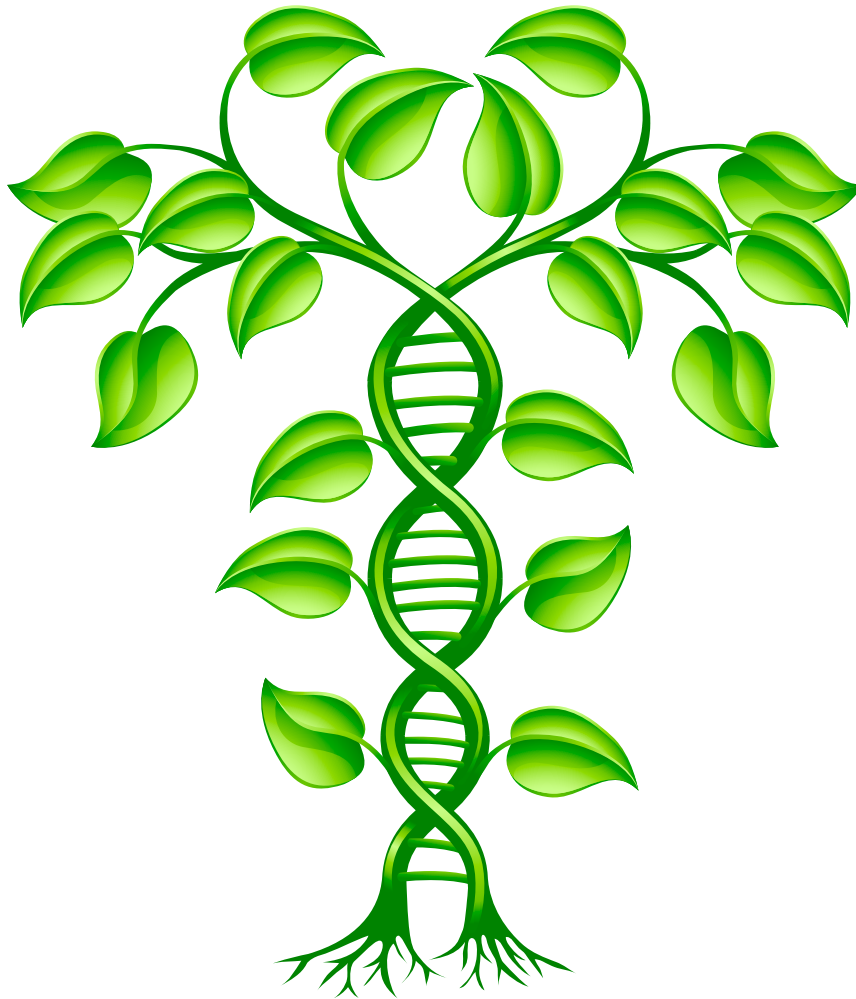


חיסון - הדור הבא: פיתוח צמחי מאכל מהונדסים גנטית המעוררים תגובה חיסונית לכולרה ולמלריה



עובד על פי המאמר:

Chloroplast-derived vaccine antigens confer dual immunity against cholera and malaria by oral or by injectable delivery

מאת דוודי-סמירומי וחוקרים נוספים מקבוצת המחקר של דניאל מאוניברסיטת מרכז פלורידה, אורלנדו, ארה"ב.

Davoodi-Semiromi, A., Schreiber, M., Nalapalli, S., Verma, D., Singh, N. D., Banks, R. K., Chakrabarti, D., and Daniell, H. (2010). *Plant Biotechnology Journal*, 8, 223-242.



מאמר מחקרי מעובד כחלק מספר הלימוד: מאלפי הגנים - קובץ מחקרים בביוטכנולוגיה
Gene Tamers – Studying Biotechnology Through Research, 2005
הדה פלק, יעל פיונטקביץ, גילת בריל, אילת ברעם-צברי, ענת ירדן

פיתוח ועיבוד:
גליה זר כבוד
כרופ' ענת ירדן

ייעוץ אקדמי:
כרופ' צח אדם

קראו והעירו:
רותי מנדלוביץ, דר' הדס גלברט, דר' יוסי מחלוף, דר' גילת בריל, רונית רוזנשיין, דינה ברטוב, ירדנה דוד

עריכה ועימוד:
אבי טל

גרפיקה ממוחשבת:
זיו אריאלי

עריכה לשונית:
נדין קלברמן

גרסה אלקטרונית למאמר באתר המלווה לספר:
<http://stwww.weizmann.ac.il/g-bio/biotech/maamarim.html>

תודה לכל המורים שהתנסו בהוראת המאמר בשנה"ל תשע"ג, פתחו לפנינו את כיתותיהם, שיתפו אותנו בחומרים שהכינו, העירו ותרמו: **דליה אורן, יעל בר-ציון, נילי גילוני, נורית האן, פרחי וקסמן, רות ורון, נירה חרמוני, כרמלה יגב, רומי ישראלי, רינה ליברמן, סיון לייבושור-אוקנין, שלמה לימון, גילה מאיר-לביא, נחמי סגל, עינת פילר, יעל פינגולד, נעמי ריבשטיין, ולי שטיינהרט, נורית שיזף, רונית שיר-שלו, דפנה תרסי-צוק.**

אין לשכפל, להעתיק, לצלם, להקליט, לתרגם, לאחסן במאגר מידע, לשדר או לקלוט בכל דרך או אמצעי אלקטרוני, אופטי או מכני או אחר כל חלק שהוא מהחומר שבספר זה. שימוש מסחרי מכל סוג שהוא בחומר הכלול בספר זה אסור בהחלט אלא ברשות מפורשת בכתב מהמוציא לאור.

©
כל הזכויות שמורות
משרד החינוך
2013

חיסון - הדור הבא: פיתוח צמחי מאכל מהונדסים גנטית המבטאים חיסון משולב לכולרה ולמלריה

תמצית

כולרה ומלריה הן שתי מחלות זיהומיות קשות הגורמות לתמותה גבוהה. החיסון היחיד הקיים למחלת הכולרה אינו מספק הגנה מלאה לאורך זמן, ועלות ייצורו גבוהה, בעוד שלמחלת המלריה לא קיים חיסון כלל. במחקר זה אנו מתארים פיתוח **חיסון אכיל** משולב לשתי המחלות. החיסון האכיל שפותח מבוסס על צמחי טבק וחסה מהונדסים גנטית. הצמחים המהונדסים מבטאים בכלורופלסטים שלהם חלבון מוידק הגורם למחלת הכולרה, מאוחה לחלבון מטפיל חד-תאי בשם פלסמודיום הגורם למחלת המלריה. לשם יצירת החיסון, האזור המבני של גן המקודד לתת-היחידה B של **רעלן** הכולרה חובר לאזור המבני של גן המקודד לחלבון מטפיל המלריה. אל האזורים המבניים הוצמדו אזורי בקרת תחילת תעתוק וסיום תעתוק, שבדדו מגן המתבטא רק בכלורופלסטים של טבק או של חסה. באופן זה יצרנו **אנטיגן** חדש שהוא **חלבון מאוחה** המורכב מחלבון מוידק הכולרה ומחלבון מטפיל המלריה. אנטיגן חדש זה בוטא ברמה של כ-10% מכלל החלבונים המסיסים בתא בצמחי טבק וכ-6% בחסה. בעכברים שאכלו עלים של הצמחים המהונדסים נוצרו נוגדנים ייחודיים כנגד חלבוני הכולרה והמלריה. נוגדנים אלו הגנו על העכברים מפני רעלן הכולרה ומנעו את כניסת טפיל המלריה לתאי דם אדומים. יצירת חיסון משולב למחלות הקשות כולרה ומלריה בכלורופלסטים של צמחי טבק וחסה מעודדת וייתכן שבדרך זו ניתן יהיה בעתיד ליצור חיסונים משולבים אכילים נוספים בעלויות נמוכות למחלות רבות אחרות.

מבוא

כולרה היא מחלה זיהומית קשה, הגובה 100,000-150,000 קורבנות מדי שנה בכל העולם. המחלה נגרמת על ידי החיידק *Vibrio cholerae*. חיידק זה מפריש רעלן (הנקרא *Cholera Toxin* או בקיצור CT), המורכב משתי תתי-יחידות A ו-B (וסימון CTA ו-CTB, בהתאמה). תת-היחידה A גורמת להפרשת נוזלים רבה אל המעי ולשלשולים, בעוד שתת-היחידה B נקשרת אל קולטן ייחודי על פני קרום תאי המעי ובכך מאפשרת לתת-היחידה A לחדור אל התא ולפגוע בו. תת-היחידה B אינה גורמת לסימני המחלה, אך היא מסוגלת לעורר תגובה חיסונית. לכן, תת-היחידה B מהווה אנטיגן אידיאלי ליצירת חיסון אכיל למחלת הכולרה. מלריה גם היא מחלה זיהומית קשה והיא אחד מגורמי

המוות העיקריים בעולם כיום. המלריה נפוצה בעיקר באזורים טרופיים ביותר מ-100 מדינות. חצי מיליארד חולים במלריה בשנה ויותר ממיליון מתים מדי שנה, רובם מאפריקה. מחלת המלריה נגרמת על ידי הטפיל החד-תאי פלסמודיום (*Plasmodium*), הנמצא ברוק של נקבת יתוש האנופלס (*Anopheles*). הטפיל חודר לגוף האדם בעת העקיצה, לתאי הדם האדומים, מתרבה בהם, משתחרר לדם ומפוצץ את התאים, וחוזר חלילה. החלבון MSP1 (Merozoite surface protein-1), נמצא על פני קרום התא של הטפיל והוא נחוץ, ככל הנראה, לחדירת הטפיל לתאי הדם האדומים.

חיסון יעיל הוא חיסון המספק הגנה מלאה לאורך זמן. למרות ניסיונות רבים שנעשו לפיתוח חיסון יעיל כנגד כל אחת מהמחלות המתוארות, למחלת המלריה אין עדיין חיסון, בעוד שהחיסון הקיים כיום למחלת הכולרה מגן על

1. **חיסון אכיל**: חיסון פעיל המבוסס על מזון מהונדס גנטית. גן המקודד לאנטיגן מהונדס גנטית לצמח אכיל. האנטיגן מעורר תגובה חיסונית בגוף היצור בעקבות אכילת הצמח המהונדס.
2. **רעלן** (בלועזית טוקסין): חומר רעיל, המיוצר על-ידי יצורים חיים.
3. **אנטיגן**: מולקולה המעוררת תגובה חיסונית שגורמת ליצירת נוגדנים, האנטיגן הוא בדרך כלל חלבון.
4. **חלבון מאוחה**: חלבון המתקבל מביטוי של גן מאוחה, אשר נוצר על ידי חיבור של רצפים של שני גנים (או יותר) בשיטות של הנדסה גנטית.



ילדים מפני הדבקה למשך שלוש שנים בלבד ואינו מגן על מבוגרים באופן מלא. אחד ההסברים האפשריים לקושי בפיתוח חיסון יעיל הוא רמת תגובה נמוכה של מערכת החיסון באדם כנגד האנטיגנים המעורבים בהתפתחות המחלות. אחת האסטרטגיות המוכרות שבהן מנסים להגביר את כמות הנוגדנים שנוצרת היא חיבור האנטיגן לנשא אימונולוגי⁵ המשתתף בהפעלת התגובה החיסונית. אף על פי כן, ניסיונות שנעשו בעבר לחבר אנטיגן של מלריה לנשאים אימונולוגיים שונים לא הצליחו להעלות את רמת התגובה החיסונית כנגד האנטיגן.

גם ההצלחה בפיתוח חיסונים יעילים הניתנים בשיטות מסורתיות של הזרקה מתחת לעור, אינה מבטיחה את פתרון הבעיה. חיסון כזה עלול להיות יקר עבור אוכלוסיית אפריקה הענייה, שהיא הנפגעת העיקרית ממחלות הכולרה והמלריה. עלות החיסון הגבוהה נובעת משיטת הייצור הקיימת כיום, הכוללת תהליכי תסיסה, טיהור, אחסון והובלה יקרים. מכאן שקיים צורך ממשי ביצירת חיסון זול ועמיד לשתי מחלות קשות אלו. אחת הדרכים ליצור חיסון שעלותו נמוכה היא יצירת חיסון אכיל על ידי שיבוט הגן המקודד לאנטיגן בצמחים. יצירת חיסון משולב לשתי המחלות עשוי להיות יעיל אף יותר.

לאחרונה נעשו מספר ניסיונות ליצירת חיסון אכיל בצמחים על ידי החדרת גנים לתא הצמחי ושילובם בגנום גרעין התא. הבעיה העיקרית בניסיונות אלו הייתה רמת ביטוי נמוכה של החלבונים המהונדסים בתא (0.02%-0.5% מכלל החלבונים המסיסים בתא). חיסרון נוסף בשילוב גנים בגנום גרעין התא הוא הסכנה האקולוגית הטמונה במעבר גנים מהצמחים המהונדסים לצמחים הלא מהונדסים. החדרת גנים ושילובם בגנום הכלורופלסט⁶ הצמחי יכולה להוות פתרון לשתי בעיות אלו, מכיוון שבכל תא צמח יש כמה מאות כלורופלסטים ובכל כלורופלסט מספר רב של מולקולות DNA כלורופלסטי, דבר המביא להגברה ברמת הביטוי. בנוסף לכך ביטוי הגנים בכלורופלסטים מבטיח

שהגנים המהונדסים לא ימצאו בגרגרי האבקה ובכך מקטין את הסיכון של מעבר DNA דרך גרגרי האבקה מצמחים מהונדסים לצמחים אחרים שאינם מהונדסים. יתרון נוסף בביטוי גנים בכלורופלסט הוא אופיו הפרוקריוטי של הכלורופלסט, המאפשר ביטוי של גנים מרובים תחת בקרה משותפת.

בעבודה זו שאלנו: האם ניתן לייצר חיסון אכיל משולב יעיל כנגד מחלת הכולרה ומחלת המלריה? גישת המחקר שבה נקטנו כדי לענות על שאלה זו היא יצירת צמחי טבק וחסה מהונדסים, המבטאים בכלורופלסט אנטיגן משולב⁷ המקודד על ידי שני גנים מאוחים זה לזה: הגן המקודד לתת-יחידה B של רעלן הכולרה (CTB) והגן המקודד לחלבון המלריה (MSP1). עכברים שהואכלו בצמחים המהונדסים שימשו לבדיקת התגובה החיסונית כנגד חשיפה לרעלן הכולרה וכנגד חשיפה לטפיל המלריה.

שיטות וחומרים

אורגניזמים

במחקר זה נעשה שימוש בשני מיני צמחים מהונדסים: צמחי טבק וצמחי חסה. אל גנום הכלורופלסט של שני מיני הצמחים הוחדרו שני גנים מאוחים זה לזה: גן המקודד לרעלן הכולרה (CTB) וגן המקודד לחלבון המלריה (MSP1). צמחי טבק וצמחי חסה לא מהונדסים שימשו כבקרה.

מהלך העבודה

על מנת לבדוק יצירת חיסון כנגד כולרה ומלריה, הואכלו עכברים בצמחי הטבק המהונדסים. עלי טבק מהונדסים, המבטאים את שני חלבוני הכולרה והמלריה, נכתשו והומסו וניתנו לעכברים למאכל. כבקרה שימשה קבוצת עכברים נוספת שהואכלה בעלי טבק לא מהונדסים. בכל

5. נשא אימונולוגי: מולקולה המחוברת לאנטיגן המסייעת להגברת התגובה הייחודית של מערכת החיסון כנגד האנטיגן אך בעצמה אינה מעוררת תגובה חיסונית.

6. כלורופלסט: אברון בתאים ירוקים, המכיל כלורופיל ומתבצע בו תהליך פוטוסינתזה. ההשערה המקובלת היא שמוצא הכלורופלסט הוא בחיידק פוטוסינתטי שחדר לתא הצמחי והקנה לתא את היכולת לבצע פוטוסינתזה. הכלורופלסט מכיל חומר תורשתי ייחודי, בעל כושר שכפול עצמי - הגנום הכלורופלסטי - שהמוצא שלו הוא פרוקריוטי.

7. אנטיגן משולב: אנטיגן הנוצר מאיחוי של שני אנטיגנים שונים (זוהי דוגמה לחלבון מאוחה).



האזור המבני הנדוס של גנים מרובים בגנום הכלורופלסט, תחת אזור בקרה אחד, מתאפשר עקב אופיו הפרוקריוטי של הכלורופלסט. עקב כך, ה-DNA המהונדס נקרא "אופרון החיסון". אזורי הבקרה להתחלת התעתוק ולסיומו, שמקורם בכלורופלסט, מבטיחים ש"אופרון החיסון" והגן לעמידות יתבטאו אך ורק בכלורופלסט ולא בגרעין. כנשא⁸ ל-DNA המהונדס שימש פלסמיד המכיל רצפים מגוונים הכלורופלסט, המאפשרים השתלבות של ה-DNA המהונדס בגנום הכלורופלסט לאחר חדירתו לתא הצמח ולכלורופלסט.

2. החדרת ה-DNA המהונדס לצמחים

החדרת ה-DNA המהונדס לכלורופלסט של צמחי טבק וחסה התבצעה באמצעות "הפגזה ביוליסטית". ביוליסטיקה משמשת להחדרת DNA לתאים של צמחים באמצעות מכשיר המכונה "תותח גנים". מכינים כדורי מתכת בקוטר 1 מיקרומטר ומצפים אותם בנושא המכיל את ה-DNA המהונדס. את כדורי המתכת המצופים מכניסים לקנה "תותח הגנים" ומפגיזים את התאים ממרחק קצר (9 ס"מ) ובמהירות גבוהה. כתוצאה מההפגזה חלק מהכדורים נכנסים לתאים וחלקם חודרים לאברוני התא, בין השאר לכלורופלסטים (איור 2).

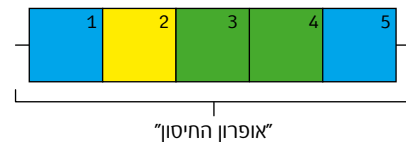
בסביבה המימית שבתא מולקולות ה-DNA המהונדס ניתקות מהכדורים. חלק מהן משתלבות בגנום הכלורופלסטים וחלק בגנום הגרעין. בגלל שאזורי הבקרה על שלבי ההתחלה והסיום של תעתוק ה-DNA המהונדס הם "יחודיים" לכלורופלסט, ה-DNA המהונדס יתבטא רק מגוון הכלורופלסט ולא יהיה ביטוי שלו אם הוא חדר לגנום גרעין התא והשתלב בו.

קבוצת ניסוי היו 10 עכברים. העכברים הואכלו בצמחים המהונדסים 10 פעמים במשך כ-300 ימי הניסוי. לאחר מתן מנת החיסון האחרונה, נחשפו העכברים לגורמי המחלה (רעלן הכולרה או טפיל הפלסמודיום) ונבדקה התגובה החיסונית למחלה.

יצירת תאי צמח מהונדסים גנטית

1. הכנת ה-DNA המהונדס - "אופרון⁸ החיסון"

השלב הראשון ביצירת ה-DNA המהונדס (איור 1) היה בידוד האזור המבני של שני הגנים המקודדים לחלבון הכולרה (CTB) ולחלבון המלריה (MSP1) וחיבורם זה לזה לשם קבלת חלבון מאוחה (שהוא האנטיגן המשולב CTB-MSP1).



1. איזור בקרה להתחלת התעתוק שמקורו בגנום הכלורופלסט של החסה או הטבק
2. גן לעמידות לאנטיביוטיקה
3. גן לתת יחידה B של רעלן הכולרה
4. גן לחלבון MSP1 ממלריה
5. אזור בקרה לסיום התעתוק שמקורו בגנום הכלורופלסט של החסה או הטבק

איור 1: "אופרון החיסון" לכולרה ומלריה

אל הגנים המאוחים ואזורי הבקרה שלהם חובר גן בורר המקנה עמידות לאנטיביוטיקה ספקטינומיצין ומאפשר לזהות את התאים המהונדסים. בשלב הבא חוברו לאזור המבני של הגנים המאוחים אזורי בקרת תעתוק שבודדו מגן ייחודי לכלורופלסט של הטבק או החסה: אזור בקרת תעתוק חובר לפני האזור המבני של הגנים המאוחים, ומקטע DNA המורה על הפסקת התעתוק חובר בסיום

8. אופרון: מקטע DNA המכיל מספר גנים סמוכים זה לזה המקודדים לחלבונים שונים, אשר תעתוקם מבוקר באופן משותף. נמצא בעיקר ביצורים פרוקריוטים. "אופרון החיסון" המתואר כאן מתאר מקרה יוצא דופן שבו האזורים המבניים של שני הגנים מחוברים ומקודדים לחלבון אחד מאוחה.

9. נשא: אמצעי להעברת קטעי DNA לתוך תאים, נשא יכול להיות למשל פלסמיד או נגיף.



קביעת רמת הביטוי של החלבון המאוחה

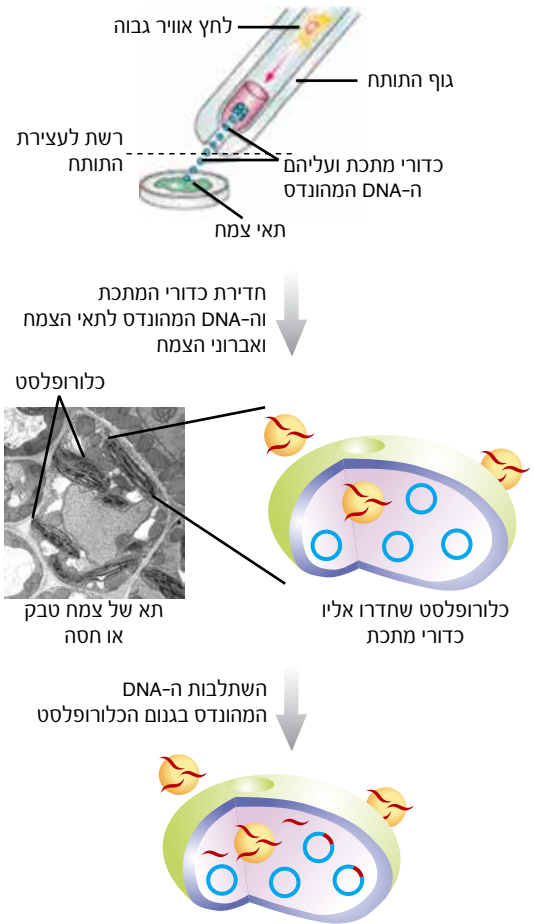
בדיקת רמת הביטוי של חלבון הכולרה והמלריה המאוחה במיצוי מעלים של צמחי חסה וטבק מהונדסים מתבצעת באמצעות שיטת ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). שיטה זו מאפשרת גילוי נוכחותם של חלבונים מסוימים בדוגמה (כמו הורמונים, אנזימים, רעלנים ועוד) וקביעת כמותם. שיטה זו מורכבת מארבעה שלבים עיקריים: ציפוי באריות בנוגדנים לוכדים, הוספת דוגמה המכילה את החלבון הנבדק, חשיפה לנוגדן שני המחובר לאנזים ותגובת צבע בהוספת סובסטרט מתאים. בין השלבים הללו שוטפים מרכיבים שלא נקשרו, כפי שיוסבר בהמשך (ראה איור 3).

מכיוון שחלבון המלריה MSP1 מאוחה לחלבון הכולרה CTB, שימוש בנוגדן כנגד חלבון הכולרה יצביע גם על רמת הביטוי של חלבון המלריה, ואין צורך להשתמש בנוגדן ייחודי נוסף כנגד חלבון המלריה. כלומר, לשם קביעת רמת הביטוי של החלבון המאוחה (CTB-MSP1) מצפים את הבאריות בנוגדן כנגד CTB בלבד. קביעת רמת הביטוי של החלבון המאוחה נעשית על פי השלבים הבאים:

א. הכנת עקומת כויל - לבאריות המצופות נוגדן כנגד CTB מוסיפים כמויות ידועות של החלבון CTB. לבאריות אלו מוסיפים נוגדן שני, שאליו צמוד אנזים, היוצר תגובת צבע בנוכחות סובסטרט מתאים ולכן נקרא נוגדן מוגלה. לאחר הוספת הסובסטרט בודקים את עוצמת הצבע בבאריות השונות באמצעות ספקטרופוטומטר. עוצמת הצבע היא יחסית לכמות החלבון CTB המצוי בתמיסה. ניתן לבנות עקומה המבטאת את עוצמת הצבע כתלות בריכוז החלבון.

ב. קביעת כמות החלבון המאוחה – כלל החלבונים המסיסים (ובניהם החלבון המאוחה) ממוצים מהעלים של צמחי החסה והטבק מהונדסים. דוגמאות המיצוי מוספות לבאריות המצופות בנוגדן כנגד CTB. על ידי השוואת עוצמת הצבע המתקבלת לעוצמת הצבע השונות שהתקבלו בעקומת הכויל, ניתן לקבוע את כמות החלבון המאוחה במיצוי.

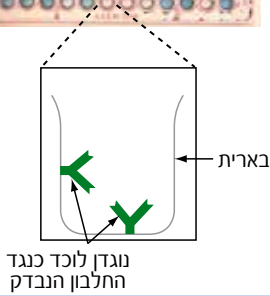
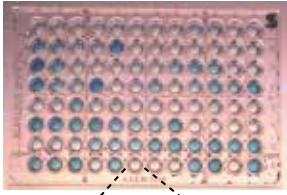
ג. חישוב אחוז החלבון המאוחה מכלל החלבונים



איור 2: תיאור סכמתי של החדרת ה-DNA המהונדס לתוך כלורופלסט של צמח טבק או חסה על ידי הפגזה ביוליסטית

3. בידוד תאי צמח המכילים את ה-DNA המהונדס וגידולם

כדי לברור את התאים שקלטו את ה-DNA המהונדס בכלורופלסטים, מגדלים את התאים בתנאים סטריליים בנוכחות האנטיביוטיקה ספקטינומיצין. אנטיביוטיקה זו מונעת סינתזה של חלבונים בכלורופלסט, על ידי עיכוב פעולת הריבוזום, ולכן מונעת את התפתחות הצמחים שאינם מהונדסים. כלומר, רק צמחים מהונדסים שמבטאים את הגן המקנה עמידות לאנטיביוטיקה זו, יוכלו לגדול ולהתפתח בנוכחותה. מאחר שהגן המקנה עמידות לאנטיביוטיקה הוחדר לנשא כך שיבוטא על ידי אזור בקרה ייחודי לכלורופלסט, רק תאים שקלטו את ה-DNA המהונדס בכלורופלסטים יפתחו לצמח שלם בנוכחות האנטיביוטיקה.



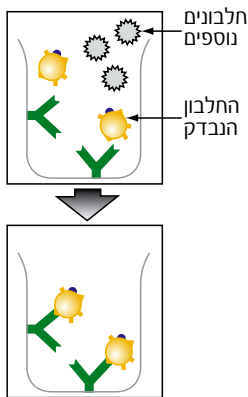
לצורך הבדיקה משתמשים בלוח המכיל שורות של שקעים זעירים או באריות.

1. ציפוי הבאריות בנוגדנים לוכדים

מכניסים לתוך כל בארית תמיסה המכילה נוגדנים שנקשרים באופן ייחודי לחלבון שאת כמותו מעוניינים לבדוק. אלה הנוגדנים הלוכדים. הנוגדנים נצמדים לדפנות הבארית, כך שכל בארית מכילה מספר רב של נוגדנים המצפים את הדפנות. בסוף שלב זה שוטפים את הנוגדנים שלא נקשרו לדפנות.

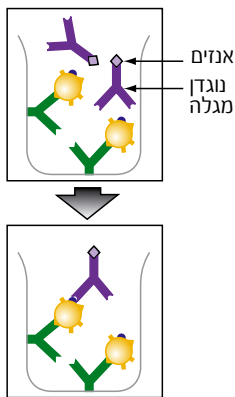
2. הוספת דוגמה המכילה את החלבון הנבדק

מוסיפים דוגמה המכילה תערובת חלבונים. החלבון הנבדק יקשר אל הנוגדנים הלוכדים. בסיום שלב זה שוטפים את עודפי החלבונים שלא נקשרו לנוגדנים הלוכדים.



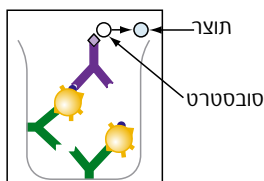
3. הוספת נוגדנים מגלים

מוסיפים לבארית נוגדנים אחרים, כנגד החלבון הנבדק. אל הנוגדנים הללו מחוברות מולקולות של אנזימים היוצרים תגובת צבע בנוכחות סובסטרט מסוים ולכן הם נקראים נוגדנים מגלים. נוגדנים אלו נקשרים לאזור אחר בחלבון הנבדק. נוצר תצמיד: נוגדן לוכד-חלבון נבדק-נוגדן מגלה. בסוף שלב זה שוטפים את עודפי הנוגדנים המגלים שלא נקשרו לחלבון הנבדק.



4. תגובת צבע

מוסיפים סובסטרט אשר מגיב עם האנזים הקשור לנוגדנים המגלים, וכתוצאה מכך צבע התמיסה משתנה. עוצמת הצבע נמצאת ביחס ישר לכמות החלבון הנבדק. אפשר להכין עקומת כיוול על-ידי בדיקת עוצמת הצבע הנוצר בנוכחות כמויות ידועות מראש של החלבון הנבדק. בעזרת עקומת כיוול כזו ניתן להעריך את כמותו של החלבון הנבדק בדוגמה.



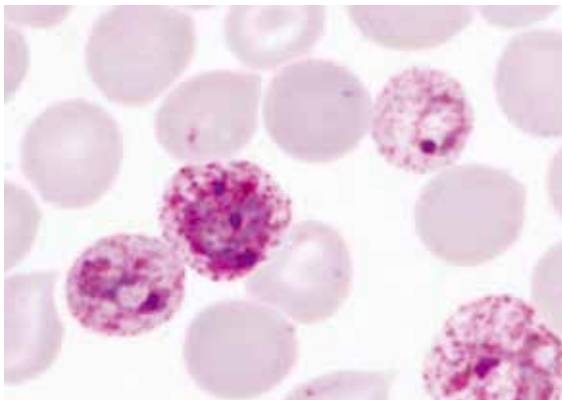
איור 3: השלבים של שיטת ELISA לקביעת ריכוז של חלבון



מדד למחלת הכולרה. לאחר החשיפה לרעלן הכולרה, שתי קבוצות העכברים (עכברים שהואכלו בצמחי טבק מהונדסים ולא מהונדסים) קיבלו מים ללא הגבלה, אך לא קיבלו מזון, במשך 14 שעות. לאחר מכן נשאבו המים ממעי העכברים ונפח המים נמדד.

בדיקת פעילות הנוגדנים כנגד MSP1

פעילותם של הנוגדנים כנגד MSP1, שנוצרו בעכברים המחוסנים, נבדקה באמצעות בדיקת יכולתם של הנוגדנים למונע את כניסת הטפיל לתאי דם אדומים. לשם כך, הודגרו תאי דם אדומים אנושיים עם **סרום** (המכיל את הנוגדנים) מהעכברים שאכלו צמחי טבק מהונדסים. הדוגמא נצבעה בצבע גימזה (Giemsa), הצובע את הטפיל פלסמודיום. בעזרת מיקרוסקופ אור נקבע אחוז התאים האדומים שהטפיל חדר אליהם (איור 4). בנוסף, בדרך זו נבדקו בניסוי מספר קבוצות בקרה, שכללו: סרום מעכברים שאכלו צמחי טבק לא מהונדסים, סרום מעכברים שלא אכלו צמחי טבק, נוגדנים מסחריים כנגד MSP1 וקבוצה נוספת ללא טיפול כלל (תאי דם + טפיל).



איור 4: צביעת גימזה המראה תאי דם אדומים נגועים בטפיל פלסמודיום (בסגול)

המסיסים - נוהגים לבטא את רמת הביטוי של חלבונים מהונדסים כאחוז מכלל החלבונים המסיסים בתא. כמות כלל החלבונים המסיסים במיצוי העלים של צמחי החסה והטבק מהונדסים נקבע באמצעות שיטת ברדפורד¹⁰. כמות החלבון המאוהה -CTB MSP1 מבוטאת כאחוז מסך כל החלבונים המסיסים בתא.

קביעת רמת הנוגדנים בדם העכברים

לאחר האכלת העכברים בצמחים מהונדסים, נלקחו דגימות דם מהעכברים על מנת לבדוק האם התרחשה תגובה חיסונית ונוצרו נוגדנים כנגד חלבוני הכולרה והמלריה (CTB ו-MSP1). רמת הנוגדנים כנגד CTB וכנגד MSP1 נבדקה בשיטת ELISA. לשם קביעת ריכוז הנוגדנים כנגד CTB ו-MSP1 בדם העכברים, הבארות צופו באנטיגנים CTB או MSP1. אל הבארות הוספו דגימות דם מהעכברים, המכילות תערובת נוגדנים הנקשרים באופן ייחודי לאנטיגנים שונים, וביניהם הנוגדנים הנקשרים לאנטיגנים CTB או MSP1. לאחר מכן, הוספו לבארות נוגדנים מגלים, כנגד הנוגדנים הנבדקים, אליהם מחובר אנזים היוצר תגובת צבע בהוספת הסובסטרט ונבדקה עוצמת הצבע שהתקבלה לאחר הוספת הסובסטרט. על מנת לקבוע את ריכוז הנוגדנים בדם העכברים, עוצמת הצבע שהתקבלה השוותה לעקומות כיוול שבוצעו באותו אופן, אך עם כמויות ידועות של האנטיגנים CTB או MSP1.

בדיקת נפח מים במעי

אחד מסימני מחלת הכולרה הוא הפרשה של נוזלים אל המעי של החולה. מדידת נפח המים במעי העכברים מהווה

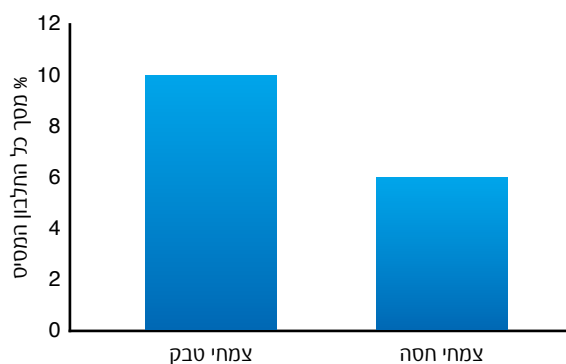
10. שיטת ברדפורד: שיטה למדידת ריכוז חלבון, המבוססת על היווצרות צבע בעקבות תגובה של חומר הצבע קומאסי עם חומצות אמינו בסיסיות. לכן שיטה זו מתאימה לזיהוי נוכחות של חלבונים, אך לא לזיהוי חלבון ייחודי מתוך כלל החלבונים.

11. סרום: נוזל הדם ללא תאי הדם וללא גורמי הקרישה. מכיל חלבונים שונים, כולל נוגדנים.

תוצאות

האנטיגן המשולב מתבטא בעלים של צמחי טבק וחסה

בדקנו באמצעות ELISA את הביטוי של תת היחידה B של רעלן הכולרה (CTB), כמדד לביטוי החלבון המאוהה CTB-MSP1. בעלים של צמחי טבק הכמות של החלבון המאוהה CTB-MSP1 היא כ-10% מכמות החלבון המסיס בתא. בצמחי חסה, כמות ה-CTB-MSP1 היא כ-6% מסך כל החלבון המסיס בתא (גרף 1).



גרף 1: ריכוז החלבון CTB-MSP1 בעלים של צמחי טבק וחסה מהונדסים כפי שנקבע בעזרת ELISA

התגובה החיסונית לכולרה בעכברים

לאחר שקיבלנו צמחי טבק מהונדסים ווידאנו כי הם מבטאים את החלבון CTB, ביצענו ניסויים שבהם עכברים חוסנו כנגד מחלת הכולרה על ידי האכלתם בעלים של צמחי הטבק המהונדסים. הצלחת החיסון נבדקה על ידי חשיפת העכברים לרעלן הכולרה ובדיקת רמת הנוגדנים הייחודיים כנגד CTB בדמום של העכברים המחוסנים לאחר החשיפה באמצעות שיטת ELISA, וכן על ידי בדיקת נפח המים במעי העכברים.

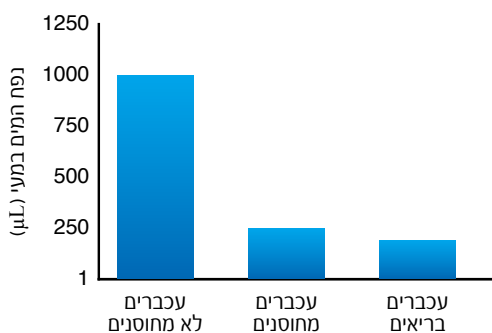
נוכחות נוגדנים כנגד CTB בדם עכברים שונים

בדקנו בשיטת ELISA את נוכחות הנוגדנים הייחודיים כנגד CTB בדמום של העכברים לאחר 10 האכלות בצמחי טבק מהונדסים.

מצאנו כי בקבוצת העכברים שהואכלו על ידי צמחי הטבק המהונדסים נוצרו נוגדנים ייחודיים כנגד CTB, בריכוז של 4000 יחידות שרירותיות, ואילו בקבוצת הבקרה (עכברים שהואכלו בצמחים לא מהונדסים) לא נוצרו נוגדנים.

נפח מים קטן במעי העכברים שאכלו עלים מהונדסים

אחד מסימני מחלת הכולרה הוא הפרשה של נוזלים אל המעי של החולה. על מנת לבדוק אם העכברים שהואכלו על ידי צמחי הטבק המהונדסים מחוסנים למחלת הכולרה, בדקנו את נפח המים במעי העכברים לאחר חשיפתם לרעלן הכולרה (גרף 2).



גרף 2: נפח המים במעי העכברים

ניתן לראות כי נפח המים במעי העכברים המחוסנים (עכברים שאכלו צמחי טבק מהונדסים) היה קטן בהרבה מנפח המים במעי העכברים הלא מחוסנים (עכברים שאכלו צמחי טבק לא מהונדסים) ודומה לנפח המים בעכברים בריאים (שלא נחשפו לרעלן הכולרה). כלומר, חלבון רעלן הכולרה בצמחי הטבק המהונדסים עורר את מערכת החיסון של העכברים שיצרה נוגדנים כנגד הרעלן. הנוגדנים הגנו על העכברים מפני הרעלן ומנעו את המחלה, כפי שמראה נפח המים הקטן במעי.

התגובה החיסונית למלריה בעכברים

כאמור, העכברים הואכלו בצמחי טבק מהונדסים המבטאים גם את החלבון MSP1 (מאוהה לחלבון CTB) של הטפיל פלסמודיום ובכך חוסנו העכברים גם כנגד מחלת המלריה. לצורך בדיקת הצלחת החיסון כנגד מלריה בעכברים, בדקנו באמצעות שיטת ELISA את

שלא אכלו עלים כלל לא מנעו את כניסת הטפיל אל תאי הדם האדומים. כלומר, הנוגדנים כנגד MSP1, שנוצרו על ידי מערכת החיסון של העכברים בעקבות אכילת צמחי הטבק המהונדסים, היו פעילים והצליחו למנוע את כניסת טפיל המלריה לתאי דם אדומים.

טבלה 1: מניעת כניסת הטפיל פלסמודיום לתאי דם אדומים

עיצוב יחסי (%)	מקור הנוגדנים	קבוצה	ניסוי
97.2	סרום מעכברים שהואכלו בצמחי טבק מהונדסים	1	ניסוי
100	נוגדנים מסחריים כנגד MSP1	2	בקרה
0	-	3	בקרה
14.3	סרום מעכברים שהואכלו בצמחי טבק לא מהונדסים	4	בקרה
25.7	סרום מעכברים שלא הואכלו בצמחי טבק	5	בקרה

* בכל הקבוצות, תאי דם אדומים מאדם הודגרו עם הטפיל פלסמודיום ובנוכחות/היעדרות נוגדנים על-פי המפורט בטבלה.

דיון ומסקנות

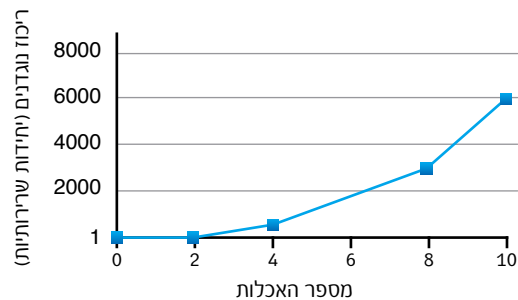
כיום לא קיים חיסון למחלת המלריה, והחיסון היחיד למחלת הכולרה יקר ויעילותו מוגבלת. על מנת לפתור בעיה זו נעשו מספר ניסיונות לפתח חיסון אכיל על ידי החדרת גנים המקודדים לאנטיגנים של כל אחת מהמחלות לתא הצמחי ושילובם בגנום המצוי בגרעין התא, אולם ניסיונות אלו נכשלו בעיקר עקב רמת ביטוי נמוכה מדי של כל אחד מהאנטיגנים, וכן עקב תגובה חיסונית נמוכה של אנטיגן טפיל המלריה בעכברים. מחקר זה מדווח לראשונה על פיתוח חיסון אכיל לכולרה ומלריה על ידי ביטוי אנטיגן משולב מגורמי שתי המחלות בכלורופלסט של צמחי טבק וחסה. תוצאות המחקר מראות ש"אופרון החיסון", הכולל גן מרעלן הכולרה מאוחה לגן מטפיל המלריה, חדר לכלורופלסט וכי הוא מתבטא בכלורופלסט. רמת הביטוי של האנטיגן המשולב גבוהה יחסית ומגיעה לפי 100 ויותר מרמתו בצמחים מהונדסים המכילים את הגנים האלה בגנום הצמחי. תוצאות המחקר מראות גם כי חשיפה לאנטיגן המשולב

רמת הנוגדנים הייחודיים כנגד MSP1 לאחר חשיפה לטפיל ואת פעילותם במניעת חדירת הטפיל לתאי דם אדומים.

רמת נוגדנים כנגד MSP1 בדם עכברים שונים

רמת הנוגדנים הייחודיים כנגד MSP1 בדמם של העכברים שהואכלו בצמחי טבק מהונדסים נבדקה בשיטת ELISA (גרף 3).

בדקנו את נוכחותם של הנוגדנים בדם העכברים בשלבים שונים של הניסוי (לאחר מספר האכלות). התוצאות מראות נוכחות של נוגדנים כנגד MSP1 בדמם של העכברים. כמו כן, ניתן לראות כי ככל שמספר ההאכלות עולה, ריכוז הנוגדנים בדמם של העכברים עולה עד לרמה של כ-6000 יח' לאחר 10 האכלות.



גרף 3: ריכוז הנוגדנים כנגד MSP1 בדם העכברים כתלות במספר האכלות כפי שנקבע בעזרת ELISA

הנוגדנים שנוצרו בעכברים מונעים כניסת טפיל המלריה לתאי דם אדומים

על מנת לבדוק האם הנוגדנים כנגד MSP1 שנוצרו בעכברים המחוסנים פעילים כנגד הטפיל פלסמודיום, בדקנו את יכולתם של הנוגדנים למנוע את כניסת הטפיל לתאי דם אדומים. בניסויים אלו הדגרנו תאי דם אדומים אנושיים עם הטפיל ועם סרום (המכיל את הנוגדנים) מהעכברים שאכלו צמחים מהונדסים (לאחר 10 האכלות) או ממספר קבוצות בקרה (טבלה 1). מצאנו כי הנוגדנים שנוצרו בעכברים המחוסנים מנעו את כניסת הטפיל אל תאי הדם האדומים ביעילות דומה לנוגדנים מסחריים ייחודיים כנגד MSP1 (97.2%-100%, בהתאמה). לעומת זאת, אי-הוספת נוגדנים, או הוספת סרום מעכברים שהואכלו בצמחי טבק לא-מהונדסים או הוספת סרום מעכברים

עוררה את מערכת החיסון בעכברים ליצירת נוגדנים לשת המחלות. עבור חיידק הכולרה הצליחו החוקרים להראות כי הנוגדנים שנוצרו הגנו על העכברים מפני הרעלן ומנעו את התפתחות המחלה. עבור טפיל המלריה הראו החוקרים כי הנוגדנים שנוצרו היו יעילים במניעת החדירה של הטפיל לתאי דם אדומים בתרבית.

רמת הביטוי הגבוהה של האנטיגן המשולב מצביעה על מספר יתרונות חשובים לשיבוט של אנטיגנים בגנום הכלורופלסט לעומת גנום הגרעין בתא הצמחי: רמת הביטוי הגבוהה התקבלה כפי הנראה מכיוון שבכל תא צמח יש כמה מאות כלורופלסטים ובכל כלורופלסט מספר רב של מולקולות DNA כלורופלסטי. יתרון נוסף נעוץ באופי הפרוקריוטי של גנום הכלורופלסט, המאפשר ביטוי של אופרון ובו מספר גנים תחת בקרה אחת. ניצול תכונה זו אפשר את יצירת החיסון המשולב לשת המחלות בצמח אחד.

מכיוון שהחיסון אכיל, קיימת חשיבות נוספת לשיבוט הגנים המקודדים לאנטיגנים בגנום הכלורופלסט לעומת שיבוטם בגנום הגרעין בתא. בחיסון מסוג זה, מערכת החיסון מופעלת על ידי האנטיגנים שנאכלים ונספגים דרך המעי אל זרם הדם. אולם רוב החלבונים המגיעים לקיבה עוברים פירוק לפני שימשיכו למעי וייספגו בזרם הדם. ביטוי חלבוני החיסון בכלורופלסטים הצמחיים הוא משמעותי במניעת פירוקם בקיבה. דפנות תאי הצמח הנוקשות מספקות הגנה ראשונית מפני החומצה שבקיבה, וקרומי הכלורופלסטים מעניקים הגנה נוספת לחלבונים. בדרך זו שורדים החלבונים את המעבר בקיבה ומצליחים להגיע למעי ומשם לזרם הדם ולמערכת החיסון.

בניגוד לחיסון לכולרה הקיים כיום, שיעילותו באדם מוגבלת לשלוש שנים בלבד, העכברים בניסוי זה הפכו מחוסנים בפני מחלת הכולרה למשך יותר מ-300 ימים, מהווים יותר ממחצית מתוחלת החיים של העכבר (שווי ערך ל-40-50 שנות אדם). רמת הנוגדנים כנגד אנטיגן המלריה עלתה אף היא לאורך זמן וככל שהחשיפה לאנטיגן עלתה. תוצאות אלו מצביעות על כך שחשיפה לאנטיגן המשולב הגבירה את התגובה החיסונית כנגד כל אחד מהאנטיגנים. אחת האסטרטגיות המוכרות שבהן מנסים להגביר

את כמות הנוגדנים שנוצרת היא חיבור האנטיגן לנשא אימונולוגי המשתתף בהפעלת התגובה החיסונית. ניסיונות שנעשו בעבר לחבר אנטיגן של מלריה לנשאים אימונולוגים שונים לא הצליחו להעלות את רמת התגובה החיסונית כנגד האנטיגן. סביר להניח כי במקרה זה רמת הביטוי הגבוהה של האנטיגן המשולב תרמה להגברת התגובה החיסונית כנגד שני האנטיגנים. אנו משערים כי המבנה המרחבי החדש שנוצר מאיחוי שני החלבונים תרם אף הוא להגברת התגובה החיסונית כנגדם. ייתכן אף כי אנטיגן הכולרה שימש כנשא אימונולוגי לאנטיגן המלריה ובכך תרם להגברת התגובה האנטיגנית כנגדו. עלייה בתגובה החיסונית כנגד אנטיגן המלריה עשויה להסביר גם את התגובה היעילה של הנוגדנים לאנטיגן המלריה במניעת חדירת הטפיל לתאי דם אדומים. אנו מתכוונים להמשיך ולבדוק את השפעת הנוגדנים למלריה במניעת חדירת הטפיל לתאי דם אדומים גם בעכברים, כפי שהראינו בתאי דם אדומים במבחנה. תוצאות המחקר מפירות תקווה כי בדומה לחיסון שנרכש בעכברים, החיסון בבני אדם, לשת המחלות כולרה ומלריה, יישמר לתקופה ארוכה.

התפוצה העולמית של מחלת המלריה עלתה בשנים האחרונות עקב פיתוח עמידות של הטפיל לתרופות, פיתוח עמידות של יתושים לחומרי הדברה, ניטור לא מספק של אזורים מוכי מלריה ועלייה ברמת התירות באזורים אלה. התפוצה העולמית של מחלת הכולרה גם היא בעלייה. הצלחת יצירת חיסון "רוק" כפול למחלות הקשות כולרה ומלריה בכלורופלסטים של צמחי טבק וחסה - שעלות ייצורם נמוכה ואחסונם והפצתם פשוטים יחסית - מספקת תקווה שבעתיד ניתן יהיה לייצר חיסונים אכילים נוספים בעלויות נמוכות למחלות אחרות. אנו רואים יתרון רב בביטוי "אופרון החיסון" בכלורופלסט של צמחי חסה ולא בכלורופלסט של צמחי טבק לשם יצירת חיסון אכיל לכולרה ומלריה. זאת מכיוון שלניקוטין שמצוי בטבק יש השפעה שלילית על האדם, לעומת עלי החסה, הניתנים כמובן למאכל אדם גם ללא בישול, היכול לפגוע בחלבונים המהונדסים. אנו מציעים להמשיך ולבדוק את השפעת ביטוי "אופרון החיסון" בצמחי החסה על חיסון העכברים, כפי שהראינו בצמחי הטבק.





1. חיסון יעיל מספק הגנה מלאה לאורך זמן.
2. אפשר לייצר חיסון אכיל יעיל על ידי שיבוט אנטיגנים מהונדסים וביטויים בכלורופלסט בתאי צמח.
3. אכילת צמחים שמבטאים אנטיגנים מהונדסים מפעילה את מערכת החיסון ומובילה ליצירת נוגדנים ייחודיים כנגד אותם האנטיגנים.
4. לחיסון אכיל, לעומת חיסון הניתן בהזרקה, עשויים להיות יתרונות מגוונים: הוא זול לייצור, אחסון והפצה, וניתן לשלב בצמח אחד חיסונים כנגד אנטיגנים שונים.
5. ניתן לאחות שני גנים נפרדים ליצירת חלבון מאוחד. החלבון שיתקבל עשוי לשמר את הפעילות של כל אחד מהחלבונים המקוריים, ובכך להוות אנטיגן משולב שיוביל להגברת התגובה החיסונית.
6. ניצול האופי הפרוקריוטי של הכלורופלסט מאפשר לאחות בין גנים המקודדים לחלבונים ממקורות שונים ולשבת אותם תחת בקרה אחת של גן המתבטא בכלורופלסט.
7. החדרת גן ושילובו בגנום הכלורופלסט, לעומת גנום התא הצמחי, עשוי להוביל להגברה ברמת הביטוי של החלבונים שהגן מקודד להם. זאת משום שבכל תא צמח יש כמה מאות כלורופלסטים.
8. החדרת גן ושילובו בגנום הכלורופלסט מבטיחים שהגן המשובט לא ימצא בגרגרי האבקה ומקטינים את הסיכון למעבר הגנים מצמחים מהונדסים לצמחים שאינם מהונדסים.
9. הכרה ייחודית בין נוגדן לחלבון משמשת בסיס לשיטות אבחון וכימות של חלבונים.
10. גישת המחקר ליצירת חיסון יעיל לאפיון פעילותו כוללת בדיקת ביטוי האנטיגן המהונדס בתאי הצמח, קביעת רמת הנוגדנים בדם לאורך זמן בעקבות השיפה לאנטיגן, וכן קביעת פעילות הנוגדנים במניעת התפתחות המחלה בעקבות השיפה לאנטיגן.





1. אילו בעיות מעוררים החיסונים הקיימים למלריה וכולרה?
2. מהם היתרונות בביטוי של גנים בכלורופלסט לעומת ביטוי בגנום התא הצמחי?
3. מהן התכונות של אנטיגן אידאלי ומדוע תת-יחידה B של חיידק הכולרה נבחרה כאנטיגן?
4. מהם החידושים שמציעה גישת המחקר המוצגת במאמר?
5. בהפגזה ביוליסטית הנשא המכיל את "אופרון החיסון" חודר באופן אקראי לחלקי התא השונים. איזה מרכיב של הנשא מבטיח שהאופרון יתבטא רק בכלורופלסטים?
6. בבניית ה-DNA המהונדס נעשה שימוש בגן המקנה עמידות כנגד סוג מסוים של אנטיביוטיקה, הפוגעת באופן ייחודי בסיתזה של חלבונים בכלורופלסט. הסבירו למה משמשת אנטיביוטיקה זו.
7. מדוע לא הסתפקו החוקרים בשיטת ברדפורד לקביעת רמת הביטוי של האנטיגן המשולב ובדקו גם באמצעות שיטת ELISA?
8. השוו בין שני ניסויי ה-ELISA שבוצעו במחקר. מה הרכיב הנבדק בכל אחד מהם? במה הם דומים ובמה הם שונים?
9. הסבירו את הצורך להשתמש במרכיבים הבאים של שיטת ה-ELISA: אנטיגן, נוגדן ראשוני, נוגדן מגלה, שטיפה אחרי הכנסת הנוגדן המגלה, סובסטרט.
10. התבוננו בגרף 2. נסחו את שאלת המחקר שהובילה לניסויים שתוצאותיהם מוצגות בגרף. כיצד ניתן להסביר את התוצאות המוצגות בגרף?
11. התבוננו בטבלה 1: נסחו את שאלת המחקר שהובילה לניסוי שתוצאותיו מוצגות בטבלה. תארו את התוצאות. הסבירו מהו תפקידה של כל אחת מהביקורות בניסוי.
12. איזה ניסוי נוסף הייתם מציעים לערוך כדי להוכיח שהנוגדנים שמנעו את חדירת הטפיל פלסמודיום לתאי דם אדומים אכן מגינים מפני התפתחות מחלת המלריה?
13. אילו תכונות של החיסון שפותח במחקר זה תורמות, לדעתכם, להגברת יעילותו?
14. אתם רוצים לפרסם בכנס את החיסון האכיל המשולב. סכמו את היתרונות של החיסון לעומת חיסונים שפותחו בעבר וכן את דרכי השימוש העתידיות בחיסון.

