتئین $VirD_2$ ممکن است در ادغام T-DNA بدرون ژنوم میزبان نقش داشته باشد، هرچند این فرآیند عمدتاً توسط پروتئین‌های سلول میزبان انجام می‌شود (van Attikum et al. 2001; 2003; Soltani, 2009; Soltani et al. 2009) (شکل ۱).



شکل ۱- شمای کلی فرآیندهای مهم در تراریخت اگروباکتریومی. در مجاورت مواد شیمیایی محرک، اگروباکتریوم با احساس آن‌ها (۱) توسط سیستم تنظیمی VirA-VirG (۳) به سلول میزبان می‌چسبد (۲) این پروسه منجر به بیان پروتئین‌های بیماری‌زایی (Vir) (۴) و تولید رشته‌ی T متصل به VirD5 (۵) و حرکت این رشته به‌همراه چند پروتئین بیماری‌زایی به سمت سلول میزبان از طریق سیستم ترشحی نوع چهار (T4SS) می‌شود (۶). درون سیتوپلاسم سلول میزبان کمپلکس T شکل می‌گیرد (۷) و با استفاده از موتورهای سلولی و پروتئین‌های میزبان بدرون هسته می‌رود (۸). $VirD_2$ و VirE2 چندین رابط پروتئینی دارند که چندین پروسه را وساطت می‌کنند (۹). VirF در تجزیه‌ی پروتئین نقش دارد (۱۰). قبل از ورود T-DNA بدرون ژنوم (۱۳) باید پروتئین‌ها از روی آن زدوده شده (۱۱) و تک رشته به فرم دورشته‌ای درآید (۱۲) که به احتمال زیاد توسط سیستم‌های میزبان صورت می‌گیرند.

تحت شرایط آزمایشگاهی، Agrobacterium تحریک شده T-DNA را نه تنها به سلول‌های گیاهی بلکه به سلول‌های جلبکها، مخمرها، ائومایست‌ها، قارچهای رشته‌ای، توتیای دریایی و انسانی نیز منتقل می‌کند (Soltani et al. 2008). جهت بررسی عوامل پروتئینی درگیر در فرآیند تراریخت اگروباکتریومی دو موجود مدل ژنتیکی *Arabidopsis thaliana* و *Saccharomyces cerevisiae* مورد استفاده هستند (Bundock 1999; Van Attikum 2003; Soltani 2009). از آنجا که پروتئین $VirD_2$ دارای نقش‌های مهمی در سلول‌های میزبان گیاهی ست و با توجه به دامنه‌ی میزبانی بسیار وسیع سیستم انتقال ژن اگروباکتریومی، در پژوهش حاضر جایگاه درون سلولی پروتئین $VirD_2$ در سلول-های میزبان مخمری *S.cerevisiae* با استفاده از پروتئین فلورسنت سبز (yGFP) و نقش توالی‌های هسته یاب این پروتئین در راه‌یابی T-DNA بدرون هسته میزبان مورد بررسی قرار گرفت.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-09-01]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.2.7.4]

مواد و روش‌ها

نژادها و محیط‌های کشت

استرین *E. coli* XL1-Blue برای تمام موارد کلون‌سازی مورد استفاده قرار گرفت. *E. coli* در دمای 37°C در محیط کشت لوریا–برتانی (LB) یا TB و در صورت حمل وکتورهای کلون سازی ژن در محیط‌های کشت حاوی 100 µg/ml آمپی سیلین یا 60 µg/ml کانامایسین رشد داده شد. برای مطالعات مکانیابی پروتئین فلورسنت سبز (*GFP*) مخمر *S.cerevisiae* استرین CEN.pk113-3B (*MATα his3Δ1 ura3-52*) مورد استفاده قرار گرفت. استرین‌های مخمر در دمای 30°C در YPD یا MY حاوی مواد لازم مثل 20 µg/ml آدنین، 30 µg/ml هیستیدین، 20 µg/ml لئوسین, 30 µg/ml لایزین و 20 µg/ml تریپتوفان رشد داده شدند (Sherman 1991; Zonneveld 1986).

دستورزی اسیدهای نوکلئیک بر اساس پروتکلهای استاندارد انجام شد (Sambrook et al. 1989). جداسازی پلاسمید DNA از *E.coli* با استفاده از کیت شرکت کیاژن (QIAprep mini spin kit) انجام شد. برای جداسازی پلاسمید از سلول‌های مخمر با استفاده از کیت مذکور، 1 mg/ml لیتیکاز به بافر P1 افزوده شد. پلاسمیدهای جداشده از مخمر در استرین *E. coli* XL1-blue تکثیر شدند.

ساخت پلاسمید

برای کلون‌کردن ژن $virD_2$ در پلاسمید pGBDKc1 (van Hemert et al, 2003)، قسمت پایانه‌ی ´۳ ژن $virD_2$ که فاقد ۳۷۹ جفت‌باز ابتدایی‌ست از روی پلاسمید pVD43 (Rossi et al, 1993) به روش PCR تکثیر شد. DNA پلیمراز Vent (شرکت NEB) یا DNA پلیمراز Gold (The Applied Biosystems) در واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز به کار گرفته شدند. بعد از برش آنزیمی فرآورده‌ی مذکور با اندوکلئازهای *Sal*I و *Bgl*II، محصول نهایی بدرون پلاسمید pGBDKc1 که توسط همان اندونوکلئازها برش خورده بود کلون شد. قسمت پایانه‌ی ´۵ ژن $virD_2$ (۳۷۹ جفت باز) با انجام PCR برروی پلاسمید pVD43 بدست آمد. به این منظور از آغازگر $VirD_2$*Sal*Ip2 (´5-ACGCGTCGACGTCATGCCCCGATCGCGCTCAAG-´3) که یک جایگاه برش آنزیمی *Sal*I در بالادست رمز شروع رونویسی (´ATG) پدید می‌آورد و آغازگر VirD2p2 (´5-TATTCGGTCCTTCCTGTCTCTAGGTCCCCCC-´3) استفاده شد. سپس این قطعه با آنزیم *Sal*I برش خورده و بدرون ناحیه‌ی برش آنزیمی *Sal*I در پلاسمید pGBDKc1 که حاوی پایانه‌ی ´۳ ژن $virD_2$ بود وارد شد و پلاسمید pGBDKc1.$virD_2$ بدست آمد. به‌منظور ایجاد پروتئین‌های نوترکیب yGfp-$VirD_2$ و $VirD_2$-yGfp، قطعه‌ی *Xma*I-*Eco*RI حامل $virD_2$ از پلاسمید pGBDKc1.$virD_2$ بدرون ناحیه‌ی برش *Xma*I- *Eco*RI پلاسمیدهای حامل ژن y*GFP* بنام‌های pUG34، pUG35 و pUG36 کلون شد. در وکتورهای نوترکیب pUG34-$virD_2$ و pUG36-$virD_2$، ژن $virD_2$ از طرف پایانه‌ی آمینواش و در وکتور pUG35-$virD_2$، ژن $virD_2$ از طرف پایانه‌ی کربوکسیلی‌اش به *yGFP* متصل شده و تحت کنترل پروموتر ژن (alias *MET17* *MET25)* است. لیست و ویژگی‌های پلاسمیدهای مورد استفاده در این پژوهش جهت کلون سازی ژن‌ها در جدول یک ارائه شده است. صحت توالی پلاسمیدهای ساخته شده توسط آنالیز آنزیمی و توالی‌یابی DNA (شرکت BaseClear، هلند) بررسی شد. آغازگر GAD-fw (´5-GATGAGAAGATACCCCACC-´3) در توالی‌یابی استفاده شد.

انتقال ژن

انتقال ژن به استرین *E.coli* XL1-blue بروش معمول شوک گرمایی انجام شد (Takahashi et al. 1992). انتقال ژن به استرین‌های مخمر *S.cerevisiae* بروش شیمیایی استات لیتیوم انجام شد (Gietz and Woods 2002) و سلول‌های واجد تراژن برروی محیط کشت MY حاوی موادغذایی لازم غربال شدند (Zonneveld 1986).

مطالعات فلورسنس میکروسکوپی

رنگ‌آمیزی هسته‌ی سلول مخمر توسط ۴ و ۶–دی آمیدینو–۲–فنیل ایندول (DAPI) انجام شد. بدین منظور کشت‌های شبانه از استرین مخمر CEN.pk113-3B که حاوی پروتئین $VirD_2$ متصل به پروتئین *yGFP* می‌باشند با سانتریفیوژ رسوب داده شده و در یک میلی لیتر الکل اتانول ۷۰ درصد مجدداً حل شدند (Hašek and Streiblová 1996). پس از ۵ دقیقه، سلول‌ها مجدداً برداشت شده و در 25 µL از محلول DAPI با غلظت 0.1 µg/ml حل

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-09-01]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.2.7.4]

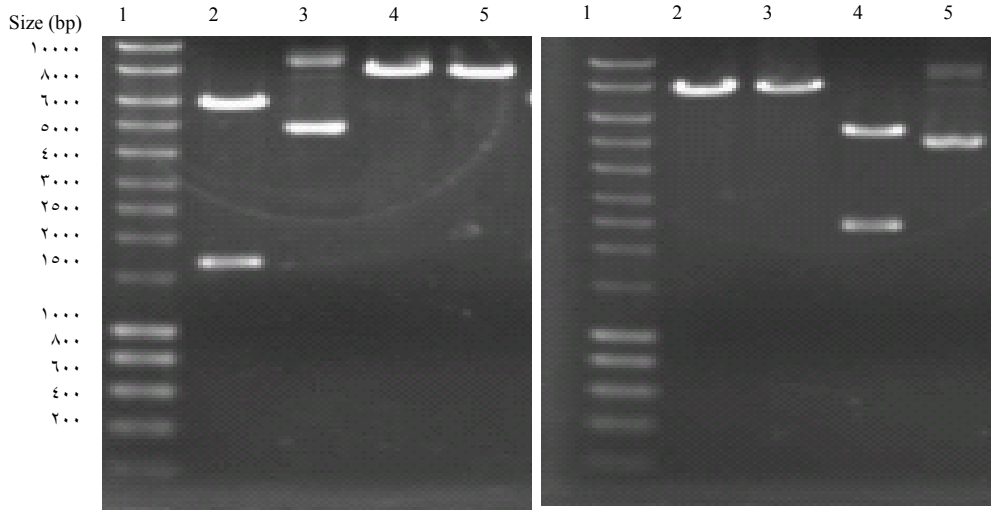
شدند. سپس 5 µL از سوسپانسیون مخمر رنگ‌آمیزی شده توسط DAPI برای مطالعات میکروسکوپی مورد استفاده قرار گرفت. بعلاوه, 5 µL از کشت شبانه نیز برای مطالعات میکروسکوپی توسط میکروسکوپ Zeiss Axio-plan-2 imaging microscope مورد استفاده قرار گرفت. پروتئین *yGFP* در طول موج ۴۸۸ نانومتر تحریک شد و بازتابش آن در طول موجهای بین 564-514 نانومتر ردیابی شد.

کلون‌سازی ژن‌ها و ساخت پلاسمید

پس از ساخت پلاسمیدهای نوترکیب حاوی هر دو ژن $virD_2$ و *yGFP* برای تعیین صحت ورود ژن $virD_2$ بدرون پلاسمیدهای حامل ژن *yGFP* آنالیزهای برش آنزیمی و سپس توالی‌یابی ساخته‌های مذکور انجام شد. برش‌های آنزیمی توسط آنزیم‌های برشی *EcoRV*،*EcoRI* و *SmaI* ایجاد باندهای مورد انتظار را کرد (شکل ۲). صحت نوکلئوتیدی

جدول ۱- پلاسمیدهای مورد استفاده در این پژوهش جهت کلون سازی ژن و ایجاد پروتئین‌های نوترکیب

پلاسمید	ویژگی	منبع
pGBDKc1.*vir*D_2	*ADH1* promoter, Gal4 BD, AmpR, *TRP1*, Kan, ori, carrying *vir*D_2	(A.Briancon-Marjollet and H. van Attikumچاپ نشده)
pUG34	*MET25* promoter, *HIS3*, CEN6/ARS4, AmpR, ori, N-terminal y*GFP* fusion site	(U. Güldener and J. H. Hegemannچاپ نشده,)
pUG35	*MET25* promoter, *URA3*, CEN6/ARS4, AmpR, ori, C-terminal y*GFP* fusion site	(U. Güldener and J. H. Hegemannچاپ نشده,)
pUG36	*MET25* promoter, *URA3*, CEN6/ARS4, AmpR, ori, N-terminal y*GFP* fusion site	(U. Güldener and J. H. Hegemannچاپ نشده,)



شکل ۲- شمایی از تجزیه‌های برش آنزیمی پلاسمیدهای ساخته شده‌ی حامل *vir*D_2-*GFP* .

پلاسمید pUG35.*vir*D_2 برش خورده با EcoRI (لاین ۲، ca. 7550 bp)، SmaI (لاین ۳، ca. 7550 bp)، EcoRV (لاین ۴، ca. 5132 bp & 2418 bp) و پلاسمید شاهد (لاین ۵).

B) پلاسمید pUG36.*vir*D_2 برش خورده با EcoRV (لاین ۲، ca. 5852 bp & 1692 bp)، پلاسمید شاهد (لاین ۲)، EcoRI (لاین ۳۲، ca. 7550 bp)، SmaI (لاین ۴، ca. 7550 bp).

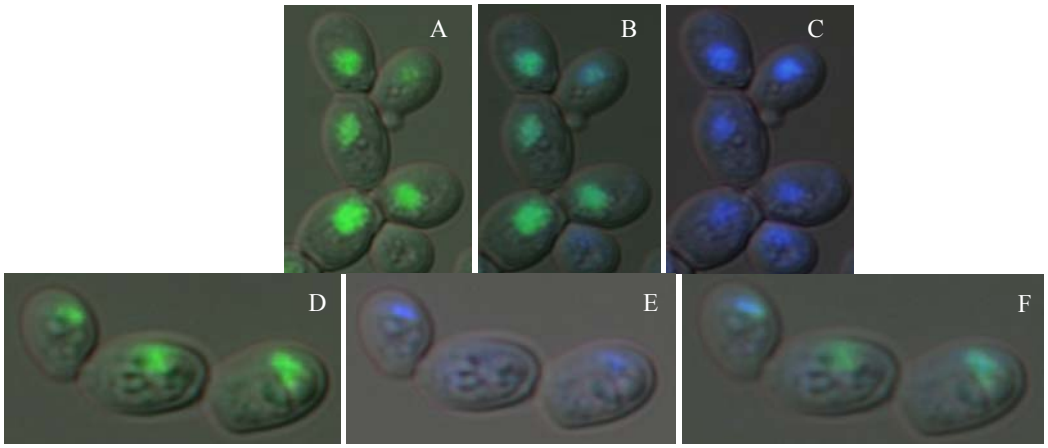
لاین‌های ۱ هر ژل باندهای DNA Ladder ده کیلوبازی ست.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-09-01]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.2.7.4]

پلاسمیدهای ساخته شده‌ی pUG34-*vir*D_2، pUG35-*vir*D_2 و pUG36-*vir*D_2 توسط توالی یابی نیز تائید شد (نتایج ارائه نشده). همانطور که از محتوای جدول (۱) بر می‌آید وکتورهای حامل ژن *GFP* دارای پروموتر ژن *MET25* هستند که درست پس از پروموتر و یا در ناحیه‌ی پایان ژن GFP دارای ناحیه‌ی برش آنزیمی برای واردسازی ژن بیگانه می‌باشند. ژن مورد نظر ما در وکتورهای pUG34-*vir*D_2، pUG35-*vir*D_2 و pUG36-*vir*D_2 در هردو جایگاه وارد شده و پس از رونویسی توسط RNA Polymerase بصورت یک نسخه mRNA حاوی هردو ژن رونویسی می‌شود.

جایگیری درون هسته‌ای پروتئین $VirD_2$ در سلول‌های مخمر *S.cerevisiae*

برای مکان‌یابی پروتئین $VirD_2$ در سلول *S.cerevisiae* این پروتئین از پایانه‌های آمینو و کربوکسیلی‌اش به پروتئین گزارشگر y*GFP* متصل و درون سلول مخمر بیان شد. بدین منظور از استرین اکسوتروف مخمر (*MATα his3Δ1 ura3-52*) که در محیط‌های حداقلی فاقد هیستیدین و اوراسیل قادر به رشد نیست استفاده شد. انتقال وکتورهای حامل ژن *GFP.vir*D_2 (جدول ۱) که دارای ژن‌های نشانگر *URA3* و یا *HIS3* می‌باشند به مخمر مذکور توانایی رشد و جداسازی آن‌ها در محیط حداقلی را می‌دهد. پس از جداسازی استرین‌های نوترکیب حامل وکتورهای جدید، مطالعات میکروسکوپی دنبال شد. بدین منظور سلول‌های مخمر نوترکیب کشت شبانه داده شدند. مشاهدات بیانگر آن بود که سلول‌های مخمر حاوی پروتئین $VirD_2$ متصل شده از پایانه‌ی آمینویی‌اش به پایانه‌ی کربوکسیلی y*GFP* (بیان شده از پلاسمیدهای pUG34 و pUG36) مشخصاً جایگیری درون هسته‌ای داشتند (شکل 1A و 1D). همانطور که در شکل یک دیده می‌شود رنگ‌آمیزی DAPI (B,E) که مختص رنگ‌آمیزی اسیدهای نوکلئیک و کروماتین‌ها می‌باشد مکان هسته را در عکس مذکور نشان می‌دهد و بطور همزمان تابش فلورسنت سبز (GFP متصل به $VirD_2$) هم فقط در همان مکان که هسته است دیده می‌شود. تصویرهای همپوشان دو عکس مذکور تشکیل شکلهای C و F را می‌دهند که دقیقا نشان دهنده حضور فراورده‌های پروتئینی ژن مذکور در درون هسته ست. در پژوهش حاضر، پروتئین $VirD_2$ متصل شده از پایانه‌ی کربوکسیلی‌اش به پایانه‌ی آمینویی پروتئین فلورسنت سبز (y*GFP*)، بیان شده از پلاسمید pUG35 چنین ویژگی‌ای را نشان نداد.



شکل ۱- جایگیری درون هسته‌ای پروتئین $VirD_2$ متصل شده از پایانه‌ی آمینویی‌اش به پایانه‌ی کربوکسیلی پروتئین فلورسنت سبز مخمری (y*GFP*)، بیان شده از پلاسمیدهای pUG34 (A-C) و pUG36 (D-F) در سلول‌های مخمر *S.cerevisaie* استرین CEN.pk113-3B. شکل‌های A تا D) بازتابش فلورسنت پروتئین‌های *GFP*. شکل‌های B تا E) رنگ آمیزی DAPI سلول‌های مذکور. C & F) تصویر همپوشان شکل‌های A/B و D/E. عکس‌ها توسط میکروسکوپ Zeiss Axio-plan-2 imaging microscope تهیه شده اند.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-09-01]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.2.7.4]

نتایج و بحث

طی دو دهه‌ی گذشته، همراه با گیاه *A. thaliana*، قارچ *S.cerevisiae* نیز بعنوان یک میزبان مدل ژنتیکی بسیار عالی در مطالعات تراریخت اگروباکتریومی مورد استفاده قرار گرفته است. تحقیقات انجام شده بر روی این قارچ منجر به شناسایی نقش پروتئین‌های سلول میزبان در تراریخت اگروباکتریومی شده‌اند (Soltani 2009; van Attikum et al. 2003). علاوه بر این، بدلیل ژنتیک بسیار پیشرفته‌ی مخمر S.cerevisiae هم اکنون مجموعه-ای از موتانت‌های هاپلوئید و دیپلوئید مخمر و نیز مجموعه‌ای از دیگر ابزار و مواد ژنتیکی این موجود در دسترس است که می-توانند در تحقیقات پایه‌ی تراریخت اگروباکتریومی موجودات غیرگیاهی بویژه قارچ‌ها مورد استفاده قرار گیرند. در طی سالیان اخیر، بیش از ۹۰ گونه قارچ رشته‌ای و غیررشته‌ای با استفاده از *A.tumefaciens* بسهولت تراریخت شده‌اند (Soltani et al. 2008). با این حال مطالعات بسیار محدودی در مورد عملکرد پروتئین‌های بیماری‌زایی اگروباکتریوم درون سلول‌های غیرگیاهی انجام شده است. یکی از پروتئین‌های کلیدی اگروباکتریوم در فرایند انتقال ژن، $VirD_2$ می‌باشد. T-DNA منتقل شده از اگروباکتریوم به سلول میزبان باید بتواند بدرون هسته‌ی میزبان برود تا وارد ژنوم شود. درون سیتوپلاسم سلول میزبان T-DNA که به پروتئین $VirD_2$ متصل شده توسط پروتئین‌های VirE2 پوشانده می‌شود. هردوی پروتئین‌های $VirD_2$ و VirE2 دارای توالی‌های هسته‌یاب (NLS) هستند که ورود کمپلکس T بدرون هسته‌ی سلول گیاه را تسهیل می‌کنند (Citovsky et al. 1992; Tinland et al. 1992). فرض ما بر آن بود که پروتئین$VirD_2$ چنین نقشی را نیز در سلول‌های مخمر *S.cerevisiae* ایفا میکند. لذا باید بتواند بدرون هسته‌ی سلول مخمر وارد شود. در پژوهش حاضر، بمنظور درک بهتر از عملکرد پروتئین $VirD_2$ در سلول-های مدل ژنتیکی *S.cerevisiae*، جایگیری درون سلولی پروتئین مذکور در سلول مخمر مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور پروتئین $VirD_2$ از پایانه‌ی آمینو ونیز از پایانه‌ی کربوکسیلی‌اش به پروتئین *yGFP* متصل شده و برای مکانیابی درون سلولی در *S.cerevisiae* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که پروتئین $VirD_2$ متصل شده از پایانه‌ی آمینویی‌ش به پایانه‌ی کربوکسیلی پروتئین *G*، درون هسته‌ی سلول میزبان *S.cerevisiae* جای گرفت (شکل ۱). این پدیده، مشابه جایگیری درون هسته‌ای پروتئین $VirD_2$ در سلول‌های گیاهی و پستانداران است (Citovsky et al. 1992; Tinland et al. 1992; Relić et al. 1998; Ziemienowicz et al. 1999; Ziemienowicz et al. 2001). با این‌حال در پژوهش حاضر در مورد پروتئین $VirD_2$ متصل شده از پایانه‌ی کربوکسیلی‌اش به پایانه‌ی آمینویی پروتئین *yGFP*، فقط تابش فلورسنت زمینه دیده شد. پروتئین $VirD_2$ دارای یک توالی هسته‌یاب در پایانه‌ی آمینو و یک توالی هسته یاب دو قسمتی در پایانه‌ی کربوکسیلی اش می‌باشد (Wang et al. 1990; Howard et al. 1992). در گیاهان، نشان داده شده که توالی پایانه‌ی آمینوی $VirD_2$، که دربردارنده‌ی ۷۰ درصد پروتئین می‌باشد، قادر به رساندن پروتئین بتاگالاکتوزیداز به هسته‌ی سلول می‌باشد (Herrera-Estrella et al. 1990). همچنین نشان داده شده که هردوی توالی‌های پایانه‌ی آمینو و کربوکسیلی پروتئین $VirD_2$ که از سمت پایانه‌ی کربوکسیلی‌شان به پروتئین بتاگالاکتوزیداز متصل شده‌اند قادر به رساندن پروتئین بتاگالاکتوزیداز به هسته‌ی سلول‌های گیاه بوده‌اند (Tinland et al. 1992). اتصال هردو پایانه‌ی آمینو و کربوکسیلی پروتئین $VirD_2$ به پروتئین *GFP* در سلول پستانداران نیز این پروتیئن را به هسته‌ی سلول رساند (Relić et al. 1998). اما رساندن DNAی بیگانه به هسته‌ی سلول پستانداران توسط $VirD_2$ بستگی به حضور توالی NLS پایانه‌ی کربوکسیلی $VirD_2$ دارد (Ziemienowicz et al. 1999; 2001). بطور مشابه، فقط توالی NLS پایانه‌ی کربوکسیلی $VirD_2$ که به پایانه‌ی کربوکسیلی پروتئین بتاگلوکورونیداز متصل شده بود توانست پروتئین نوترکیب را به هسته‌ی سلول گیاهی برساند (Howard et al. 1992). تفاوتهای بین پژوهش‌های دیگران و پژوهش حاضر می‌تواند به علت تاثیر ژن‌های گزارش‌گر متفاوت متصل شده به پایانه‌ی آمینو یا کربوکسیلی پروتئین $VirD_2$ بر عملکرد توالی هسته‌یاب $VirD_2$، سلول‌های میزبان متفاوت مورد استفاده، و طول‌های متفاوت از پروتئین $VirD_2$ باشد. پژوهش حاضر با استفاده از پروتئین گزارش‌گر فلورسنت سبز، اهمیت توالی NLS پایانه‌ی کربوکسیلی پروتئین $VirD_2$ در جایگیری درون هسته‌ای این پروتئین در سلول غیرگیاهی مخمر را می-

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-09-01]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.2.7.4]

رساند. اتصال پروتئین $VirD_2$ از سمت پایانه‌ی کربوکسیلی‌اش به پروتئین *yGFP* احتمالا عملکرد توالی NLS این بخش را مختل میکند، در حالیکه با اتصال *yGFP* به سمت پایانه‌ی آمینوی پروتئین $VirD_2$، هنوز توالی هسته‌یاب سمت پایانه‌ی کربوکسیلی فعال است و جایگیری درون هسته‌ای پروتئین نوترکیب را باعث می‌شود. در مجموع این یافته بیانگر توانایی انتقال $VirD_2$ بدرون هسته‌ی سلول قارچ آسکومیست *S.cerevisiae* و اهمیت توالی NLS پایانه‌ی کربوکسیلی پروتئین $VirD_2$ در این پدیده می‌باشد. این خود بیانگر پتانسیل استفاده از پروتئین $VirD_2$ در هدف‌گیری T-DNA حامل هرگونه تراژن بدرون هسته و ژنوم سلول‌های میزبان قارچی می‌باشد. همچنین با توجه به استفاده از تکنیک سیستم دوهیبریدی مخمری (Y2H System) در بررسی و شناسایی پروتئین‌های برهمکنش‌گر با یکدیگر در هسته‌ی سلول *S.cerevisiae*، این یافته بیانگر امکان شناسایی پروتئین‌های برهمکنش‌گر سلول مخمر با پروتئین $VirD_2$ می‌باشد که می‌تواند در آینده کمک به هدف‌گیری انتخابی ژن‌ها در سلول‌های یوکاریوتی کند.

تقدیر و تشکر

نگارندگان بدین‌وسیله از A.Briancon-Marjollet، H.van Attikum و Gerda Lamers از موسسه‌ی زیست‌شناسی دانشگاه لایدن هلند تشکر می‌نمایند. از Prof. Dr. J. H. Hegemann (دانشگاه دوسلدورف آلمان) بدلیل دراختیار گذاشتن پلاسمیدهای حامل y*GFP* تشکر می‌گردد. این پژوهش با مساعدت مالی وزارت علوم، تحقیقات و فناوری ایران (گرنت شماره 800363 به جلال سلطانی) و گروه ژنتیک ملکولی دانشگاه لایدن هلند انجام شده است.

منابع

Bako L, Umeda M, Tiburcio AF, Schell J, Koncz C (2003) The $VirD_2$ pilot protein of *Agrobacterium*-transferred DNA interacts with the TATA box-binding protein and a nuclear protein kinase in plants. Proc Natl Acad Sci USA 100:10108–10113.

Ballas N, Citovsky V (1997) Nuclear localization signal binding protein from *Arabidopsis* mediates nuclear import of *Agrobacterium* $VirD_2$ protein. Proc Natl Acad Sci USA 94:10723-8.

Bundock P (1999) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of yeasts and fungi. PhD thesis, 119 pp. Leiden University, Leiden, The Netherlands.

Citovsky V, Zupan J, Warnick D, Zambryski P (1992) Nuclear localization of *Agrobacterium* VirE2 protein in plant cells. Science 256:1802-1805.

Citovsky V, Kozlovsky SV, Lacroix B, Zaltsman A, Dafny-Yelin M, Vyas S, Tovkach A, Tzfira T (2006) Biological systems of the host cell involved in *Agrobacterium* infection. Cell Microbiol 9:9-20.

Gietz RD, Woods RA (2002) Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. Methods Enzymol 350:87–96.

Hašek J, Streiblová E (1996) Fluorescence microscopy methods. In: Yeast Protocols: Methods in Cell and Molecular Biology vol. 53, pp.391–406. Edited by I.H. Evans, Humana Press, Totowa, New Jersey, USA.

Herrera-Estrella A, Van Montagu M, Wang K (1990) A bacterial peptide acting as a plant nuclear targeting signal: the amino-terminal portion of *Agrobacterium* $VirD_2$ protein directs a beta-galactosidase fusion protein into tobacco nuclei. Proc Natl Acad Sci U S A 87:9534-9537.

Howard E, Zupan J, Citovsky V, Zambryski, PC (1992) The $VirD_2$ protein of *A. tumefaciens* contains a C-terminal bipartite nuclear localization signal: implications for nuclear uptake of DNA in plant cells. Cell 68:109–118.

Li J, Krichevsky A, Vaidya M, Tzfira T, Citovsky V (2005) Uncoupling of the functions of the Arabidopsis VIP1 protein in transient and stable plant genetic transformation by Agrobacterium. Proc Natl Acad Sci USA 102:5733–5738.

Relić B, Andjelkovic M, Rossi L, Nagamine Y, Hohn B (1998) Interaction of the DNA modifying proteins VirD1 and $VirD_2$ of *Agrobacterium tumefaciens*: analysis by subcellular localization in mammalian cells. Proc Natl Acad Sci USA. 95:9105–9110.

Rossi L, Hohn B, Tinland, B (1993) The $VirD_2$ protein of *Agrobacterium tumefaciens* carries nuclear localization signals important for transfer of T-DNA to plants. Mol Gen Genet 239:345–353

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 2nd Edition. Cold Spring Habour Laboratory Press, New York.

Sherman, F. (1991) Getting started with yeast. Methods Enzymol 194:3-21.

Soltani J (2009) Host genes involved in *Agrobacterium*-mediated transformation. PhD thesis, Leiden University, The Netherlands, 141 pp.

Soltani J, Van Heusden GPH, Hooykaas PJJ (2009) Deletion of host histone acetyltransferases and deacetylases strongly affects *Agrobacterium*-mediated transformation of *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol Lett 298: 228-233.

Takahashi R, Valeika SA, Glass KW (1992) A simple method of plasmid transformation of *E. coli* by rapid freezing. Biotechniques 13:711-715.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-09-01]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.2.7.4]

Tinland B, Koukolíková-Nicola Z, Hall MN, Hohn B (1992) The T-DNA-linked $VirD_2$ protein contains two distinct functional nuclear localization signals. *Proc Natl* Acad Sci USA. 89:7442–7446.

Tzfira T, Vaidya M, Citovsky V (2001) VIP1, an *Arabidopsis* protein that interacts with *Agrobacterium* VirE2, is involved in VirE2 nuclear import and *Agrobacterium* infectivity. EMBO J 20:3596-3607.

Van Attikum H, Bundock P, Hooykaas PJJ (2001) Non-homologous end-joining proteins are required for *Agrobacterium* T-DNA integration. EMBO J 20:6550–6558.

Van Attikum H, Hooykaas PJJ (2003) Genetic requirements for the targeted integration of *Agrobacterium* T-DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. Nucleic Acid Res 31:826–832.

Van Hemert M J, Deelder A M, Molenaar C, Steensma H Y. and van Heusden GPH (2003) Self-association of the Spindle Pole Body-related Intermediate Filament Protein Fin1p and Its Phosphorylation-dependent Interaction with 14-3-3 Proteins in Yeast. J Biol Chem 278:15049-15055.

Wang K, Herrera-Estrella A, Van Montagu M (1990) Overexpression of virD1 and $virD_2$ genes in Agrobacterium tumefaciens enhances T-complex formation and plant transformation. J Bacteriol 172:4432–4440.

Ziemienowicz A, Görlich D, Lanka E, Hohn B, Rossi L (1999) Import of DNA into mammalian nuclei by proteins originating from a plant pathogenic bacterium. Proc Natl Acad Sci USA 96:3729–3733.

Ziemienowicz A, Merkle T, Schoumacher F, Hohn B, Rossi L (2001) Import of Agrobacterium T-DNA into plant nuclei. Two distinct functions of $VirD_2$ and VirE2 proteins. Plant Cell 13:369–384.

Zonneveld BJM (1986) Cheap and simple yeast media. J Microbiol Methods 4:287-291.

Zhu J, Oger PM, Schrammeijer B, Hooykaas PJ, Farrand, SK, Winans SC, 2000 The bases of crown gall tumorigenesis. J Bacteriol 182:3885–3895.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-09-01]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.2.7.4]