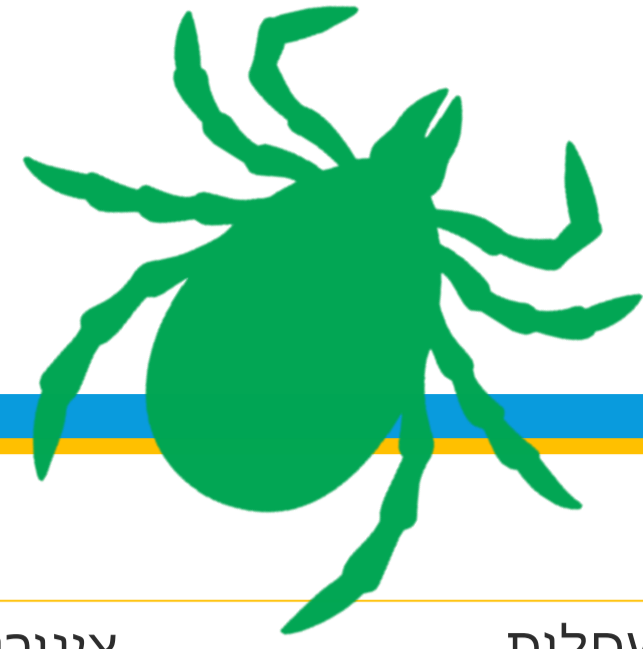


# חשיבות החומצה הפרולין בסמיבוזה בין קרצית הכלב החומה והחידק *Coxiella*

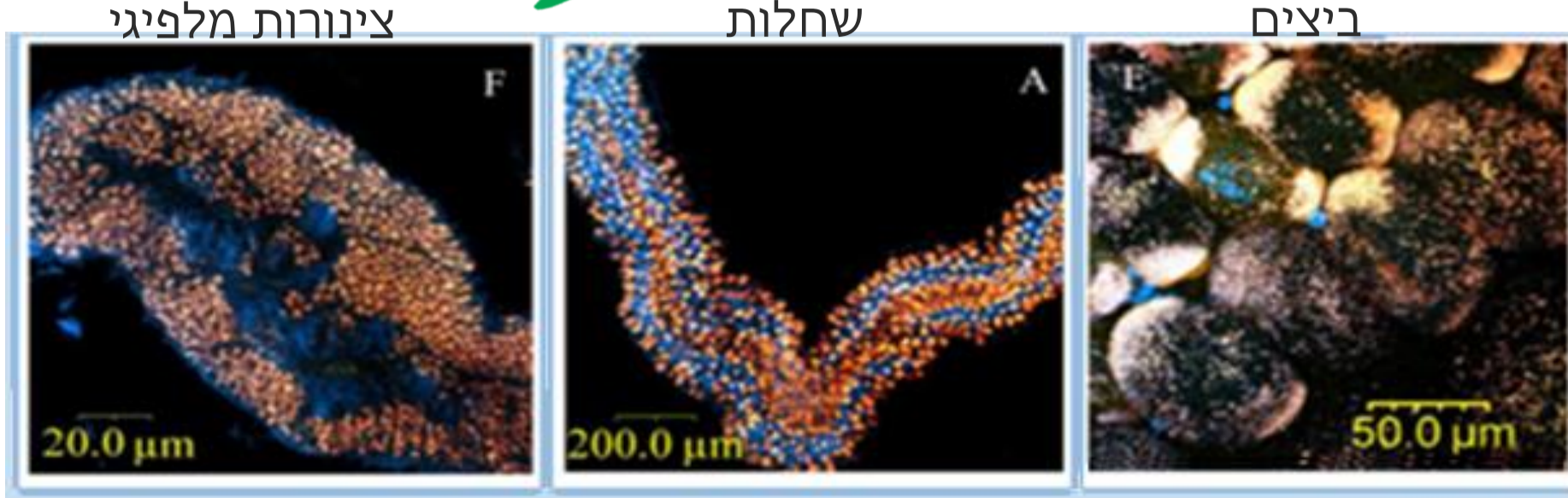


נטע שקד,  
בהנחיית פרופ' יובל גוטליב  
בית הספר לרפואה וטרנירית על שם קורט

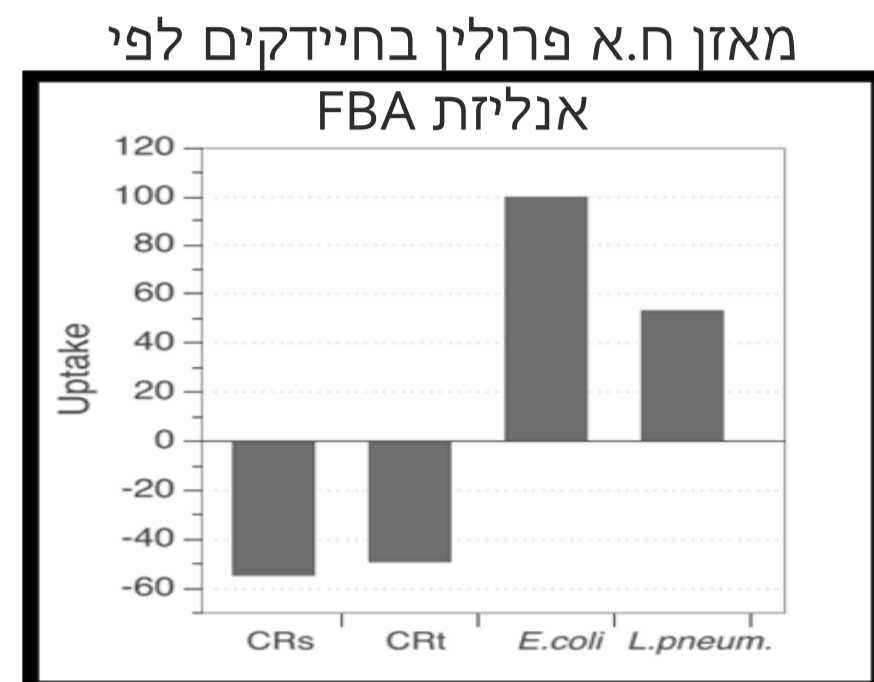
## מבוא

קרציות מעבירות מגוון של גורמי מחלה לאדם ולבעלי החיים ולכן חשובות מבחינה רפואית. הבנת ביולוגיית הקרצית יכולה לשמש בעתיד כבסיס לפיתוח אסטרטגיות הדברה כנגדה. קרציות ניזונות באופן בלעדי מדם חולייתנים החסר בויטמיני B ולכן יש להן חיידקים סמביוטים כדוגמת חיידקי קוקסיילה (*Coxiella*) המשלימים את החסרים התזונתיים וחיוניים להשרדותן. הסמביוטים נמצאים בתוך צינורות מלפגי (מערכת הפרשה) ותאי השחלות של הקרצית ומועברים מהאם לצאצאים דרך הביצים (איור 1). ממצאים מגוונים הקוקסיילה של קרצית הכלב (*Rhipicephalus sanguineus*), שהינו גנום מופחת המשמר גנים הכרחיים לסמביוזה, מדגימים כי החומצה האמינית פרולין עשויה למלא תפקיד בקשר בין הסמביוט לקרצית: באנליזה מטבולית ממוחשבת נמצא שפרולין מיוצר בעודף על ידי החיידק (איור 2), ובהתאמה נמצא יצוג יתר של טרנספורטרים לשינוע פרולין. לפרולין חשיבות בשמירה על המאזן האנרגטי בפרוקי גלויים, וקרציות לאחר הזנה זקוקות לאנרגיה מרובה עבור עיכול ויצירת ביצים. בעבודה זו נבדק האם נוכחות של חיידקי קוקסיילה משפיעה על כמות הפרולין בקרצית והאם בקרציות תחת דרישה מטבולית גבוהה מיוצר יותר פרולין. ממצאים אלו צפויים למקד את חשיבות הפרולין בקשר שבין הקרצית והקוקסיילה.

איור 1: Fluorescence in situ hybridization (FISH) המציג צינורות מלפגי (איבר לסילוק פסולת חנקנית בקרצית), שחלות וביצי קרצית מאוכלסים על ידי אוכלוסיית קוקסיילה (קוקסיילה בצהוב, גרעיני תאי הקרצית בכחול)



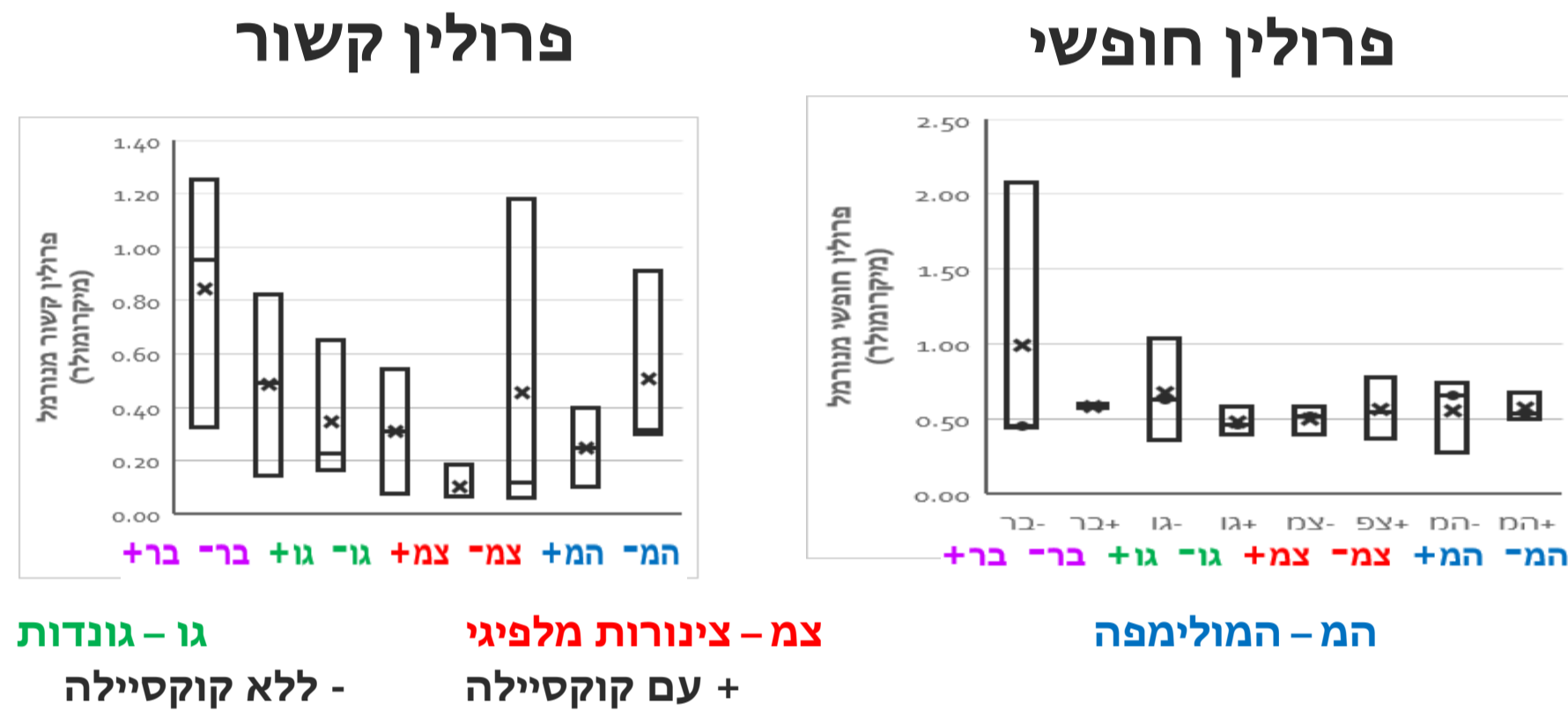
איור 2: גרף המציג את צריכת הפרולין בחיידקים לפי אנליזה ממוחשבת לניבוי רמות יצור וצריכת מטבוליים (FBA - Flux Balance Analysis). ניתן לראות שבחיידק הקוקסיילה (CRs, CRT) קיימת צריכה שלילית של פרולין (כלומר פרולין מופרש מהתאים) ואילו בחיידקים דומים ממשפחת הגאמפרוטאובקטריה, לגיונלה ואי. קולי קיים מאזן חיובי של פרולין (כלומר צריכה של פרולין).



## תוצאות

• **אין הבדל בכמות פרולין באיברים של קרציות רעבות סמביוטיות ואפוסמביוטיות**

סכום פרולין חופשי וקשור



המ+ המ- צמ+ צמ- גו+ גו- בר+ בר-  
בר - בלוטות רוק

גו - גונדות  
צמ - צינורות מלפגי  
+ עם קוקסיילה - ללא קוקסיילה

המ - המולימפה  
המ+ המ- צמ+ צמ- גו+ גו- בר+ בר-

כל עמדה מייצגת חזרה ביולוגית של 2-3 איגומים כאשר כל איגום מכיל בין 3-4 איברים מנותחים, בממוצע 10 איברים מנותחים מקרציות שונות עבור כל עמדה.

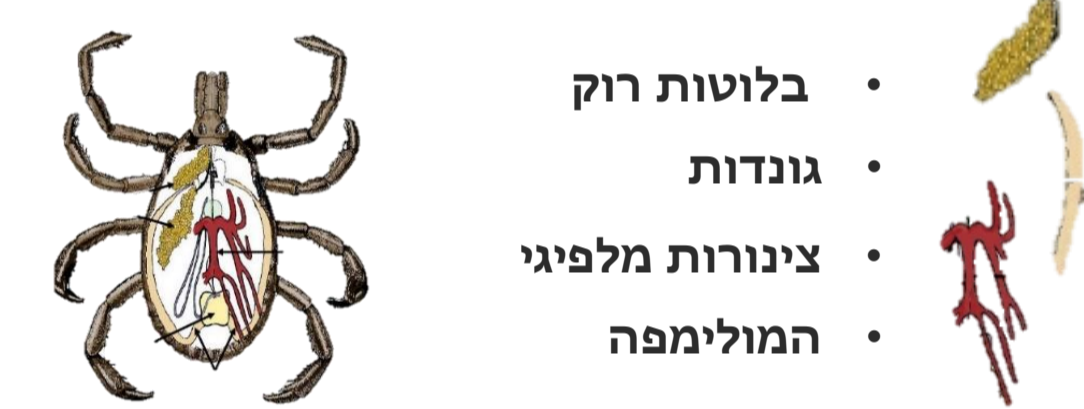
## השערת המחקר

• החיידק קוקסיילה מייצר ומפריש פרולין התורם לכשירות הקרצית בזמן פעילות מטבולית מוגברת, ולכן:

1. בקרציות סמביוטיות כמות פרולין גבוהה יותר לעומת אפוסמביוטיות
2. בקרציות רוויות כמות פרולין גבוהה יותר לעומת רעבות

## מטרות המחקר

1. א. כימות פרולין באיברים השונים בקרציות רעבות סמביוטיות ואפוסמביוטיות



1. ב. כימות פרולין בקרציות רעבות שלמות סמביוטיות ואפוסמביוטיות

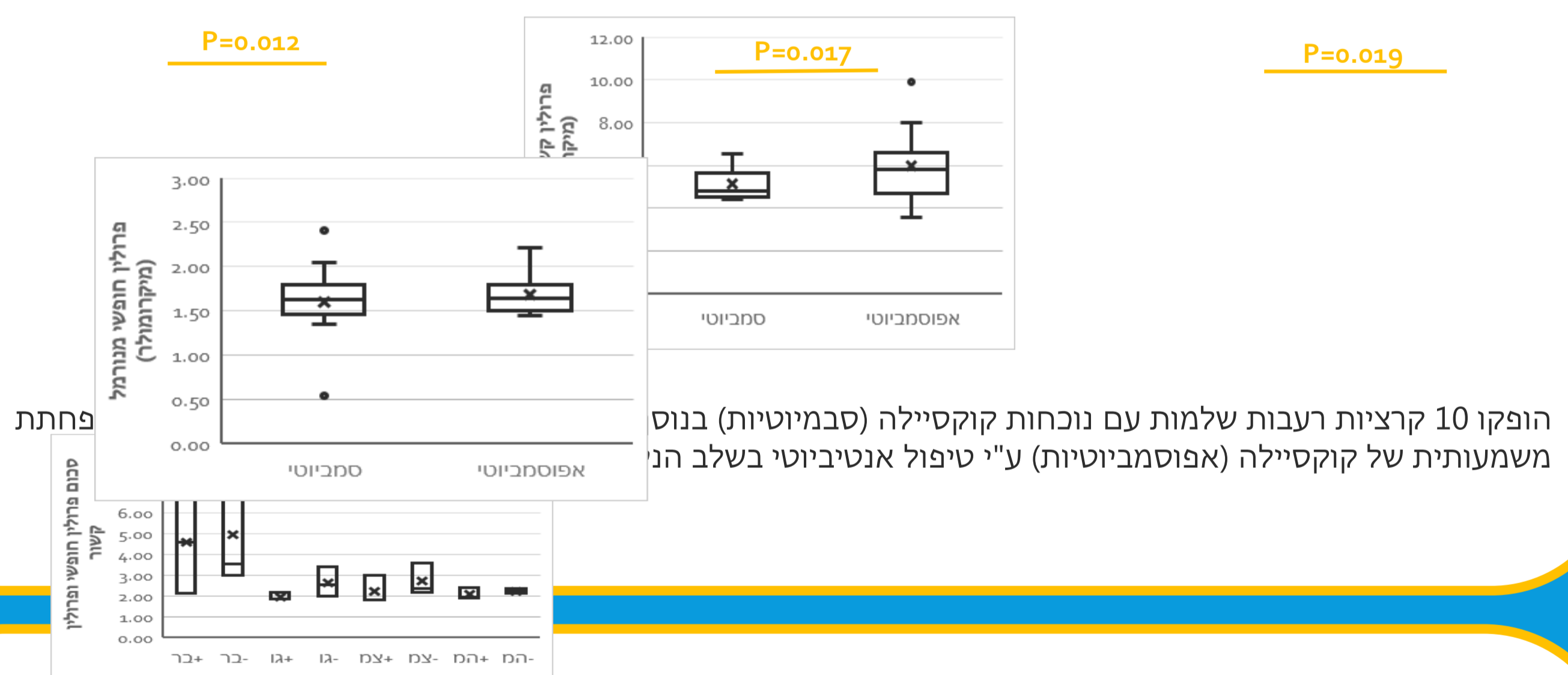


2. כימות פרולין בקרציות רוויות מול רעבות (אחרי ולפני ארוחת דם)



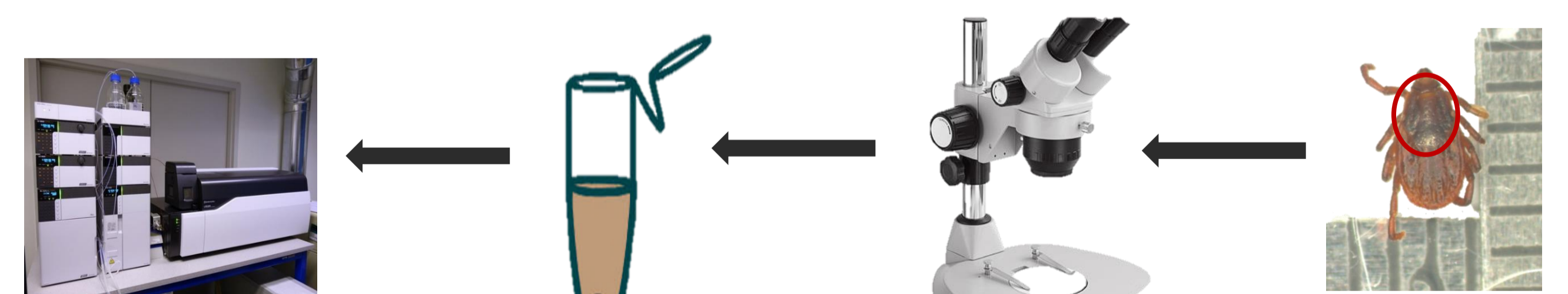
• **קרציות רעבות שלמות אפוסמביוטיות מכילות יותר פרולין**

סכום פרולין חופשי וקשור



הופקו 10 קרציות רעבות שלמות עם נוכחות קוקסיילה (סמביוטיות) בנוסף משמעותית של קוקסיילה (אפוסמביוטיות) ע"י טיפול אנטיביוטי בשלב הנ

## שיטות



1. מדדת סקוטום אינדקס

סקוטום אינדקס מהווה מדד קבוע לכשירות הקרצית, המתפלג באופן נורמאלי ובלתי תלוי באוכלוסייה, אליו ננרמל את התוצאות הסופיות.

2. ניתוח איברים תחת בינוקולר

ניתוח האיברים השונים לאיגומים. בין 3-4 איברים בכל איגום.

3. הפקה ומיצוי של:

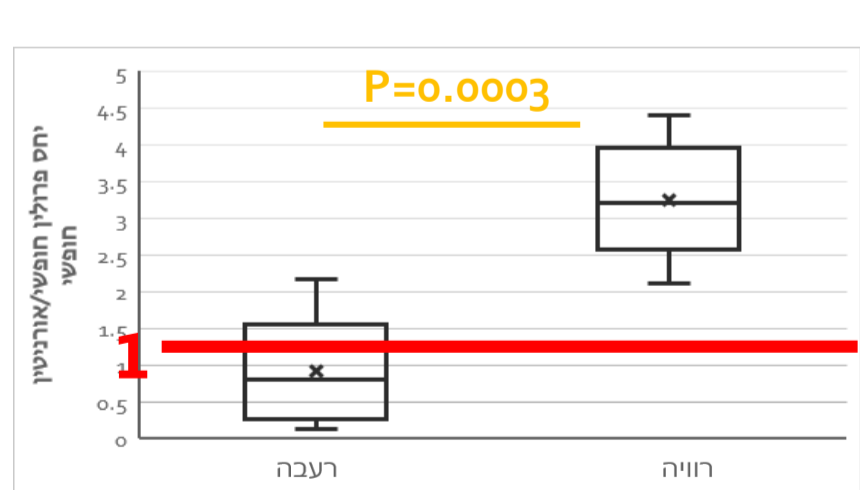
• חלבונים  
• ח"א חופשיות  
• חומצות גרעין  
מכלל הקרציות והאיברים.

4. אנליזה ב-LCMS

אנליזה כמותית של ח"א חופשיות וקשורות ב-ספקטרומטר מסה.

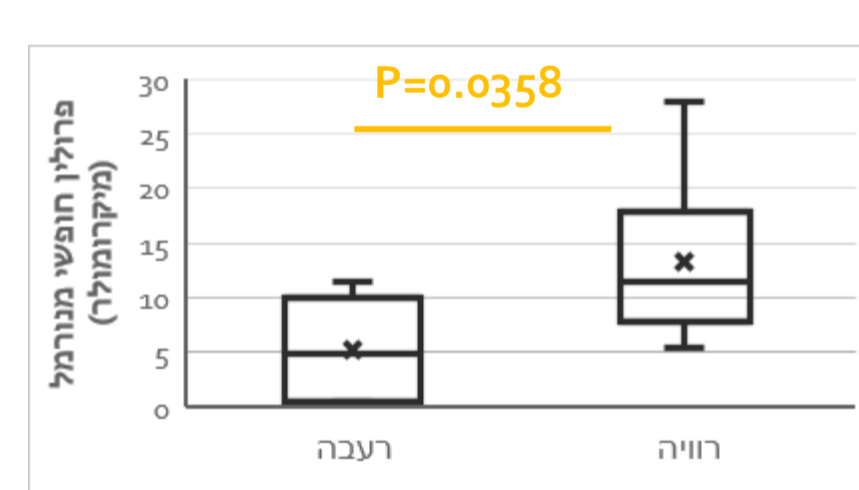
• **קרציות סמביוטיות רוויות מכילות יותר פרולין**

יחס פרולין/אורניטין חופשי



הופקו 6 קרציות רעבות שלמות סמביוטיות בנוסף ל-6 קרציות רוויות סמביוטיות. יחס פרולין/אורניטין גדול מ-1 מעיד על ייצור מוגבר יותר של פרולין בניגוד לערך קטן מ-1 שמצביע על כמות אורניטין גבוה יותר כלומר פירוק פרולין.

פרולין חופשי



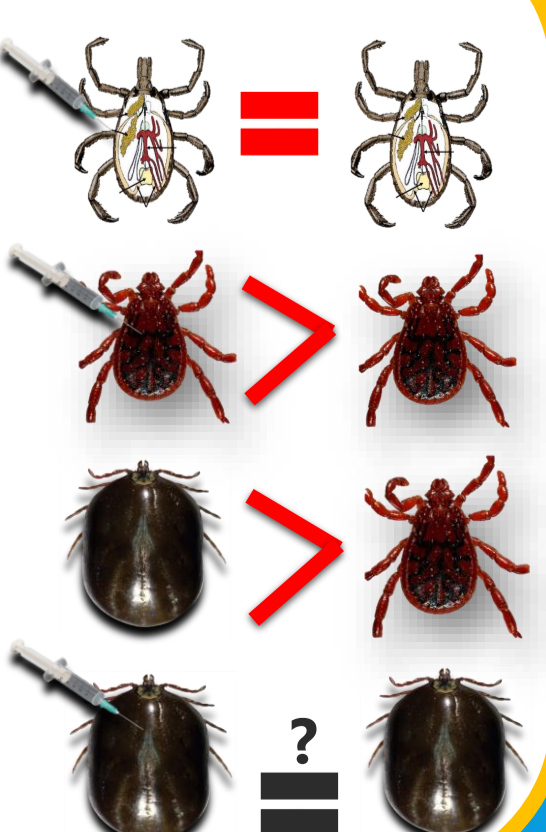
## מסקנות

בניגוד להשערנו הראשונית, בקרציות רעבות נמצא שעבור קרציות אפוסמביוטיות כמות הפרולין גבוהה מאשר קרציות סמביוטיות, לפיכך התוצאות מעלות את המסקנה כי יתכן שבשלב בו לקרצית פעילות מטבולית נמוכה (במצב רעב), פרולין נצרך על ידי קוקסיילה לשמירה על חיוניותו ואילו הקרצית צורכת פרולין מייצור עצמי או ממקור אחר (שיירי ארוחת דם). בהתאמה, קרציות רוויות שפעילותן המטבולית גבוהה, הכילו כמות פרולין גבוהה יותר מאשר בקרציות רעבות, שמקורו כנראה בייצור עודף על ידי החיידק קוקסיילה, הפעם לצרכי הקרצית.

באיברים המנותחים לא נמצאו הבדלים בין קרציות סמביוטיות ואפוסמביוטיות. יתכן שפעילות החיידק זהה בין האיברים השונים, אולם מאחר וגודל המדגם היה יחסית קטן, יש להרחיבו על מנת להסיק מסקנות נוספות.

## המשך מחקר

בכדי לחזק את המסקנות הנובעות מהמחקר הנוכחי, יש להשוות רמות פרולין גם בין קרציות סמביוטיות ואפוסמביוטיות רוויות, ולהגדיל את מדגם האיברים.



1. Tsementzi D, Castro Gordillo J, Mahagna M, Gottlieb Y, Konstantinidis K.T. 2018. Comparison of closely related, uncultivated *Coxiella* tick endosymbiont population genomes reveals clues about the mechanisms of symbiosis. Environmental microbiology. 20: 1751-1764.  
2. Gottlieb Y, Lalzar I, Klasson L. 2015. Distinctive genome reduction rates revealed by genomic analyses of two *Coxiella*-like endosymbionts in ticks. Genome biology and evolution. 7: 1779-1796.  
3. Lalzar I, Friedmann Y, Gottlieb Y. 2014. Tissue tropism and vertical transmission of *Coxiella* in *Rhipicephalus sanguineus* and *Rhipicephalus turanicus* ticks. Environmental microbiology. 16: 3657-3669.