

22 יוני 2006

דוח שנתי מוגש למועצת גפן היין

גישה חדשה לדיכוי מחלת הצהבון בגפן ע"י ביטוי נוגדנים ספציפיים לפיטופלסמה

A new approach for controlling of phytoplasmal diseases in grapevine using viral vectors expressing specific antibodies

דוח שנתי

מוגש למועצת גפן היין

ע"י

מוניר מואסי (ממשיך את רון גפני) המחלקה לפתולוגיה וחקר עשבים, מנהל המחקר החקלאי

Munir Mawassi,

The Department of Plant Pathology and Weed Control, Bet-Dagan. P.O.B. 6 Bet-Dagan. Email: mawassi@volcani.agri.gov.il

תקציר

הצגת הבעיה

פיטופלסמות הם חיידקים חסרי דופן הנחשבים לפתוגנים צמחיים הגורמים למחלות הצהבון ולנזקים כלכליים כבדים במינים רבים של צמחים. כיום אין פתרון יעיל למחלות הנגרמות ע"י פיטופלסמה וברור כי הפתרון לבעיות הקשות בתחום זה מחייב גישה בלתי שגרתית. מטרת המחקר היא לפתח גישה למלחמה בפיטופלסמות של גפן על יד ביטוי נוגדנים רקומבננטיים (scFv) סגוליים בצמחים.

מהלך ושיטות העבודה

הכנת נוגדנים פוליקלונליים מחומר צמחי חופשי מפיטופלסמה. ע"י השימוש בנוגדנים אלו מוכן תכשיר מועשר בפיטופלסמה. בידוד cDNA של ה-scFv, שיבוט בפלסמיד ביטוי וביטוי חלבונים בחיידקים. שיבוטה-scFv בגנום ווקטור ה-GVA.

תוצאות עיקריות

הוכן נוגדן פוליקלונלי נגד חומר צמחי חופשי מפיטופלסמה. הנוגדנים שימשו לצורך סילוק החומר הצמחי ממיצוי אשר נעשה מצמח מודבק והכנת תכשיר מועשר בפיטופלסמה. בודד ה-cDNA של ה-scFv (סגולי לפיטופלסמה קבוצת aster yellow). ה-cDNA שובט בפלסמיד ביטוי ובוטא בחיידקים. בבדיקות ראשוניות נמצא כי החלבון אשר התקבל מראה פעילות ביולוגית. ה-cDNA של ה-scFv הוחדר לגנום הווקטור GVA והביטוי נבדק בצמחי בוחן. תוצאות ראשוניות הראו על ביטוי ספציפי למקטע המוחדר..

מסקנות והמלצות

מקטע ה-cDNA של ה-scFv אשר בוטא בחיידקים ובצמחים (ע"י הווקטור GVA) הוא פעיל ביולוגית. בשנה השנייה נעסוק בפיתוח נוגדנים מונוקלונליים נגד פיטופלסמת הגפן מסוג Stolbur.

דו"ח מפורט

מבוא

פיטופלסמות הם חיידקים חסרי דופן הנחשבים לפתוגנים צמחיים אשר גורמים למחלות הצהבון ולנזקים כלכליים כבדים במינים רבים של עצי פרי, ירקות ופרחים. פיטופלסמות, הנחשבות לפתוגנים של שיפה, יכולות להיות מועברות מצמחים נגועים לצמחים בריאים ע"י הרכבה, ריבוי וגטטיבי, וע"י מינים ספציפיים של ציקדות. הגפן הנה אחד הגידולים החשובים בארץ ובמדינות רבות בעולם אשר נפגעת קשה ע"י מחלות הצהבון. הפיטופלסמות גורמות בגפן בעיקר לחוסר התעצות של השריגים והתנוונות של האשכולות, והנזקים מתבטאים בירידה בכמות, באיכות היבול ובהפסדים כלכליים הנאמדים במאות מיליוני דולרים. בישראל, הזן שרדונה ידוע לרגיש ביותר למחלות הצהבון, אם כי רוב הזנים של גפני היין רגישים גם כן. בארץ נמצא כי הפיטופלסמות מקבוצות ה- stolbur ו- aster yellows הן גורמות הנזק העיקריות בגידול הגפן. כיום אין פתרון יעיל למחלות הנגרמות ע"י פיטופלסמה וברור כי הפתרון לבעיות הקשות בתחום זה מחייב גישה בלתי שגרתית.

אחד המנגנונים למלחמה בגורמי מחלה ובגורמים זרים אחרים בבעלי חיים היא המערכת החיסונית המבוססת על תנועתם ופעילותם של נוגדנים המסוגלים להתקשר באופן סגולי ולנטרל פולשים תאיים ואחרים. הנוגדנים מורכבים מ-4 שרשראות פוליפפטידיות, שתי שרשראות קלות (light chains) בנות כ-220 חומצות אמיניות ושתיים כבדות (heavy chains) בנות כ-440 חומצות אמיניות. השרשראות מתקפלות בצורת (Y) ויוצרות מבנה תלת מרחבי בעל מתחמים בני כ-110 חומצות אמיניות (מכל שרשרת). האזורים היוצרים את החלק המשתנה בנוגדן (variable region) ((Fv) הנקשר לאנטיגן, נמצאים בקצה האמיני של החלבון, מהווים את המתחם הראשון ונוצרים מאינטראקציות בין החלק המשתנה של השרשרת הקלה (variable light (VL) לבין החלק המשתנה מהשרשרת הכבדה (variable heavy (VH). שאר המתחמים מהווים את האזור השמור והוא אחראי לפעילות אפקטורית של הנוגדן כגון קישור לרצפטורים.

צמחים חסרים נוגדנים, ומערכי ההגנה שהם פיתחו שונים. מאידך, מחקרים רבים הראו כי ניתן לייצר בצמחים נוגדנים שלמים, או חלקי נוגדנים השומרים על פעילותם ולהגיע לצמחים המוגנים ספציפית בפני פתוגן מסוים. בספרות דווח על יצירת נוגדנים מונוקלונליים סגוליים לפיטופלסמות מקבוצות ה- stolbur ו- aster yellows המעורבות במחלת הצהבון בגפן ובגידולים נוספים. בנוסף

נמצא כי צמחי מודל, טבק, אשר ביטאו נוגדן scFv ספציפי לפיטופלסמה מקבוצת ה- stolbur לא הראו סימני הדבקה בפתוגן. תוצאות אלה מראות כי ביטוי נוגדנים ספציפיים לפיטופלסמה בצמחים היא גישה ביוטכנולוגית היכולה לשמש למטרת "חיסון" צמחים בפני פתוגנים אלו. במחקר המוצע פה, ברצוננו ליישם גישה זו ולבטא בגפן גנים של נוגדים ספציפיים לפיטופלסמה. לצורך החדרת וביטוי גנים בגפן, פותח לאחרונה במעבדתנו ווקטור ויראלי המבוסס על גנום נגיף הגפן (GVA) *Grapevine virus A*. ה- GVA שייך לסוג *Vitivirus* ובעל גנום של RNA חד-גדילי, חיובי בגודל של כ- 7.5kb המכיל חמש מסגרות קריאה (ORFs) (open reading frames) אשר מקודדות חלבונים כגון הפולימראז (ORF1), חלבון התנועה (ORF3), חלבון המעטפת (ORF4), וחלבונים נוספים (ORF2 ו- ORF5) שתפקידם טרם נקבע. הגנום של ה- GVA הונדס לווקטור המכיל שני עותקים של הפרומוטור המבקרים יצירת חלבון התנועה, בתוספת אתרי רסטרקציה אשר ישמשו לצורך החדרת הגן הזר. על מנת לשמור על יציבות הגן הזר בגנום הוירוס במשך תקופת הרפלקציה של ה- RNA הויראלי בצמח, הוחלף עותק אחד משני הפרומוטורים האלה של חלבון התנועה בפרומוטור הטרולוגי אשר בודד מגזע אחר של GVA. היעילות של הווקטור המהונדס לביטוי גנים זרים נוסתה בהצלחה באמצעות ביטוי גן ה- GUS וגן ה- GFP. במסגרת המחקר המוצע ברצוננו לנצל את ווקטור ה- GVA לצורך ביטוי נוגדנים scFv ספציפיים לפיטופלסמות מקבוצת ה- stolbur ו- aster yellows למטרת דיכוי מחלת הצהבון בגפן.

מטרות המחקר

המטרות הספציפיות של המחקר המוצע הן:

- (1) להכין נוגדנים מונוקלונליים ספציפיים לפיטופלסמה מקבוצת ה- stolbur (נוגדנים מונוקלונליים לקבוצת ה- aster yellows כבר נמצאים ברשותנו).
- (2) לבטא בגפן גנים של scFv ספציפיים המסוגלים להתקשר ולנטרל באופן ספציפי פיטופלסמות מקבוצת ה- stolbur ו- aster yellows.

עיקר הניסויים שבוצעו והתוצאות שהתקבלו

דרי' מוואסי בשיתוף עם פרופ' גרה מובילים את המחקר הזה לצורך בניית בסיס למחקר עתידי למלחמה במחלות פיטופלסמה בצמחים שונים. בפרויקט זה, אשר בו מועסקים שלושה סטודנטים לתואר שני (תמר חורש, הילה יחזקל, ותומר גרשון).

הכנת תכשיר מועשר של פיטופלסמה.

חומר המוצא שלנו היה שתילים של וינקה אשר נמצאו ע"י בדיקות PCR מודבקים בפיטופלסמה. שתילים אלה שימשו לצורך איסוף רקמת שיפה עשירה בפיטופלסמה (עורקים ופטוטרות של עלים). רקמה כזאת (10 גרם) נאספה מצמחים מודבקים בפיטופלסמה, ושימשה להכנת הומוגנט ע"י טיפול באנזימים של צילולאז ומאציראז. במקביל ייצרנו הומוגנט מצמחים בריאים אשר משמשים להכנת נוגדנים לחלבונים הצמחיים. השלבים בעבודה אשר בוצעו בשנה הראשונה היו:

- הכנת נוגדנים פוליקלונליים כנגד חלבונים צמחיים, ע"י הזרקת הומוגנט מוכן מצמח וינקה בריא.
- הנוגדנים של מיצוי הצמח הבריא שימשו להשקעת החלבונים הצמחיים (cross-adsorption) ע"י הדגרתם של נוגדנים אלה עם מיצוי של צמח וינקה נגוע בפיטופלסמה. כתוצאה מכך תחול התקשרות בין הנוגדנים לבין החלבונים הצמחיים ואלה ישקעו ויוצאו מהמערכת ובכך נשאר עם חלבונים פיטופלסמתיים.
- החלבונים הצמחיים סולקו ע"י צנטריפוגה, והמשפה (הנוזל) המכיל את הפיטופלסמה ישלח למעבדת שירות במכון וויצמן להזרקה לעכברים והכנת נוגדנים מונוקלונליים ספציפיים.

הכנת mRNA ושיבוט scFv:

במסגרת שיתוף עם קבוצתו של דרי' Hei-Ti Hsu מ- Beltsville MD, USA קבלנו תאי היברידומה המייצרים נוגדנים ספציפיים לפיטופלסמה מקבוצת ה- aster yellows.

התאים של ההיברידומות אשר שימשו לצורך הפקת mRNA ע"י השימוש בקיטים מסחריים בהם ניתן לבודד poly A mRNA. ה-RNA המופק שימש לצורך הכנת cDNA של החלק הוריאבילי של השרשרת הכבדה ושל השרשרת הקלה של הנוגדנים המונוקלונליים (scFv) תוך כדי השימוש בפריימרים ספציפיים לאזורים שמורים בשרשראות אלה. שתי השרשראות חוברו ביניהן ע"י רצף DNA המקדד לפפטיד קצר $(\text{Ser-(Gly)}_4)_3$ אשר יגשר בין האזור המשתנה של השרשראות הכבדה והקלה. תפקידו של הפפטיד המגשר הוא לאפשר קיפול שתי השרשראות ויצירת מבנה מרחבי פעיל.

בקצה הקרבוקסילי של המבנה הנוצר חובר פפטיד c-myc ופפטיד המורכב משרשרת היסטידינים. פפטידים אלה ישמשו למטרות זיהוי, הפקה וניקוי של החלבון תוצר הביטוי של ה-cDNA. שיבוט ה-cDNA בפלסמידים לצורך ביטוי תוצר ה-scFv באמצעות פלסמידים של ביטוי (pET28a) בחיידקים ובניית קונסטרוקטים לצורך טרנספורמציה של גפן נעשה ע"י השימוש בפרוטוקולים סטנדרטיים. מבנה ה-cDNA של שתי שרשראות הנוגדן בתוספת הפפטיד המגשר, פפטיד ה-c-myc ופפטיד ההיסטידינים שובט בפלסמיד לביטוי חלבונים pET28a, ולאחר מכן הוחדר הפלסמיד אשר יכול את המחדר לחיידקים BL21. בדיקת ביטוי המחדר נעשתה ע"י גידול החיידקים בנוכחות IPTG, הפקת החלבונים מהחיידקים ואנליזת Western blot תוך כדי השימוש בנוגדנים ספציפיים לפפטיד ההיסטידינים או לפפטיד ה-c-myc.

בדיקת פעילות:

בדיקת הפעילות של scFv מבוצעת ע"י בדיקות DAS-ELISA. מיצוי מצמחים (וינקה) נועים בפיטופלסמה קובעו על גבי ממבראנה. אחרי שטיפתה, הוגבה הממבראנה עם חלבון ה-scFv המבוטא בחיידק. לאחר מכן הוגבה הממבראנה עם נוגדן מונוקלונאלי סגולי לנוגדנים של הארנבת מסומן ב-alkaline phosphatase. פעילות ה-alkaline phosphatase נעשתה עם הוספת סובסטרט p-nitrophenyl phosphate.

בבדיקות ראשוניות אשר נעשו אובחנה פעילות ביולוגית ל-scFv המבוטא בחיידקים.

ביטוי scFv בצמחים:

לצורך החדרה וביטוי הגנים של scFv בצמחים התחלנו את הניסויים דרך השימוש במערכת וירוס-ווקטור. המערכת מבוססת על השימוש בוירוס ה-GVA כווקטור להחדרת וביטוי גנים זרים לתא הצמחי. מבין יתרונותיה הבולטים של מערכת זו: (א) ביטול הצורך בשתילת הגנים לתוך הגנום הצמחי (טרנספורמציה); (ב) הרמות הגבוהות של הריבוי של הוירוס מביאות לביטוי כמויות גדולות של תוצר הגן; (ג) בשל טבעה של ההדבקה המכאנית בוירוסים, הרמה המקסימאלית של ביטוי הגנים הזרים מהגנום הוויראלי, צפויה להתרחש בתוך זמן קצר, בדרך-כלל שבוע עד שבועיים מיום ההדבקה; (ד) היות יחידה GVA הוא וירוס של רקמת השיפה, ניתן להסיק כי ווקטור ה-GVA עשוי להוות לנו כלי יעיל לביטוי מקסימאלי של גנים לעמידות ברקמה בה חיה גם הפיטופלסמה. במעבדתו של ד"ר מוניר מוואסי

פותח ווקטור ויראלי המבוסס על גנום נגיף הגפן GVA. אשר הוכח כי היה יעיל למטרת ביטוי הגנים GFP ו-GUS בצמחי בנטמינה וגפן.

ה- cDNA של הנוגדנים scFv שובט לתוך הגנום של ווקטור ה- GVA תחת בקרת הפרומוטור של חלבון התנועה המביא את ביטוי הנוגדנים לרקמת השיפה המאוכסנת בפיטופלסמה. לאחר שיבוט הגנים של scFv הספציפיים לפיטופלסמה לתוך הגנום של ווקטור ה- GVA (המשובט בפלסמיד בינארי) נעשתה הדבקה של הווקטור לצמחי בוחן בנטמינה ע"י אגרואינפקציה. בדיקות ראשוניות מעידות על ביטוי של ה- scFv בצמחי בנטמינה. השלב הבא הוא לבחון את ביטוי ה- scFv במערכת של גפן.

המשך העבודה

בשנה השנייה של המחקר נעסוק נמשיך בהכנת התכשיר המועשר של פיטופלסמה מסוג ה- stolbur. התכשיר יישלח למכון ויצמן למדע לצורך הכנת נוגדנים מונוקלונליים. בנוסף נבחן את ביטוי ואת הפעילות הביולוגית של ה-scFv בגפן.