

2000-2002

תקופת המחקר:

261-0364-02

קוד מחקר:

**Subject:** THE USE OF THE LAMBDOID INTEGRASE PROTEIN AND THE FLP/FRT SYSTEM FOR SITE SPECIFIC GENE INSERTION IN PLANTS

**Principal investigator:** DAVID GIDONI

**Cooperative investigator:** ARIE ROSNER, RON WANSI, EZRA YAGIL

**Institute:** Agricultural Research Organization (A.R.O.)

**שם המחקר:** פיתוח שיטה לאינטגרציה ספציפית בגנום הצמח באמצעות מערכות הרקומבינציה INT מהפאזי למבדה ו-FLP משמר

**חוקר ראשי:** דוד גדוני

**חוקרים שותפים:** אריה רוזנר, רון וונש, עזרא יגיל

**מוסד:** מינהל המחקר החקלאי, ת.ד. 6 בית דגן 50250

## תקציר

החדרת גנים למקומות מוגדרים מראש בגנום הצמח מהווה ציון דרך חשוב בתהליכי הפיתוח של צמחים טרנסגניים בעתיד. כיום, הגישה המבוססת על מערכות רקומבינציה ספציפיות נראית כמבטיחה ביותר למטרה זו. קימת חשיבות רבה לפיתוח מספר מערכות אלטרנטיביות בצמחים, הן לאור הצורך בשימוש בו-זמני של מספר מערכות והן עקב סבירות שמערכות שונות יפעלו ברמות יעילות שונות.

מטרות תכנית המחקר: 1) לפתח לראשונה שיטות להחדרת גנים בצמחי טבק ועגבנייה, המבוססות על מערכות הרקומבינציה FLP/FRT ו-Int-att (2) לבדוק לראשונה אפשרות הפתוח של מערכת בקרת גנים המבוססת על שני טרנסגנים אלליים. במהלך עבודת המחקר הראינו לראשונה ביטוי של גן האינטגרז של הפאזי למבדה השלם בצמחי Arabidopsis (תודרנית) ע"י התמרה גנטית או על ידי הדבקה עם ווקטור ויראלי (PVX) מהונדס. נוכחות גן האינטגרז בצמחים הוכחה ע"י הגברה מולקולרית של רצפי הגן באמצעות PCR וביטוי הגן ברקמה הצמחית הוכח הן ברמת שעתוק הגן ל-RNA (בשיטת ה-Northern-Blot) והן ברמת תרגום ה-RNA לחלבון (בשיטת ה-Western-Blot). כדי לבחון באם החלבון פעיל מבחינה ביולוגית (בהכנסה ו/או הוצאה של DNA הממוקם בין רצפי רקומבינציה ייחודיים), הוכן מבנה DNA שבו אתרי הקישור של אנזים האינטגרז צמודים לגן מדווח (פלאורסצנטי, GFP) שישמש כ"סובסטרט". ניסיונות אלו בצמחים נמצאים כעת בשלב של עבודה ועדיין לא הושלמו.

בתכנית המקבילה החדרנו לצמחי טבק ועגבנייה מבנה של אתר המטרה (FRT) שמטרתו לאפשר החדרה אללית (לאותו לוקוס – FRT) של טרנסגנים אינטראקטיביים בגנום הצמח ובו-זמנית, להפסיק שעתוק גן הרקומבינזא במטרה לייצב את המחדר בגנום. במהלך העבודה עד כה יצרנו צמחים טרנסגניים ובצענו בדיקות מולקולריות (PCR ו-Southern) ואנזימטיות (GUS) לאפיון אתרי מטרה אלו. כדי לבדוק יכולתם של אתרי המטרה הכרומוזומליים לאפשר החדרה ספציפית ואללית של גן זר לגנום הצמח, יצרנו "פלסמיד חודר" שבו פעילות הגן המדווח GUS מותנית ברצפי בקרה טרנס-אקטיביים של DNA המטרה. ניסיונות החדרה באמצעות ירי ואלקטרופורציה של "הפלסמיד החודר" לתאי המטרה, בשילוב עם סלקציה ורגרציה בתרבית, הסתיימו עד כה בהצלחה בשיטת האלקטרופורציה לפרוטופלסטים של צמחי הטבק. בדיקות יעילות וייחודיות החדירה בצמחונים טרנסגניים במצב תחילת השרשה שהתקבלו לאחרונה נעשית בימים אלו במעבדה.

דו"ח מדעי מסכם לתכנית מחקר מספר: 02 - 0364 - 261

**פיתוח שיטה לאינטגרציה ספציפית בגנום הצמח באמצעות מערכות הרקומבינציה Int-att של הפאז' הלבדואידי HK-022 ו-FLP/FRT של שמר**

**The use of the lambdoid integrase protein and the FLP/FRT system for site-specific gene insertion in plants**

**מקור המימון:** קרן המדען הראשי של משרד החקלאות

**מגישים:** דוד גרעוני – המחלקה לגנטיקה של צמחים, מרכז וולקני

אריה רוזנר – המחלקה לוירולוגיה, מרכז וולקני

עזרא יגיל – המחלקה לביוכימיה, אוניברסיטת תל – אביב

רון וונש – המחלקה לגנטיקה של צמחים, מכון ויצמן למדע

יוליה פיילר – המחלקה לגנטיקה של צמחים, מרכז וולקני

אנהיט (אנה) מט – המחלקה לגנטיקה של צמחים, מרכז וולקני

David Gidoni, Plant Genetics, The Volcani Center, POBox 6, Bet Dagan

dgido@volcani.agri.gov.il

Arie Rosner, Virology, The Volcani Center, POBox 6, Bet Dagan

vpsarasp@volcani.agri.gov.il

Ezra Yagil, Biochemistry, Tel Aviv University, Ramat Aviv

yagill@post.tau.ac.il

Ron Vunsh, Plant Genetics, The Weizmann Inst of Science, Rehovot

lpron@weizmann.weizmann.ac.il

Julia Feiler, Plant Genetics, The Volcani Center, POBox 6, Bet-Dagan

Anahit (Ana) Mett, Plant Genetics, The Volcani Center, POBox 6, Bet-Dagan

תאריך הגשה: אפריל 2003



הממצאים בדו"ח זה הנם תוצאות ניסויים ואינם מהווים המלצות לחקלאים. חתימת החוקר:

**תקציר**

החדרת גנים למקומות מוגדרים מראש בגנום הצמח מהווה ציון דרך חשוב בתהליכי הפיתוח של צמחים טרנסגניים בעתיד. כיום, הגישה המבוססת על מערכות רקומבינציה ספציפיות גראית כמבטיחה ביותר למטרה זו. קימת חשיבות רבה לפיתוח מספר מערכות אלטרנטיביות בצמחים, הן לאור הצורך בשמוש בו-זמני של מספר מערכות והן עקב סבירות שמערכות שונות יפעלו ברמות יעילות שונות.

מטרות תכנית המחקר: (1) לפתח לראשונה שיטות להחדרת גנים בצמחי טבק ועגבניה, המבוססות על מערכות הרקומבינציה FLP/FRT ו-Int-att. (2) לבדוק לראשונה אפשרות הפתוח של מערכת בקרת גנים המבוססת על שני טרנסגנים אלליים.

במהלך עבודת המחקר הראנו לראשונה ביטוי של גן האינטגרז של הפאז' למבדה השלם בצמחי *Arabidopsis* (תודרנית) ע"י התמרה גנטית או על ידי הדבקה עם ווקטור ויראלי (PVX) מהונדס. נוכחות גן האינטגרז בצמחים הוכחה ע"י הגברה מולקולרית של רצפי הגן באמצעות PCR וביטוי הגן ברקמה הצמחית הוכח הן ברמת שיעתוק הגן ל-RNA (בשיטת ה-Northern-Blot) והן ברמת תירגום ה-RNA לחלבון (בשיטת ה-Western-Blot). כדי לבחון באם החלבון פעיל מבחינה ביולוגית (בהכנסה ו/או הוצאה של DNA הממוקם בין רצפי רקומבינציה ייחודיים), הוכן מבנה DNA שבו אתרי הקישור של אנזים האינטגרז צמודים לגן מדווח (פלואורסצנטי, GFP) שימש כ"סובסטרט". ניסיונות אלו בצמחים נמצאים כעת בשלב של עבודה ועדיין לא הושלמו.

בתכנית המקבילה החדרנו לצמחי טבק ועגבניה מבנה של אתר המטרה (FRT) שמטרתו לאפשר החדרה אללית (לאותו לוקוס - FRT) של טרנסגנים אינטראקטיביים בגנום הצמח ובו-זמנית, להפסיק שיעתוק גן הרקומבינזא במטרה ליצב את המחדר בגנום. במהלך העבודה עד כה יצרנו צמחים טרנסגניים ובצענו בדיקות מולקולריות (PCR ו-Southern) ואנזימטיות (GUS) לאפיון אתרי מטרה אלו. כדי לבדוק יכולתם של אתרי המטרה הכרומוזומליים לאפשר החדרה ספציפית ואללית של גן זר לגנום הצמח, יצרנו "פלסמיד חודר" שבו פעילות הגן המדווח GUS מותנית ברצפי בקרה טרנס-אקטיביים של DNA המטרה. ניסיונות החדרה באמצעות ירי ואלקטרופורציה של "הפלסמיד החודר" לתאי המטרה, בשילוב עם סלקציה ורגרציה בתרבות, הסתימו עד כה בהצלחה בשיטת האלקטרופורציה לפרוטופלסטים של צמחי הטבק. בדיקת יעילות וייחודיות החדירה בצמחונים טרנסגניים במצב תחילת השרשה שהתקבלו לאחרונה נעשית בימים אלו במעבדה.

## מבוא

היכולת של החלבון FLP של שמר להדריך אינטגרציה ספציפית של DNA זר המכיל אתר FRT לתוך FRT כרומוזומלי הוראתה עד כה בעכברים (Dymecki, 1996) ודרוזופילה (Golic et al., 1997) אך לא בצמחים. יכולת החדרה ספציפית של DNA זר לאתר כרומוזומלי בצמחים הוראתה באמצעות מערכת Cre-lox של הבקטריופאז P1 בטבק (Albert et al., 1995) וארבידופסיס (Vergunst and Hooykaas, 1999). בנוסויים אלה רמת היעילות היחסית של האינטגרציה הושפעה על ידי שליטה על יכולת המחדר לצאת מהגנום עקב נוכחות גבוהה של חלבון הרקומבינזא שממשיך להוצר בתא. בהתאם לכך, נוסו מספר גישות במטרה להביא לידי הגברת יציבות המחדר בגנום. גישה אחת שנוסתה בהצלחה ע"י Albert et al. 1995, התבססה על היווצרות אתרי lox לא פעילים מיד עם יצירת המחדר. גישות נוספות שדווחו בהצלחה היו ביטוי חולף של הרקומבינזא מחד, או הפסקת שיעתוקו כתוצאה מארוע החדירה. בדומה למערכות הנ"ל, המערכת Int-att של הבקטריופאז הלבדואידי HK022 יכולה להיות מיושמת בתחום הצמחים המהונדסים לשתי מטרות חשובות: (א) החדרת גנים זרים לאתר ייחודי בגנום הצמח, (ב) הוצאה של גן ייחודי (בלתי רצוי) מתוך גנום הצמח המהונדס. לאור החשיבות של פיתוח מספר מערכות אלטרנטיביות בצמחים, מטרת תוכנית זו לפתח באמצעות מערכות הרקומבינציה FLP/FRT ו-Int-att גישות ושימושים חדשניים להוצאה מהגנום הצמחי ולאו החדרה מבוקרת של גנים זרים לאתרים גנומיים צמחיים מוגדרים מראש.

## תאור הניסויים

### א. מערכת FLP/FRT

#### א1. תוצאות

במהלך תכנית המחקר ריכזנו מאמץ ביצירה ואפיון של צמחים טרנסגניים שמטרתם לאפשר אינטגרציה ספציפית של גן זר לאתר FRT בגנום של צמחי טבק ולראשונה גם בעגבניה. הצמחים הונדסו ע"י מערכת של מבני DNA שיאפשרו לנו, בנוסף, לבדוק לראשונה את האפשרות של הפעלת גן אחד (טרנסגן "A=TAted") באמצעות גן אחר (טרנסגן "B=TAtor"), לאחר ששני הגנים יוחדרו לאותו אתר גנומי וימצאו במצב אללי בגנום. יצירת אלליות בין טרנסגן A לטרנסגן B תאפשר את הרחבת מגוון אמצעי הבקרה על גנים טרנסגניים באמצעות התפצלות גנטית. אפשרות בקרה מסוג זה לא ניתנת להשגה במתכונת טכנולוגיות הטרנספורמציה/אינטגרציה האקראית בגנום הנהוגות כיום.

העבודה התמקדה ביצירה ואפיון מולקולרי וגנטי של צמחים בעלי לוקוס של "גן מטרה" בגנום. שתי המערכות של "צמחי מטרה" שנבנו ונבחנו עד כה הן:

#### 1. יצרנו 6 קווי עגבניה טרנסגניים (מזן MP-1) עם מבנה גן מטרה: FRT - gusA

בצמחים אלה אתר הרקומבינציה (FRT) ממקם בצמוד לגן המדוח *gusA* ללא פרומוטור. בדיקה ראשונית של מבנה הטרנסגן בוצעה ע"י PCR באמצעות פריימרים יחודיים. בדיקות חוזרות של פעילות האנזים GUS הראתה, להפתעתנו, פעילות גבוהה (ביחס לצמחי בקורת שלילית וחיונית). פעילות זו יכולה לנבוע מחיריה של הטרנסגן בסמיכות לפרומוטור/אנהנסר גנומי. לאור תוצאות אלו, החלטנו בשלב זה להתמקד בתכנית המקבילה המתוארת בהמשך.

#### 2. יצרנו 11 קווי טבק (מזן Samsun NN) ו-18 קווי עגבניה טרנסגניים (מזן Moneymaker)

עם וקטור בינארי שמכיל את "גן המטרה" המקודד לחלבון הטרנס-אקטיבטור ("TAtor"). גן זה הוכנס תחת בקרת הפרומוטור 35S (35SP). בנוסף, בין הגן לבין הפרומוטור הוכנס אתר רקומבינציה FRT שמטרתו לשמש כ"אתר כניסה" עבור "הגן החודר".

#### מבנה "גן המטרה": 35SP - FRT - TAtor

בדיקה ראשונית של מבנה הטרנסגן בוצעה ע"י PCR באמצעות פריימרים יחודיים. בנוסף, כדי לאפיין באופן מדויק יותר את המבנה ומספר העותקים של הטרנסגן בגנום, בצענו סדרת אנליזות Southern עם גלאים ספציפיים, הן לקצה הימני והן השמאלי של ה-T-DNA.

במקביל, יצרנו זרעי הכלאה עצמית ( $T_1$ ) והכלאה חוזרת לצמח לא טרנסגני ( $BC_1$ ). הזרעים של הכלאות אלו הונבטו והעברו בתהליכים של אנליזות גנטיות ומולקולריות של התפצלות הלוקוס הטרנסגני. המטרות בכך היו לבחור קוים בעלי מחדר יחיד שיהיו אתרי מטרה לחזירת פלסמיד המכיל את מבנה "הגן החודר"

(Block-FRT-TAted -gusA). מבנה זה מכיל אתר רקומבינציה FRT המחובר לגן מדוח המקודד ל-GUS, המחובר לפרומוטור המופעל ספציפית על ידי ה-"TAtor". מטרתו של גן זה היא לדווח על החדרה מדויקת של ה"גן

החודר" באמצעות ביטוי GUS תחת בקרה ספציפית של ה-"TAtor" מהקו ההורה המקורי (צמח המטרה). החדירה של "הגן החודר" ל"אתר המטרה" מבוצעת באמצעות מבנה נוסף שיצרנו למטרה זו: FLP – TAted. החדירה מתבצעת תוך כדי הפרדה בו-זמנית בין הפרוטוטור לבין ה-"TAtor" של אתר המטרה והפסקת פעולתו. הפסקת פעולת ה-"TAtor" כתוצאה מהחדירה, תביא לידי הפסקת יצור ה-FLP רקומבינאז, ובכך צפויה להגביר את יציבות המחדר בגנום. התפקודים של כל מבני ה-DNA הנ"ל נבדקו ונמצאו תקינים בבדיקה טרנווינטית לאחר החדרתם לפרוטופלסטים של טבק באמצעות אלקטרופורזיה. כדי לבחון פעילות הגן FLP רקומבינאז בעגבניה, יצרנו קווי עגבניה (מזן MoneyMaker) טרנסגניים המבטאים FLP מהפרוטוטור 35S והכלאנו אותם עם צמחי מטרה בעלי מבנה טרנסגני המורכב מהגן gusA החסום ע"י אתרי רקומבינזיה. התקבלה פעילות GUS אך ורק בצמחי מכלוא שהכילו בו-זמנית את שני הטרנסגנים בגנום (Gidoni et al., 2001; 2003). אנליזות Southern הראו יעילות רקומבינזית חלוץ בסדר גודל דומה לזה שהתקבל בעבר במעבדתנו בצמחי טבק.

ניסיונות החדרה ראשוניות בוצעו במהלך השנה השלישית למחקר באמצעות "הפצצה" של פסיגים ודיסקיות עלים עם DNA פלסמידי של "הגן החודר" (מקנה עמידות להיגרומיצין) בנוכחות פלסמיד הרקומבינאז. בסדרת ניסיונות אלה התקבלה השחמה של רקמות עגבניה מחד, וחוסר יכולת רגנרציה של רקמות טבק מאידך. בהתאם לכך, החלטנו בשלב ראשון להתמקד בגישה של החדרת ה-DNA של "הפלסמיד החודר" לתאי המטרה באמצעות אלקטרופורזיה לפרוטופלסטים של צמחי טבק. גישה זו הניבה הצלחות ראשוניות בכך שכימים האחרונים התקבלו שלושה צמחונים טרנסגניים עמידים להיגרומיצין במצב תחילת השרשה (ועוד כ-15 בדרך). בדיקת יעילות ויחודיות החדירה מחד, ואקטיבציה אללית של הטרנסגן החודר מאידך, תעשה במהלך החודשים הקרובים ע"י שילוב של אנליזות אנזימטיות ומולקולריות עם הכלאות גנטיות מכוונות בין "צמחי מחדר" שהתקבלו לבין קווי ההורים ששימשו כ"צמחי מטרה".

## 2. דין ומסקנות

חלק זה של תכנית המחקר נועד ליצור צמחים טרנסגניים שמטרתם לאפשר אינטגרציה ספציפית של גן זר, לראשונה לאתר FRT, בגנום של צמחי טבק וגם בעגבניה. הצמחים הונדסו ע"י מערכת של מבני DNA שנועדו לאפשר לנו, בנוסף, לבדוק לראשונה הפעלת טרנסגן אחד (A="TAted-gusA") באמצעות טרנסגן אחר (B="TAtor"), לאחר ששני הגנים יוחדרו לאותו אתר גנומי וימצאו במצב אללי בגנום. יצירת אלליות בין טרנסגן A לטרנסגן B תאפשר את הרחבת מגוון אמצעי הבקרה על גנים טרנסגניים באמצעות התפצלות גנטית. החדשנות בגישה זו היא בכך שבקרה מסוג זה לא ניתנת להשגה במתכונת טכנולוגיות הטרנספורמציה/אינטגרציה האקראית בגנום הנהוגות כיום. בהתאם לתכנית עד כה, יצרנו מבנה של "גן חודר" (Block-FRT-TAted -gusA) מחד, ומאידך יצרנו צמחי מטרה (35SP - FRT - TAtor) בעלי תפקיד כפול: א) להיות אתרי מטרה ל"גן החודר", כדי ליצור "צמחי מחדר", ב) להיות קווי הורים לבחינה של הפעלה אללית של GUS לאחר הכלאה עם "צמחי המחדר" שיתקבלו. התוצאות המתוארות לעיל מראות התחלת יצירה של אוכלוסייה טרנסגנית המכילה מועמדים לצמחי מחדר, ולראשונה פעילות FLP בעגבניה. התוצאות מהוות בסיס להמשך הפיתוח והבחינה של מערכת בקרה באמצעות אינטראקציה אללית בין שני לוקוסים טרנסגניים בגנום הצמח.

### 1. תוצאות

יישום מערכת ההכנסה/הוצאה של גן האינטגרזאז בצמחים תלוי בראש וראשונה בביטוי גן האינטגרזאז בתאי הצמח. ולכן ראינו כמטרה ראשונה לבחון שאלה זו. ניסינו לענות עליה תוך שימוש בשתי גישות עיקריות:

האחת, ע"י בידוד גן האינטגרזאז מהבקטריופאז HK022 והכנסתו לתוך וירוס צמחי (PVX) המשמש כווקטור להכנסת גנים זרים לצמחים. וירוס PVX מהוגדס, מתרבה בתוך תאי הצמח ומבטא את הגנום שלו עצמו. אם הוכנס גן האינטגרזאז לגנום הוירוס הרי שהוירוס אמור לבטא גם את גן האינטגרזאז בתאי הצמח. ביטוי החלבון בצמחים המודבקים נבדק כפי שיפורט בהמשך.

ע"פ הגישה השניה הוכנס גן האינטגרזאז לצמחים, על ידי טרנספורמציה יציבה, ונבחרו צמחים עמידים. צמחים טרנסגנים המבטאים את החלבון בודדו כפי שיתואר בהמשך.

### יצירת צמחים טרנסגנים המבטאים את חלבון ה-Integrase

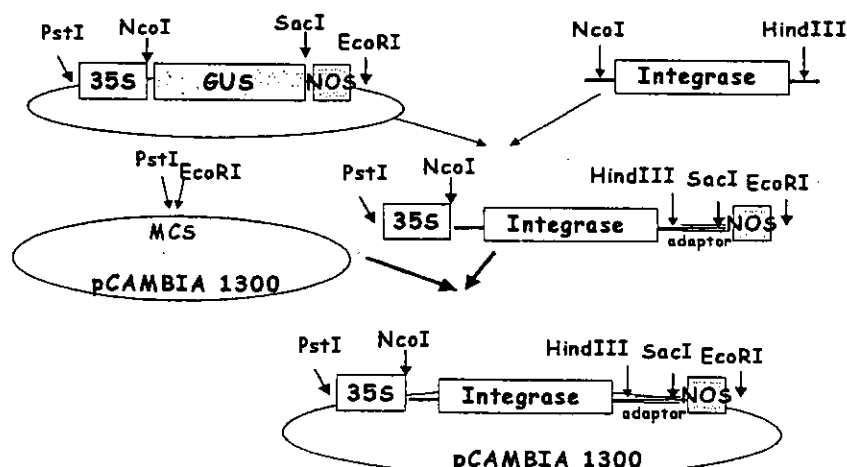
(חלק זה של הפרויקט נעשה בשותפות עם ד"ר וורד יסודי וד"ר עפרה לוטן מחברת FertiSeeds קרית המדע, נס-ציונה).

צמחי ה-Arabidopsis נבחרו להעמדת מערכת הבדיקה של האינטגרזאז בגלל הקלות היחסית שבהתמרתם ובזכות מחזור החיים הקצר שלהם.

### בניית קסטת ביטוי צמחית לביטוי ה-Integrase בצמחים;

גן האינטגרזאז בודד מהפלסמיד pET22B ע"י חיתוך בעזרת אנזימי ההגבלה NcoI/HindIII. הגן המבודד הוכנס לקסטת ביטוי צמחית המכילה את הפרומוטר 35S ואת רצף הסיום NOS. הגן הוכנס לאחר NcoI מקורי בצידו ה-N טרמינלי וחובר, ע"י שימוש בלינקר סינטטי המכיל אתרי HindIII / SacI, לאחר SacI בקטסה בצידו ה-C טרמינלי. הקטסה בשלמותה, המכילה את גן האינטגרזאז, הועברה לווקטור הבינארי pCambia 1300 ע"י חיתוך באנזימי ההגבלה EcoRI/PstI (איור מספר 1)

### Construction of expression cassette for Integrase



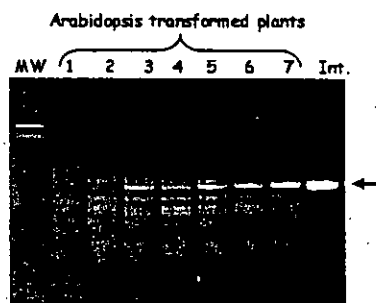
### הכנסת גן האינטגרזא לצמחי Arabidopsis;

גן האינטגרזא הוכנס לווקטור ביטוי בינארי (pCambia 1300) בין הפרומוטור 35S לרצף סיום השעתוק NOS. הווקטור הבינארי הוכנס לחיידקי אגרובקטריום מסוג GV3101 באמצעות אלקטרופורזה. החיידקים גודלו על מצע סלקטיבי של Kanamycin ו-Gentamycin. התמרת צמחי התודרנית נעשתה בשיטה של הטבלת התפרחת (Inflorescence Filtration) (הטבלת התפרחת בתמיסת חיידקי אגרובקטריום הנושאים את גן האינטגרזא על גבי פלסמיד ה-Ti). הזרעים שנוצרו מהתפרחת המוטבלת נזרעו על מצע סלקטיבי המכיל Hygromycin אשר מאפשר נביטה של הזרעים המותמרים בלבד. באופן זה נאספו כ- 50 קווים של צמחים מותמרים שגודלו ורובו להמשך העבודה.

### בדיקה לנוכחות וביטוי גן האינטגרזא בצמחי התודרנית המותמרים;

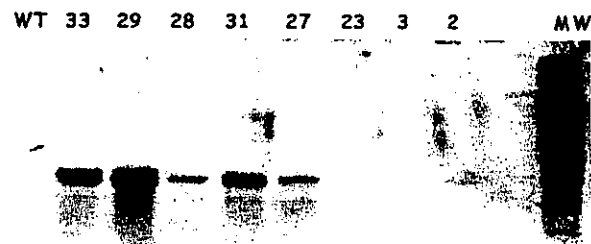
1. בשלב ראשון נסרקו צמחים עמידים לנוכחות הגן בעזרת PCR. חומצות גרעין (DNA), שבודדו מצמחים עמידים, עברו הגברה מולקולרית של רצפי גן האינטגרזא תוך שימוש בתחלים יחודיים לגן (תמונה מס' 1).

### Integrase sequences in transformed Arabidopsis plants



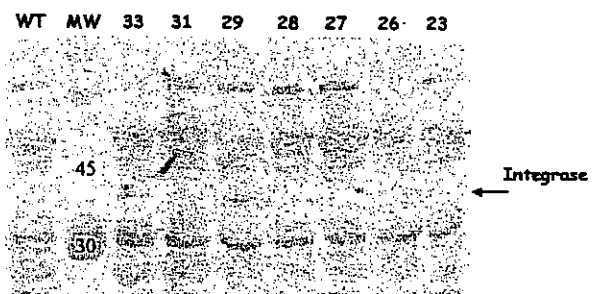
2. בחינת שיעתוק גן האינטגרזא בצמחים העמידים נעשתה בשיטת ה-Northern Blot. חומצת גרעין (RNA) הופקו מצמחים עמידים ע"י שימוש במערכת הפקה של חברת Promega (SV total RNA isolation Kit). ה-RNA הופרדו על ג'ל אגרוז בתמיסת מופס-פורממיד-פורמלדהיד. חומצות הגרעין הוברו לנילון טעון חיובית (Roche) על ידי בלוטר מהיר (S&S). היברידיזציה נעשתה עם גלאי מולקולרי ייחודי לגן האינטגרזא מסומן ב-DIG על פי הוראות היצרן (Roche). מספר צמחים שנבדקו הראו שיעתוק של הגן הרמות שונות. האוטורדיוגרפיה שהתקבלה (תמונה מס' 2) אפשרה זיהוי מספר צמחים שבהם רמה גבוהה של שיעתוק גן האינטגרזא. בצמחים אחרים זוהו רמות משתנות של תעתיקים. באופן זה נבחרו צמחים בעלי רמת ביטוי גבוהה של RNA להמשך המחקר.

## Detection of Integrase mRNA in transformed *Arabidopsis* plants



3. בדיקת ביטוי גן האינטגרזא בתאי הצמח ברמת חלבון נבדקה בשיטה של Western Blot. חלבונים מוצו מעלים של צמחים עמידים ע"י הפקה ישירה לבופר הרצה (1x Sample Buffer). כלל החלבונים הופרדו על ג'ל (12%) אקריל-אמיד (SDS-PAGE) והועברו לגילון טעון חיובית (Hybond-P, Amersham Pharmacia Biotech). חלבון האינטגרזא זוהה ע"י נוגדן יחודי שהופק במעבדתו של פרופ' עזרא יגיל. נמצאו שלושה קווי צמחים שבהם רמה גבוהה של ביטוי חלבון האינטגרזא. תמונה מס' 3 מראה חלק מהצמחים האלו. צמחים שבהם נמצאה רמה גבוהה של תעתיקי אינטגרזא הראו ביטוי של חלבון. בצמחים מסוימים נמצאו תעתיקי אינטגרזא אך לא אותר חלבון, התוצאות מצביעות על רגישות נמוכה של הנוגדן ויתכן שקיימים צמחים המבטאים את חלבון הרקומבינאז למרות של אותר ב- Western Blot.

## Detection of Integrase protein in transgenic *Arabidopsis* plants



### הכנות לבדיקה של פעילות חלבון האינטגרזא בצמחים

פעילות חלבון האינטגרזא בצמחים תיבדק ע"י בדיקת פעילות "ההוצאה" של החלבון. בבקטריופאז עצמו חלבון האינטגרזא אחראי להכנסת רצפי ה-DNA של עצמו לכרומוזום החיידק. על גבי רצף ה-DNA של החיידק נמצא אתר יחודי של attB ועל גבי רצף ה-DNA של הפאז קיים אתר של attP. כאשר שניהם נמצאים במבנה של טרנס (על שני כרומוזומים נפרדים) באותו תא מתקיימת "הכנסה" של רצפי



ה-DNA. לאחר ההכנסה נוצרים בשני קצוות "ההכנסה" רצפי רקומבינזיה אופייניים, attR ו-attL. שמאפשרים "הוצאה" של רצפי ה-DNA הממוקמים ביניהם. עבודות קודמות בבעלי חיים הראו שכאשר שני רצפי הרקומבינזיה attR ו-attL או attB ו-attP נמצאים בציס (על אותו כרומוזום) מתקבלת "הוצאה" של רצפי ה-DNA התחומים בין הרצפים (עבודות מחקר במעבדתו של פרופ' עזרא יגיל). השאלה הנחקרת בפרויקט זה היא האם פעילות דומה יכולה להתקיים גם בצמחים. לשם כך הוכן מבנה של רצפי DNA שימש כ-"סובסטרט" לבדיקת פעילות חלבון הרקומבינאז.

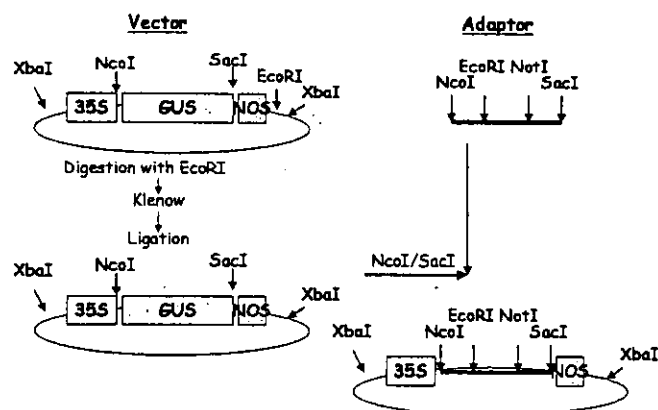
#### הכנת מבנה ה-DNA שימש כ-"סובסטרט" לבחינת הפעילות;

נבנה קונסטרוקט המכיל מבנה DNA שבו אתרי הקישור של גן האינטגראז (attR ו-attL) מתחמים קטע DNA מפריד ועוצר (stop) המונע את ביטוי הגן הפלואורסצנטי (GFP) מהפרומוטור 35S. רק כאשר חלבון האינטגראז "יוציא" את הקטע המפריד יתאפשר ביטוי החלבון GFP ברקמה הצמחית ויתקבל אות פלורוסנטי שניתן לראותו ע"י הארה במגורת UV.

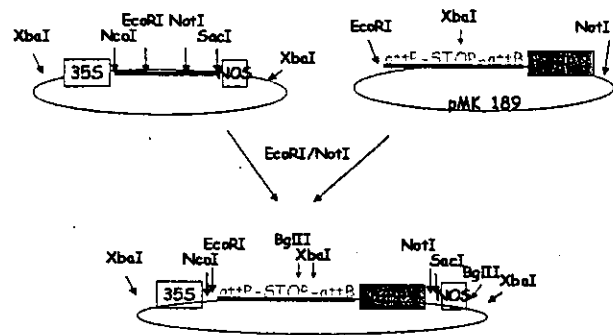
#### בנית קסטת ביטוי צמחית לבדיקת פעילות ה-Integrase בצמחים;

בשלב ראשון הוכן המבנה של attR-STOP-attL-GFP שבו נמצא הקטע המפריד בין שני אתרי הקישור של האינטגראז צמוד לגן הפלואורסצנטי GFP. מבנה זה הוכנס לקסטת ביטוי צמחית המכילה את הפרומוטור 35S ואת רצף הסיום NOS בדרך הבאה; המבנה attR-STOP-attL-GFP בודד ע"י חיתוך באנזימי הגבלה EcoRI/NotI ואליו הוכנסו שני אתרים. מלאכותיים (NcoI ו-SacI). המבנה כולו הוכנס לווקטור צמחי בין הפרומוטור לטרמינאטור. המבנה הסופי יחד עם הפרומוטור והטרמינאטור הוכנס למספר ווקטורים בינאריים. בשלב ראשון המבנה הוכנס לווקטור pGA492 בשני שלבים (כפי שמתואר באיורים 2 עד 5). בהמשך הוכנס מבנה דומה, שאינו מכיל את הגן הפלורסנטי (GFP), גם לווקטור הבינארי pCAMBIA 2300. הווקטורים הוכנסו לחיידקי אגרובקטריום מסוג GV3101 או DAE105 באלקטרופורזיה.

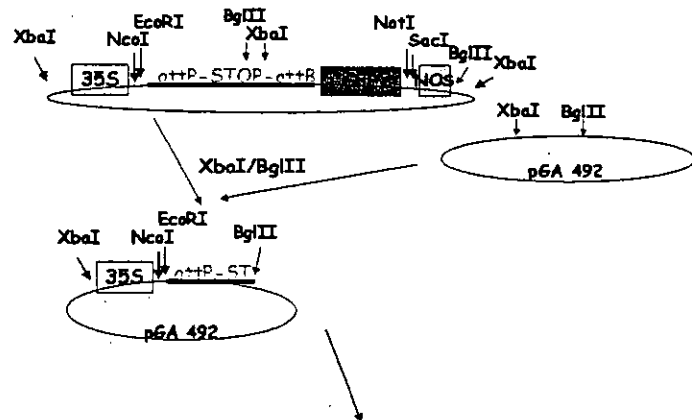
#### Construction of "Substrate" DNA (I)



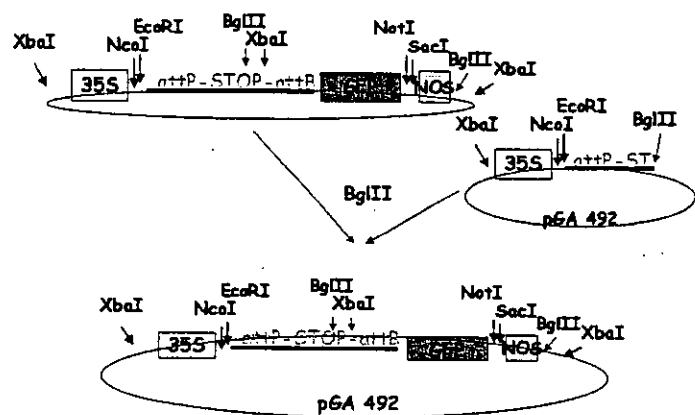
### Construction of "Substrate" DNA (II)



### Construction of "Substrate" DNA (III)



### Construction of "Substrate" DNA (IV)



הכנסת מבנה ה"סובסטרט" לצמחי עגבניה ו-Arabidopsis;

רצף חומצות הגרעין של מבנה ה"סובסטרט" הוכנס לצמחי תודרנית בשיטה של הטבלת התפרחת או לעגבניה בשיטה המקובלת של חיתוך עלים. זרעים (תודרנית) או קאלוסים (עגבניה) עברו רגנציה על מצע של Kanamycin.

איתור ובדיקה של צמחים המכילים את מבנה ה"סובסטרט" מתקיים בימים אלה.

## בדיקת פעילות האינטגראז בצמחים;

על מנת לבחון את פעילותו הביולוגית של חלבון האינטגראז בצמח השלם נעשו ניסיונות לבטא את שני מרכיבי המערכת באותו תא צמחי, כלומר תא אשר מבטא הן את הרקומבינאז והן את הסובסטרט. מצבים כאלו יכולים להתרחש באופנים שונים, ואת חלקם בדקנו;

1. הכנסה של רצף ה"סובסטרט" לצמחי תודרנית המבטאים אינטגראז. פלסמיד המכיל את מבנה ה"סובסטרט" הצמוד לגן הפלורוסנטי GFP, נורה ע"י "תותח-גנים" לעלי צמח התודרנית שהראו רמת ביטוי גבוהה של חלבון האינטגראז ב-Western-Blot. הוצאת "הקטע המפריד" מה"סובסטרט" אמורה לאפשר את ביטוי הגן הפלואורסנטי GFP ולכן במידה ויש פעילות ביולוגית לחלבון ניתן יהיה לצפות בזהירה. ניסיונות כאלו לא צלחו, עדין, ולא נצפתה זוהרה ברורה בעלי הצמחים שנבדקו.

2. היות ועלי צמח התודרנית קטנים והירי לתוכם בעייתי מבחינה טכנית, הוחלט להכין צמחים טרנסגנים המכילים את מבנה ה"סובסטרט" הצמוד לגן הפלורסנטי GFP, ולירות את חלבון האינטגראז לתוכם. עבודה על שלב זה נמצאת בעיצומה.

3. גישה אחרת לבחינת פעילות חלבון האינטגראז בצמח השלם הינה ע"י הכנת צמח תודרנית מותמר המכיל את מבנה ה"סובסטרט" (עם או בלי הגן הפלורסנטי) ולבצע הכלאה גנטית (ידינית) בין צמח המבטא את חלבון האינטגראז לצמח המכיל את מבנה ה"סובסטרט". צמחים שיתקבלו בהכלאה כזו יבדקו או ברמת הזוהרה (אם לסובוטראט היה גן פלורסנטי צמוד) או ברמה של איתור ה"סובסטרט ב-DNA הגנומי (על ידי בידוד DNA גנומי והיברידיזציה מתאימה). בשלב זה של הפרויקט אנו עוסקים בהכנה של צמחים מותמרים המכילים את מבנה ה"סובסטרט" ובבידודם.

4. אפשרות נוספת היא טרנספורמציה שניה לצמחים מותמרים. צמחים שעברו התמרה עם גן הרקומבינאז והראו ביטוי של חלבון הרקומבינאז עברו התמרה נוספת עם מבנה ה"סובסטרט". צמחים עמידים לשתי האנטיביוטיקות (hygromycin שבא מווקטור האינטגראז ו-Kanamycin שבא מווקטור מבנה ה"סובוטראט") בודדו ונמצאים בבדיקה.

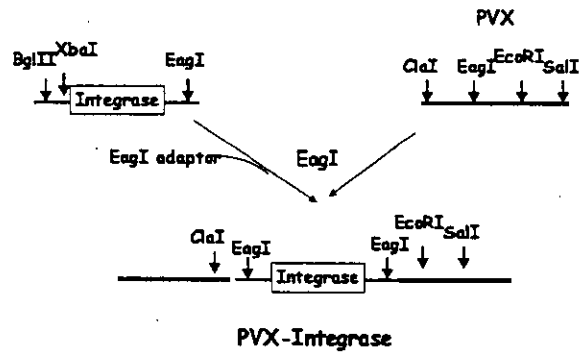
## ביטוי גן הרקומבינאז מווקטור וירלי צמחי;

על פי גישה שונה במקצת, התמקדנו בהכנת ווקטור וירלי שלתוכו יוכנס גן האינטגראז. באופן כזה הדבקה של צמחים בוירוס המהונדס תאפשר ביטוי של חלבון האינטגראז ברקמה צמחית בדרך פשוטה של הדבקה בוירוס.

יצירת וקטור ויראלי צמחי;

הוירוס אשר שימש למטרה זו הוא הוירוס ה-PVX (Potato Virus X) שמוכר כווקטור וירלי למגוון רב של צמחים. גן האינטגרזא הוכנס לפוליילינקר שמהונדס בוירוס כפי שמתואר באיור 6. ההדבקה של צמחי טבק בוירוס המהונדס נעשתה ע"י הכנת תעתיקי RNA מהקלון הויראלי האינפקטיבי והחדרתם לעלי הטבק ע"י שפשוף. צמחים מודבקים זוהו ע"פ הופעת תסמינים יחודיים בעלים של הצמח.

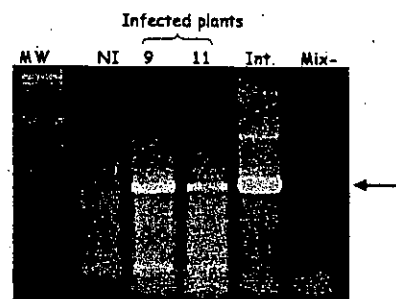
### Introducing of Integrase into PVX vector



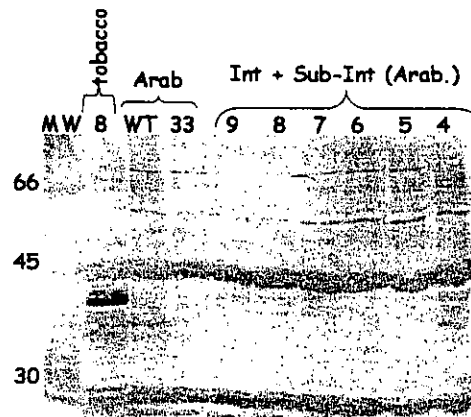
בדיקה לטווחות וביטוי גן האינטגרזא בצמחים המודבקים;

נוכחות גן האינטגרזא בצמחים המודבקים אומתה בעזרת PCR (תמונה מס 4). ביטוי חלבון האינטגרזא מגנום הוירוס נבדק על ידי זיהוי החלבון באמצעות גוגדן. כפי שניתן לראות בתמונה מס' 5 צמח 8, מבטא את חלבון הרקומבינאז ברמות המספיקות לזיהוי על ידי הגוגדן. בשאר הצמחים המודבקים לא זוהה חלבון, יתכן שהחלבון אינו מתבטא אף יתכן שרמת הביטוי נמוכה ואינה מגיעה לסף הרגישות של הגוגדן.

### Integrase sequences in PVX-Int. infected tobacco plants



## Expression of exogenous Integrase in tobacco plant infected with PVX virus



### ב2. דיון ומסקנות

במסגרת תכנית זו הצלחנו להדגים ביטוי של חלבון האינטגראז שבודד מהבקטריופוז HK022 בתאי צמחים. חקר פעילותו הביולוגית של החלבון בצמחים מצריכה עבודה ניסויית נוספת.

אחת מאבני הנף העיקריות בעבודה עם צמחים מהנדסים גנטית ובעיקר כאלו המיועדים למאכל אדם הינה השימוש בגנים סלקטיביים המקנים עמידות לאנטיביוטיקה בתהליך ההתמרה. סילוק גנים אלו בגמר תהליך ההתמרה הינו בעל חשיבות כלכלית גבוהה ומהווה אתגר רציני חשוב בתחום הביוטכנולוגיה בחקלאות. אחד הפתרונות האפשריים לבעיה זו הינו הוצאת הגן הסלקטיבי (הבלתי רצוי) בגמר ההתמרה. הוצאה כזו יכולה להעשות באמצעות פעילות "ההוצאה" של חלבון האינטגראז.

פעילות ה"הכנסה" של חלבון האינטגראז יכולה לשמש להכנסת גנים לאתרים יחודיים בגנום הצמח. כלומר, ניתן יהיה למקם את הגן החיצוני באתר נבחר. לפעילות זו של האינטגראז חשיבות רבה בשמירה על פנוטיפ זהה לפנוטיפ הצמח המקורי כמו גם הבטחה שלא לפגוע בתכונות חשובות של הצמח. מסיבות אלו אנו חושבים כי ישנה חשיבות גדולה בהמשך מחקר זה והשלמתו עד להגעה לשלב של יישום.

- Dymecki, S.M. 1996. FLP recombinase promotes site-specific DNA recombination in embryonic stem cells and transgenic mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91: 12183-12187.
- Gidoni D, Feiler J, Mett A, Vunsh R and Murakhovsky L (2001) Demonstration of FLP/FRT-mediated site-specific recombination in transgenic tomato. Abstract, Israel J of Plant Sci 49: 156.
- Gidoni D, Feiler J, Mett A, Vunsh R and Murakhovsky L (2003) FLP/FRT-mediated site-specific excisional recombination in transgenic tomato. Abstracts of the 7<sup>th</sup> International Congress of Plant Molecular Biology, Barcelona, Spain.
- Golic, M.M., Rong, Y.S., Petersen, R.B., Lindquist, S.L. and Golic, K.G. 1997. FLP-mediated DNA mobilization to specific target sites in *Drosophila* chromosomes. Nucl. Acids Res. 25: 3665-3671.
- Albert, H., Dale, E.C. and Ow, D.W. 1995. Site-specific integration of DNA into wild type and mutant *lox* sites placed in the plant genome. Plant J. 7: 649-659.
- Vergunst, A.C. and Hooykaas, P.J.J. 1999. Recombination in the plant genome and its application in biotechnology. Critical Reviews in Plant Sciences 18: 1-31.

## סיכום לפי שאלות מנחות

- מטרות המחקר לתקופת הדו"ח תוך התייחסות לתוכנית העבודה:  
לפתח לראשונה שיטות להוצאה ולהחדרת גנים בצמחים המבוססות על מערכות הרקומבינזיה FLP/FRT.  
Int-att-1  
לבדוק לראשונה אפשרות הפתוח של מערכת בקרת גנים המופעלת באמצעות טרנס-אקטיבציה בין שני גנים אלליים.
- עיקרי הניסויים והתוצאות שהוגשו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח:  
קבלת ביטוי של חלבון האינטגראז שבודד מהבקטריופז HK022 בתאי צמחים, יצירה ואפיון של קווי טבק ועגבניה טרנסגניים למבני ה- FLP/FRT DNA במטרה להכתיב אינטגרציה ספציפית של DNA זר לגנום, רגנרציה והתחלת קבלה של מועמדים לצמחי מחזר (קווי אינטגרציה) ראשוניים לאתר FRT גנומי בטבק.
- המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו:  
בעבודה זו הראנו ממצאים המצביעים על ביטוי האינטגראז באמצעות התמרה וכן באמצעות קלון ויראלי אינפקטיבי, בתאים צמחיים וכן יצרנו מבנים של FLP/FRT בצמחי טבק ועגבניה המיועדים להכתיב פעילות של אינטגרציה ספציפית של DNA זר בגנום. בשתי התכניות נותרו עדין שלבי פיתוח ואפיון הדורשים כ- 2-3 שנים נוספות למימושן.
- הבעיות שנותרו לפתרון/או השינויים במהלך העבודה (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים, התייחסות המשך המחקר לגביהן):  
במסגרת המימון שאושר (80,000 ש"ח לשנה לכל קבוצה) בשתי התכניות נבנה בסיס תשתיתי והתקדמות לקראת המטרות שהוצבו. הבעיה המרכזית העומדת בפני שתי התכניות היא למעשה הפסקת המימון לפני השלמת השלבים הסופיים והבאת עקרי התכניות למימוש. בתכנית המבוססת על מערכת Int-att נותר עוד לפתח ולהדגים פעילויות של הן "הוצאה" והן "הכנסה" של DNA זר באמצעות חלבון האינטגראז. בתכנית המבוססת על מערכת FLP/FRT נותר

עוד להשלים את אנליזות מועמדי צמחי המחדר שהתקבלו ואלו שבדרך, ליצור ולהשוות פעילות המחדר בין צמחי וקווי מחדר שונים וכן, לבחון הפעלה והפסקה של פעילות טרנסגנים הממוקמים במצב אללי בגנום.

5. האם הוחל כבר בהפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח – פרסומים, פטנטים, בעל פה (הרצאות, ימי עיון): הידע שנוצר בתקופת הדו"ח שמור כמידע חסוי ועדין לא הופץ.