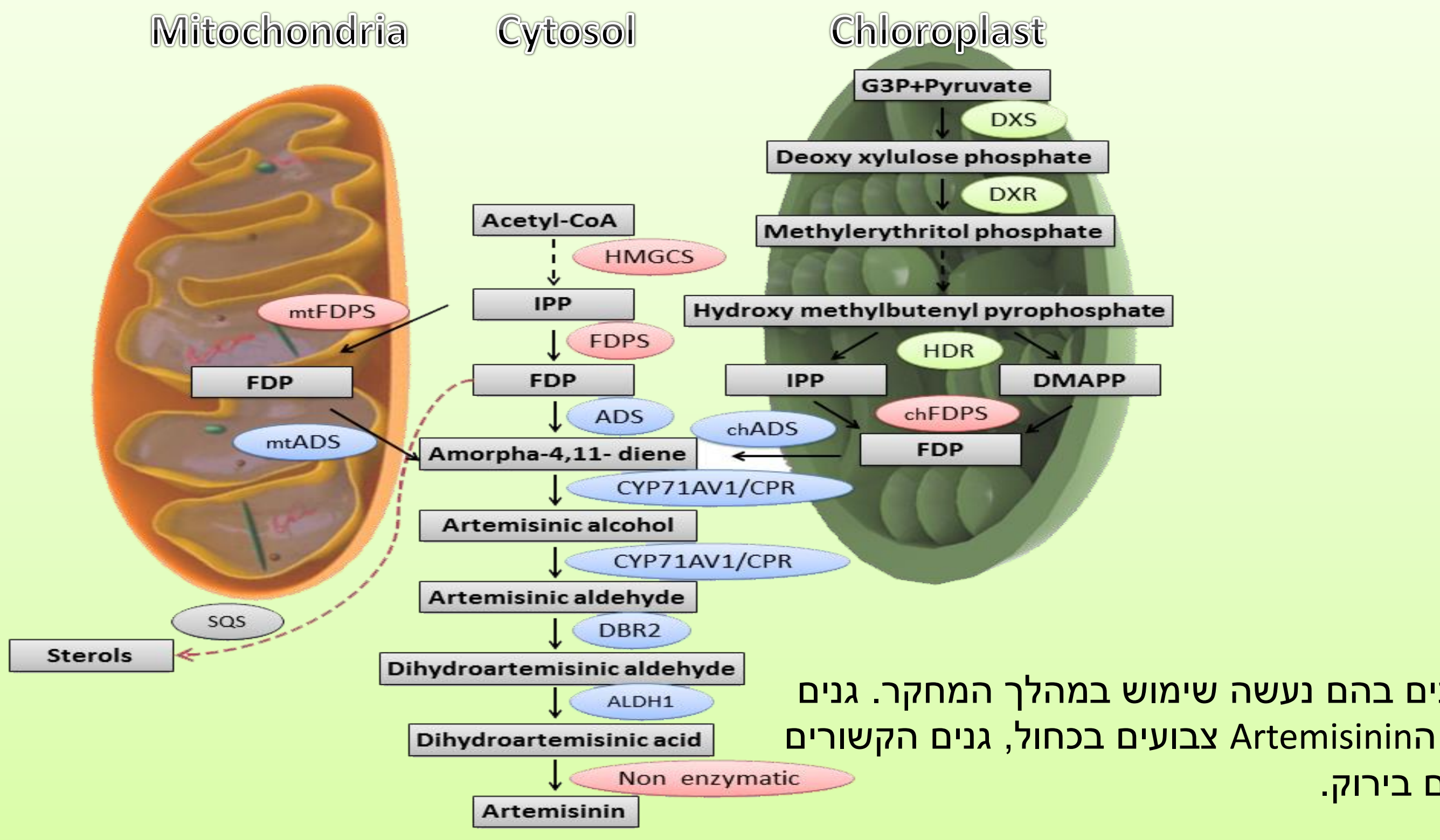
The Robert H. Smith Institute of Plant Sciences and Genetics in Agriculture, Faculty of Agriculture, Food and Environment,
The Hebrew University of Jerusalem, Rehovot, Israel

השבחה קומבינטורית של Artemisinin, תרופה נגד מלריה, בצמחי טבק טרנסגניים

גל שפירא, פרופסור משה ויינשטיין

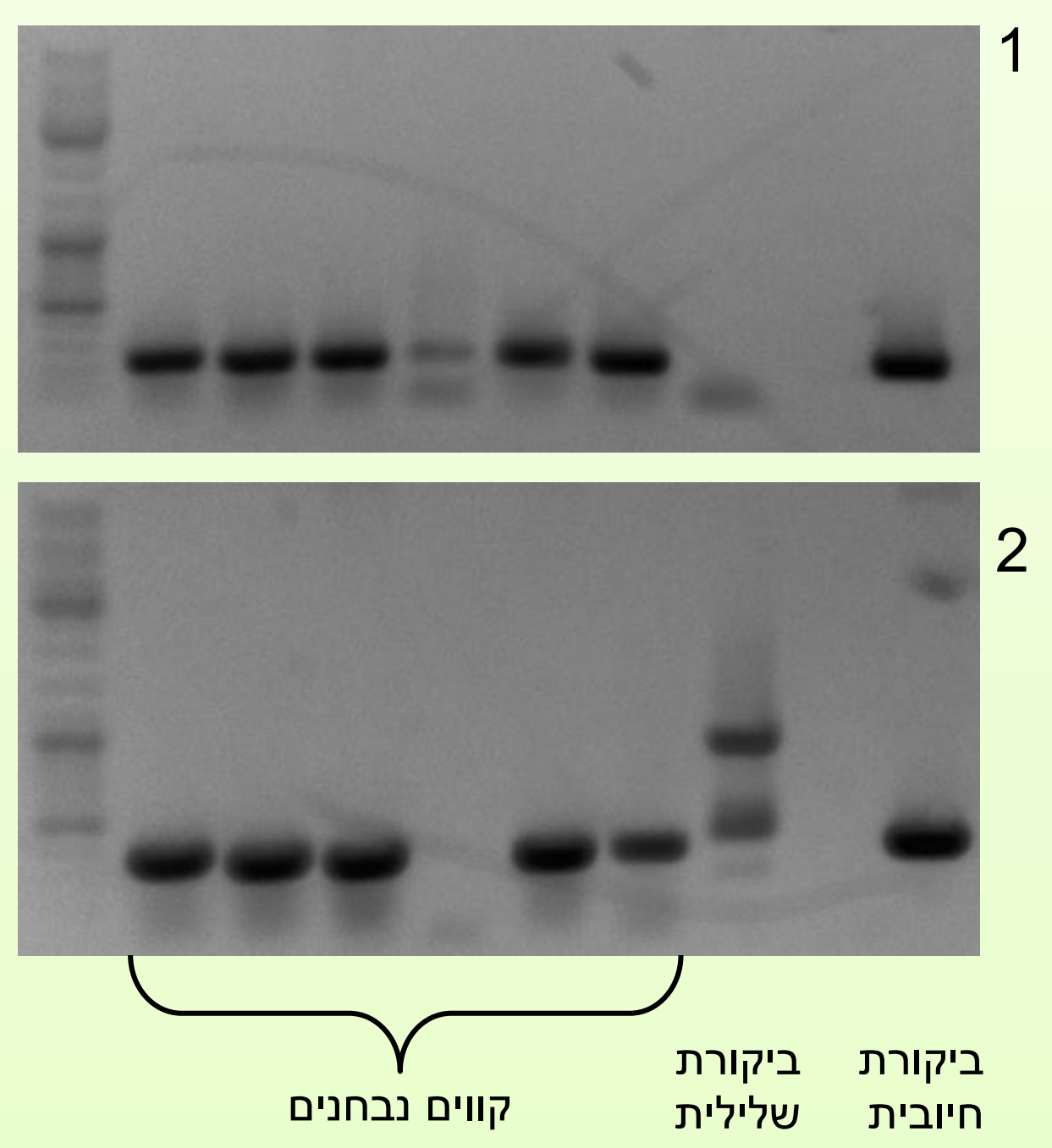
מחלת המלריה הינה מגיפה אנדמית אשר מסכנת תושבי מדינות רבות בעולם, בעיקר באיזורים טרופיים וסוב-טרופיים סמוך לקו המשווה. בשנת 2010 ארגון הבריאות העולמי WHO העריך כי מהמחלה נהרגו בין שש מאות אלף למיליון אנשים, רובם ילדים. מחלת המלריה נגרמת ע"י טפיל חד תאי מסוג *Plasmodium* ומועברת בין פונדקאים ע"י נקבת יתוש הAnopheles. לטפיל מעגל חיים מורכב הכולל רביה מינית במעי היתושה ושלבי רביה אה-מינית בכבד האדם ובתאי הדם האדומים. התרופה המקובלת לטיפול במלריה במשך שנים רבות הייתה Chloronique, אך טפילי ה-*Plasmodium* פיתחו עמידות כנגדה, מה שאילץ מציאת פתרון חלופי לטיפול במחלה. כיום הטיפול הנחשב ליעיל ביותר כנגד מלריה הוא combined therepy Artemisinin -שימוש במספר תרופות במקביל כאשר העיקרית שבהן היא Artemisinin. Artemisinin הוא ססקוויטרפן המיוצר בצמח *Artemisia annua*. בעוד שהדרישה ל Artemisinin הולכת ועולה כל הזמן, לצמח מספר חסרונות בתור מקור מסחרי למולקולה ועל כן נבחנות שיטות אחרות להפקתה. במעבדה של פרופסור משה וויינשטיין הועתק המסלול הספציפי של ביוסינתזת Artemisinin לגנום טבק (ראה תרשים 1, אנזימים המסומנים בכחול) ויצרו טבק טרנסגני המייצר Artemisinin[1]. **מטרת המחקר** היא להעלות את רמת הArtemisinin המיוצרת בקווי הטבק הטרנסגני.לאחר שהוכח כי ניתן לנצל את המיטוכונדריה למימוש מטרה זו[2], נעשה ניסיון לרתום מדור תאי נוסף- הכלורופלסט. לגנום הטבק הטרנסגני הכנסנו גנים חדשים ובנוסף ביצענו הכלאות בין קווי טבק טרנסגני המכילים קומבינציות גנים שונות במטרה להעלות את רמת ה Artemisinin המיוצרת.



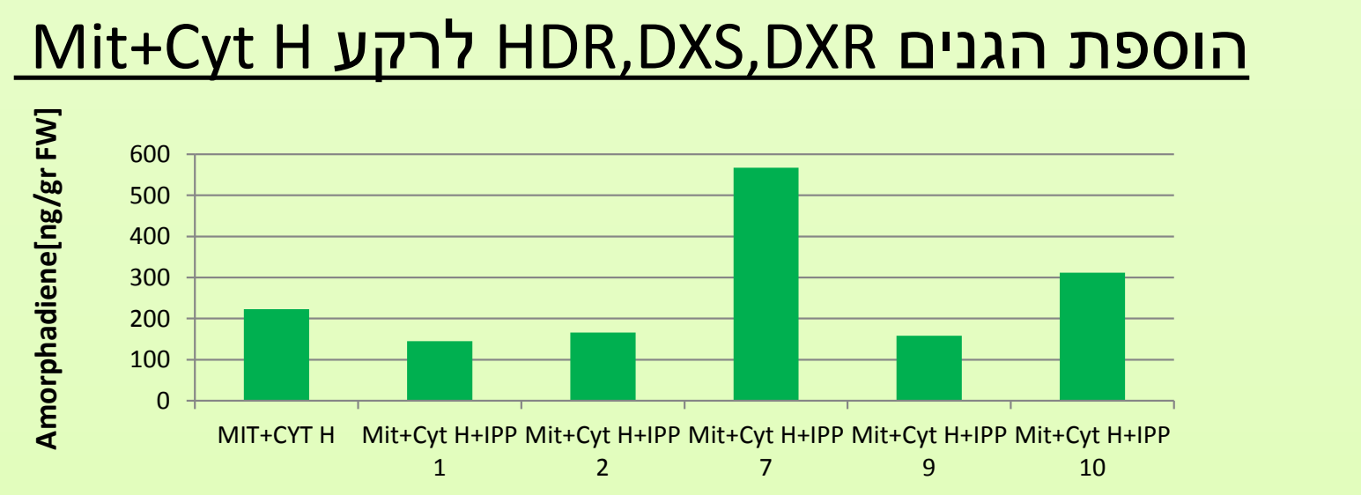
תרשים 1: סכמת הגנים בהם נעשה שימוש במהלך המחקר. גנים ספציפים לביוסינתזת הArtemisinin צבועים בכחול, גנים הקשורים למסלול הMEP צבועים בירוק.

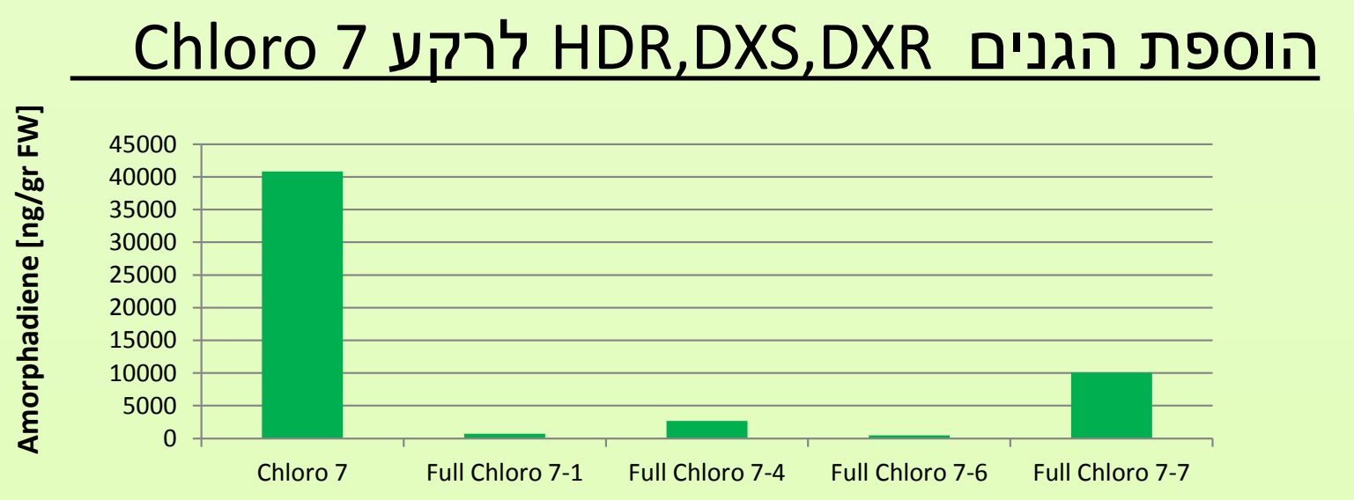
1.ריתום הכלורופלסט לייצור Artemisinin:

מולקולת **farnesyl diphosphate** (FDP) היא הסובסטראט הראשון של תהליך סינתזת Artemisinin. על מנת להגביר את זמינותו בטבק הטרנסגני הוחלט להעלות את כמות ה Isopentenyl pyrophosphate(IPP) שמהווה פרקורסור עבורו. מולקולות IPP נוצרות בצמחים עילאיים בשני מסלולים מטבוליים שונים:מסלול ה- Mevalonate (MEV) המתרחש בציטוזול ומסלול ה- Methylerythritol phosphate (MEP) המתרחש בכלורופלסט. במסלול הMEP זוהו שלושה אנזימי מפתח[3-5] :
(DXS) deoxyxylulose phosphate synthase,
(DXR)deoxyxylulose phosphate reductoisomerase
ו (HDR)hydroxy methyl butenyl diphosphate reductase.
הגנים לאנזימים אלו הוחדרו לגנום הטבק תחת פרומוטורים קונסטיטוטיבים על מנת לבחון האם הם יגבירו את כמות ה- amorpha-4,11-diene (AMO) שהם מייצרים. לאחר טרנספורמציה באמצעות אגרובקטריום ורגנרציה, אומת באנליזת PCR שהצמחים מכילים את הגנים DXS,DXR,HDR (ראה תמונה) ולאחר תקופת גידול של חודש בחממה נבדקה רמת הAMO בהם:

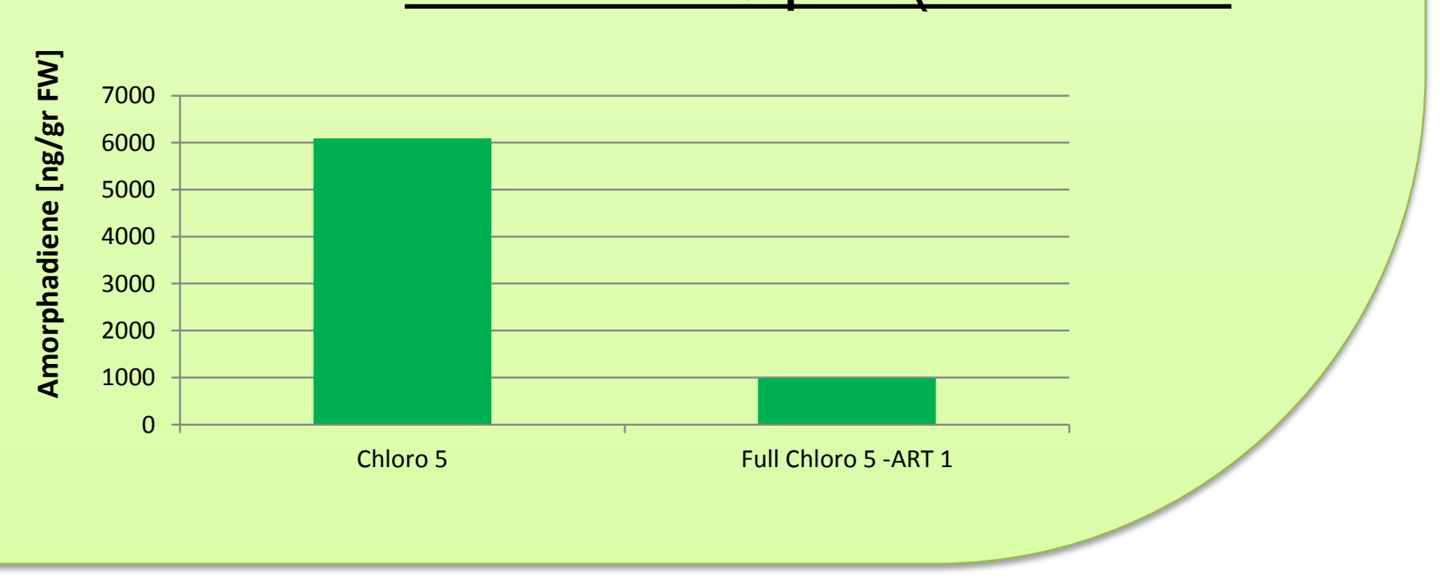


דוגמה לתוצאות PCR מדנ"א שהופק ממספר קווים: 1 תוצאות לגן DXR, 2 תוצאות לגן HDR


הוספת הגנים HDR,DXS,DXR לרקע Mit+Cyt H


הוספת הגנים HDR,DXS,DXR לרקע Chloro 7

הוספת הגנים HDR,DXS,DXR והגנים בקוסטרקט 3(ראה תרשים 2 B) לרקע Chloro 5



שלושת הגרפים מתארים רמת AMO שנמדדה מצמחים בני חודש. כל גרף מתאר צמחים עם קומבינציית גנים אחרת כאשר כל עמודה מתארת קו עם גנום ייחודי. העמודה השמאלית ביותר בכל גרף היא של צמח המקור שעליו בוצעה הטרנספורמציה, בהתאם לתרשים 2 A.

2. הכוונת השטף המטבולי של FDP לכיוון Artemisinin:

מולקולת FDP מנוצלת לסינתזת הArtemisinin (תרשים 1) אך היא גם מהווה סובסטרט למסלולים אחרים בתא כגון סינתזת סטרולים וטרפנים. בכדי להכווין את השטף המטבולי לכיוון יצירת Artemisinin בחרנו באסטרטגיה של השתקת הגן לsqualene synthase (SQS), שהוא האנזים הראשון במסלול סינתזת הסטרולים. שיבטנו מקטע מאיזור ה3'utr של הגן SQS מטבק לפלסמיד בינארי שלאחר מכן הועבר לחיידק אגרובקטריום ,ששימש להדבקת צמחי טבק טרנסגניים. בהמשך נבצע בדיקה לרמת AMO בצמחים בהם הגן הושתק לעומת צמחים בהם הוא לא הושתק.


עלה שהודבק באגרובקטריום המכיל את המחדר שנועד להשתיק את SQS

3.הכלאות בין צמחים מקווי טבק טרנסגני שונים

ממכלול הקווים השונים שנוצרו במעבדה (תרשים 2) נבחרו הקווים שיצרו רמה גבוהה של AMO וביניהם בוצעו הכלאות מכוונות אשר מטרתן להגיע לצמח Full Cell -צמח שיכיל את כל האלמנטים המופיעים בתרשים 1, כולל גנים במסלול סינתזת Artemisinin וגנים ממסלולים המספקים לו פרקורסרים בשלושת המדורים- ציטוזול, מיטוכונדריה וכלורופלסט. לדוגמא, צמח Full Chloro המבטא גנים שונים ממסלול ה Artemisinin והMEP בכלורופלסט הוכלא עם צמחים מקווים שונים המבטאים גנים לסינתזת Artemisinin במיטוכונדריה ובציטוזול. בכדי לנצל את הקומבינטוריקה ולהגדיל את השונות נעשו הכלאות רציפרוקליות. הצמחים שהתקבלו מההכלאות נסרקו באנליזת PCR לבדיקת הכלת הגנים (סה"כ 14 גנים שמקורם ב7 קונסטרקטים).


לאחר ההכלאה הפרח מסומן וההלקט נאסף כאשר הוא בשל.

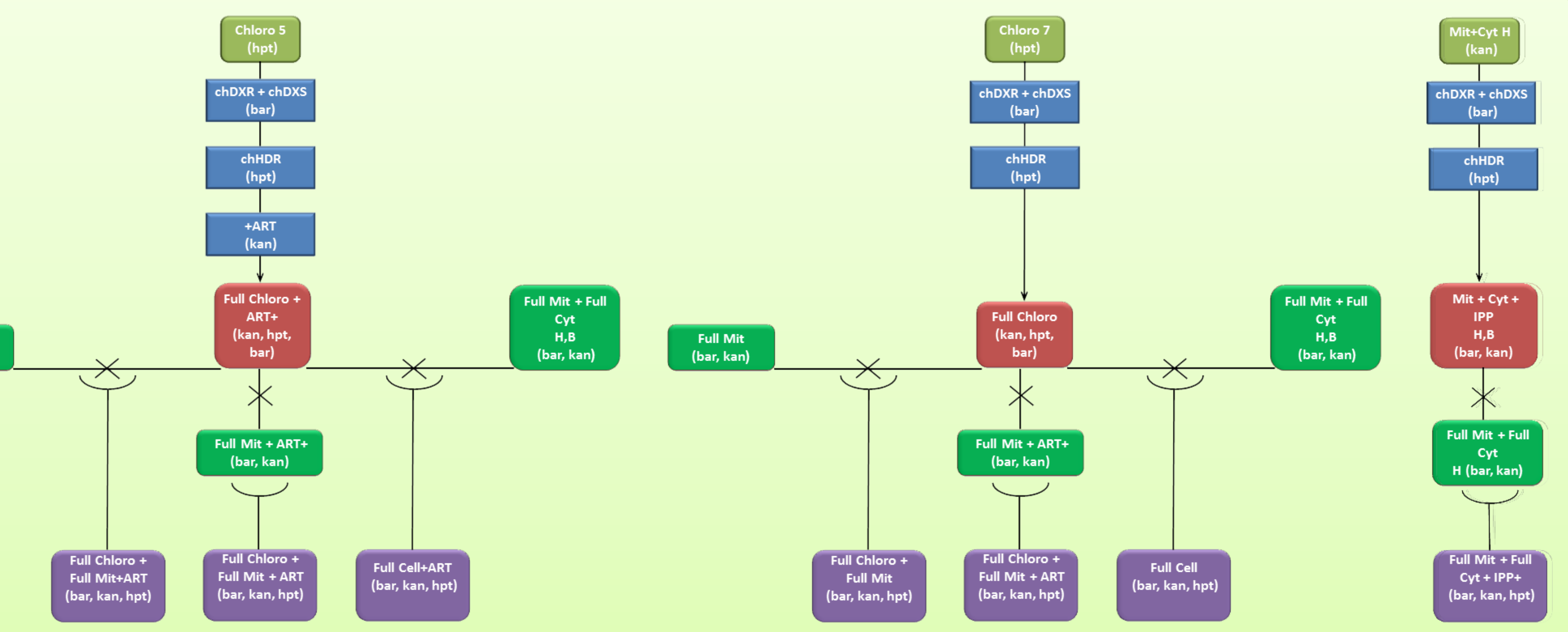

הזרעים שבהלקט עוברים עיקור ונזרעים על מצע גידול המכיל את האנטיביוטיקות הרלוונטיות.

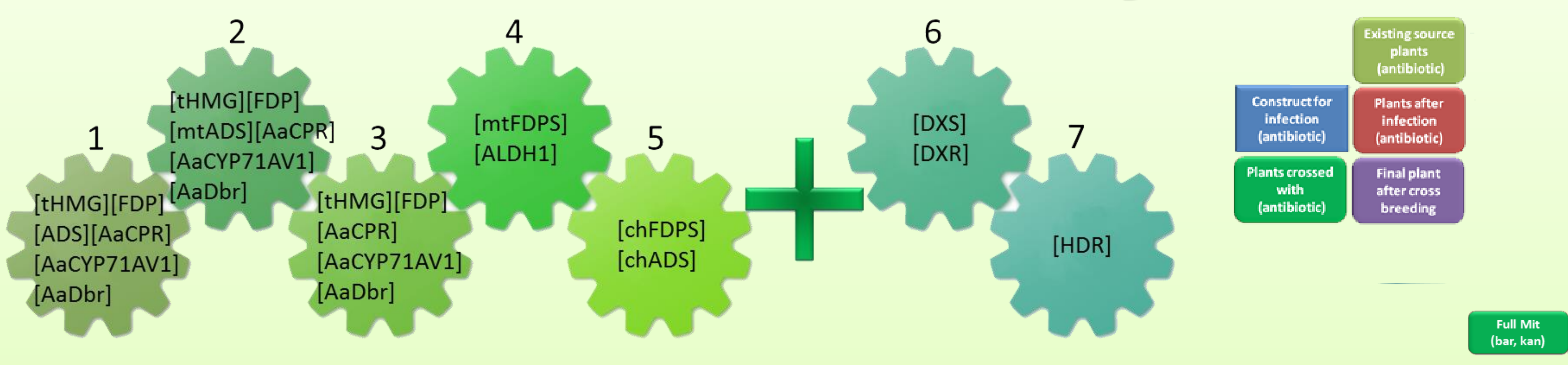

ניתן לראות שחלק מהזרעים לא נובטים. בנוסף ניתן להבחין כבר בהבדלים פנוטיפיים בין הצמחים (רמת כלורוטיות למשל).


בשלב בוגר יותר כבר ניתן לאסוף דגימה ולהפיק ממנה דנ"א ולבדוק שהצמח מכיל בגנום שלו את הגנים הדרושים.


את הצמחים שנמצאו כמכילים את הגנים מגדלים עד לגיל המתאים להוצאה לחממה

4.סיכום מהלך המחקר ופירוט הגנים והקונסטרקטים בהם נעשה שימוש





C

Line name	Chloro 5	Chloro 7	Mit+Cyt	Full Chloro + ART	Full Chloro	Mit + Cyt + IPP	Full Mit	Full Mit + ART	Full Mit + Full Cyt	Full Chloro + Full Mit+ART	Full Cell+ART	Full Chloro + Full Mit	Full Cell	Full Mit + Full Cyt + IPP
Transgenic for	5	5	1,2	5-7,3	5- 7	1,2,6,7	2,4	2-4	1,2,4	2-7	1-7	2,4- 7	1,2, 4-7	1,2,4,6,7

תרשים 2:
A תרשים זרימה המתאר את הנעשה במחקר. בשלב הראשון נעשו טרנספורמציות על מספר קווים שונים. לאחר קבלת הצמחים המכילים את הגנים הנוספים בוצעו הכלאות בינם לבין צמחים מקווים שונים עם קומבינציות גנים שונות שנוצרו במעבדה.
B תצוגה של כל הקונסטרקטים שנעשה בהם שימוש במחקר, ופירוט הגנים שכל אחד מהם מכיל.
C פירוט כל קווי הטבק הטרנסגני בהם נעשה שימוש במחקר והקונסטרקטים שהם מכילים בגנום שלהם.

5. דיון ומסקנות

מתוצאות הבדיקה המתוארת בסעיף 1 ניתן להסיק כי הוספת הגנים HDR,DXS,DXR לגנום הטבק הטרנסגני יכולה לשפר את רמת הAMO המיוצרת בהם;
הוספת הגנים HDR,DXS,DXR לרקע MIT+CYT H אפשרה לנו לבחור מספר קווים טרנסגניים שבהם עלתה רמת AMO. לעומת זאת תוספת של הגנים ברקע chloro 5 וchloro 7 הוביל לירידה ברמות הAMO בכל הקווים מרקע זה שנבדקו. תוצאה זו אינה עומדת בקנה אחד עם ניסוי בביטוי חולף שנעשה בעבר במעבדה. בניסוי זה, שבו בוצע overexpression של שלושת הגנים באמצעות אגרו-אינפילטרציה למשך יומיים, נצפתה עליה ברמת AMO לעומת צמחי ביקורת. ניתן להציע כי הסיבה לכך היא שביטוי גנים המגבירים זרימה מטבולית בתא לטווח ארוך מכבידה על התא כי היא מנצלת מאגרים הדרושים להתפתחות תקינה וקיום. על כן ייתכן והצמח הפעיל מנגנונים לדיכוי ביטוי הגנים כדי להתמודד עם המעמס. ייצור מוגבר של פרקוסרים אלו יכול לפגוע בתפקוד האורגנלה ואכן בקווים chloro 5 וchloro 7 המייצרים רמה גבוהה של AMO נצפתה תופעה של כלורטיות בעלים, ובקווים שהתקבלו לאחר הטרנספורמציה כמעט ולא נצפתה כלורוטיות (ראה תמונה).
אפשרות אחרת היא שהזרימה המוגברת של הפרקורסרים מנוצלת לטובת מסלולים אחרים (כגון מסלול סינתזת הסטרולים) שגם הם עשויים להפריע להתפתחות הצמח. יתכן והוספת הגנים תחת פרומוטורים אינדוקטיבים, ולא קונסטיטוטיבים כפי שנעשה במקרה הנ"ל ,יאפשר לנצל את היתרון של תוספת הפרקורסרים באופן שלא יפגע בהתפתחות התקינה של הצמח.
הצמחים שנוצרו במסגרת ההשבחה הקומבינטורית (תרשים 2) נמצאים כעת בשלבי גידול מתקדמים ואנו רוצים לבחון אותם למטבוליטים שונים במטרה להסיק האם נוכל להפיק מהם יותר Artemisinin.


צמח כלורוטי מרקע Chloro


צמח מרקע Chloro שעבר טרנספורמציה עם הגנים DXS,DXR,HDR וכבר לא מראה פנוטיפ כלורוטי

ביבליוגרפיה:

1) Farhi, M., Marhevka, E., Ben-Ari, J., Algamas-Dimantov, A., Liang, Z., Zeevi, V., Edelbaum, O., et al. (2011). Generation of the potent anti-malarial drug artemisinin in tobacco. *Nature biotechnology*, *29*(12), 1072–4.
2) Moran Farhi, Magali Kozin, Duchin Shai, Alexander Vainstein. (2013). Metabolic Engineering of Plants for Artemisinin Synthesis. *Biotechnology&Genetic Engineering*
3)Wu, S., Schalk, M., Clark, A., Miles, R. B., Coates, R., & Chappell, J. (2006). Redirection of cytosolic or plastidic isoprenoid precursors elevates terpene production in plants. *Nature biotechnology*, *24*(11), 1441–7.
4) Yang, J., Adhikari, M. N., Liu, H., Xu, H., He, G., Zhan, R., Wei, J., et al. (2012). Characterization and functional analysis of the genes encoding 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase and 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, the two enzymes in the MEP pathway, from *Amomum villosum* Lour. *Molecular biology reports*, *39*(8), 8287–96.
5) Botella-Pavía, P., Besumbes, O., Phillips, M. a, Carretero-Paulet, L., Boronat, A., & Rodríguez-Concepción, M. (2004). Regulation of carotenoid biosynthesis in plants: evidence for a key role of hydroxymethylbutenyl diphosphate reductase in controlling the supply of plastidial isoprenoid precursors. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, *40*(2), 188–99