



2000-2002

תקופת המחקר:

408-0031-02

קוד מחקר:

Subject: DEVELOPMENT OF A GENETIC TRANSFORMATION SYSTEM FOR DUNALIELLA

Principal investigator: AMNON LERS

Cooperative investigator: SHAUL BORD, , ADA ZAMIR, URI PICK, ANDREY HALTZITZKY

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

שם המחקר: פיתוח מערכת טרנספורמציה גנטית לאצה דונליאלה

חוקר ראשי: אמנון לרס

חוקרים שותפים: שאול בורד, אלה לומניץ, עדה זמיר, אורי פיק, אנריי חלציצקי

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

תקציר

פיתוח מערכת טרנספורמציה של DNA לאצה דונליאלה על מנת לאפשר הן מחקר בסיסי ללימוד תכונותיה הייחודיות המאפשרות לה התמודדות עם עקות סביבתיות, במיוחד מליחות, והן על מנת לאפשר את יישומה ליצור חומרים בעלי ערך באמצעים ביוטכנולוגיים.

מהלך ושיטות העבודה

סריקת מעבלים שיאפשרו בידוד תאים עמידים וביצוע ניסויי טרנספורמציה תוך שימוש במגוון רב מאוד של הרביצידים ואנטיביוטיקות שונות כולל המעכבים פליאומיצין, DCMU וכלורמפניקול והגנים המקנים עמידות כנגד CAT, *psbA*, *ble*. הוכנו ווקטורים מתאימים הנושאים את הגנים לעמידות כולל הכנת גן סינטטי עבור עמידות לכלורמפניקול. נעשה שימוש בשיטות שונות המשמשות להחדרת DNA זר לאורגניזמים שונים, ובמיוחד לאצה הקרובה כלמידומנס.

תוצאות עיקריות

אותרו שלשה מעכבים עיקריים אשר השימוש בהם מוביל בתנאים המתאימים לעיכוב מלא של התפתחות האצה דונליאלה כולל פליאומיצין, DCMU וכלורמפניקול. עבור שלשתם נבנו וקטורים מתאימים הנושאים אלמנטים רגולטוריים אשר בודדו מגנים אנדוגניים של האצה על מנת להבטיח ביטוי אופטימלי. בוצעו ניסויים לבידוד טרנספורמנטים תוך שימוש בשלושת המערכות שנוכרו. במערכת הפליאומיצין התקבלו מספר מושבות עמידות אשר אנליזה מולקולארית העידה על מאורעות טרנספורמציה אולם אלה לא היו יציבות ולא בתדירות גבוהה מספיק. במערכת ה-DCMU והכלורמפניקול לא אותרו טרנספורמנטים. בוצעו ניסויים במספר שיטות טרנספורמציה שונות ובמיוחד בשיטת האלקטרופודייז, תוך חשיפת האצות לשוק חשמלי בנוכחות ה-DNA, ובשיטה בה נחשפות האצות לערבוב חזק בנוכחות כדורי זכוכית קטנים וה-DNA.

מסקנות והמלצות

לא ברור מהי הסיבה המונעת קבלת טרנספורמנטים בדונליאלה שכן הסלקציה ומבנה הגן המקנה עמידות הותאמו במיוחד לאצה. על פי המחקר שנערך נראה שניסויים עתידיים, במידה ויבוצעו, עדיף לבצעם תוך שימוש במערכת הכלורמפניקול אשר הן הייתה יעילה בהרג התאים והן הגן CAT אשר הותאם במיוחד לקודון חומצות האמינו של האצה. יכול להיות שיש גורם בסיסי אשר קיים באצה זו ואשר קשור ליכולתה להתקיים בתנאי מליחות קיצוניים ואשר מונע את כניסת, קיום ואינטגרציית ה-DNA הזר.

דו"ח שנתי לתכנית מחקר מספר 408-0031-00

פיתוח מערכת טרנספורמציה גנטית לאצה דונליילה

Development Of A Genetic Transformation System For *Dunaliella*

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

ע"י

אמנון לרס - המחלקה לחקר תוצרת חקלאית לאחר הקטיף, מינהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני.

עדה זמיר - המחלקה לביוLOGיה כימית, מכון ויצמן למדע.

ליליאן סונגו - המחלקה לחקר תוצרת חקלאית לאחר הקטיף, מינהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני

חנן הימלפרב - המחלקה לחקר תוצרת חקלאית לאחר הקטיף, מינהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני.

Amnon Lers, Department of Postharvest Science of Fresh Produce, ARO, The Volcani Center,
P.O.B. 6, Bet Dagan 50250. E-mail: alers@volcani.agri.gov.il

Ada Zamir, Department of Biological Chemistry, The Weizmann Institute of Science, Rehovot
76100. E-mail: bczamir@wicc.weizmann.ac.il

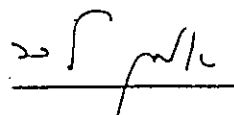
Lilian Sonogo, Department of Postharvest Science of Fresh Produce, ARO, The Volcani Center,
P.O.B. 6, Bet Dagan 50250. E-mail: Lili@volcani.agri.gov.il

Hanan Himmelfarb, Department of Postharvest Science of Fresh Produce, ARO, The Volcani
Center, P.O.B. 6, Bet Dagan 50250. E-mail: hanan@volcani.agri.gov.il

מרץ 2003

אדר תשס"ג

הממצאים בדו"ח זה הנם תוצאות ניסויים ואינם מהווים המלצות לחקלאים

חתימת החוקר 

הצגת הבעיה

פיתוח מערכת טרנספורמציה של DNA לאצה דונוליילה על מנת לאפשר הן מחקר בסיסי ללימוד תכונותיה הייחודיות, המאפשרות לה התמודדות עם עקות סביבתיות, במיוחד מליחות, והן על מנת לאפשר את יישומה ליצור חומרים בעלי ערך באמצעים ביוטכנולוגיים.

מהלך ושיטות העבודה

סריקת מעכבים שיאפשרו בידוד תאים עמידים וביצוע ניסויי טרנספורמציה תוך שימוש במגוון רב מאוד של הרביצידים ואנטיביוטיקות שונות כולל המעכבים פליאומיצין, DCMU וכלורמפניקול והגנים המקנים עמידות כנגדם *CAT*, *psbA*, *ble*. הוכנו וקטורים מתאימים הנושאים את הגנים לעמידות כולל הכנת גן סינטיטי עבור עמידות לכלורמפניקול. נעשה שימוש בשיטות שונות המשמשות להחדרת DNA זר לאורגניזמים שונים, ובמיוחד לאצה הקרובה כלמידומנס.

תוצאות עיקריות

אותרו שלשה מעכבים עיקריים אשר השימוש בהם מוביל בתנאים המתאימים לעיכוב מלא של התפתחות האצה דונוליילה כולל פליאומיצין, DCMU וכלורמפניקול. עבור שלשתם נבנו וקטורים מתאימים הנושאים אלמנטים רגולטוריים אשר בודדו מגנים אנדוגניים של האצה על מנת להבטיח ביטוי אופטימלי. בוצעו ניסויים לבידוד טרנספורמנטים תוך שימוש בשלושת המערכות שנוכרו. במערכת הפליאומיצין התקבלו מספר מושבות עמידות אשר אנליזה מולקולארית העידה על מאורעות טרנספורמציה אולם אלה לא היו יציבות ולא בתדירות גבוהה מספיק. במערכות ה-DCMU והכלורמפניקול לא אותרו טרנספורמנטים. בוצעו ניסויים במספר שיטות טרנספורמציה שונות ובמיוחד בשיטת האלקטרופורייזציה, תוך חשיפת האצות לשוק חשמלי בנוכחות ה-DNA, ובשיטה בה נחשפות האצות לערבוב חזק בנוכחות כדורי זכוכית קטנים וה-

DNA

מסקנות והמלצות

לא ברור מהי הסיבה המונעת קבלת טרנספורמנטים בדונוליילה שכן הסלקציה ומבנה הגן המקנה עמידות הותאמו במיוחד לאצה. על פי המחקר שנערך נראה שניסויים עתידיים, במידה ויבוצעו, עדיף לבצעם תוך שימוש במערכת הכלורמפניקול אשר הן הייתה יעילה בהרג התאים והן הגן *CAT* אשר הותאם במיוחד לקודון חומצות האמינו של האצה. יכול להיות שיש גורם בסיסי אשר קיים באצה זו ואשר קשור ליכולתה להתקיים בתנאי מליחות קיצוניים ואשר מונע את כניסת, קיום ואינטגרציית ה-DNA הזר.

רשימת פרסומים - אין פרסומים ממחקר זה.

האצה דונליילה (Dunaliella)

האצה דונליילה הינה אצה ירוקה חד-תאית הממוקמת באופן מסורתי בסדרת ה- Volvocales ויש לה דמיון רב לאצה כלמידומונס (Ginzburg 1987, Chlamydomonas) המשמשת כמערכת מודל לחקר אורגניזמים פוטוסינטטיים עילאיים. לתאי דונליילה ישנה צורה דמוית ביצה כאשר רוחב התא $4-10\ \mu\text{m}$ ואורכו $6-15\ \mu\text{m}$. לאצה יש שתי פלגות השוות באורכן, וכלורופלסט אחד גדול דמוי ספל אשר תופס יותר ממחצית נפח התא. דונליילה דומה לצמחים עילאיים במערכות מטבוליות עיקריות כגון: המערכת הפוטוסינטטית, ומערכת הנשימה. בתרבות תאים של *D. salina* הגדלה בתנאי גידול מיטביים מספר האצות מוכפל כל 7-8 שעות. לזנים שונים של דונליילה יש את היכולת להתקיים בתנאים קשים וקיצוניים מאד כולל תחום רחב של רמות מליחות, pH, טמפרטורה נמוכה אפילו עד מתחת לנקודת הקיפאון, וקרינה חזקה (Zamir 1995). לדונליילה יש יכולת בלתי רגילה לגדול בתנאי מליחות גבוהים עד מצב של כמעט חמיסה רוויה- $5\ \text{M NaCl}$ בעוד היא שומרת על ריכוז יוני תוך-תאי נמוך. לתאי האצה חסרה הדופן הפוליסכרידית, תכונה המאפשרת הסתגלות לתנאי מליחות משתנים בצורה מהירה ביותר על-ידי שינוי ראשוני ומידי בנפח התאים בהתאם לשינוי בריכוז המלח החיצוני. בשלב ראשון לאחר שינוי הלחץ האוסמוטי החיצוני התאים משנים את נפחם בצורה דרסטית עקב יציאה או כניסה מהירה של מים, מתכווצים מאד עם עליה חיצונית במליחות ומתנפחים עם ירידתו. במקביל ריכוזו הפנימי של גליצרול תוך-תאי משתנה עקב תהליכי ייצור/פירוק דבר המאפשר השוואת הלחץ האוסמוטי הפנימי לסביבה החיצונית חזרה לנפח המקורי, והמשך גדילה. תהליך זה של השוואת לחצים מסתיים בתוך כשעתיים, ולאורך כל התהליך האצות שומרות על ריכוז מלח נמוך בתוך התא. מנגנון ההתמודדות הייחודי של דונליילה עם ריכוזי מלח גבוהים שכאלה הוא נושא למחקר כבר עשרות שנים, יכולת האצה לייצר או לפרק גליצרול תוך-תאי בתגובה לשינוי בלחץ האוסמוטי (Ben-Amotz and Avron 1973) מהווה מנגנון חשוב בהתאמה של דונליילה לגידול בריכוזי משתנה של מלח. מלבד המחקר הנרחב בנושא יצירת הגליצרול התוך-תאי נצפו מנגנונים נוספים המאפשרים את ההתאמה והגדילה בתנאי מלח גבוהים. מנגנונים אלו כוללים, יכולת שליטה במעבר היונים בין שתי צידי הממבראנה, שמירה על ריכוז יוני נתרן נמוך בתוך התא, ויכולת ריכוז CO_2 חיצוני לצורך תהליך הפוטוסינתזה בתנאים של מליחות גבוהה הגורמים לירידה בזמינותו (Fisher et al. 1996).

ביוטכנולוגיה והאצה דונליילה

לדונליילה פוטנציאל עצום ליישומים ביוטכנולוגיים הנובע מהסיבות הבאות: א. דונליילה היא אצה הליוטולרנטית הגדלה מהר, מחזור תא של כ-8 שעות בתנאים מיטביים, ושניתן לגדלה בכמויות תעשייתיות באזורים בהם מוגבלים ביותר גידולים חקלאיים עקב תנאי סביבה עוינים כגון יובש/הום וקרקע לא מתאימה, וזאת תוך שימוש במים מלוחים; ב. הכושר הביוסינטטי יוצא הדופן ליצירת קרוטנואידים באצה מהווה בסיס מעולה לקבלת כימיקלים חדשים הנגזרים מהמסלול הביוסינטטי האיזופירנואיד, כגון אסתקסנתין שמחירו בשוק גבוה יחסית. שינויים אלו יוכלו להתרחש ע"י החדרה של מספר קטן של גנים זרים לאצה או הגברת ביטוי גנים אנדוגניים. כבר כיום יש שימוש מסחרי באצה לצורך הפקה מסחרית של בטא-קרוטן טבעי מהאצה הגדלה בברכות באילת; ג. דונליילה ראויה למאכל אדם ובע"ח ולכן ניתן לסנתז בה חומרים נוספים בעלי ערך מסחרי ולשווקם ללא צורך בעיבוד נוסף. ליישום השימוש באצה בארץ יש יתרון גם עקב העובדה שידע רב, גם בסיסי וגם שימושי, נצבר בשנים האחרונות כתוצאה מהמחקר הרב שנערך בעיקר במכון ויצמן והדבר נכון במיוחד לגבי מחקר מולקולרי-גנטי. ידע זה מקנה יתרון יחסי לחוקרים בארץ בהתאמת

האצה לשימושים ביוטכנולוגיים. יישומה הביוטכנולוגי של האצה מותנה באפשרות להחדיר אליה DNA זר. טרנספורמציה גנטית הינה שיטה המאפשרת להחדיר מידע גנטי זר לתוך יצורים חיים מחד-תאיים, חיידקים, מיקרו אצות עד צמחים ובעלי חיים. שיטה זו היא קריטית לצרכים ביוטכנולוגיים כיוון שהיא מאפשרת שינוי תכונות של יצורים חיים ללא המגבלות של חילוף חומר גנטי בטבע וחיונית עבור יצור חומרים בעלי ערך מוסף גבוה באורגניזמים שגידולם פשנט חול.

מטרת המחקר שבוצע הייתה פיתוח מערכת טרנספורמציה DNA לאצה דונוליילה. במסגרת העבודה היה עלינו לבצע מחקר בשלשה כיוונים עיקריים אשר ההתקדמות בהם הייתה חשובה לצורך פיתוח הטרנספורמציה כולל: 1. איתור חומרים מעכבים (הרביצידים או אנטיביוטיקות) אשר יכולים לשמש כמעכבים ואשר עבורם קיימים גנים המקנים עמידות; 2. בנית ווקטורים הנושאים גנים אלו תוך התייחסות למגבלות הביטוי באצה עקב שונות בקודונים לחומצות אמינו ואלמנטים רגולטוריים; 3. התאמת שיטות להחדרת ה-DNA הזר לאצה.

אחת הבעיות שנתקלנו בה בעבר הוא עמידותה הגבוהה לחומרים אנטיביוטיים ומעכבי גידול אחרים אשר יכולים לשמש לצורך סלקציית טרנספורמנטים לאחר הכנסת הגן המתאים לגנום האצה. רוב החומרים בהם נעשה שימוש בצמחים ובאצות שונות נמצאו ברוב המקרים כבעלי פעילות נמוכה כנגד דונוליילה. בשנים האחרונות פותחו מערכות טרנספורמציה כנגד אצות שונות תוך שימוש בגנים שונים המקנים עמידות כנגד חומרים מעכבי גידול. בין היתר פותחו מערכות טרנספורמציה עבור האצה כלמידומנס (Shimogawara et al., 1998) אשר בהרבה היבטים דומה לדונוליילה. כן פותחו מערכות טרנספורמציה עבור האצה *volvox* ואצות *diatom* אשר היו ידועות כמערכות קשות לביצוע טרנספורמציה (Zaslavskaja et al., 2000). אחד החומרים אשר נמצא שימושי בפיתוח מערכות אלו הוא פליאומיצין אשר יחד עם הגן *ble* מאפשר בידוד מושבות עמידות (Stevens et al., 1996). ניסויים מוקדמים שבוצעו עם דונוליילה תמכו באפשרות שמערכת זו תוכל לשמש בסיס לפיתוח שיטת טרנספורמציה לאצה זו. באצה כלמידומנס דווח על הצלחות בביצוע טרנספורמציה כלורופלסטית תוך שימוש בגן *psbA* הנושא מוטציה המקנה עמידות להרביציד DCMU (Boynton and Gillham, 1993). במסגרת פרויקט זה הסתמכנו וניסינו לבצע התאמות של שיטות הסלקציה והטרנספורמציה אשר תוארו בעבודות הנ"ל באצות השונות לצורך פיתוח מערכת הטרנספורמציה בדונוליילה.

ג. פירוט הניסויים שבוצעו והתוצאות שהתקבלו.

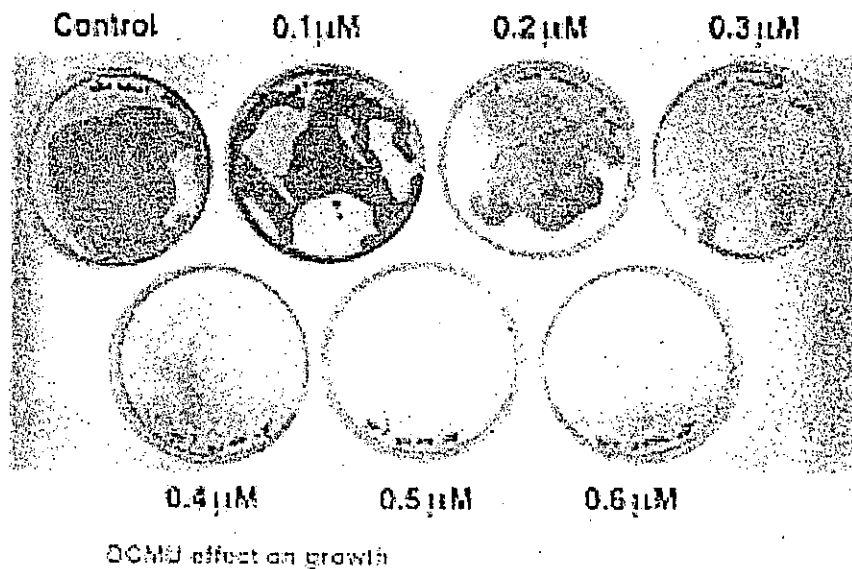
1.1. פיתוח שיטות לסלקציה

בשלב ראשון של הפרוייקט עסקנו בהתאמת התנאים לגידול האצה כולל בניית הדר גידול מתאים ואפיון תנאי הגידול של האצה, כולל התקנת מקור אור מתאים, רכישת מטלטלות מתאימות ואפיון הגידול בתנאים אלו. על מנת לוודא שהסלקציה למושבות של אצות עמידות תהיה יעילה אפיינו את גדילת האצות בצלחות פטרי תוך בדיקת שיטות זריעה שונות. לאחר מכן נסרקו החומרים שונים למידת יכולתם לעכב את גידול האצה לשם בחירת החומר המתאים והכנת הווקטור המתאים שישא את הגן מקנה העמידות לחומר זה. החומרים נבדקו להשפעתם על גדילת האצות הן במדיום נוזלי שהוכן כפי שתואר בעבר (Lers et al., 1990) והן על גבי צלחות פטרי שכללו את אותו המדיום בתוספת 1.5% של אגר. החומרים שנסרקו כללו היגרומיצין, פיורומיצין, גלופוסניט (L-phosphinotricin), גליפוסט (glyphosate), כלורוסולפורן (chlorosulfuron) ברומוקסיניל (bromoxynil) והאנטיביוטיקה G-418. כל החומרים הנ"ל נבדקו אולם בכולם לא נמצאה השפעה משמעותית על גידול האצה שתאפשר שימוש לצורך סלקציה של מושבות

עמידות. כיוול השפעת המעכב פליאומיצין הוביל למסקנה שחומר זה מסוגל להביא לקטילה מוחלטת של האצה, אם כי היתה שונות ביכולת ההריגה של החומר בין ניסויים שונים ונמצאה גם שונות ברמת הפעילות של מקורות שונים או אצות שונות של המעכב. נעשה בעיקר שימוש בחומר בעל השם המסחרי זיאוצין (Zeocin) שנמצא בעל פעילות מעכבת גבוהה. בריכוזי מלח נמוכים (0.25 M NaCl) נמצא שבתוך שבוע כל תרבית האצות על גבי הצלחת מתה והלבינה לגמרי בריכוזים סביב 10 מ"ג למ"ל בעוד שבריכוזי מלח של כ- 2.5 M היה צורך לעלות לריכוזים של כ- 100 מ"ג למ"ל כדי לקבל אפקט דומה וגם זה הצריך משך זמן ארוך יותר של כשבועיים.

בסוף חלק זה של העבודה נמצאו סה"כ שלשה חומרים אשר אפשריים בשימוש עקב רגישות האצה. בוצעה עבודה לאפיון הריכוזים האפקטיביים לשימוש. הדרך בה אופיינו ריכוזים אלו הייתה על ידי בדיקת השפעת ריכוזים הולכים ועולים של המעכבים ומעקב אחר גידול האצות בתרבית נוזלית ובמיוחד בצלחות פטרי בהן תיעשה הסלקציה בניסיונות הטרנספורמציה. נעשה שימוש בריכוזים הנמוכים ביותר אשר עדיין הביאו לתמותה מוחלטת של האצות בצלחות הפטרי. החומרים להם האצה נמצאה רגישה כללו:

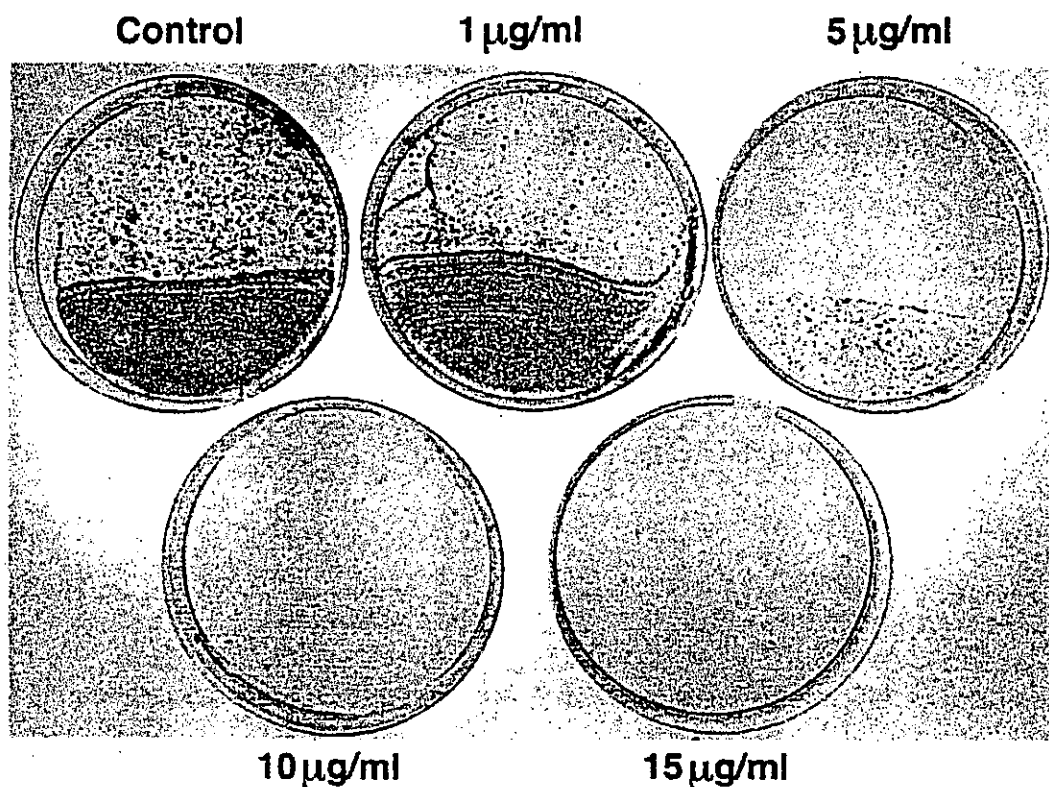
1. מעכב הפרוטוסינטיזה DCMU הנקשר לחלבון D1 ועל ידי כך גורם לעיכוב התהליך ומות התאים. העמידות כנגד מעכב זה מוקנית על ידי מוטציה בגן הכלורופלסטי המקודד ל חלבון ה-D1 והוא הגן *psbA* הנמצא בגנום הכלורופלסטי. מוטציה נקודתית גורמת להחלשות האפניות בין המעכב לחלבון עקב שינוי של חומצה אמינית בודדת. בוצעו ניסויים לצורך קביעת עקומות כיוול של ריכוז המעכב. על פי תוצאות ניסויים אלו (איור 1) נעשה שימוש בריכוזים של $0.5 \mu\text{M}$ של המעכב. השימוש במעכב גרם להרג מלא של האצות אולם הבחנו בגדילה של מושבות שהתפתחו בתדירות נמוכה ($\sim 10^{-6}$).



- איור 1. השפעת ריכוזים שונים של ההרביציד DCMU על גדילת דונוליה. תרבית אצות נוזלית הכוללת סה"כ 10×10^6 אצות רוכזה לנפח של 0.5 מ"ל של מדיום גידול נוזלי ונזרעה על גבי מצע גידול בצלחות פטרי שהוכן תוך הוספת ההרביציד בריכוזים השונים המצוינים. לאחר שתרבית הביקורת שגודלה על גבי מצע שאינו מכיל מעכב הגיעה לצפיפות מלאה צולמו כל הצלחות.

2. פליאומיצין (Bleomycin, Phleomycin, Zeocin), חומרים גליקופפטידיים אלו יוצרים קומפלקסים עם יוני מתכת עוברים אינטרקציה ל-DNA ומשפיעים ריאקציות הגורמות ליצירת שברים ועיכוב תהליכי סינטיזת DNA. העמידות מוקנית על ידי הגן החידקי *ble* המקודד לחלבון קטן מולקולארי הנקשר באפניות גבוהה לחומר. במהלך הניסויים לכיוול

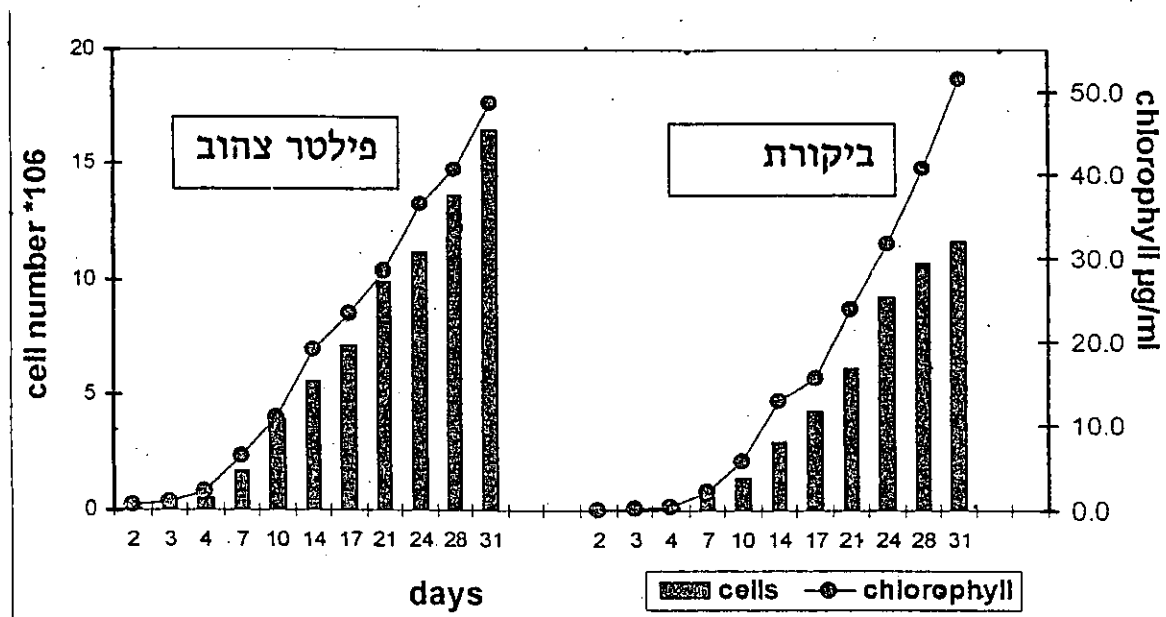
הריכוזים נמצא שיש שונות בפעילות מעכבים ממקורות שונים והפעילות יורדת עם משך אחסון החומר. בנוסף נראה שבניסויים שונים ההרג לא היה מוחלט והיו מיקרו-אזורים בהם האצות לא מתו. תופעות אלו יצרו בעיה בשימוש בחומר אולם עקב ההצלחה בשימוש במערכת זו בכלמידומנס החלטנו למרות בעיות אלו לנסות ולהשתמש במערכת זו. על פי הניסויים שנערכו נמצא שטווח הריכוזים האופטימלי לשימוש עם דונליילה הוא 5-10 מ"ג למ"ל (איור 2).



איור 2. השפעת ריכוזים שונים של המעכב פליאומיצין על גדילת דונליילה. תרבית אצות נוזלית הכוללת סה"כ 5×10^6 אצות רוכזה לנפח של 0.5 מ"ל של מדיום גידול נוזלי ונזרעה על גבי מצע גידול בצלחות פטרי שהוכן תוך הוספת ההרביציד בריכוזים השונים המצוינים. לאחר שתרבית הביקורת שגודלה על גבי מצע שאינו מכיל מעכב הגיעה לצפיפות מלאה צולמו כל הצלחות.

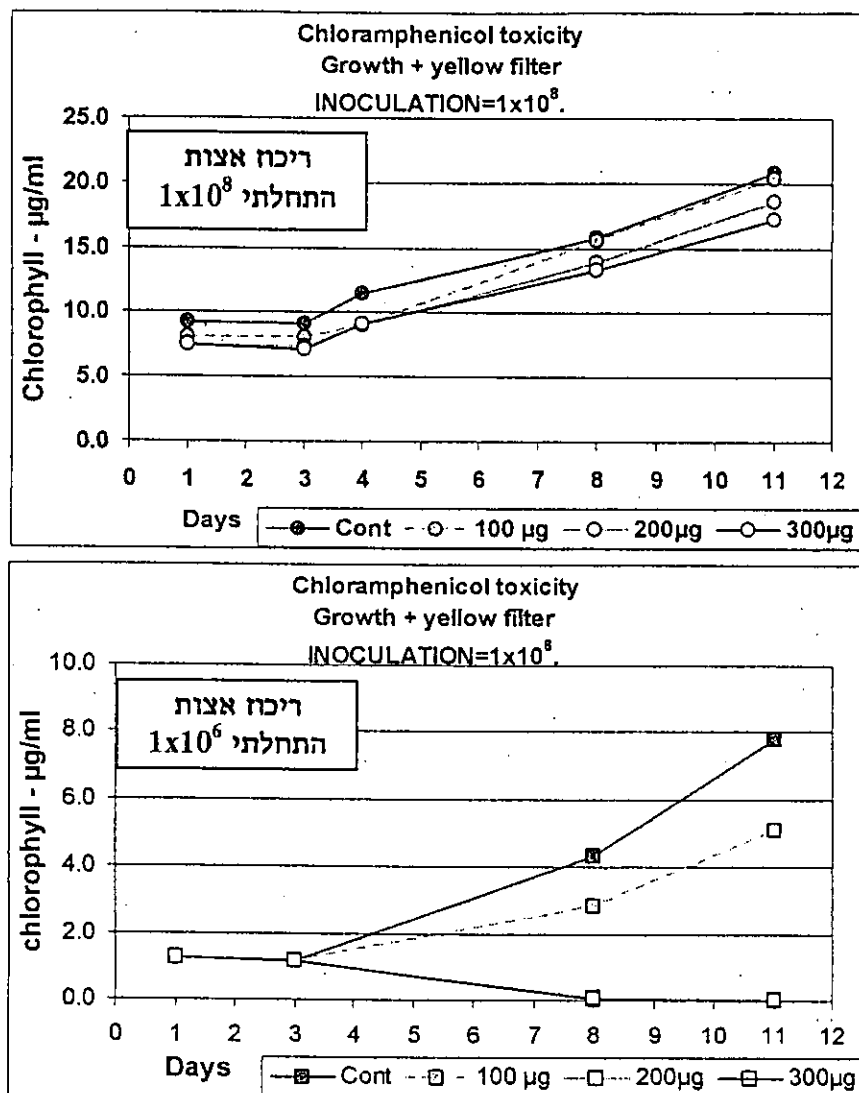
3. כלורמפניקול (chloramphenicol) - מעכב תרגום הלבונים פרוקריוטי. עמידות מוקנית על ידי גן ממקור חידקי המקודד לאנזים chloramphenicol acetyl transferase, CAT. אנזים זה מנטרל את המעכב ע"י מודיפיקציה של אצטילציה. הבעיה בשימוש בחומר זה היא היווצרות חומר רעיל הנוצר לאחר חשיפת האנטיביוטיקה לאור ואשר אינו פועל דרך עיכוב מערכת התרגום אלא כנראה דרך עיכוב תהליך הפוטוסינתזה. לא ברור האם האנזים המקודד על ידי הגן לעמידות מסוגל לנטרל גם את החומר בזה. על מנת לעקוף את הבעיה סקרנו פילטרים שונים אשר בולעים את אורכי הגל הנמוכים הנבלעים על ידי הכלורמפניקול, צלופן צהוב או כתום, אך עדיין מעבירים את האור הדרוש לצורך בצעו יעיל של פוטוסינתזה. בניסויי השוואה נמצא שאם או בלי נוכחות הפילטר, האצות גדלות בצורה דומה (איור 3). נעשו ניסויי כיול על מנת גם לעקוב אחר יכולת גידול האצות תחת הפילטר וגם על מנת לעקוב אחר היווצרות החומר הטוקסי לאחר חשיפה לאור. נמצא שגדילת האצה מעוכבת ברמה שולית, וגם זאת בעיקר השלבים הראשונים של הגידול דבר שכנראה נובע מהתאמה של האצה לאיכות וכמות האור (איור 3). במסגרת ניסויי גידול אלו נבחנה האפשרות להשתמש במדידת ריכוז הכלורופיל בנפח אצות מסויים, לאחר מיצויו מהאצות, כמדד למספר האצות לאחר יצירת עקומת כיול מתאימה המקשרת בין ריכוז האצות לריכוז הכלורופיל. כפי שניתן לראות באיור 3 המתאם גבוה ומאפשר שימוש כמדד הכלורופיל על מנת

לקבוע את ריכוזן. בניסויים אלו נימצא, תוך שימוש במעקב על היווצרות החומר באמצעות ספקטרוסקופיה, שרמת יצירתו וצבירתו מעוכבים באופן משמעותי עם השימוש בפילטר. בהמשך בוצעו ניסויי כיוול לרמות הכלורמפניקול האפקטיביות תוך שימוש בפילטר. יחד עם כיוול הריכוזים של האנטיביוטיקה במדיום הגידול בחנו את האפשרות של ריכוז ההתחלתי של האצות בתרבית יש חשיבות למידת ההרג הנגרם על ידי ריכוז נתון של המעכב. לדוגמא התוצאות המובאות באיור 4. מדגימות את ההבדל העקרוני בין ביצוע הסלקציה בתרבית מרוכזת המונה 1×10^8 תאים למ"ל, בה לא נראית השפעה של הכלורמפניקול בעוד שאם אותו ריכוז כלורמפניקול ניתן לתרבית מהולה יותר של 1×10^6 אצות למ"ל יש עיכוב גידול. כתוצאה מניסויי כיוול אלו נקבעו לשימוש כתנאים לסלקציה ריכוז של 200 מק"ג למ"ל כלורמפניקול תוך שמירת הריכוז ההתחלתי של האצות ל- 1×10^6 (איור 4).



איור 3. השפעת פילטר צהוב על גדילת האצה דונליילה. תרבית נוזלית של האצה גודלה עם או בלי כיסוי כלי הגידול בשכבה אחת של נייר צלופן צהוב. דגימות נלקחו בזמנים שונים לקביעת מספר האצות (עמודות כחולות), ע"י ספירה בתא מתאים תחת מיקרוסקופ, או קביעת ריכוז הכלורופיל לאחר מיצויו באצטון (גרף ירוק).

4. ציקלוהקסימיד (cycloheximide) - מעכב תרגום חלבונים אוקריוטי. העמידות כנגד מעכב זה מוקנית על ידי מוטציה בחלבון הריבוזומלי L41 הגורם להחלשות קשירת המעכב. האצה נמצאה רגישה מאוד לחומר זה ובריכוזים של כ-0.5 מק"ג למ"ל גידול האצה עוכב כליל. עקב אי זמינות הגן לעמידות לא השתמשנו במערכת זו. לאחרונה דווח על בידוד הגן לעמידות מהאצה כלמידומנס (Stevens et al., 2001). ויתכן שבהמשך נעשה שימוש בגן זה כסמן לעמידות בדונליילה.



איור 4. כול השפעת השפעת כלורמפניקול על גדילת האצה בתרבות נוזלית. ריכוזים שונים של כלורמפניקול הוספו לתרבויות בשתי צפיפויות שונות של האצה ונערך מעקב אחר השינויים בגדילת האצה ע"י

2.ג. התאמת שיטות לטרנספורמציה בדונוליילה.

אנו התמקדנו בהתאמת שלוש שיטות לשם שימושן באצה המפורטות להלן:

1. ערבוב חזק, תוך שימוש בוורטקס, של האצות עם DNA בנוכחות כדורי זכוכית ו-PEG. שיטה זו אשר משמשת שנים רבות לצורך טרנספורמציה של שמרים הותאמה גם לצורך הכנסת DNA לאצה כלמידומנס (Kindle, 1990). נבדקו תנאי ערבוב שונים בבחינת עוצמת הערבוב ומשך הזמן. נמצא שהאצות רגישות לרמות ה-PEG בהן נעשה שימוש בניסויים דומים בכלמידומנס והיה צורך להוריד את הריכוז על מנת למנוע תמותה גבוהה של האצות. כיוון שאנו עדיין לא יכולים לקבוע את התנאים האופטימאליים לקבלת אירועי טרנספורמציה נסינו למצוא את התנאים החמורים ביותר האפשריים אבל שאינם מובילים עדיין לתמותה גבוהה מאוד של האצות אלה רק עד שיעור של 10-20% תמותה. התנאים סבבו סביב ערכים של 3 פולסים של ערבוב במשך 10 שניות כל אחד, בעוצמה מכסימלית של מכשיר וורטקס מדגם - Ginnie2, תוך שימוש בריכוז סופי של 1-5% PEG.

2. חשיפת האצות לשדה חשמלי Electroporation נמצאה כדרך יעילה להכנסת DNA לכלמידומנס (Shimogawara, 1998). אנו ניסינו לאפיין בדונוליילה את התנאים לישום שיטה זו. האצות רוכזו לריכוזים שונים $5 \times 10^6 - 10^8$ תוך החלפת המלח במדיום בגליצרול על מנת לשמור על איזוטוניות ללא נוכחות ריכוז מלח גבוהה אשר ימנע

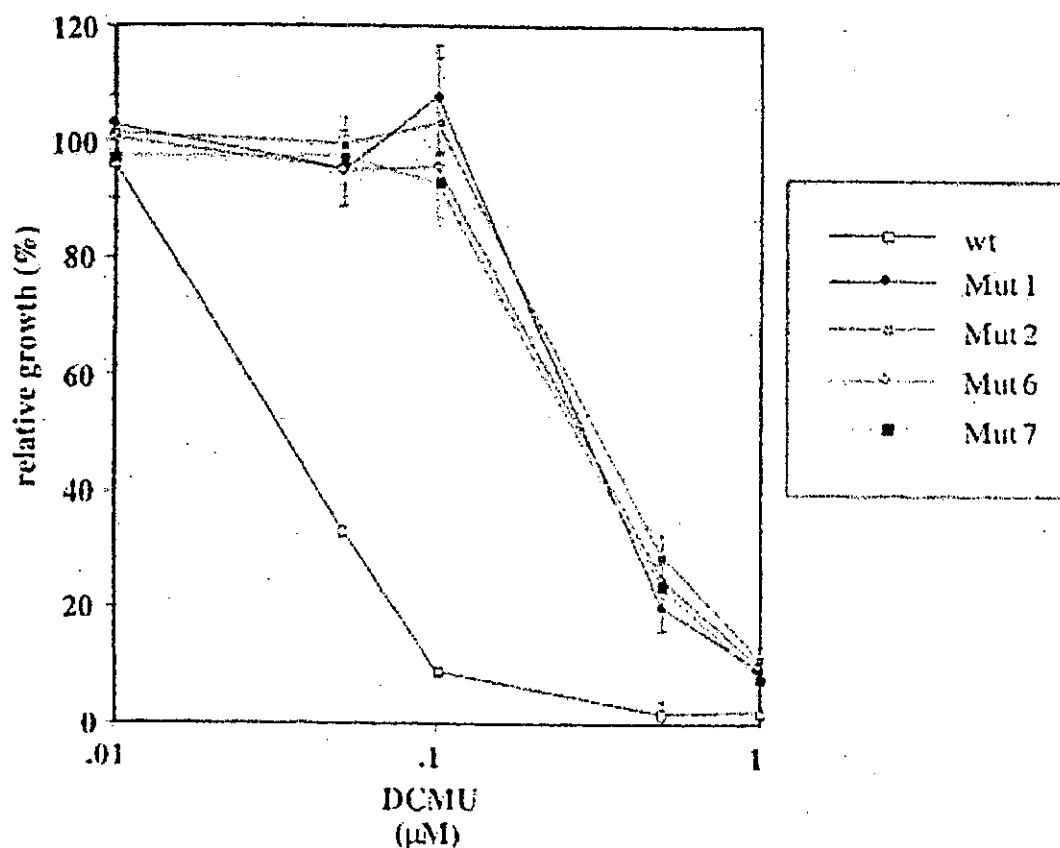
את אפשרות יצירת השדה החשמלי המתאים. האצות הונחו בקיווטות ברוחב של 4 מ"מ ונחשפו לשדות חשמליים שונים מבחינת מדדי עוצמת השדה וזמן הדעיכה ובמיוחד בעוצמות 800-1400 V/cm בדומה לעוצמות שנמצאו יעילות לטרנספורמציה של כלמידומנס.

3. שיטה הביוליסטית- שימוש ב- Helium gun (Boynton and Gillham, 1993). בשיטה זו ה-DNA עובר השקעה בנוכחות ספרמין ויוני סידן על גבי חלקיקי טונגסטן או זהב אשר מואצים אל תרבית האצות הנמצאות בריכוז גבוהה על פלטות. הפלסמידים השונים עברו טיפול בדומה למתואר בספרות והחלקיקים הוצאו אל התאים, 1 מ"ל של תרבית תאים מרוכזת שהכילה 0.5×10^8 תאים.

ג. שימוש ב-DCMU לצורך פיתוח מערכת טרנספורמציה לכלורופלסט האצה דונוליילה.

כאמור ההרביציד DCMU פועל כמעכב של תהליך הפוטוסינתזה עקב קישור לחלבון D1 המהווה מרכיב מרכזי במערכת הפוטוסינתטית ואשר מקודד ע"י הגן הכלורופלסטי *psbA*. ניתן בכלמידומנס לקבל עקב מוטציה בגן אשר מקודד לחלבון D1 אשר כתוצאה מהמוטציה אינו רגיש למעכב ואפשר לכן לעשות בו שימוש כסמן סלקציה המאפשר בידוד מאורעות כניסת DNA לגנום הכלורופלסט עקב רקומבינציה הומולוגית והחלפת העותק האנדוגני של הגן המקודד לחלבון הרגיש. לאחר שנמצא שהמעכב DCMU פועל ביעילות גבוהה כנגד האצות בצענו ניסויים לצורך בידוד מוטנטים של דונוליילה אשר עמידים כנגד המעכב. הנחת העבודה הייתה שבחלק מהמוטנטים שיבודדו העמידות תנבע, בדומה לידוע במערכות צמחים ואצות אחרות, ממוטציה בגן הכלורופלסטי *psbA* המקודד לחלבון D1. האצות נחשפו לקרינת UV ומספר מוטנטים נלקחו לשם המשך האפיון. בארבעה מוטנטים שנבדקו נמצאה עמידות גבוהה יחסית לזן הבר (איור 5). לדוגמא בריכוז מעכב של $0.1 \mu\text{M}$ גידול זן הבר עוכב לרמה של 5% לעומת גידול ללא מעכב בעוד שהמוטנטים לא עוכבו כלל בריכוז זה של המעכב. בריכוזים גבוהים יותר של המעכב התחלנו לראות עיכוב בגידול גם אצל המוטנטים.

לשם אפיון של המוטציה ברמה המולקולארית בצענו ניסויים לבחון האם התרחשה מוטציה בגן *psbA*. הסתמכנו על האפשרות שקיים דמיון ברצף הנוקליאוטידים של גן זה בין דונוליילה לכלמידומנס והשתמשנו ברצף הידוע של כלמידומנס על מנת להשתמש ב-PCR כדי לשבט מקטע cDNA המכיל את רוב האזור המקודד לחלבון D1. שיבוט זה בוצע גם עבור הגן של זן הבר ונמצאה מוטציה באזור הצפוי אשר ידוע כי הוא המעורב בקישור בין חלבון ה-D1 לבין הקווינון Qb (איור 6). המעכב DCMU מונע קישור זה והמוטציה באתר מורידה את האפיניות למעכב יחד עם שמירת אפשרות הקישור ל-Qb. המוטציה הנקודתית הובילה להחלפת הקודון ל-Valine עם זה של Isoleucine בעמדה 219 (איור 6). מוטציה דומה נצפתה במוטנטים שונים בצמחים ואצות אשר נמצאו עמידים כנגד ההרביציד DCMU. מוטציה זו הייתה המוטציה היחידה שאותרה בכל רצף ה-cDNA של ארבעה תבדידים שונים שמצאו עמידים ל-DCMU. מוטציה זו, מלבד החלפת הקודון, יצרה אתר חדש לאנזים רסטרקציה *AseI* ובהמשך הניסויים נעשה שימוש באתר זה על מנת לזהות מאורעות מולקולאריים הנובעים מיצירת המוטציה.



איור 5. השפעת ריכוזים שונים של DCMU על גידול דונוליילה כולל זן הבר ומספר מוטנטים שנמצאו עמידים למעכב.

כיוון שבמהלך טרנספורמציה לגנום הכלורופלסט בצמחים מתרחשת רקומבינציה הומולוגית תוך החלפת מקטע גן אנדוגני בגן הזר אין צורך לכלול בווקטור בו משתמשים לביצוע הטרנספורמציה את כל הגן או אלמנטים רגולטוריים אלא מקטע מספיק גדול שיאפשר ביצוע רקומבינציה. תוך שימוש במקטע ששובט מדונוליילה והמכיל את המוטציה המקנה עמידות הוכנו ווקטורים המתוארים באיור 7. הוכן ווקטור שהכיל מקטע DNA גנומי, pIG200 בו נעשה שימוש בניסויים הראשונים. כיוון שבניסויים אלו נמצא קיום רקע גבוה של מוטציות ספונטאניות המוביל לקבלת אותן מוטציות דבר שלא איפשר הבחנה בין מוטנטים לטרנספורמנטים הוכנו שני ווקטורים נוספים: האחד, pIG201, שכלל cDNA ולא מקטע גנומי המכיל את האינטרון ולכן צפוי שאם תתבצע החלפה בגנום הכלורופלסטי עקב כניסת DNA זה יכול שינוי במבנה ה-DNA באזור זה. ווקטור נוסף שהוכן, pIG202, כלל בנוסף לאתר המוטציה המובילה לעמידות, מוטציה שקטה, שאינה גורמת לשינוי החומצה האמינית המקודדת שהוכנסה לרצף בסמוך אולם מובילה להיווצרות אתר חדש לאנזים רסטריקציה, DdeI, אשר אינו צפוי להיות נוכח במידה והעמידות נוצרה עקב מוטציה ספונטאנית. מוטציה זו הוכנה על ידי שימוש בשיטת in-vitro mutagenesis ליצירת אתר רסטריקציה חדש לאנזים DdeI ללא שינוי הקוד הגנטי וזאת באתר הסמוך כ-30 בסיסים מאתר המוטציה לעמידות.

```

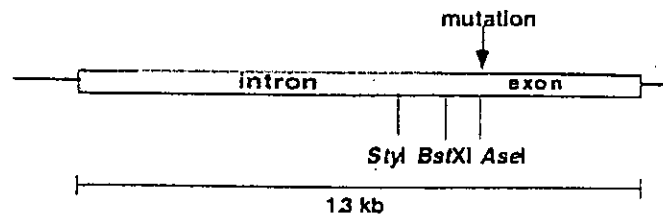
1  ATGACAGCAATTTTAGAACGTCGTGAAAATACTAGCCTTTGGGCACGTTTTTGTGAATGG
   M T A I L E R R E N T S L W A R F C E W
61  ATCACTTCAACTGAAAACCGTTTATACATCGGTTGGTTTCGGTGTTATCATGATCCCAACA
   I T S T E N R L Y I G W F G V I M I P T
121 TTATTAAGTGAATTTCTGTGTACATCATCGCATTTCATCGCAGCACCTCCAGTTGATATC
   L L T A I S V Y I I A F I A A P P V D I
181 GATGGTATCCGCGAACCGATTCTGTTTCATTATTATACGGTAACAACATCATCACTGGT
   D G I R E P V S G S L L Y G N N I I T G
241 GCAGTTGTTCCAACCTTCTAACGCTATCGGTTTACATTTCTACCCAATCTGGGAAGCTGCT
   A V V P T S N A I G L H F Y P I W E A A
301 TCTTTAGATGAGTGGTTATACAACGGTGGTCCTTACCAATTAGTTGTATGTCACTTCTTC
   S L D E W L Y N G G P Y Q L V V C H F F
361 TTAGGTGTATGTTGTTACATGGGTCTGAGTGGGAATTATCTTACCGTTTAGGTATGCGT
   L G V C C Y M G R E W E L S Y R L G M R
421 CCATGGATCGCTGTTGCTTACTCAGCTCCAGTAGCTGCTGCAACTGCTGTATTTCATCATC
   P W I A V A Y S A P V A A A T A V F I I
481 TACCTATCGGTCAAGGTTCTTTCTCTGTTGGTATGCCTTTAGGTATTTCTGGTACTTTTC
   Y P I G Q G S F S D G M P L G I S G T F
541 AACTTCATGATCGTATTCCAAGCTGAGCATAACATTTTAATGCACCCATTCCACATGTTT
   N F M I V F Q A E H N I L M H P F H M F
601 GGTGTTGCTGGTGTATTTCGGTGGTTTCATTATTCTCTGCTATGCACGGTTCATTAGTAACT
   G V A G V F G G S L F S A M H G S L V
661 TCATCTTTAATCCGTGAAACAACGAAAATGAATCAGCTAACGCTGGTTACAAATTCGGT
   S S L I R E T T E N E S A N A G Y K F G
721 CAAGAAGAAGAACTTACAACATCGTAGCTGCTCATGGTTACTTTGGTTCGTTTAACTCTTC
   Q E E E T Y N I V A A H G Y F G R L I F
781 CAATACGCTTCATTCAACAACAGCCGTTTATTACACTTCTTCTTAGCTGTATGGCCAGTT
   Q Y A S F N N S R S L H F F L A V W P V
841 GTATGTATTTGGTTAACTGCTTTAGGTATCTCAACTATGGCATTCAACTTAAACGGTTTC
   V C I W L T A L G I S T M A F N L N G F
901 AACTTCAACCAATCAGTTGTTGATTCAAACGGTCGTGTATTAAACACATGGGCTGATATT
   N F N Q S V V D S N G R V L N T W A D I
961 ATCAACCGTGCTAACTTAGGTATGGAAGTTATGCACGAACGTAATGCACATTGTACTTC
   I N R A N L G M E V M H E R N A H C N F
1021 CCATTAGACTTAGCTTCAACTGAAAGCTCCTTCA 1053
      P L D L A S T E A P S

```

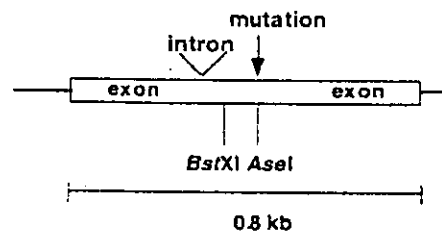
איור 6. רצף ה-DNA וחומצות האמינו באזור המקודד של הגן *psbA* בדוגליילה. קו שחור תחתי מציין את מיקום האינטרונים בגן; מסגרת אדומה מציינת את מיקום הנוקליאוטיד G אשר שינוי עקב מוטציה נקודתית ל-A מוביל לקידון עבור החומצה האמינית איזולוצין (Isoleucine, I) במקום ולין (Valine, V) ועקב כך לקבלת חלבון בעל עמידות למעכב DCMU.

בניסויי הטרנספורמציה שבוצעו לא נמצא הבדל בין ניסויים שכללו שימוש ב-DNA שאמור להקנות עמידות לבין ניסויי ביקורת ללא DNA. אחת הבעיות העיקריות בגישה זו נבעה מרמה גבוהה, לפעמים למעלה מ- 10^{-6} , של מאורעות שהובילו לעמידות ספונטאנית עקב המוטציה. גם השימוש בווקטורים אשר מאפשרים להבדיל בין מאורעות ספונטניים לבין אלו הנובעים מהטרנספורמציה לא הוביל לזיהוי מאורע טרנספורמציה תוך שימוש במערכת זו.

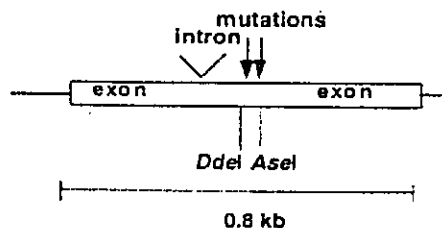
a. pIG 200 - *psbA* genomic construct



b. pIG 201 - *psbA* cDNA construct



c. pIG 202 - *psbA* cDNA construct



איור 7. שלשת הווקטורים הנושאים מקטע מהגן *psbA* הכולל שינוי ברצף להקניית עמידות ל-DCMU. A. ווקטור הנושא מקטע DNA גנומי; B. ווקטור הנושא מקטע cDNA. C. ווקטור הנושא מקטע cDNA בתוספת מוטציה שקטה על מנת לאפשר אבחון פולימורפיזם בין עמידות המוקנית עקב מוטציה ספונטנית או עקב מאורע טרנספורמציה עקב השימוש בווקטור.

הגן ל-*psbA* מדונליאלה.

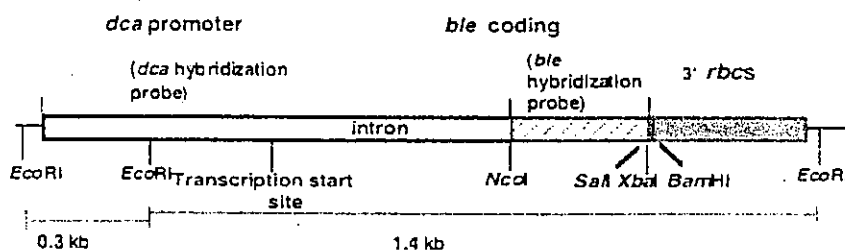
במהלך העבודה שובטו הן ה-cDNA המלא של הגן ל-*psbA* והן הגן עצמו ונקבע הרצף המלא שלהם. נמצא שההומולוגיה ברמת הנוקליאוטידים היא 88% יחסית לכלמידומנס וההומולוגיה ברמת חומצות האמינו מגיעה ל-93% יחסית לחלבון ה-D1 של כלמידומנס. תכולת ה-GC בגן זה נמצאה ברמה של כ-40% וזאת בהשוואת לרמה של 50--60% כפי שקיים בגנום הנוקליארי. נמצא שבגן קיימים שלשה אינטרונים והאינטרון השני עבר אנליזת רצף מלאה. על סמך אנליזה זו ניתן לשייך אינטרון זה לקבוצת ה-group I introns ולאחר את המאפיינים של אינטרונים אלו.

ג. 4. שימוש במערכת הבליאומיציין והגן *ble* לשם טרנספורמציה נוקליארית.

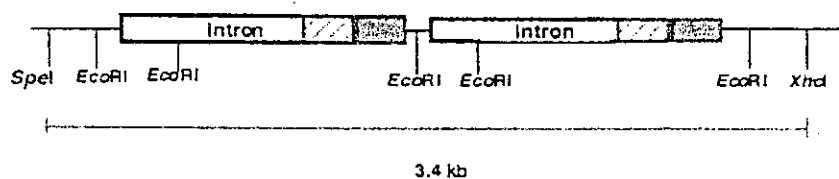
לאחר כיוול תנאי הסלקציה כפי שפורט לעיל תוך שימוש במעכב פליאומיציין בוצעה עבודת לבניית וקטורים מתאימים לצורך השימוש בניסויי הטרנספורמציה (איור 8). הגן בו נעשה שימוש הוא הגן הבקטריאלי *ble* בשלב ראשון נעשה שימוש בווקטור אשר שימש בהצלחה לצורך ביצוע טרנספורמציה לכלמידומנס כולל הווקטורים pSP108, pSP124 (Stevens et al., 1996). בווקטורים אלו הבקרה של הגן *ble* מתבצעת באמצעות הפרומוטור והטרמינטור של הגן *rbcS* מכלמידומנס. בהמשך שופרו ווקטורים אלו על מנת להתאימם יותר לדונליילה (איור 8). באמצעות טכנולוגיית ה-Inverse PCR שובט האזור הרגולטורי 5' של הגן המקודד ל-*carbonic anhydrase, dca* מדונליילה והמכיל את

הפרוטוטור האחראי להפעלת גן זה עם העלייה במליחות המדיום (Fisher et al., 1996). מקטע DNA זה הוכנס בווקטור pIG100 והחליף את הפרוטוטור של כלמידומנס להפעלת הגן לעמידות *ble*. מקטע ה-DNA שאוחד כולל גם את התחלת האזור 5' של ה-mRNA מדונוליילה כלומר יוצר איחוי טרנסקריפט (transcriptional fusion) וכולל המצאות של אינטרון. קיום אינטרון דווח במספר מקרים כבעל השפעה חיובית על רמת הביטוי. בווקטור נוסף שהוכן, pJB100, הוכנס עותק נוסף של הגן לעמידות עם האלמנטים המבקרים את ביטוי לצורך העלאת רמת הביטוי. על מנת למנוע את האפשרות שהרצפים ארוכים ששובטו מדונוליילה באזור ה-5' מכילים רצפים היכולים לדכא את רמת הביטוי הוכן ווקטור נוסף, pJB101, אשר בו קוצר האזור הרגולטורי אשר מקורו מדונוליילה.

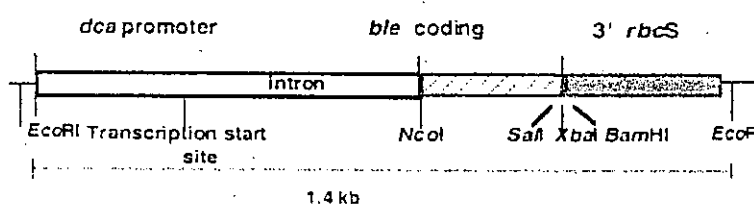
a. pIG 100



b. pJB 100

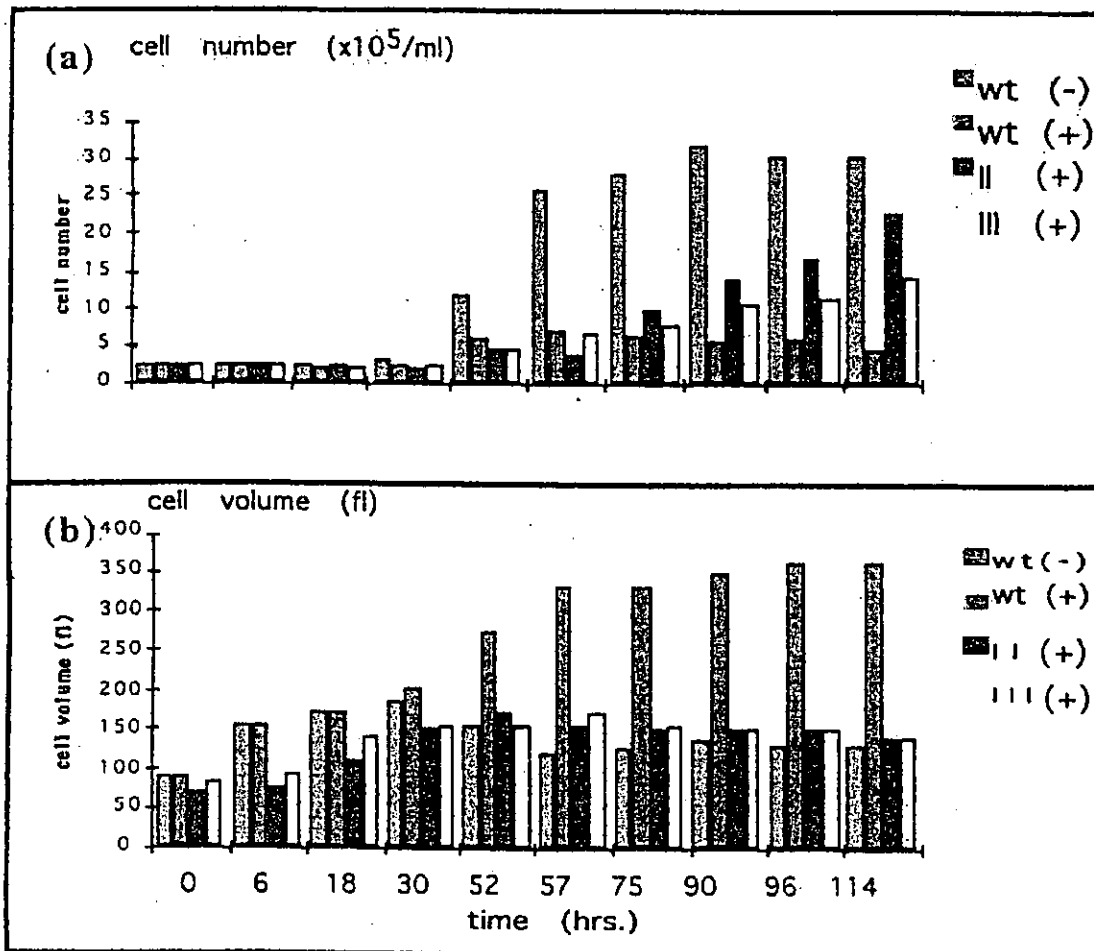


c. pJB 101



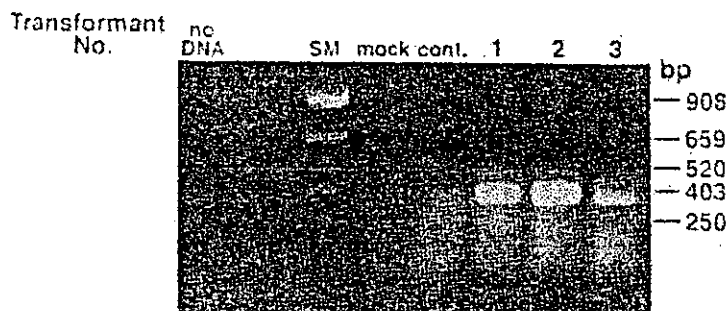
איור 8. הווקטורים שנבנו לביצוע ניסויי טרנספורמציה תוך שימוש בגן *ble* המקנה עמידות למעכב פליאומיצין. A. הגן תחת בקרה של הפרוטוטור הארוך של הגן *dca* מדונוליילה; B. ווקטור המכיל שני עותקים של הגן לעמידות; C. ווקטור המכיל את הגן *ble* תחת בקרה של הפרוטוטור המקוצר של הגן *dca* מדונוליילה.

בוצעו ניסויי טרנספורמציה תוך שימוש בווקטורים אלו והתקבלו תבדידים עמידים. אולם כפי שצוין הניסויים בהם בוצעה סלקציה עם פליאומיצין היו בעיתיים לעיתים. המושבות העמידות הופיעו הן בניסויים שכללו DNA והן בביקורת אולם בניסויים שכללו DNA מושבות אלו התפתחו לפחות 48 שעות מוקדם יותר. אפיון גידול התבדידים העמידים הראה הבדל משמעותי בינם לבין זן הבר בעת גידול על מדיום המכיל את המעכב (איור 9). הבדל נוסף שאותר היה בנפח התא אשר בעוד שהיה גבוה באצות זן הבר בנוכחות המעכב היה נורמאלי בתבדידים העמידים ודומה לזה של אצות זן הבר.

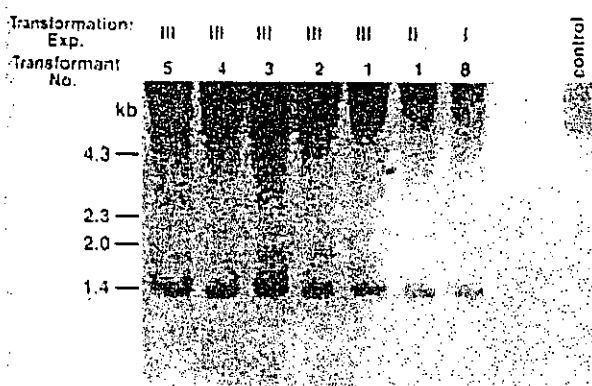


איור 9. אפיון תבדדי דוגליילה שהתקבלו בניסוי טרנספורמציה ואשר מראים שינוי ברגישות לפליאומיצין. a. השפעת נוכחות המעכב על מספר האצות בתרבית נוזלית. b. השפעת נוכחות המעכב על נפח האצות בתרבית נוזלית. Wt, זן הבר; II, III, התבדדים העמידים שבדרך; +/-, גידול עם או בלי המעכב, בהתאמה.

אפיון מולקולארי של התבדדים בשיטות PCR (איור 10) ו-Southern blotting (איור 11) הוביל בחלק מהמקרים, בשלשה ניסויים בלתי תלויים, לזיהוי מקטעי DNA בגודל הצפוי מקיום ה-DNA בו נעשה שימוש בניסויי הטרנספורמציה. צורת המקטעים לא תאמה מאורעות של אינטגרציה של ה-DNA לתוך גנום האצה, אלא תאמה קיום של פלסמיד עדיין בצורתו החופשית.

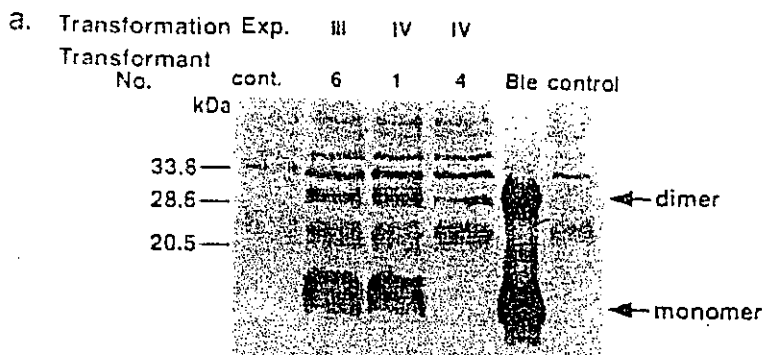


איור 10. זיהוי רצפים מהגן *ble* בתבדידים שבודדו על פי עמידותם לפליאומיצין לאחר ביצוע ניסויי טרנספורמציה. מיצוי DNA מתבדידים עמידים, 1,2,3 או מתבדידים שהראו עמידות לאחר ביצוע ניסוי טרנספורמציה אך ללא הווקטור, mock cont. לאחר ביצוע ריאקציית הגברה באמצעות פריימרים מתאימים הופרדו התוצרים על גבי ג'ל אגרוז שנצבע עם אתידיום ברומיד לזיהוי ה-DNA.



איור 11. זיהוי קיום רצפי DNA ההומולוגיים לגן *ble* בגנום התבדידים העמידים לפליאומיצין. לאחר הפקת ה-DNA מתרבית האצות העמידות בוצעה אנליזת Southern תוך שימוש ברצפים מהגן *ble* כגלאי לאחר סימון רדיואקטיבי. לאחר היברידיזציה ושטיפה נחשף הבלוט לפילם.

בנוסף עשינו שימוש בנוגדנים כנגד החלבון המקודד על ידי הגן *ble* על מנת לבדוק האם היה ביטוי של גן זה בדונליילה. במספר תבדידים נמצא אות ברור של חלבון ה-*BLE* (איור 12) דבר אשר הוכיח שהגן הזר עבר ביטוי בתוך האצה וכנראה אפשר את הגדול בנוכחות המעכב.

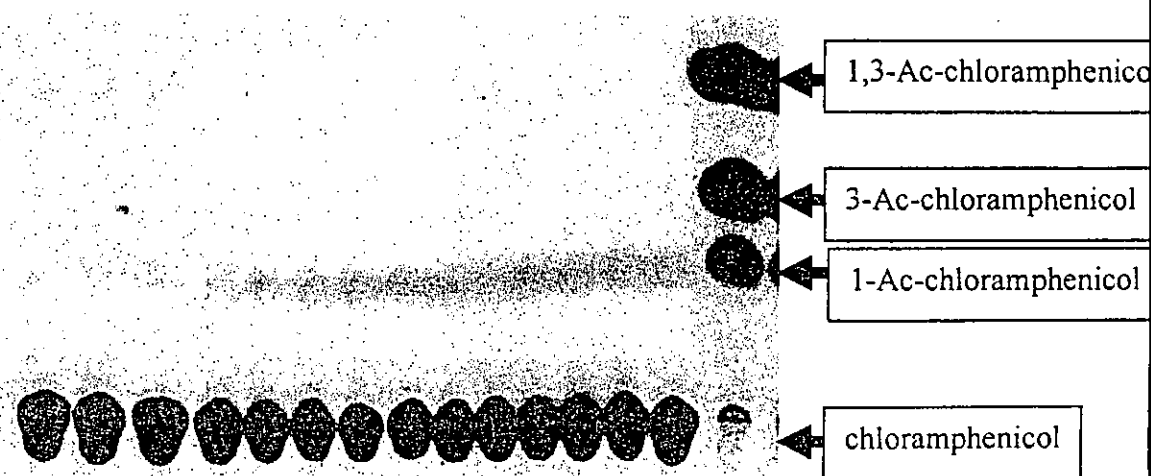


איור 12. זיהוי החלבון המיוצר על ידי הגן *ble* בתאי דונליילה המראים עמידות לפליאומיצין. לאחר הפקת כלל החלבונים מהתאים בוצעה אנליזת western תוך שימוש בנוגדן הספציפי לחלבון *BLE*. החיצים מסמנים את מקום נדידת הדימר (dimer), או המונומר (monomer) של החלבון; cont, תאים ללא ביצוע טרנספורמציה; 6,1,4, זני תבדידים עמידים שונים; *Ble*, חלבון ה-*BLE* שהורץ במקביל כביקורת חיובית.

אולם למרות ההצלחה בקבלת הביטוי, כיוון שלא נמצאה אינטגרציה ולא היה ניתן לחזור בעקביות על תוצאות אלו, יחד עם הבעייתיות בשימוש במעכבים ממשפחת הפליאומיצין נראה שכיוון זה אינו יעיל ובשלב זה אין אנו ממשיכים בשימוש במערכת זו לשם פיתוח הטרנספורמציה.

ג. שימוש בכלורמפניקול ובגן CAT לצורך טרנספורמציה נוקליארית.

המעכב כלורמפניקול נמצא יעיל בעיכוב גדילת האצות, אם כי, כפי שפורט לעיל היה צורך בסינון האור על מנת למנוע פירוק המעכב ויצירת חומר רעיל אחר. על מנת להגדיל את סיכויי הביטוי של הגן בדונליילה הוכנסו מספר שיפורים משמעותיים לעומת הווקטורים בהם נעשה שימוש קודם. יצרנו שיתוף פעולה עם החוקר Dr. P. Hegemann. מגרמניה אשר יצר את הגן כשהוא מותאם במיוחד עבור הקוד הגנטי של כלמידומנס ודונליילה וזאת באמצעות סינתזה מלאכותית של האזור המקודד לחלבון תוך שינוי לקודונים המועדפים על ידי אורגניזמים אלו. מקטע DNA סינטטי זה חובר לאלמנטים הרגולטוריים של הגן dca מדונליילה אשר מבטיחים אפשרות הפעלת הגן באצה. אחד היתרונות של השימוש בסמן זה היא האפשרות לעקוב אחר ביטוי החולף (transient expression) של הגן CAT תוך מעקב אחר פעילות האנזים המסונתז על סובסטרט כלורמפניקול המסומן רדיואקטיבית. ביצוע ריאקציית האצטילציה של הסובסטרט ניתנת לזיהוי באמצעות כרומטוגרפיה והפרדת המולקולות להן בוצעה האצטילציה משאר הסובסטרט. תוך שימוש בווקטור זה בוצעו מספר גדול של ניסויי טרנספורמציה, הן עבור קבלת מאורעות של טרנספורמציה יציבה שתוביל לתבדירים עמידים לאחר ביצוע הסלקציה על גבי צלחות, והן ניסויים שבהם בחנו את הביטוי החולף של הגן CAT. לאחר ביצוע ניסוי הטרנספורמציה, הן בשיטת כדורי הזכוכית והן באמצעות אלקטרופורייזן, הועברו התאים להתאוששות והתרביות נקצרו בנקודות זמן שונות. טווח הזמנים הנבדק היה ממספר שעות ועד 48 שעות. כלל החלבונים הופקו מהתאים והם שימשו בריאקציית ה-CAT assay. דוגמא לתוצאה של ניסוי כזה מובאת באיור 13.



איור 3. אנליזת פעילות האנזים CAT. דגימות חלבון שמוצו מתרביות לאחר טיפולים שונים של טרנספורמציה הודגרו בתנאים מתאימים עם סובסטרטים שכללו כלורמפניקול מסומן בפחמן רדיואקטיבי ו-Acetyl CoA. לאחר תקופת ההדגרה מוצו התוצרים בעזרת אתחיל אצטט ולאחר יבושו והרחפת הפלט ב-30 מיקרוליטר אתיל-אצטט הדגימות הוטענו על פלטת TLC ובוצעה הפרדה בעזרת תערובת ממסים מתאימה. החיצים מסמנים את מיקום הנגזרות השונות של הכלורמפניקול כולל הסובסטרט החופשי ולאחר הוספת קבוצת אצטיל, Ac, בעמדה 1, 3 או בשתייהן.

ד. מסקנות והשלכותיהן

למרות הדימיון הרב בין האצה הנחקרת לבין כלמידומנס, בה פותחו מערכות טרנספורמציה יעילות גם עבור הגנום

הנוקליארי וגם עבור הגנום הכלורופלסטי תוך שימוש במספר סמנים וגנים שונים זה מזה, לא הצלחנו עד היום לפתח מערכת טרנספורמציה יעילה עבור דונליילה. הבדל משמעותי אחד בין המערכות הוא כמובן ההבדל בין מספר קבוצות המחקר שעסקו בפיתוחים אלו. בעוד שבחקר כלמידומנס, כולל פיתוח מערכות טרנספורמציה יש מספר קבוצות בעולם, עד כמה שידוע לנו אנו קבוצת המחקר היחידה שעסקה בניסויים לפיתוח טרנספורמציה לדונליילה. אולם ברור שלגבי האצה דונליילה קיים קשיים ספציפיים הקשורים אולי ליכולותיה המיוחדות להתקיים בסביבה עוינת ובמיוחד במדיום רמת מליחות גבוהה. כבר בסקר שערכנו לזיהוי חומרים המעכבים גדילה כולל הרביצידים ואנטיביוטיקות נוכחנו למצוא אדישות/עמידות גבוהה מאוד של האצה לחומרים שונים אשר בדרך כלל מעכבים בצורה יעילה צמחים ואצות שונות ובכללן כלמידומנס. לדוגמא אנטיביוטיקות שונות בהן יש שימוש נפוץ בכלמידומנס כגון ספקטינומיצין, קנאמיצין או G418 אינן משפיעות כלל על גידול האצה. יתכן שעמידות גבוהה זו נובעת ממנגנונים המונעים כניסת חומרים חיצוניים לאצה כגון מבנה ממבראנה ייחודי, או לחילופין קיום מנגנונים יעילים האחראים לסילוק מתוך התא חומרים זרים העוברים את הממבראנה. יכול להיות שמנגנונים אלו השתכללו מאוד בדונליילה ומאפשרים את קיומה בסביבת גידול עוינת. מגבלות נוספת המשפיעות על יכולתנו לפתח מערכת טרנספורמציה לאצה זו נובעות גם מכך שלא ידועה דרך אפשרית לגידול האצה ללא תלות בפוטוסינטיזה תוך ניצול מקור פחמן חיצוני לצורך איתור מוטנטים בגנים פוטוסינטיים וכן אי קיום מוטנטים אוטוטרופיים אשר ניתן לנצלם כמארחים.

בשלב זה גם לא ברור לנו מהי היעילות בה בכלל חודר ה-DNA לתוך תאי האצה שכן כפי שתואר בעבודה גם כשניסו לעקוב אחר ביטוי חולף של הגן ל-CAT, ללא דרישה לאינטגרציה יציבה של הגן לגנום האצה, לא מצאו כל עדות לביטוי כזה. יתכן וגם בשלב זה, של הכנסת ה-DNA לאצה קיימת מגבלה הנובעת אולי אף מאותם מנגנונים המונעים כניסת חומרים זרים לתוך התא או ממנגנונים האחראים לסילוק מולקולות זרות שהצליחו לחדור לתוך התאים. במהלך המחקר שבוצע איתור מספר חומרים שלהם הייתה רגישה האצה ובוצעו ניסויים לטרנספורמציה תוך שימוש בהם. בחינת שתי המערכות הראשונות שתוארו: DCMU והגן *psbA* ופליאומיצין והגן *ble* לא הובילה לפיתוח מערכת טרנספורמציה. אמנם במערכת בה עשינו שימוש במעכב פליאומיצין והגן *ble* התוצאות שהתקבלו מדגימות קיום מאורעות בהם ה-DNA חדר לתאים ואף ביטוי של הגן לעמידות ובעקבותיו עמידות מוגברת, יחסית של האצה למעכב אך הבעיות שנצפו הן ביעילות המעכב והן בתגובת העמידות הנרכשת על ידי האצות לא נראה שכיוון זה ראוי להמשך מחקר.

לאור הבעיות השונות שהתגלו בשתי מערכות אלו ואשר הוזכרו, במיוחד בעיית הסלקציה הנובעת מקיום שיעור גבוה של מוטציות ספונטניות או ההתאמה שנמצאה מתרחשת לגידול דונליילה בנוכחות המעכב, החלטנו להתמקד בשנה האחרונה לפרויקט תוך שימוש במערכת הכלורופניקול וזאת עקב קיום מספר יתרונות אשר יכולים להיות רבי חשיבות כולל: סלקציה טובה ללא קבלת רקע כל שהוא של מושבות עמידות, התאמה מלאה הן מבחינת האלמנטים הרגולטורים והן מבחינת הקוד הגנטי לדונליילה ואפשרות לעקוב אחר ביטוי זמני של הגן ובאמצעותו לכייל את התנאים וההצלחה שדווחה לגבי השימוש בכלמידומנס. יש חשיבות במחקר מעין זה להתמקדות בכיוון מסוים על מנת לאפשר ביצוע ניסויים בהיקף רחב לאיתור לפחות מאורעות נדירים תחילה שיאפשרו המשך עבודה לשכלול התנאים האופטימאליים. אמנם מימון המחקר הסתיים אולם, בכוונתנו להמשיך, לפחות בצורה מוגבלת, את השימוש במערכת הכלורופניקול תוך שיכלול ויעול גידול האצות על מצע מוצק ובדיקת מערכות נוספות להחדרת ה-DNA לתוך האצות. אחד הניסויים הראשונים שיבוצעו הוא שימוש במערכת האגרובקטריום וה-Ti-plasmid לשם החדרת DNA לתוך גנום האצה. קטע הגן CAT כולל האלמנטים הרגולטוריים מוכנס בימים אלו לתוך הפלסמיד המתאים ויעשו ניסויים להדבקת האצה על ידי החיידק הנושא וקטור זה. בספרות דווח על יכולת האגרובקטריום לתפקד גם במערכות שונות מצמחים בביצוע טרנספורמציה.

מטרות המחקר-פיתוח מערכת טרנספורמציה של DNA לאצה דונליילה על מנת לאפשר הן מחקר בסיסי ללימוד תכונותיה הייחודיות המאפשרות לה התמודדות עם עקות סביבתיות, במיוחד מליחות, והן על מנת לאפשר את יישומה ליצור חומרים בעלי ערך באמצעים ביוטכנולוגיים.

עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח- בוצעה סקירה מקיפה של מעכבים השונים להם האצה רגישה ואותרו שלשה המתאימים ביותר: פליאומיצין, DCMU, וכלורמפניקול. הוכנו ווקטורים שונים הכוללים את הגנים המקנים עמידות כנגד מעכבים אלו: *psbA*, *ble* ו-*CAT*, בהתאמה. בוצעו ניסויי טרנספורמציה בשלשת המערכות תוך התאמת שיטות במיוחד שיטת כדורי הזכוכית, אלקטרופורייזן והשיטה הביוליסטית. במערכת הפליאומיצין התקבלו מספר תבדידים אשר בהם היה ביטוי של הגן הזר אולם DNA לא היה יציב ולא עבר אינטגרציה לגנום האצה. בודדו מוטנטים עמידים ל-DCMU ושובט ואופיין הגן ל *psbA* מדונליילה כולל אפיון המוטציה שהובילה לעמידות. במערכת הכלורמפניקול הוכן ווקטור הכולל גן מלאכותי מתאים במיוחד לקודוני ח. האמינו בדונליילה ובוצעו ניסויי טרנספורמציה אשר לא הובילו עד כה לכידוד טרנספורמנטים.

המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו- בדונליילה כנראה קיימות מגבלות ייחודיות לביצוע טרנספורמציה, אולי עקב מנגנונים הקשורים בקיום העמידות הגבוהה למליחות. ההצלחה החלקית תוך שימוש במערכת הפליאומיצין מדגימה שקיימת אפשרות להחדיר את ה-DNA ולקבל ביטוי של הגן הזר.

הבעיות שונתרו לפתרון ו/או השינויים שחלו- עדיין יש צורך בהמשך ביצוע ניסויים לפיתוח מערכת טרנספורמציה בדונליילה אם כי נראה שכדאי יהיה בעתיד להמשיך בכיוונים אשר המחקר שנערך מצביע עליהם כיותר כדאיים.

האם הוחל בהפצת הידע- עדיין לא. גם במקרה של הצלחה אנו ראשית נבחן את האפשרות לרשום פטנט על דרך הטרנספורמציה כיוון שתהיה לה חשיבות כלכלית.

Literature

- Ben-Amotz, A. Avron, M. (1973) The role of glycerol in the osmotic regulation of the halophilic alga *Dunaliella salina*. Plant physiol. 51: 875-878.
- Boynton, J. E. and Gillham, N.W. (1993) Chloroplast transformation in *Chlamydomonas*. Method Enzymol. 217: 510-536.
- Fisher, M., Gokhman, I., Pick, U. and Zamir, A. (1997) A structurally novel transferring-like protein accumulates in the plasma membrane of the unicellular green alga *Dunaliella salina* grown in high salinities. J. Biol. Chem. 272: 1565-1570.
- Fisher, M., Gokhman, I., Pick, U. and Zamir, A. (1996) A salt-resistant plasma membrane carbonic anhydrase is induced by salt in *Dunaliella salina*. J. Biol. Chem. 271: 17718-17723.
- Ginzburg, M. (1987) *Dunaliella*: a green alga adapted to salt. Advances in botanical research 14: 93-103.
- Kindle, K.L. (1990) High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas-reinhardtii*. Proc. Natl. Acad. Sci USA 87: 1228-1232.
- Lers, A., Bienr, Y. and Zamir, A. (1990) Photoinduction of massive β -carotene accumulation by the alga *Dunaliella bardawil*. Plant physiol. 93: 389-395.
- Shimogawara K., Fujiwara, S., Grossman, A. and Usuda, H. (1998) High-efficiency transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation. Genetics 148: 1821-1828.
- Stevens, D.R., Atteia, A., Franzen, L.G. and Purton, S. (2001) Cycloheximide resistance conferred by novel mutations in ribosomal protein L41 of *Chlamydomonas reinhardtii*. Mol. Gen. Genet. 264: 790-795.
- Stevens, D.R., Rochaix, J.D. and Purton, S. (1996) The bacterial phleomycin resistance gene *ble* as a dominant selectable marker in *Chlamydomonas*. Mol. Gen. Genet. 251: 23-30.
- Zamir, A. (1995) Plant defenses against excessive light studied in the microalga *Dunaliella*. Endeavour. 19: 152-156.
- Zaslavskaja, L.A., Lippmeier, J.C., Kroth, P.G., Grossman, A.R. and Apt, K.E. (2000) Transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) with a variety of selectable marker and reporter genes. J. Phycol. 36: 379-386.