

820

2004-2006

תקופת המחקר:

817-0051-06

קוד מחקר:

Subject: DETOXIFICATION OF TRICHOOTHECENE BY GENETICALLY MODIFIED PROBIOTIC BACTERIA ADDED TO FOODS.

Principal investigator: RON SHAPIRA

Cooperative investigator: PINES MARK, PASTER NACHMAN

Institute: Faculty of Agriculture

שם המחקר: נטרול טריכוטצנים, רעלני פטריות המסוכנים לאדם ולבע"ח, ע"י חיידקים פרוביוטיים מותמרים המוספים למזון

חוקר ראשי: רון שפירא

חוקרים שותפים: מרק פינס, נחמן פסטר

מוסד: הפקולטה לחקלאות, רחובות

תקציר

מיקוטוקסינים מקבוצת הטריכוטצנים, מהווים בעיה בריאותית חמורה בשל תפוצתם הרחבה במזון (בעיקר בדגניים) והנזקים הבריאותיים הקשים הנגרמים בעקבות צריכת מזון נגוע, הן לאדם והן לחיות המשק. עמידותם של הטריכוטצנים בטיפול פיסיקליים וכימיים והקושי הרב בהדברת העובשים היוצרים אותם, העלתה את הצורך לחפש חלופות יעילות לניטרול. מטרת העבודה היא להשתמש בחיידקים פרוביוטיים לניטרול טריכוטצנים במעיים ע"י שיבוט וביטוי הגן *Tri101*, המקודד לאנזים המנטרל טריכוטצנים, בודד מפטריה ושובט לפלזמידים המשמשים לביטוי בחיידקי חומצת חלב. הפלזמידים המותמרים הוחדרו לחיידקים לקטיים (MG1363, NZ9000) ולחיידק הפרוביוטי *L. casei*. לאחר חשיפת החיידקים המותמרים לטריכוטצין נצפתה ירידה ברמת הרעלן. נמצא קשר ישר בין זמן חשיפת החיידקים לרעלן ולפירוקו. פותחה מערכת Bioassay רגישה למדידת רעילות הטוקסין המבוססת על זן של שמר אפיה שלגנום שלו משובט הגן GFP. נמצא כי החיידק הלקטי *L. lactis* המותמר הינו היעיל ביותר בפירוק הטוקסין. פותח מבחן נוסף לכימות הרעילות המבוסס על קווי תאים הומאניים ממעי גס ומכבד הרגישים לרעלן. במבחן זה התקבלה רגישות רבה יותר מזו שהתקבלה עם תאי השמר. לצורך הגברת הביטוי נבנה וקטור מעבורת המכיל את הגן GFP חסר פרומוטור לאיתור פרומוטורים טבעיים של החיידק *L. casei* העוברים שיפעול בתנאי מעי וזאת על ידי בניית ספריית פרומוטורים ב- *L. casei* ונקבע ריכוז מלחי מרה שישמש בניסויי חשיפת החיידק *L. casei*. בנוסף פותחה שיטת אלקטרו-טרנספורמציה ב- *L. casei* לקבלת יעילות טרנספורמציה גבוהה.

ספריית הפרומוטורים נסרקה במכשיר ה- FACS ובודדו החיידקים המצטיינים במספר מחזורי העשרה. החיידקים נאספו הועשרו ונבחרו מתוכם 10 שנראו כמצטיינים ביותר. בימים אלה אנו עמלים על ריצוף אזורי הבקרה. גישה חליפית לבידוד פרומוטורים הייתה חשיפת החיידק הפרוביוטי *L. casei* ל 0.05% מלחי מרה והשוואת פרופיל החלבונים לחיידק ביקורת. בודדו 4 חלבונים שכמותם עלתה בנוכחות מלחי המרה והרצף שלהם נקבע ביחידה לפרוטאומיקה של הטכניון. בימים אלה אנו מפענחים את רצפי הבקרה המקודדים לחלבונים אלה במטרה לשבטם לפני הגן *Tri101*. לאחר בחינת יעילות הפרוק של הרעלן ע"י חיידקים הנושאים את הפלזמידים הכימרים ניפנה למבחן דה-טוקסיפקציה בעכברים.

ניטרול טריכוטצנים, רעלני פטריות המסוכנים לאדם ולבע"ח, ע"י חיידקים פרוביוטיים
מותמרים המוספים במזון

**Detoxification of trichothecenes by genetically modified probiotic bacteria added
to foods**

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

ע"י

רוני שפירא	ביוכימיה ומדעי המזון, רחובות
נחמן פסטר	מדעי המזון, מנהל המחקר החקלאי, בית דגו
מארק פינס	מדעי בעלי חיים, מנהל המחקר החקלאי, רחובות

Shapira Roni, Biochemistry and Food Science, Faculty of Agriculture, P.O. B. 12 Rehovot 76100.
E-mail: shapira@agri.huji.ac.il

Paster Nachman, Food Science, ARO, The Volcani Center, P.O.B. 6 Bet Dagan
50250. E-mail: npaster@volcani.agri.gov.il

Pines Mark, Animal Science, ARO, The Volcani Center, P.O.B. 6 Bet Dagan
50250. E-mail: pines@agri.huji.ac.il

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא

חתימת החוקר מרק פינס

ב. תקציר

מיקוטוקסינים מקבוצת הטריכוטצינים, מהווים בעיה בריאותית חמורה בשל תפוצתם הרחבה במזון (בעיקר בדגניים) והנזקים הבריאותיים הקשים הנגרמים בעקבות צריכת מזון נגוע, הן לאדם והן לחיות המשק. עמידותם של הטריכוטצינים בטיפול פיסיקליים וכימיים והקושי הרב בהדברת העובשים היוצרים אותם, העלתה את הצורך לחפש חלופות יעילות לניטרול. מטרת העבודה היא להשתמש בחיידקים פרוביוטיים לניטרול טריכוטצינים במעיים ע"י שיבוט וביטוי הגן *Tri101*, המקודד לאנזים המנטרל טריכוטצינים, בודד מפטריה ושובט לפלזמידים המשמשים לביטוי בחיידקי חומצת חלב. הפלזמידים המותמרים הוחדרו לחיידקים לקטיים (NZ9000, MG1363) ולחיידק הפרוביוטי *L. casei*. לאחר חשיפת החיידקים המותמרים לטריכוטצין נצפתה ירידה ברמת הרעלן. נמצא קשר ישר בין זמן חשיפת החיידקים לרעלן ולפירוקו. פותחה מערכת Bioassay רגישה למדידת רעילות הטוקסין המבוססת על זן של שמר אפיה שלגנום שלו משובט הגן GFP. נמצא כי החיידק הלקטי *L. lactis* המותמר הינו היעיל ביותר בפירוק הטוקסין. פותח מבחן נוסף לכימות הרעילות המבוסס על קווי תאים הומאניים ממעי גס ומכבד הרגישים לרעלן. במבחן זה התקבלה רגישות רבה יותר מזו שהתקבלה עם תאי השמר. לצורך הגברת הביטוי נבנה וקטור מעבורת המכיל את הגן GFP חסר פרומוטור לאיתור פרומוטורים טבעיים של החיידק *L. casei* העוברים שיפעול בתנאי מעי וזאת על ידי בניית ספריית פרומוטורים ב- *L. casei* ונקבע ריכוז מלחי מרה שימש בניסויי חשיפת החיידק *L. casei*. בנוסף פותחה שיטת אלקטרו-טרנספורמציה ב- *L. casei* לקבלת יעילות טרנספורמציה גבוהה.

ספריית הפרומוטורים נסרקה במכשיר ה- FACS ובודדו החיידקים המצטיינים במספר מחזורי העשרה. החיידקים נאספו הועשרו ונבחרו מתוכם 10 שנראו כמצטיינים ביותר. בימים אלה אנו עמלים על ריצוף אזורי הבקרה. גישה חליפית לבידוד פרומוטורים הייתה חשיפת החיידק הפרוביוטי *L. casei* ל 0.05% מלחי מרה והשוואת פרופיל החלבונים לחיידק ביקורת. בודדו 4 חלבונים שכמותם עלתה בנוכחות מלחי המרה והרצף שלהם נקבע ביחידה לפרוטאומיקה של הטכניון. בימים אלה אנו מפענחים את רצפי הבקרה המקודדים לחלבונים אלה במטרה לשבטם לפני הגן *Tri101*. לאחר בחינת יעילות הפרוק של הרעלן ע"י חיידקים הנושאים את הפלזמידים הכימרים ניפנה למבחן דה-טוקסיפקציה בעכברים.

ג. מבוא

מיקוטוקסינים, רעלניים טוקסיים ביותר של עובשים, הם מטבוליטים משניים המיוצרים בעיקר ע"י עובשים מהקבוצות: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*. מעריכים שכרבע מהיבולים החקלאיים והמזון בעולם מזדהמים במיקוטוקסינים מידי שנה. חלק מהמיקוטוקסינים, רעילים ביותר כאשר הם נאכלים ע"י בני אדם או בע"ית. הפגיעה יכולה להיות בכל הרקמות והמערכות בגוף והמחלות השכיחות הם גידולים ממאירים בכבד, דיכוי המערכת החיסונית, נזק לכליות, שיבוש מערכות הורמונליות ופגיעה במערכת העיכול והעצבים. טריכוטצינים הם קבוצה של מיקוטוקסינים בעלי מבנה כימי דומה המיוצרים ע"י מינים שונים של הפטריה *Fusarium*. פעילותם העיקרית בתאים אוקריוטים היא חסימה של יצירת חלבונים עקב היקשרותם לתת היחידה הגדולה של הריבוזום. מבין הטריכוטצינים T-2 הוא הנפוץ ביותר בעולם בעיקר בגרעינים (חיטה, שעורה תירס שיבולת שועל ועד). הרעלן גורם לבצקות בחלל הבטן, שלשולים דמיים עקב נזקים קשים למעי הגס, נמק בחלל הפה, נזקים למערכת העצבים ומות.

השיטות לניטרול מיקוטוקסינים מתחלקות לשלוש קטגוריות: הסרה או הרחקה, פרוק באמצעים פיסיקליים או כימיים וניטרול ביולוגי. החלופה הביולוגית היא לעיתים היחידה לנוכח העמידות של הרעלנים לפרוק פיסיקאלי, דחיית השימוש בכימיקלים המזיקים לאדם ולסביבה ומשנים תכונות סנסוריות במזון והשיקול הכלכלי – תועלת/ נזק צפוי. לחיידקים פרובוטיים המוספים למזון מייחסים מגוון פעילויות המשפרות את מצב הבריאות של המאכסן. נטרול מיקוטוקסינים ע"י מיקרואוגנומים (לאו דוקא חיידקים פרובוטיים) מתרחש ע"י ספיחה או התמרה אנזימטית. בהקשר זה נתגלה לפי כשש שנים גן בפטריה המייצרת טריכוטצנים – *tri101* המקודד לאנזים המבצע אצטילציה ובכך מנטרל את הטוקסיות של רעלנים מקבוצה זו.

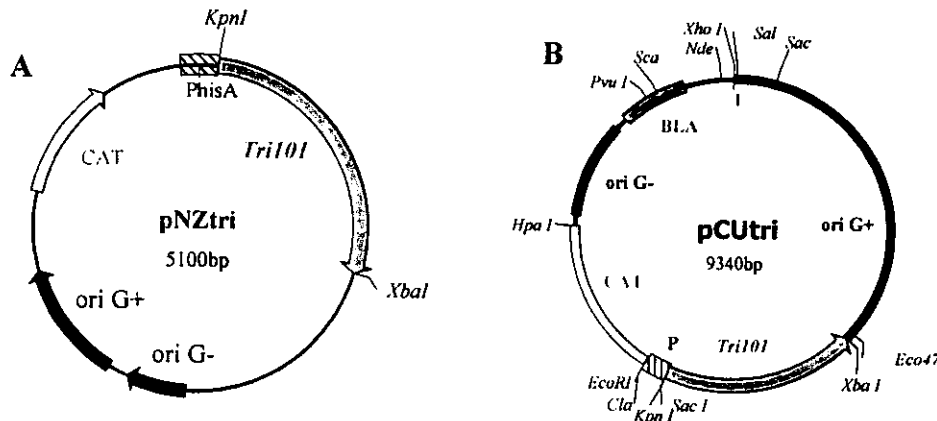
מטרות המחקר:

1. שיבוט וביטוי הגן *Tri101* בחיידק הפרוביוטי *Lactobacillus casei*
2. כימות הפעילות האנזימטית של החיידקים המותמרים ע"י HPLC ו GC
3. פיתוח מערכות Bioassay רגישות לכימות פעילות הנטרול.
4. הכנת ספריית פרומטורים וסריקתה לבידוד פרומטורים יעילים לביטוי
5. בידוד חלבונים המתבטאים בעודף בתנאי מעי לאפיון פרומטורים יעילים לבטוי

ד. עיקרי הניסויים ותוצאות

שיבוט הגן *tri101* לוקטורי ביטוי

הגן *tri101* בודד מה-DNA הגנומי של הפטריה היצרנית *Fusarium graminearum* על ידי PCR. *Tri101* שובט ל-2 וקטורי ביטוי של חיידקים לקטיים: pNZtri ו-pCUTri. הוקטור הכימרי pNZtri הוחדר לחיידק המחמצת *Lactococcus lactis* המכיל את הגנים *nisK* ו-*nisR* (NZ9000). והפלסמיד הכימרי pCUTri על הפרומוטורים השונים ששובטו בו הוחדר לחיידק המחמצת *L. lactis* MG1363 ולחיידק הפרוביוטי *Lactobacillus casei*.

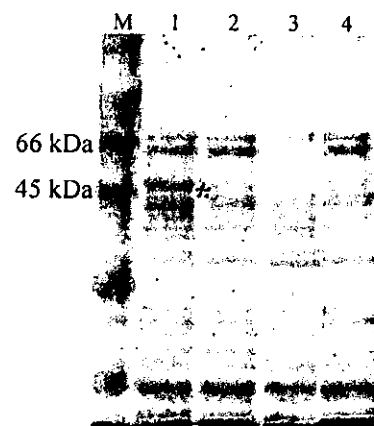


איור מס' 1: ציור סכמטי של וקטורי המעברת של *E. coli* וחיידקי חומצת חלב בהם שובט הגן *tri101*. בשני הציורים מוצגים אזורי ה-ori בחיידקים גרם חיוביים (G+) וגרם שליליים (G-), מסמן את הגן *tri101* (מסמן פרומוטור, הגנים לסלקציה ב-*pNZtri* *CAT* (עמידות לכלורמפניקול) גם בגרם חיוביים וגם בגרם שליליים, ב-*pCUTri* *CAT* לגרם חיוביים ו-*BLA* (עמידות לאמפיצילין) לגרם שליליים. אתרי חיתוך יחודיים מוצגים. A ציור סכמטי של pNZtri, הגן *tri101* שובט תחת בקרת הפרומוטור האינדוקטיבי *lacA*. B ציור סכמטי של pCUTri, הגן *tri101* שובט במעלה הזרם לפרומוטור הקונסטיטוטיבי של *lacA*. אתרי החיתוך היחודיים של *EcoRI* ו-*KpnI* שימשו לשיבוט פרומוטורים שהם מודיפקציות של הפרומוטור pCUTri104 ו-pCUTri103.

ביטוי הגן *tri101* על ידי *L. lactis* (NZ9000)

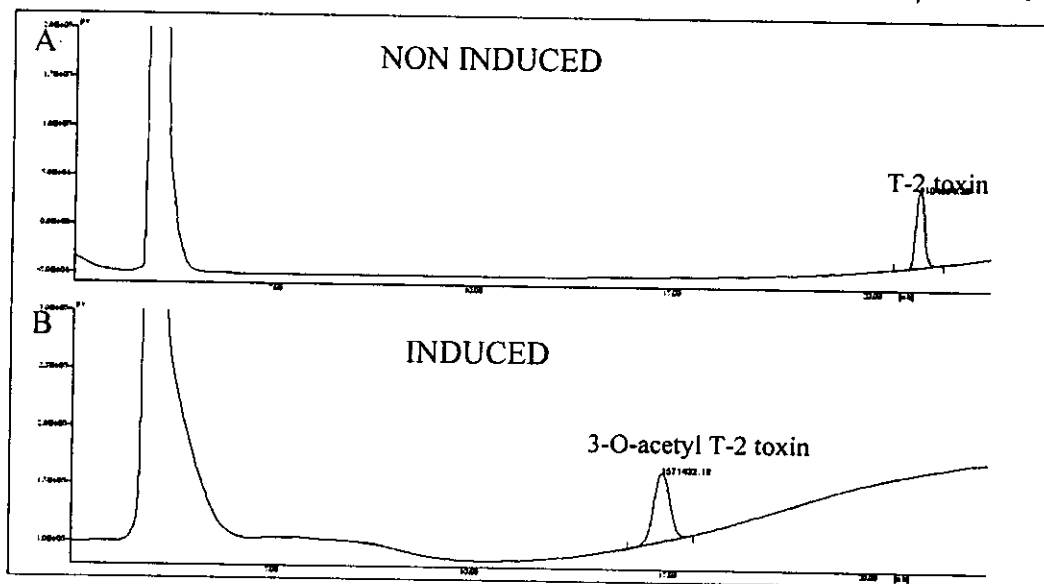
ביטוי הגן *tri101* על ידי החיידק המותמר *L. lactis* ללא אינדוקציה על ידי ניזין ועם אינדוקציה בריכוזים עולים של ניזין כפי שניתן לראות באיור מס' 2.

איור מס' 2: אנליזה של כלל חלבוני החיידק המותמר ע"י אלקטרופורזה על גל SDS-PAGE. חיידק מותמר לאחר אינדוקציה ע"י 5 ppb ניזין (1), חיידק מותמר לאחר אינדוקציה ע"י 1ppb ניזין (2), חיידק לא מותמר (3) וחיידק מותמר ללא אינדוקציה (4). ביטוי החלבון הטרנספורמנטי מצוין על ידי כוכב אדום (*), והמרקר למשקל המולקולארי מצוין על ידי האות M.



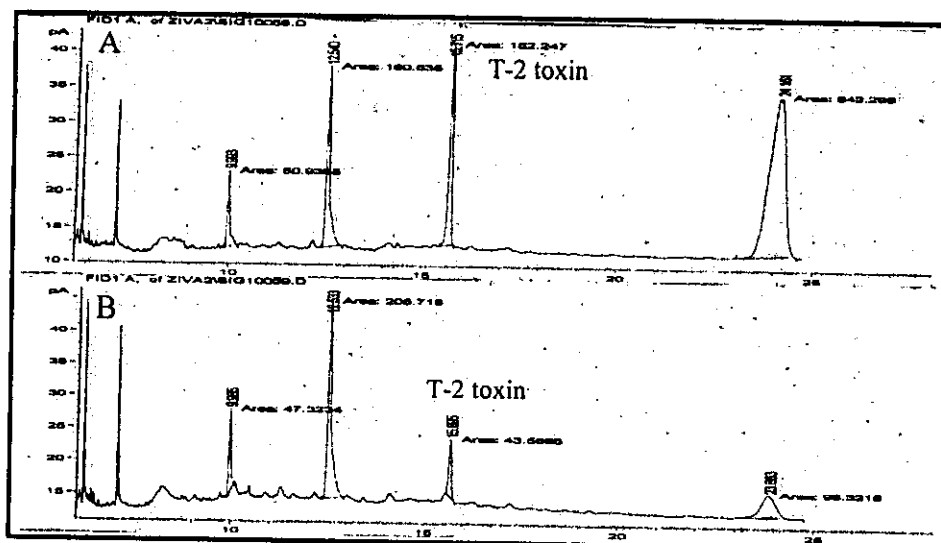
טרנספורמציה T-2 לניגזרתו 3-O-acetyl T-2

ליזאט כלל החלבונים של החיידק המותמר *L. lactis* NZ9000 הושהו בנוכחות 200ppm טוקסין T-2. כפי שניתן לראות באנליזת HPLC עם עמודת C₁₈ שנעשתה לפני אינדוקציה (A) ולאחר אינדוקציה (B), חיידק מותמר שעבר אינדוקציה על ידי ניזון הינו בעל יכולת פירוק T-2 לנגזרת הפחות רעילה שלו 3-O-acetyl T-2.



איור מס' 3: פירוק הטוקסין T-2 על ידי ליזאט חלבוני החיידק המותמר *L. lactis* כפי שנראית באנליזת HPLC. A ללא אינדוקציה אין שינוי ברמת ה-T-2 בעל RT=17.36 min, B לאחר אינדוקציה יש טרנספורמציה של הטוקסין לנגזרתו 3-O-acetyl T-2 בעל RT=14.86 min.

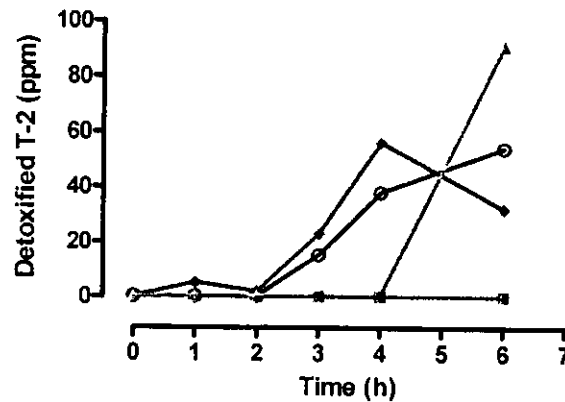
החיידק הפרוביוטי המותמר *Lactobacillus casei*+pCUtri104 הושהו בנוכחות הטוקסין T-2 למשך 4 שעות, ובכרומטוגרמה שהתקבלה באנליזת GC ניתן לראות ירידה בכמות הטוקסין, A לפני אינקובציה (זמן 0) B לאחר אינקובציה (זמן 4 שעות), דבר שלא נראה באינקובציה של הטוקסין עם חיידק לא מותמר.



איור מס' 4: אנליזת GC לפירוק T-2 על ידי החיידק הפרוביוטי המותמר *L. casei*. A לפני אינקובציה של החיידק עם הטוקסין (זמן 0) B לאחר אינקובציה החיידק עם הטוקסין (זמן 4 שעות). RT=15.71 T-2 ל-0

פירוק T-2 על ידי חיידק *Lactococcus lactis* MG1363 מותמר

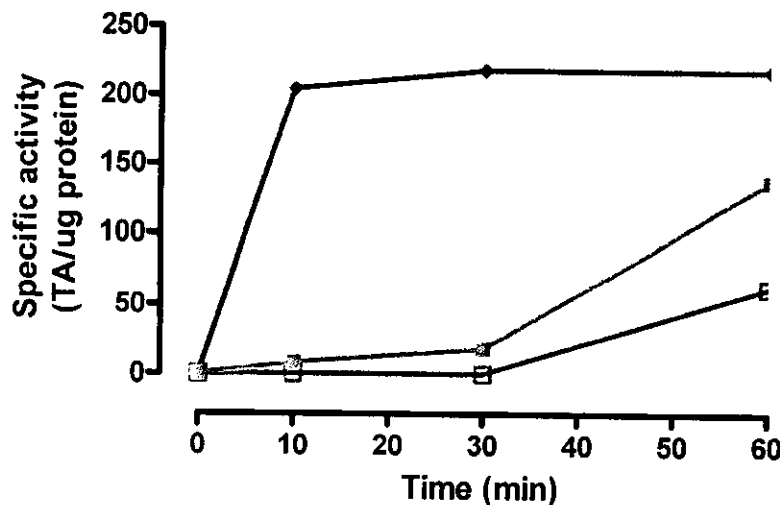
החיידק *L. lactis* MG1363 מותמר בפלסמידים pCUtri101/103/104 הנבדלים זה מזה בפרומוטור וחיידק לא מותמר הושהו בנוכחות 150 ppm מהטוקסין T-2, דוגמאות נלקחו בזמנים שונים ונבדקה כמות ה-T-2 שנותרה בהם. פירוק T-2 על ידי *L. lactis* MG1363+pCUtri104 היה היעיל ביותר כפי שניתן לראות באיור מס' 5.



איור מס' 5: פירוק T-2 על ידי חיידקי *L. lactis* בזמנים שונים. ■ מסמן חיידק לא מותמר. ○ מסמן את החיידק *L. lactis*+pCUtri101. ▲ מסמן את החיידק *L. lactis*+pCUtri103. מסמן את החיידק *L. lactis*+pCUtri104.

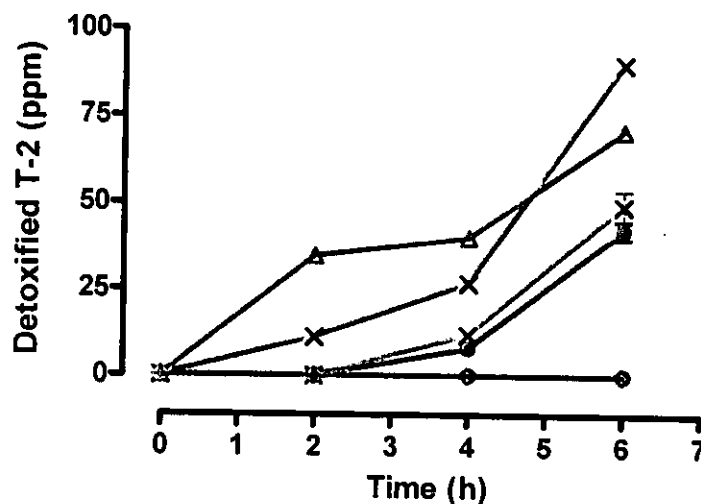
פעילות האנזים *Acetyltransferase* בחיידק המותמר *Lactobacillus casei*

פירוק הטריכוטצאן T-2 על ידי שני חיידקי *L. casei* כימריים, הניבדלים אחד מהשני בפרומוטור המבקר את ביטוי הגן *tri101*. פעילות האנזים *3-O-acetyltransferase* נבחנה בשני חיידקי *L. casei* כימריים וכן בחיידק לא מותמר, על ידי אינקובציה של כלל חלבוני החיידקים עם T-2, בפרקי זמן שונים עד שעה נאספו דוגמאות שנבחנו באנליזת HPLC. פעילות ספציפית חושבה לפי מידת הפירוק ורמת החלבון בדוגמה. ניתן לראות כי הפעילות הספציפית של החיידק הכימרי *L. casei*+pCUtri101 היא הטובה ביותר.



איור מס' 6: פעילות ספציפית של חלבוני החיידק *L. casei*. □ מצוין *L. casei* לא מותמר. □ מצוין *L. casei* המכיל את הפלסמיד pCUtri104. ◆ מצוין *L. casei* מותמר בפלסמיד pCUtri101.

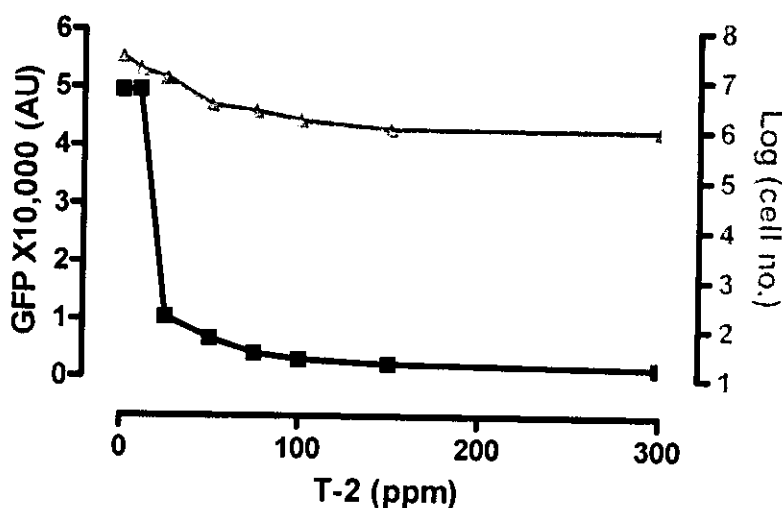
יעילות ניטרול הטוקסין T-2 על ידי החיידק *L. casei* נבחנה בטמפ' שונות. למרות שמערכת הביטוי pCUTri, על הפרומוטורים השונים שלה, הותאמה במקור לחיידק הלקטי *L. lactis* MG1363 (גדל ב- 30°C) נמצא כי פעילות הניטרול של הטוקסין על ידי *L. casei* טובה יותר בטמפ' הגידול שלו 37°C .



איור מס' 7: ניטרול T-2 על ידי החיידק *L. casei* בטמפ' שונות. Δ *L. casei*+pCUTri101 ב- 37°C . \times *L. casei*+pCUTri101 ב- 30°C . * *L. casei*+pCUTri104 ב- 37°C . \circ *L. casei*+pCUTri104 ב- 30°C . \diamond *L. casei* לא מותמר ב- 30°C ו- 37°C לא מותמר ב- 37°C .

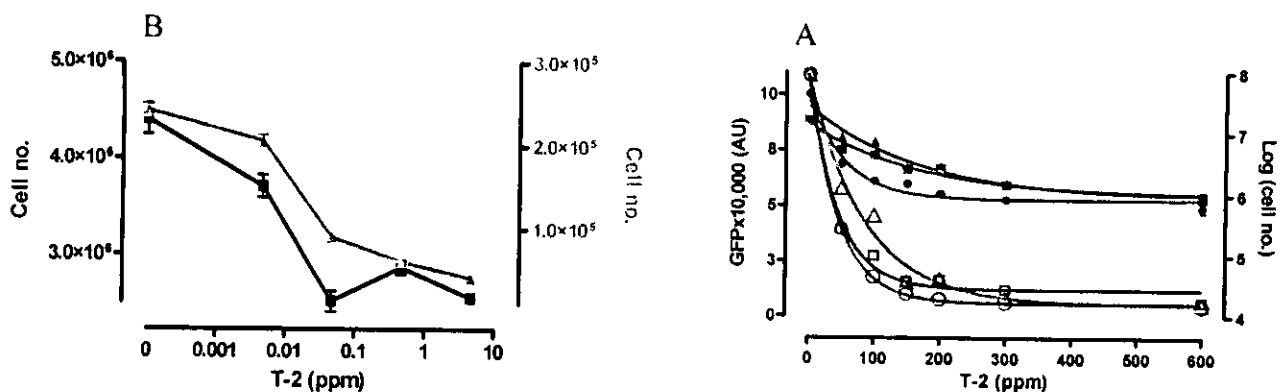
מיתוח Bioassays רגישים לזיהוי טריכוטצאנים

השמר *Saccharomyces cerevisiae* המכיל בגנום שלו את הגן ל- GFP שימש כ- bioassay לטריכוטצאנים. 10^7 תאי שמר נחשפו לריכוזים שונים של הטוקסין T-2. דגימות נלקחו בזמנים שונים ונבחנו מס' התאים החיים שבהם על ידי זריעות ומיחולים וכן ועל ידי מכשיר FACS, בו גם נבחנה מידת הפלורוסנציה שיצרו השמרים.



איור מס' 8: עיכוב גידול השמר *Saccharomyces cerevisiae* על ידי ריכוזים עולים של הטריכוטצאן T-2. ■ מצוין רמת הפלורוסנציה. Δ מצוין את Log מס' תאי השמר.

מידת פירוק הטוקסין T-2 על ידי חיידקי *L. casei* כימריים נבדקה גם על ידי ה- bioassay של השמר. בריכוזי T-2 שונים. לאחר אינקובציה של החיידקים עם ריכוזים עולים של T-2 במשך 6 שעות נאסף הנוזל העליון של הראקציות והושהה למשך שעתיים עם 10^7 תאי שמר. לאחר אינקובציה זו נלקחו דגימות ונבחנו מסי' תאי השמר וכן רמת הפלורוסנציה במכשיר FACS. ניתן לראות כי גם במערכת זו הזן *L. casei*+pCUtri101 נמצא היעיל ביותר מבין חיידקי *L. casei* הכימריים.

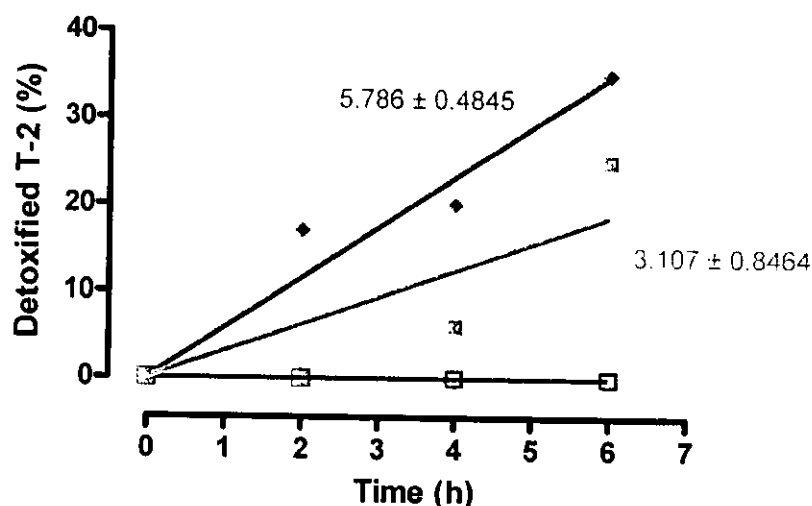


איור מס' 9: A מידת הפלורוסנציה וגידול השמר *Saccharomyces cerevisiae* בנוכחות נוזל עליון של חיידקי *L. casei* עם ריכוזים עולים של T-2. ● מציין נוזל עליון של החיידק *L. casei*. ▲ מציין נוזל עליון של החיידק *L. casei*+pCUtri101. ■ מציין נוזל עליון של החיידק *L. casei*+pCUtri104. סימנים חלולים מציינים מידת מס' תאי שמר וסימנים מלאים מציינים מידת פלורוסנציה עבור כל אחד מהחיידקים בהתאם לצבע. **B** פרוליפרציה תאים הומניים בנוכחות ריכוזים עולים של T-2. ■ תאי מעי גס מסוג Caco-2. ▲ תאי כבד מסוג Huh-7.

Bioassay נוסף לזיהוי טריכוטצאנים, מבוסס על קווי תאים הומניים רגישים. נבחנו פרוליפרציה תאי מעי גס Caco-2 ותאי כבד Huh-7 בנוכחות ריכוזים עולים של הטריכוטצאן T-2. ה- bioassay המבוסס על תאי מעי גס ותאי כבד הומניים נמצא כרגיש יותר מה- bioassay המבוסס על תאי שמר מותרים. עבור התאים ההומניים נראתה ירידה ביכולת הפרוליפרציה החל מריכוז של 10ppb (0.01 ppm) בעוד שתאי שמר הראו ירידה הן בפרוליפרציה והן בביטוי GFP החל מריכוז של 10ppm T-2.

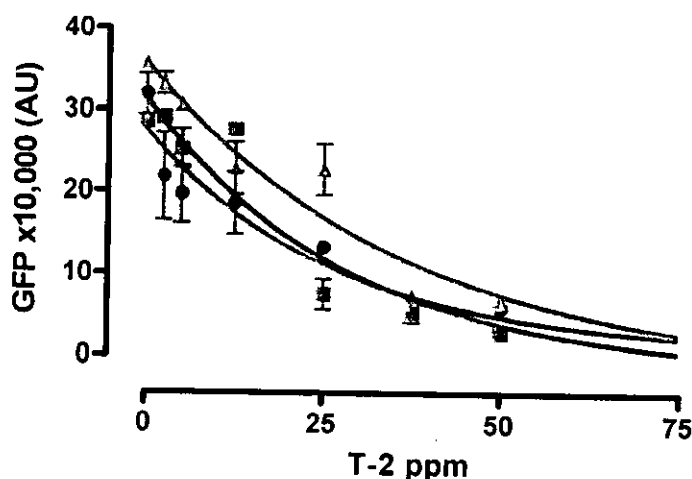
פירוק T-2 על ידי החיידק הפרוביוטי *Lactobacillus casei* מותמר

פירוק הטריכוטצאן T-2 על ידי שני חיידקי *L. casei* כימריים, הניבדלים אחד מהשני בפרומוטור המבקר את ביטוי הגן *tri101*, וכן של חיידק לא מותמר נבחנו ע"י אנליזת HPLC. כל אחד מהחיידקים גודל במשך לילה ורוכז פי 80 בבופר, כל אחד מהחיידקים המרוכזים הושהה בנוכחות 100ppm מהטוקסין T-2 ובפרקי זמן שונים עד 6 שעות נלקחו דוגמאות שנבחנו לרמת הטוקסין שנשארה בהם וזאת ע"י HPLC. החיידק *L. casei*+pCUtri101 נמצא כבעל יכולת לנטרל את הטוקסין T-2 בצורה הטובה ביותר כפי שניתן לראות באיור מס' 3.



איור מס' 10: ניטרול T-2 על ידי חיידקי *L. casei* כימריים. □ מצוין *L. casei* לא מותמר. □ מצוין *L. casei* המכיל את הפלסמיד pCUtri104. ♦ מצוין *L. casei* מותמר בפלסמיד pCUtri101.

יכולתו של החיידק הפרוביוטי *L. casei*, המותמר בשני פלסמידים הנבדלים אחד מהשני בפרומוטור המבקר את ביטוי הגן tri101, נבחנה גם על ידי bioassay של השמר *Saccharomyces cerevisiae*. השמר גודל עד לאמצע השלב הלוגריתמי ואז נחשף כל פעם לנוזל עליון של אחד החיידקים הכימריים לאחר השהיית החיידק בנוכחות ריכוזים שונים שטוקסין במשך 6 שעות. גם במבחן זה נראה החיידק *L. casei*+pCUtri101 כבעל היכולת הטובה ביותר לניטרול הטוקסין, (איור 4).



איור מס' 11: מידת הפלורוסנציה של השמר *Saccharomyces cerevisiae* המכיל את הגן GFP בנוכחות נוזל עליון של חיידקי *L. casei* עם ריכוזים עולים של T-2. ● מצוין נוזל עליון של החיידק *L. casei*, המהווה ביקורת. ▲ מצוין נוזל עליון של החיידק *L. casei*+pCUtri101. ■ מצוין נוזל עליון של החיידק *L. casei*+pCUtri104.

חיידקים לקטיים בהם נעשה שימוש בעבודה זו ומידת יעילותם בנטרול הטוקסין T-2 מפורטים בטבלה מס' 1. מן הטבלה עולה כי בכל החיידקים זן חבר חסר יכולת פירוק של הטוקסין. יעילות הפירוק הגבוהה ביותר נמצאה עבור החיידק הלקטי *Lactococcus lactis* MG1363 מותמר על ידי pCUtri104, בעוד שמערכת ביטוי זו בחיידק הפרוביוטי *L. casei* נמצאה פחות יעילה ממערכת הביטוי pCUtri101.

טבלה מס' 1: פרוק T2 ע"י גזעים שונים של חיידקים לקטיים מותמרים בפלסמידים. פירוק של 1ppm טוקסין לשעה נקבע כ-100 יחידות פירוק, פעילות ספציפית נקבעה לפי מס' יחידות פירוק ללוג מס' החיידקים בראקציה.

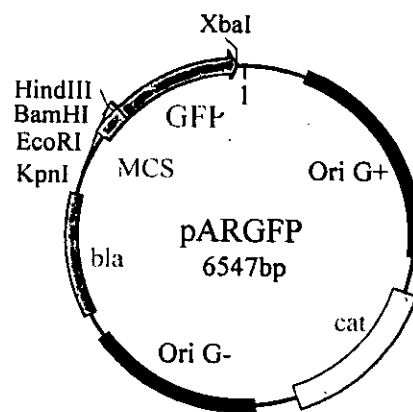
Bacteria	Detoxification units (100 unit = 1ppm/hour)	Specific Activity (units/log bacteria no.)
<i>L. casei</i>	0	0
<i>L. casei</i> + pCUtri101	1,089	90.75
<i>L. casei</i> + pCUtri104	801	66.75
<i>L. lactis</i> (NZ9000)	0	0
<i>L. lactis</i> + pNZtri	718	102.49
<i>L. lactis</i> (MG1363)	0	0
<i>L. lactis</i> + pCUtri101	966.7	80.56
<i>L. lactis</i> + pCUtri103	1,218.75	101.56
<i>L. lactis</i> + pCUtri104	1,516.7	126.40

בחינת פרומוטורים נוספים להגדלת יעילות הפירוק של T-2

הפרומוטורים המתוארים בעבודה זו, פרומוטור של מערכת יצור הבקטריוצין lacticin RM שבודד מהחיידק הלקטי *L. lactis* MG1363 עם מודיפיקציות (נקראים בעבודה זו pCUtri101/104) וכן הפרומוטור האינדוקטיבי P_{nisA} המשופעל ע"י תוספת של ניזין למצע גידול החיידק, נמצאו כבעלי יכולת לנטרל את הטריכוטצאן T-2 כפי שניתן לראות בטבלה מס' 1. כיון שבשלב זה אין בידנו נקודת ייחוס ליעילות הניטרול ראניוצ צורך למצוא פרומוטורים נוספים הפועלים ביעילות בחיידק הפרוביוטי *L. casei*.

לצורך כך, נבנה הוקטור pAR-GFP1000 שהינו וקטור מעבורת (בעל יכולת הכפלה הן בחיידקים גרם שליליים והן בחיידקים גרם חיוביים) המכיל את הגן המדווח GFP חסר פרומוטור. במעלה הזרם ל-GFP שובטו מספר פרומוטורים הידועים כפעילים בחיידקים לקטיים, כגון: P_{lac} (פרומוטור של אופרון הלקטוז), P_{ldh} (הפרומוטור של הגן לקטאט דהידרוגנאז) ו- P_{slpA} (פרומוטור של הגן *slpA*, מקודד לחלבון המוצג על ממברנת התא). קונסטרוקטים אלה יוכנסו לחיידק הפרוביוטי *L. casei* על ידי אלקטרוטרנספורמציה ועל ידי שימוש במכשיר ה-FACS, תבחן מידת הפלורוסנציה שתתקבל תחת בקרת כל אחד מהפרומוטורים הנ"ל. הפרומוטור שתחתיו תתקבל מידת הפלורוסנציה הגבוהה ביותר ישמש לביטוי של הגן tri101, ואז תבחן מידת ניטרול הטריכוטצאן T-2 על ידי חיידק *L. casei* מותמר בוקטור זה.

איור מס' 12: ציור סכמטי של וקטור המעבורת, pARGFP, של *E. coli* וחיידקי חומצת חלב בו שובט הגן GFP. בציור מוצגים אזורי ה-ori בחיידקים גרם חיוביים מוצגים (G+) וגרם שליליים (G-), מסמן את הגן GFP, מסמן את ה-MCS, הגן לסלקציה עבור חיידקים גרם חיוביים הינו cat (עמידות לכלורמפניקול) מסומן כ-□ ועבור גרם שליליים הינו bla (עמידות לאמפיצילין) מסומן כ-■. אתרי חיתוך יחודיים מוצגים. אתרי החיתוך היחודיים של *EcoRI* ו-*KpnI* שימשו לשיבוט פרומוטורים שונים הפעילים בחיידקים לקטיים לקבלת pARGFP-lac, pARGFP-slpl ו-pARGFP-ldh.



יצירת סיפריית פרומוטורים בחיידק הפרוביוטי *L. casei*

הטריכוטצאן T-2 צריך לעבור פירוק על ידי החיידק הפרוביוטי בתנאי המעי בחיה. נוכחות מלחי מרה ושינויי pH מהווים את הפרמטרים העיקריים בתנאי מעי שהינם שונים מהותית מתנאי מעבדה ולכן פירוק הטוקסין במבחנה אינו מעיד בהכרח על מידת הפירוק, בתנאים הקיימים במעי החיה. לפיכך נראה חיוני לבדוד פרומוטורים מהחיידק *L. casei* הפועלים בתנאי המעי. כדי לענות על צורך זה, נבנתה סיפריית פרומוטורים בחיידק *L. casei*, לאחר חיתוך חלקי של ה-DNA הגנומי של החיידק נעשתה פרקציונציה של מקטעי הגנום, מקטעים בתוך הגדלים של 0.5-3 kbp בודדו, נוקו ושובטו במעלה הזרם לגן המדווח GFP בוקטור המעבורת pARGFP המוצג באיור 5. נעשתה טרנספורמציה עם אוסף הפלסמידים הנ"ל לחיידק *E. coli* לצורך ריבוי הפלסמיד ולאחר מכן אלקטרוטרנספורמציה ל-*L. casei*. על מנת שהסיפרייה תהיה מייצגת יש צורך בטרנספורמציה בעלת יעילות גבוהה.

שיטת טרנספורמציה בעלת יעילות גבוהה כוילה עבר החיידק הנ"ל, עם יעילות טרנספורמציה ממוצעת של 10^{-5} DNA 10^6 cfu/ μ g כפי שניתן לראות בטבלה מס' 2.

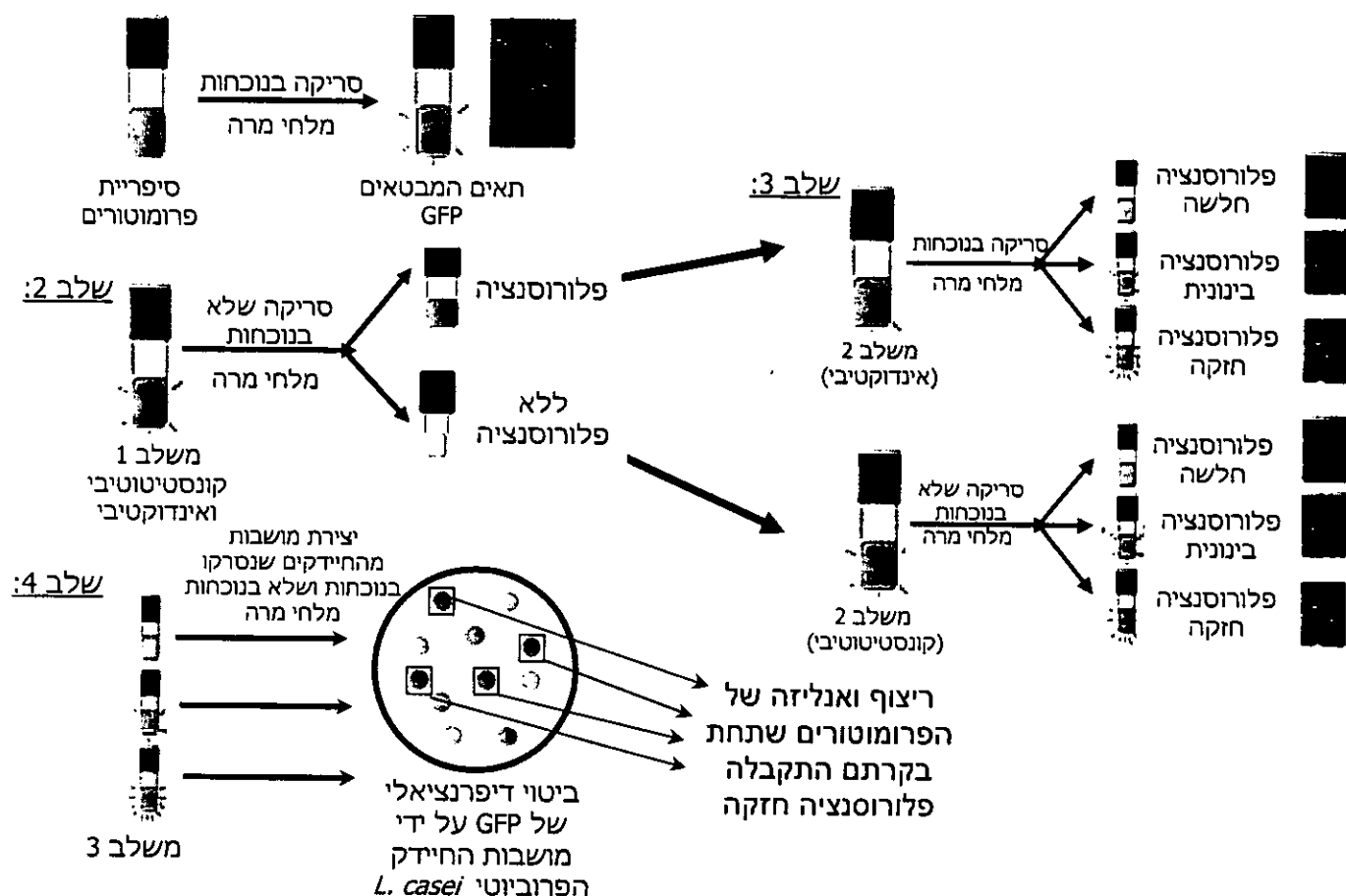
טבלה מס' 2. יעילות טרנספורמציה פלסמידים בגדלים שונים לחיידק *L. casei*.

plasmid size	6.5 kbp	6 kbp	7 kbp	7.2 kbp	8.2 kbp	9.2 kbp
transformants per 1 μ g DNA	1.75×10^5	7.4×10^6	8×10^6	4×10^6	2×10^6	2.19×10^6

סריקת סיפריית פרומוטורים בחיידק *L. casei*

סיפריית הפרומוטורים ב-*L. casei* תיסרק באופן המתואר באיור מס' 6, על מנת לאתר קטעי DNA גנומי של החיידק *L. casei* הפעילים כפרומוטורים המשופעלים בנוכחות מלחי מרה, בהם ייעשה שימוש לביטוי הגן tri101 לניטרול יעיל יותר של הטריכוטצאן T-2 על ידי החיידק *L. casei* במעי עכבר.

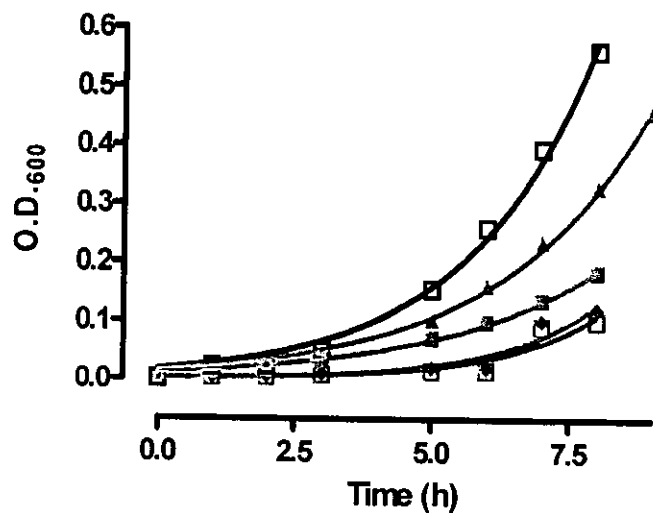
שלב 1:



איור מס' 13. תיאור סכמטי של אופן סריקת סיפריית הפרומוטורים בחיידק הפרוביוטי *L. casei* לצורך זיהוי פרומוטורים אינדוקטיביים בנוכחות מלחי מרה.

השפעת מלחי מרה על קצב גידול החיידק *L. casei*

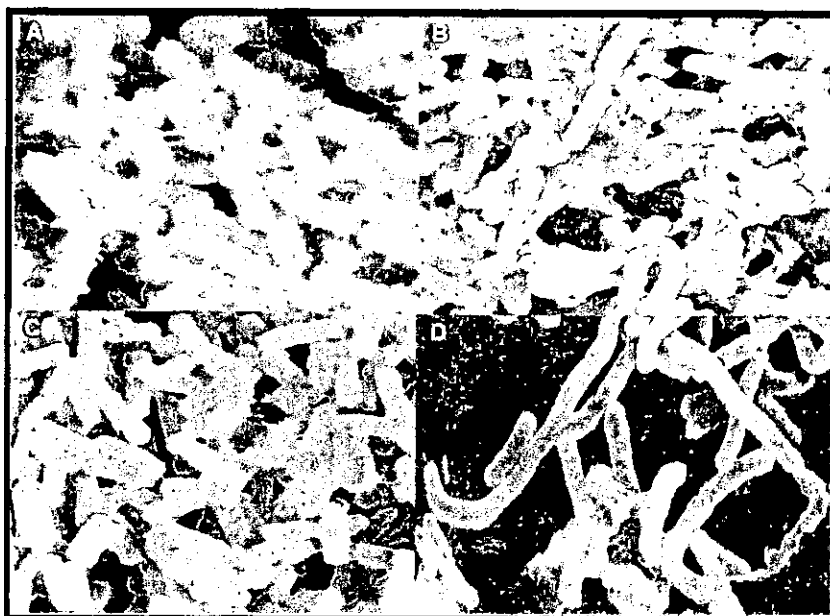
תרבית חיידק *L. casei* שגדל במשך לילה נמחל עד לקבלת בליעה $O.D_{600}=0.02$ וגודל בנוכחות מלחי מרה בריכוזים שונים (0, 0.01%, 0.05%, 0.1%, 0.15%) עד הגעה לאמצע השלב הלוגריתמי ($O.D_{600}=0.5-0.6$). קצב הגידול המקסימלי של החיידק קטן עם העליה בריכוז מלחי המרה. מהשוואת שיפועי העקום הלינארי שהתקבל עבור כל אחד מתנאי הגידול נמצא כי בנוכחות ריכוזי מלחי מרה של 0.1%, 0.15% הגידול הינו איטי ביותר, כעבור 22 שעות בנוכחות 0.1% מלחי מרה התרבית הגיעה לאמצע השלב הלוגריתמי ואילו בנוכחות 0.15% מלחי מרה התרבית לא הגיעה לבליעה מתאימה גם כעבור 24 שעות (לא מוצג). מאיור מס' 14 ניתן לראות כי קצב גידול החיידק מושפע מריכוז מלחי המרה, בנוכחות 0.05% מלחי מרה קצב הגידול של התרבית קטן פי 3 מקצב הגידול ללא מלחי מרה, היות וריכוז זה הינו בעל השפעה על החיידקים אך לא השפעה גדולה מידי, בריכוז זה ייעשו בהמשך ניסויים הכוללים גידול החיידק בנוכחות מלחי מרה.



איור מס' 14: השפעת ריכוזים עולים של מלחי מרה על הגידול של החיידק הפרוביוטי *L. casei*. מציין גידול החיידק ללא נוכחות מלחי מרה (קורת). מציין גידול החיידק בנוכחות 0.01% מלחי מרה. מציין גידול החיידק בנוכחות 0.05% מלחי מרה. מציין גידול החיידק בנוכחות 0.1% מלחי מרה.

השפעת מלחי מרה על מורפולוגיית החיידק *L. casei*

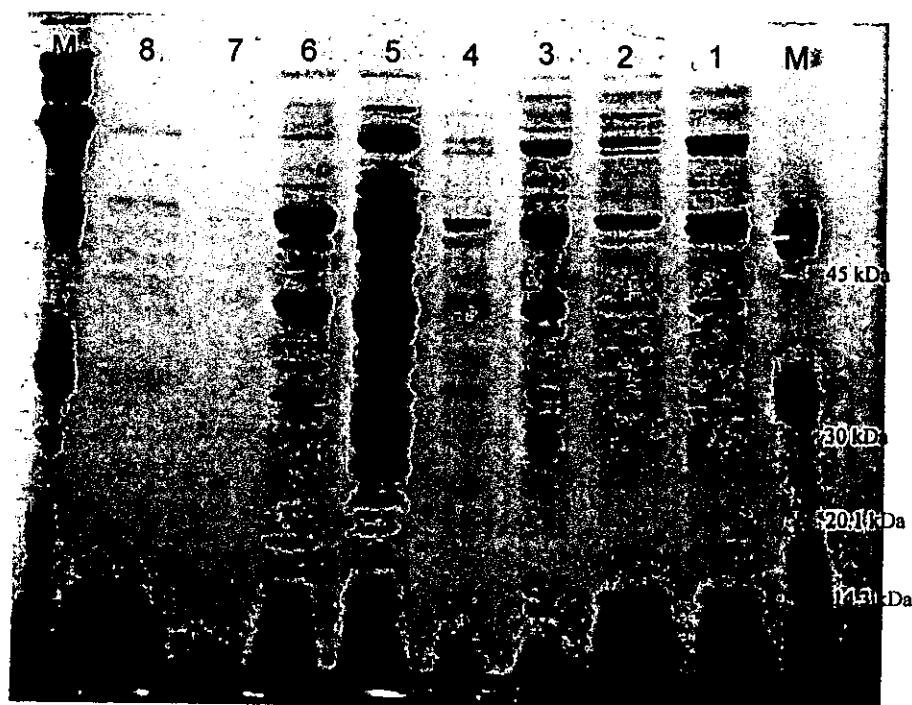
תרבית חיידק שגדלה במשך לילה נמהלה לקבלת $O.D._{600}=0.05$ והחיידקים גודלו במצע נוזלי עד הגעה לאמצע השלב הלוגריתמי, אז נחשפו למלחי מרה בריכוז 0.1% לפרקי זמן של שעה ו-4 שעות, עם ביקורות מתאימות ללא חשיפה למלחי מרה. מכל אחת מהתרביות הנ"ל נלקחה דוגמה לבחינת מורפולוגיית החיידק במיקרוסקופ אלקטרוני סורק. חיידקים שגודלו בתנאים סטנדרטיים ולא נחשפו למלחי מרה הראו מורפולוגיה אופיינית לחיידקי *Lactobacilli*, בעלי מבנה מתג (rod shape) ושטח פנים חלק, כפי שניתן לראות בתמונה מס' 15 A, C. חיידקים שנחשפו במשך שעה למלחי מרה בריכוז של 0.1% (תמונה B 8) הראו נטייה להיצמד אחד לשני ושטח הפנים שלהם נראה פחות חלק. בחשיפה של 4 שעות ל- 0.1% מלחי מרה (תמונה D 8) תופעות אלה מוקצנות יותר, נראים מבני שלפוחיות על ממברנה התאים וכן חלק מהתרבית בעלי מבנה מכווץ וריק.



איור מס' 15. השפעת מלחי מרה לאורך זמן על החיידק הפרוביוטי *L. casei* כפי שניתן לראות במיקרוסקופ אלקטרוני סורק. A חיידקי *L. casei* כעבור שעה ללא חשיפה למלחי מרה. B חיידקי *L. casei* לאחר חשיפה של שעה למלחי מרה. C חיידקי *L. casei* כעבור 4 שעות ללא חשיפה למלחי מרה. D חיידקי *L. casei* לאחר חשיפה של 4 שעות למלחי מרה.

השפעת מלחי מרה על ביטוי חלבונים בחיידקים *L. casei* ו-LGG

החיידקים גודלו עד השלב הלוגריתמי או תחילת השלב הסטציונרי, נאספו, נשטפו ואז נחשפו למלחי מרה בריכוז של 0.1% במשך שעה בתנאים אנארוביים במצע MRS נקי ב-pH=7. כעבור שעה של חשיפה החיידקים נאספו, נשטפו והופקו מהם כלל חלבוני התא שהורצו בגיל חלבונים חד מימדי, בתמונה. חלבונים שנראו בבירור כבעלי ביטוי דיפרנציאלי זוהו ע"י חיתוכים עם טריפסין ואנליזה ב-LC-MS/MS, מסומנים בחצים אדומים (איור מס' 16).



איור מס' 16: אנליזת כלל חלבונים של החיידקים הפרוביוטיים *L. casei* ו-*LGG*. מרקרים של גודל 1,2 חלבוני החיידק *L. casei* בשלב הסטציונרי לאחר חשיפה למלחי מרה וללא חשיפה, בהתאמה. 3,4 חלבוני החיידק *L. casei* בשלב הלוגריתמי לאחר חשיפה למלחי מרה וללא חשיפה, בהתאמה. 5,6 חלבוני החיידק *LGG* בשלב הלוגריתמי לאחר חשיפה למלחי מרה וללא חשיפה, בהתאמה. 7,8 חלבוני החיידק *LGG* בשלב הסטציונרי לאחר חשיפה למלחי מרה וללא חשיפה, בהתאמה.

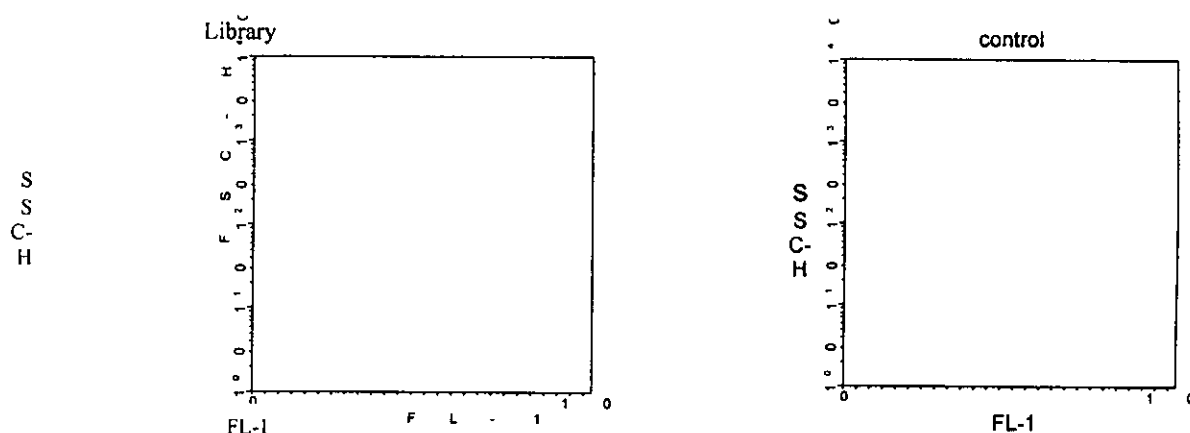
טבלה מס' 3: פענוח רצף החלבונים ותפקודם שביטויים עלה בעקבות חשיפה למלחי מרה בחיידקים הפרוביוטיים *L. casei* ו-*LGG*.

bacteria	symbol	Protein name	Protein function
<i>L. casei</i>	A	Chaperonin GroEL (HSP60 family)	A multimeric complex that binds protein substrates and enables them to fold properly
	B	putative elongation factor Tu	Plays sentral rol in protein biosynthesis in the plasma. And an adhesin-like particle - surface molecules mediating attachment to intestinal epithelial cells and mucins.
	C	putative elongation factor Tu	
	D	Tuf and GroEL	
<i>LGG</i>	E	RNA polymerase alpha subunit and Tuf	Sunbunit of RNA polymerase Guanosine nucleotide binding protein that plays a central role in protein synthesis in the cytoplasm.and adhesin-like factor,a surface molecule mediating attachment to intestinal epithelial cells and mucins.
	F	RmlC	Involves in the dTDP-L-rhamnose

		(composing the glycan chains of the surface layer - s-layer) pathway.
	G	50S ribosomal protein L5 a 5S rRNA binding protein in the large subunit and plays an essential role in the promotion of a particular conformation of 5S rRNA.

בחינת סיפריית פרומוטורים של החיידק הפרוביוטי *L. casei* (ב- MG1363)

ה-DNA הגנומי של החיידק *L. casei* הופק ונחתך באופן אקראי, מקטעים בגודלים של 0.5-3kb נאספו ושובטו בפלסמיד pGFP1000 במעלה הזרם לגן המדווח GFP. מקבץ הפלסמידים הנייל הוחדר לחיידק הלקטי MG1363. תרבית החיידקים המכילים את הסיפריה וכן חיידק שלא מכיל את הסיפריה נבחנו במכשיר ה-FACS על מנת למצוא תאים בהם הגן GFP פעיל.



איור מס' 17: בחינת סיפריית הפרומוטורים של החיידק *L. casei* במכשיר ה-FACS. FL-1 מצוין פלורוסנציה (סקלה לינארית). SSC-H מצוין את גודל התאים.

במשוואה בין התמונה (איור 17) המתקבלת ב-FACS מהרצת חיידקי הביקורת שלא מכילים את הסיפריה ניתן לראות כי האוכלוסיה דומה מבחינת גודל החיידקים לתמונה המתקבלת מהרצת חיידקי הסיפריה. כמו כן נראה כי יש רקע פלואורוסנטי (הנקודות השחורות), אך עבור חיידקי הסיפריה מתקבלים משמעותית יותר חיידקים בעלי פלורוסנציה. חיידקים אלה נאספו ויבחנו לפלורוסנציה תחת תנאים הקיימים במעי כגון, מלחי מרה, תנאים אנארוביים, שינוי pH וטמפרטורה.

ה. דיון ומסקנות

בעבודה זו מתואר לראשונה במחקר נטרול יעיל של מיקוטוקסינים, שיבוט, ביטוי ופעילות נטרול ע"י חיידק פרוביוטי מותמר. עבודה זו פותחת צוהר לעבודות נוספות בנטרול מיקוטוקסינים מקבוצות שונות תוך שימוש בטכניקות מולקולריות בחיידקים פרוביוטיים. בנוסף, פיתוח bioassay רגיש ביותר מאפשר מדידה כמותית של יעילות הנטרול האפקטיבית. במחקר זה שובט הגן המקודד לאנזים המבצע דהטוקסיפקציה למיקוטוקסין T-2 למספר מערכות ביטוי והוחדר לחיידקים לקטים וחיידק פרוביוטי. מהתוצאות שהתקבלו נראה שהביטוי בחיידק הפרוביוטי פחות יעיל ולפיכך פותחה מערכת לבידוד פרומטורים "טבעיים" מתוך החיידק הפרוביוטי.

מערכת ביטוי זאת תשופעל במעי החיה כיון שהפרומוטורים שבודדו מופעלים בנוכחות פקטורים הנמצאים במעי. נבחנו 2 שיטות לבידוד אזורי בקרת ביטוי גנים בחיידקים פרוביוטיים: ניבנתה ספריית פרומטרים בחיידק ובשילוב עם מכשיר FACS המכיל sorter הועשרה אוכלוסיית חיידקים שמתוכה נבחרו 10 לאנליזת פרומוטרים. במקביל בודדנו חלבונים אשר ביטויים עלה בעקבות חשיפה למלחי מרה מגילים של חלבונים. אזורי הבקרה של חלבונים אלה כמו גם הפרומוטרים שבודדו מהספריה יבחנו לעוצמתם במערכות ה- bioassay והנבחרים מביניהם יבחנו

ליעילות הפרוק ליעילות הפרוק in vivo במעי עכבר

1. פרסומים

Hamama, Z. and Shapira, R. 2005. Detoxification of trichothecens by genetically modified probiotic bacteria. (Abstract). FISEB Ilanit Symposium, Eilat, Israel.

חממה, ז. ושפירא ר. 2005. נטרול מיקוטוקסינים מקבוצת הטריכוטצינים ופטולין ע"י חיידקי חומצת חלב וחיידקים פרוביוטיים. (תקציר). כינוס תזונה מונעת איחוד כוחות, תל אביב, ישראל.

Paster, N., Hamama, Z., Nemerovski, L. and Shapira, R. (2005). Detoxification of the mycotoxins patulin and T-2 by probiotic bacteria. 1st International Food and Nutrition Congress, 15-18 June 2005, Istanbul, Turkey.

סיכום עם שאלות מנחות

נא לענות על כל השאלות, בקצרה ולעניין, ב 3 עד 4 שורות מכסימם 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 לתקופת הדו"ח תוך התייחסות לתוכנית העבודה.
המטרה המרכזית של העבודה היא שימוש בחיידקים פרוביוטיים לניטרול מיקוטוקסינים מקבוצת הטריכוטצינים. להשגת מטרה זו, הוגדרו מטרות הביניים הבאות: א) בידוד הגן Tri101. ב) שיבוט בפלזמידים המתרבים בחיידקים פרוביוטיים. ג) פיתוח מערכות לאבחון פעילות הנטרול (כימיות וביולוגיות). ד) הגברת יכולת הנטרול ע"י מציאת אוורי בקרה לביטוי (פרומוטורים) המתבטאים ביתר בתנאי מעי חיה.
עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח.
הגן Tri101 בודד ושובט למספר פלזמידים. פותחה מערכת טרנספורמציה יעילה לחיידקים פרוביוטיים. פותחו מבחנים ביולוגיים (bioassay) לבחינת הנטרול. נבנתה ונסרקה ספריית פרומוטורים (אינדוקטיביים וקונסטיטויביים) לבידוד יעילים לביטוי. בודדו חלבונים המתבטאים ביתר בתנאי מעי במטרה לבודד ולאפיין את אוורי הבקרה של הגנים המקודדים לחלבונים אלה.
המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר בתקופת הדו"ח.
ביטוי הגן לדטהטוקסיפקציה של מיקוטוקסינים מקבוצת הטריכוטצינים בחיידקים פרוביוטיים מהווה פריצת דרך הן במחקר על ביטוי חלבונים זרים בקבוצת חיידקים זו והן באפשרות לנטרל רעלים דרך פעילות מטבולית של חיידקים ידידותיים הפעולים במעים. רוב מטרות המחקר הושלמו בתקופת הדו"ח. לא הגענו לניסוי נטרול בחיות.
הבעיות שנותרו לפתרון ו/או השינויים שחלו במהלך העבודה (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים); התייחסות המשך המחקר לגביהן, האם יושגו מטרות המחקר בתקופה שנותרה לביצוע תוכנית המחקר.
אבן הגוף העיקרית בביצוע המחקר הוא עריכת מניפולציות מולקולאריות בחיידקים פרוביוטיים. הצלחנו לשבט להחדיר ולבטא חלבון בחיידקים אלה. ברם, לצורך השגת המטרה של נטרול הרעלן בחיה היה צורך להערכתנו לבודד רצפי פרומוטורים ייחודיים שיתבטאו בעוצמה כאשר החיידק נמצא במעי החיה. בנוסף יש צורך להתחיל בניסוי האכלה ברמות טוקסין שונות ולקבוע את מינון החיידק כדי להגיע לנטרול בחיות מודל (עכבר, עוף). להערכתנו דרושה תקופת מחקר נוספת להשגת יעדים אלה.
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. התוצאות פורסמו בשלושה כנסים:
FISEB 2005, Eilat Israel
כינוס תזונה מונעת 2005 תל אביב, ישראל
International Food and Nutrition Congress 2005, Istanbul, Turkey
פרסום הדו"ח: אני ממליץ לפרסם את הדו"ח: (סמן אחת מהאופציות)
X רק בספריות
ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט)
חסוי - לא לפרסם