

جایگیری درون هسته‌ای پروتئین *Agrobacterium VirD2* در مدل

ژنتیکی *Saccharomyces cerevisiae*

جلال سلطانی^{۱*}، جاناناتان 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 می‌فرستد. پروتئین بیماری‌زایی VirD₂ 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 غیر گیاهی نیز می‌باشد. وجود پروتئین VirD₂ فعال برای تراریخت اگروباکتریومی سلول‌های گیاهی و غیر گیاهی ضروری است. در این پژوهش با استفاده از پروتئین فلورسنت سبز (yGFP)، جایگاه درون سلولی پروتئین VirD₂ در سلول‌های قارچ مدل ژنتیکی *Saccharomyces cerevisiae* مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور، ابتدا ژن virD₂ توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تکثیر و در پلاسمید pGBDKc1 کلون شد. سپس ژن مذکور بدرون جایگاه‌های کلونینگ وکتورهای pUG34، pUG35 و pUG36 که حامل ژن yGFP تحت کنترل پروموتور MET25 می‌باشند کلون شد. انتقال ژن به استرین‌های اکسوتروف *S. cerevisiae*، بروش شیمیایی استات لیتوم انجام شد. نتایج مطالعات فلورسنس میکروسکوپی نشان داد که VirD₂ 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 VirD₂ در جایگیری درون هسته‌ی این پروتئین در سلول غیر گیاهی مخمر را می‌رساند.

واژه‌های کلیدی

Agrobacterium

GFP

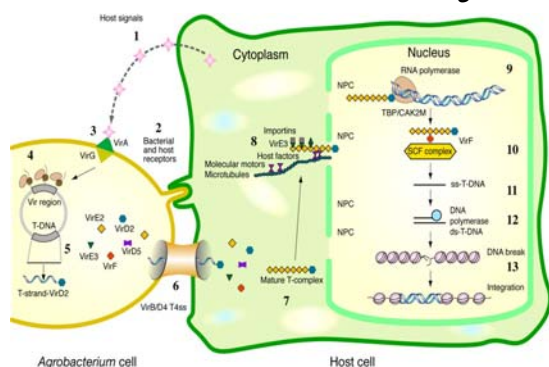
Saccharomyces cerevisiae

VirD₂

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.

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 ترشی 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). VirD2 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، انوماپیست‌ها، 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 2009; Attikum 2003; Soltani 2009). از آنجا که پروتئین VirD2 دارای نقش‌های مهمی در سلول‌های میزبان گیاهی است و با توجه به دامنه‌ی میزبانی بسیار وسیع سیستم انتقال ژن اگروباکتریومی، در پژوهش حاضر جایگاه درون سلولی پروتئین VirD2 در سلول‌های 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.

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 است 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 بیماری‌زایی (Vir) مختلفی را تولید می‌کند که در فرآیند ایجاد تومور (گال) نقش‌های متفاوتی ایفا می‌کنند. در این بین، پروتئین اندونوکلاز VirD2 به‌همراه پروتئین‌های VirD1 و VirC1 در تشکیل تک رشته‌ی T-DNA نقش دارد. پروتئین VirD2 به‌صورت کووالان به گروه فسفات آزاد شده‌ی پایانه‌ی ۵' رشته‌ی T-DNA متصل می‌شود بصورت یک پروتئین راهبر انتقال رشته‌ی T-DNA از طریق سیستم ترشی نوع IV اگروباکتریوم را هدایت می‌کند. این سیستم ترشی توسط پروتئین‌های VirB1- VirD4/11 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 VirD2 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 VirD2 با تعدادی سایکلوپیلین گیاهی، پروتئین Cak2M و پروتئین متصل شونده به ناحیه‌ی TATA (TBP) برهمکنش دارد (Bako et al. 2003). درون هسته‌ی سلول میزبان، پروتئین VirD2 ممکن است در ادغام T-DNA بدرون ژنوم میزبان نقش داشته باشد، هرچند این فرآیند عمدتاً توسط پروتئین‌های سلول میزبان انجام می‌شود (van

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 و کتورهای 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 (*MATa 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* به 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 جدا شده از مخمر در استرین *E. coli* XL1-blue تکثیر شدند.

ساخت پلاسمید

برای کلون‌کردن ژن *virD2* در پلاسمید pGBDKc1 (van Hemert et al, 2003)، قسمت پایانه‌ی 3' ژن *virD2* که فاقد 379 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 پلیمرز به کار گرفته شدند. بعد از برش آنزیمی فرآورده‌ی مذکور با اندوکلنازهای *SalI* و *BglII*، محصول نهایی بدرون پلاسمید pGBDKc1 که توسط همان اندوکلنازها برش خورده بود کلون شد. قسمت پایانه‌ی 5' ژن *virD2* (379 جفت‌باز) با انجام PCR بر روی پلاسمید pVD43 بدست آمد. به این منظور از آغازگر VirD2*SalI*p2 (5'-ACGCGTCGACGTCATGCCCCGATCGCGTCAAG-3' که یک جایگاه برش آنزیمی *SalI* در بالادست رمز شروع رونویسی

(ATG) پدید می‌آورد و آغازگر VirD2p2 (5'-TATTCGGTCCTTCCTGTCTCTAGGTCCCCC-3' استفاده شد. سپس این قطعه با آنزیم *SalI* برش خورده و بدرون ناحیه‌ی برش آنزیمی *SalI* در پلاسمید pGBDKc1 که حاوی پایانه‌ی 3' ژن *virD2* بود وارد شد و پلاسمید pGBDKc1.virD2 بدست آمد. به‌منظور ایجاد پروتئین‌های نوترکیب yGfp-VirD2 و VirD2-yGfp، قطعه‌ی *XmaI-EcoRI* حامل *virD2* از پلاسمید pGBDKc1.virD2 بدرون ناحیه‌ی برش *XmaI-EcoRI* پلاسمیدهای حامل ژن *yGFP* بنام‌های pUG34، pUG35 و pUG36 کلون شد. در وکتورهای نوترکیب pUG34-*virD2* و pUG36-*virD2* ژن *virD2* از طرف پایانه‌ی آمینوآش و در وکتور pUG35-*virD2* ژن *virD2* از طرف پایانه‌ی کربوکسیلی‌اش به *yGFP* متصل شده و تحت کنترل پروموتور ژن *MET17* (alias *MET25*) است. لیست و ویژگی‌های پلاسمیدهای مورد استفاده در این پژوهش جهت کلون‌سازی 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'-GATGAGAAGATACCCACACC-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 بر روی محیط کشت MY حاوی مواد غذایی لازم غریبال شدند (Zonneveld 1986).

مطالعات فلورسنس میکروسکوپی

رنگ‌آمیزی هسته‌ی سلول مخمر توسط 4 و 6-دی آمیدینو-2-فنیل ایندول (DAPI) انجام شد. بدین منظور کشت‌های شبانه از استرین مخمر CEN.pk113-3B که حاوی پروتئین VirD2 متصل به پروتئین *yGFP* می‌باشند با سانتریفیوژ رسوب داده شده و در یک میلی لیتر الکل اتانول 70 درصد مجدداً حل شدند (Hašek and Streiblová 1996). پس از 5 دقیقه، سلول‌ها مجدداً برداشت شده و در 25 µL از محلول DAPI با غلظت 0.1 µg/ml حل

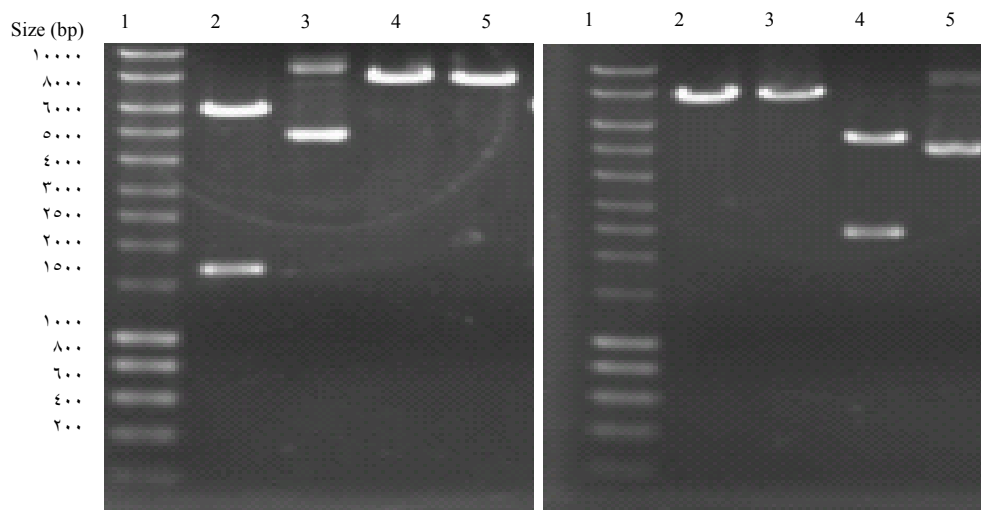
پس از ساخت پلاسمیدهای نو ترکیب حاوی هر دو ژن *virD2* و *yGFP* برای تعیین صحت ورود ژن *virD2* بدرون پلاسمیدهای حامل ژن *yGFP* آنالیزهای برش آنزیمی و سپس توالی‌یابی ساخته‌های مذکور انجام شد. برش‌های آنزیمی توسط آنزیم‌های برشی *EcoRV*، *EcoRI* و *SmaI* ایجاد باندهای مورد انتظار را کرد (شکل ۲). صحت نوکلئوتیدی

شدند. سپس 5 μ L از سوسپانسیون مخمر رنگ‌آمیزی شده توسط DAPI برای مطالعات میکروسکوپی مورد استفاده قرار گرفت. علاوه، 5 μ L 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 514-564 نانومتر ردیابی شد.

کلون‌سازی ژن‌ها و ساخت پلاسمید

جدول ۱- پلاسمیدهای مورد استفاده در این پژوهش جهت کلون‌سازی ژن و ایجاد پروتئین‌های نو ترکیب

منبع	ویژگی	پلاسمید
(A. Briancon-Marjollet and H. van Attikum)	<i>ADHI</i> promoter, Gal4 BD, AmpR, <i>TRP1</i> , Kan, ori, carrying <i>virD2</i>	pGBDKc1. <i>virD2</i>
(U. Guldener and J. H. Hegemann,)	<i>MET25</i> promoter, <i>HIS3</i> , CEN6/ARS4, AmpR, ori, N-terminal <i>yGFP</i> fusion site	pUG34
(U. Guldener and J. H. Hegemann,)	<i>MET25</i> promoter, <i>URA3</i> , CEN6/ARS4, AmpR, ori, C-terminal <i>yGFP</i> fusion site	pUG35
(U. Guldener and J. H. Hegemann,)	<i>MET25</i> promoter, <i>URA3</i> , CEN6/ARS4, AmpR, ori, N-terminal <i>yGFP</i> fusion site	pUG36



شکل ۲- شمایی از تجزیه‌های برش آنزیمی پلاسمیدهای ساخته شده‌ی حامل *virD2-GFP*.

پلاسمید *pUG35.virD2* 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).

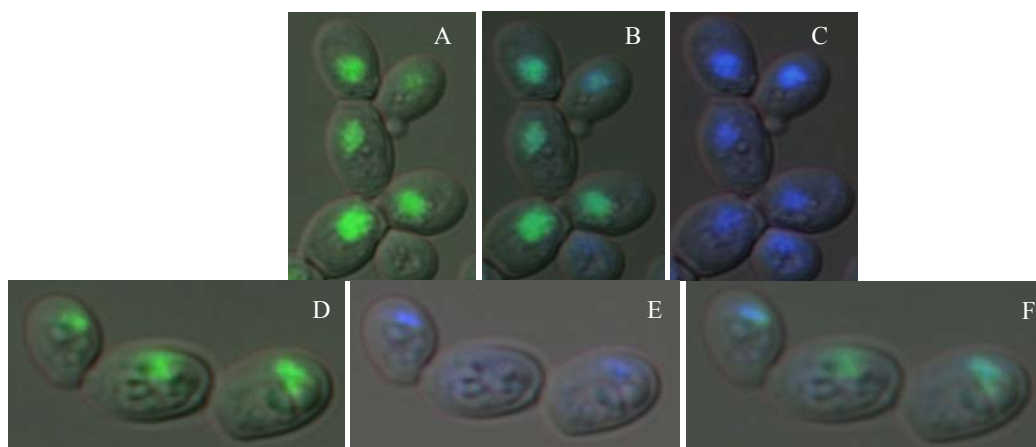
(B) پلاسمید *pUG36.virD2* برش خورده با *EcoRV* (لاین ۲، ca. 5852 bp & 1692 bp)، پلاسمید شاهد (لاین ۳)، *EcoRI* (لاین ۴، ca. 7550 bp)، *SmaI* (لاین ۵، ca. 7550 bp).

لاین‌های ۱ هر ژل باندهای DNA Ladder ده کیلو بایز است.

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 *VirD2* متصل شده از پایانه‌ی آمینویی‌اش به پایانه‌ی کربوکسیلی *yGFP* (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 *VirD2* هم فقط در همان مکان که هسته است دیده می‌شود. تصویرهای همپوشان دو عکس مذکور تشکیل شکل‌های C و F را می‌دهند که دقیقاً نشان دهنده حضور فراورده‌های پروتئینی ژن مذکور در درون هسته است. در پژوهش حاضر، پروتئین *VirD2* متصل شده از پایانه‌ی کربوکسیلی‌اش به پایانه‌ی آمینویی پروتئین فلورسنت سبز (*yGFP*)، بیان شده از پلاسمید pUG35 چنین ویژگی‌ای را نشان نداد.

پلاسمیدهای ساخته شده‌ی pUG34-*virD2*، pUG35-*virD2* و pUG36-*virD2* توسط توالی یابی نیز تأیید شد (نتایج ارائه نشده). همانطور که از محتوای جدول (۱) بر می‌آید وکتورهای حامل ژن *GFP* دارای پروموتور ژن *MET25* هستند که درست پس از پروموتور و یا در ناحیه‌ی پایان ژن *GFP* دارای ناحیه‌ی برش آنزیمی برای واردسازی ژن بیگانه می‌باشند. ژن مورد نظر ما در وکتورهای pUG34-*virD2*، pUG35-*virD2* و pUG36-*virD2* 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 *VirD2* در سلول‌های مخمر *S.cerevisiae* برای مکان‌یابی پروتئین *VirD2* در سلول *S.cerevisiae* این پروتئین از پایانه‌های آمینو و کربوکسیلی‌اش به پروتئین گزارشگر *yGFP* متصل و درون سلول مخمر بیان شد. بدین منظور از استرین اکسوتروف مخمر (*MATa his3Δ1 ura3-52*) که در محیط‌های حداقلی فاقد هیستیدین و اوراسیل قادر به رشد نیست استفاده شد. انتقال وکتورهای حامل ژن *GFP.virD2* (جدول ۱) که دارای ژن‌های نشانگر *URA3* و یا *HIS3* می‌باشند به مخمر



شکل ۱- جایگیری درون هسته‌ای پروتئین *VirD2* متصل شده از پایانه‌ی آمینویی‌اش به پایانه‌ی کربوکسیلی پروتئین فلورسنت سبز مخمری (*yGFP*)، بیان شده از پلاسمیدهای pUG34 (A-C) و pUG36 (D-F) در سلول‌های مخمر *S.cerevisiae* استرین CEN.pk113-3B. شکل‌های A تا D) بازتابش فلورسنت پروتئین‌های *GFP*. شکل‌های B تا E) رنگ‌آمیزی DAPI سلول‌های مذکور. C & F) تصویر همپوشان شکل‌های A/B و D/E. عکس‌ها توسط میکروسکوپ Zeiss Axio-plan-2 imaging microscope تهیه شده‌اند.

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 مجموعه‌ای از موتانت‌های هاپلوئید و دیپلوئید مخمر و نیز مجموعه‌ای از دیگر ابزار و مواد ژنتیکی این موجود در دسترس است که می‌توانند 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* به‌سہولت 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، VirD₂ می‌باشد. T-DNA منتقل شده از اگروباکتریوم به سلول میزبان باید بتواند بدرون هسته‌ی میزبان برود تا ژنوم شود. درون سیتوپلاسم سلول میزبان T-DNA که به پروتئین VirD₂ متصل شده توسط پروتئین‌های VirE2 پوشانده می‌شود. هردوی پروتئین‌های VirD₂ 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 VirD₂ 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 VirD₂ در سلول‌های مدل ژنتیکی *S. cerevisiae*، جایگیری درون سلولی پروتئین مذکور در سلول مخمر مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور پروتئین VirD₂ از پایانه‌ی آمینو و نیز 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 VirD₂ 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 VirD₂ 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 این حال در پژوهش حاضر در مورد پروتئین VirD₂ متصل شده از پایانه‌ی کربوکسیلی‌اش به پایانه‌ی آمینویی پروتئین yGFP، فقط تابش فلورسنت زمینه دیده شد. پروتئین VirD₂ دارای یک توالی هسته‌یاب در پایانه‌ی آمینو و یک توالی هسته‌یاب دو قسمتی در پایانه‌ی کربوکسیلی‌اش می‌باشد (Wang et al. 1992; Howard et al. 1990). در گیاهان، نشان داده شده که توالی پایانه‌ی آمینوی VirD₂، 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 VirD₂ 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 VirD₂ به پروتئین GFP در سلول پستانداران نیز این پروتئین را به هسته‌ی سلول رساند (Relić et al. 1998). اما رساندن DNA ییگانه به هسته‌ی سلول پستانداران توسط VirD₂ بستگی به حضور توالی NLS پایانه‌ی کربوکسیلی VirD₂ دارد (Ziemienowicz et al. 1999; 2001). بطور مشابه، فقط توالی NLS پایانه‌ی کربوکسیلی VirD₂ که به پایانه‌ی کربوکسیلی پروتئین بتاگلوکوروئیداز 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 VirD₂ بر عملکرد توالی هسته‌یاب VirD₂، سلول‌های میزبان متفاوت مورد استفاده، و طول‌های متفاوت از پروتئین VirD₂ باشد. پژوهش حاضر با استفاده از پروتئین گزارش‌گر فلورسنت سبز، اهمیت توالی NLS پایانه‌ی کربوکسیلی پروتئین VirD₂ در جایگیری درون هسته‌ای این پروتئین در سلول غیرگیاهی مخمر را می‌

S.cerevisiae، این یافته بیانگر امکان شناسایی پروتئین‌های برهمکنش‌گر سلول مخمر با پروتئین *VirD2* 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 *yGFP* تشکر می‌گردد. این پژوهش با مساعدت مالی وزارت علوم، تحقیقات و فناوری ایران (گرت شماره 800363 به جلال سلطانی) و گروه ژنتیک ملکولی دانشگاه لایدن هلند انجام شده است.

رساند. اتصال پروتئین *VirD2* از سمت پایانه‌ی کربوکسیلی‌اش به پروتئین *yGFP* احتمالاً عملکرد توالی NLS این بخش را مختل میکند، در حالیکه با اتصال *yGFP* به سمت پایانه‌ی آمینوی پروتئین *VirD2*، هنوز توالی هسته‌یاب سمت پایانه‌ی کربوکسیلی فعال است و جایگیری درون هسته‌ای پروتئین نو ترکیب را باعث می‌شود. در مجموع این یافته بیانگر توانایی انتقال *VirD2* بدرون هسته‌ی سلول قارچ آسکومیسیت *S.cerevisiae* و اهمیت توالی NLS پایانه‌ی کربوکسیلی پروتئین *VirD2* در این پدیده می‌باشد. این خود بیانگر پتانسیل استفاده از پروتئین *VirD2* 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

منابع

- Bako L, Umeda M, Tiburcio AF, Schell J, Koncz C (2003) The *VirD2* 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 VirD2* 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 VirD2* 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 *VirD2* 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 *VirD2* 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 *VirD2* 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 Harbour 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.

Tinland B, Koukolíková-Nicola Z, Hall MN, Hohn B (1992) The T-DNA-linked VirD₂ 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 virD₂ 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 VirD₂ 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.