

תנועת נגיפים מתא לתא בצמח

זיו שפיגלמן וחגית האק

המחלקה לפתולוגיה של צמחים וחקר העשבים, מנהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני, דרך המכבים 68, ראשון לציון

תקציר

נגיפים (וירוסים) צמחיים הינם ממחוללי המחלה החקלאיים החשובים הגורמים לנזקים קשים במגוון רחב של גידולים. אחת התכונות המשותפות לכלל נגיפי הצמחים היא יכולתם לנוע בצמח. לשם כך, הם מקודדים לחלבוני תנועה (movement proteins) המאפשרים לנגיף לנוע מתא לתא ולהתפשט בצמח השלם. נגיפים מסוגים שונים מקודדים למגוון רחב של חלבוני תנועה הפועלים באסטרטגיות תנועה שונות. חלבוני התנועה מנצלים את המערכת התאית של הפונדקאי על מנת להעביר את הנגיף מתא לתא. לשם כך, הם נקשרים למגוון אלמנטים בתא המודבק הכוללים חלבונים ספציפיים של הפונדקאי, השלד התוך תאי ודרך תעלות המקשרות בין הציטופלסמות של התאים (Plasmodesmata). במקרים מסוימים, מערכות ההגנה של הצמח מסוגלות לזהות את חלבוני התנועה ולהקנות עמידות כנגד הנגיף בתגובה לחלבונים אלו. לפיכך, חלבוני תנועה הינם גורם חשוב במהלך המחלה ובתגובת הצמח לנגיף.

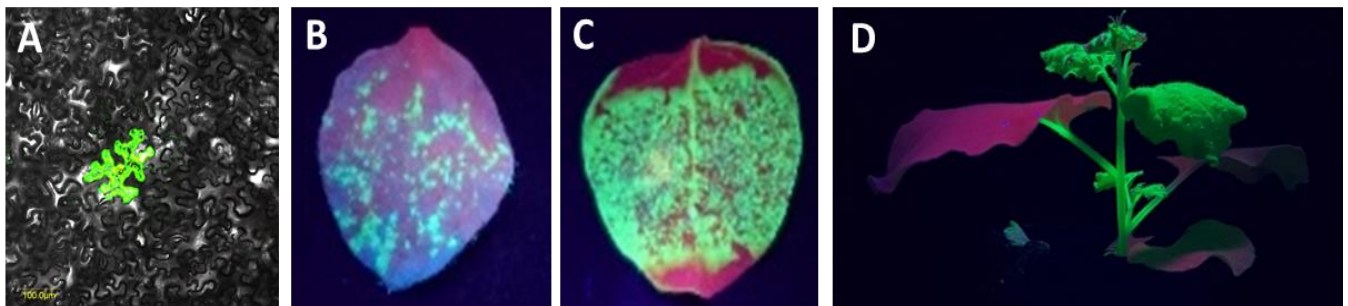
אופן הציטוט: שפיגלמן ז' והאק ח' (2021) **תנועת נגיפים מתא לתא בצמח**. בספר **תובנות חדשות במחלות צמחים**, בעריכת אלעד י', דומברובסקי א', מנוליס-ששון ש' ועזרא ד', הוצאת המחלקה לפתולוגיה של צמחים וחקר העשבים.
<https://volcaniarchive.agri.gov.il/skn/tu/e51977>



מבוא

מחלה נגיפית (ויראלית) של הצמח מתאפשרת באמצעות מספר מנגנונים מקבילים הכוללים בין היתר את שכפול הנגיף ונטרול מנגנוני הגנה צמחיים. אחד החשובים שבמנגנונים אלו הוא יכולת התנועה וההתפשטות של הנגיף בצמח. תנועת הנגיף מאפשרת לו להגיע לתאים חדשים ורקמות חדשות ולהפיץ את עצמו בצורה יעילה. ניתן לחלק תנועה ויראלית לשני שלבים עיקריים (Lucas et al., 2006). השלב הראשון הוא תנועה מתא לתא (איור 1A-C). תנועה זו מתבצעת דרך תעלות המקשרות בין הציטופלסמות של התאים ((PD) Plasmodesmata), קשרים המחברים בין שני תאים סמוכים ויוצרים ביניהם המשכיות בתנועת המזל התוך תאי, הציטופלסמה. בתוך תעלות ה-PD מעוגנת הרשתית האנדופלסמית (Endoplasmic reticulum, ER) אשר היוצרת גם היא רצף בין

שני התאים המקושרים (איור 2A). בצמחים בריאים, PD מאפשרים מעבר של מגוון מולקולות צמחיות הכוללות מטבוליטים, פפטידים, הורמונים, חלבונים ו-RNA. בזמן הדבקה נגיפית, חלבוני תנועה (movement proteins) של הנגיף מנצלים את ה-PD ומשנים את תכונותיה על מנת לאפשר תנועה בין-תאית. השלב השני הינו תנועה סיסטמית של הנגיף (איור 1D). שלב זה מתבצע לאחר שהנגיף נע מתא לתא והגיע לרקמות ההובלה של הצמח הכוללות את העצה (מערכת הולכת המים והמינרלים של הצמח) והשיפה (מערכת הולכת המוטמעים). בשלב זה, נגיפים חודרים למערכת השיפה ונעים בצינורות הכברה עם כיוון זרימת הולכת המוטמעים, מאברי מקור המייצרים סוכרים (בעיקר עלים בוגרים), לאברי מבלע הצורכים סוכרים (שורשים, קודקודי צמיחה, עלים צעירים פרחים ופירות).



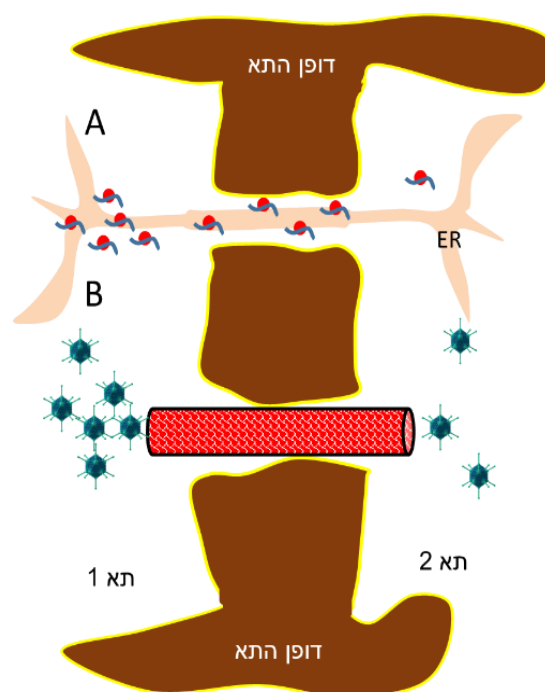
איור 1. תנועה של Tobacco mosaic virus מהונדס (רקומביננטי) המבטא את החלבון הפלואורסנטי GFP בצמח השלם. (A) בשלב הראשון ההדבקה מתרחשת בתאים בודדים. (B) בהמשך, הנגיף נע אל תאים סמוכים דרך תעלות ה-PD עד שהוא מגיע אל צרורות ההובלה (C). (D) הנגיף מתפשט דרך מערכת השיפה אל אברי המבלע של הצמח: עלים צעירים, קודקודים, שורשים, פרחים ופירות.

פרק זה עוסק במנגנונים המולקולריים והפיזיולוגיים המאפשרים תנועה ויראלית בצמח. רובו של הפרק עוסק בחלבון התנועה של נגיף המוזאיקה של הטבק Tobacco mosaic virus (TMV) השייך לסוג של הטובמווירוסים *Tobamovirus*. זאת משני טעמים: האחד הוא כי זהו המנגנון הנחקר ביותר לתנועה של נגיפים בצמח וקיים מודל מפורט ומבוסס על אופן פעולתו. השני הוא כי שניים מהנגיפים המזיקים ביותר לגידולי הירקות, Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV) ו-Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) הינם מאותו סוג, *Tobamovirus*, ולהם ככל הנראה מנגנון תנועה דומה.

ראשית, נכיר מגוון חלבוני התנועה המאפשרים את מעברם של נגיפים שונים מתא לתא. לאחר מכן, נעסוק במנגנונים באמצעותם חלבוני תנועה ויראליים פועלים, כשההתמקדות תהיה באינטראקציה של חלבוני תנועה עם רכיבים תוך-תאיים וחלבונים של הצמח הפונדקאי. לבסוף, פרק זה יעסוק באינטראקציה של חלבון התנועה עם מערכת החיסון הצמחית.

אסטרטגיות תנועה מתא לתא של נגיפים צמחיים

התנועה של מולקולות אנדוגניות דרך PD הינה מבוקרת וספציפית. לפיכך, על חלבוני התנועה הנגיפיים בראש ובראשונה לשנות את הפעולה של תעלות אלו על מנת לאפשר מעבר חופשי של הנגיף. ניתן לחלק את תנועת הנגיפים לשני סוגים עיקריים: 1. **תנועה שלא בעזרת צינורית** (איור 2A): חלבוני תנועה נקשרים לחומצת הגרעין הנגיפי, ללא חלבון המעטפת, ולמעשה מעבירים אותה דרך PD. באופן תנועה זה, אין שינויים גדולים במבנה ה-PD אך תכונותיהן משתנות כך שהן יכולות להעביר מולקולות גדולות יותר. דוגמאות לסוגי נגיפים הנעים בצורה זו הן *Tobamovirus* ו-*Tombusviruses* (Niehl and Heinlein, 2011). 2. **תנועה בעזרת צינורית** (איור 2B): חלבוני התנועה מתפלמרים ליצירת צינורית אשר חודרת דרך ה-PD, מרחיבה אותה ומגדילה את היכולת שלה להוליך מולקולות גדולות. אסטרטגיה זו מאפשרת מעבר ויריונים שלמים מתא לתא. נגיפים הפועלים באסטרטגיה זו עשויים להיות נגיפי RNA חד גדילי (כמו למשל הסוג *Bromovirus*, Van Lent et al., 1991), RNA דו גדילי (כמו *Tospovirus*, Storms et al., 1995) ו-DNA דו גדילי (כמו הסוג *Caulimovirus*, Perbal et al., 1993). יש לציין כי במנגנון זה, ה-PD מרוקנת מהמרכיבים אותם היא מכילה, שתפקידם לבקר תנועה בין תאית ולמעשה הופכת לצינורית.



איור 2. שתי אסטרטגיות תנועה מתא לתא של נגיפים בצמח. (A) תנועה שלא בעזרת צינורית. הגנום הנגיפי נקשר לחלבוני תנועה המעבירים אותו מתא לתא. (B) תנועה בעזרת צינורית. צינוריות מרחיבות את מפתח ה-PD ומאפשרות מעבר של ויריונים שלמים.

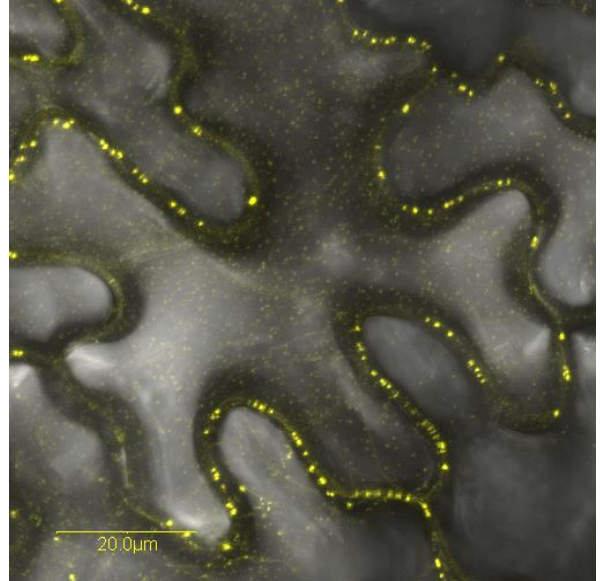
חלבון התנועה של TMV – המודל הראשון לתנועת נגיפים מתא לתא

מחקרים אנטומיים פורצי דרך בנגיף TMV (סוג: *Tobamovirus*) מאמצע המאה הקודמת גילו כי חלקיקים נגיפיים מרוכזים ב-PD ובחוליות כברה של מערכת השיפה (Esau et al., 1968), ממצא שחיזק את ההשערה כי נגיפים

לא נעים בצמח באופן דיפוזי, וכי קיימים מנגנונים מבוקרים המאפשרים את תנועתם. מאוחר יותר, הוכח כי התנועה והשכפול של TMV מבוקרים על ידי שני מנגנונים בלתי-תלויים (Nishiguchi et al., 1978). עבודה זו בוצעה באמצעות מוטנטים רגישי-טמפרטורה של TMV, בהם המחלה נעצרת כאשר הצמח נחשף לטמפרטורות גבוהות (32 מ"צ). בטמפרטורות אלו, נראה כי אין פגיעה בשכפול הנגיף בתא המודבק, אולם תנועתו מתא לתא מפסיקה. מאוחר יותר, התגלה כי המוטציה הגורמת לרגישות זו ממוקמת בחלבון הנגיפי במשקל 30 kiloDalton (30K) (Leonard and Zaitlin, 1982). מחקר נוסף גילה כי חלבון ה-30K אכן חיוני לתנועת הנגיף מתא לתא (Meshi et al., 1987). לפיכך חלבון זה קיבל את השם "חלבון התנועה" (Movement protein).

השלב הבא היה אפיון המנגנון באמצעותו חלבון התנועה מאפשר את מעבר הנגיף מתא לתא. Tomenius et al. (1987) גילו כי חלבון התנועה ממוקם ב-PD (איור 3), ממצא שהעלה את ההשערה כי חלבון התנועה משנה את תפקוד ה-PD על מנת לאפשר העברה של נגיפים. אכן, במחקר פורץ דרך, Wolf et al. (1989) מצאו כי חלבון התנועה מסוגל לשנות את תכונות ה-PD ומאפשרת למולקולות גדולות יותר לעבור דרכה. מאוחר יותר התגלה כי חלבון התנועה הוא בעל יכולת לקשור RNA חד-גדילי (Citovsky et al., 1990; Citovsky et al., 1992). מחקרים אלו סללו את הדרך למודל בו חלבון התנועה נקשר ל-RNA הנגיפי ומעביר אותו מתא לתא דרך PD. מחקרים נוספים אפיינו את האזורים בחלבון התנועה המאפשרים את שלוש הפונקציות הללו. חלבון התנועה מורכב מ-268 ח' אמינו. נמצא כי 55 חומצות אמינו בקצה ה-C טרמינלי של החלבון אינן חיוניות לתפקידו, אך ח' האמינו 195-213 חיוניות למיקומו ב-PD (Berna et al., 1991). עוד נמצא כי ח' האמינו במיקום 3-5 חיוניות לתפקוד החלבון (Lapidot et al., 1993). בנוסף, נמצא כי החלק המרכזי של החלבון (ח' אמינו 126-224) חיוני לתפקידו בשינוי תכונות ה-PD (Waigmann et al., 1994). לאחרונה נמצא כי ח' האמינו 1-50 יכולות לשמש כסיגנל להגעה ל-PD ושאיחוי של מקטע זה לחלבונים אחרים יכול להוביל אותם ל-PD (Yuan et al., 2016). סדרת מחקרים חלוציים אלו היוותה תשתית ומודל ראשוני לחקר התנועה הנגיפית בצמח.

איור 3. ביטוי חלבון התנועה של TMV המאוחד לחלבון הפלואורסנטי YFP בתאי אפידרמיס של *Nicotiana benthamiana*. הנקודות בקצוות התאים הינן PD המקשרות בין תא לתא.



חלבוני תנועה אחרים

המחקר בחלבון התנועה של TMV פרץ דרך לסדרה של מחקרים המאפיינים את חלבוני התנועה של נגיפים שונים. נתמקד במספר סוגי נגיפים אשר להם מנגנוני תנועה שונים מזה של TMV.

חלבון התנועה 3a: מופיע בנגיפים מהסוגים *Bromovirus* ו-*Cucumovirus* הכוללים את *Brome mosaic virus* (BMV), המדביק בעיקר צמחים חד-פסיגיים ו-*Cucumber mosaic virus* (CMV) המדביק בעיקר צמחים דו-פסיגיים. נגיפים אלו נעים תנועה מבוססת צינורית כמתואר לעיל. בחלק ממיני הנגיפים, כמו CCMV, 3a מתפקד לבד בתנועה מתא לתא (Rao, 1997), אך ב-BMV, התנועה מתבצעת באמצעות פעולה משותפת של חלבון התנועה וחלבון המעטפת (Schmitz and Rao, 1996). עבור CMV התמונה מורכבת יותר, חלבון ה-3a יכול להספיק לצורך תנועת הנגיף מתא לתא, אולם בפועל, דרושה נוכחותו של חלבון המעטפת בכדי שהובלה זו תהיה יעילה (Ding et al., 1995; Kaplan et al., 1998). מוטציות ספציפיות ב-3a יכולות לגרום לקשירה חזקה יותר של ה-RNA הנגיפי ולתנועה המסתמכת על 3a ללא תלות ביצירה של ויריון שלם (Kaplan et al., 1998; Andreev et al., 2004). לפיכך נראה כי התנועה מתא לתא של CMV הוא תהליך מורכב ודינמי שלעתים מסתמך על חלבון המעטפת, אשר ככל הנראה מחזק את האפיניות בין חלבון התנועה ל-RNA הנגיפי.

חלבוני תנועה מסוג Triple gene block (TGB): מופיעים בסוגים שונים של נגיפים אך ניתן לחלקם שתי קבוצות עיקריות: אלו מהסוג של *Potex* ואלו מהסוג של *Hordei-like* המכילים נגיפים מהסוגים *Benyvirus*, *Hordeivirus*, *Pomovirus*, *Pecluvirus* ו-*TGBp1*, *TGBp2*, *TGBp3*. מדובר בשלושה חלבוני תנועה: *TGBp1*, *TGBp2* ו-*TGBp3* אשר פעולתם המשותפת חיונית לתנועה מתא לתא. ל-*TGBp1* יכולת לקשור RNA (Donald et al., 1997) והוא בעל פעילות של helicase (Kalinina et al., 2002). החלבוני *TGBp2* ו-*TGBp3* הם חלבוני ממברנליים אשר נקשרים ל-*TGBp1* ומאפשרים לו להעביר את ה-RNA הנגיפי מתא לתא דרך PD (Lim et al., 2008). ב-

potexvirus, כגון Potato virus X (PVX), נדרש גם חלבון המעטפת על מנת לאפשר תנועה מתא לתא (Lough, 2000).

חלבון התנועה BC1: מקודד ע"י נגיפי DNA חד-גדילי דו-חלקי מהסוג *Begomovirus*. חלבון זה נקשר סלקטיבית ל-DNA ולא ל-RNA באורך ובתצורה שמתאימים לשלב הרפליקציה של הנגיף (DNA דו-גדילי, אורך של 2-3 Kb). בנוסף יש לציין כי כיוון שמדובר בנגיף DNA, לאחר התנועה מתא לתא על הנגיף להיכנס לגרעין התא. לשם כך קיים חלבון נוסף בשם BV1 המשמש כ-nuclear shuttling protein המכניס את גנום הנגיף לגרעין. ככל הנראה, שילוב החלבונים הנ"ל הינו חיוני לתנועת הנגיף מתא לתא (Gilbertson et al., 2003). חשוב לציין כי נגיפי *Begomovirus* חד חלקיים, כמו Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV), מקודדים לחלבון C4 שכל הנראה משמש כחלבון התנועה (Hak et al., 2015).

נגיפים ללא חלבוני תנועה ייחודיים: הסוג Potyvirus הינו בעל מספר מיני הנגיפים הרב ביותר מבין נגיפי הצמחים. באופן מפתיע, נגיפים אילו אינם מקודדים לחלבון תנועה ייעודי, אך ככל הנראה מפצים על כך בפעילותם המשותפת של חלבונים אחרים. חלבוני Potyvirus החיוניים לתנועה הינם חלבון המעטפת (Dolja et al., 1994; Wei et al., 1995), חלבון ה- CI (Carrington et al., 1998) ו-P3N-PIPO (Wen and P3N-PIPO, 2010; Hajimorad, 2010). כל החלבונים הנ"ל ממוקמים ב-PD ומוטציות בכל אחד מהחלבונים מונעת תנועה מתא לתא של הנגיף. לאחרונה נמצא שלחלבון P3N-PIPO יש יכולת תנועה מתא לתא ללא תלות בחלבוני הנגיף האחרים, וכי יכולת זו תלויה בחלבון PCaP1 של הצמח הפונדקאי (Vijayapalani et al., 2012). ראוי לציין כי קיימות עדויות כי לחלבון ה-HC-Pro תפקיד בויסות התנועה ארוכת הטווח של הנגיף (Sáenz et al., 2002).

המנגנון התאי המאפשר תנועת נגיפים מתא לתא

חלבוני התנועה מאפשרים את מעבר הנגיף מתא לתא בעזרת אינטראקציה עם גורמים ספציפיים בתוך התא. ניתן לומר שחלבוני התנועה "משתלטים" על התא ורותמים מגוון רכיבים תאיים למשימה זו. בחלק זה, נתמקד במנגנון התאי המבקר את תנועת ה-TMV. מנגנון זה נחקר בצורה מעמיקה וכיום קיים מודל מפורט של תנועת TMV על שלביה השונים. בפרק זה נפרט את המנגנון התאי המבקר את התנועה וכיצד רכיבים מבניים שונים בתוך התא מווסתים תנועה זו.

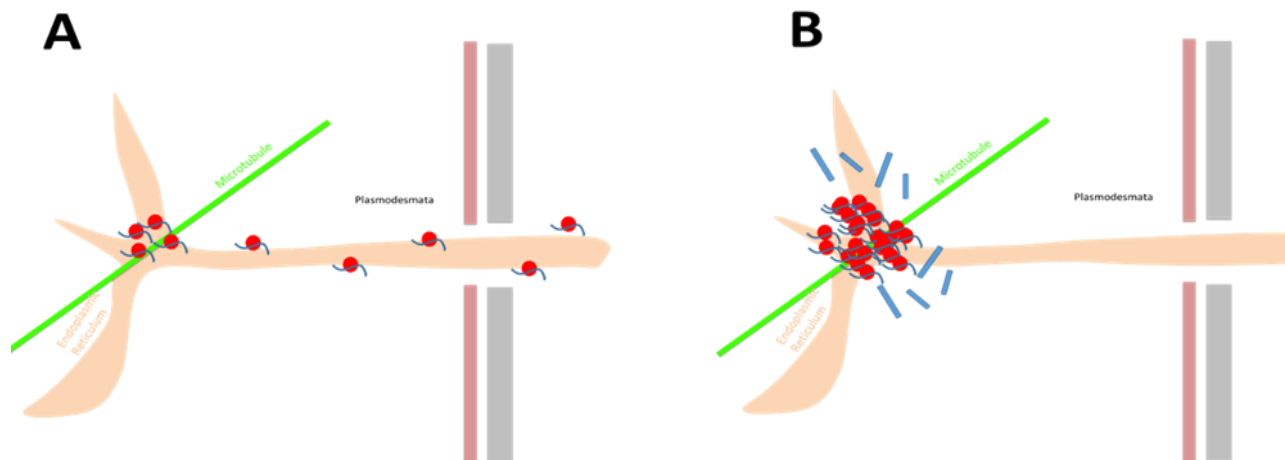
לאחר החדירה לתא, הנגיף יוצר גופיפים ממברנלים המשמשים לשכפולו (Viral Replication Complexes; VRCs) אך גם חיוניים לתנועה. גופיפים אלו כוללים את חלבוני התנועה, הגנום הנגיפי והרפליקאז הנגיפי. הם ממוקמים על הרשתית האנדופלסמית (Endoplasmic Reticulum, ER) ויכולים לנוע עליה או להיות נייחים (Heinlein, 2015). ה-VRCs הניידים מגיעים ל-PD לצורך תנועה וקיימות עדויות לכך ש-VRC שלמים יכולים לעבור מתא לתא (Kawakami et al., 2004). מצד שני, ייתכן ומדובר בתנועה דיפוזית דרך ה-ER שעובר בפלסמודסטה (Guenoune-Gelbart et al., 2008). ניתן לחלק את "חיי" ה-VRCs בתא לשלושה שלבים (ע"פ Heinlein, 2015):

1. **Early VRC (איור 4A):** גופיפים קטנים, ניידים בתוך התא, יכולים להגיע ל-PD ולעבור מתא לתא. תנועת הגופיפים האלה היא על רשת האקטין/רשתית אנדופלסמית והם נעצרים מדי פעם על צמתים של הרשתית האנדומפלסמית עם מיקרוטובולי.

2. **Late VRC (איור 4B):** גופיפי הסגר גדולים, לא ניידים, המהווים למעשה "מפעלים ויראליים" המייצרים את ויריונים שלמים. נוצרים בעיקר לאחר שהנגיף כבר התפשט מהתא ונע לתאים הסמוכים. גופים אלו מעוגנים על צמתים בין רשת ה-ER למיקרוטובולי ומייצרים כמויות גדולות של הנגיף השלם.

3. **שלב הפירוק:** גופיפי ה-VRC מפורקים ע"י מערכת פירוק החלבונים בתא והתא חוזר לתפקוד תקין.

מחקרים רבים אפיינו את תפקיד השלד התוך תאי, הבנוי מאקטין ומיקרוטובולי, בתנועה של הנגיף. כיום, רוב המידע מצביע על כך שלאקטין יש תפקיד מכריע בתנועה של הנגיף. לעומת זאת, תפקיד המיקרוטובולי עודו לוט בערפל. פירוק אקטין באמצעות כימיקלים חוסם את התנועה מתא לתא של TMV אך לעומת זאת לפירוק כימי של מיקרוטובולי אין השפעה על התנועה (Kawakami et al., 2004). מיוזינים הם חלבוני מנוע (motor proteins) המאפשרים תנועה של אברונים וגופיפים לאורך סיבי האקטין. לאחרונה, (Amarí et al., 2014) הראו כי חלבוני מיוזין חיוניים לתנועה של TMV ולהכוונה של חלבון התנועה ל-PD. נראה שבעוד שלחלבוני המיוזין XI-2 ו-XI-K השפעה כללית על היווצרות ה-VRC והדינמיקה שלהם בתוך התא, לחלבוני מיוזין מקבוצת VIII תפקיד ישיר בתנועת הנגיף ל-PD ומשם לתא הסמוך.



איור 4. שלבי ההדבקה הנגיפית בתאים. Early VRC (A): גופיפים ממברנליים קטנים נוצרים בצמתים שבין המיקרוטובולי ל-ER. גופים אלו הינם ניידים בתוך התא, יכולים להגיע ל-PD ולעבור לתא הסמוך. Late (B) VRC, נקראים גם Viral factories, גופיפים גדולים המעוגנים על צמתי ER ומיקרוטובולי ומשמשים לייצור ויריונים שלמים. גופיפים אלו אינם ניידים ולא נעים מתא לתא.

לגבי תפקידם של מיקרוטובולי, התמונה היא יותר מורכבת. קישור של חלבון התנועה של TMV עם מיקרוטובולי נצפתה עוד לפני למעלה מ-20 שנה (Heinlein et al., 1995; Heinlein et al., 1998), אולם עד היום לא ברור תפקידם בתנועה של הנגיף. למוטנטים של חלבון התנועה של TMV אשר לא נקשרים למיקרוטובולי הייתה דווקא תנועה מוגברת מתא לתא (Gillespie et al., 2002). כיום, ידוע שגופיפי ה-VRC, הכוללים את חלבוני התנועה, ממוקמים בצמתים בין המיקרוטובולי ל-ER. נקודות אלו משמשות לעגינה של מגוון אברונים תוך תאיים (Hamada et al., 2012) ומשמשות לעצירה של אברונים שהינם ניידים בתא. ייתכן שנקודות אלו משמשות לאינטראקציה בין רכיבי הנגיף השונים או בין הנגיף לבין חלבונים צמחיים הקשורים לתנועה. עוד ייתכן שהגופיפים הקשורים למיקרוטובולי משמשים מאגר של גופיפי תנועה המשוחררים בצורה מבוקרת לצורך תנועה מתא לתא. בכך, מיקרוטובולי מעכב את תנועת הנגיף, אך מדובר בעיכוב מבוקר המשמר "רזרבות" של נגיפים ניידים בתוך התא.

חלבונים צמחיים המעורבים בתנועת הנגיף מתא לתא

כפי שהוזכר לעיל, חלבוני התנועה הנגיפיים משמשים לתנועה מתא לתא בעזרת אינטראקציה עם חלבונים ספציפיים של הפונדקאי. אינטראקציות אלו מאפשרות לנגיף לרתום תהליכים תאיים על מנת לאפשר את מעבר הנגיף מתא לתא. במהלך 20 השנים אחרונות, נמצאו מספר חלבונים אליהם נקשר חלבון התנועה של TMV והמאפשרים את תפקודו. נפרט כמה מהם:

Pectin methylesterase (Chen et al., 2000): חלבון הממוקם בדופן התא, ונקשר לחלבון התנועה של TMV כמו גם לחלבוני תנועה של מספר נגיפים אחרים. היעדר קישור לחלבון התנועה גורם להפסקה של התנועה מתא לתא. בהתאם, השתקה של הגן המקודד ל- Pectin methylesterase גורמת לעיכוב בתנועה הסיסטמית של הנגיף (Chen and Citovsky, 2003).

MPB2C (Kragler et al., 2003): חלבון הנקשר ישירות לחלבון התנועה של TMV ולמיקרוטובולי. ביטוי ביתר של MPB2C מעכב את תנועתו של חלבון התנועה מתא לתא ומגביר את יכולת הקישור שלו למיקרוטובולי. השתקת MPB2C אינה משפיעה על תנועת הנגיף אך מפסיקה את הקישור שלו למיקרוטובולי (Curin et al., 2007). נתונים אלו מחזקים את ההשערה שקישור חלבון התנועה למיקרוטובולי מעכב את תנועת הנגיף ונראה כי MPB2C משמש כגורם מתווך בקישור זה.

Calreticulin (Chen et al., 2005): חלבון ממשפחה של חלבונים מסיסים קושרי סידן. נקשר לחלבון התנועה ומעכב את תנועתו לתא בכך שמונע את מיקומו ל-PD וגורם לו להקשר למיקרוטובולי, בדומה ל-MPB2C.

Ankyrin repeat-containing protein (ANK) (Ueki et al., 2010): חלבון אשר נקשר ישירות לחלבון התנועה של TMV ב-PD ומאפשר את תנועתו. לפיכך, תנועה ויראלית מוגברת בביטוי ביתר של ANK ומופחתת

כאשר ANK מושתק. ANK מאפשר את התנועה מתא לתא ע"י פירוק של קאלוז, פוליסכריד המצוי ב-PD וחוסם אותה.

Synaptotagmin A (SYTA) (Lewis and Lazarowitz, 2010): נקשר לחלבון התנועה של TMV ו-begomovirus ומאפשר את תנועתם. השתקה או מוטציה ב SYTA גורמת לעיכוב בתנועה מתא לתא של הנגיף. SYTA ממוקם בצמתים שבין קרום התא ל-ER (Levy et al., 2015). בעת הדבקה ויראלית, האינטראקציה בין חלבון התנועה ל-SYTA גורמת לצמתים האלו לשנות את מיקומם ולהגיע ל-PD. מנגנון זה דרוש לתנועת הנגיף מתא לתא. לאחרונה התגלה ש SYTA נקשר בחלבון התנועה לאותו רצף ח. אמינו אשר נמצא כחיוני להגעה ל-PD (Yuan et al., 2018). לפיכך, נראה ש SYTA הוא גורם חשוב בתנועה מתא לתא של הנגיף. כיוון שהחלבונים המתוארים לעיל דרושים לתנועה של הנגיף, קיים בסיס להניח שפגיעה בהם באמצעות מוטציה תהיה אסטרטגיה מועילה לפיתוח עמידות לנגיפים. אחת הבעיות בגישה זו היא כי לרוב מדובר בחלבונים אשר להם גם תפקיד בהתפתחות התקינה של הצמח ופגיעה בהם ככל הנראה תפגע גם בצימוח וביבול.

אינטראקציה בין חלבוני תנועה ומנגנון העמידות של הצמח

כיום, האמצעי היעיל ביותר להקניית עמידות לנגיפים מבוסס על גנים דומיננטיים להגנה (R genes). רוב הגנים האלו מקודדים לרצפטורים מסוג nucleotide binding leucine rich repeat (NLR) (DeYoung and Innes, 2006). NLRs מזהים מולקולות ספציפיות או חלבונים של מחולל המחלה ע"י קשירתן בצורה ישירה או עקיפה (Padmanabhan and Dinesh-Kumar, 2014). קשירה זו מפעילה תגובת עמידות אשר מבודדת את מחולל המחלה, בד"כ ע"י הרג של הרקמה בתהליך המכונה Hypersensitive response (HR). בעגבנייה, עמידות כנגד tobamovirus הושגה בעזרת הגן *Tm-2* והאלל שלו *Tm-2²* שמקורם בהכלאה עם מין הבר *Solanum peruvianum*. שני האללים מפעילים תגובת עמידות בצמח ע"י זיהוי של חלבון התנועה של הנגיף. בשנים האחרונות הופיעו גזעים עמידים של Tomato mosaic virus (ToMV) ששוברים את *Tm-2*. לפיכך, *Tm-2²* נותרה העמידות היחידה כנגד Tobamovirus בעגבנייה (Strasser and Pfitzner, 2007). *Tm-2²* מקודד ל-NLR אשר נקשר לחלבון התנועה הנגיפי. קשירה זו מתבצעת על קרום התא (Chen et al., 2017). קיים מידע סותר על האופן בו חלבון התנועה מזוהה ע"י *Tm-2²*. בתחילה, נמצא כי 30 ח' האמינו בקצה ה-C טרמינלי של חלבון התנועה חיוניים להפעלת *Tm-2²* (Weber et al., 1993; Weber and Pfitzner, 1998). אולם מחקרים מאוחרים יותר הראו כי מחיקה של הקצה ה-C טרמינלי עדיין מאפשרת את זיהוי חלבון התנועה ע"י *Tm-2²* (Weber et al., 2004; Chen et al., 2017).

לאחרונה הופיע tobamovirus חדש בשם ToBRFV, אשר מסוגל להתחמק מכל העמידויות הידועות בעגבנייה, כולל *Tm-2* ו-*Tm-2²* (Luria et al., 2017). כיום, ToBRFV הינה המחלה הנפוצה ביותר בגידולי העגבנייה בארץ, ופוגעת קשות בכמותם ואיכותם של היבולים. העדר העמידות הגנטית כנגד ToBRFV גרם

למחלה זו להפוך לאיום משמעותי על גידול העגבניות בעולם, ודיווחים חדשים מרחבי העולם מעידים כי מדובר במגיפה עולמית של ממש (Menzel et al., 2019; Cambrón-Crisantos et al., 2018; Yan et al., 2019; Ling et al., 2019). מאנליזות ביואינפורמטיות עולה כי שבירת העמידות נובעת ככל הנראה משינויים ברצף חלבון התנועה (Maayan et al., 2018). לפיכך, פענוח מנגנון האינטראקציה בין $Tm-2^2$ לחלבון התנועה יוכל לעזור להבין מהו הגורם להתחמקות מהעמידות וכיצד ניתן לשנות את אותו מנגנון בכדי ליצור עמידות חדשה ומקיפה יותר.

סיכום

תנועת נגיפים בצמח הינה מנגנון מורכב, הכולל מספר רב של אלמנטים הן מצד הנגיף והן מצד הצמח הפונדקאי. מנגנוני תנועה ויראליים עשויים לשמש כ"עקב אכילס" של הנגיף, אשר פגיעה בו יכולה להקנות עמידות מפני נגיפים. אולם, התמונה היא ככל הנראה מורכבת יותר. רוב האלמנטים של הפונדקאי אשר הנגיף נעזר בהם לתנועה הינם חיוניים להתפתחות תקינה של הצמח ומכאן שפגיעה בהם הינה בלתי אפשרית בטיפוח של זנים חקלאיים. יש לזהות גורמים תאיים נוספים הדרושים לתנועת הנגיף אשר פגיעה בהם לא תהיה משמעותית לגדילה תקינה של הצמח ויהיה ניתן לפגוע בהם על מנת למנוע תנועה ויראלית. בנוסף, במהלך האבולוציה, צמחים פיתחו מנגנוני הגנה אשר מזהים את חלבוני התנועה הנגיפיים ומשתמשים בהם לתגובות הגנה. גישה נוספת לפיתוח עמידות היא חקר של מנגנונים אלו על מנת לפתח שיטות מתקדמות להקניית עמידות לנגיפים חדשים ושוברי עמידות.

מקורות

- Amari K., Di Donato M., Dolja V. V. and Heinlein M. (2014) Myosins VIII and XI play distinct roles in reproduction and transport of tobacco mosaic virus. *PLoS Pathogens* 10:e1004448.
- Andreev I. A., Kim S. H., Kalinina N. O., Rakitina, D. V., Fitzgerald A. G., Palukaitis P. and Taliansky M. E. (2004) Molecular interactions between a plant virus movement protein and RNA: Force spectroscopy investigation. *Journal of Molecular Biology* 339: 1041-1047.
- Berna A., Gafny R., Wolf S., Lucas W. J., Holt C. A. and Beachy R. N. (1991) The TMV movement protein: Role of the C-terminal 73 amino acids in subcellular localization and function. *Virology* 182: 682-689.
- Cambrón-Crisantos J. M., Rodríguez-Mendoza J., Valencia-Luna J. B., Rangel S. A., de Jesús García-Ávila C. and López-Buenfil J. A. (2018) First report of *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) in Michoacan, Mexico. *Mexican Journal of Phytopathology* 37: 185-192.
- Carrington J. C., Jensen P. E. and Schaad M. C. (1998) Genetic evidence for an essential role for potyvirus CI protein in cell-to-cell movement. *The Plant Journal* 14: 393-400.

- Chen M. H. and Citovsky V. (2003) Systemic movement of a tobamovirus requires host cell pectin methylesterase. *The Plant Journal* 35: 386-392.
- Chen M. H., Sheng J., Hind G., Handa A. K. and Citovsky V. (2000) Interaction between the tobacco mosaic virus movement protein and host cell pectin methylesterases is required for viral cell-to-cell movement. *The EMBO Journal* 19: 913-920.
- Chen M. H., Tian G. W., Gafni Y. and Citovsky V. (2005) Effects of calreticulin on viral cell-to-cell movement. *Plant physiology* 138: 1866-1876.
- Chen T., Liu D., Niu X., Wang J., Qian L., Han L., Liu N., Zhao J., Hong Y. and Liu Y. (2017) Antiviral resistance protein Tm-2² functions on the plasma membrane. *Plant Physiology* 173: 2399-2410.
- Citovsky V., Knorr D., Schuster G. and Zambryski P. (1990) The P30 movement protein of tobacco mosaic virus is a single-strand nucleic acid binding protein. *Cell* 60: 637-647.
- Citovsky V., Wong M. L., Shaw A. L., Prasad, B. V. and Zambryski, P. (1992) Visualization and characterization of tobacco mosaic virus movement protein binding to single-stranded nucleic acids. *The Plant Cell* 4: 397-411.
- Curin M., Ojangu E. L., Trutnyeva K., Ilau B., Truve E. and Waigmann E. (2007) MPB2C, a microtubule-associated plant factor, is required for microtubular accumulation of tobacco mosaic virus movement protein in plants. *Plant Physiology* 143: 801-811.
- DeYoung B. J. and Innes R. W. (2006) Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense. *Nature Immunology* 7: 1243.
- Ding B., Li Q., Nguyen L., Palukaitis P. and Lucas W. J. (1995) Cucumber mosaic virus 3a protein potentiates cell-to-cell trafficking of CMV RNA in tobacco plants. *Virology* 207: 345-353.
- Dolja V. V., Haldeman R., Robertson N. L., Dougherty W. G. and Carrington J. C. (1994) Distinct functions of capsid protein in assembly and movement of tobacco etch potyvirus in plants. *The EMBO Journal* 13: 1482-1491.
- Dolja V. V., Haldeman-Cahill R., Montgomery A. E., Vandenbosch K. A. and Carrington J. C. (1995) Capsid protein determinants involved in cell-to-cell and long distance movement of tobacco etch potyvirus. *Virology* 206: 1007-1016.

- Donald R. G., Lawrence D. M. and Jackson A. O. (1997) The barley stripe mosaic virus 58-kilodalton beta (b) protein is a multifunctional RNA binding protein. *Journal of Virology* 71: 1538-1546.
- Esau K. (1968) *Viruses in plant hosts. Form, distribution, and pathologic effects.* University of Wisconsin Press, Madison, USA, 225 p.
- Gilbertson R. L., Sudarshana M., Jiang H., Rojas M. R. and Lucas W. J. (2003) Limitations on geminivirus genome size imposed by plasmodesmata and virus-encoded movement protein: insights into DNA trafficking. *The Plant Cell* 15: 2578-2591.
- Gillespie T., Boevink P., Haupt S., Roberts A. G., Toth R., Valentine T., Chapman S. and Oparka, K. J. (2002) Functional analysis of a DNA-shuffled movement protein reveals that microtubules are dispensable for the cell-to-cell movement of Tobacco mosaic virus. *The Plant Cell* 14: 1207-1222.
- Guenoune-Gelbart D., Elbaum M., Sagi G., Levy A. and Epel B. L. (2008) Tobacco mosaic virus (TMV) replicase and movement protein function synergistically in facilitating TMV spread by lateral diffusion in the plasmodesmal desmotubule of *Nicotiana benthamiana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21: 335-345.
- Hak H., Levy Y., Chandran S. A., Belausov E., Loyter A., Lapidot M. and Gafni Y. (2015) TYLCV-Is movement in planta does not require V2 protein. *Virology* 477: 56-60.
- Hamada T., Tominaga M., Fukaya T., Nakamura M., Nakano A., Watanabe Y., Hashimoto T. and Baskin T. I. (2012) RNA processing bodies, peroxisomes, Golgi bodies, mitochondria, and endoplasmic reticulum tubule junctions frequently pause at cortical microtubules. *Plant and Cell Physiology* 53: 699-708.
- Heinlein, M. (2015) Plant virus replication and movement. *Virology* 479: 657-671.
- Heinlein M., Epel B. L., Padgett H. S. and Beachy R. N. (1995) Interaction of tobamovirus movement proteins with the plant cytoskeleton. *Science* 270(5244): 1983-1985.
- Heinlein M., Padgett H. S., Gens J. S., Pickard B. G., Casper S. J., Epel B. L. and Beachy R. N. (1998) Changing patterns of localization of the tobacco mosaic virus movement protein and replicase to the endoplasmic reticulum and microtubules during infection. *The Plant Cell* 10: 1107-1120.

- Kalinina N. O., Rakitina D. V., Solovyev A. G., Schiemann J. and Morozov S. Y. (2002) RNA helicase activity of the plant virus movement proteins encoded by the first gene of the triple gene block. *Virology* 296: 321-329.
- Kaplan I. B., Zhang L. and Palukaitis P. (1998) Characterization of cucumber mosaic virus. *Virology* 246: 221-231.
- Kawakami S., Watanabe Y. and Beachy R. N. (2004) Tobacco mosaic virus infection spreads cell to cell as intact replication complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101: 6291-6296.
- Kragler F., Curin M., Trutnyeva K., Gansch A. and Waigmann E. (2003) MPB2C, a microtubule-associated plant protein binds to and interferes with cell-to-cell transport of tobacco mosaic virus movement protein. *Plant Physiology* 134: 1870-1883.
- Lapidot M., Gafny R., Ding B., Wolf S., Lucas W. J. and Beachy R. N. (1993) A dysfunctional movement protein of tobacco mosaic virus that partially modifies the plasmodesmata and limits virus spread in transgenic plants. *The Plant Journal* 4: 959-970.
- Leonard D. A. and Zaitlin M. (1982) A temperature-sensitive strain of tobacco mosaic virus defective in cell-to-cell movement generates an altered viral-coded protein. *Virology* 117: 416-424.
- Levy A., Zheng J. Y. and Lazarowitz S. G. (2015) Synaptotagmin SYTA forms ER-plasma membrane junctions that are recruited to plasmodesmata for plant virus movement. *Current Biology* 255: 2018-2025.
- Lewis J. D. and Lazarowitz S. G. (2010) Arabidopsis synaptotagmin SYTA regulates endocytosis and virus movement protein cell-to-cell transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 2491-2496.
- Lim H. S., Bragg J. N., Ganesan U., Lawrence D. M., Yu J., Isogai M., Hammond J. and Jackson A.O. (2008) Triple gene block protein interactions involved in movement of Barley stripe mosaic virus. *Journal of Virology* 82: 4991-5006.
- Ling K. S., Tian T., Gurung S., Salati R. and Gilliard A. (2019) First report of Tomato brown rugose fruit virus infecting greenhouse tomato in the United States. *Plant Disease* 103: 1439.
- Lough T. J., Netzler N. E., Emerson S. J., Sutherland P., Carr F., Beck D. L., Lucas W. J. and Forster R. L. (2000) Cell-to-cell movement of potexviruses: Evidence for a

ribonucleoprotein complex involving the coat protein and first triple gene block protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13: 962-974.

Lucas W. J. (2006) Plant viral movement proteins: Agents for cell-to-cell trafficking of viral genomes. *Virology* 344: 169-184.

Luria N., Smith E., Reingold V., Bekelman I., Lapidot M., Levin I., Elad N., Tam Y., Sela N., Abu-Ras A. and Ezra N. (2017) A new Israeli Tobamovirus isolate infects tomato plants harboring Tm-22 resistance genes. *PloS one*, 12(1), p.e0170429.

Maayan Y., Pandaranayaka E. P., Srivastava D. A., Lapidot M., Levin I., Dombrovsky A. and Harel A. 2018. Using genomic analysis to identify tomato Tm-2 resistance-breaking mutations and their underlying evolutionary path in a new and emerging tobamovirus. *Archives of Virology* 163: 1863-1875.

Menzel W., Knierim D., Winter S., Hamacher J. and Heupel M. (2019) First report of Tomato brown rugose fruit virus infecting tomato in Germany. *New Disease Reports* 39: 2044-0588.

Meshi T., Watanabe Y., Saito T., Sugimoto A., Maeda T. and Okada Y. (1987) Function of the 30 kd protein of tobacco mosaic virus: involvement in cell-to-cell movement and dispensability for replication. *The EMBO Journal* 6: 2557-2563.

Niehl A. and Heinlein M. (2011) Cellular pathways for viral transport through plasmodesmata. *Protoplasma* 248: 75-99.

Nishiguchi M., Motoyoshi F. and Oshima N. (1978) Behaviour of a temperature sensitive strain of tobacco mosaic virus in tomato leaves and protoplasts. *Journal of General Virology* 39: 53-61.

Padmanabhan M. S. and Dinesh-Kumar S. P. (2014) The conformational and subcellular compartmental dance of plant NLRs during viral recognition and defense signaling. *Current Opinion in Microbiology* 20: 55-61.

Storms M. M., Kormelink R., Peters D., Van Lent J. W. and Goldbach R. W. (1995) The nonstructural NSm protein of tomato spotted wilt virus induces tubular structures in plant and insect cells. *Virology* 214: 485-493.

Strasser M. and Pfitzner A. J. P. (2007) The double-resistance-breaking Tomato mosaic virus strain ToMV1-2 contains two independent single resistance-breaking domains. *Archives of Virology* 152: 903.

- Tomenius K., Clapham D. and Meshi T. (1987) Localization by immunogold cytochemistry of the virus-coded 30K protein in plasmodesmata of leaves infected with tobacco mosaic virus. *Virology* 160: 363-371.
- Van Lent J., Storms M., Van der Meer F., Wellink J. and Goldbach R. (1991) Tubular structures involved in movement of cowpea mosaic virus are also formed in infected cowpea protoplasts. *Journal of General Virology* 72: 2615-2623.
- Vijayapalani P., Maeshima M., Nagasaki-Takekuchi N. and Miller W. A. (2012) Interaction of the trans-frame potyvirus protein P3N-PIPO with host protein PCaP1 facilitates potyvirus movement. *PLoS Pathogens* 8: p.e1002639.
- Perbal M. C., Thomas C. L. and Maule A. J. (1993) Cauliflower mosaic virus gene I product (P1) forms tubular structures which extend from the surface of infected protoplasts. *Virology* 195: 281-285.
- Rao A. L. N. (1997) Molecular studies on bromovirus capsid protein. *Virology* 232: 385-395.
- Sáenz P., Salvador B., Simón-Mateo C., Kasschau K.D., Carrington J.C. and García, J.A. (2002) Host-specific involvement of the HC protein in the long-distance movement of potyviruses. *Journal of Virology* 76: 1922-1931.
- Schmitz I. and Rao A. L. N., (1996) Molecular studies on bromovirus capsid protein: I. Characterization of cell-to-cell movement-defective RNA3 variants of brome mosaic virus. *Virology* 226: 281-293.
- Ueki S., Spektor R., Natale D. M. and Citovsky V. (2010) ANK, a host cytoplasmic receptor for the Tobacco mosaic virus cell-to-cell movement protein, facilitates intercellular transport through plasmodesmata. *PLoS Pathogens* 6: p.e1001201.
- Waigmann E., Lucas W. J., Citovsky V. and Zambryski P. (1994) Direct functional assay for tobacco mosaic virus cell-to-cell movement protein and identification of a domain involved in increasing plasmodesmal permeability. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91: 1433-1437.
- Weber H., Ohnesorge S., Silber M. V. and Pfitzner A. J. P. (2004) The Tomato mosaic virus 30 kDa movement protein interacts differentially with the resistance genes Tm-2 and Tm-2. *Archives of Virology* 149: 1499-1514.

- Weber H. and Pfitzner A. J. (1998) Tm-22 resistance in tomato requires recognition of the carboxy terminus of the movement protein of tomato mosaic virus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11: 498-503.
- Weber H., Schultze S. and Pfitzner A. J. (1993) Two amino acid substitutions in the tomato mosaic virus 30-kilodalton movement protein confer the ability to overcome the *Tm-2 (2)* resistance gene in the tomato. *Journal of Virology* 67: 6432-6438.
- Wei T., Zhang C., Hong J., Xiong R., Kasschau K. D., Zhou X., Carrington J. C. and Wang A. (2010) Formation of complexes at plasmodesmata for potyvirus intercellular movement is mediated by the viral protein P3N-PIPO. *PLoS pathogens* 6: p.e1000962.
- Wolf S., Lucas W. J., Deom C. M. and Beachy R. N. (1989) Movement protein of tobacco mosaic virus modifies plasmodesmatal size exclusion limit. *Science* 246 (4928): 377-379.
- Yan Z. Y., Ma H. Y., Han S. L., Geng C., Tian Y. P. and Li X. D. (2019) First report of tomato brown rugose fruit virus infecting tomato in China. *Plant Disease* 103: 2973-2973.
- Yuan C., Lazarowitz S. G. and Citovsky V. (2016) Identification of a functional plasmodesmal localization signal in a plant viral cell-to-cell-movement protein. *MBio* 7: e02052-15.
- Yuan C., Lazarowitz S. G. and Citovsky V. (2018) The Plasmodesmal localization signal of TMV MP is recognized by plant synaptotagmin SYTA. *MBio* 9: e01314-18.