

דו"ח מדעי מסכם - לתכנית מדען ראשי מס' 09-0583-261 (שנים 2007-2009)

**פיתוח מערכת לאינטגרציה מכוונת של ד.נ.א זר לאתרים טבעיים בגנום הצמח,
מבחן יציבות וידידות לסביבה של תכונות טרנסגניות בחקלאות**

מוגש לקרן המדען הראשי של משרד החקלאות ולצוות היגוי ביוטכנולוגיה
על ידי

דוד גדעוני המכון למדעי הצמח, מנהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני (חוקר ראשי)
ניר כרמי המכון למדעי הצמח, מנהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני
אנאית מט המכון למדעי הצמח, מנהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני

David Gidoni, Inst. of Plant Sciences, ARO, The Volcani Center,
POB 6, Bet Dagan 50250; gidoni@volcani.agri.gov.il

Nir Carmi, Inst. of Plant Sciences, ARO, The Volcani Center,
POB 6, Bet Dagan 50250; vhncarmi@volcani.agri.gov.il

Anahit Mett, Inst. of Plant Sciences, ARO, The Volcani Center,
POB 6, Bet Dagan 50250; amett@volcani.agri.gov.il

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: **כן/לא**

חתימת החוקר הראשי:

מבוא

מטרת תכנית המחקר לבדוק היתכנות בצמחים של פתוח מנגנון מולקולרי מבוקר, המבוסס על מערכות רקומבינציה-יחודיות לאתר, להחזרה מכוונת של גנים זרים לאתרים גנומיים טבעיים המאופיינים ומוגדרים מראש.

בשלבי המחקר הראשונים, בחנו רקומבינציות הוצאה ואינטגרציה (תוך- ובין-פלסמידית, בהתאמה) בחיידקים ובתאים צמחיים (פרוטופלסטים) של שתי מערכות הרקומבינציה Φ C31 Int-attB\attP (מערכת רקומבינציה חד-כיוונית) ומערכת Cre/lox (מערכת רקומבינציה דו-כיוונית), (ראה Gidoni et al, 2008 Srivastava and Gidoni, 2010). (מערכת רקומבינציה חד-כיוונית) ומערכת Cre/lox (מערכת רקומבינציה דו-כיוונית).

בחינת פעילות רקומבינציות הוצאה שביצענו, הינה מבוססת על DNA פלסמידי המכיל שני אתרי רקומבינציה (המופרדים על ידי מקטע של DNA חוסם). DNA זה הוצב בין פרומוטור לבין גן מדווח (*gusA* או *gfp*) באופן שהוצאתו על ידי רקומבינציה בין שני האתרים תביא להפעלת שיעתוק הגן המדווח באמצעות הפרומוטור. מערכת בחינת פעילות רקומבינציות מחדר מבוססת על אינטגרציה של שני פלסמידים המכילים אתר רקומבינציה בכל אחד. הפלסמידים בנויים באופן שחיבורם זה לזה על ידי רקומבינציה בין שני האתרים תביא להפעלת שיעתוק הגן המדווח. במערכות ניסויים אלו, הפלסמידים הוחזרו באופן ישיר (בו-זמנית עם פלסמיד נפרד לביטוי חולף של האינטגראז\רקומבינאז) בשיטת אלקטרופורציה לפרוטופלסטים. פעילות הגן המדווח נמדדה, כמדד של רמה יחסית של פעילות רקומבינציה, כ-24 שעות לאחר החזרת הפלסמידים לתאים הצימחיים.

בעוד המערכת Φ C31 Int-attB\attP הראתה פעילות חיובית בחיידקים (תוצאה שהיא בהתאמה לפירסומים של מעבדות שונות) בתאים צמחיים לעומת זאת, לא התקבלה פעילות. בהשוואה, בחינת המערכת Cre/lox הראתה בתאים צמחיים, כצפוי, יכולות של הן רקומבינציות הוצאה והן אינטגרציה של שני פלסמידים.

לאור תוצאות אלו, תכנית המחקר המשיכה בשני כיוונים: בדיקת מגוון תנאים במגמה לאתר התנאים המאפשרים הפעלה של מערכת הרקומבינציה/אינטגרציה החד-כיוונית Φ C31 Int-attB\attP, מחד, ופיתוח מערכת של איתור וזיהוי ופעילות רקומבינציה של אתרים דמויי-*lox* טבעיים בגנום הצמח, מאידך. מערכת *lox* ניבחרה *erC* / כנציגת מערכות רקומבינציה דו-כיוונית על בסיס יכולתה המתועד לחולל אינטגרציה בצמחים, וכן לפי דימונה הרב במיבנה ותיפקוד למערכת *FRT*\FLP.

תוצאות המחקר

I. המערכת Φ C31 Int-attB\attP :

לאור הפירסומים המראים באורגניזמים שונים שתהליך האינטגרציה הספציפית בין שתי יחידות DNA המכילים אתרי *attB* ו-*attP* של הפאז' Φ C31, הוא תהליך חד-כיווני, (ראה Gidoni et al, 2008 Srivastava and Gidoni, 2010) ובנוסף, מאחר ופעילות המערכת בגנום הצמח עדין לא הוראתה, החלטנו להמשיך בלימוד מערכת זו. בהתאם לכך ובהתאמה ליעד התכנית לפתח מערכת אינטגרציה לאתרים גנומיים דמויי *attB* ו-*attP*, הפרמטרים שניבדקו הם:

א) ביצוע ניסיונות הגדרה ואיפיון של רצפים מינימליים של *attB* ו-*attP* טיבעיים (הידועים כפועלים ביעילות במערכות של אורגניזמים שונים). בהתאם לכך, בדיקת רקומבינציה בין שתי זוגות של אתרים מינימליים: זוג 1: *attB*₃₄ (בגודל 34 בסיסים) ו-*attP*₃₉ (בגודל 39 בסיסים), זוג 2: אתרים בעלי רצפים ארוכים יותר *attB*₇₀ ו-*attP*₇₀ (70 בסיסים), בוצעה באופן הבא:

מיבני הפלסמידים שהשתפו בניסוי:

(א) רקומבינצית הוצאה:

(1) מבנה פלסמיד דווח המבוסס על אתרי *attB* ו-*attP* מינימליים (באורכים של 39\34 ו-70\70):

35SPr---- attB ----BLOCK----- attP -- gfp – 35ST

(2) מבנה פלסמיד המבטא אינטגראז: **35SPr - Int - OcsT**

החדרה בו-זמנית של שני הפלסמידים הנ"ל לפרוטופלסטים צפויה להביא לביטוי GFP כדיווח על אירוע רקומבינצית הוצאה ולקבלת

מיבנה: **35SPr – attL – gfp - 35ST**

(ב) רקומבינצית חבירה (אינטגרציה):

(1) מבנה פלסמיד "המטרה": **35SPr – attB**

(2) מבנה הפלסמיד "החודר" (פלסמיד מדווח) **attP - gfp - 35ST**

הפלסמידים לדווח אינטגרציה מבוססים על אתרי *attB* ו-*attP* מינימליים (באורכים של 39\34 ו-70\70).

(3) מבנה פלסמיד המבטא אינטגראז (*Int*): **35SPr - Int- OcsT**

רצפי ה-DNA בכל המיבנים הנ"ל ניבדקו ואומתו לאחר יצירתם ולפני החדרתם לתאים.

החדרה בו-זמנית של שלושת הפלסמידים הנ"ל לפרוטופלסטים צפויה להביא לביטוי GFP כדיווח על אירוע קו-אינטגרציה ולקבלת

מיבנה: **35SPr – attL – gfp - 35ST**

התוצאות מראות כי בעוד שהתקבל ביטוי GFP גבוה לאחר החדרה של פלסמיד הביקורת

, 35SPr – attB- gfp -35ST

לא התקבלה פעילות רקומבינציה (העדר ביטוי GFP) הן בניסיונות ההוצאה והן החיבור המתוארים לעיל. הבדיקות בוצעו על ידי

החדרה בו-זמנית (בשיטת אלקטרופורציה) של יחסים כמותיים שונים של הפלסמידים המרכיבים כל הניסוי. העדר יכולת

רקומבינציה איפיון הן את האתרים *attB*₃₄ ו-*attP*₃₉, והן האתרים *attB*₇₀ ו-*attP*₇₀ בפרוטופלסטים. מיבחן ביקורת של הפעלת

רקומבינציה המותנית בהחדרת שלושה פלסמידים במערכת *Cre/lox* הניבה תוצאות חיוביות. תוצאות אלו מראות שהחדרה בו-

זמנית של שלושה פלסמידים אינה מהווה גורם מגביל במיבחי רקומבינציה בפרוטופלסטים.

(ב) לאור שהאינטגראז (*Int*) הוא גן ממקור חיידקי, החלטנו לנסות ולהגביר את רמת הביטוי ויציבות חלבון האינטגראז על ידי שינוי

והתאמת רצף ה-DNA שלו לפי רצף קודוני התירגום (codon usage), המקובל בצמחים (טבק) תוך ביטול אתרי מתילציה

וספלייסנג. הניסויים בוצעו במתכונת המתוארת לעיל. התוצאות הראו שבדומה לאנזים האינטגראז המקורי (*INT*), גם האינטגראז

החדש (*INTm*) הניב תוצאות רקומבינציה שליליות בתאים הצמחיים.

(ג) כדי לבדוק האפשרות שאי-תיפקוד המערכת בצמחים עשוי לנבוע ממתילציה של אתרי הרקומבינציה *attB* ו-*attP* בתאי הצמח,

DNA גרעיני מפרוטופלסטים, 24 שעות לאחר אלקטרופורציה, טופל בביסולפיט-נתרני, ושוכפל ב-PCR. הטיפול בביסולפיט-נתרני

מאפשר לאבחן מתילציה של DNA בכך שהוא גורם לד-אמינציה של ציטוזין לא-ממותל, וכתוצאה הופכו לאורציל), בעוד ציטוזין

ממותל נישאר ללא שינוי. לאחר שיבוט תוצרי ה-PCR (בתוך פלסמיד pGEM T Easy) וקביעת רצף של 10 קלונים, ניתן לראות

כי: (1) כל עשרת הפלסמידים מכילים את שני האתרים, *attB* ו-*attP*, עובדה המצביעה על העדר רקומבינציה. (2) בשני אתרי

הרקומבינציה, *attB* ו-*attP* בכל אחד מעשרת הקלונים שנבדקו, קיימת מתילציה בציטוזינים, לפחות בארבעה מתוך תשעה

אפשריים באתר *attP*₃₉ ולפחות בשיבעה מתוך שלושה עשרה אפשריים באתר *attB*. תוצאות אלו מעלות את האפשרות של חסימת

יכולת הרקומבינציה של מערכת ה- Φ C31 Int בצמחים באמצעות מתילציה של אתרי הרקומבינציה $attB$ ו- $attP$, מיד עם חדירת ה-DNA לתאים.

II. מערכת ה- Cre/lox :

בהתאם ליעד התכנית לפתח מערכת אינטגרציה לאתרים גנומיים דמויי- lox (ו\או FRT), ערכנו סריקה ביואינפורמטית של הגנום לאתרים דמויי- lox בצמחים שונים (ארבידופסיס, אורז, תירס, עגבניה). המטרה היא ללמוד לזהות ולבודד את הרצפים המתאימים ולהביאם למבחנים השוואתיים של יעילות אינטגרציה במערכת חוץ-כרומוזומלית בתאים צמחיים. יתרון של מערכות כגון Cre/lox ו- FLP/FRT הוא בכך שאתרי הרקומבינציה המינימליים בהן מוגדרים (34 בסיסים) ופעילותם בתאים צמחיים ידועה, אך הסרוגן הוא בדו-כיווניות התהליך המוריד את יעילות האינטגרציה. הגישה שנימצאה יעילה ביותר לייצוב מצב האינטגרציה בין שני אתרי lox עד כה, מבוססת על שתי מוטציות נקודתיות, אחת בזרוע השמאלית של ה- lox האחד (Left Element; LE), והשנייה בזרוע הימנית של ה- lox השני (Right Element; RE), (ראה Srivastava and Gidoni 2010). מאתהב, הנחת העבודה בניסויים אלו היא שמאחר ואתרי מטרה גנומיים הם בהכרח מוטנטיים (בהשוואה לאתר המקורי), ייצוב תוצרי האינטגרציה בין שני אתרים דמויי- lox (האחד גנומי=אתר מטרה' והשני משלים=אתר חודר') צפוי להיות לפי עקרון מנגנון ה- LE-RE המצויין לעיל. סידרת הניסויים שביצענו נועדה לבחון היכולת של מערכת הרקומבינאז הטבעי CRE לחולל רקומבינציה של אתרים דמויי- lox ($pslox$) שניגזרו מגנום צמח הארבידופסיס. הניסויים נערכו במערכת חוץ-כרומוזומלית בתאים צמחיים, המבוססים על יכולת איבחון ואיפיון מהירים יחסית של ארועי רקומבינציה, בפרוטופלסטים של טבק.

מיבני הפלסמידים שהשתתפו בניסוי:

אתר ה- lox מורכב משני זרועות הפוכות בנות 13 בסיסים כל אחת (המהוות אתרי קישור לרקומבינאז), וביניהן 'ספייסר' באורך של 8 בסיסים (המהווה את אתר השיחלוף). בסריקה ביואינפורמטית של אתרים דמויי- lox בגנום של צמחי ארבידופסיס התקבלו 20 אתרים המאופיינים ברמת הומולוגיה של לפחות 8 מתוך 13 הבסיסים של כל אחת משני הזרועות. טווח ההומולוגיה הכללית בקבוצת אתרים אלו, ביחס ל-34 בסיסי ה- lox הטבעי, נע בין 17 ל-23 בסיסים. למבחן ההיתכנות נבחרו שני אתרים בעלי רמת הומולוגיה כללית של 22 מתוך 34, אך ניבדלים ברמת ההומולוגיה הפנימית שבין הזרועות, כאשר האחד כולל 10 מתוך 13 הבסיסים ($psloxTA$) והשני כולל 12 מתוך 13 הבסיסים ($psloxTB$). אתרים אלו יהוו 'אתרי מטרה' (T=Target). כדי לבדוק אפשרות רקומבינציה של אתרים אלו באמצעות Cre, יצרנו לכל אחד משני אתרי המטרה הנ"ל, 3-4 גירסאות של אתרי 'חדירה' (או 'קטורים') משלימים-אלטרנטיביים המכונים $psloxVA(1-4)$ ו- $psloxVB(1-3)$ (V=vector), בהתאמה.

(1) מבנה הפלסמיד המדווח (ניסוי): למטרה הראשונית של זיהוי יכולת רקומבינציה בין זוגות אתרי 'מטרה' ואתרי 'חדירה' ('וקטורים') תואמים, בנינו מיבני דווח של רקומבינציה הוצאה במיבנה הבא:

35SPR - $psloxT$ -BLOCK- $psloxV$ - $gusA$ - 35ST

(2) מבנה פלסמיד דווח המבוסס על אתרי lox טבעיים (ביקורת):

35SPR---- lox ----BLOCK---- lox -- $gusA$ - 35ST

35SPR - Cre - 35ST

(3) מבנה פלסמיד המבטא רקומבינאז:

רצפי ה- DNA בכל המיבנים הנ"ל ניבדקו ואומתו לאחר יצירתם ולפני החדרתם לתאים.

מערכת הניסויים כללה בחינה השוואתית של ארבעה מיבני הדיווח המבוססים על *psloxTA* ו-*psloxVA(1-4)*, מחד, ושל שלושה מיבני הדיווח המבוססים על *psloxTB* ו-*psloxVB(1-3)*, מאידך.

רמת הרקומבינציה שהיתקבלה במיבני הדיווח של הניסוי הושוותה וחושבה גם ביחס לרמת הרקומבינציה שהיתחוללה במיבנה הדיווח של הביקורת. החדרה בו-זמנית של שני פלסמידים (דווח ורקומבינאז) לפרוטופלסטים צפויה להביא לביטוי GUS כדיווח על אירוע רקומבינציה ולקבלת מיבנה: **35SPr –psloxTV– gusA - 35ST**.

התוצאות (בארבע חזרות) מראות הכרה ופעילות רקומבינציה (ביטוי GUS) של אתר המטרה הגנומי *psloxTA* עם 3 מתוך 4 אתרי ה-*psloxVA(1-4)*, וכן של אתר המטרה הגנומי *psloxTB* עם אחד מתוך 3 אתרי ה-*psloxVB(1-3)* שיצרנו. רמת הרקומבינציה שהתקבלה בין אתרי ה-*lox* (ביקורת) התבטאה בעליה פי 6 ברמת פעילות GUS בהשוואה לרמת רקע (ללא CRE) ואילו פעילות GUS בניסוי הייתה ברמות שנעו בין 50-100% בהשוואה לרמת הרקומבינציה של הביקורת. בכדי לבחון את יכולת האינטגרציה בין האתרים שניבחנו, ניבנו הפלסמידים הבאים:

(1) מבנה פלסמידי "המטרה": **35SPr - psloxT**

(2) מבנה הפלסמיד "החודר" (פלסמיד מדווח) **psloxV - gusA - 35ST**

(3) מבנה פלסמיד המבטא רקומבינאז: **35SPr - Cre - 35ST**

החדרה בו-זמנית של שלושת הפלסמידים (דווח ורקומבינאז) לפרוטופלסטים צפויה להביא לביטוי GUS כדיווח על אירוע אינטגרציה ולקבלת מיבנה: **35SPr –psloxTV– gusA - 35ST**.

התוצאות מראות כי בעוד פעילות GUS בניסויי הביקורת המבוססים על אינטגרציה אתרי *lox* טיבעיים, מראה עליה מתונה ברמה כפולה (פי 2) בהשוואה לרקע (ללא פלסמיד הרקומבינאז). פעילות ה-GUS הממוצעת בניסיונות האינטגרציה מהוות עליה של עד 50% בהשוואה לביקורת. תוצאות נמוכות אלו ניתנות להסבר על פי האופי הדו-כווני של אינטגרציה אתרי ה-*lox* הטבעי, מחד, ועל אי ההתאמה וחוסר אפקטיביות של הרקומבינאז הטבעי CRE לחולל אינטגרציה (רקומבינציה בין מולקולארית) בין אתרי ה-*psloxT* ו-*psloxV* שבניסוי.

מסקנות ותכניות להמשך המחקר

I. מערכת Φ C31 Int-attB\attP

התוצאות שהתקבלו נמצאות בימים אלו בתהליך של ניסויי אישוש על ידי אנליזת ביסולפיט-PCR של פלסמיד ביקורת (ללא החדרה לפרוטופלסטים). בנוסף לכך, בכדי לוודא שמתילציה של אתרי ה-*attB* ו-*attP* אכן חוסמת רקומבינציה, אנו נערכים לנסיונות רקומבינציה במערכת זו בתאים צמחיים בתנאים של ד-מתילציה (ראו/ה תכנית המחקר הקדמית).

II. מערכת ה-Cre/pslox

בניסויים עד כה פיתחנו יכולת לזיהוי פוטנציאלי של אתרי 'מטרה' גנומיים, מחד, וליצירת אתרי 'מחדר' ('וקטורים') בעלי יכולת הכרה ורקומבינציה עם אתרי המטרה, מאידך. במסגרת תכנית ההמשך (המוגשת לשנים 14-2011) אנו נערכים להפעלת טכנולוגיות 'אבולוציה מולקולרית' על הרקומבינאז Cre, להגברת רמת הספציפיות ויעילות הפעולה שלו על אתרי המטרה בחיידקים, פרוטופלסטים וצמחים. בנוסף, עקרונות הגישות שיפותחו לגבי מערכת ה-Cre/lox ייושמו על מערכת הרקומבינציה FLP/FRT, ובהתאם למסגרת הזמן, נערך ליישום הגישות שיפותחו בעגבניה.

רשימת ספרות

- Gidoni, D., Srivastava, V. and Carmi, N. (2008). Site-specific excisional recombination strategies for elimination of undesirable transgenes from crop plants. *In Vitro Cell & Dev Biol-Plant*. 44: 457-467
- Srivastava, V. and Gidoni, D. (2010). Site-specific gene integration technologies for crop improvement. *In Vitro Cell & Dev Biol-Plant*. Online.

סיכום עם שאלות מנחות

נא להתייחס לכל השאלות בקצרה ולעניין, ב-3 עד 4 שורות לכל שאלה (לא תובא בחשבון חריגה מגבולות המסגרת המודפסת). שיתוף הפעולה שלך יסייע לתהליך ההערכה של תוצאות המחקר.
הערה: נא לציין הפנייה לדו"ח אם נכללו בו נקודות נוספות לאלה שבסיכום.

מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה.
לפתח בצמחים מנגנון מולקולרי מבוקר, המבוסס על מערכות רקומבינציה-יחודיות- לאתר, להחדרה מכוונת של גנים זרים לאתרים גנומיים טבעיים המאופיינים ומוגדרים מראש.
עיקרי הניסויים והתוצאות.
פיתוח יכולת (שיטה מולקולארית-ביוטכנולוגית) בצמחים, לזיהוי פוטנציאלי של אתרי 'מטרה' גנומיים, מחד, וליצירה של אתרי 'מחדר' ('וקטורים') בעלי יכולת הכרה ורקומבינציה, מאידך.
מסקנות מדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר לתקופת הדוח?
השיטה פותחה עבור מערכת הרקומבינציה Cre/lox, אך היא ישימה גם עבור המערכת FLP/FRT. התוצאות פותחות דרך להמשך השגת יעדי המחקר, החדרת גן זר לאתרי מטרה טבעיים בגנום. הושגו מטרות המחקר לתקופת המחקר הנתון.
בעיות שונות לפתרון ו/או שינויים (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים) שחלו במהלך העבודה; התייחסות המשך המחקר לגביהן, האם יושגו מטרות המחקר בתקופה שנותנה לביצוע תוכנית המחקר?
הפעלת מערכת הרקומבינציה PhiC31 Int בתאים צימחיים. היכולת להגיע ליעדי הפרויקט תוך התבססות על מערכות הרקומבינציה Cre/lox (1) - FLP/FRT) סבירה בהחלט.
הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח: פרסומים בכתב - ציטט ביבליוגרפי כמקובל בפרסום מאמר מדעי; פנטטים - יש לציין שם ומס' פטנט; הרצאות וימי עיון - יש לפרט מקום, תאריך, ציטוט ביבליוגרפי של התקציר כמקובל בפרסום מאמר מדעי.
אין
פרסום הדוח: אני ממליץ לפרסם את הדוח: (סמן אחת מהאופציות)
רק בספריות
ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט)
חסוי - לא לפרסם
האם בכוונתך להגיש תוכנית המשך בתום תקופת המחקר הנוכחי? כן* - לא -
כן

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