

דו"ח סופי לתוכנית 203-0552-08

שינוי רמת חמיצות פרי ההדר ע"י מניפולציה של פעילות האקוניטאז

Manipulation of citrus fruit acidity by aconitase activity

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

ע"י

אבי צדקה, המחלקה לעצי פרי, המכון למדעי הצמח, מנהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני
לודמילה שלייזרמן, המחלקה לעצי פרי, המכון למדעי הצמח, מנהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני
נפתלי צור, המחלקה לעצי פרי, המכון למדעי הצמח, מנהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני

Avi Sadka, Department of Fruit Trees Sciences, Institute of Plant Sciences, ARO, The
Volcani Center P.O. Box 6, Bet Dagan, Israel

Lyudmila Shlizerman, Department of Fruit Trees Sciences, Institute of Plant Sciences,
ARO, The Volcani Center P.O. Box 6, Bet Dagan, Israel

Naftali Zur, Department of Fruit Trees Sciences, Institute of Plant Sciences, ARO, The
Volcani Center P.O. Box 6, Bet Dagan, Israel

יולי 2010

אב תש"ע

הממצאים בדו"ח זה הנם תוצאות ניסויים

הניסויים אינם מהווים המלצות לחקלאים

א. זיק

חתימת החוקר:

תקציר

בשנים האחרונות חקרנו את נושא החמיצות בכיוונים שונים, בניהם מטבוליזם של חומצה ציטרית. שלב חשוב בביוסינתזה של החומצה נשלט ע"י האנזים אקוניטאז, אשר הופך ציטראט לאיזוציטראט לקראת הבשלת הפרי. במסגרת התוכנית, בחנו דרכים לעיכוב מכוון של האנזים בכדי למנוע ירידה ברמת החמיצות באותם מקרים בהם זה נדרש, תוך שימוש בשני מעכבים, ציטראמאלאט ואוקסלומאלאט. לתוכנית הנוכחית היו שתי מטרות עיקריות. הראשונה, לימוד השפעת המעכבים הנ"ל על פעילות, ביטוי ורמת החלבון של אקוניטז, וכן, לימוד מנגנון הביוסינתזה של ציטראמאלאט, תוך התמקדות באנזים 2-isopropylmalate synthase (IPMS) כאנזים ביוסינטטי אפשרי. המטרה השנייה הנה לפתח כלי יישומי לשמירה על רמת החמיצות בזן אור.

הממצאים העיקריים:

1. ציטראמאלאט ואוקסלומאלאט מעכבים את פעילות האקוניטאז הן *in vitro* והן *in vivo*, כאשר הוכחנו כי הציטראמאלאט מעכב את האנזים במיטוכונדריה אך לא בציטוזול. שני המעכבים מעלים מידה מסוימת את רמת החלבון.
2. שני המעכבים מעלים רמת החומצה הציטרית בקאלוסים.
3. ציטראמאלאט מעלה רמת החומצה הציטרית בפרי, אולם באופן זמני.
4. השינויים ברמת הציטראמאלאט לאורך התפתחות הפרי מעלים ספק לגבי מעורבותו בכל שלבי צבירת החומצה.
5. האנזים IPMS אכן יכול לסנז ציטראמאלאט, וביעילות יותר גבוהה מאשר האנזים מארבידופסיס. תוצאות המחקר תורמות להבנה טובה יותר של בעיית צבירת החומצה בפרי ההדר. פיתוח כלים יעילים לבקרה שלה דורש מחקר נוסף.

מבוא

אחד המאפיינים הבולטים של פרי ההדר הינו היכולת לצבור חומצה ציטרית בכמויות ניכרות בתוך הווקואולות של תאי שקיק המיץ. החומצה הציטרית הינה החומצה העיקרית בפרי והיא מגיעה לערכי שיא של 3-5% בציפת הפרי בזנים רבים. רמת החומצה או ליתר דיוק היחס כלל מוצקים מסיים\חומצה הינו מדד חשוב הקובע את טעם הפרי ואיכותו בעת ההבשלה. בארץ מצויים זנים מצטיינים הלוקים בחומצה גבוהה בהשוואה לפרות המגיעים ממקומות אחרים בעולם. אולם, בעיית חמיצות הפרי אינה מתבטאת רק בחמיצות גבוהה, אלא גם בבעיה הפוכה של חמיצות נמוכה מדי, המביאה לטעם טפל של הפרי. בעיה זו אופיינית לזנים קליפים חדשים, ובמיוחד בעת אחסונם, אם כי היא גם עשויה להופיע עוד לפני הקטיף. למשל, מקובל שאת

הזן "אור", זן הדגל של ענף ההדרים, היה רצוי לשווק כמה שיותר מאוחר בעונה, בתקופה בה המחירים הפוטנציאליים הנם הגבוהים ביותר. אולם בגלל שהוא נוטה לאבד מחמיצותו, הוא משווק מוקדם מדי מהרצוי. ניתן לסכם כי בניגוד למצב לפני כעשור בו בעיית איכות הפרי הייתה נעוצה בעיקר בעודף חומצה במספר זנים, הרי כיום הבעיה הנה בעיקר רמת חומצה נמוכה מדי מהרצוי, בעיקר בזן אור.

כלים אגרו-טכניים לשינוי רמת החומצה הנם מוגבלים. מוגבלות הכלים האגרוטכניים הביאו ומביאים לחיפוש גישות חדשות לטיפול בבעיית חמיצות הפרי ושיפור איכותו. העמקה של הבנת המנגנון המוסת והשולט ברמת חמיצות הפרי הנה תנאי הכרחי לפיתוח גישות חדשות. במושג גישות חדשות, אין הכוונה בהכרח לגישות ביוטכנולוגיות המבוססות על צמחים מהונדסים גנטית, אלא לפיתוח של טיפולים "קונבנציונליים", המבוססים למשל על ריסוסים. בעשור האחרון נצבר ידע רב על מטבוליזם של החומצה ציטרית, טרנספורט שלה לוקואולה, וכן צבירת יוני מימן, המביאה להעלאה של חמיצות הציפה. חקרנו בשנים האחרונות את פעילות ובקרת האנזים אקוניטאז, המזרז את השלב הראשון בקטבוליזם של החומצה הציטרית, וזאת, במהלך התפתחות פרי ההדר. במסגרת המחקר הנוכחי בחנו שימוש במעכב של האקוניטאז, ציטראמאלאט, המופיע באופן טבעי בפרי ההדר, ככלי לשמירה על רמת חמיצות הציפה. במסגרת המחקר למדנו גם את מנגנון היווצרותו, וגם את אפשרות השימוש המעשי בו בשדה.

הערה: בדו"ח הכנסנו רק ספרות רלוונטית ביותר או כזו שלא נכללה בהצעת המחקר. סקירת ספרות מלאה מופיעה בהצעה.

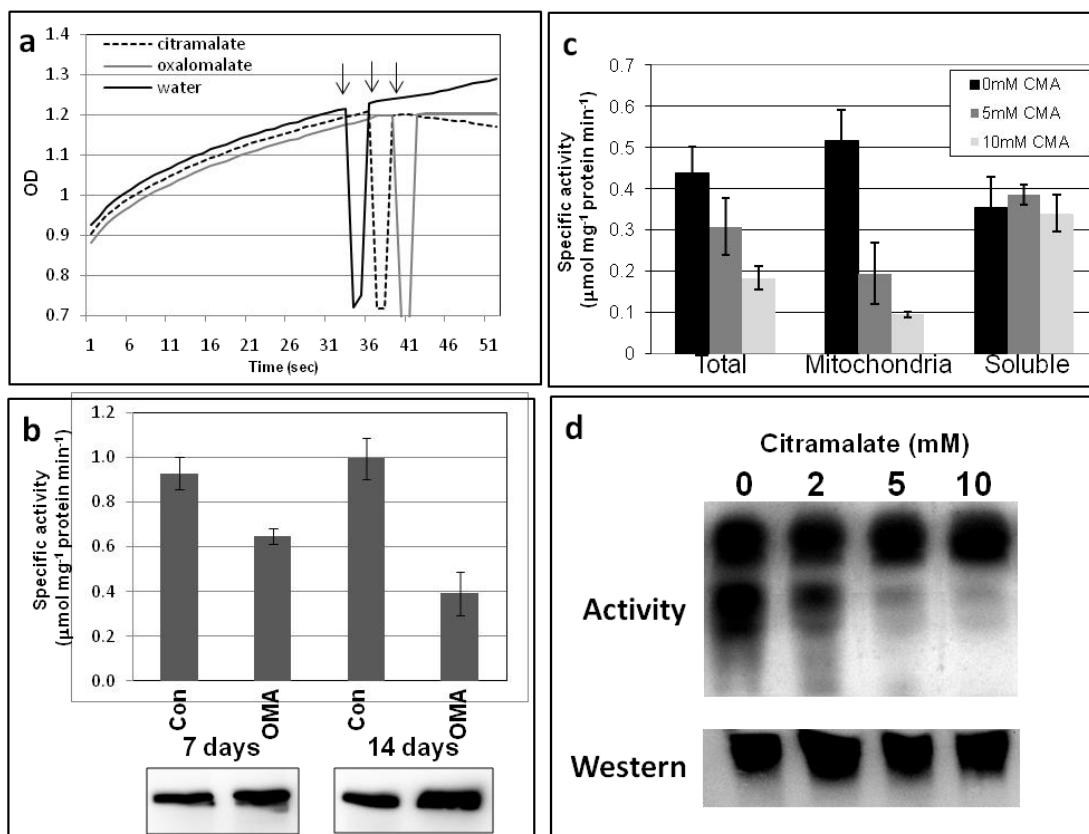
מטרות המחקר

1. לימוד השפעת המעכב ציטראמאלאט, ושל מעכב נוסף, אוקסאלומאלאט, על ביטוי האקוניטאז ופעילותו, וכן שינויים ברמת המעכב בפרי בהתאמה לשינויים ברמת החומצה הציטרית.
2. טיפולים שדה ואחרי קטיף של ציטראמאלאט לבדיקת השפעתם על חמיצות הפרי, ורמת החומצה הציטרית.
3. לימוד מנגנון הביוסינתזה של ציטראמאלאט בפרי ההדר, תוך התמקדות באנזים 2-isopropylmalate synthase (IPMS), כאנזים ביוסינטטי אפשרי.

תוצאות

השפעת המעכבים, ציטראמאלאט ואוקסאלומאלאט על פעילות האנזים אקוניטאז, ביטוי, ורמת החלבון שלו (מטרה 1)

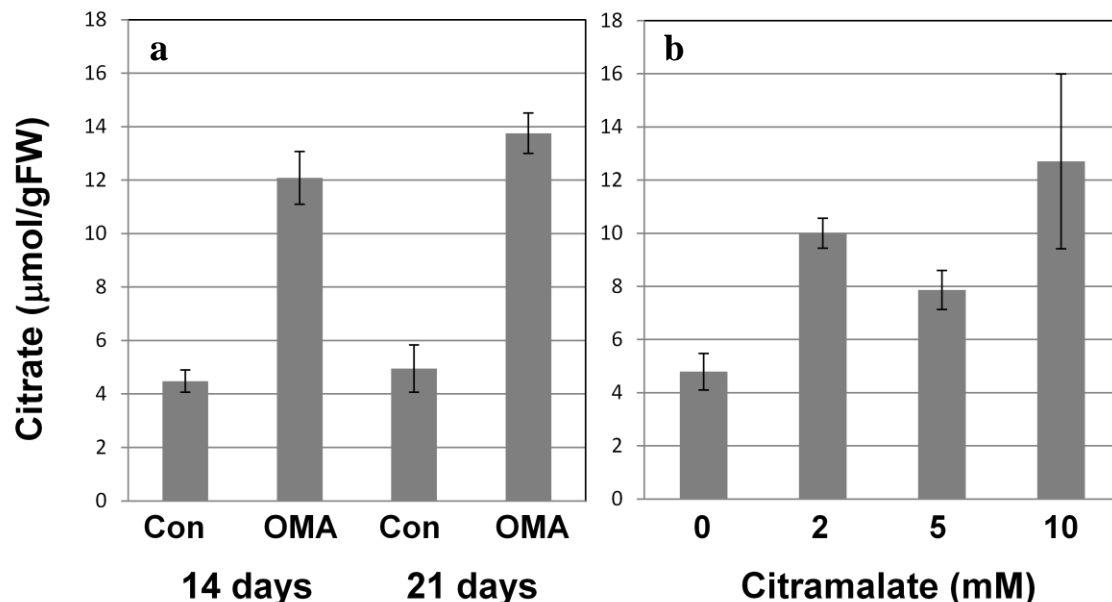
בשלב הראשון של המחקר נבדקה השפעת המעכבים ציטראמאלאט ואוקסאלומאלאט על פעילות האקוניטאז, *in vivo* ו-*in vitro* במערכת קאלוסים שמקורם משקיקי מיץ לימון. הוספת המעכבים לאקסטרקט חלבונים של קאלוסים שמקורם משקיקי מיץ הראתה כי פעילות האקוניטאז מעוכבת מיד עם הוספת המעכבים, בעוד שבביקורת (תוספת מים) לא חל שינוי בקינטיקה של הריאקציה (תמונה a1).



תמונה מס' 1: השפעת המעכבים ציטראמאלאט ואוקסאלומאלאט על פעילות האנזים אקוניטאז בהדרים. המעכבים הוספו בריכוז 1 mM למיצוי חלבונים מקאלוסים שמקורם משקיקי מיץ (חיצים, a). קאלוסים גודלו לתקופה המצויינת בנוכחות 10 mM אוקסאלומאלאט ופעילות האקוניטאז נבחנה במיצוי חלבונים שלהם (b פנל עליון). רמת החלבון של אקוניטאז נבחנה תוך שימוש בנוגדנים ספציפיים (c, פנל תחתון). קאלוסים גודל בנוכחות הריכוזים המצויינים של ציטראמאלאט למשך שלשה שבועות, ופעילות האקוניטאז נבחנה במיטוכונדריה מנוקות בגרדיאנט פרקול, במיצוי של חלבונים מסוימים ובמיצוי חלבונים כללי (c). פעילות האקוניטאז במיצוי חלבונים כללי נבחנה בג'ל פעילות (d, פנל עליון), ורמת החלבון של אקוניטאז נבחנה תוך שימוש בנוגדנים (d, פנל תחתון).

קאלוסים גודלו בנוכחות 10 mM של אוקסלומאלאט למשך שבוע ושבעיים, ופעילות האקוניטאז נבדקה במיצוי חלבונים כללי. כבר לאחר שבוע אובחנה ירידה בפעילות הספיציפית שהתחזקה לאחר שבועיים (תמונה b1 פנל עליון). מעניין היה לגלות באמצעות שימוש בנוגדנים כנגד האקוניטאז כי רמת החלבון עלתה מעט בנוכחות המעכב (תמונה b1 פנל תחתון). השפעת המעכב ציטראמאלאט על פעילות האקוניטאז נבחנה במיצוי כללי של חלבונים, במיטוכונדריה מנוקה ובפרקציה מסיסה של קאלוסים שגודלו כשלושה שבועות בנוכחות המעכב בריכוזים של 5 mM ו-10 mM. התוצאות הראו כי הפעילות עוכבה, כצפוי, במיצוי חלבונים כללי ובמיטוכונדריה, בעוד שלא אובחן כל עיכוב במיצוי שהכיל חלבונים מסיסים (תמונה b1). השפעת הציטראמאלאט נבחנה גם בג'ל פעילות. בד"כ מזהים שני איזומרים של אקוניטאז אשר בעבודה קודמת הראנו כי העליון הנו הציטוזולי, והתחתון הנו המיטוכונדריאלי. כצפוי, רק האיזומים התחתון ירד בעקבות הטיפול בשני הריכוזים של המעכב (תמונה d1 פנל עליון). כמו במקרה של אוקסלומאלאט, גם הציטראמאלאט הביא לעלית מה ברמת החלבון של אקוניטאז (תמונה d1 פנל תחתון).

קאלוסים גודלו בנוכחות 10 mM של אוקסלומאלאט למשך שבועיים ושלושה, ורמת החומצה הציטרית שלהם נבחנה. לאחר שבועיים אובחנה עליה של פי 2.5 בריכוז החומצה, ולאחר שלושה שבועות בשיעור אף יותר גבוה (תמונה a2). גידול קאלוסים בריכוזים שונים של ציטראמאלאט הביא לתוצאה דומה לאחר שלושה שבועות גידול בנוכחות המעכב (תמונה b2).



תמונה מס' 2: רמת החומצה הציטרית בקאלוסים הגדלים בנוכחות המעכבים ציטראמאלאט ואוקסלומאלאט. קאלוסים גודלו לפרקי הזמן המצויינים בנוכחות 10 mM של אוקסלומאלאט, וריכוז החומצה הציטרית בהם נמדד (a). קאלוסים גודלו לשלושה שבועות בנוכחות הריכוזים המצויינים של ציטראמאלאט ורמת החומצה הציטרית בהם אובחנה (b).

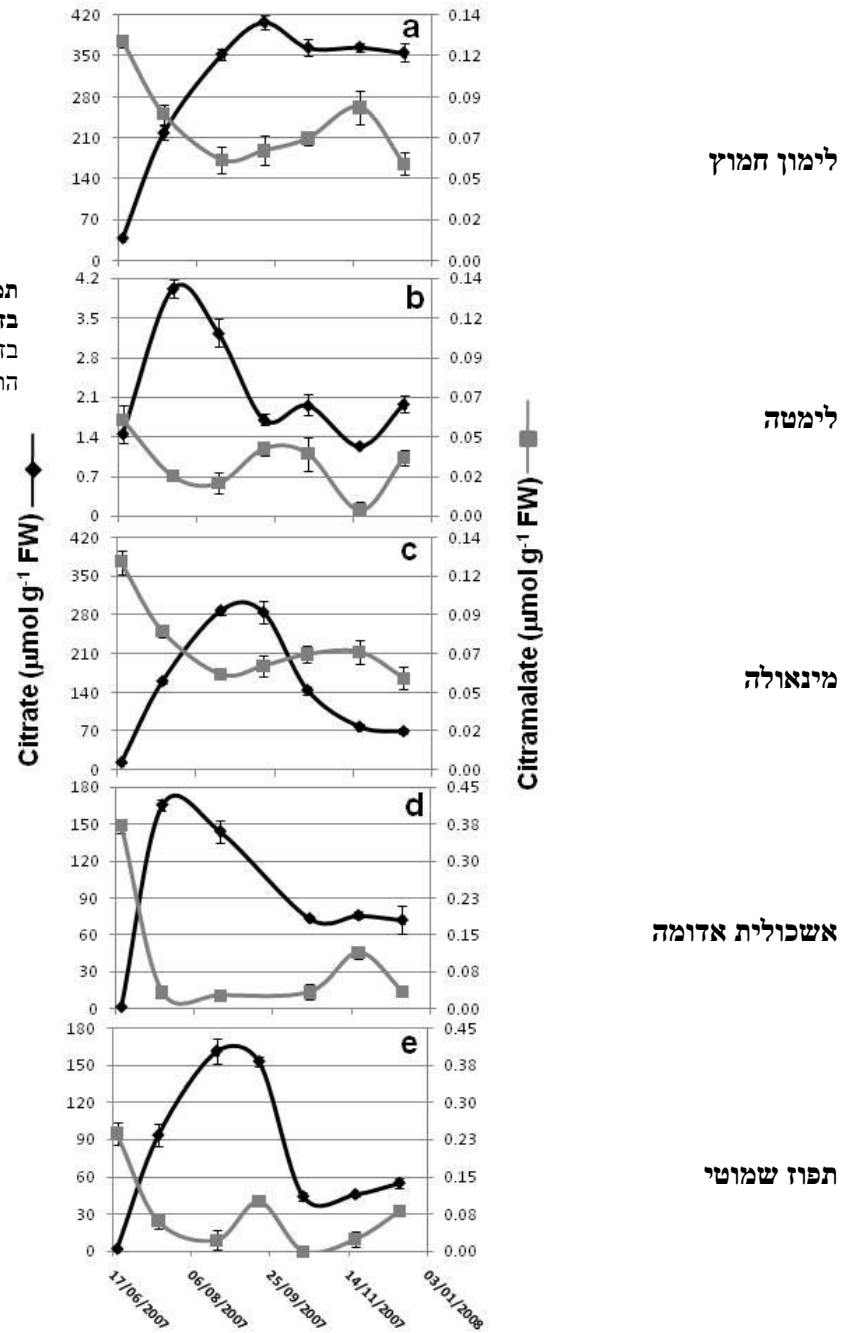
שינויים ברמת המעכב ציטראמאלאט בהתאמה לשינויים ברמת החומצה הציטרית

(מטרה 1)

ההיפותזה שהועלתה בספרות, והוצגה בהצעת המחקר טענה כי הציטראמאלאט הנו מעכב אנדוגני של האקוויטאז, וכי רמה גבוהה של המעכב בשלבים הראשונים של התפתחות הפרי מביאה לעיכוב באנזים המיטוכונדריאלי, וזה תורם להעלאת רמת חמיצות הפרי, ע"י העלאת רמת החומצה הציטרית. היפותזה זו נשענה על הממצא כי רמת הציטראמאלאט נמוכה פי 2 בזן "לימטה" שאינו צובר חומצה לעומת הזן לימון הצובר חומצה בשיעור ניכר. עבודה מוקדמת שלנו הראתה כי אכן בזן לימון יש עיכוב של האקוויטאז במיטוכונדריה, בעוד שפעילות האנזים בזן "לימטה" אינה משתנה (Sadka et al 2000). במסגרת המחקר בחנו את השינויים ברמת הציטראמאלאט לאורך התפתחות הפרי ביחס לשינויים ברמת החומצה הציטרית. נבחרו חמישה זנים עפ"י מאפייני חמיצות הפרי שלהם:

1. לימון חמוץ ומינאולה אשר צוברים חומצה לרמה גבוהה, יחסית, אולם במינאולה החומצה יורדת במחצית השנייה של התפתחות הפרי, בעוד שבלימון היא נשארת ברמה גבוהה
2. לימטה, אשר צוברת חומצה ברמה מאוד נמוכה, בשני סדרי גודל יותר נמוך מאשר בזנים האחרים
3. אשכולית אדומה ותפוז שמוטי הצוברים חומצה לרמה בינונית, היורדת במחצית השנייה של התפתחות הפרי ולקראת הבשלה.

תמונה מס' 3: רמת הציטראמאלאט והציטראט בזני הדורים שונים. רמת שתי החומצות נבחנה בזני הדורים שונים, כמצוין, במועדים שונים של התפתחות הפרי.

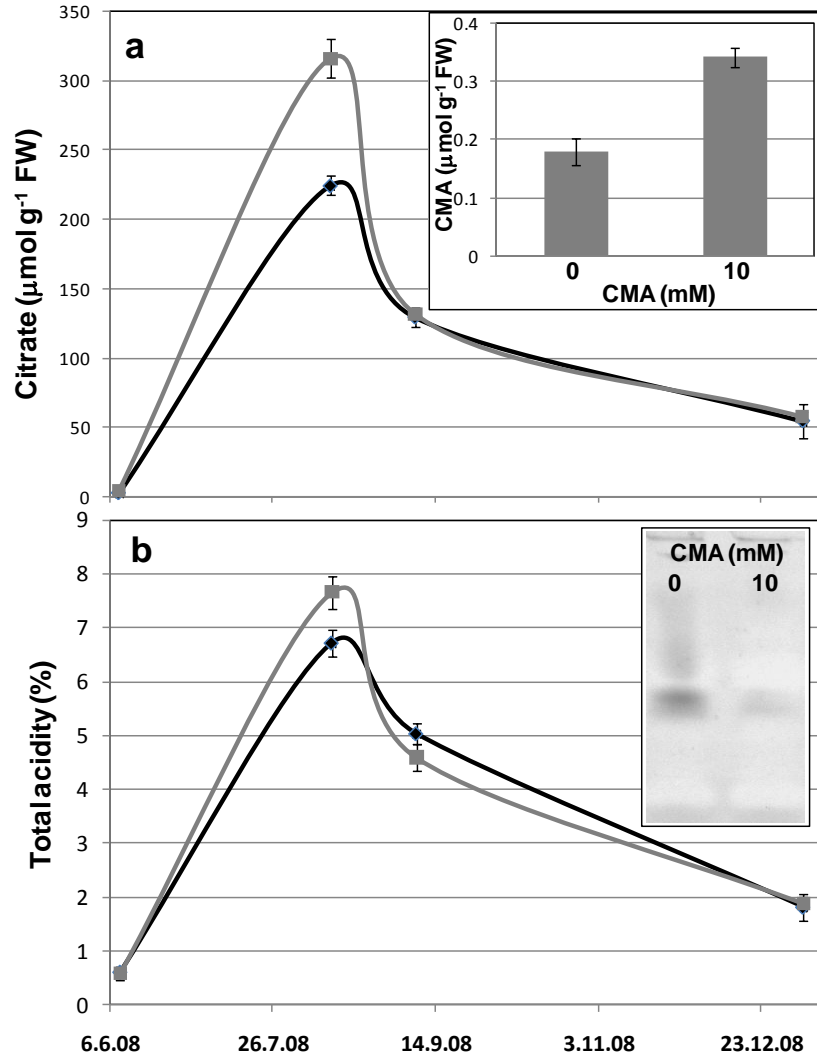


התוצאות (תמונה 3) הראו שדגם הצבירה של החומצה הציטרית הנו כמצופה בכל הזנים. בכל הזנים דגם ההצטברות של ציטראמאלאט היה יחסית דומה; רמה גבוהה בשלבים המקודמים של התפתחות הפרי, כאשר רמת החומצה הציטרית הייתה נמוכה, ולאחר מכן ירידה הדרגתית ברמתה עם פיק נוסף. בלימטה ובאשכולית נצפתה עלייה נוספת גם לקראת הבשלת הפרי. בין הלימון ללימטה היו הבדלים של פי 2 לערך ברמת הציטראמאלאט, אולם כללית, דגם ההצטברות בכל הזנים העלה שאלה האם אכן הציטראמאלאט משקת

תפקיד בהצטברות החומצה הציטרית. יתכן והיא נחוצה לצורך עיכוב ראשוני של האקוניטאז במיטוכונדריה, ואז מופעלים מנגנונים אחרים התורמים להצטברות החמיצות.

טיפול שדה לבדיקת השפעת הציטראמאלאט (מטרה 2)

השפעת הציטראמאלאט על חמיצות הפרי, ורמת החומצה הציטרית בו נבחנה בזן אור 1 בניסוי שדה מוגבל (ריסוסים על ענפים), מפאת מגבלה בכמות המעכב. בוצעו שלשה ריסוסים, בסוף יוני, אמצע ספטמבר וסוף



תמונה מס' 4: חמיצות וחומצה ציטרית בפרי אור מטופל בציטראמאלאט. ענפים של עצי אור 1 רוססו בתמיסה המכילה 10 mM של ציטראמאלאט, ורמת הציטראמאלאט בפרותיהם נבחנה לאחר שבוע (a, מסגרת פנימית). פעילות האקוניטאז נבחנה בשקיקי המיץ לאחר 48 שעות בג'ל פעילות (b, מסגרת פנימית). רמת החומצה הציטרית (a), ואחוז חמיצות כללית (b) נבחנה בציפה במועדים המצוינים.

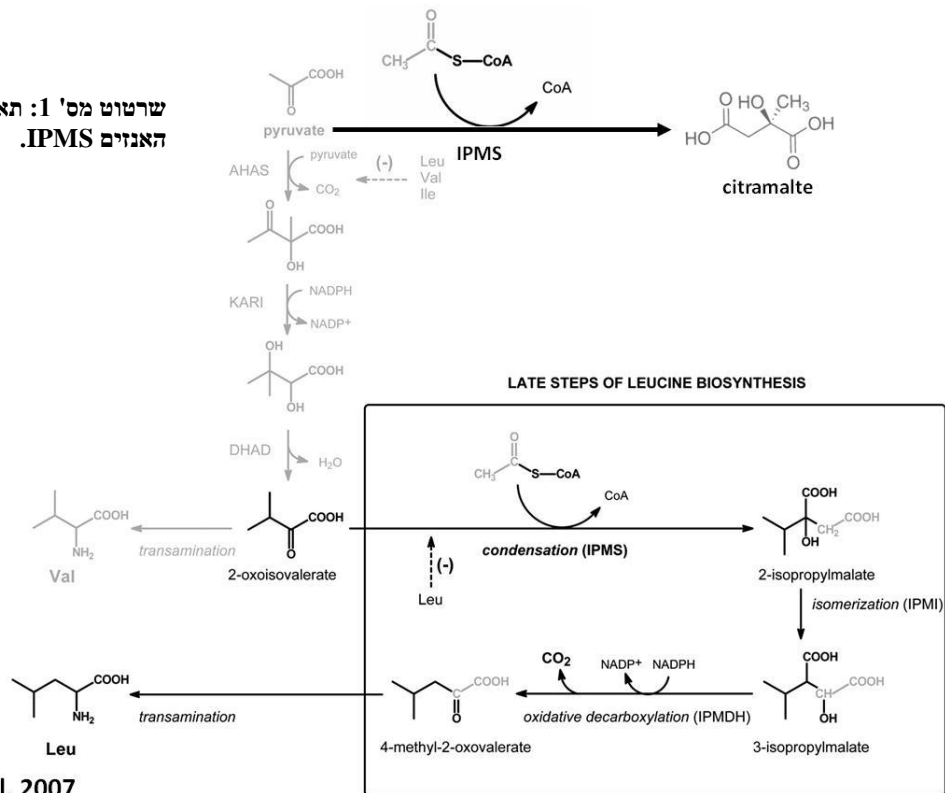
דצמבר, כאשר טיפול נוסף כלל ריסוס בכל שלשת המועדים. אחוז חומצה וחומצה ציטרית נבחנו במועדים שונים. שבוע לאחר הריסוס הראשון אובחנה עליה ברמת הציטראמאלאט בפרי (תמונה a4 מסגרת פנימית). השפעת הריסוס על פעילות האקוניטאז נבחנה בג'ל של פעילות 48 שעות לאחר הריסוס הראשון, בשלב בו רק האיזוזים המיטוכונדריאלי פעיל. הריסוס הביא לירידה ברורה בפעילות של איזוזים זה (תמונה b4 מסגרת פנימית). כ-45 ימים לאחר הריסוס אובחנה עליה ברורה ברמת החומצה הציטרית (תמונה a4), אשר לוותה,

כצפוי, בעליה ברמת החמיצות של ציפת הפרי (תמונה b4). אולם, כאשר פרמטרים אלו נבחנו בזמנים יותר מאוחרים, ההבדל בין הטיפול לביקורת נעלם. ריסוסים במועדים מאוחרים יותר לא הביאו לתוצאות רצויות (תוצאות לא מוצגות).

מנגנון הביוסינתזה של ציטראמאלאט, בהקשר לפעילות האנזים IPMS (מטרה 3)

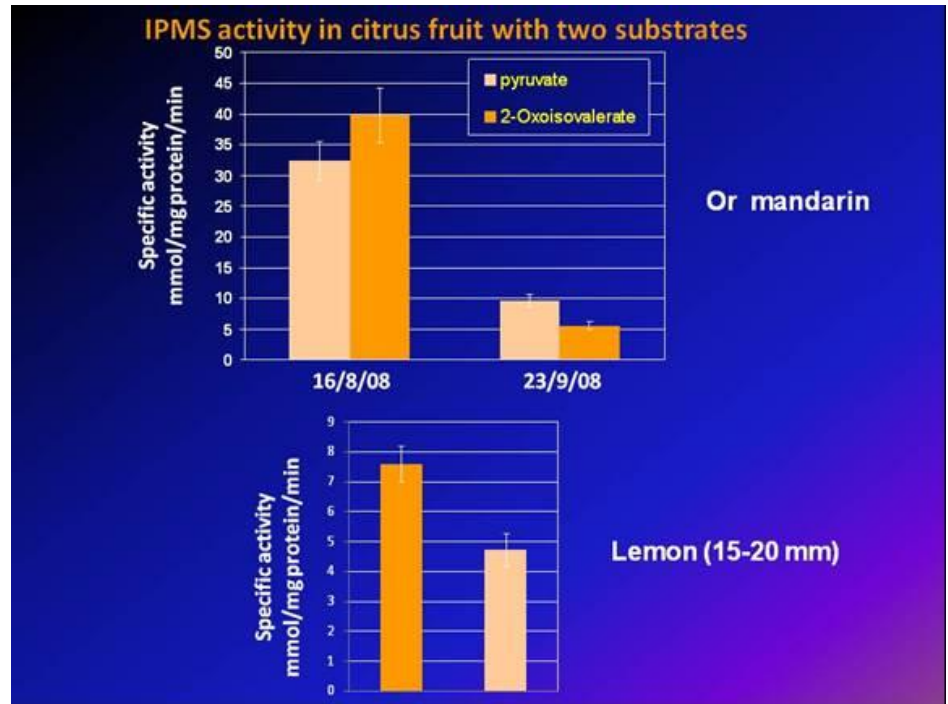
כמפורט בתוכנית המחקר, הביוסינתזה של ציטראמאלאט יוחסה בספרות לשני מנגנונים. האחד, מתואר בעבודה מאוד מוקדמת, מבוסס על אנזים שלא זוהה עד כה, והגן שלו לא שובט (Marcus and Shannon, 1962). השני, מבוסס על האנזים isopropoylmalate synthase (IPMS), המשחק תפקיד בביוסינתזה של חומצת האמינו לאוצין, והוא מראה הומולוגיה לcitramalte synthase מארכיבקטריה (Howell et al., 1999; Xu et al., 2004). לאנזים מארבידופסיס יש מספר סובסטרטים, והוא מזרז מספר ריאקציות, ששתיים מהן מוצגות בשרטוט מס' 1 (de Karker et al 2007). מהסובסטרט 2-oxoisovalertae נוצר ע"י האנזים isopropoylmalate, וזו הריאקציה הראשונה במסלול לייצור ליאוצין. אספקת הסובסטרט pyruvate לאנזים IPS מביאה ליצירת ציטראמאלאט. הפעילות הספיציפית של האנזים מארבידופסיס המבוטא בחיידקים (ללא 50 חומצות אמינו בקצה ה-N terminal המהווים signal peptide לכלורופלסט) עם pyruvate הנה 12-15% מזו כאשר הסובסטרט הנו 2-oxoisovalertae.

שרטוט מס' 1: תאור של שתי פעילויות האנזים IPMS.



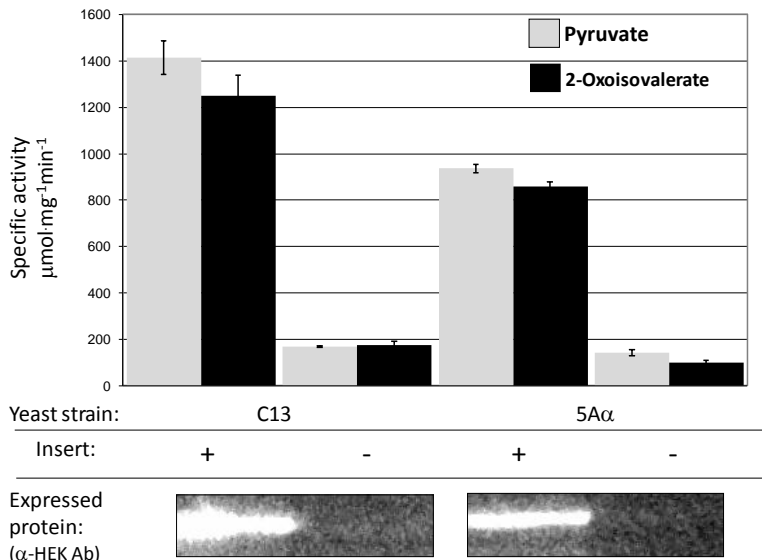
De Kraker et al, 2007

בשלב ראשון, בדקנו את פעילות ה-IPMS בזני זני הדורים, אור 1 (בשני מועדים) ולימון עם שני הסובסטרטים, pyruvate ו-2-oxoisovalerate. בניגוד לאנזים מארבידופסיס שבוטא בחיידק (כאמור ללא signal peptide), הפעילות הספציפית של האנזים מהזן אור עם שני הסובסטרטים הייתה דומה למדי (תמונה 5), כאשר בלימון עם הסובסטרט pyruvate היא הייתה נמוכה בשליש מזו עם 2-oxoisovalerate.



תמונה מס' 5: פעילות האנזים IPMS בהדרים. הפעילות הספציפית של האנזים IPMS נבחנה בזן אור ובזן לימון במועדים המצוינים תוך שימוש בשני סובסטרטים כמצוין בגוף התמונה.

האנזים מהדרים שובט, ובצירוף ל-signal peptide, הוא אוחה לרצף HA המקודד לאפיטופה אנטיגנית המזוהה ע"י נוגדנים. האנזים הוחדר לשני זני שמרים, והפעילות הספציפית שלו נבחנה עם pyruvate ועם 2-oxoisovalertae (תמונה מס' 6). כמו האנזים הלא משובט, גם כאן הפעילות עם שני הסובסטרטים הייתה דומה.

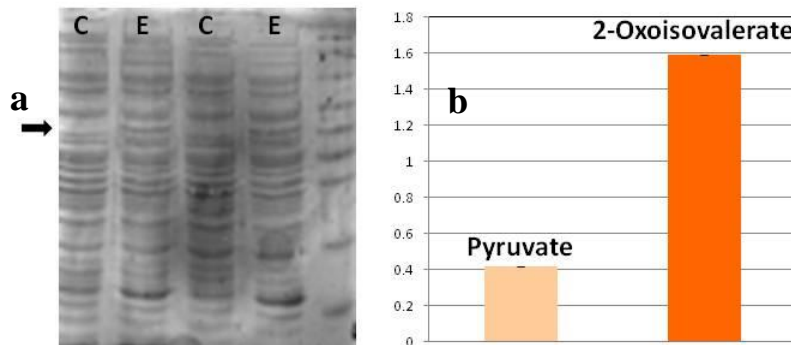


תמונה מס' 6: פעילות ה-IPMS מהדרים בשמרים. הרצף המקודד של האנזים IPMS מפרי הדר שובט לווקטור בצמוד לאפיטופה אנטיגנית HA והוחדר לשני זני שמרים, כמצויין. פעילות האנזים הרקומביננטי נבחנה במיצוי חלבונים כללי של התאים תוך שימוש בשני סובסטרטים, כמצויין (פנל עליון). נוגדנים כנגד HA epitope שימשו לקביעת רמת החלבון בתאים

הצמדת ה-HA, בוצעה ע"מ לאפשר ניקוי האנזים בשיטת immunoadfinity chromatography בכדי לאפיין את פעילותו מבחינה אנזימתית. אולם, מסיבות טכניות, הניקוי לא צלח. לפיכך, פנינו לבחינת התכונות של האנזים במערכת ביטוי בחיידק. הוכח כי האנזים אינו מתבטא בחיידק עם ה-signal peptide, ולפיכך זה סולק, והרצף אוחה ל-His tag המאפשר ניקוי החלבון בקולונת ניקל (תמונה 6, פנל עליון). האנזים ללא ה-signal peptide התבטא ברמה טובה בחיידק (תמונה a6). בדומה לאנזים מארבידופסיס ובשונה מהאנזים האנדוגני בהדרים, ובוה המבוטא בשמרים, הפעילות עם 2-oxoisovalertae הייתה גבוהה מאשר עם pyruvate, אם כי בשיעור נמוך יותר, פי 4 לעומת פי 6-7 באנזים מארבידופסיס (תמונה b6). הקינטיקה של האנזים הרקומביננטי נבחנה (תוצאות לא מוצגות). השערתנו הנה כי קיימות שתי צורות לאנזים. זו עם ה-signal peptide נכנסת לכרומופלאסט בתא שקיק המיץ, ושם היא מזרזת את השלב הראשון בביוסינטזה של לאוצין תוך שימוש בסובסטרט 2-oxoisovalertae. הצורה השנייה, ממנה לא מסולק ה-signal peptide נשארת בציטוזול, ושם היא מזרזת מספר ריאקציות, ובניהן זו היוצרת ציטראמאלאט.

IPMS from citrus expressed in bacteria

Putative signal peptide
 MAATTAATAAFTN**R**QPT**F**ILSP**P**K**T**KVNASL**L**FFHC**N**NS**K**PF**F**K**T**TISCS 50
 LQKPPPSLYPRITAS**R**PEYIPNRIPDPNYVRFDTTLRDGEQSPGATLTS 100
 KEKLDIARQLAKLGV**D**IIEAGFPAASKEDFEAVRTIAKEVGNVDAESGY 150
 VPVICGLSRCNE**R**DIKTAW**E**AVKYAKRPRIHTFIATSGIHMEHKLKTKQ 200
 QVVEIARSMVKFARSLGCDDVEFSPEDAGRS**D**RKFLYEILGEVIKAGATT 250
 LNI**P**DTVGITMPTE**F**GKLIADIKANTPGIENIVISTHCQNDLGLSTANTI 300
 AGACAGARQ**V**ETINGIGERAGNAS**L**EEVVM**A**FKCRGEHILGGLYTGINT 350
 RHIVMASKM**V**EEY**T**GLHVQPHK**A**IVGANAF**A**HE**S**GIHQD**G**MLK**H**KGT**Y**E**I** 400
 IS**P**EDIG**L**ER**S**SEAGIVL**G**KL**S**GRHAL**K**DR**L**KE**L**G**Y**EL**N**DE**Q**L**G**T**I**FW**H**F 450
 K**A**VA**E**Q**K**K**R**VT**D**AD**L**I**A**LV**S**DE**V**F**Q**PE**V**V**W**K**L**LD**M**Q**V**TC**G**TL**G**L**S**T**A**T**V**K 500
 L**M**D**A**NG**E**EH**V**AC**S**T**G**T**G**P**V**D**S**A**K**AV**D**L**I**V**K**E**P**AT**L**L**E**Y**S**M**N**AV**T**E**G**I**D**A 550
 I**A**T**T**R**V**L**I**R**G**E**K**S**Q**L**S**T**H**A**S**T**G**E**T**V**K**R**T**F**S**G**T**G**A**G**M**D**I**V**V**S**S**V**K**A**Y**I**G**A**L** 600
 NK**M**L**G**F**K**D**Q**L**P**A**N**D**S**V**E**R**T**S**V**S**A**



תמונה מס' 7: פעילות IPMS מהדרים בחיידק. הרצף המקודד של IPMS מפרי הדר שובט לוקטור של חיידקים ללא ה-signal peptide לכלורופלסט (פנל עליון). רמת החלבון נבחנה במיצוי כללי של תאי ביקורת (C) ובתאים המבטאים את הגן (E) בג'ל אלקטרופורוזה, והחלבון הרקומביננטי מסומן בחץ (a). הפעילות הספציפית של האנזים נבחנה במיצוי חלבונים תוך שימוש בשני סובסטרטים, כמצוין.

מסקנות ודיון

מחקר זה השיג את כל מטרותיו, ואף פתח צוהר למחקר נוסף. המסקנות העיקריות:

1. המעכבים ציטראמאלאט ואוקסאלומאלאט מעכבים את האנזים אקוניטאז הן *in vivo* והן *in vitro*. הוכח כי העיכוב ע"י ציטראמאלאט, שהו מעכב אנדוגני בפרי ההדר, הנו של האנזים המיטוכונדריאלי, אולם לא של הציטוזולי. זהו ממצא נוסף המחזק ממצאים קודמים שיש שוני בתכונות שני האיזומים, הן מבחינת הרגישות שלהם למחסור בברזל, והן מבחינות אחרות.
2. בחינת דגם ההצטברות של הציטראמאלאט בפרי ההדר ביחס לזה של ציטראט מעוררת ספק לגבי מעורבות הראשון בצבירת חמיצות הפרי בכל שלבי התפתחותו. סביר להניח כי המעכב פעיל רק בשלבים הראשונים, כאשר האנזים המיטוכונדריאלי פעיל. יש להניח כי בשלבים מאוחרים יותר מעורבים מנגנונים נוספים.
3. בעבודה קודמת שפרסמנו (נסקר בתוכנית המחקר), הראנו כי פעילות האנזים המיטוכונדריאלי גבוהה בשלבים הראשונים של התפתחות הפרי, ועצירתה מביאה לצבירת החומצה. העלאת הפעילות של האנזים הציטוזולי משחקת תפקיד בפירוק החומצה במחצית השנייה של התפתחות הפרי (Sadka et al 2000). לאור הממצא כי הציטראמאלאט מעכב את האנזים המיטוכונדריאלי, אך לא הציטוזולי, לא מפתיע כי הוא פעיל (מעכב) רק בשלבים הראשונים של התפתחות הפרי, בזמן שהאנזים המיטוכונדריאלי פעיל. לפיכך, אין מנוס מהמסקנה כי שימוש במעכב לא יכול להועיל. אכן, ראינו כי ריסוסים מאוחרים בו לא יעילים.
4. הוכח במסגרת העבודה כי האנזים IPMS יכול לשמש כאנזים הביוסינטטי של ציטראמאלאט, שכן האנזים האנדוגני מהדרים פעיל במסלול זה ביעילות דומה לזו של הפעילות במסלול יצירת החומצה האמינו לאוצין. נדרשת עבודה נוספת בכיוון זה.

ספרות

- de Kraker J, Luck K, Textor S, Tokuhisa JG, Gershenzon J (2007)** Two *Arabidopsis* Genes (*IPMS1* and *IPMS2*) Encode Isopropylmalate Synthase, the Branchpoint Step in the Biosynthesis of Leucine. *Plant Physiol* **143**:970-986
- Howell D, Xu H, White R (1999)** (R)-citramalate synthase in methanogenic archaea. *J Bact* **181**: 331-333
- Sadka A, Dahan E, Cohen L, Marsh KB (2000)** Aconitase activity and expression during the development of lemon fruit. *Physiol. Plant.* **108**: 255-262
- Xu H, Zhang Y, Guo X, Ren S, Staempfli A, Chiao J, Jiang W, Zhao G (2004)** Isoleucine biosynthesis in *Leptospira interrogans* serotype lai strain 56601 proceeds via a threonine-independent pathway. *J Bact* **186**: 5400-5409

מאמרים שיצאו ממחקר זה

Asfaw Degu, Bayissa Hatew, Adriano Nunes-Nesi, Ludmila Schlizerman, Naftali Zur, Ehud Katz, Alisdair R. Fernie, Eduardo Blumwald, Avi Sadka. Inhibition of citrus fruit aconitase results in a metabolic shift towards amino acid biosynthesis. Submitted.

Asfaw Degu, Sham Prakash, Ludmila Schlizerman, Tal Arad, Naftali Zur, Bayissa Hatew, Eduardo Blumwald, Avi Sadka (2010): The regulation of aconitase, a central enzyme of citric acid metabolism in citrus fruit. Proc Inter Soc Citriculture. In Press.

סיכום עם שאלות מנחות

נא לענות על כל השאלות, בקצרה ולעניין, ב 3 עד 4 שורות מכסימום לכל שאלה (לא תובא בחשבון חריגה מגבולות המסגרת המודפסת).

הערה: נא לציין הפנייה לדו"ח אם נכללו בו נקודות נוספות לאלה שבסיכום.

מס' מחקר: 203-0552-06

<p>1. מטרת המחקר לתקופת הדו"ח תוך התייחסות לתוכנית העבודה.</p> <p>1. לימוד השפעת המעכב ציטראמאלאט, ושל מעכב נוסף, אוקסאלומאלאט, על ביטוי האקוניטאז ופעילותו, וכן שינויים ברמת המעכב בפרי בהתאמה לשינויים ברמת החומצה הציטרית.</p> <p>2. טיפולים שדה ואחרי קטיף של ציטראמאלאט לבדיקת השפעתם על חמיצות הפרי, ורמת החומצה הציטרית.</p> <p>3. למוד מנגנון הביוסינתזה של ציטראמאלאט בפרי ההדר, תוך התמקדות באנזים 2-isopropylmalate synthase (IPMS), כאנזים ביוסינטטי אפשרי.</p>
<p>2. עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח.</p> <p>1. ציטראמאלאט ואוקסאלומאלאט מעכבים את פעילות האקוניטאז הן in vitro והן in vivo, כאשר הוכחנו כי הציטראמאלאט מעכב את האנזים במיטוכונדריה אך לא בציטוזול. שני המעכבים מעלים מידה מסוימת את רמת החלבון.</p> <p>2. שני המעכבים מעלים רמת החומצה הציטרית בקאלוסים.</p> <p>3. ציטראמאלאט מעלה רמת החומצה הציטרית בפרי, אולם באופן זמני.</p> <p>4. השינויים ברמת הציטראמאלאט לאורך התפתחות הפרי מעלים ספק לגבי מעורבותו בכל שלבי צבירת החומצה. כפי הנראה הוא פעיל רק בשלבים הראשונים של צבירתה.</p> <p>האנזים IPMS אכן יכול לסנטז ציטראמאלאט, וביעילות יותר גבוהה מאשר האנזים מארבידופסיס</p>
<p>3. המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו.</p> <p>יש שוני בתגובת האנזים המיטוכונדריאלי והציטוזולי למעכב ציטראמאלאט. פעילות המעכב רק על האנזים המיטוכונדריאלי, אשר פעיל רק בשלבים המוקדמים של התפתחות הפרי, פוגעת בסיכויי הציטראמאלאט להפוך לכלי פרקטי יעיל. הביוסינתזה של ציטראמאלאט כנראה מזורזת ע"י IPMS, אולי ע"י צורה המצויה בציטוזול, אולם הדבר דורש מחקר נוסף.</p>
<p>4. הבעיות שנתרו לפתרון ו/או השינויים שחלו במהלך העבודה (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים); התייחסות המשך המחקר לגביהן.</p> <p>יש לבחון לעומק את ההיפותזה כי קיימות שתי צורות לאנזים isopropylmalate synthase, אחת ציטוזולית והשנייה כרומופלואסטית, כאשר הצורה הראשונה פעילה בסינטזת ציטראמאלאט והשנייה פעילה בביוסינתזה של חומצות אמינו.</p>
<p>5. האם הוחל כבר בהפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח - יש לפרט: פרסומים - כמקובל בביבליוגרפיה, פטנטים - יש לציין מס' פטנט, הרצאות וימי עיון - יש לפרט מקום ותאריך.</p> <p>ניתנו מספר הרצאות בנושא, במסגרת סמינר בנווה יער, וכן בכנס ההדרים בסין. רשימת פרסומים מופיעה בגוף הדו"ח.</p>
<p>6. פרסום הדו"ח: אני ממליץ לפרסם את הדו"ח: (סמן אחת מהאופציות)</p> <ul style="list-style-type: none">• רק בספריות• <u>ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט)</u>• חסוי – לא לפרסום