מאלפי הגנים

קובץ מחקרים בביוטכנולוגיה

הדה פלק
יעל פיונטקביץ
גילת בריל
אילת ברעם-צברי
ענת ירדן

מטה מל"מ
המרכז הישראלי לחינוך מדעי טכנולוגי
ע"ש עמוס דה-שליט

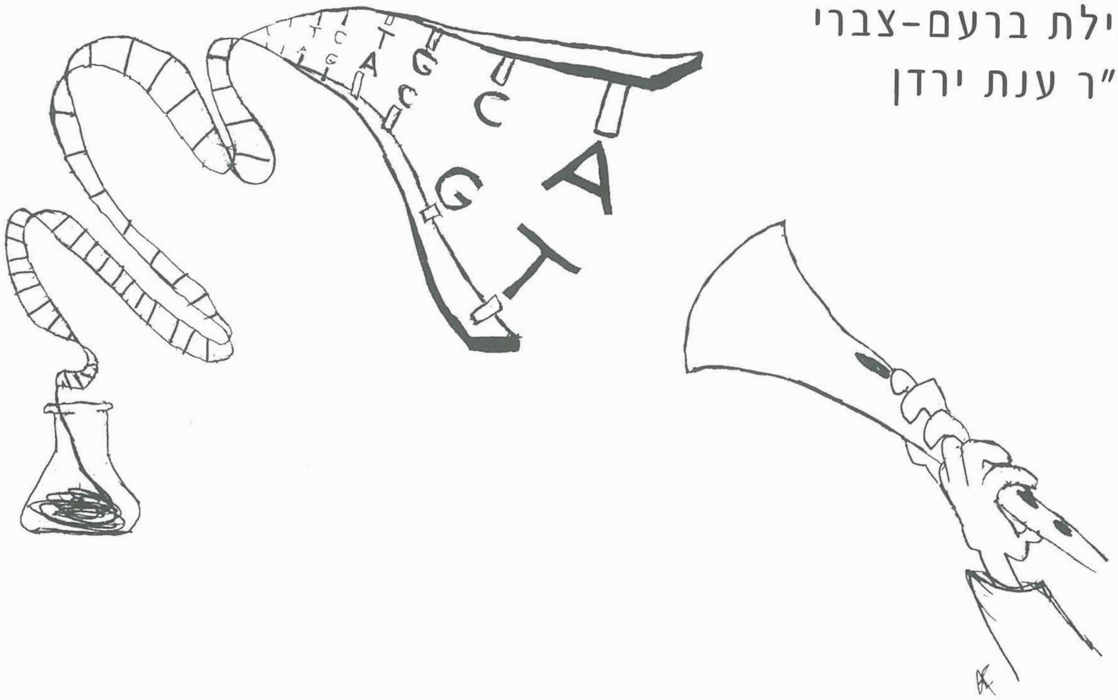
משרד החינוך, התרבות והספורט
האגף לתכנון ולפיתוח תכניות לימודים

מכון ויצמן למדע
המחלקה להוראת המדעים

מאלפי הגנים

קובץ מחקרים בביוטכנולוגיה

ד"ר הדה פלק
ד"ר יעל פיונטקביץ
ד"ר גילת בריל
אילת ברעם-צברי
ד"ר ענת ירדן



אתר מלווה לספר: http://stwww.weizmann.ac.il/g-bio/biotech

גף אישור ספרי לימוד
באישור
משרד החינוך התרבות והספורט
אישור מס' נ/4088
אושר בתאריך 7 יוני 2004

מכון ויצמן למדע
המחלקה להוראת המדעים

יוצא לאור במסגרת
מטה מל"מ, המרכז הישראלי לחינוך מדעי טכנולוגי ע"ש עמוס דה-שליט
משרד החינוך, התרבות והספורט, האגף לתכנון ולפיתוח תכניות לימודים

Gene Tamers – Studying Biotechnology Through Research

ייעוץ אקדמי:

פרופ' צח אדם (צמחים מהונדסים)

פרופ' זליג אשחר (ריפוי גני)

פרופ' שמשון בלקין (חיישנים ביולוגיים)

פרופ' דוד גבעול (מבנית מבוא)

קראו והעירו:

פרופ' יונתן גרסל (צמחים מהונדסים)

פרופ' צבי זקס

פרופ' עודד ירדן (מבנית מבוא)

פרופ' אפרים קציר

פרופ' נתן שרון

ד"ר נעה אבולעפיה, ד"ר ברוריה אגרסט, אילנה אדר, שרה ורטהיימר, רותי מנדלוביץ, מאשה צ'אושו, ד"ר מיכל ציון

עריכה ועימוד במחשב:

ציפי עובדיה

גרפיקה ממוחשבת:

טלי וייזל

טליה מלול

עריכה לשונית:

נדין קלברמן

עיצוב והפקה:

טליה מלול

תודה מיוחדת ל**אבשלום פלק** על הקריקטורות שמלוות את הספר.

תודה לכל המורים שהתנסו בהוראת המהדורה הקודמת, פתחו לפנינו את כיתותיהם, שיתפו אותנו בחומרים שהכינו, העירו ותרמו: **יהודית אופיר, דליה אורן, שגיא בן-בסט, מיקי גוטמן, אדל ג'יסלן, ירדנה דוד, אבשלום דרמון, נורית האן, מאיר ויסברד, רוית ורון, עתי יפה, אסתר כהן, יונה כהן, תמר יוספוב, רומי ישראלי, חיה לוי, אורית לם, גילה מאיר, רבקה נויבאור, מיכאל פרידלנדר, תמי צור, פרננד קירנברג, חגית קליין, עליזה רוזן, רונית רוזנשיין, נעמי ריבשטיין, נורית שיזף, רונית שלו, מאשה שפי.**

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 מהמו"ל.

©
כל הזכויות שמורות
משרד החינוך
הודפס בישראל יוני 2005
דפוס מאירי בע"מ

תוכן עניינים

מבנית מבוא 5

פרק א – תולדות ימי הביוטכנולוגיה 6

א1 – מהי ביוטכנולוגיה? 6

א2 – ביוטכנולוגיה מסורתית 7

א3 – ביוטכנולוגיה מבוססת על הנדסה גנטית – סיפור מקרה האריתרופויטין 8

פרק ב - שיבוט גנים בחיידקים ובתרביות תאים 14

ב1 – שבירת מחסום המינים 14

ב2 – מבנה החומר התורשתי ותפקודו 15

ב3 – יצירת DNA מהונדס וביטויו בחיידקים 20

ב4 – ביטוי DNA מהונדס בתרביות תאים של בעלי חיים 31

פרק ג - יצירת אורגניזמים מהונדסים: צמחים ובעלי חיים 33

ג1 - יצירת צמחים מהונדסים 33

ג2 - יצירת בעלי חיים מהונדסים (הרחבה) 46

פרק ד - תרומת הביוטכנולוגיה לקידום הרפואה 49

ד1 – אבחון מחלות תורשתיות 49

ד2 – שיטת ה-PCR עוזרת לאיתור מוטציות הגורמות למחלות תורשתיות 50

ד3 – ריפוי גני 54

ד4 – תאי גזע כדרך להחלפת רקמות (הרחבה) 55

קובץ מחקרים 57

פיתוח חיישן ביולוגי לאיתור חומרים הפוגעים בחומר התורשתי 59

ביטוי רעלן של חיידק ה-Bt בכלורופלסטים של צמחי טבק מקנה לצמחים עמידות נגד חרקים 69

טיפול במחלה ADA-SCID על-ידי ריפוי גני של תאי גזע ממוח העצם 81

מילון מונחים 91

מקורות לתמונות, איורים וגרפים 98

אינדקס 101

מבנית
מבוא

פרק א – תולדות ימי הביוטכנולוגיה

א1 – מהי ביוטכנולוגיה?

מה משותף לבצק שמרים, אבקת כביסה, יין, בירה, חיסון נגד צהבת, חשמל מזבל פרות, קביעת אבהות ותרופה מסוימת נגד סרטן?

התשובה קצרה: בתהליך הייצור של כולם מעורבים תהליכים ביוטכנולוגיים.

ביוטכנולוגיה הוא תחום העוסק ביישום תהליכים ביולוגיים לשירות האדם. בצק שמרים ומשקאות אלכוהוליים מכינים תוך ניצול תהליכי נשימה ותסיסה המתרחשים בשמרים, חשמל ניתן להפיק באמצעות חיידקים מפרקים המצויים בשפע בזבל פרות, ואבקות כביסה מסוימות מכילות אנזימים מפרקי שומנים והלבונים. קביעת אבהות מבצעים על ידי השוואה בין רצפי ה-DNA של הילד ושל ההורים, חיסון חדיש נגד צהבת ותרופות מסוימות נגד סרטן מייצרים בשיטות של הנדסה גנטית.

למושג ביוטכנולוגיה מגוון רב של משמעויות והקשרים. לראשונה השתמשו במושג זה ב-1917 כדי לתאר תהליכים שעשו שימוש באורגניזמים חיים, כמו תהליכים תעשייתיים המבוססים על תסיסה באמצעות מיקרואורגניזמים. הרחבה של המושג כוללת גם את החקלאות מראשיתה וביות חיות המשק. בספרו "עקרונות בביוטכנולוגיה"[1] הגדיר פרופ' עמיחי פרימן ביוטכנולוגיה כ"תורה העוסקת בניצול מערכות ביולוגיות, ברמה תאית או מולקולרית, לייצור או לאנליזה בתעשייה, ברפואה ובחקלאות." ביוטכנולוגיה היא תחום המשלב ידע מתחומים רבים, כמו: כימיה, ביוכימיה, ביולוגיה, הנדסה, מיקרוביולוגיה, גנטיקה אימונולוגיה, מדעי המחשב ואלקטרוניקה.

מדענים עוסקים במחקר בסיסי שתוצאותיו יכולים להניב בשלב מאוחר יותר מוצר ביוטכנולוגי; אנשי ייצור מפיקים את המוצר ובודקים את תקינותו; אנשי עסקים וכלכלנים משקיעים, מספקים את המימון ושוקלים רווחים אפשריים; רופאים ורוקחים משתתפים בניסויים בתרופות חדשות ועורכי דין עוסקים ברישום פטנטים המעניקים זכויות למפתחי המוצר – כולם בעצם עוסקים בביוטכנולוגיה. התקשורת הכתובה והאלקטרונית מביאה לידיעת הציבור את החידושים הביוטכנולוגיים ואת הסיכונים האפשריים הכרוכים בהם. לפעמים גם הציבור זקוק לידע בביוטכנולוגיה

[1] **עמיחי פרימן** – עקרונות הביוטכנולוגיה, האוניברסיטה הפתוחה, 1998.

על מנת להחליט אם להעזר במוצר או בטיפול רפואי מסוים או לצורך גיבוש עמדה בנוגע לחקיקה על יישום ביוטכנולוגי השנוי במחלוקת.
ביחידה "מאלפי הגנים – קובץ מחקרים בביוטכנולוגיה" ההתייחסות לביוטכנולוגיה היא כאל תחום התורם לפתרונן של בעיות מגוונות בעזרת ידע ביולוגי. הדגש על "פתרון בעיות" ילווה אותנו לאורך היחידה.

א2 – ביוטכנולוגיה מסורתית

ביוטכנולוגיה המבוססת על אורגניזמים, שלא עברו שינוי גנטי מכוון, מכונה ביוטכנולוגיה מסורתית או קלאסית. האדם התחיל לנצל ידע ביולוגי לפני אלפי שנים על סמך הסתכלות וניסיון. האנשים שבייתו בעלי חיים וזרעו בקרבת ביתם זרעים של צמחי מאכל עסקו בביוטכנולוגיה. רופאי אליל ידעו על סמך ניסיון של דורות אילו צמחים יכולים לשמש לריפוי, ואומני מערות ידעו כיצד להפיק חומרי צבע מהיצורים הנמצאים בסביבתם. כבר בתעשיית המזון בימי התנ"ך נעשה שימוש בתהליכי חילוף החומרים המתרחשים במיקרואורגניזמים (נשימה ותסיסה) להכנת משקאות אלכוהוליים, מוצרי חלב ולחם. בסוף המאה התשע עשרה ובתחילת המאה העשרים החל האדם להבין את התהליכים שעד לאותה העת ידע רק ליישמם: המיקרואורגניזמים אופיינו, חוקי מנדל סיפקו הסבר על כללי התורשה והתפתח מחקר מסודר על תהליכי התסיסה. בעקבות גילוי הפניצילין ותרומתו להחלמת פצועי בעלות הברית במלחמת העולם השנייה, החלו העוסקים בביוטכנולוגיה להתמקד בייצור תרופות. ביוטכנולוגים מנצלים את המגוון הרחב של חומרים שמיקרואורגניזמים יכולים ליצור או לפרק וכן את תהליכי חילוף החומרים שהם מקיימים. שימושים כאלה אפשר למצוא היום במכוני טיהור שפכים, בניקוי שטחים שזוהמו במתכות כבדות, בייצור חומצות אמיניות או תרופות כמו אנטיביוטיקה. דרך נוספת לנצל מיקרואורגניזמים היא הפקת אנזימים מהתאים שלהם וקיבועם לתשתית מוצקה – למשל לסיבים או לכדוריות זעירות. כך האנזימים מבצעים את תפקידם בפירוק או בשינוי אחר של הסובסטרט, כשהם מצויים מחוץ לתא המקורי שלהם. ברירת מוטנטים מתאימים אפשרה את השבחת המיקרואורגניזמים המעורבים בתהליכים ביוטכנולוגיים קלאסיים.
בשני המקרים, גם כשמדובר בתאי מיקרואורגניזמים וגם כשמדובר במולקולות שבודדו ממיקרואורגניזמים, התהליכים הביוטכנולוגיים מתרחשים במכלים המכונים ביוראקטורים (ביו-חי, ראקטור – כלי שבו מתרחשת ראקציה, תגובה), שבהם נשמרים תנאים סטריליים ומבוקרים. גודל הביוראקטורים משתנה לפי הצרכים.

ביוראקטורים שולחניים המשמשים לגידול פטריות במעבדה

ביוראקטורים תעשייתיים

3א – ביוטכנולוגיה מבוססת על הנדסה גנטית – סיפור מקרה האריתרופויטין

גילוי המבנה והתפקוד של מולקולת ה-DNA, לצד הגילוי שהמידע הגנטי מוצפן בצורה דומה בכל היצורים, הכשירו את הקרקע לעידן ההנדסה הגנטית. טכנולוגיה זו שהופיעה בשנות השבעים של המאה העשרים, שינתה את פני הביוטכנולוגיה וחוללה את מהפכת הביוטכנולוגיה החדישה שבה נעסוק ביחידה זו. עם זאת יש לזכור שגם היום חלק גדול מהיישומים הביוטכנולוגיים מבוססים על אורגניזמים שלא עברו שינוי באמצעות ההנדסה הגנטית. על מנת לבחון שלבים אופייניים לפתרון בעיה בעזרת כלים של ביוטכנולוגיה חדישה, נבחן את המקרה של האריתרופויטין, הורמון הניתן כתרופה ששינתה את החיים לחולים הנזקקים לה, אבל הפכה גם לסם ספורט.

לייצר דם לפי הזמנה

חולים שכליותיהם אינן מתפקדות כראוי ונזקקים לטיפולי דיאליזה, סובלים לעתים קרובות מאנמיה הנגרמת ממחסור חמור בתאי דם אדומים. כיצד קשורה הפגיעה בכליות לאנמיה? יצירת תאי דם אדומים במוח העצמות מבוקרת על ידי ההורמון אריתרופויטין. הורמון זה הוא חלבון המיוצר ומופרש על ידי הכליות בכמויות זעירות, מגיע עם זרם הדם למוח העצמות ומשרה שם את יצירת תאי הדם האדומים. מסיבה זאת כאשר הכליות נפגעות פגיעה חמורה שמצריכה טיפול בדיאליזה, נפגע גם ייצור אריתרופויטין ובעקבותיו גם ייצור תאי הדם האדומים ומתפתחת אנמיה חמורה המתבטאת בעייפות קיצונית, חולשה, כאבי ראש ואף עילפון.

משימה 1

1. איזה מידע נחוץ לכם על מנת להחליט באילו מן הדרכים הבאות יש לפעול כדי לטפל באנמיה של חולים שכליותיהם נפגעו?
   א. מתן תוספת של תאי דם אדומים בעזרת עירוי דם.
   ב. מתן תרכובות ברזל (יון הברזל קושר את החמצן בתוך תאי הדם האדומים).
   ג. הפקת אריתרופויטין ממנות דם והזרקתו לחולים.
   ד. טיפול באריתרופויטין המופק מכליות של בקר.
2. בחרו בדרך שנראית לכם מתאימה לטיפול באנמיה של חולי כליות והסבירו את יתרונה לעומת הדרכים האחרות.

במקרה המתואר שבו נוצרת אנמיה כתוצאה מפגיעה בתהליך היצירה של תאי הדם, לא יפתור את הבעיה מתן ברזל – המרכיב שקושר את החמצן למולקולת ההמוגלובין. היות שאריתרופויטין נוצר בכמויות זעירות בגוף, ניתן להפיקו ממנות דם רק בכמויות קטנות שאינן מספקות את הביקוש. כמו כן הפקת האריתרופויטין מבעלי חיים והזרקתו לחולים יכולה לגרום לתגובה חיסונית. הפתרון שהיה בשימוש עד לפני כחמש עשרה שנה היה עירויי דם תכופים. אלא שעירויים חוזרים ונשנים טומנים בחובם בעיות שאינן מופיעות אחרי עירוי דם בודד: עודף ברזל ברקמות הגוף שיכול לגרום למחלות, וכן תגובה חיסונית של הגוף נגד תאי הדם בעירוי, אף כי מדובר בקבוצות דם זהות. יצירת תגובה חיסונית נגד תאי דם בעירוי יכולה אף להכשיל השתלת כליה בשלב מאוחר יותר.

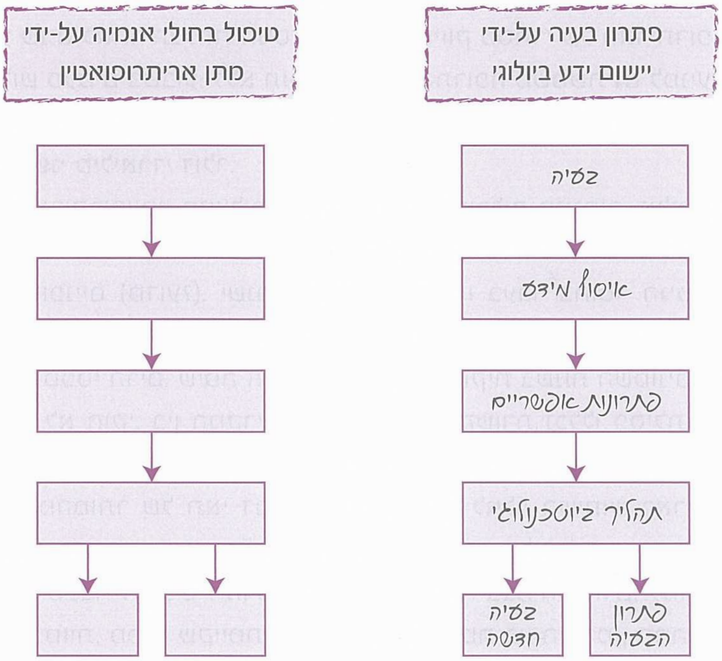
בתחילת שנות השמונים החדירה חברת אַמגֶן את הגן המקודד לאריתרופויטין באדם, לתאי אוגר הגדלים בתרבית רקמה על מנת להפיק מהם את ההורמון (על הסיבה לבחירת תאים מבעל חיים נרחיב בשלב מאוחר יותר). בשנת 1985 החלה החברה בניסויים לבדיקת השפעתו של האריתרופויטין המהונדס שהופק מתרבית התאים, על הטיפול בבני אדם. בניסויים התברר שהחלבון המהונדס פועל בדיוק כמו האריתרופויטין המיוצר בגוף. הוא מצליח להעלות את ריכוז תאי הדם האדומים בחולי כליות לערכים קרובים לנורמליים ולמנוע את הצורך בעירויי דם כתוצאה מאנמיה. ארבע שנים לאחר הצלחת הניסויים הוחל בשיווק מסחרי של האריתרופויטין המהונדס. התרופה מוזרקת לחולי כליות שלוש פעמים בשבוע, ללא תופעות לוואי. התרופה משמשת גם למניעת אנמיה של חולי סרטן, שהטיפול בהם בכימותרפיה או בהקרנות פוגע במוח העצמות. מדובר בתרופה יקרה מאוד – בשנת 2002 הסתכמו מכירות התרופה בעולם בשני מיליארדי דולר.

ההשפעות המיטיבות של אריתרופויטין מנוצלות לא רק על ידי הסובלים מאנמיה, אלא גם, באופן בלתי חוקי, על ידי ספורטאים. ריכוז גבוה של תאי דם אדומים משפר הישגים בענפי ספורט אירוביים כמו ריצות למרחקים בינוניים וארוכים, שחייה ומירוצי אופניים (מדוע?). ישנם ספורטאים שנהגו בעבר בחוסר הגינות מקצועית והעלו באופן מלאכותי את ריכוז תאי הדם האדומים בדמם על ידי קבלת עירויים לפני התחרויות, כחיקוי של תהליך המתרחש באופן מבוקר וטבעי אצל מטפסי הרים. שיטה זאת הוכרזה בלתי חוקית בשנות השמונים. האריתרופויטין המהונדס הפך גם הוא לסם ספורט לא חוקי. בין המקרים שהיכו גלים בתקשורת נכללו פסילת צוותי רוכבים במירוץ טור דה פרנס ב-1996 וב-1998 ופסילת רצים באולימפיאדת סידני בשנת 2000. בשנים האחרונות נערכות באופן מסודר בדיקות לגילוי ריכוז גבוה מהמותר של תאי דם אדומים ובדיקות לגילוי השימוש באריתרופויטין מהונדס. בנוסף לפגיעה בנורמות של ספורט הוגן, השימוש הבלתי חוקי באריתרופויטין עלול לגרום נזק בריאותי לספורטאים: עלייה בריכוז תאי הדם האדומים מעבר לערכים הנורמליים גורמת לעלייה בצמיגות הדם, למחלות לב וכלי דם וכתוצאה מכך עלולה להסתיים אף במוות. מכיוון שקיימת זהות כמעט מוחלטת בין ההורמון המהונדס להורמון הנוצר באופן טבעי בגוף, מושקע היום מאמץ גדול בפיתוח בדיקות מדויקות ומהירות לגילוי אריתרופויטין מהונדס בדם ובשתן.

תאי דם אדומים מבעד למיקרוסקופ אלקטרונים סורק (הגדלה פי 4,000)

משימה 2

התרשים שלפניכם מסכם את השלבים העיקריים בפתרון בעיות בעזרת ביוטכנולוגיה.
מלאו את התרשים המקביל בעזרת הדוגמה של האריתרופויטין. בשני התרשימים אפשר להוסיף שלבים לפי הצורך.



משימה 3

לפניכם לקט חדשות בתחום הביוטכנולוגיה מהתקשורת היומית. הלקט ממחיש את הרבגוניות, את הדינמיות של הביוטכנולוגיה ואת תחומי הדעת הרבים שהיא משלבת בתוכה.

1. רשמו ליד כל סעיף את הנושא המרכזי שבו היא עוסקת, לדוגמה: ייצור תרופות, הקלאות.
2. רשמו במידת האפשר מה הם המרכיבים הביולוגיים שנעשה בהם שימוש: אורגניזם, תא, מולקולות שמקורן בתא או, אולי, רק ידע על תהליכים ביולוגיים.
3. אילו תחומי ידע מעורבים בפיתוח המוזכר? למשל: ביולוגיה, הנדסה, כלכלה או תחום אחר.
4. אילו היבטים ערכיים או חברתיים קשורים בו?
5. הוסיפו שלוש חדשות נוספות על הפיתוחים בביוטכנולוגיה שהוצגו בכלי התקשורת או באתרי האינטרנט.
6. בחרו "חדשה בביוטכנולוגיה" שמעניינת אתכם במיוחד, מהלקט המובא כאן, מהעיתונות או מהאינטרנט. הסבירו את בחירתכם. רשמו חמש שאלות שהייתם מפנים למדענים בעלי ידע מתאים על מנת ללמוד יותר על הנושא.

1. . . . טענה רצינית יותר שאיתה צריכים תומכי ההנדסה הגנטית להתמודד היא הביקורת האקולוגית: אם המינים המהונדסים ידלפו מהשדות החקלאים אל שדות הבר עלול להיות להם יתרון לא הוגן שיאפשר להם להשתלט על בתי גידול ולהכחיד מינים אחרים. הפתרון שהנהיג משרד החקלאות האמריקאי בשיתוף עם משרד ההגנה על הסביבה הוא הגבלה על שיעור הגידולים המהונדסים בכל שדה. על פי החוק הפדרלי, לפחות 20% מהגידולים חייבים להיות לא מהונדסים. אבל הידיעה שפורסמה בשבוע שעבר מבשרת... על פרויקט שאפתני של נאס"א למעקב לוויני על גידולים מהונדסים. אם השיטה תעבוד, הלווינים האמריקאים ירגלו אחרי החקלאים ויתפסו בקלות את מי שמפר את חוק עשרים האחוזים.

הארץ, 10.10.03.

2. כשהאלקטרוניקה מגלה את הביולוגיה – הקשר בין שבב סיליקון זעיר, פרויקט הגנום האנושי ומחלת הסוכרת. למערכות ניטור רפואיות תהיה השפעה אדירה על תעשיית השבבים, הדומה לזאת של הטלפון הסלולרי בעשר השנים האחרונות. לאחרונה, הגישה חברת רוש מולקולר בקשה לאישור שיווק של מכשיר הממחיש את הפוטנציאל הטמון בשילוב של ידע גנטי ויכולת ביצוע בדיקות מעבדה על גבי שבב. החברה פתחה מכשיר המבצע סדרת בדיקות גנטיות לחולה על מנת לברר אם הוא רגיש לתרופות מסוימות לפני שהן ניתנות לו על ידי הרופא. בשלב הנוכחי מתמקד המכשיר בבדיקת נוכחות של אנזים המפרק חלק מהתרופות הניתנות היום לחולים.

ביוטכנולוגיה - מוסף פרסומי לקראת שבוע הביוטכנולוגיה, מאי 2003.

3. דילמת לב החזיר: תוך שנתיים תהיה חזיריה ליד כל בית חולים וממנה יילקחו לבבות חזיר להשתלה בבני אדם", מבטיחים רופאים ישראלים שעוסקים בהשתלות. "זהו סיוט שהפך למציאות", מאיימים רופאים מתנגדים, "אברי החזירים נושאים וירוסים שחלקם אינם מוכרים למדע, ועלולים לגרום למגפות".

מעריב, 6.4.98.

4. שכפל לי תרופה: מדענים הצליחו לראשונה לשכפל עזים, שיפיקו חלבונים אנושיים. פריצת דרך בתחום הזה התרחשה כאשר חוקרים בארה"ב הצליחו לראשונה לפני כחצי שנה לשכפל חיות שעברו קודם לכן שינוי גנטי. הם שכפלו שלוש עזים בריאות שמסוגלות לייצר חלב עם כמות גדולה של חלבון אנטיטרומבין אנושי.

הארץ, 29.4.99.

5. החיידקים זללו את הנפט כל הדרך למפרץ הפרסי. הרעיון של חיידקים זוללי נפט עלה במוחו של פרופ' רוזנברג כשהלך יום אחד על שפת הים וזפת טורדנית נדבקה לכפות רגליו. תגובתו הייתה תגובה מובהקת של ביולוג: "חשבתי שחייבים להימצא בטבע חיידקים שיודעים לפרק את הנפט." החיידקים מפרישים חומרים המפרקים את הנפט לטיפות קטנות. אפשר להשתמש בחומרים אלה בתעשיית הקוסמטיקה ובתעשיית המזון.

הארץ, 7.5.01.

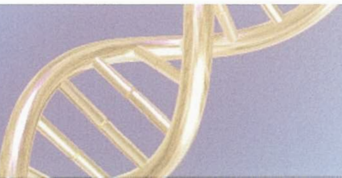
6. מי צריך נפט כשיש חיידקים: סוללה מבוססת על חיידקים מפיקה חשמל מפסולת ואינה מזהמת את הסביבה. החיידקים שעליהם מתבסס המחקר החדש הם קרובי משפחה של זוללי הנפט. בעת פירוק תרכובות אורגניות בים, הם משחררים אלקטרונים. אם מצמידים אל החיידקים חוטים מוליכים, הם יעבירו את האלקטרונים אל החוט ויצרו זרם חשמלי. אקולוגים, מיקרוביולוגים ומומחים לאנרגיה נקייה מגיבים לפי שעה בהתלהבות. לא רק שהטכנולוגיה החדשה מייצרת אנרגיה בלי לזהם את הסביבה, היא אף מסוגלת להשתמש בזיהומים כדי לייצר אנרגיה.

הארץ, 22.1.02.

7. מצוידת בכמעט 4.7 מיליון דולר מקרן המימון של ביל ומלינדה גייטס, הקימה ד"ר ויקטוריה הייל, פרמקולוגית (חוקרת תרופות) בת 41 מסן-פרנסיסקו, את חברת התרופות הראשונה ללא כוונת רווח. מטרת החברה להלחם במחלות הטפיליות הקטלניות ביותר, התוקפות את אנשי העולם השלישי.

ד"ר הייל וחברת OneWorld Health שבראשה היא עומדת מובילות את הפיתוח, הבדיקה והייצור של תרופות חדשות, שהעלו עד עתה אבק במעבדותיהן של חברות מסחריות. כעת תרופות אלו יעברו ניסויים קליניים, שיבחנו את יכולתן להלחם בטפילים, המאיימים על חייהם של מיליוני בני אדם ברחבי אסיה ודרום אמריקה. חברת OneWorld Health אמורה למלא צורך אדיר בהכנסה לשוק של תרופות המיועדות לטיפול ברוב המחלות המשתוללות בארצות לא מפותחות.

San Francisco Chronicle News, 19.8.02
תורגם מאנגלית



משימה 4

פתרון בעיות בעזרת ידע ביולוגי (לביצוע בצוותים או בזוגות)

מתוך התכנים של נושאי הליבה, או מתוך הידע הביולוגי שלכם, הציעו שתי דוגמאות של בעיות שאותן אפשר לנסות לפתור, ולו באופן חלקי, בעזרת ביוטכנולוגיה. אם ידוע לכם שלבעיה מסוימת קיים כבר פתרון ביוטכנולוגי (טיפול באנמיה בעזרת אריתרופויטין, למשל), אל תכללו אותה בין הבעיות שאתם מציעים, אלא אם לפי דעתכם הפתרון הוא חלקי או בלתי מספק.

ליד כל בעיה רשמו בקצרה, בצורת שאלות, מידע שיכול לעזור בחיפוש אחר הפתרון.

לפניכם בעיה לצורך המחשת המשימה:

זחלי יתושים מתרבים במי שלולית. היתושים שבוקעים מהם גורמים למטרד ויכולים להעביר מחלות.

מידע נחוץ למציאת הפתרון לבעיה:

- האם מדובר במין אחד של יתושים או במינים רבים?
- מה התנאים שגורמים להתרבות היתושים?
- האם יש בעלי חיים שניזונים מהיתושים הללו?
- האם יש אורגניזמים שמקיימים יחסי טפילות עם היתושים?
- אילו אמצעים ננקטו עד עכשיו ומה הייתה מידת הצלחתם?

בפרקים הבאים של מבנית המבוא נכיר את התהליכים העומדים בבסיס הביוטכנולוגיה החדישה המבוססת על הנדסה גנטית, נערוך חזרה על הביולוגיה העומדת בבסיס ההנדסה הגנטית ונעקוב אחרי שיבוט גנים ושיבוט אורגניזמים. במקביל נתרשם מהשפעת היישומים הביוטכנולוגיים על החקלאות ועל הרפואה.

כאשר תסיימו ללמוד את הנושא, תוכלו לנסות לפתור את הבעיות שהצעתם בעזרת הידע שצברתם (המשך המשימה "פתרון בעיות בעזרת ידע ביולוגי" בעמוד 56).

פרק ב - שיבוט גנים בחיידקים ובתרביות תאים

ב1 - שבירת מחסום המינים

המעבר מביוטכנולוגיה מסורתית לביוטכנולוגיה המבוססת על הנדסה גנטית התאפשר הודות להבנה שאפשר לשנות תכונות של יצור על ידי החדרת גנים ממין אחר לתוך התאים (או התא) המרכיבים אותו.
באופן טבעי רק אורגניזמים בני אותו מין (או במקרים נדירים ממינים קרובים) יכולים להעביר חומר תורשתי מפרט לפרט בתהליך הרבייה הזוויגית. זאת משום שגמטות של אורגניזמים ממינים שונים אינן יכולות בדרך כלל להפרות זו את זו. אם חלה הפריה כזאת - יהיה הצאצא עקר, כמו למשל הפרד שהוא צאצא של סוסה וחמור. מחסום זה להפריה מכונה "מחסום המינים".
הטכנולוגיה של ההנדסה הגנטית יכולה להסיר מחסום זה. מדובר בטכנולוגיה שנראתה דמיונית עד לראשית שנות השבעים ועיקרה העברת גנים מיצור ליצור. פירושו של דבר - העברת תכונות בין אורגניזמים השייכים למינים שונים, שהם לפעמים רחוקים מאוד זה מזה מבחינה אבולוציונית. דוגמה אחת היא צירוף של גן האדם לייצור אינסולין למטען התורשתי של חיידק. כתוצאה מהתהליך יתחיל החיידק לייצר את הורמון האינסולין של האדם.
גם בעבר נהג האדם לשנות תכונות של בעלי חיים וצמחים על מנת להשביח את תכונותיהם בעזרת הכלאות מבוקרות בין יצורים שיכולים להעמיד צאצאים פוריים. השבחה גנטית על ידי הכלאות אפשרה לשפר תכונות, אולם שיפור זה היה מוגבל למכלול התכונות הקיימות באותו המין. יתרה מזו, יחד עם הגן המקנה את התכונה הרצויה, עוברים לעתים קרובות גנים נוספים, צמודים בתאחיזה לגן הרצוי, ומקודדים לתכונות נוספות, שחלקן אינן רצויות.

טכנולוגיית ההנדסה הגנטית מאפשרת להעביר מספר גנים, גן יחיד, או רק מקטע של גן, לאורגניזם שיכול להיות מרוחק מבחינה אבולוציונית. האורגניזמים שלתוכם מוכנסים גנים - מאותו המין או ממינים אחרים - נקראים אורגניזמים מהונדסים או טרנסגניים. ליצורים אלו תכונות חדשות שלא התבטאו בהם לפני שהגן הזר הוחדר אליהם.
איך מבודדים גן שאחראי לביטוי תכונה?
איך מעבירים גן מיצור ליצור, ואילו שיקולים מעורבים בבחירת היצור שאליו תועבר התכונה?
האם הסרת מחסום המינים מסוכנת?

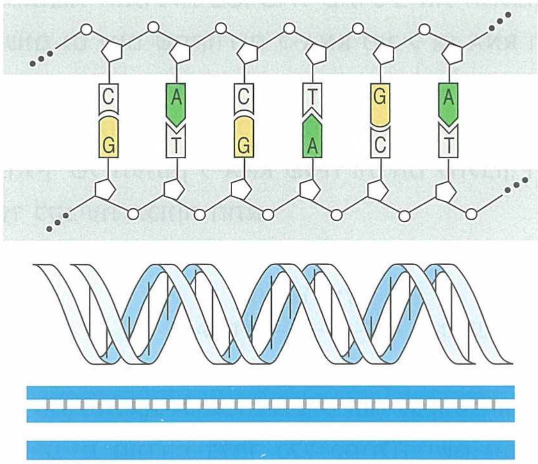
כדי שנוכל לענות על השאלות האלה, עלינו להבין את מבנה החומר התורשתי, את תפקודו וכן את תהליכי הבקרה על ביטוי גנים.

ב2 - מבנה החומר התורשתי ותפקודו

מבנה החומר התורשתי

מולקולת ה-DNA מורכבת משתי שרשראות ארוכות של נוקלאוטידים שמלופפות זו סביב זו במבנה מרחבי של סליל כפול. נהוג לכנות את שרשראות הנוקלאוטידים גם בשם גדילים. ה-DNA הוא, אם כן, מולקולה דו-גדילית. היות שהנוקלאוטידים נבדלים ביניהם רק בבסיס החנקני שהם מכילים (אדנין-A, ציטוזין-C, גואנין-G, או תימין-T), נהוג להשתמש בקיצורים של שמות הבסיסים גם כדי לציין את הנוקלאוטידים. כל נוקלאוטיד יוצר קשרים כימיים חזקים (קשרים קוולנטים) עם שכניו באותו הגדיל וקשרים כימיים חלשים (קשרי מימן) עם הנוקלאוטיד שמולו בגדיל השני. הקשרים החלשים בין שני הגדילים יוצרים את המבנה הדו-גדילי של ה-DNA. היות ש-A יכול ליצור קשר רק עם T ו-C יכול ליצור קשר רק עם G, הרצף של גדיל אחד מותאם (בהשלמה) לרצף של הגדיל שמולו ומשלים לו.

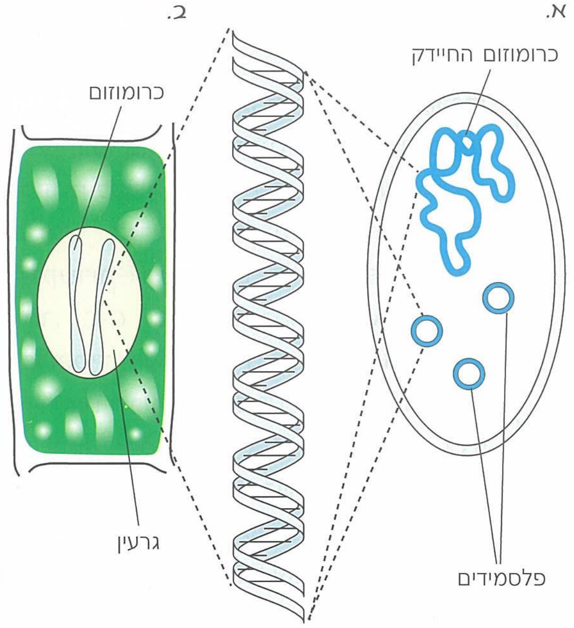
מאילו מרכיבים מתעלמים בכל אחד מהייצוגים (א-ד) של מולקולת ה-DNA?



ייצוגים סכמתיים שונים של מולקולת DNA דו-גדילית.
בהמשך, נשתמש בכל אחת מדרכי התצוגה האלה, לחלופין.

מיקום החומר התורשתי בתאים פרוקריוטים ואיקריוטים

בתאי חיידקים (שהם יצורים פרוקריוטיים) ה-DNA נמצא בצורת כרומוזום מעגלי בציטופלסמה. לפעמים בחיידקים מצויות בנוסף לכרומוזום גם מולקולות DNA מעגליות קטנות, המכונות פלסמידים.
בתאים איקריוטיים, מולקולות ה-DNA מאורגנות בכרומוזומים שממודרים בתוך גרעין התא. גם המיטוכונדריות והכלורופלסטים בתא איקריוטי מכילים מולקולות DNA.



א. החומר התורשתי בחיידקים
ב. החומר התורשתי באיקריוטים

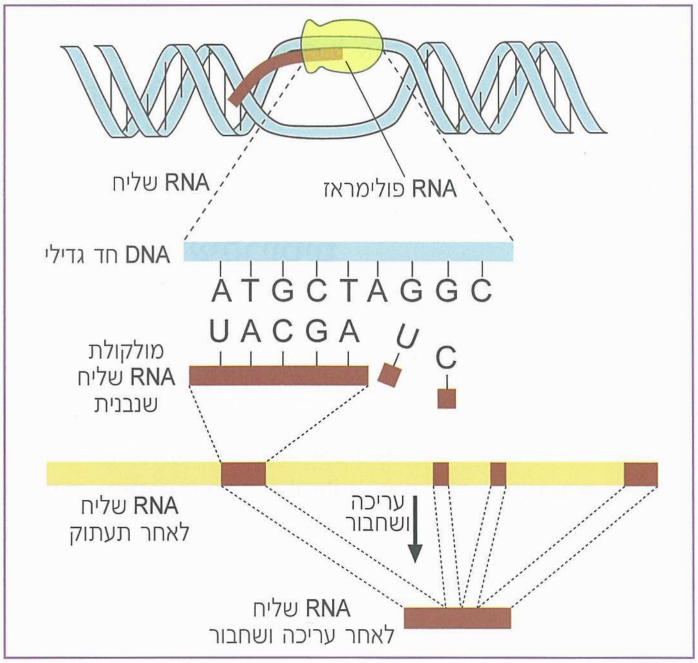
מ-DNA לתכונה

רצף DNA המקודד לחלבון או ל-RNA, מכונה גן[1]. רצף הבסיסים של גן במולקולת ה-DNA הוא שקובע את רצף החומצות האמיניות בשרשרת שתרכיב את החלבון שיתבטא מגן זה, ומכאן את מבנהו ואת תפקודו של החלבון (ישנם גם גנים שמקודדים ל-RNA מוביל או RNA ריבוזומלי, ומהם לא ייווצר חלבון). החלבונים הם הקובעים את תכונות התא ומכאן גם את תכונותיו של הייצור: יש חלבונים שממלאים תפקידים בבניית התא, יש חלבונים שהם אנזימים המזרזים תהליכים כימיים ויש שמווסתים את פעילותם של גנים. כשגן מתבטא, משמעות הדבר שהוא עובר תהליך של תעתוק ל-RNA שליח ותרגום לחלבון. התרשים שלפניכם מציג את זרימת המידע מהחומר התורשתי ועד לקביעת תכונות התא.

רוב התכונות של אורגניזם אינן נראות לעין, מכיוון שאין הן משפיעות על מראה האורגניזם. תכונה הפוגעת בתפקוד האורגניזם מוגדרת בדרך כלל כמחלה. ישנן תכונות שמופיעות כתוצאה מפעילותו של גן יחיד, ויש שמופיעות כתוצאה מפעילות משולבת של מספר גנים.

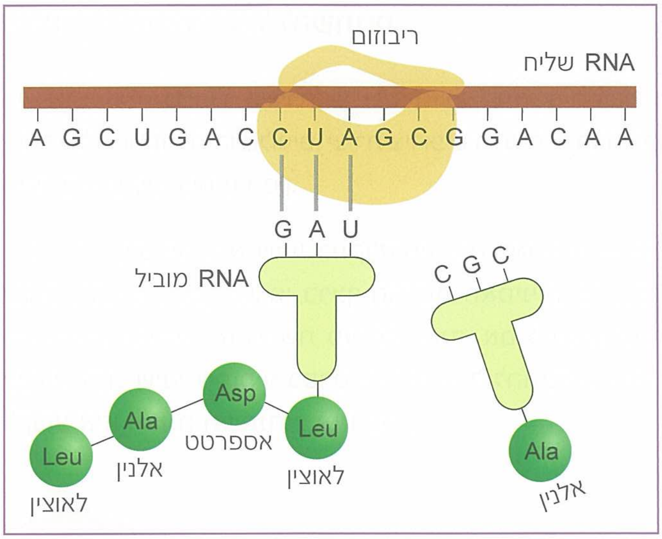
מ-DNA לחלבון, שלב אחר שלב

תעתוק: בתהליך התעתוק גדילי ה-DNA בקרבתו של הגן נפרדים, ובעזרת האנזים RNA פולימראז נוצרת מולקולה חד-גדילית של RNA שליח על אחד הגדילים של ה-DNA, לפי כללי ההתקשרות המקובלים בין הנוקלאוטידים. כלומר, A-T, G-C (במולקולת ה-RNA יופיע הנוקלאוטיד בעל הבסיס אורציל U, במקום הנוקליאוטיד בעל הבסיס T במולקולת ה-DNA). רצף הנוקלאוטידים ב-DNA קובע את רצף הנוקלאוטידים ב-RNA השליח. באיקריוטים ה-RNA השליח נוצר בגרעין, ובמהלך המעבר בין הגרעין לציטופלסמה הוא עובר תהליכי עריכה ושחבור שכתוצאה מהם מורחקים ממנו קטעים מסוימים. בפרוקריוטים, ה-RNA השליח נוצר על גבי מולקולת ה-DNA המצויה בציטופלסמה, ואין מתרחשים תהליכי עריכה ושחבור של ה-RNA השליח.

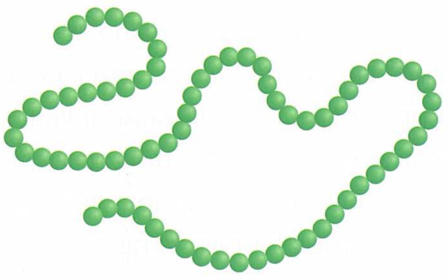


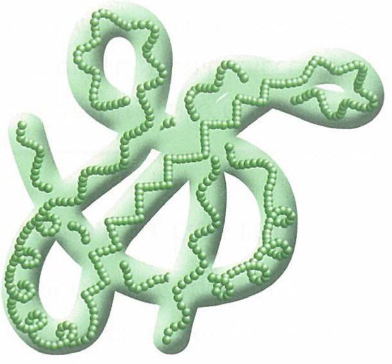
[1] הגדרה זאת אינה שלמה ותשמש רק כבסיס להסברים; בסוף הפרק תובא הגדרה מדויקת ומורחבת יותר של המושג גן.

תרגום: ה-RNA השליח נצמד לריבוזומים בציטופלסמה. בריבוזומים מתורגם המידע המצוי ב-RNA שליח לשרשרת של חומצות אמיניות בעזרת מולקולות של RNA מוביל ובעזרת אנזימים שונים. צירוף של שלושה נוקלאוטידים ב-RNA שליח יוצר קודון לחומצה אמינית מסוימת. יש חומצות אמיניות שמקודדות על ידי מספר קודונים, ויש קודונים המאותתים להתחלה ולסיום של התרגום. האוניברסליות של הצופן הגנטי משמעה שבכל היצורים הצופן הגנטי מקודד באותה הדרך.



שינויים שלאחר התרגום: שרשרת החומצות האמיניות שנוצרה ניתקת מהריבוזום ועוברת שינויים נוספים באמצעות אנזימים המצויים בתא: יצירת קשרים כימיים נוספים בין חומצות אמיניות שאינן שכנות, ארגון במרחב, הוספת קבוצות סוכר, קבוצות זרחה או קבוצות כימיות אחרות לחומצות האמיניות ומעבר למקום הפעילות של החלבון בתא. שינויים אלה נקראים "עיבוד שלאחר התרגום". חלבונים רבים מורכבים מכמה שרשראות של חומצות אמיניות המחוברות ביניהן.


שרשרת חומצות אמיניות יוצרת את המבנה הראשוני של החלבון


מבנה שלישוני של חלבון

רק חלק קטן מה-DNA של התא מורכב מגנים

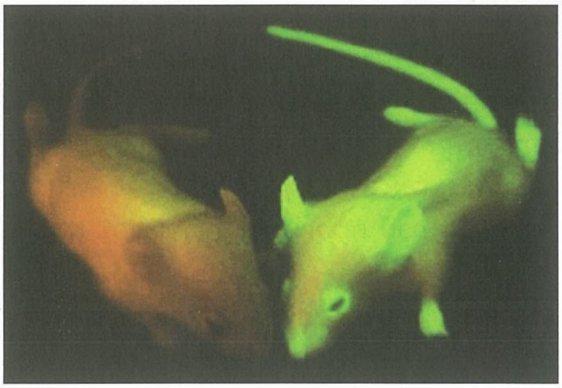
בגנום האדם ובגנומים של חלק מן היצורים האיקריוטיים האחרים, 97% מכלל ה-DNA אינו מקודד ל-RNA. היום מושקע מאמץ מחקרי רב בפענוח תפקידם של האזורים הלא מקודדים הללו. ייתכן שקטעים אלה ממלאים תפקיד בבקרה על ביטוי הגנים או תפקיד חשוב אחר שעדיין לא התגלה.

המטען התורשתי יכול להשתנות

רקומבינציה: במהלך היצירה של תאי הזוויג, בתהליך המיוזה, נוצרים לעתים קרובות צירופים גנטיים חדשים בין קטעי DNA של כרומוזומים הומולוגיים. יצירת צירופים חדשים נקראת רקומבינציה. במקרה זה הצירופים הם אך ורק בתוך החומר התורשתי שקיים באותו המין.

מוטציה: מוטציה היא שינוי בנוקלאוטיד אחד או יותר ברצף ה-DNA. מוטציה יכולה לגרום לשינוי ברצף ה-RNA שליח וכתוצאה מכך לשינוי ברצף חומצות האמיניות של החלבון. ייתכן אף שינוי במבנה המרחבי של החלבון, עד כדי אובדן פעילותו או רכישת פעילות שונה. אם מוטציה מתרחשת בתאי המין, היא יכולה לעבור לדורות הבאים. בצורה זאת שינוי שמופיע בפרט מסוים, יכול להתפשט בתוך המין. באופן טבעי מוטציות הן אקראיות ואי-אפשר לקבוע איזו תכונה תשתנה ובאיזו צורה.

משימה 1



באיור שלפניכם, העכבר הזוהר מצד ימין נוצר לאחר ששילבו בגנום שלו את הגן המקודד לחלבון הירוק הזוהר (GFP – Green Fluorescen Protein) שמקורו במדוזה. לאחר שהגן שולב בגנום (בתהליך שיוסבר בהמשך) הוא התבטא באופן רגיל, כמו שאר הגנים המתבטאים בעכבר. העכבר הלא-זוהר משמאל משמש להשוואה.

1. הסבירו את התהליכים המתרחשים בתאים המבטאים את הגן GFP והשתמשו במושגים אלה: תעתוק, RNA שליח, עריכה ושחבור ה-RNA שליח, ציטופלסמה, ריבוזומים, תרגום, שרשרת חומצות אמיניות, מחסום המינים.
2. האם מוטציה אקראית בעכבר נורמלי יכולה, לפי דעתכם, לגרום להופעת זהירה?
3. העלו השערות לשאלה, מדוע יש צורך לייצר עכבר זוהר. חזרו לבדוק את תשובתכם לאחר שתלמדו את הפרק הבא.

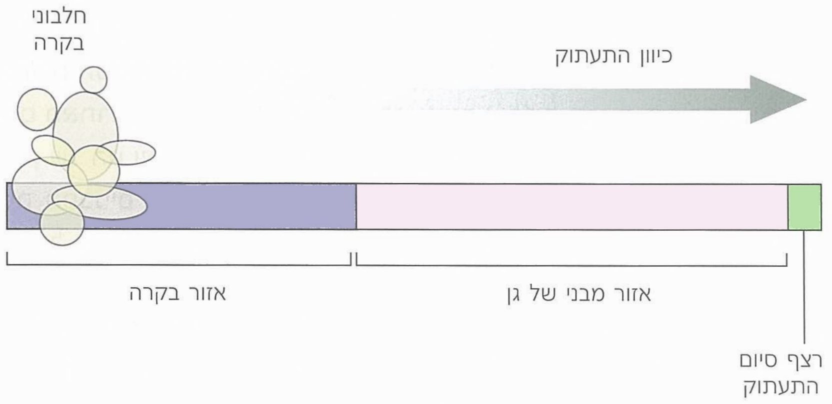
מנגנון הבקרה על ביטוי גנים

למרות שהגנום בכל תאי גופו של יצור מסוים כמעט זהה, מגוון הגנים המתבטאים בכל תא ברגע נתון מושפע משינויים בסביבה החיצונית והפנימית של התא. למשל, אם חיידק מצוי בסביבה העשירה בלקטוז (מקור מזון) מגוון הגנים שיתבטאו בו יהיה שונה מאלה שיתבטאו בנוכחות גלוקוז. ביצורים רב-תאיים, ביטוי גנים שונים בתאים בעלי מטען תורשתי זהה עומד בבסיסו של תהליך ההתמיינות המתרחש במהלך ההתפתחות העוברית. למשל, חלק מן הגנים המתבטאים בתא כבד שונה מן הגנים המתבטאים בתא עצב, ולכן מתרחשים תהליכים שונים בשני סוגי התאים.

מהו מנגנון הבקרה על ביטוי הגנים? כיצד נקבע אילו גנים יתבטאו ואילו לא?
בכל גן אפשר להגדיר שני סוגים של אזורים ב-DNA, כל אחד ותפקידו:
אזורים מבניים – אזורים המקודדים לחלבונים.
אזורי בקרה – אזורים האחראים על הבקרה על ביטוי הגן ואינם עוברים תרגום. ביניהם ישנם אזורי בקרה המסמנים את התחלת התעתוק של הגן ואזור המסמן את סיום התעתוק.
גן כולל את האזורים המבניים ביחד עם אזורי הבקרה ואת האזורים שעוברים עריכה ושִחבור. לכן, נהוג להגדיר גן כמקטע DNA שמכיל את היחידה התפקודית שקובעת תכונה תורשתית (או חלק ממנה), בדרך כלל חלבון או RNA.
בפרוקריוטים מספר גנים יכולים להיות צמודים זה לזה ליד אזור בקרה משותף. יחידת ארגון זאת, המכונה אופרון, כוללת בדרך כלל גנים המעורבים בתהליך משותף (למשל, כולם מקודדים לאנזימים המעורבים ביצירת חומצה אמינית מסוימת), והם מתבטאים ביחד. הבקרה על ביטוי האופרון נעשית על ידי חלבוני בקרה המתקשרים לרצפים שונים באזור הבקרה, ופועלים כמעכבים או כמפעילים של תהליך התעתוק של האופרון כולו.

בקרה על ביטוי גנים בפרוקריוטים.
האיור מתאר אופרון המורכב משלושה גנים ואזור בקרה

באיקריוטים כמעט כל גן מבוקר בנפרד מגנים אחרים. חלק מאזורי הבקרה יכולים להימצא במרחק רב מהגן שהם מווסתים, או אף בתוך הגן עצמו. הבקרה על ביטוי הגנים האיקריוטיים מורכבת יותר מהבקרה על ביטוי הגנים הפרוקריוטיים, ומעורבים בה מספר רב יותר של חלבוני בקרה. חלבוני הבקרה הם חלבונים הנקשרים לרצפים ייחודיים באזור הבקרה או זה לזה ובצורה זאת מעכבים או מגבירים את תעתוק הגן.
בכל סוג של תא מתבטאים מגוון שונה של חלבוני בקרה (אך חלקם משותפים לסוגי תאים שונים). מגוון זה יכול להשתנות בהשפעת גורמים שמקורם מחוץ לתא או בתוך התא עצמו. השינויים שחלים במגוון חלבוני הבקרה שקיימים בתא גורמים לביטוי של גנים שונים.



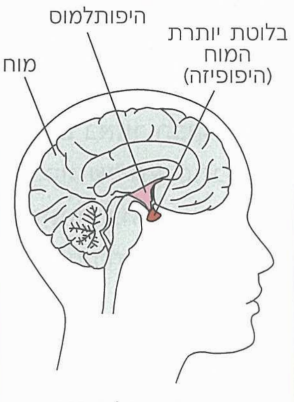
בקרה על ביטוי גנים באיקריוטים - האיור מתאר גן המורכב מאזור מבני ואזור בקרה

ב3 - יצירת DNA מהונדס וביטויו בחיידקים

הנדוס - פירושים רבים לו

כשיוצרים תוצר, גן או אורגניזם, בתהליך של הנדסה גנטית, נהוג לכנות את התהליך בשם הנדוס. גן המורכב ממספר חלקים שחוברו יחדיו במעבדה, בתהליך של הנדסה גנטית, נקרא גן מהונדס (בלועזית - גן רקומבيננטי), מכיוון שנוצרו באופן מלאכותי צירופים חדשים של חומר תורשתי. אורגניזם שלתוכו הוכנס גן ממין אחר נקרא אף הוא אורגניזם מהונדס או בלועזית אורגניזם טְרָנסגני.

בפרק זה נדון בתהליך היצירה של חלבון מהונדס בחיידקים. אמנם נדון בעיקר ביצירת הורמון הגדילה של אדם, שהוא אחד היישומים הראשוניים של הנדסה גנטית בתחום התרופות, אך העקרונות הנלמדים נכונים גם עבור אין ספור חלבונים שמיוצרים היום בדרכים דומות.



איור סכמטי של המוח ובו נראית בלוטת יותרת המוח

יצירת הורמון הגדילה מאדם בחיידקים

הורמון הגדילה הוא חלבון קצר (191 חומצות אמיניות) המופרש מבלוטת יותרת המוח (היפופיזה). ההורמון מופרש לזרם הדם ומשפיע על גדילת עצמות הגוף, על בניית מסת השריר ועל חילוף החומרים בתאים. פגמים בבלוטת יותרת המוח יכולים לגרום לעיכוב בייצור הורמון הגדילה ובהפרשתו. היעדר ההורמון אצל ילדים מתבטא בננסות שבה הפרופורציות בין איברי הגוף הן נכונות, אבל הילדים נמוכים יחסית לבני גילם.

שאלה 1

1. איך ניתן להסביר את העובדה שהגן להורמון גדילה מתבטא אך ורק בתאי יותרת המוח?
2. מהו המידע הדרוש לכם כדי לנסות למצוא דרך לטפל בילדים הסובלים מננסות כתוצאה מעיכוב בייצור ובהפרשת הורמון הגדילה?
3. כיצד אפשר, לפי דעתכם, לטפל בילדים אלה?
4. אם ברצוננו להפיק בחיידקים את הורמון הגדילה של האדם, מאלו תאים אפשר לבודד את הגן המקודד להורמון הגדילה על מנת שנחדיר אותו לחיידקים?
5. שאלה לדיון – אם ברצונכם להנדס את הגן בחיידקים, מאיזה אורגניזם תבודדו את אזור הבקרה שבו תשתמשו – מאדם או מחיידק? (אפשר לחבר אזור בקרה מיצור אחד לאזור מבני של יצור אחר, כפי שנלמד בהמשך.) נמקו את תשובתכם.

ברוב המקרים הורמון הגדילה המופק מבעלי חיים לשירות האדם אינו יעיל. לכן היה נהוג בעבר לטפל בילדים, הסובלים ממחסור בהורמון, בעזרת הורמון גדילה המופק מבלוטות היפופיזה של נפטרים. אלא שכמות ההורמון שאפשר להפיק בדרך זו נמוכה, והחומר המופק עלול להעביר למטופל מחלות כדוגמת מחלה ניוונית של המוח הדומה ל"מחלת הפרה המשוגעת".

טכנולוגיית ההנדסה הגנטית אפשרה בראשית שנות השמונים ייצור הורמון גדילה של אדם בחיידקים על ידי הנדוס הגן של האדם בחיידקים.

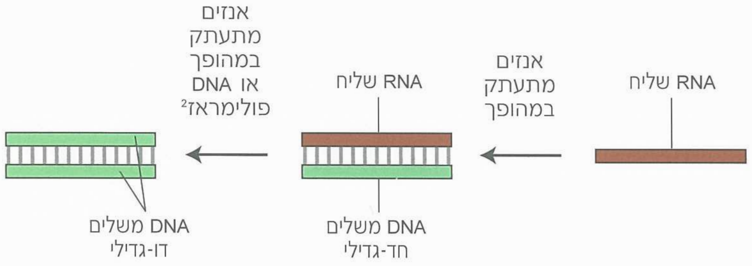
השלבים העיקריים בתהליך הנדוס הגן המקודד להורמון הגדילה הם:

- יצירת DNA משלים של הגן המקודד להורמון הגדילה באדם. ה-DNA המשלים מכיל את האזור המבני של הגן.
- חיבור ה-DNA המשלים של הגן המקודד להורמון הגדילה באדם לפלסמיד שמשמש כנשא. חיבור אזור בקרה מתאים לביטוי בחיידקים.
- הכנסת הגן המהונדס, המכיל אזור מבני מהאדם ואזור בקרה מחיידק, באמצעות נשא לתאי חיידקים.
- ביטוי הגן בחיידקים ובדיקת הורמון הגדילה שהם מייצרים.
- גידול החיידקים המהונדסים בכמויות גדולות והפקת ההורמון.

בהמשך הפרק נעקוב אחרי תהליך ההנדוס של הורמון הגדילה כדוגמה לדרך ההנדוס של גנים נוספים בחיידקים. קיימות מספר דרכים חלופיות לבצע משימה זאת, ואנו נעקוב כאן אחרי דרך אפשרית אחת בלבד.

יצירת DNA משלים של האזור המבני של הגן המקודד להורמון הגדילה

הגן המקודד להורמון הגדילה באדם, כמו רוב הגנים ביצורים איקריוטיים, מכיל אזורים שעוברים עריכה ושחבור לאחר התעתוק. היות שאנחנו מעוניינים שהגן יתבטא בחיידקים, שבהם אין מתבצעים תהליכי העריכה והשחבור של ה-RNA השליח, עלינו להכניס לחיידקים רק את קטעי הגן שעוברים תרגום. לכן לא נוכל להכניס את הגן בשלמותו, כפי שהוא מופיע בגנום האדם, אלא נצטרך ליצור DNA משלים (DNA). DNA משלים מכונה כך כי הוא מהווה העתק (או השלמה) של מולקולת RNA שליח, לאחר שעברה תהליכי עריכה ושחבור, והיא מוכנה לתרגום. יצירת DNA משלים מתבצעת בעזרת האנזים המתעתק במהופך (RT – Reverse Transcriptase), שמקורו בנגיפים המכונים נגיפי רטרו. האנזים מסוגל ליצור מולקולות DNA לפי הרצף של מולקולות RNA.
לצורך הפקת כמות גדולה של RNA שליח משתמשים בתאים המבטאים את הורמון הגדילה. מבודדים מהציטופלסמה של תאים אלו מולקולות RNA שליח שמקודד להורמון הגדילה. מולקולות אלו עברו כבר עריכה ושחבור, ולכן הן מכילות רק רצפים שיעברו תרגום. בעזרת האנזים המתעתק במהופך יוצרים במבחנה מולקולות DNA משלים, לפי התבנית של ה-RNA שליח. ה-DNA המשלים שנוצר מכיל את כל הרצפים שמתורגמים להורמון הגדילה.



יצירת DNA משלים בעזרת האנזים המתעתק במהופך

בסוף שלב זה ברשותנו DNA משלים הזהה לרצפי ה-RNA שליח שמהם מתורגם הורמון הגדילה באדם.

חיבור הגן לנשא

פלסמיד כנשא

אם ננסה להכניס לתוך חיידקים את הגן המקודד להורמון הגדילה כפי שהוא, הוא לא יעבור שכפול, לא יתבטא וסביר להניח שיפורק במהרה על ידי אנזימי החיידק או שיאבד במהלך חלוקת תאי החיידקים. לכן עלינו לחבר

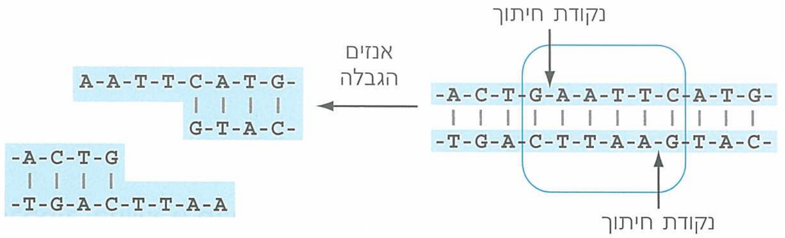
[2] בנגיפים האנזים המתעתק במהופך יכול ליצור את שני הגדילים של ה-DNA המשלים, אך במבחנה משתמשים באנזים DNA פולימראז ליצירת הגדיל השני.

את הגן לנשא מתאים, שיאפשר את שכפולו במספר רב של עותקים ואת ביטויו לאורך זמן תחת בקרה מתאימה. פלסמידים נחשבים לנשאים מצוינים להכנסת גנים לתוך חיידקים. הפלסמידים הם מולקולות קטנות של DNA מעגלי המתרבות בתא החיידק באופן עצמאי ומכילות בדרך כלל גנים המקנים יתרון חשוב לחיידק. הפלסמידים מתרבים במהירות בתוך תא החיידק, ויכולים להיות אף מאות עותקים של פלסמיד מסוים בתוך תא חיידק בודד. הכנסת הגן של הורמון הגדילה לתוך פלסמיד תאפשר את החדרתו לתא חיידק ואת שכפולו בתא זה.

חיתוך עם אנזימי הגבלה

על מנת שנוכל לחבר לפלסמיד את הגן, עלינו לחתוך את המולקולה המעגלית של הפלסמיד. למטרה זאת משתמשים באנזימים, הנקראים אנזימי הגבלה (אנזימי רסטריקציה). כל סוג של אנזים הגבלה חותך את ה-DNA אך ורק ברצף נוקלאוטידים ייחודי, שאורכו לרוב ארבעה עד שמונה נוקלאוטידים. אנזימי הגבלה רבים יוצרים במהלך החיתוך קצוות חד-גדיליים קצרים. נהוג לקרוא לקצוות אלה "קצוות דביקים", היות שהם יכולים להיצמד לקצוות בעלי רצף משלים של קטעי DNA שנחתכו עם אותו אנזים הגבלה. כאשר מעוניינים לחבר בין שני קטעי DNA, נהוג לחתוך אותם עם אותו אנזים הגבלה, כדי להגביר את יעילות החיבור. עלינו לחתוך גם את הפלסמיד וגם את ה-DNA המשלים המקודד להורמון הגדילה עם אותו אנזים הגבלה.

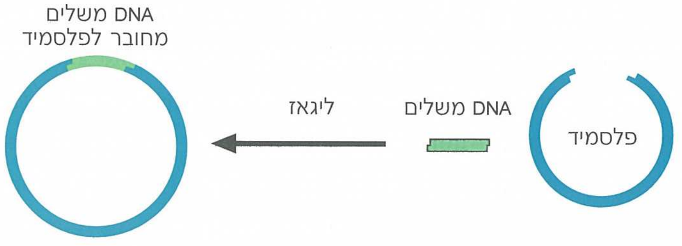
חיתוך פלסמיד עם אנזים הגבלה



אנזים הגבלה מזהה רצף ייחודי וחותך את ה- DNA. באיור - חיתוך עם אנזים ההגבלה Eco R1, היוצר תוצרי חיתוך עם קצוות קצרים של DNA חד-גדילי

חיבור עם ליגאז

על מנת לחבר בין ה-DNA המשלים של הורמון הגדילה לפלסמיד החתוך נשתמש באנזים ליגאז, המחבר בין שתי מולקולות DNA. האנזים ליגאז יוצר קשר כימי (קשר קוולנטי) בין שני נוקלאוטידים שכנים במולקולת ה-DNA. אם נערבב במבחנה בתנאים מתאימים מולקולות נשא וגן שנחתכו באותו אנזים הגבלה, הקצוות המשלימים יתקרבו זה לזה, ויווצרו קשרי מימן בין הנוקליאוטידים המשלימים בין שני הגדילים של "הקצוות הדביקים". בהמשך, יחבר האנזים ליגאז בין הנוקליאוטידים השכנים המצויים בקצוות של הגן לבין הקצוות של הפלסמיד.

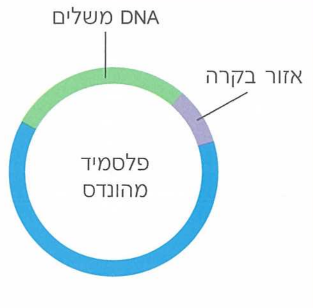


חיבור בין קטעי DNA באמצעות האנזים ליגאז

חיבור אזור בקרה

על מנת שהגן שמקורו באדם יוכל להתבטא בחיידקים, הוא צריך להכיל אזור בקרה המוכר על ידי האנזים המתעתק (ה-RNA פולימראז) ועל ידי חלבוני הבקרה של החיידק. לכן נחבר באותו אופן לפלסמיד, המשמש כנשא, אזור בקרה שמקורו בחיידק ושיאפשר את תעתוק הגן בחיידקים[3].

נוצר גן חדש, מהונדס, המורכב מהאזור המבני של הגן הַמקודד להורמון הגדילה של האדם ומאזור בקרה שמקורו בחיידקים. גן כזה, שמורכב מקטעי גנים של מינים שונים, יכול להיווצר אך ורק בתהליך של הנדסה גנטית.



פלסמיד מהונדס

בסוף שלב זה ברשותנו פלסמיד, הנושא גן מהונדס המקודד להורמון הגדילה והיכול להתבטא בתא החיידק.

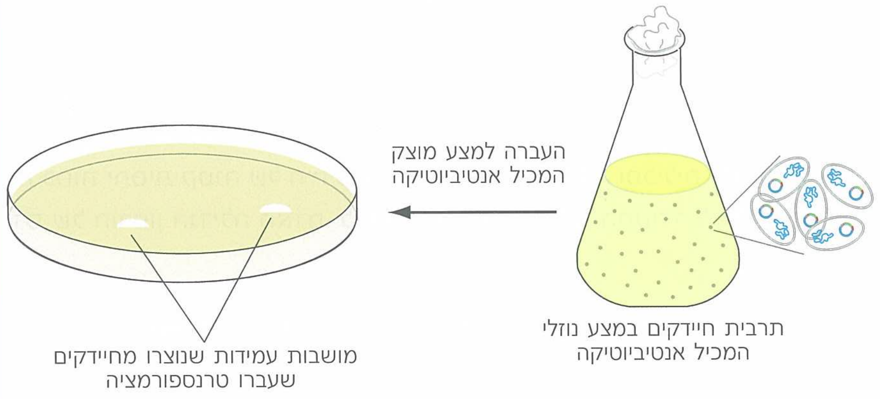
[3] היום, ברשות החוקרים מצוי מגוון גדול של פלסמידים שמכילים מראש אזורי בקרה שונים. כל מה שנשאר לעשות הוא לחבר לאותם פלסמידים את האזור המבני של הגן הרצוי ליד אזור הבקרה.

הכנסת הנשא לתוך החיידק

חיידקים יכולים לקלוט מולקולות DNA מתוך מצע המזון שבו הם נמצאים, בתהליך הנקרא טרנספורמציה. אפשר להגביר את יכולת החיידקים לקלוט DNA על ידי טיפולים כימיים או חשמליים שמשנים את חדירותו של קרום החיידק.
אך גם בתנאים מיטביים, כאשר מוסיפים את הפלסמיד המהונדס לתרבית חיידקים שהוכשרו לקראת הטרנספורמציה, רק אחוז קטן מאוד מהחיידקים יקלטו אותו. כיצד נבודד את החיידקים שקלטו את הנשא כדי שרק אותם נוכל להמשיך ולגדל?

שימוש בגן בורר

גן בורר הוא גן שמאפשר לברור מכלל החיידקים את אלו שקלטו את הפלסמיד המהונדס, היות שרק הם שורדים. בדרך כלל משתמשים בגן המקנה עמידות לאנטיביוטיקה, ואותו מחברים לפלסמיד המהונדס. כאשר מגדלים את החיידקים במצע שמכיל אנטיביוטיקה מתאימה, רק החיידקים שעברו טרנספורמציה ורכשו את הגן לעמידות יתרבו. כל חיידק מתרבה ויוצר מושבה המורכבת מחיידקים זהים. את המושבות אפשר לראות ללא מיקרוסקופ.

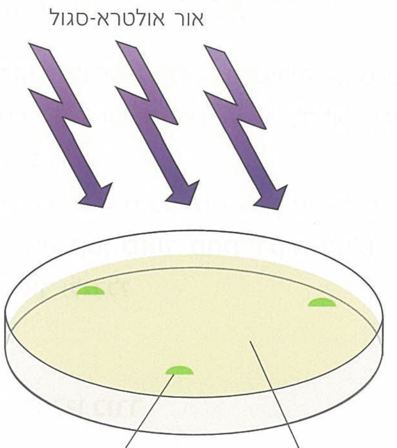


שימוש בגן בורר לזיהוי מושבות שעברו טרנספורמציה

שיטה נוספת שמשתמשים בה לעתים ביחד עם הגן הבורר היא שימוש בגן מדווח.

שימוש בגן מדווח

גן מדווח הוא גן היוצר תוצר שקל לזהות אותו, כמו למשל צבע או זהירה. אם נחבר גן מדווח לנשא המהונדס שהכנו (מובן שגם לגן המדווח צמוד אזור בקרה המתפקד בתאי חיידקים), רק החיידקים שמכילים את הנשא המהונדס יהיו זוהרים או בעלי צבע.
כדי לזהות את החיידקים שעברו טרנספורמציה, מפזרים על גבי מצע מזון מוצק המכיל אנטיביוטיקה את החיידקים שעברו טרנספורמציה. אפשר להבחין בצבע או בזהירה של המושבות שמתקבלות כתוצאה מביטויו של הגן המדווח. בדרך זו אנחנו יכולים לאשר שהמושבות העמידות לאנטיביוטיקה אכן מכילות את הנשא המהונדס.



שימוש בגן מדווח לזיהוי מושבות שעברו טרנספורמציה

שאלה 2

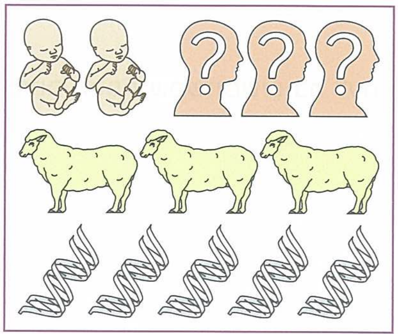
חזרו לתשובתכם למשימה 1 שבעמוד 18 והסבירו מדוע היה צורך להנדס עכבר זוהר.

בסוף שלב זה

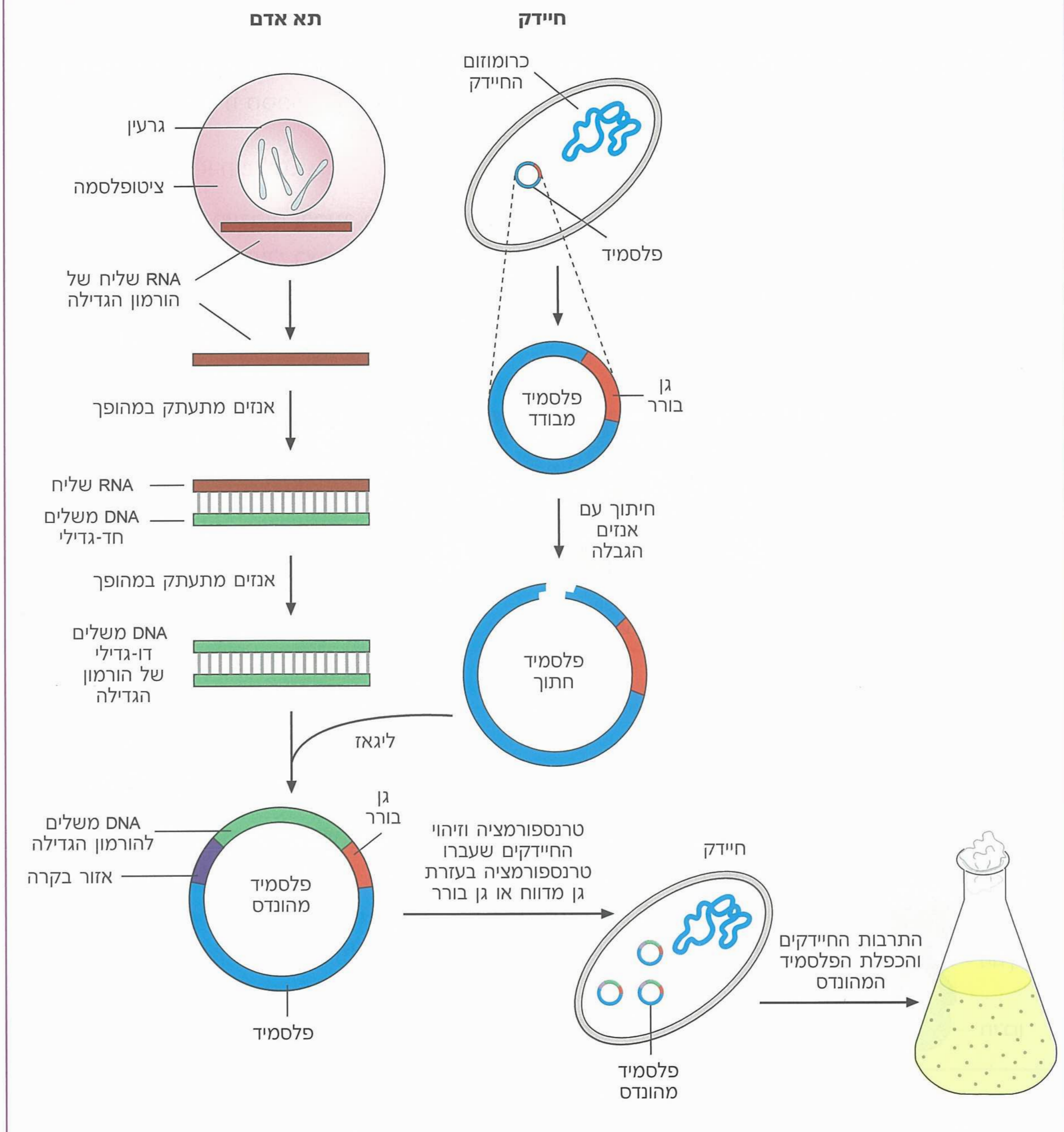
ברשותנו כמות יחסית קטנה של חיידקים שעברו טרנספורמציה ומכילים בחומר התורשתי שלהם את הגן המהונדס של הורמון הגדילה מאדם. למעשה שיבטנו את הגן המקודד להורמון הגדילה בחיידקים.

בעמוד הבא אפשר לראות סיכום של כל שלבי תהליך ההנדוס של הגן להורמון גדילה.

מה בין שיבוט להנדוס?



שיבוט (cloning) פירושו יצירת עותקים זהים או יצירת שבט. משתמשים במושג שיבוט כדי לתאר שני תהליכים שונים: יצירת עותקים זהים של מולקולת DNA, ויצירת יצורים, חד-תאיים או רב-תאיים, הזהים מבחינה גנטית. הכבשה דולי הייתה תוצר השיבוט הראשון של יונק, היות שהייתה זהה לחלוטין לאמה הגנטית. במקרים מסוימים שיבוט יכול להתרחש באופן טבעי: כל החיידקים המצויים במושבת חיידקים שמקורה בחיידק בודד, הם למעשה שבט אחד; כאלה הם גם ייחורים שנוצרו מצמח אחד או תאומים זהים. במעבדה אנחנו מהנדסים את ה-DNA לצורך שיבוטו בחיידקים.



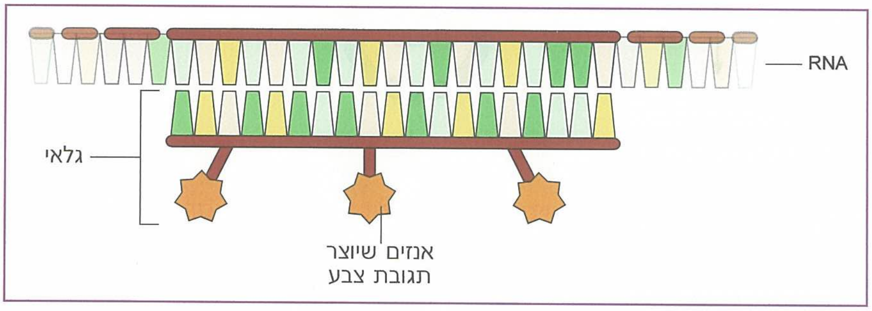
סיכום תהליך השיבוט של הורמון הגדילה מאדם בחיידקים

בדיקת הביטוי של הגן המקודד להורמון הגדילה

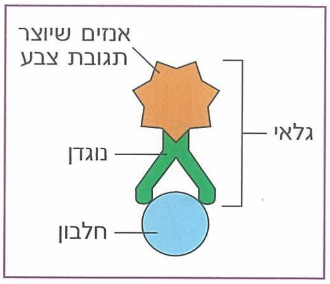
למרות שבשלבים שביצענו עד כה, שיבטנו חיידקים שהגן המקודד להורמון הגדילה חדר אליהם, עלינו לוודא שהגן אכן מתבטא בהם. לפנינו מספר אפשרויות:

בדיקה ברמת ה-RNA השליח:

אפשר לפרק חלק מהחיידקים ולהגיב את ה-RNA שבתאיהם עם גלאי ייחודי שיוצר תגובת צבע. הגלאי מכיל קטע DNA חד גדילי, או RNA, בעלי רצף משלים לרצף של ה-RNA השליח של הורמון הגדילה. אם אכן ה-RNA השליח הזה נוצר בתאים, הגלאי ייצמד אליו באופן ייחודי (A-U, C-G), ותופיע תגובת צבע. מכאן אפשר יהיה להבין שהגן עובר תעתוק בתאי החיידק.



בדיקה ברמת החלבון:



אם הגן מתבטא, ייווצר חלבון, שהוא הורמון הגדילה. לפעמים החלבון שנוצר מופרש מתאי החיידקים, לפעמים יש לפרק את החיידקים על מנת לגלות אותו. אפשר לזהות חלבונים בעזרת גלאי המורכב מנוגדנים הנקשרים לחלבון באופן ייחודי. אל הנוגדנים הללו קושרים אנזים היוצר תגובת צבע. הופעת צבע תצביע על נוכחות החלבון.

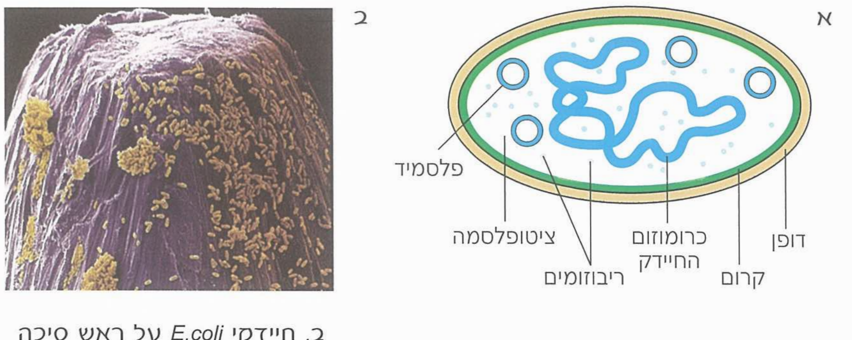
בהמשך יש צורך לבדוק את רמת הדמיון בין המבנה והפעילות של ההורמון המהונדס למבנה ולפעילות של ההורמון הטבעי. למרות שרצף ה-DNA המקודד להורמון זהה בשניהם, ייתכנו הבדלים במבנה המרחבי של החלבון שנוצר, הנגרמים על ידי שינויים שמתרחשים לאחר התרגום (ראה עמוד 17). שינויים אלה יכולים להיות שונים באורגניזמים שונים.

משימה 2

1. רשמו תרשים זרימה מפורט של תהליך השיבוט של גן המקודד לחלבון כלשהו באדם. השתמשו במושגים: RNA שליח, DNA משלים, אנזים מתעתק במהופך, אנזים הגבלה, ליגאז, נשא, פלסמיד, טרנספורמציה, אזור בקרה, חיידקים, גן בורר, גן מדווח, גלאי, חלבון, תרבית חיידקים.
2. הסבירו את המשפט: "ההנדסה הגנטית ממחישה את האוניברסליות של הצופן הגנטי".
3. הסבירו את הצורך בבדיקת הדמיון בין ההורמון המהונדס להורמון הטבעי (מעבר לבדיקת הזהות בין רצפי החומצות האמיניות שלהם). הציעו שיטה אפשרית לבדיקת הדמיון ברמה תפקודית.

גידול חיידקים בכמויות גדולות

תא חיידק הוא תא קטן (אורכו כ-1 מיקרומטר) בעל קרום תא ודופן תא, אך נטול קרומים פנימיים בציטופלסמה. גם החומר התורשתי של החיידק הוא פשוט באופן יחסי ומורכב ממולקולה אחת של DNA (כרומוזום החיידק) ומפלסמידים. מבנה פשוט וקטן זה מאפשר לחיידקים קצב התרבות מהיר מאוד. חיידקים מתרבים ברבייה אל-זוויגית: תא החיידק מתחלק לשניים, ליצירת שני חיידקים חדשים וזהים לחיידק שממנו נוצרו. החיידק ***E. coli***, חיידק החי גם במערכת העיכול שלנו ונעשה בו שימוש רב במחקר, מתחלק בתנאים מיטביים כל 20 דקות.



א. מבנה של תא חיידק

ב. חיידקי *E.coli* על ראש סיכה
(צולם במיקרוסקופ אלקטרונים סורק)

במהלך גידול החיידקים גם הפלסמידים מתרבים בתוכם. מחיידק בודד שקלט מולקולה אחת של פלסמיד מהונדס עם הגן של הורמון הגדילה, אפשר לקבל תוך מספר שעות מיליוני עותקים זהים של הגן. למעשה, שיבטנו בחיידקים את הגן המהונדס המקודד להורמון הגדילה.

בסוף שלב זה

ברשותנו כמות גדולה של חיידקים, המכילים עותקים רבים של הגן המקודד להורמון הגדילה של אדם ומבטאים אותו.

בהמשך, בייצור התעשייתי, מגדלים את החיידקים המהונדסים בתנאים סטריליים בתוך ביוריאקטורים, עם אספקה מבוקרת של חומרי מזון, טמפרטורה מתאימה ואוורור. אם ההורמון מופרש מהתא, אוספים את מצע המזון ומנקים ממנו את ההורמון. אם ההורמון המיוצר מצטבר בתאי החיידקים, יש צורך לאסוף את החיידקים ולפרק את תאיהם על מנת להפיק את ההורמון.

מה הם היתרונות של הפקת ההורמון בחיידקים?

חיידקי *E. coli* מתרבים מהר יחסית לתאים איקריוטיים, בתרביות שבאופן יחסי קל וזול לגדלן גם בקנה מידה גדול, מכיוון שצרכיהם התזונתיים פשוטים יחסית. הם מכילים פלסמידים שיכולים לשמש כנשאים יעילים של גנים. דרך ההתרבות של החיידק ושל הפלסמידים שבתוכו מבטיחה יצירת עותקים זהים של הגן בכמות גדולה. הגידול המהיר בתנאים זולים למדי מאפשר הפקה תעשייתית נוחה של התוצר החלבוני. מנגד, מכיוון שמדובר בתאים פרוקריוטיים, לא מתבצעים בהם תהליכי עריכה ושחבור של RNA, ועיבוד החלבון לאחר שלב התרגום לא נעשה בדומה לתאים איקריוטיים.

הורמון הגדילה המהונדס משמש מזה 16 שנה לטיפול בילדים נמוכים בצורה קיצונית שגופם אינו מייצר את ההורמון באופן טבעי, וכן לטיפול במספר מחלות אחרות הקשורות בבלימת הגדילה. כ-200 אלף ילדים בשנה מקבלים את הטיפול בכל העולם. משטר הטיפולים כולל זריקה מדי יום, במשך כמה שנים.

החברות הביוטכנולוגיות המשווקות את ההורמון המהונדס מנסות לשפר את המוצר מבחינת נוחות השימוש בו, כמו פיתוח מזרקים אוטומטיים וידידותיים למשתמש, או פיתוח גופיפים מיקרוסקופיים המוחדרים לגוף והמשחררים את ההורמון באטיות.

שאלה 3

1. מדוע אי אפשר לשווק את הורמון הגדילה בצורת גלולות?
2. האם מוכרות לכם מחלות נוספות, הנובעות מעיכוב בהפרשת הורמונים? הביאו דוגמאות והציגו את דרך הטיפול בהן.
3. השתמשו בתרשים הזרימה המובא בסוף פרק א של מבנית המבוא (בעמוד 10), והתאימו אותו למקרה של הורמון הגדילה.
4. מה הם ההיבטים הדומים והשונים בין מקרה האריתרופויטין המתואר בפרק א למקרה הורמון הגדילה המתואר כאן?

מזרק ידידותי למשתמש עם הורמון גדילה

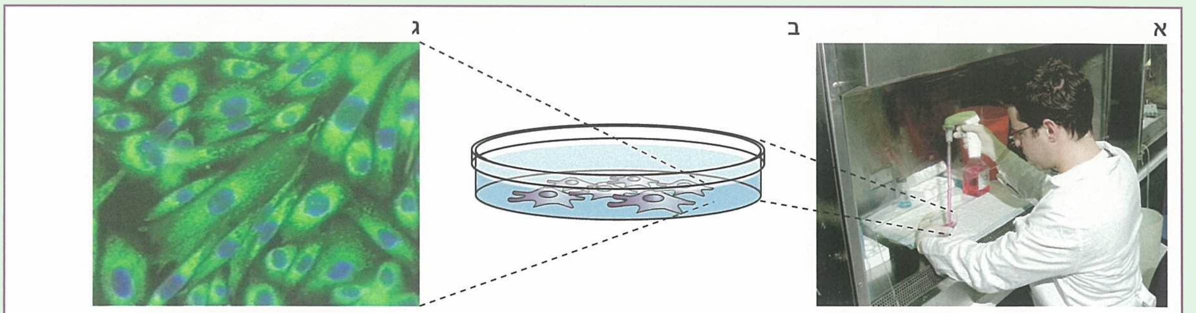
ב4 - ביטוי DNA מהונדס בתרביות תאים של בעלי חיים

כשהשוויתם את דרך היצירה של הורמון הגדילה המהונדס (בעמ' 30-20) ושל האריתרופואטין המהונדס (בעמ' 9-8), בוודאי שמתם לב שהראשון מופק בחיידקים ואילו השני בתרבית תאים של בעלי-חיים. מהי משמעות הדבר? הורמון הגדילה הוא הורמון קטן יחסית, שאינו דורש תהליכים משמעותיים של עיבוד לאחר התרגום. לעומתו האריתרופואטין הוא חלבון גדול יותר, שקשורות אליו קבוצות סוכר המשפיעות על פעילותו הביולוגית ועל קצב הפירוק שלו בגוף. בחיידקי *E. coli* אין מתבצע תהליך הקישור של מולקולות הסוכר למולקולת האריתרופואטין לאחר התרגום. לשם כך יש לייצר את החלבון בתאים של יונק, שהם בעלי אנזימים שמסוגלים לקשור את קבוצות הסוכר בצורה המתאימה. היות שחלק גדול מהחלבונים המהונדסים שמעוניינים ליצור מקורם באדם, יש לכך יתרון ברור. אולם התנאים הנחוצים לגידול תאים של בעלי חיים בתרבית רקמה שמנותקת מהגוף מורכבים ויקרים הרבה יותר מתנאי הגידול של חיידקים.

הרחבה

תרביות תאים של בעלי חיים

אפשר לבודד תאים מתוך רקמה ולגדלם במנותק מהגוף בתרבית תאים. ניסויים רבים דרושים על מנת לקבוע מהו סוג המצע והתנאים הדרושים לגידול כל סוג של תא. ישנם בגוף תאים שקל לגדלם בתרבית – אלה תאים שקצב התרבותם בגוף הוא גבוה, ותאים אחרים שקשה ליצור מהם תרבית תאים, למשל תאי עצב אשר לרוב אינם מתרבים בגוף. את התאים מגדלים בתרבית בתוך אינקובטורים שבהם אפשר לווסת את הטמפרטורה, את הלחות, ואת הרכב הגזים. הגידול והטיפול בתרביות התאים חייב להיעשות בתנאים סטריליים לחלוטין, משום שכל חיידק, נגיף או פטרייה שיחדרו לתרבית, ימשיכו להתרבות בתנאים המשופרים שהיא מספקת ועלולים לגרום להרג התאים.



א. עבודה במנדף סטרילי

ב. תאים בתרבית יוצרים שכבה על קרקעית צלחת שבה מצע מזון נוזלי

ג. תאים הגדלים בתרבית (חלבוני שלד התא נצבעו עם נוגדנים זוהרים והגרעיניים נצבעו עם צבע זוהר הנקשר ל- DNA)

אחד מסוגי התאים המצויים בשימוש במחקר ובתעשייה הם תאים שמקורם בשחלה של אוגר. לתאים אלו דרושים חומרי מזון זולים יחסית, והם יכולים לשגשג גם בנפחים תעשייתיים של אלפי ליטרים.

היום משתמשים בתרביות תאים מבעלי חיים לייצור מספר רב של חלבונים מהונדסים, המיועדים לטיפול באדם.

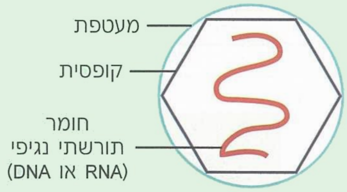
לדוגמה

- גורמי קרישה (פקטור 8, פקטור 9) הניתנים לחולי המופיליה, שמנגנון הקרישה שלהם אינו פועל בצורה תקינה בשל חסר בגורמי קרישה.
- סוגים שונים של אינטרפרון, שהינו חלבון המופרש מתאי הגוף ופועל כנגד נגיפים, גידולים סרטניים ומחלות אחרות.
- מפעיל פלסמינוגן רקמתי - חומר המשמש להמסת קרישי דם וניתן בין השאר כטיפול במקרה של אוטם שריר הלב.

שימוש בנגיפים להכנסת גנים לתוך תאים

היום מקובלות מספר שיטות להכנסת גנים לתוך תאים של בעלי-חיים וביניהן גם שימוש בנגיפים כנשאים. כדי להשתמש בנגיפים להכנסת גנים מהונדסים לתא, יש להנדס תחילה את הגנום של הנגיף, על מנת להוציא ממנו את הגנים שעלולים לגרום נזק לתא המודבק. משאירים בתוך הגנום של הנגיף רק את הגנים שמאפשרים את חדירתו לתא (ולפעמים גם לתוך הגנום של התא המאכסן) ואת אזור הבקרה של הגנים שהוצאו. פירושו של דבר, שעל ידי שיטות של הנדסה גנטית אנחנו מרוקנים את הנגיף מתוכנו המזיק והופכים אותו לאריזה נוחה שמעבירה את הגן המהונדס לייעודו.

כאשר מהנדסים את הגן לתוך הנגיף, מחברים אותו לרוב לאזור הבקרה של הגנים של הנגיף: אזור בקרה זה מאפשר ביטוי מוגבר של הגנים בתוך התאים המודבקים. תהליך ההדבקה דורש ערבוב של תאי המטרה עם הנגיף המהונדס בתוך תמיסה בעלת הרכב מתאים - הנגיף נצמד אל התאים באופן ייחודי וחודר לתוכם.



שאלה 4

1. אילו רקמות ניתן לדעתכם לגדל בתרבית תאים? נמקו את תשובתכם.
2. אילו תנאים צריך לספק לתאים? ליד כל תנאי רשמו אילו מערכות בגוף בעלי החיים אחראיות להשגתו.
3. מה הן התכונות המכשירות מולקולה לשמש כנשאית לגן שמוחדר לתוך תאים מבעלי חיים הגדלים בתרבית?

פרק ג - יצירת אורגניזמים מהונדסים: צמחים ובעלי חיים

אורגניזם מהונדס (טרנסגני) הוא אורגניזם שלתוכו הוכנס גן שמקורו באורגניזם ממין אחר או גן שמקורו באותו המין, לאחר שעבר שינוי במעבדה. בעקבות הכנסת הגן מופיעות באורגניזם המהונדס תכונות חדשות.

בפרק הזה נדון ביצירה של אורגניזמים איקריוטיים (צמחים ובעלי חיים) מהונדסים גנטית. אמנם נדון בעיקר ביצירת תירס וכותנה מהונדסים העמידים בפני חרקים, שנמנים עם היישומים המסחריים הראשונים של אורגניזמים מהונדסים, אך העקרונות הנלמדים חלים גם על צמחים ובעלי חיים מהונדסים אחרים.

ג1 - יצירת צמחים מהונדסים

רעלן טבעי מגויס להדברה

הנזק הנגרם ליבולים חקלאיים על ידי חרקים מצריך הדברה כימית, הכרוכה בפגיעה במערכת האקולוגית ובהוצאות כספיות לחקלאי. בעקבות השימוש בחומרי הדברה, מופיעים חרקים בעלי עמידות לחומרי ההדברה, ולכן יש צורך בעלייה בתדירות ההדברה ובריכוז החומרים; כך נוצר מעגל קסם הפוגע בסביבה ובצרכן.

משימה 1

1. בעזרת התכנים שלמדתם בנושא האקולוגיה, הציגו בצורה מפורטת את הנזק הנגרם לסביבה על ידי ההדברה הכימית.
2. הציעו דרכים אפשריות לפתרון הבעיה.

הדברה ביולוגית של מזיקים עושה שימוש באורגניזמים שונים הפוגעים במזיק. כך למשל, השימוש באקריות[1] טורפות להדברת אקריות אדומות התוקפות גידולי תות שדה והשימוש בזחל החיפושית מושית השבע שטורף כנימות הפוגעות בוורד, הקטינו את הצורך בהדברה הכימית של הגידולים המעורבים. הדברה ביולוגית היא פתרון ידידותי לסביבה, אך על מנת ליישמו יש לגדל אוכלוסיות גדולות של חרקים טורפים ולהשתמש במספר מדבירים, לפי סוג המזיק המופיע בכל עונה. לכן פתרון זה אינו מעשי כאשר מדובר בגידולי שדה, המכסים שטח נרחב.

[1] **אקריות:** פרוקי רגליים זעירים.

שאלה 1

מדוע בהדברה ביולוגית יש צורך להכניס את החרק הטורף בכל עונה מחדש?

גישה אחרת של הדברה ביולוגית משתמשת בתכונות של חיידק הקרקע *Bt – Bacillus thurigensis*. החיידק התגלה במקרה לפני כ–100 שנה כאשר מגדלי טוואי המשי בסין הבחינו שהוא גרם לתמותת הזחלים. רק בשנות השלושים של המאה שעברה, במסגרת החיפוש אחר אורגניזמים הפוגעים באופן טבעי בחרקים מזיקים, התחילו לחקור את מנגנון השפעתו של החיידק על חרקים. מסתבר שהחיידק מייצר חלבון רעיל, המכונה רעלן, והפוגע בחרקים על ידי שיתוק מערכת העיכול שלהם. כתוצאה מכך החרקים מפסיקים לאכול ומתים בטווח שבין מספר שעות למספר ימים. עם הזמן התברר שזנים שונים של חיידקי Bt מפרישים רעלנים הפוגעים באופן ייחודי בחרקים מסוימים. למשל, זן של Bt שבודד בארץ בשנות השלושים ואף כונה *Bacillus thurigensis israeliensis*, פוגע במיוחד בזחלים של יתושים. עד היום נוהגים לרסס בהצלחה אזורים נרחבים של ביצות באמצעות ה"חיידק הישראלי" במלחמה להדברת המלריה. בדומה לרעלנים שפוגעים בזחלי היתושים, רעלנים אחרים שמקורם בחיידקי Bt מזנים אחרים נמצאו יעילים בפגיעה בזחלים של חרקים הפוגעים בצמחים בעלי ערך כלכלי.

אמנם הריסוס בחיידקי Bt מזיק פחות למערכת האקולוגית מריסוס כימי ואינו פוגע באדם, אך הוא עדיין מצריך השקעה מרובה ויעילותו נמוכה. רק זחלים בשלב התפתחותי מסוים נפגעים ממנו, ולכן יש לחזור על הריסוס מספר פעמים במשך עונת גידול. בשנת 1982 הצליחו חוקרים לבודד גן המקודד ליצירת הרעלן מתוך חיידק ה-Bt ולשבט אותו.

משימה 2

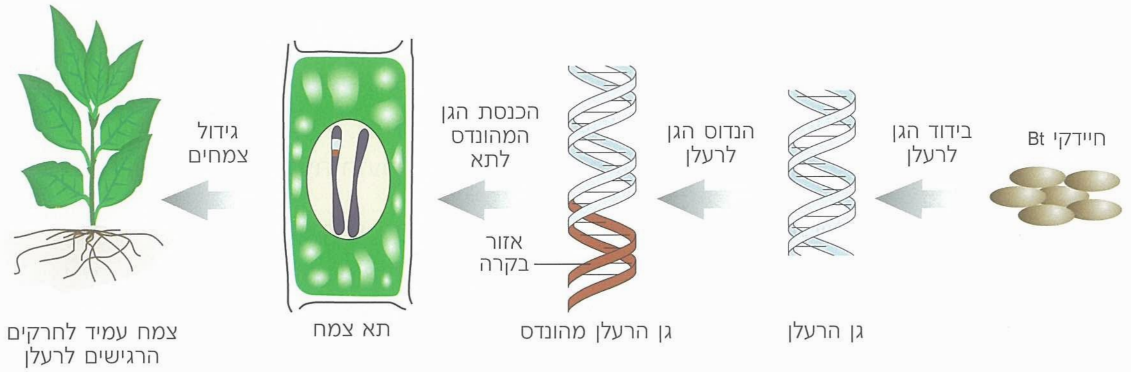
הציעו לפחות שני שימושים אפשריים בגן המשובט לרעלן של חיידקי ה-Bt על מנת לייעל את תהליך ההדברה של החרקים המזיקים. ציינו יתרונות וחסרונות לכל אחד מהשימושים שהצעתם.

צמחים מהונדסים עמידים לחרקים

בסוף שנות השמונים החלו ניסויים ליצירת צמחים מהונדסים, שיבטאו את הגן לרעלן של חיידקי ה-Bt בתאים שלהם. על ידי כך יהפכו הצמחים המהונדסים לעמידים לחרקים מזיקים, ולא יהיה צורך להשתמש בחיידקים עצמם להדברה.

על מנת להנדס צמח (לדוגמה, כותנה או תירס – הצמחים הראשונים שבהם נערכו מחקרי ההנדוס) המבטא את הגן לרעלן של חיידקי ה-Bt, יש לפעול במספר שלבים:

1. בידוד האזור המבני של הגן המקודד לרעלן.
2. הנדוס האזור המבני של הגן המקודד לרעלן כך שיתבטא בתאי הצמח.
3. הכנסת ה-DNA המהונדס לתאי הצמח (טרנספורמציה של תאי הצמח).
4. גידול התאים שעברו טרנספורמציה בתרבית רקמה, והפיכתם לצמחים בוגרים.



יצירת צמח עמיד לחרקים המייצר את רעלן ה- Bt

בידוד האזור המבני של הגן המקודד לרעלן

אפשר לבודד מתוך הגנום של חיידקי ה-Bt את הגן המקודד לרעלן. היות שמדובר בגן של חיידק שאותו אנו מעוניינים להנדס באורגניזם איקריוטי, אנחנו יכולים להשתמש לצורך ההנדוס בגן עצמו, בלי ליצור DNA משלים כמו במקרה של הנדוס הורמון הגדילה מאדם בחיידקים. על תהליך הבידוד של הגן אפשר לקרוא בפרק ההרחבה "הכנת ספרייה גנומית לצורך בידוד הגן המקודד לרעלן מחיידקי ה-Bt".

בסוף שלב זה

ברשותנו האזור המבני של הגן המקודד לרעלן של חיידקי ה-Bt.

הרחבה

הכנת ספרייה גנומית לצורך בידוד הגן המקודד לרעלן מחיידקי ה-Bt

עלינו לבודד מתוך הגנום של חיידקי ה-Bt את הגן המקודד לרעלן. לכאורה, מדובר במשימה לא פשוטה, הדומה לחיפוש מחט בערמת שחת. כדי להמחיש את דרך עבודתם של החוקרים, נשתמש במשל:

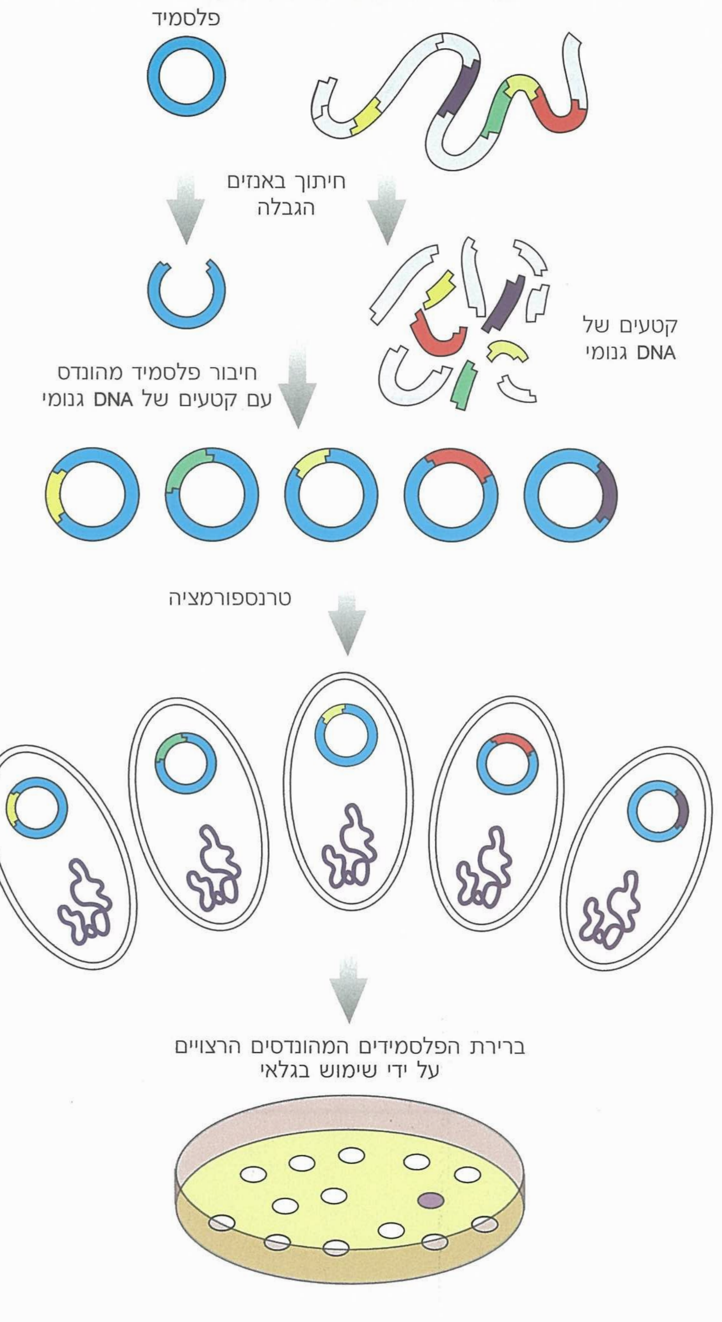
האגדה מספרת שהקוסם הגיש לנערה שהצילה אותו פרי עגול ואמר לה:
"רואה את? בפרי הזה יש אלפי זרעים. כולם יצמיחו עצים, אך רק זרע אחד מתוכם יצמיח את העץ הקסום שריח פרחיו מושך את ציפור גן העדן. אם תצליחי למצוא את העץ, אספי את הפרחים והם יביאו לך ולמשפחתך עושר רב."
"ואיך אדע לזהות מבין כל הזרעים את הזרע של העץ הקסום?" שאלה הנערה.
"אני סומך עליך, כבר הוכחת שאת חכמה."
הנערה חזרה לכפרה, חתכה את הפרי, לקחה את אלפי הזרעים וזרעה אותם בשדה, אחד אחד (משפחתה עזרה לה במלאכה). יער עבות צמח סביב הכפר. הגיע האביב, העצים פרחו, והנערה חיכתה. יום אחד הגיעה ציפור גן העדן. היא חגה בשמים והתיישבה על אחד העצים. למחרת חזרה הציפור לאותו העץ. אז ידעה הנערה שזה העץ הקסום ומעכשיו היא תהיה עשירה.

הגן המקודד לרעלן הוא אחד מהגנים הרבים הנמצאים בגנום חיידק ה-Bt. אפשר לחלק את הגנום של חיידק ה-Bt בין אלפי חיידקי *E. coli* ולגדל אותם על צלחות עם מצע מזון. כל אחד מחיידקי ה-*E. coli* ייצור מושבה - כל מושבה תכיל קטע אחר מגנום החיידק Bt. זוהי ספרייה גנומית שיצרנו בתוך חיידקים. עד לכאן אנו פועלים בדומה לנערה שפיזרה את הזרעים וגידלה את העצים. כיצד יודעים איזו מושבת חיידקים מכילה את הגן של הרעלן? (מהי ציפור גן העדן בניסוי שלנו?) למטרה זאת אפשר להשתמש בנוגדנים שהוכנו נגד חלבון הרעלן. (ראו עמוד 28) אלה יתקשרו באופן ייחודי לחלבון הרעלן הנוצר בחיידקים שמכילים בתוכם את הגן המקודד לרעלן. אל הנוגדנים הללו מצמידים בעוד מועד גלאי אשר ניתן לזהותו בעזרת תגובת צבע.

כדי ליצור ספרייה גנומית ולאתר את הגן המקודד לרעלן, ניתן לפעול בדרך הבאה:

1. מפיקים DNA מחיידקי Bt. חותכים את ה-DNA באמצעות אנזים הגבלה שבחרנו. בוחרים פלסמיד המתאים לשמש כנשא לקטעי ה-DNA שיצרנו ומשתמשים באותו אנזים ההגבלה כדי לחתוך את הפלסמיד.
2. מחברים את קטעי ה-DNA לפלסמיד החתוך בעזרת האנזים ליגאז. הפלסמידים המהונדסים מוחדרים בטרנספורמציה אל חיידקי *E. coli* (בצורה שתוארה בפרק הקודם). כל חיידק עובר טרנספורמציה באמצעות פלסמיד מהונדס יחיד, כלומר מכיל קטע DNA יחיד שמקורו בחיידק ה-Bt. התרבית מהווה עכשיו "ספריית" גנים של חיידק ה-Bt. בניגוד לספרייה עירונית שבה יש קטלוג למיקום כל ספר מוכר, בספרייה זאת אין יודעים איזה גן נמצא בכל חיידק.
3. מפזרים את החיידקים על מספר גדול מאוד של צלחות עם מצע מזון מוצק, כך שבכל צלחת כל חיידק יוצר מושבה המבודדת היטב מהמושבות האחרות.
4. מגיבים את המושבות עם נוגדנים כנגד רעלן של חיידקי ה-Bt, שמחוברים לאנזים היוצר תגובת צבע. רק מושבה שמכילה חיידקים שעברו טרנספורמציה עם הגן המקודד לרעלן ושהגן מתבטא בה, תיצור תגובת צבע בנוכחות הנוגדנים הללו.

5. מגדלים ומרבים את החיידקים של המושבה שאיתרנו. מתוכם מפיקים את ה-DNA ומבודדים את האזור המבני של הגן לרעלן של חיידקי ה-Bt.



שלבים עיקריים באיתור גן על ידי בניית ספרייה גנומית ושימוש בגלאי

שאלה 2

1. במה שונה דרך הבידוד של הגן לרעלן מדרך הבידוד של הגן להורמון הגדילה בפרק הקודם?
2. אם ניקח חיידק כלשהו מהספרייה הגנומית שיצרנו, הוא יכיל: (הקיפו את התשובות הנכונות)

   א. את כל הגנים של החיידק *E. coli*.

   ב. את כל הגנים של החיידק Bt.

   ג. רק קטע מסוים מהגנום של חיידק ה-*E. coli*.

   ד. רק קטע מסוים מתוך הגנום של חיידק ה-Bt.

הנדוס הגן המקודד לרעלן על מנת שיתבטא בתאי הצמח

משימה 3

כיצד אפשר להבטיח שגן הרעלן יתבטא בתאי הצמח?

בעזרת הידע שרכשתם בפרק הקודם, בחרו את האפשרויות הנכונות והסבירו את בחירתכם. כמו כן, הסבירו מדוע שללתם את שאר האפשרויות:

1. יש לחבר לגן הרעלן אזור מבני של גן הפועל בתאי צמח.
2. יש לחבר לגן הרעלן אזור בקרה של גן הפועל בתאי צמח.
3. יש לשבט את גן הרעלן ביחד עם אזור הבקרה המקורי שלו בחיידק הבצילוס כדי להבטיח את ביטוי הגן בתאי הצמח.
4. מכיוון שהצופן הגנטי הוא אוניברסלי, אין צורך לבצע כל פעולה נוספת.
5. יש לחבר לגן המקודד לרעלן אזור בקרה מחיידקים, שמאפשר ביטוי חזק של הגן בתאי הצמח.
6. יש לחבר את גן הרעלן לנשא שיכול לחדור לתאי הצמח.
7. יש לחבר לגן הרעלן גן עמידות לאנטיביוטיקה.

אם פעלתם נכון –

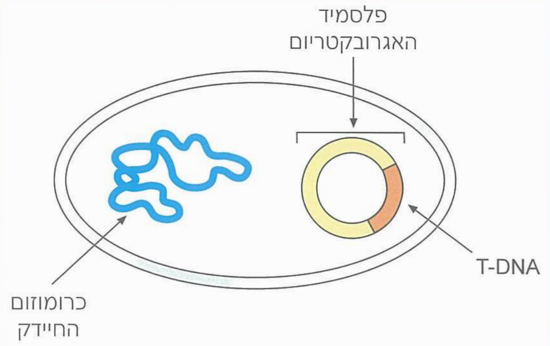
בסוף שלב זה

ברשותנו גן מהונדס של רעלן של חיידקי ה-Bt היכול להתבטא בתאי הצמח.

הכנסת הגן המהונדס לתאי הצמח

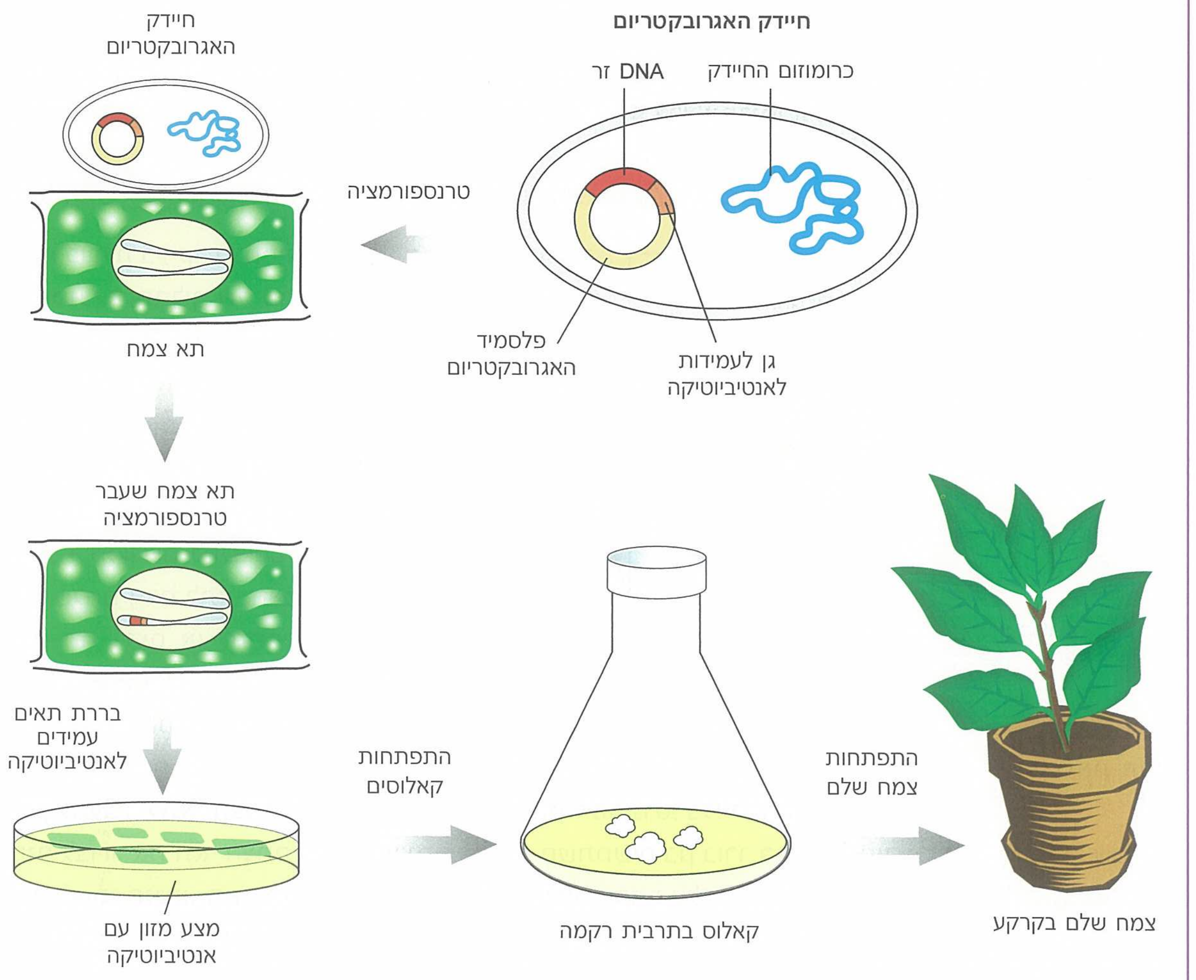
כדי שגן הרעלן ימשיך להתבטא לאורך זמן בכל תאי הצמח הבוגר, יש להכניס אותו לתאים כך שהוא ישתלב באופן יציב בגנום. קיימות היום שתי שיטות עיקריות שבאמצעותן ניתן לבצע טרנספורמציה של תאי צמח:

טרנספורמציה באמצעות החיידק *אגרובקטריום טומפציאנס* (*Agrobacterium tumefaciens*)



איור סכמתי של חיידק האגרובקטריום

שיטה זו פועלת בעיקר בצמחים דו-פסיגיים (כותנה, עגבניות, טבק) ומנצלת תהליך של טרנספורמציה המתרחש באופן טבעי.
אגרובקטריום הוא חיידק קרקע החודר לרקמות הצמח, בעיקר דרך רקמות פצועות ויוצר עפצים. הוא נושא בתוכו פלסמיד, שקטע ממנו (המכונה T-DNA) עובר לתאי הצמח ומשתלב באופן יציב בגנום התא. גנים הנמצאים על גבי ה-T–DNA מקודדים לחלבונים הגורמים נזק לרקמת הצמח: הביטוי שלהם גורם לתאי הצמח להפריש חומרים הנחוצים לתזונת החיידקים או להתפתחות עפצים – גידולים בגוף הצמח – שבהם מתרבים חיידקי האגרובקטריום. על ידי החלפת הגנים המקודדים לחלבונים המזיקים לצמח, בגן שאותו אנו מעוניינים להנדס לצמח, למשל הגן לרעלן שמקורו בחיידק ה-Bt, נוכל ליצור נשא המשלב את הגן הרצוי ב-DNA של הצמח. הכנת הנשא בדרך זאת תגרום לחיידק להעביר לתאי הצמח קטע DNA שמכיל את הגן המהונדס, בלי להזיק לתאי הצמח.
על מנת לברור את תאי הצמח שעברו טרנספורמציה, משתמשים בגן בורר המקנה עמידות לאנטיביוטיקה, שגם הוא מחובר לאותו הנשא. תאי צמח שלא עברו טרנספורמציה ייפגעו על ידי האנטיביוטיקה וימותו. רק התאים שעברו טרנספורמציה ישרדו. תאים אלה יכילו גם את הגן המקנה עמידות לאנטיביוטיקה וגם את הגן הרצוי, למשל הגן לרעלן.
משתמשים באגרובקטריום כדי לייצר, לדוגמה, כותנה עמידה לחרקים. מחברים את הגן המהונדס והמקודד לרעלן של חיידקי ה-Bt שיצרנו בשלב הקודם ל-DNA של פלסמיד האגרובקטריום. מדביקים באגרובקטריום המכיל את הפלסמיד המהונדס, קטע מרקמת עלה הכותנה. החיידק חודר לתאים הפצועים שבהיקף הרקמה, הפלסמיד המהונדס משתלב ב-DNA של התאים בהיקף הרקמה, והם הופכים עמידים לאנטיביוטיקה. הוספת אנטיביוטיקה לתרבית שבה גדלה הרקמה, מאפשרת את המשך ההתרבות של התאים המהונדסים בתרבית בלבד. בהתחלה הם יוצרים גושי תאים לא ממוינים, ובהמשך אפשר ליצור מגושים אלה צמחים שלמים (כפי שיוסבר בהמשך).



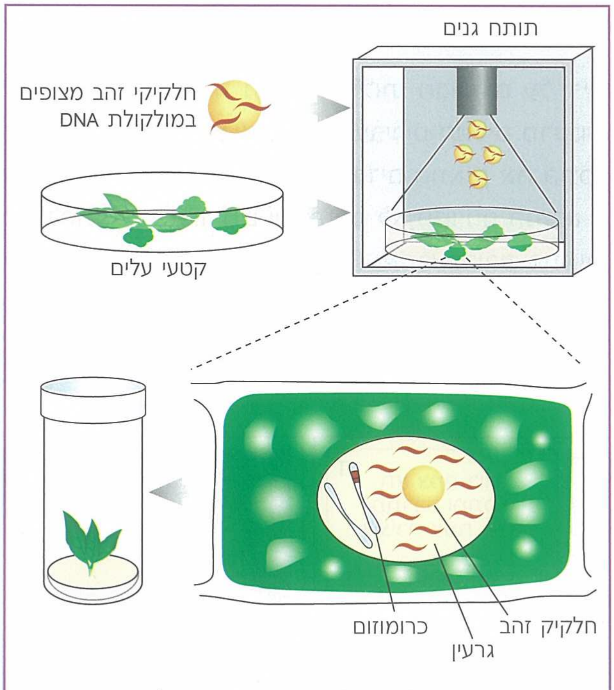
טרנספורמציה באמצעות אגרובקטריום – ה-DNA הזר הוא הגן לרעלן

טרנספורמציה ביוליסטית

הטרנספורמציה באמצעות אגרובקטריום אינה יעילה בצמחים חד-פסיגיים (חיטה, תירס, שעורה, אורז) ולכן אי אפשר להשתמש בה לצורך יצירת תירס עמיד להרקים. לטרנספורמציה של חד-פסיגיים נהוג להשתמש בשיטה אחרת, השיטה הביוליסטית (בליסטיקה היא תורת הירי).

בשיטה הביוליסטית משתמשים ב"תותח גנים". התותח מפציץ את תאי הצמח באמצעות חלקיקי מתכת (טונגסטן או זהב) מיקרוסקופיים שצופו בעותקים רבים של הגן המהונדס. החלקיקים מקבלים תנופה בעת ה"הפצצה" וחודרים לתאי הצמח. בסביבה המימית של תוך התא ניתקות מולקולות ה-DNA מחלקיקי המתכת ויכולות להשתלב אקראית בכל מקום בגנום התא. בשיטה זאת משתמשים לביצוע טרנספורמציה לדגנים שהם חד-פסיגיים, לצמחים דו-פסיגיים, ולתאים של בעלי-חיים.

גם בטרנספורמציה ביוליסטית יש צורך לברור את התאים שעברו טרנספורמציה בעזרת גן בורר.



טרנספורמציה באמצעות הפגזה ביוליסטית

בסוף שלב זה

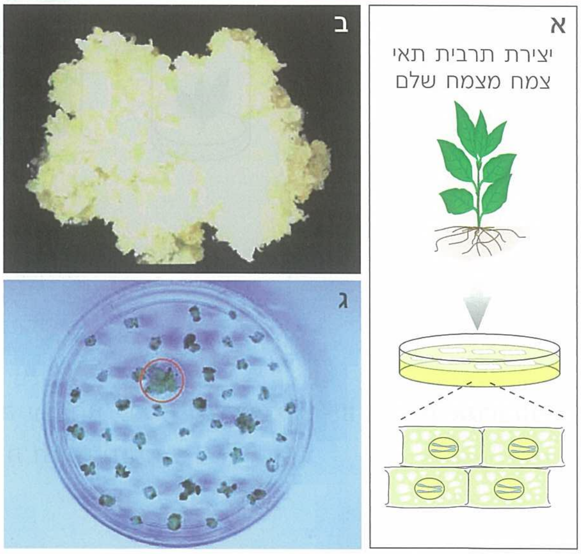
ברשותנו תאים של כותנה שעברו טרנספורמציה עם הגן לרעלן של חיידק ה-Bt בעזרת אגרובקטריום ותאים של תירס שעברו טרנספורמציה כזו בעזרת תותח גנים.

משימה 4

ציינו מה הדומה ומה השונה בין שתי השיטות לטרנספורמציה של תאי צמח.

גידול תאי צמח שעברו טרנספורמציה בתרביות רקמה והפיכתם לצמחים בוגרים

המבנה והתפקוד של רקמות שונות בצמח וצורת הצמח בכללותו מבוקרים על ידי הורמונים צמחיים המופרשים מאזורים שונים של הצמח (הניצנים, השורש, הפרי). כאשר מעבירים קטעים מרקמות שונות בצמח לצלחות פטרי עם מצע שמכיל ריכוזים מתאימים של הורמונים צמחיים, מאבדים התאים את התכונות הייחודיות שלהם והופכים לתאים לא ממוינים, הממשיכים להתחלק וליצור גוש של תאים לא ממוינים הנקרא קאלוס.
אחרי טרנספורמציה (באמצעות אגרובקטריום או תותח גנים) ואחרי ברירת התאים שמכילים את הגן המהונדס, יוצרים מתאים אלה קאלוסים, שתאיהם מכילים את הגן המהונדס.
אפשר, על-ידי הוספת הורמונים מתאימים, לגרום להתמיינות הדרגתית של הקאלוס המהונדס לצמח שלם.



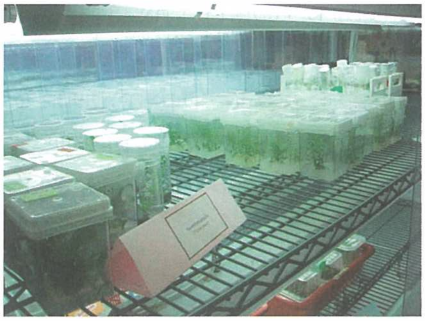
א - תרשים המתאר יצירת תרבית תאים
ב - קאלוס שהתפתח מתא צמח בודד
ג - בידוד קאלוסים עמידים לאנטיביוטיקה באמצעות מצע המכיל אנטיביוטיקה. קאלוס עמיד (מסומן בעיגול), ממשיך להתפתח, קאלוסים רגישים לאנטיביוטיקה מתים.

ד - שלבים ביצירת צמח מהונדס מתרבית רקמה
ה - התחלת ההתמיינות של קאלוסים והופעת שורשים
ו - צמחון שהתפתח מקאלוס

בסוף שלב זה

ברשותנו צמחי תירס וצמחי כותנה שבגנום שלהם משולב הגן המהונדס לרעלן של היידקי ה-Bt.
את הצמחים מגדלים תחילה בתנאי חממה ובהמשך מעבירים אותם בהדרגה לתנאי שדה.

שאלה 3


גידול תרביות רקמה בתנאים סטריליים

1. גידול קאלוס בתרבית רקמה מצריך תנאים מבוקרים היטב. אילו תנאי גידול של התאים הצמחיים בתרבית חשוב לבקר? נמקו את קביעתכם בעזרת הידע שרכשתם על המאפיינים של תאי צמח.
2. א. שימו לב לצבעו הלבן של הקאלוס באיורים קודמים. האם תאי צמח שגדלים במצב של קאלוס ניזונים בהזנה אוטוטרופית או הטרוטרופית? האם קיים שלב דומה בחיי צמח שמתפתח באופן טבעי?
   ב. מה, אם כן, צריך להכיל מצע שבו מגדלים קאלוס?

היות שהמצע של תרביות רקמה מותאם לצרכים של תאים הטרוטרופיים, מזהמים כמו פטריות וחיידקים עלולים להתרבות בו במהירות. לכן יש להקפיד על עבודה בתנאים סטריליים שכוללת שימוש בכלים סטריליים חד פעמיים, תמיסות שעוברות עיקור, ועבודה בתוך מנדף סטרילי, שבו נמנעת חדירת מיקרואורגניזמים לתרבית.

שאלות ותשובות חשובות על צמחים מהונדסים

היכן משתלב הגן המהונדס בגנום התא?

כמעט בכל שיטות ההנדוס הנהוגות היום ההשתלבות של ה-DNA המהונדס בגנום היא אקראית. כאשר ה-DNA הזר חודר לתוך אזור מבני או לתוך אזור בקרה של גן אחר, סביר להניח שפעילותו של האחרון נפגעת, והאורגניזם יכול להינזק. אם אזור הבקרה של הגן המהונדס חודר בקרבת גן אחר, הדבר עלול להשפיע על הגברת הביטוי של אותו גן או על עיכובו. אך חשוב לזכור שרק חלק קטן מהגנום של צמחים ובעלי חיים מורכב מגנים, כך שבאופן סטטיסטי קיים סיכוי רב יותר שהגן המהונדס יחדור לאזור חסר גנים. בנוסף נעשים היום מאמצים רבים, חלקם כבר מוכתרים בהצלחה, לכוון את חדירת הגן המהונדס למקום מסוים בגנום.
האזור שאליו חודר הגן המהונדס משפיע גם על יעילות התעתוק שלו עצמו, מכיוון שישנם אזורים בחומר התורשתי העוברים תעתוק ביעילות נמוכה יותר מאזורים אחרים. לכן כל תא שעובר טרנספורמציה ויוצר בהמשך צמח מהונדס, הוא אירוע אקראי ועצמאי שיש לבדוק אותו מבחינת רמת הביטוי של הגן ומבחינת סך כל התכונות של הצמח הנוצר ממנו.

היכן בצמח נמצא הגן המהונדס?

כאשר יוצרים צמח מהונדס כל התאים שלו, וביניהם גם תאי הרבייה, מכילים בדרך כלל את ה-DNA הזר. הדבר עלול לגרום להפצת הגן הזר לצמחים אחרים, והוא מעורר חששות רבים מבחינה אקולוגית. גרגירי האבקה (הגמטות הזכריות) של צמח שתאיו מכילים את הגן המקודד לרעלן של חיידקי ה-Bt, יכולים לעבור בתהליך ההאבקה לצמחים אחרים מאותו המין או אף לצמחי בר ממינים קרובים. כתוצאה מכך התכונה לעמידות עלולה להתפשט ולגרום להופעת צמחים עמידים, שיגרמו להפרת שיווי המשקל האקולוגי או לנזק לחקלאות. כדי להתמודד עם בעיה זאת, מקפידים שצמח מהונדס ה"משוחרר" לשדה יהיה עקר. יש היום מחקרים המנסים להחדיר את הגן המהונדס לגנום הכלורופלסט, היות שאין כלורופלסטים בגרגירי האבקה. עוד תוכלו לקרוא על הנושא הזה במאמר "ביטוי רעלן של חיידק ה-Bt בצמחי טבק מקנה לצמחים עמידות נגד חרקים".

היכן בצמח מתבטא הגן המהונדס?

מקום הביטוי וזמן הביטוי של הגן המהונדס תלוי באזור הבקרה שחובר אליו. למשל, כאשר מהנדסים צמחים עמידים לחרקים, רצוי שכל חלקי הצמח שיכולים לשמש כמזון לזחלים יבטאו את הרעלן. מנגד, ישנם מקרים שבהם מעוניינים שהגן המהונדס יתבטא רק ברקמות מסוימות. כך למשל, אפשר להנדס צמחי עגבנייה שיבטאו אנטיגן של נגיף הצהבת רק בתוך הפרי. כיום משתדלים המדענים לפתח אזורי בקרה המתאימים למטרות ספציפיות, כמו אזורי בקרה שמאפשרים את הביטוי של הגן המהונדס בתנאי סביבה מסוימים, או אזורי בקרה שמאפשרים את ביטוי הגן ברקמות הרצויות בלבד. במסגרת זו נערכים ניסויים לכוון את הביטוי של גנים המקודדים לחיסונים נאכלים בפירות, רק בזמן ההבשלה של הפרי.

התכונה של עמידות לאנטיביוטיקה – יתרון או חיסרון?

בדרך כלל גן המקנה עמידות לאנטיביוטיקה משמש לברירה של התאים שעברו טרנספורמציה. הגן לעמידות משתלב ביחד עם הגן שמעוניינים בו בגנום של הצמח, ונוכחותו מאפשרת לחוקרים לברור את התאים שעברו טרנספורמציה. נוכחותם של גנים אלה בצמחים מהונדסים, במיוחד בצמחים המשמשים למאכל אדם או בהמות, מעוררת אצל חלק מהציבור דאגה רבה: האם קיים סיכוי שהגן לעמידות יעבור לחיידקים המתקיימים כדרך קבע במערכת העיכול, כמו חיידקי ה-*E. coli* ומהם לחיידקים מזיקים? למרות שמדובר בסיכון בעל הסתברות קטנה מאוד, מדענים מנסים למצוא לו פתרונות ובכך גם להרגיע את הציבור של המתנגדים למזון מהונדס. נעשים היום ניסיונות לשימוש בגנים בוררים אחרים, שאינם מקנים עמידות לתרופות שמשמשות את האדם. אפשרות אחרת שנבדקת היא השימוש בשיטה שבה הגן לעמידות מסולק מהגנום לאחר שתהליך הברירה מסתיים.

שאלה 4

1. כיצד אפשר לקבוע באילו רקמות של צמח מתבטא חלבון מהונדס?
2. מהי הסכנה הנוצרת מהחדירת גנים לעמידות לאנטיביוטיקה למערכת העיכול של האדם?

3. זנים רבים של צמחי יבול מהונדסים בעזרת גנים המקנים עמידות לקוטלי עשבים. כך מתאפשר שימוש בררני בקוטלי עשבים, בלי לפגוע בצמח היבול המהונדס. מהי הסכנה האקולוגית בצמח בר שאליו חדרו במקרה גנים לעמידות לקוטלי עשבים?

צמחים מהונדסים לשימוש האדם

בראשית שנות השמונים של המאה שעברה הצליחו מדענים ליצור צמחים מהונדסים לשימוש חקלאי: היו אלה צמחי תירס וכותנה עמידים לחרקים מזיקים בזכות רעלן של חיידקי ה-Bt ששולב באופן יציב בגנום שלהם והתבטא בתאי הצמח. בראשית האלף השלישי בארה"ב כ-50% מיבולי הסויה, 40% מהכותנה ו–30% מהתירס הם יבולים מהונדסים, והמספרים הללו עולים בהתמדה. במקביל באירופה, מפגינים שורפים שדות של צמחים מהונדסים, ומתקיימות הפגנות סוערות נגד יבוא מזון שעבר שינוי גנטי (Genetically Modified Food – GM Food). בשנים 2002–2000 חוקקו בתי הפרלמנט תקנות לפיקוח קפדני במיוחד על החדרת מזון מהונדס למדינות אירופה. האם המאמץ הרב שהושקע בפיתוח צמחים מהונדסים שיכולים לסייע לפתור את בעיית הרעב בעולם ולשמש את האדם בדרכים נוספות, עלול לרדת לטמיון בגלל ההתנגדות הציבורית?
הטכנולוגיות להחדרת גנים לתאי צמח על ידי הדבקה באגרובקטריום והפגזה בתותח גנים הניבו בעשרים השנים האחרונות מגוון יישומים ואלה הם:

השבחת זנים: יצירת יבולים עמידים לקוטלי עשבים (צמחים אלה ממשיכים לשגשג גם לאחר שהשדות מרוססים בקוטלי עשבים רעים, המתחרים בצמחי היבול); שיפור העמידות של צמחי אורז ליובש ולתנאי מליחות; הגברת העמידות של צמחים שונים כנגד נגיפים ופטריות; העלאת הערך התזונתי של צמחים (למשל פיתוח צמחי אורז שמייצרים פרו–ויטמין A).

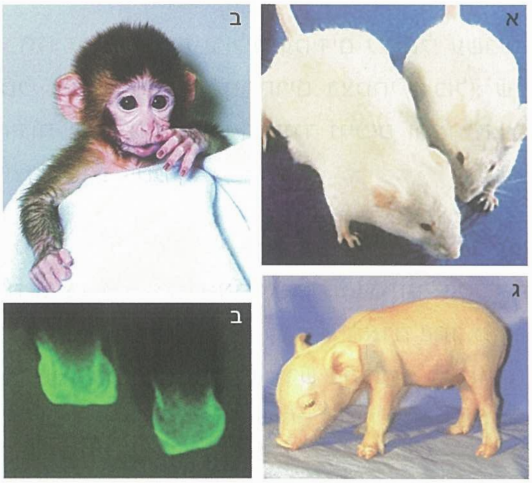
יצירת חומרים לרפואה: צמחים יכולים לשמש כביוראקטורים זולים ויעילים להפקת חלבונים המיועדים לטיפול באדם או בבעלי חיים. מאחר שהצמחים הם איקריוטים, ההתארגנות המרחבית של החלבונים והשינויים החלים בהם לאחר התרגום, דומים לאלה שבתאי האדם יותר מאשר בחיידקים. מאחר שצמחים אינם דורשים תנאים סטריליים או מצע מזון מורכב ויקר כמו שנדרש בתרביות רקמה, העלות של הטיפול בצמחים נמוכה באופן משמעותי. מנגד, דרכי ההפקה והניקוי של חומרים שונים מתוך תאי הצמח מסובכות יותר בגלל קיומו של דופן התא הקשיח שמקשה במידה מסוימת על שבירת התאים.
בין החלבונים המיוצרים בצמחים תופסים תרכיבי החיסון הפעיל והחיסון הסביל מקום מרכזי. השימוש בתרכיבי החיסון יוכל להיעשות על ידי הפקה, ניקוי ומתן בדרך המקובלת. לחילופין, אם יתגשם חזון החוקרים, יוכל החיסון להיעשות על ידי אכילת הפרי המהונדס, בננה למשל, המכיל את תרכיב החיסון. ישנם גם צמחים המייצרים חומרים כמו הירודין, חלבון שמקורו בעלוקות ומונע היווצרות קרישי דם, המוגלובין להרכבת תחליפי דם סינתטיים וחלבונים המרכיבים את חלב האם. בכל מקרה שבו מייצרים בצמח חלבון שיוחדר לגוף האדם, חשוב מאוד לבדוק אם לא קיימים הבדלים, אפילו מזעריים, בין מבנה החלבון באדם למבנה החלבון המופק בצמח. הבדלים אלה עלולים לגרום לתופעות אלרגיות, לחוסר פעילות של החלבון או לפירוק מהיר של החלבון בגוף.

משימה 5

1. בחרו שני יישומים המוזכרים בפרק ג' ובחנו אותם מהבחינות הבאות:
   א. הפתרון שהם מציעים לבעיה לעומת פתרונות חלופיים.
   ב. המקור האפשרי לגנים שהוחדרו לצמחים המהונדסים (למשל, חיידק ה-Bt במקרה של הצמחים העמידים לחרקים מזיקים).
2. הציגו בצורת תרשים זרימה את השיטות הביוטכנולוגיות שאפשר להשתמש בהן לפיתוח היישומים שבחרתם.
3. אילו קשיים אתם צופים בתהליך היישום, ועל מה אתם מסתמכים?

הרחבה

ג2 - יצירת בעלי חיים מהונדסים



בעלי חיים מהונדסים

בעלי החיים המהונדסים המופיעים בתמונות הבאות, ממחישים את התפתחות המחקר ויישומיו בתחום זה בביוטכנולוגיה.

א. היונק המהונדס הראשון הוא העכבר המופיע בתמונה משמאל, שנוצר בשנת 1982 לאחר שהוחדר לגנום שלו הגן המקודד להורמון גדילה בחולדה. הגן להורמון גדילה התבטא בעכבר המהונדס ברמה גבוהה בכבד (ביונק נורמלי הורמון הגדילה נוצר בבלוטת יותרת המוח), בזכות אזור בקרה ייחודי לכבד שחובר לגן. הביטוי הגבוה של הגן גרם לגדילה מואצת של העכבר המהונדס לעומת עכבר הבקרה הלא מהונדס מצד ימין.

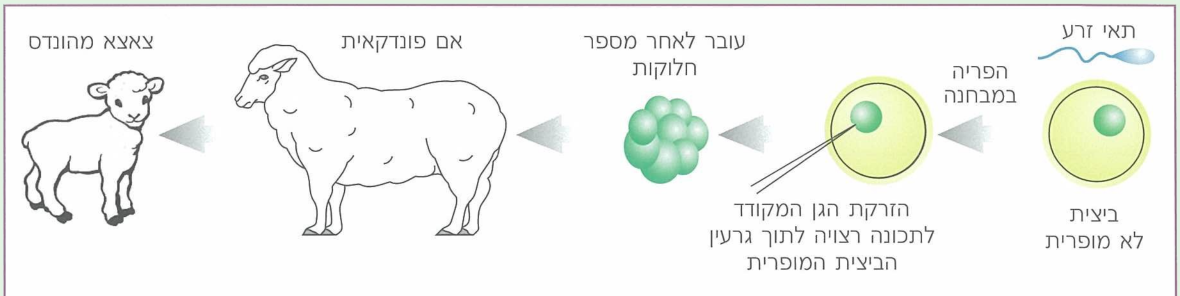
ב. בשנת 2001 נולד הקוף המהונדס הראשון (שמו אנדי) שבגנום שלו שולב הגן לחלבון הזוהר שמקורו במדוזה. מתחת לתמונת הקופיף אפשר לראות את ציפורניו הזוהרות, המצביעות על רמת ביטוי גבוהה של הגן ברקמה זאת. הגן לחלבון הזוהר הוא גן מדווח המשמש לבדיקת ההצלחה של ההנדוס. בעתיד מתכוונים החוקרים ליצור קופים נושאי גנים שמקורם באדם, שישמשו כמערכות מודל לחקר מחלות.

ג. החזיר המהונדס שייך לזן של חזירים ננסיים שהחוקרים מייעדים להשתלת איברים באדם. באופן רגיל תגובת החיסון של האדם נגד אנטיגנים על גבי התאים של החזיר תדחה את האיבר המושתל. מדובר באנטיגנים של תואם רקמות, שמאותתים למערכת החיסון של הגוף שמדובר בתא זר שיש לתקוף. ביטול הפעילות של גן המקודד לאנטיגן של תואם רקמות תבטל את התגובה החיסונית של דחיית האיבר. החזירון הומלט בשנת 2003 אחרי שהחוקרים ביטלו את פעולתו של אחד הגנים שלו המקודד לאנטיגן של תואם רקמות. בכך נסללה הדרך להשתלת איברים מחזירים לאדם, אך עדיין קיים חשש שבדרך זו עלולים לעבור גם נגיפים מן הרקמות של החזיר אל רקמות האדם.

קיימים שני יתרונות עיקריים לשימוש בבעלי חיים מהונדסים – בהשוואה לצמחים מהונדסים – לשם הפקת חלבונים שמקורם באדם:

- בתאי בעלי חיים החלבון הנוצר יכול לעבור שינויים לאחר שלב התרגום בדרך הדומה לזו של תא האדם.
- יונקים יכולים להפריש את החלבון המהונדס אל מחוץ לתאים, לדם או לחלב, דבר שיכול להקל מאוד את תהליך הפקתו. זאת בניגוד לצמחים שבהם יש בדרך כלל צורך לשבור את דפנות התאים כדי להפיק את החלבון.

באופן עקרוני תהליך ההחדרה של גן זר לתוך תאים של בעלי חיים דומה לתהליך המתבצע בתאי צמח. עם זאת קיים הבדל מהותי בין צמחים ובעלי חיים: תא צמח יכול להתפתח לצמח שלם במצע בעל הרכב מתאים, לא כן תא בעלי חיים.
רק הזיגוטה (או התאים המתקבלים בחלוקות הראשונות של הזיגוטה) יכולה ליצור יצור שלם. לכן נהוג ליצור בעלי חיים מהונדסים על ידי הזרקה של DNA לגרעין הזיגוטה. ההזרקה נעשית מתחת למיקרוסקופ, והעובר הצעיר שמתפתח מועבר לאם פונדקאית להשלמת ההריון.



שלבים בהנדוס בעלי חיים

באמצעות טכניקה זאת אפשר לשפר את תכונותיהם של חיות משק שונות, למשל, ליצור בקר משובח יותר על-ידי החדרת הגן להורמון גדילה, או לפתח כבשים שהצמר שלהן אינו מתכווץ בכביסה.
מטרה אחרת היא להפיק חומרים לטיפול במחלות שונות על ידי הפרשת החלבונים המהונדסים בדם או בחלב. למשל, הגן המקודד לאנזים אלפא-אנטי-טריפסין, אנזים החסר בחולי ציסטיק פיברוזיס – הונדס לתוך כבשים טרנסגניות, והחלבון צפוי להיות משווק ב-2007.

שאלה 5

1. מהו היתרון העיקרי בשימוש בבעלי חיים מהונדסים על פני שימוש בחיידקים או בתרביות תאי בעלי חיים ליצירת חלבון מאדם?
2. באילו רקמות של בעל החיים תעדיפו להפיק חלבון מהאדם בכמויות גדולות? התייחסו לאפשרויות הבאות: בלוטות רוק, דם, כבד, שריר, עור, בלוטות חלב ונמקו את קביעתכם.
3. יישום מבטיח מבחינה כלכלית הוא יצירת דגי סלמון מהונדסים (ראו באיור דג סלמון מהונדס מתחת לסרגל, בהשוואה לדגי סלמון רגילים, מעל לסרגל). אזור הבקרה על ביטוי הגן להורמון הגדילה בדגים המהונדסים נלקח מגן המקודד לחלבון מונע קיפאון בדגים החיים במים קרים במיוחד. מדובר באזור בקרה שמאפשר תעתוק בקצב גבוה.

א. הסבירו מה היתרון בגן המהונדס שבו השתמשו החוקרים לעומת הגן "הרגיל" להורמון גדילה, וכיצד הגן המהונדס צפוי להשפיע על קצב הגדילה של הסלמון.

ב. בהנחה שאת הסלמון המהונדס מעוניינים לשחרר לטבע, אילו בדיקות אקולוגיות הייתם מבקשים לערוך לפני אישור הפרויקט בקנה מידה מסחרי? נמקו את בקשתכם.

פרק ד - תרומת הביוטכנולוגיה לקידום הרפואה

בפרק הזה נעקוב אחרי הפיתוחים הביוטכנולוגיים שתרמו לקידום הרפואה. תחילה נבחן את הדרך לאיתור מספר הולך וגדל של מוטציות המעלות את הסיכוי לחלות במחלות מסוימות. בהמשך נדון בריפוי גני וכהרחבה נתמקד בתאי גזע.

ד1 - אבחון מחלות תורשתיות

מחלות תורשתיות הן מחלות שנגרמות על-ידי שינויים שחלים בגנים (מוטציות) ושעוברים בתורשה כאשר הם נמצאים בתאי המין. כבר היום מכירים הגנטיקאים כ-5000 מוטציות היכולות לגרום למחלות. בשלב הראשון של חקר המחלות התורשתיות הובנה הסיבה הגנטית למחלות הנגרמות על-ידי מוטציה המשבשת את הפעילות של גן יחיד (מחלות חד-גניות). כאלה הן, למשל, מחלות האנמיה החרמשית, טאי-זקס, וציסטיק-פיברוזיס. אך ישנן מחלות – כמו לחץ דם גבוה, השמנת יתר, סוכרת מבוגרים, אסטמה, סוגים שונים של סרטן, מחלות כלי דם ולב – שהגורם התורשתי להן לא היה ידוע עד לאחרונה. מתברר שהסיכוי להתפרצותן של המחלות הללו גבוה יותר כאשר מתרחשים שינויים במספר גנים שונים. כלומר, מדובר במחלות רב-גניות.
בדיקת ה-DNA של אדם, גם טרם היוולדו, יכולה לספק מידע רב על המחלות שבהן הוא עלול לחלות במשך חייו. לגבי חלק מהמחלות קיומה של מוטציה מנבא הופעה כמעט ודאית של המחלה. לגבי חלק אחר (בפרט במחלות רב-גניות) קיימת הסתברות מסוימת להופעת המחלה, המושפעת גם מגורמים סביבתיים וביניהם אורח החיים. מידע זה משמש את הרופאים כדי לספק ייעוץ גנטי וטיפול שיכול למנוע או להקל את סימני המחלה.

בשנת 1989 החל הפרויקט המדעי השאפתני ביותר של סוף המאה העשרים בתחום הביולוגיה: קביעת רצף הגנום של האדם בשלמותו. מטרת הפרויקט הייתה קביעת הרצף של כל שלושת מיליארדי ($3X10^9$) הנוקלאוטידים המרכיבים את ה-DNA שלנו ומיפוי הגנים הנמצאים בו. עם סיום פרויקט הגנום אנחנו יודעים מהו רצף ה-DNA בכל הכרומוזומים של האדם והיכן בכרומוזומים הללו נמצאים הגנים[1].

אבחון מחלות תורשתיות ברמת הגנום יכול להתבצע היום על-ידי איתור מוטציות שחלקן מופו בעזרת פרויקט הגנום. אבחון בדרך זו נעשה באופן כמעט שגרתי כשמדובר במחלות חד-גניות, אך נמצא בחיתוליו לגבי מחלות רב-גניות. ברוב המקרים זיהוי הגנים שעברו מוטציה וגילוי סוג השינוי שנגרם עקב כך, יכולים להשפיע על היכולת לנבא את הסיכוי לריפוי ועל מציאת דרך הטיפול הטובה ביותר.

[1] אם ברצונכם ללמוד עוד על פרויקט הגנום, עיינו באתר: http://stwww.weizmann.ac.il/bioinformatics.

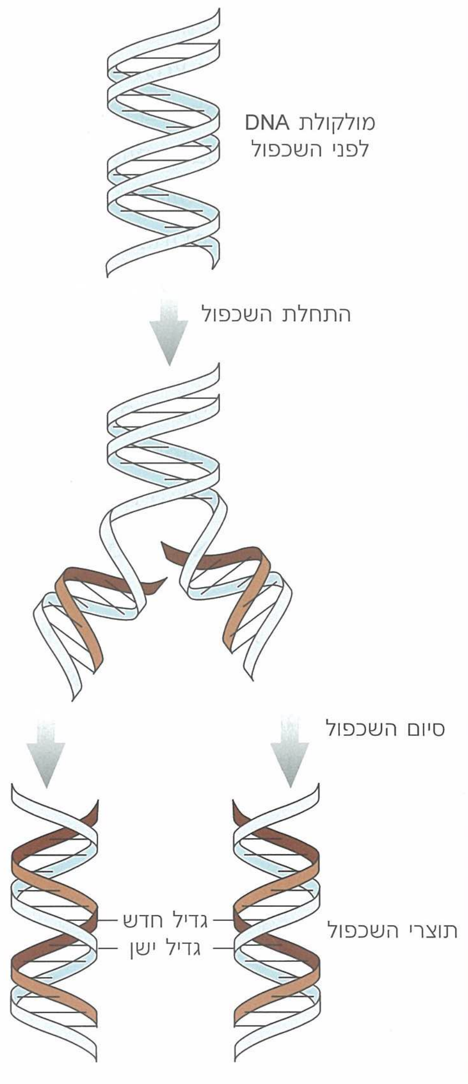
2ד - שיטת ה-PCR עוזרת לאיתור מוטציות הגורמות למחלות תורשתיות

היום, כאשר רופאים מעוניינים לבדוק נוכחות של מוטציות הגורמות למחלות תורשתיות, הם יכולים לאתר את הגן הפגום ולבדוק אם חלו בו שינויים ברצף הבסיסים. אחת השיטות הפשוטות, המהירות והנוחות ביותר לכך היא שיטת ה-PCR. בעזרת ה-PCR אפשר לשכפל תוך זמן קצר מיליוני עותקים זהים של קטע DNA רצוי מתוך DNA, המכיל גנים רבים. שיטה זאת שינתה ללא הכר לא רק את פני האבחון הגנטי אלא גם תחומים נוספים כגון הרפואה המשפטית או חקר המאובנים.

שיטת ה-PCR פותחה בשנת 1983 על-ידי החוקר קרי מוליס (Kerry Mullis) וזיכתה אותו בפרס נובל. השם המלא של השיטה, Polymerase Chain Reaction, מתורגם לעברית כ"תגובת שרשרת של האנזים DNA פולימראז". אנזים זה משתתף באופן טבעי בתהליך שכפול ה-DNA.

שכפול ה-DNA בתוך התא

באופן טבעי מולקולת ה-DNA עוברת שכפול במהלך מחזור התא, כהכנה לקראת חלוקת התא (מיטוזה או מיוזה). במהלך שכפול ה-DNA בתא נפרדים שני גדילי ה-DNA. האנזים DNA פולימראז יוצר גדיל משלים לכל אחד משני הגדילים באמצעות נוקלאוטידים הנמצאים חופשיים בגרעין (באיקריוטים) או בציטופלסמה (בפרוקריוטים). בתהליך השכפול נוצרות שתי מולקולות DNA זהות למולקולה שממנה נוצרו.



תהליך שכפול DNA

שכפול ה-DNA במבחנה (שיטת ה- PCR)

שיטת ה-PCR מאפשרת לבצע במבחנה את תהליך השכפול מספר רב של פעמים. המטרה היא לקבל מספר רב של מולקולות DNA זהות, ממספר התחלתי מזערי של מולקולות אלה.

על מנת לפעול האנזים DNA פולימראז זקוק – בנוסף לקטע ה-DNA שאותו רוצים לשכפל, לנוקליאוטידים ולתחלים. תחל הוא מקטע DNA קצר (כ-17 בסיסים), שהרצף שלו משלים לרצף גדיל אחד של ה-DNA שאותו רוצים לשכפל, התחל הינו עוגן המאפשר לאנזים להתחיל את יצירת הגדיל המשלים על-ידי הארכתו (חשבו: מהו מקור המילה תחל?).

כדי לשכפל קטע של DNA בשיטת ה-PCR, מכניסים לתמיסת בופר שבמבחנה את המרכיבים:

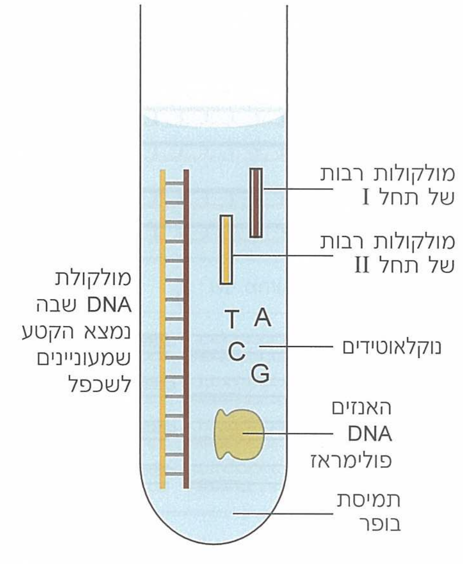
- את ה-DNA אשר אותו מעוניינים לשכפל.
- את האנזים DNA פולימראז - האנזים הופק מחיידקים החיים במעיינות חמים. אנזים זה אינו עובר דנטורציה בחום גבוה, והטמפרטורה האופטימלית שבה הוא פעיל היא 65 מעלות צלזיוס.

- תערובת של ארבעת הנוקלאוטידים (A, C, G ו-T).
- מספר רב של מולקולות של שני תחלים משלימים לשני רצפים של קטע ה-DNA, אחד לכל גדיל. את התחלים יוצרים באופן מלאכותי במעבדה, לפי הרצף שבו אנו מעוניינים. קטע ה-DNA שיעבור שכפול הוא הקטע הנמצא בין שני התחלים, כפי שיובהר בהמשך.

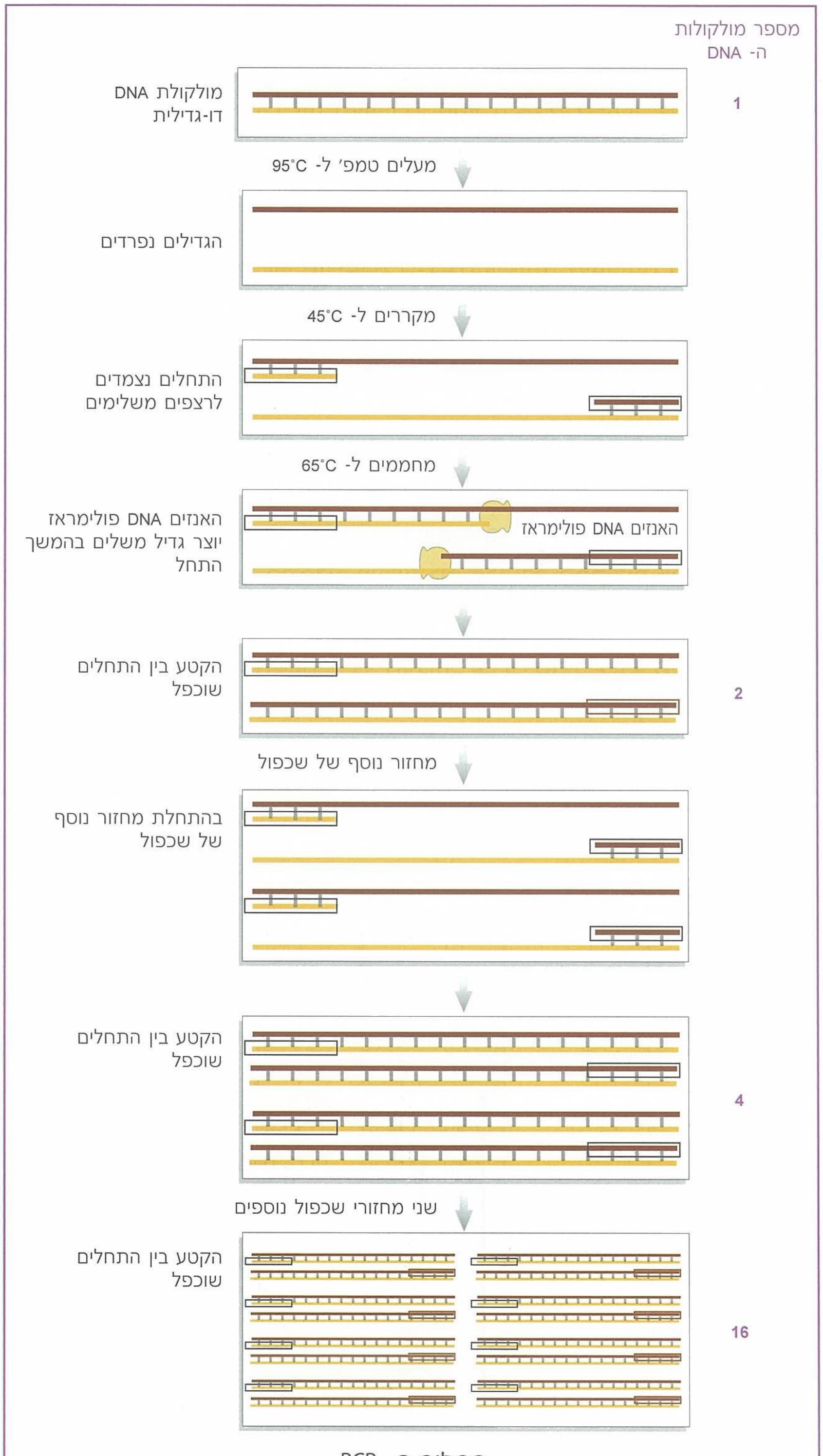
השלבים של תהליך ה-PCR

1. התהליך מתחיל בהפרדת שני הגדילים של מולקולת ה-DNA שאותה מעוניינים לשכפל. מעלים את הטמפרטורה של התמיסה במבחנה ל-95 מעלות צלסיוס כדי לנתק את הקשרים שבין שני הגדילים המשלימים, ומקבלים שתי מולקולות DNA חד-גדיליות.
2. אחר כך מקררים במהירות עד ל-45 מעלות צלסיוס. בטמפרטורה זאת שני גדילי ה-DNA עדיין נפרדים, אבל שני התחלים, בשל היותם קצרים ורבים יצמדו לרצפים המשלימים שלהם באופן ייחודי (A-T C-G) וכך יוכלו ליצור אזורים קצרים של DNA דו-גדילי. קטע ה-DNA הנמצא בין התחלים הוא הקטע שיעבור שכפול.
3. מחממים במהירות לטמפרטורה של 65 מעלות צלסיוס. בטמפרטורה זאת ה-DNA פולימראז יוצר גדיל DNA חדש בהמשך לכל אחד משני התחלים. בסוף התהליך נוצרות מהמולקולה המקורית שתי מולקולות DNA, הזהות לרצף המצוי בין שני התחלים.
4. חוזרים על התהליך שוב ושוב. כלומר, חימום ל-95 מעלות, קירור מהיר ל-45 מעלות וחימום מהיר ל-65 מעלות. בדרך כלל משתמשים ב-25-30 מחזורי שכפול, שכל אחד מהם נמשך דקות ספורות. בתום התהליך, מספר העותקים שנקבל במבחנה יהיה גדול בכמה סדרי גודל מהמספר ההתחלתי של מולקולות ה-DNA.

את התהליך מבצעים בתוך מכשיר מיוחד המכיל מעמד מתכת שבו הטמפרטורות יכולות להשתנות בצורה מדויקת ובמהירות רבה, בזמנים שנקבעים מראש.



המרכיבים הדרושים להתחלת תהליך ה- PCR



מספר מולקולות
ה- DNA
מולקולת DNA
דו-גדילית
1
מעלים טמפ׳ ל- 95°C
הגדילים נפרדים
מקררים ל- 45°C
התחלים נצמדים
לרצפים משלימים
מחממים ל- 65°C
האנזים DNA פולימראז
יוצר גדיל משלים בהמשך
התחל
האנזים DNA פולימראז
הקטע בין התחלים
שוכפל
2
מחזור נוסף של שכפול
בהתחלת מחזור נוסף
של שכפול
הקטע בין התחלים
שוכפל
4
שני מחזורי שכפול נוספים
הקטע בין התחלים
שוכפל
16

תהליך ה- PCR

שאלה 1

1. מדוע מתייחס שמו של התהליך לתגובת שרשרת?
2. אם מתחילים את תגובת ה-PCR ממולקולה אחת של DNA, בתוך כמה מחזורי שכפול אפשר לקבל 32 מולקולות זהות?
3. לכמה מולקולות אפשר להגיע אחרי 30 מחזורי שכפול?
4. הביאו דוגמה נוספת לתהליך שבו אפשר לנצל פעילות של אנזים הפועל מחוץ לתא.
5. לפני כ-20 שנה, כאשר רק פותחה שיטת ה-PCR והאנזים DNA פולימראז בודד מחיידקים שחיים בטמפרטורה של גוף האדם היה צורך להוסיף מנה של אנזים לאחר כל מחזור שכפול. היום, כאשר האנזים מופק מחיידקי מעיינות חמים, מספיקה מנה אחת של אנזים לכל שלבי התהליך. הסבירו מדוע.
6. מדוע חשוב לדעת את רצף הגן על מנת לשכפל קטע ממנו בעזרת PCR?

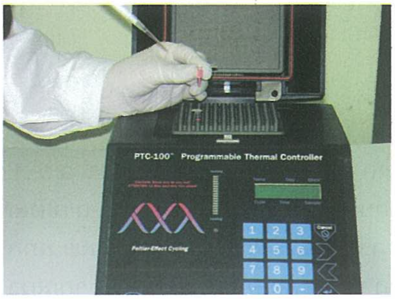
לסיכום, בעזרת שיטת ה-PCR אפשר לייצר מספר רב של עותקים של קטע מסוים של DNA מתוך תערובת של מולקולות DNA בעלות רצפים שונים. רצפי התחלים קובעים את המקומות על גבי ה-DNA שביניהם יתרחש השכפול, כלומר, קובעים איזה קטע יעבור שכפול. קטע שאינו נמצא בין התחלים לא יעבור שכפול.
לשיטת ה-PCR שימושים רבים, ואלה אחדים מהם:

אבחון מחלות תורשתיות: במעבדות לאבחון גנטי משתמשים ב-PCR כדי לגלות מוטציות שגורמות למחלות תורשתיות. שימוש בתחלים בעלי רצף משלים לרצף המוטציות, מאפשר לשכפל רק את קטע ה-DNA הנושא את המוטציה וכך לגלות את המחלה. אפשר להפעיל את השיטה על דגימות DNA שמקורן בתאי דם, או בתאי עובר שמתקבלים בבדיקת מי-שפיר. במקרה שמתגלה מוטציה שיכולה לגרום למום חמור בעובר, שוקלים הפסקת הריון. היום, במקרים שבהם יש חשש שהעובר יישא מחלה גנטית, יש אפשרות לבצע הפרית מבחנה מחוץ לרחם. כאשר העוברים המתפתחים במבחנה מצויים בשלב של שמונה תאים, מפרידים בעדינות תא אחד, מפיקים ממנו את ה-DNA, ובעזרת PCR בודקים את נוכחות המוטציה. כך ניתן לברור בין עוברים הנושאים מוטציה היכולה לגרום למחלה לבין עוברים בריאים ולהשתיל ברחם האם רק את העוברים הבריאים.

רפואה משפטית: במעבדות לזיהוי פלילי משתמשים ב-PCR על מנת לשכפל DNA הנמצא בכמות זעירה בכתמי דם, בטיפת רוק, או אפילו בשורש של שערה. לשם כך משתמשים בתחלים המשלימים לרצפים קצרים החוזרים ונשנים בגנום של האדם. מגוון הקטעים שמתקבל מאפיין כל אדם ומאפשר זיהוי כמעט ודאי של הקורבן או של הפושע.

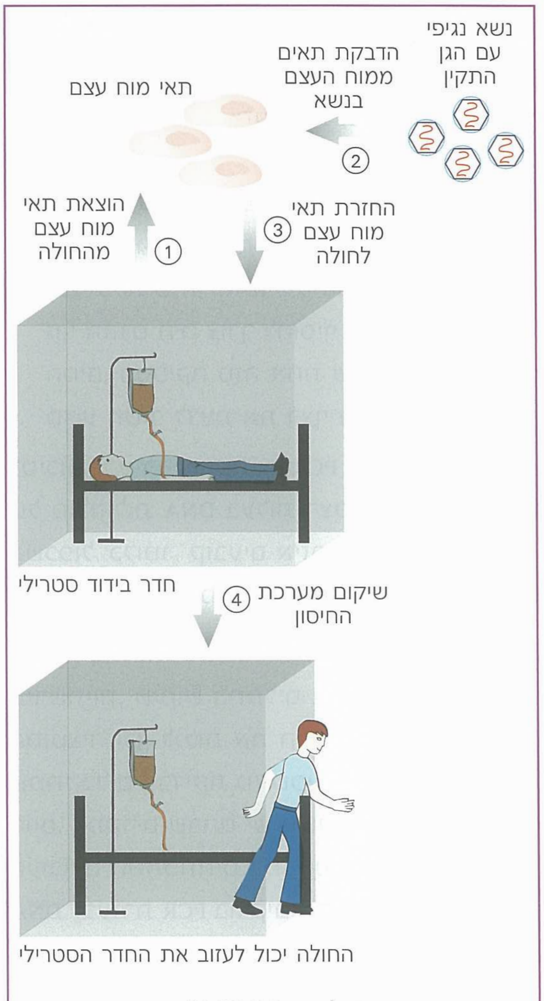
שאלה 2

חשבו על יישומים נוספים אפשריים של שיטת ה-PCR.



מכשיר PCR

3ד - ריפוי גני



שלבים בריפוי גני

בריפוי גני מחדירים לתאי המטופל גן תקין המיועד להתבטא בתא ולהחליף את תפקודו של גן פגום הגורם למחלה. כבר בשנות התשעים עורר הריפוי הגני תקוות רבות. לכאורה, מדובר בפתרון מושלם לרוב המחלות התורשתיות, אך בצד ההבטחות, עם התקדמות המחקר, מתרבים סימני השאלה.

השיטות המקובלות כיום לריפוי גני מבוססות על הוצאת תאי החולה מהגוף, גידולם בתרבית תאים והחדרת הגן התקין לתוכם. התאים מוחזרים לגוף החולה, ממשיכים להתרבות בתוכו ומתפקדים באופן תקין בזכות הגן התקין שהוחדר אליהם.

קיימות מספר דרכים להחדרת גן לתאים, ורובן מתבססות על **נגיפים**[2] כנשאים.

קיימים סוגים שונים של נשאים שמקורם בנגיפים. המשותף להם הוא שמהחומר התורשתי שלהם הוצאו הגנים שעלולים להזיק לתאים שאותם הם מדביקים. במקומם מכניסים לתוך הגנום של הנגיף את הגן התקין מהאדם, לפעמים בליווי גן נוסף המשמש כגן בורר (גן המקנה לעמידות לאנטיביוטיקה, למשל). אך עדיין לא פותח הנשא האידיאלי: ישנם נשאים שאינם משתלבים בגנום התא; הגן התקין מתבטא, אך כמותו יורדת כשהתא מתחלק. נשאים אחרים משתלבים בגנום באופן אקראי. הסכנה בשימוש בנשאים כאלה היא שהשתלבותם בתוך גנים אחרים או בסמוך להם עלולה לגרום לשיבוש פעולתם של אלה האחרונים. נשא נגיפי עלול להגביר את הביטוי של גן סמוך וכך עלול לגרום לשיבושים בקצב החלוקה של התא ובהמשך אף להופעת גידולים סרטניים. בעיה אפשרית נוספת היא תגובת מערכת החיסון לנוכחות הנגיף הנשא בגוף. היום החוקרים והרופאים בוחרים להשתמש בריפוי גני בעיקר במחלות שאין להן דרך ריפוי אחרת, אגב בדיקה מדוקדקת של הגורמים שעלולים לגרום נזק לחולה.

[2] נגיפים מורכבים מקופסית חלבונית האורזת בתוכה מולקולה של חומר תורשתי, DNA או RNA. היות שלנגיף אין ציטופלסמה ואנזימים (פרט לנגיפים מסוימים, ביניהם נגיפי הרטרו הנושאים את האנזים המתעתק במהופך), הוא תלוי לחלוטין במרכיבי התא שאליו הוא פולש. זאת גם הסיבה שנגיפים הפולשים לתוך תאים של חיידקים, בעלי חיים או צמחים, גורמים במוקדם או במאוחר לנזק לתא. בחלק מהמקרים החומר התורשתי של הנגיף משתלב בחומר התורשתי של התא עצמו, ובמהלך החלוקות הוא עובר לתאי הבת של התא המאכסן ונמצא שם במשך דורות רבים.

הרחבה

4ד – תאי גזע כדרך להחלפת רקמות

תאי גזע הם תאים שלא עברו עדיין התמיינות לסוג מסוים של תאים. הם יכולים להתחלק ולהמשיך ליצור תאים בלתי ממוינים, אך גם להתמיין לסוגים שונים של תאים. אפשר להפיק תאי גזע מעוברים צעירים מאוד (תאי גזע עובריים) ולגדלם בתרבית רקמה. בעזרת חלבונים שונים הגורמים להתמיינות, אפשר לגרום לתאים האלה להתמיין לסוגים שונים של רקמות. גם בגוף הבוגר ישנם תאי גזע המשתתפים בתהליכי גדילה ובתיקון רקמות, ומספקים את התאים החדשים בכל רקמה. בעבר חשבו שתאי גזע שמקורם בבוגר יכולים להתמיין רק לסוגים מסוימים של רקמות, למשל, תאי גזע בעור יכולים ליצור רק תאי עור. לאור ניסויים שפורסמו לאחרונה, התברר שגם תאי הגזע מבוגר יכולים להתמיין לסוגים מגוונים של תאים; למשל, תאי גזע של מערכת הדם המצויים במוח העצם, אשר באופן טבעי יוצרים סוגים שונים של תאי דם, יכולים ליצור גם תאי שריר, אם משתילים אותם בגוף במקום המיועד להתמיין לשריר.

היישום של תאי גזע ברפואה מעורר תקוות גדולות: חוקרים מקווים שבעזרתם אפשר יהיה לרפא מחלות, לתקן רקמות ואברים שנפגעו ואפילו לעכב תהליכי הזדקנות. למשל, קבוצת חוקרים מבית החולים הדסה בירושלים ומהטכניון הצליחה להפוך תאי גזע עובריים של אדם לתאים המפרישים אינסולין בהשפעת גלוקוז. בעתיד יישום אפשרי של מחקר זה יהיה בריפוי חולי הסוכרת, שתאי הלבלב שלהם הפסיקו להפריש אינסולין, על-ידי החדרת תאי גזע שהפכו לתאים מפרישי אינסולין לגוף החולה (בניגוד לפתרון לטווח קצר מאוד המתקבל על-ידי הזרקת אינסולין).

האפשרויות הטמונות בתאי גזע מלהיבות את דמיון הרופאים. המשימה של החוקרים היא בעיקר למצוא את הדרך להפוך את תאי הגזע הגדלים בתרבית לסוג הרצוי של תאים ממוינים; החדרה לגוף של תאים לא ממוינים עלולה לגרום להופעת גידולים סרטניים. גם בעיית תואם הרקמות עדיין לא נפתרה: רק תאי גזע המשמשים לריפוי ולתיקון שלקוחים מהחולה עצמו, לא יידחו על-ידי הגוף.

כיום השימוש בתאי גזע עובריים מציג יתרונות רבים לעומת השימוש בתאי גזע מבוגר – קל לגדלם ולגרום להם להתמיין לסוגים שונים של תאים. הדילמה המוסרית העיקרית שמתעוררת לנוכח השימוש בתאי גזע עובריים נובעת מדרך ההתייחסות לעובר שבו נעשה שימוש לצורך הפקת תאי הגזע. האם עובר, בשלב התפתחותו הראשוני שבו הוא גוש של תאים שטרם התבסס ברחם, נחשב כבר לישות בעלת זכויות אנוש?
כיצד עלינו להתייחס לגוש התאים הזעיר שהתקבל מהפריה במבחנה, ושללא החדרתו לרחם, לא ימומש הפוטנציאל האנושי הגלום בו?
הדילמות האתיות-החברתיות משתקפות במגוון הגישות הרווחות היום בחקיקה בארצות שונות.

מומלץ לקרוא על מגוון הגישות הביואתיות הרווחות כיום בקשר לשימוש בתאי גזע בדוח הוועדה המייעצת לענייני ביואתיקה של האקדמיה הלאומית הישראלית למדעים, באתרים: http://stwww.weizmann.ac.il/bioethics
או http://www.academy.ac.il/bioethics/index.html

משימת סיכום

לביצוע בצוותים או בזוגות

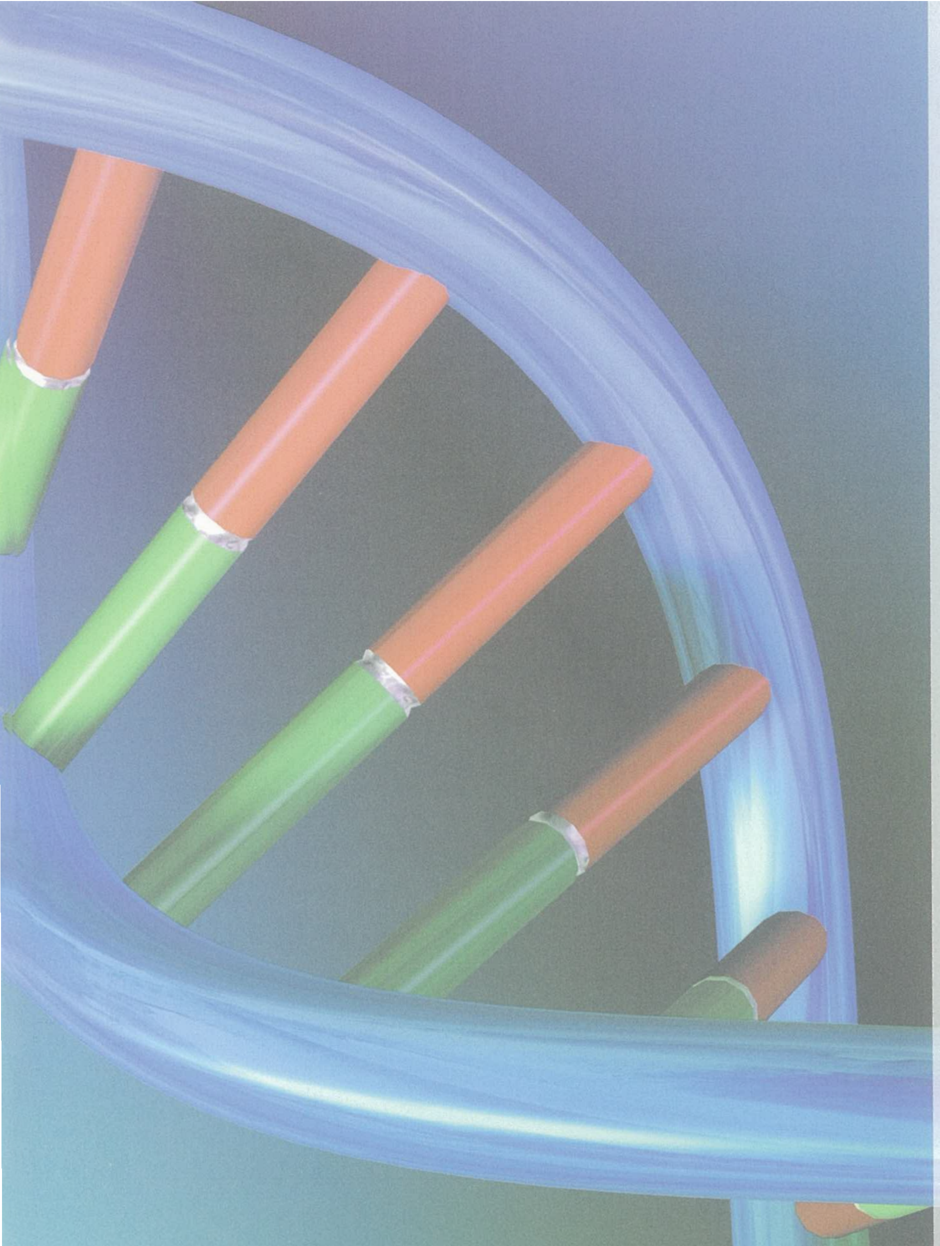
עברתם דרך ארוכה, ואנחנו מקווים שגם מעניינת. רק עוד משימה אחת עומדת בדרככם להסמכה כ"שוליות מאלפים" (מאלפי גנים, כמובן).

במשימה שבסוף פרק א, הצעתם בעיות שאותן אפשר לפתור בעזרת ביוטכנולוגיה.

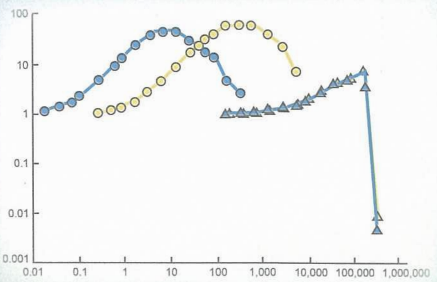
1. בשלב ראשון, הרכיבו "מחסן כלים" ביוטכנולוגיים בעזרת המבוא והמאמרים שלמדתם. אפשר להיעזר בטבלה הבאה.
   לדוגמה,

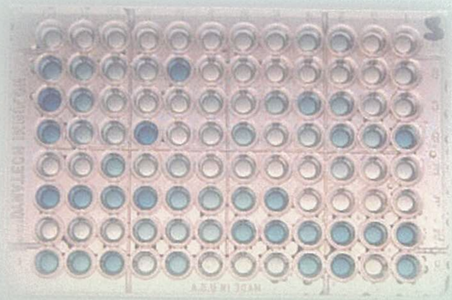
כלי ביוטכנולוגי	שימוש	יישום
PCR	שכפול קטע של DNA במבחנה	• שכפול קטעי DNA ברפואה משפטית • בדיקת נוכחות מוטציות שעלולות לגרום למחלות • קביעת מספר העותקים של גן

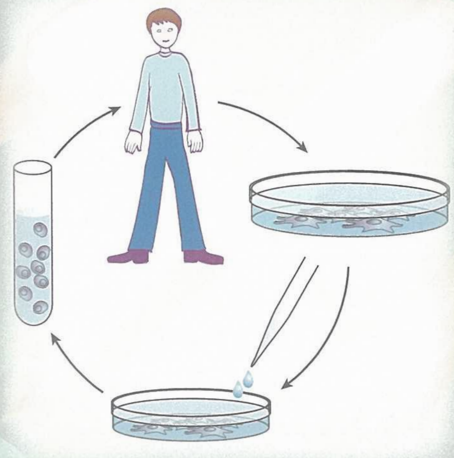
2. עכשיו השתמשו בכלים מתאימים מהמחסן שיצרתם, כדי לפתור אחת מהבעיות שהצעתם במשימת הסיכום של פרק א. ציינו אם יש מספר דרכי פתרון.
3. הציגו את היתרונות של הפתרון שבחרתם וגם את הקשיים שעלולים להתעורר במהלך פיתוחו.



קובץ מחקרים







פיתוח חיישן ביולוגי לאיתור חומרים הפוגעים בחומר התורשתי

עובד על-פי המאמר: Improved bacterial SOS promoter: lux fusions for genotoxicity detection
מאת יעקב דוידוב, רחל רוזן, דנה סמולסקי, טינה ואן-דיק, אמי וולמר, דוד אלסמור, רוברט לה-רוסה ושמשון בלקין מהמחלקה למיקרוביולוגיה סביבתית באוניברסיטה העברית בירושלים.

Davidov, Y., Rozen, R., Smulski, D.R., Van Dyk, T.K., Vollmer, A.C., Elsemore, D.A., LaRossa, R.A., & Belkin, S. (2000). Mutation Research, 466, 97-107.

פיתוח חיישן ביולוגי לאיתור חומרים הפוגעים בחומר התורשתי

תמצית

סכנת הזיהום הסביבתי מחייבת מציאת דרכים רגישות, מהירות וזולות לגילוי רעלים בסביבה. אחת הדרכים לניטור רעלים במי שתייה היא שימוש בחיישן ביולוגי המכיל חיידקי *E.coli* שהונדסו גנטית. החיידקים המהונדסים מאירים בנוכחות רעלים הפוגעים בחומר התורשתי שלהם. מטרות המחקר הן לאפיין את ביצועי החיידק המהונדס בנוכחות חומרים הפוגעים בחומר התורשתי, להתחקות אחר ביצועיו כשהוא מקובע למצע לזמן ממושך ולשפר את רגישותו על ידי שימוש בזנים שונים של חיידקים. תוצאות המחקר מעידות על הפוטנציאל היישומי של החיידקים לניטור חומרים הפוגעים בחומר התורשתי. בשיטה המתוארת כאן ניתן יהיה לתכנן חיישנים ביולוגיים נוספים שיגיבו לחומרי לחימה כימיים, לרעלנים ביולוגים ולמתכות כבדות בהתאם לצורכי החברה.

מבוא

הזיהום הסביבתי מסכן את בריאותו של האדם ואת המערכת האקולוגית העולמית כולה, ורמתו הולכת וגדלה. הצורך בגילוי מוקדם ומהיר של חומרים רעילים בסביבה הכרחי במקרים של זיהום תעשייתי או של זיהום מכוון במסגרת **טרור כימי**[1]. צורך זה הוביל לפיתוח שיטות **ניטור**[2] של רעלים שונים. חלק משיטות הניטור מאפשרות להעריך את הסיכון שבנוכחות הרעלים לבריאות הציבור ולסביבה עצמה, וגם לשמש כמערכת התרעה במקרה של זיהום. מערכת גילוי נחשבת ליעילה אם היא מצליחה לזהות כמויות זעירות של חומר (רגישות גבוהה) תוך זמן קצר (מהירות תגובה גבוהה), ואם היא מגיבה רק לחומרים שאותם היא אמורה לגלות (ייחודיות). קיימות שיטות רבות לגילוי ולזיהוי של זיהומים סביבתיים, וניתן לחלק אותן באופן גס לשתי קבוצות עיקריות: שיטות זיהוי כימיות ושיטות זיהוי ביולוגיות.

בשיטות זיהוי כימיות משתמשים בתגובות כימיות כדי לזהות ולקבוע את כמותם של חומרים מזיקים. שיטות הגילוי הכימיות מדויקות, רגישות ואמינות, אבל יש להן גם חסרונות: ראשית, הבדיקות נעשות במעבדה ולא בשטח. שנית, לכל סוג רעל נדרשת בדיקה אחרת, כך שאם אין יודעים מראש איזה חומר מחפשים, יהיה תהליך הזיהוי יקר וארוך. שלישית, יעילות הבדיקה הכימית פוחתת כאשר בודקים תערובת של מספר חומרים.

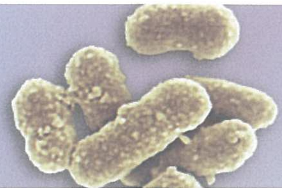
את שיטות הזיהוי הביולוגיות ניתן לחלק לשתי קבוצות:

1. שימוש ביצור חי, כמו דג (יצור רב-תאי) או חיידק (יצור חד-תאי). בשיטה זו נבדקת ההשפעה הרעילה של החומר על האורגניזם שבא אתו במגע[3]. התגובה אינה ייחודית לחומר מסוים, אלא לקשת רחבה של רעלים המשפיעים על הפיזיולוגיה של היצור החי. במבחני רעילות אלו השאלה אינה מה בדיוק מכילה הדגימה, אלא עד כמה היא רעילה.

[1] **טרור כימי:** פעולות אלימות קיצוניות, המיועדות להטיל פחד על האוכלוסייה, בעזרת חומרים כימיים רעילים. לדוגמה: ריסוס בגז עצבים או זיהום מקורות מים בחומרי הדברה.

[2] **ניטור:** מעקב אחרי תנאים או תהליכים באמצעות מכשור.

[3] לדוגמה: כורי פחם נהגו לשאת אתם קנריות לתוך המכרות, משום שציפורים אלו היו רגישות מאוד לנוכחות הגז הרעיל CO. כשהקנרית שבכלוב הראתה סימני מצוקה, היו הכורים עוזבים את המכרה במהירות.



חסרון השיטה הוא בכך שבריכוזים נמוכים של מזהם יש להמתין זמן ארוך עד לקבלת תוצאות, לעתים אף מספר ימים. זאת כיוון שיצורים חיים מפעילים מנגנונים לשמירת ההומיאוסטזיס (כמו סילוק ונטרול חומרים שחדרו לתא).

2. שימוש במרכיבים ביולוגיים, כמו נוגדנים ואנזימים. התגובה הזו ייחודית לחומר או לחומרים מסוימים, שהמרכיבים הביולוגים מסוגלים להיקשר אליהם. הייחודיות בשיטה הזו רבה אף יותר מזו שבשיטות הכימיות.

כשמדובר ביצורים חד-תאיים או במרכיבים של תאים, לא ניתן לראות בעין את השפעת הדגימה. מסיבה זו מוצמד למרכיב הביולוגי מרכיב אלקטרוני המגביר את האות. השילוב בין המרכיב הביולוגי למרכיב האלקטרוני נקרא **חיישן ביולוגי**[4].

בשנים האחרונות גובר השימוש בחיידקים כמרכיב הביולוגי בחיישנים ביולוגיים. היתרונות במבחני רעילות מיקרוביולוגיים כוללים רגישות גבוהה, עלות נמוכה, **אוכלוסיית** מבחן גדולה **ואחידה**[5], יכולת חישה של תרכובות בבתי גידול בעלי אופי שונה ומעל הכול – מהירות התגובה, המספקת תשובה אפילו בתוך 30 דקות מרגע הבדיקה. לשימוש בחיידקים בחיישנים ביולוגיים יתרון נוסף: קל יחסית להנדס גנטית חיידקים לעומת יצורים רב-תאיים.

הדרך הקלאסית לשימוש בחיידקים לניטור רעלים היא לחשוף אותם לדגימה ולבדוק אם היא גורמת למותם. אם הדגימה קטלנית לחיידקים, סביר להניח שהיא רעילה גם לבני אדם, ולכן אין להשתמש במקור המים שממנו נלקחה.

הגישה שאנו מציעים שונה: במקום לחכות עד שפעילותם של החיידקים מתחילה להידרדר, אנו מנסים לגלות את נוכחות הרעל, כבר בשלב שבו החיידקים מתחילים לחוש בו. כאשר חיידקים חשופים לחומר רעיל, מופעלות בהם מערכות הגנה. נהנדס את החיידקים באופן כזה, שיפעילו בו זמנית גם את מערכת ההגנה וגם מערכת נוספת שתדווח לנו על כך.

ניתן להנדס חיידקים כך שייצרו אות קל לזיהוי בתגובה להשפעתו של חומר מסוים או של קבוצת חומרים. לשם כך יש לחבר שני מקטעי DNA, שמקורם בגנים שונים שכבר בודדו וזוהו במחקרים קודמים, כדי ליצור גן מהונדס. הגן המהונדס מורכב משני חלקים (איור 1):

1. אזור בקרה המגיב לנוכחות החומרים שאותם רוצים לזהות. כשאזור הבקרה מופעל, הוא גורם לתעתוק של האזור המבני המחובר אליו.

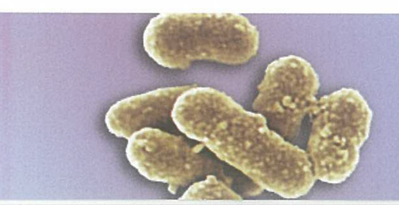
2. אזור מבני של גן המקודד לחלבון, שניתן להבחין בקלות בפעולתו – כמו יצירת צבע – ולכן נקרא גן מדווח. האזור המבני של הגן המדווח מתבטא רק כאשר מופעל אזור הבקרה שאליו הוא מחובר.

כיוון שקל להבחין בפליטת אור וקל יחסית גם למדוד אותה, גנים הגורמים להארה הם מועמדים מצוינים לתפקיד של גנים מדווחים. בגישה זו פותחו בעבר חיידקים מהונדסים, המסוגלים לדווח ברגישות גבוהה

איור 1: גן מהונדס המשמש לניטור
אזור הבקרה מופעל על ידי חומר X שגורם לביטויו של האזור המבני

[4]**חיישן ביולוגי:** באנגלית: ביוסנסור (ביו=חי, סנסור=חיישן). מכשיר שמשתמש בחומר ביולוגי כדי לנטר את הימצאותם של חומרים שונים בסביבה.

[5]**אוכלוסייה אחידה:** אוכלוסייה שאין הבדלים גדולים בין הפרטים המרכיבים אותה.



על נוכחותם של חומרים ספציפיים כמו נפטלין וכספית.

במחקר זה אנו מציעים לחבר אזור מבני של גן הגורם להארה לאזור בקרה של מערכת הגנה, המופעלת כשנגרם נזק לחומר התורשתי. מערכת זו אינה מגיבה לרעילות עצמה, אלא לנזק שגורמים חומרים כימיים ל-DNA. חומרים הגורמים לנזק כזה נקראים **חומרים גנוטוקסיים**[6]. בסדרת הניסויים שנתאר להלן חיברנו את אזור הבקרה של מערכת SOS, המופעלת בחיידקים שה-DNA שלהם ניזוק, לאזור מבני של **אופרון**[7] הגורם להארה. כך יצרנו חיידקים המאירים בתגובה לחומרים הגורמים נזק ל-DNA (איור 2). למערכת ה-SOS יש תפקידים גם בחייו הנורמליים של התא, ולכן היא מופעלת תמיד ברמה נמוכה. כתוצאה מכך החיידקים המהונדסים מאירים בקרינת רקע קבועה.
ניתן לזהות בעזרת החיישן הביולוגי גם את נוכחותם של רעלים, שאינם פוגעים ב-DNA דווקא, בשל ההשפעה השלילית שלהם על קרינת הרקע הקבועה של החיידקים. פליטת האור היא פעולה שדורשת אנרגיה, לכן תאים מתים אינם מאירים כלל, ואילו בתאים שנפגעו, ההארה נחלשת. בדרך זו יכולה המערכת לאותת בשתי צורות: אורות גבוהים – בנוכחות חומרים גנוטוקסיים, ואורות נמוכים מקרינת הרקע הרגילה – בנוכחות ריכוזים גבוהים מאוד של חומרים גנוטוקסיים או של חומרים אחרים שהורגים את החיידקים.

מטרת המחקר הנוכחי כפולה:
1. אפיון הביצועים של החיידק המהונדס בתנאים שונים: בנוכחות מגוון חומרים גנוטוקסיים ובמצב שבו הוא מקובע בג'ל לזמן ממושך.
2. שיפור רגישות החיישן הביולוגי על ידי שימוש בזנים שונים של חיידקים.

שיטות וחומרים

בניית הגן המהונדס SOS-lux

א. אזור בקרה של מערכת SOS. מערכת ה-SOS היא מערכת תיקון אנזימטית המופעלת בתא החיידק, כתוצאה מהופעת שברים או שינויים כימיים ב-DNA. אנזימים השייכים למערכת ה-SOS מעורבים בתיקון DNA. הפעלה של המערכת יכולה להעיד על מידת הגנוטוקסיות של חומרים כימיים שונים וכן על השפעתה של קרינה רדיואקטיבית.
ב. אזור מבני של אופרון lux, שמקורו בחיידק המאיר *V.fischeri*[8]. הגנים באופרון lux מקודדים לאנזים לוציפראז ולסובסטרט שלו. כשלוציפראז מפרק את הסובסטרט, נפלט אור בתהליך שדורש אנרגיה.

איור 2: ניטור באמצעות מערכת SOS-lux: חומר גנוטוקסי גורם נזק ל-DNA שמפעיל את אזור הבקרה של מערכת ה-SOS. אזור הבקרה משרה ביטוי של האזור המבני של אופרון ה-lux הגורם להארה.

[6]**חומר גנוטוקסי:** קבוצה מגוונת של חומרים בעלי השפעה רעילה על הגנום. חומרים אלה יכולים לגרום למוטציות בשיעור העולה על זה של מוטציות טבעיות (מוטגניים). הם יכולים להיות חומרים מסרטנים (קרצינוגניים) או לגרום לפגמים בעוברים המצויים ברחם (טרטוגניים).

[7]**אופרון:** צבר של גנים הנמצאים בסמיכות זה לזה על פני הכרומוזום של יצור פרוקריוטי. הבקרה על ביטוי הגנים באופרון היא משותפת, ולרוב משתתפים תוצרי הגנים שבאופרון באותו התהליך בתא.

[8]***V.fischeri*** חיידק מאיר: חיידק זה חי באופן חופשי בים או בסימביוזה עם בעלי חיים ימיים כמו הדיונון. הוא שגורם לעיני הדיונון להאיר בחושך.

אזור הבקרה והאזור המבני נחתכו באמצעות אנזימי הגבלה מתוך הגנום של החיידקים המקוריים. הם חוברו זה לזה על ידי ליגאז והוכנסו ל**פלסמיד**[9] שהוחדר לחיידק, כפי שתואר בעבודות קודמות. החיבור בין אזור הבקרה של מערכת SOS לאזור המבני של אופרון lux מאפשר לראות בקלות מתי מופעלת בחיידק המערכת לתיקון נזקים ב-DNA. את הגן המהונדס SOS-lux החדרנו לתא החיידק על גבי פלסמיד בתהליך של טרנספורמציה.

מדידת פליטת האור (ההארה)

מידת ההארה[10] חושבה על פי היחס בין הארה של חיידקים שנחשפו לחומרים גנוטוקסיים, לבין הארת הרקע של החיידקים בדגימת הביקורת, שלא נחשפו לחומרים אלו. ההארה היחסית וריכוז החומר הגנוטוקסי מוצגים בגרפים 3-1 באופן לוגריתמי.

זני החיידקים

בניסוי השתתפו שני זנים של החיידק *E.coli*, שלתוכם הוחדר הגן המהונדס על גבי פלסמיד:

1. זן SOS-lux – בזן זה נמצא הפלסמיד במספר רב של עותקים, והוא שימש בכל הניסויים המתוארים במאמר.
2. זן $SOS\text{-}lux\ tolC^{-}$ – זהה לזן הראשון, למעט הבדל אחד: הוא נושא מוטציה בגן tolC. תוצר הגן tolC הוא חלבון קטן, שנמצא בקרום התא ומתפקד כתעלה לסילוק מולקולות גדולות והידרופוביות מהציטופלסמה לסביבה החיצונית. כדי להבדיל בין הזנים נכנה אותם $tolC^{+}$ (1) ו-$tolC^{-}$ (2).

תנאי הניסוי

לפני הניסוי המתואר בגרף 1, גודלו החיידקים במשך לילה שלם בטמפרטורה של 26°C על מצע גידול עשיר. כל הניסויים בוצעו על שתי דגימות במקביל, ונעשו לפחות שתי חזרות על כל ניסוי (ברוב המקרים שלוש חזרות) בתאריכים שונים ובדגימות שונות של חיידקים.

אחסנה בקירור

החיידקים ששימשו לניסוי המתואר בגרף 2, אוחסנו על מצע דמוי ג'ל בטמפרטורה של 4°C, כדי למנוע התרבות. לפני כל מדידה גודלו החיידקים במשך לילה שלם בטמפרטורה של 26°C. האחסנה והגידול נעשו שלא בנוכחות חומרים גנוטוקסיים.

חומרים כימיים

תגובת ההארה של החיידקים נמדדה בנוכחות **מיטומיצין C**[11] שהוא חומר הידרופובי ומי חמצן (H_2O_2)[12] שהוא חומר הידרופילי. בעבודות קודמות בחיות מעבדה נמצא כי שני החומרים הללו גורמים נזק ל-DNA בריכוזים מסוימים. החומרים הגנוטוקסיים הוספו בתום ימי האחסנה בקירור.

תוצאות

הארה בהשפעת חומרים שונים

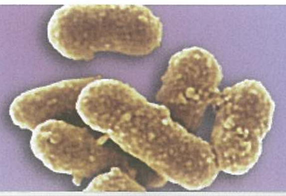
ככל שהדגימה מכילה יותר חומר גנוטוקסי, אזורי הבקרה יופעלו יותר, האנזים לוציפראז והסובסטרט שלו יסונתזו יותר והארת החיידקים תגבר. תגובת ההארה של החיידקים המהונדסים נבדקה בריכוזים שונים של חומרים גנוטוקסיים. בגרף 1 ניתן לראות כי רגישות החיידק המהונדס גבוהה יותר למיטומיצין C: הוא מתחיל להאיר בריכוז נמוך של מיטומיצין C יחסית לזה שנדרש ממי החמצן.

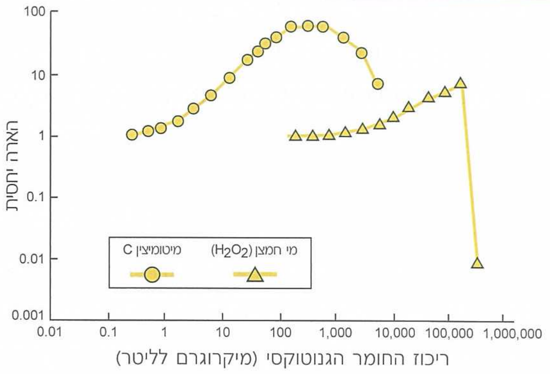
[9] **פלסמיד:** מולקולת DNA, לרוב מעגלית, שנמצאת מחוץ לכרומוזום של יצורים פרוקריוטים. היא מכילה רצפים שמאפשרים את שכפולה בנפרד מכרומוזום היצור.

[10] **מידת ההארה:** נבדקה באמצעות מכשיר שבודק פליטת פוטונים.

[11] **מיטומיצין C:** משנה את מבנה ה-DNA על-ידי יצירת קשרים נוספים בתוך הגדיל ובין הגדילים. בכך הוא מונע את התעתוק וההכפלה של החומר התורשתי.

[12] **מי חמצן:** יכולים לגרום נזק ישיר ל-DNA או בעקיפין, דרך יצירת יוני הידרוקסיל. הרדיקלים החופשיים גורמים לאובדן בסיסים ב-DNA, שברים לגדיל וכו'.





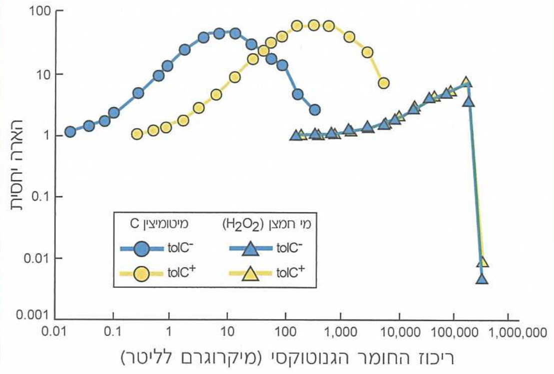
גרף 1: הארה יחסית של זן tolC$^+$ בריכוזים שונים של מיטומיצין C ומי חמצן

ככל שריכוז החומרים עולה, ההארה גוברת עד לרמת שיא, שאחריה נצפית ירידה בהארה. ירידה זו נגרמת בשל מותם או פגיעה בתפקודם של רבים מהחיידקים, שנחשפו לריכוזים גבוהים מדי של חומרים גנוטוקסיים. את תגובת ההארה ניתן היה לראות כשעתיים מרגע החשיפה לחומרים (הנתונים אינם מוצגים כאן).

שיפור רגישות החיישן על ידי שימוש בזנים שונים של חיידקים

בזן המוטנטי tolC$^-$ נפגמת יכולתו של החיידק לסלק מתוך התא חומרים שחדרו אליו. החומרים מצטברים בתא וגורמים לנזקים, ומסיבה זו הוא רגיש יותר לחומרים גנוטוקסיים מאשר זן הבר. בניסוי זה נבדקה אפשרות לשפר את ביצועי החיישן הביולוגי על ידי יצירת זן של החיידק המכיל הן את הגן המהונדס SOS-lux והן את המוטציה בגן tolC.

גרף 2 משווה בין ביצועיהם של שני הזנים המהונדסים – הזן SOS-lux tolC$^+$ והזן המוטנטי SOS-lux tolC$^-$ – בריכוזים שונים של מי חמצן ומיטומיצין C. ניתן לראות כי כשמדובר במיטומיצין C הייתה לפגיעה בקרום השפעה רבה על רגישות החיידק. השימוש ב-*E.coli* מזן הנושא מוטציה מסוג tolC$^-$ הגבירה באופן משמעותי את רגישות החיישן הביולוגי למיטומיצין C, אך לא למי חמצן.

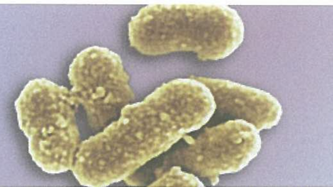


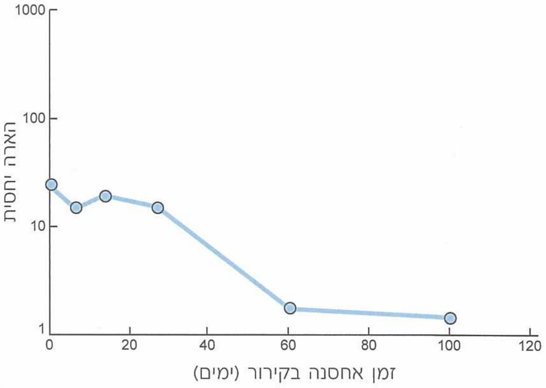
גרף 2: הארה יחסית של זן tolC$^+$ וזן tolC$^-$ בתגובה לריכוזים שונים של מיטומיצין C ומי חמצן

אחסנה לזמן ממושך

אחת הדרכים לנטר באמצעות חיישנים ביולוגיים, היא לקבע את החיידקים בתוך חומר ג'לטיני בקצהו של סיב אופטי (סיב דק המעביר אור), שאותו ניתן להחדיר לתוך מקור המים הנבדק. הסיב האופטי יעביר את האור למכשיר אלקטרוני שימדוד את עוצמתו, ויתריע בזמן אמת על הימצאות זיהום. כדי לשווק את המערכת לגופים כמו חברות לאספקת מים, מערכת הביטחון, גופי איכות סביבה, רשויות מקומיות וכו', יש לוודא שהחיידקים שבחיישן הביולוגי חיים ומתפקדים לאורך זמן.

בניסיון ראשוני לקבוע באיזו מידה החיידקים עמידים ומתאימים ליישום שכזה, נבדק הזן SOS-lux tolC$^-$. החיידקים אוחסנו לתקופות ממושכות בטמפרטורה של 4°C על גבי מצע של חומר ג'לטיני מהסוג שייעשה בו שימוש בסיב האופטי. דגימות של חיידקים הוצאו מקירור בזמנים שונים ונחשפו למיטומיצין C. החיידקים נותרו פעילים לתקופות ארוכות, אבל במחיר הפחתה ניכרת בהארה היחסית שלהם כפי שאפשר לראות בגרף 3.





גרף 3: הארה יחסית של זן SOS-lux tolC$^-$ בנוכחות מיטומיצין C בריכוז 100 מיקרוגרם לליטר, כתלות מספר ימי אחסנה בקירור

דיון

הצורך במציאת דרכים רגישות, מהירות וזולות לגילוי רעלים גנוטוקסיים בסביבה הוביל ליצירת חיישן ביולוגי המכיל חיידקי ***E.coli*** שהונדסו גנטית. החיידקים המהונדסים מגבירים את הארתם בנוכחות רעלים, הפוגעים בחומר הגנטי שלהם. תוצאות מחקר זה מעידות על הפוטנציאל היישומי של חיידקי ה-SOS-lux ככלי לניטור סביבתי: מטרתם של החיידקים המהונדסים שפיתחנו איננה לזהות חומר מסוים בדגימה, אלא להתריע באופן כללי על הימצאותם של חומרים הגורמים נזק לחומר התורשתי. חומרים רבים שהוגדרו כגנוטוקסיים על ידי בדיקות כימיות וביולוגיות אחרות, גרמו להארה גם בחיידקי ***E.coli*** שביטאו את הגן המהונדס SOS-lux. במחקר זה הצגנו רק את התוצאות הנוגעות למיטומיצין C ולמי חמצן, אך בדיקות נערכו גם לגבי חומרים נוספים.

בגרף 1 ניתן לראות כי רגישות החיידק גבוהה יותר למיטומיצין C מאשר למי חמצן, וכך גם עוצמת התגובה שלו. מכך נובע כי אזור הבקרה של הגן המהונדס מופעל יותר על ידי הנזק שגורם מיטומיצין C.

הארה חלשה, כמו בריכוזים הגבוהים בגרף 1, יכולה להעיד על היעלמותה של הסכנה הגנוטוקסית, אך גם יכולה להצביע על תמותה של החיידקים. מסיבה זו כל דגימה חייבת להיבדק בכמה מיהולים שונים, כדי לוודא שאין ההארה החלשה נובעת מריכוז קטלני של החומר הגנוטוקסי.

כדי להגביר את רגישותו של החיישן הביולוגי, השתמשנו בזן של ***E.coli*** הנושא מוטציה בגן tolC. מוטציה זו מאפשרת לחומרים גנוטוקסיים, שבאופן נורמלי היו מסולקים מן הציטופלסמה דרך תעלה תאית, להצטבר בתא החיידק בריכוזים גבוהים. בצורה זו השתפרה הרגישות של החיידק למיטומיצין C פי עשרה, אך רגישותו לגילוי מי חמצן לא גברה. הסיבה לכך היא שהתעלות ששותקו על ידי המוטציה tolC, מסלקות מן התא רק מולקולות גדולות והידרופוביות כמו מיטומיצין C, ואילו מי חמצן היא מולקולה קטנה והידרופילית. אי לכך רגישות-היתר של זן מוטנטי זה של ***E.coli*** מוגבלת רק לסוגים מסוימים של חומרים כימיים.

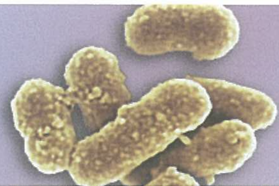
ראוי לציין כי במערכות טבעיות נשקפת לרוב סכנה מהותית לזיהום מחומרים המורכבים ממולקולות גדולות והידרופוביות, ולגביהם סף הגילוי ירד כאשר נעשה שימוש בזן הנושא את המוטציה ב-tolC. בעתיד ניתן יהיה, כפי הנראה, ליצור זנים של חיידקים הרגישים במיוחד לסוגים מסוימים של חומרים כימיים, עקב מוטציות שונות המשפיעות על קרום התא שלהם.

בניסוי שבדק את האפשרות לאחסן את החיידקים בג'ל, מצאנו כי החיידקים נותרו פעילים לתקופות ארוכות, אבל במחיר הפחתה ניכרת בהארה היחסית שלהם. לא ברור לנו מדוע השתנו תכונותיהם של החיידקים, למרות שנשמרו בטמפרטורה של ארבע מעלות ולא התחלקו. אנו משערים כי חלק מהחיידקים מתו בזמן האחסנה, וכי חלקם איבדו את האנזימים הדרושים לתעתוק ולתרגום בזמן הארוך שבו לא היו פעילים. ניסוי האחסון הראשוני שביצענו מצביע על דרך שבה ניתן יהיה להשתמש בעתיד במערכת לניטור מתמשך של חומרים גנוטוקסיים. אחת האפשרויות היא לקבע את החיידקים לסיב אופטי. בקצהו האחד של הסיב יושקעו החיידקים בתוך מצע

של ג'ל, המאפשר חדירה של חומרי מזון וחומרים גנוטוקסיים מהסביבה, אך מונע את פיזור החיידקים במקור המים שאותו מעוניינים לנטר. בקצהו השני של הסיב יימצא מכשיר המגביר, מודד ומנתח את אותות האור שפולטים החיידקים ברמת רגישות של פוטונים בודדים. מערכת זו תוכל להתריע על שינויים ברמת ההארה של החיידקים.

המגבלה העיקרית של חיישנים ביולוגיים המבוססים על חיידקים היא שלא תמיד ניתן להסיק מתוצאות מבחני הרעילות בחיידקים על השפעות אפשריות על בריאות האדם. במיוחד אין לקבל תוצאה שלילית במבחן, המתואר כאן, כהכשר תברואתי לשימוש במים על ידי בני אדם. קל יחסית להצביע על רעילות, אך קשה מאוד לשלול את קיומה. כדי לקבל תמונה מלאה על איכות המים, יש להשתמש במספר מבחנים שונים. אנו מציעים לשלב את הרגישות והאמינות של השיטות הכימיות עם יכולתן של השיטות הביולוגיות להתריע עד כמה הדגימה רעילה או מזיקה לחומר התורשתי. גם במבחני הרעילות הביולוגיים יש להשתמש ביצורים שונים: חיידקים בעלי רגישויות שונות, שמרים ותאים אנושיים. כמו כן באמצעות השימוש במבחר אזורי בקרה שונים, ניתן לתכנן "חיידקים לפי מידה", שידווחו על נוכחותם של חומרים שונים. ניתן לתכנן גם חיידק שיש בו כמה גנים מהונדסים, המורכבים מאזורי בקרה ומגנים מדווחים שונים. כך יוכל אותו חיידק להאיר באור שונה בתגובה לנוכחות חומרים שונים. חיישנים אלו יוכלו לזהות חומרי לחימה כימיים, רעלנים ביולוגיים, מתכות כבדות וכיוצא באלה בהתאם לצורכי החברה.

1. מערכת ניטור למזהמים יעילה כל עוד רגישותה גבוהה וזמן התגובה שלה קצר.
2. כדי לקבל תוצאות ניטור מהימנות ורלוונטיות לבריאות האדם יש להשתמש במגוון חיישנים כימיים וביולוגיים.
3. לשימוש בחיידקים כחיישנים ביולוגיים יש יתרונות משמעותיים: אוכלוסיית מבחן גדולה והומוגנית, התאמה לחיים בבתי גידול שונים, יישום קל של תהליכים של הנדסה גנטית, רגישות גבוהה ותגובה מהירה.
4. אפשר ליצור חיישן ביולוגי על ידי חיבור של אזור בקרה הרגיש לחומר מסוים או לאירוע המתרחש בתא (כמו שברים ב-DNA), לאזור המבני של גן מדווח. המקור של שני קטעי ה-DNA יכול להיות מיצורים שונים.
5. מוטציה הגורמת לחוסר יכולתו של חיידק לסלק חומרים רעילים שחדרו אליו, מגבירה את רגישותו בחיישן ביולוגי לאותם חומרים.
6. במעבר בין שלב המחקר לשלב היישום יש לבדוק את ביצועי התוצר הביוטכנולוגי בתנאים שמדמים את המציאות.

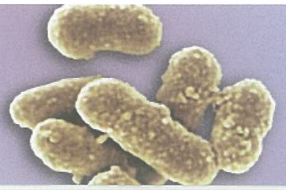


שאלות

בתשובות אתם מתבקשים לשלב ידע מהמאמר וממבנית המבוא. הסבירו את תשובותיכם.

1. מהם היתרונות של שימוש בחיישן איקריוטי רב תאי (קנרית, למשל) ומהם החסרונות של השימוש בו, לעומת אלה של חיישן פרוקריוטי?
2. הציגו בצורת תרשים זרימה את תהליך ההנדוס של החיישן. השתמשו במושגים: אנזימי הגבלה, פלסמיד, ליגאז, גן בורר, גן מדווח, טרנספורמציה.
3. האם תוצר הגן המהונדס מסוגל לתקן נזקים ב-DNA?
4. האם חיידקים מתים יכולים להאיר?
5. כיצד מוטציה המשפיעה על ריכוז חומר גנוטוקסי בתוך חיידק יכולה לגרום לחיידק למות?
6. מהו היתרון של גרף לוגריתמי בהצגת ריכוז החומר הגנוטוקסי וההארה היחסית?
7. מהו ערך ההארה היחסית של החיישן בהיעדר חומר גנוטוקסי?
8. מדוע היה חשוב לבדוק את התגובה של החיישן לשני חומרים גנוטוקסיים בעלי אופי כימי שונה?
9. בניסוי הראשון המתואר בפרק התוצאות:
   א. מהו המשתנה הבלתי תלוי ומהו המשתנה התלוי?
   ב. פי כמה רגיש החיישן למיטומיצין C בהשוואה למי החמצן?
   ג. מהו זמן התגובה של החיישן?
10. בניסוי השני המתואר בפרק התוצאות:
    א. מה הם המשתנים התלויים והבלתי תלויים?
    ב. פי כמה רגיש החיישן $tolC^-$ מהחיישן $tolC^+$ למיטומיצין C?
    ג. כיצד אפשר להסביר את העובדה שהחיידקים $tolC^-$ מתחילים למות לפני החיידקים $tolC^+$ בהשפעת המיטומיצין?
11. אחרי כמה ימי אחסון בקירור הייתם ממליצים להשתמש בחיידקים?
12. אילו מאפיינים נוספים של החיישנים תציעו לחוקרים לבדוק על מנת לברר אם האחסון בקור אינו פוגע בחיישן?
13. שלוש דגימות ממקורות מים שונים נמהלו פי 10 ונבדקה רמת ההארה היחסית לפני ואחרי המיהול. דרגו את שלוש הדגימות א-ג בסדר עולה מבחינת ריכוז המזהמים בתוכן.

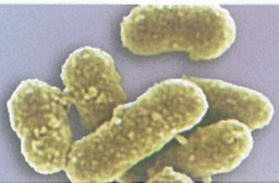
דגימה	הארה יחסית לפני המיהול	הארה יחסית אחרי המיהול
א	10	1
ב	10	100
ג	1	1



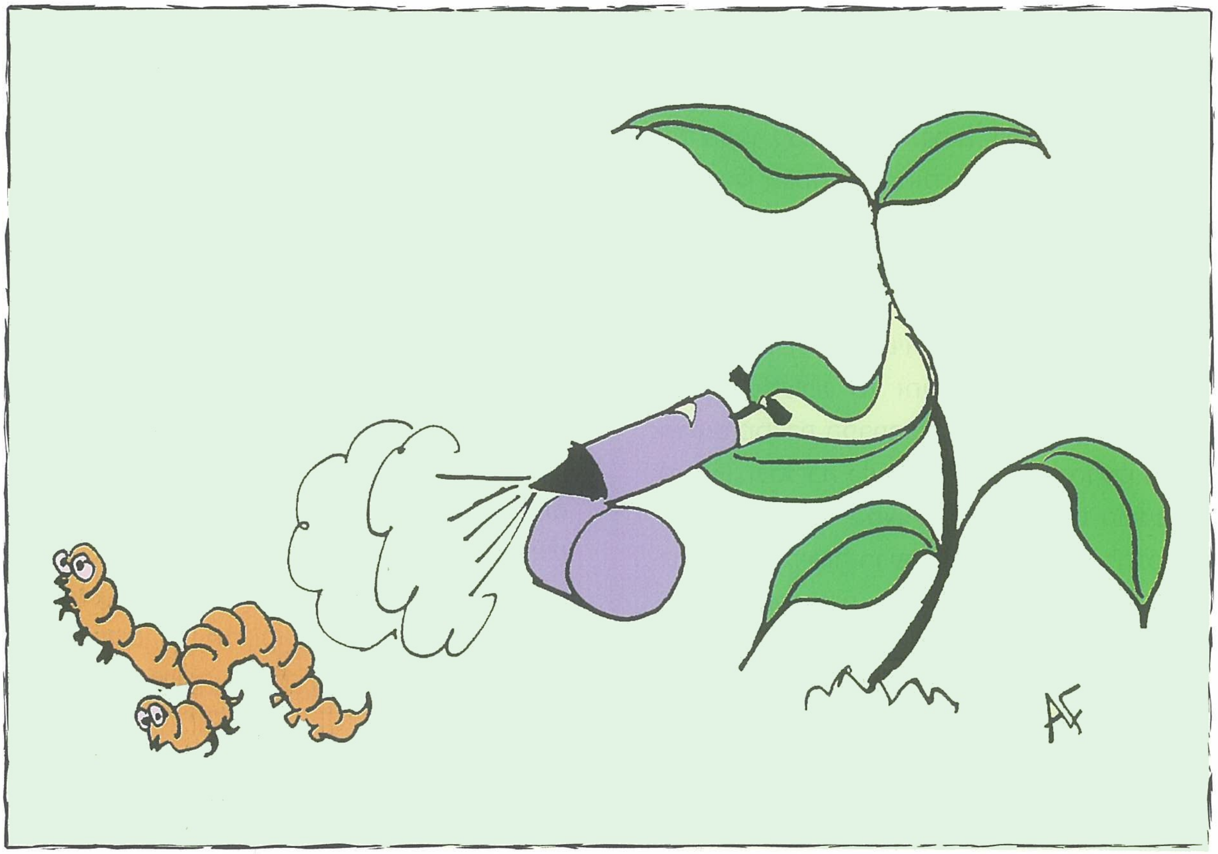
14. באיזה טווח טמפרטורות יצטרכו החיישנים המקובעים בסיב האופטי לפעול? לאור תשובתכם, אילו בדיקות נוספות הייתם מציעים לערוך לשם בחינת ישימות החיישן במערכות טבעיות?

15. הסבירו מדוע אי אפשר להסיק מתוצאות שליליות בחיידקים על חוסר סיכון לאדם, אך אפשר להסיק מפגיעה בחיידקים על פגיעה אפשרית באדם.

16. ברצונכם לפרסם בכנס את החיישנים הביולוגיים. סכמו את היתרונות והחסרונות שלהם לעומת חיישנים אחרים וכן את דרכי השימוש העתידיות בהם. הוסיפו איור.



ביטוי רעלן של חיידק ה-Bt בכלורופלסטים של צמחי טבק מקנה לצמחים עמידות נגד חרקים



עובד על-פי המאמר:

Overexpresion of the Bt cry2Aa2 operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals

מאת דה קוסה, מוהר, לי, מילר ודניאל, מאוניברסיטת מרכז פלורידה, אורלנדו, ארה"ב.

De Cosa, B., Moar, W., Lee, S.B., Miller, M.& Daniell H. (2001). Nature Biotechnology, 19, 71-74.

ביטוי רעלן של חיידק ה-Bt בכלורופלסטים של צמחי טבק מקנה לצמחים עמידות נגד חרקים

תמצית

בעיות שנוצרו בצמחים מהונדסים שלגרעין שלהם הוחדר הגן לרעלן שבודד מחיידק ה-Bt, גרמו לנו להנדס את האופרון המקודד לרעלן בכלורופלסטים של צמחי טבק. האופרון השתלב בגנום הכלורופלסטים בצמחים המהונדסים והתבטא בהם. חלבון הרעלן שנוצר התגבש בתאי הצמחים לגבישים, בדומה לרעלן שנוצר בחיידק ה-Bt. כמות הרעלן בצמחים המהונדסים הללו הייתה גבוהה פי מאה מכמות הרעלן שהתקבלה בצמחים מהונדסים שלגרעין שלהם הוחדר הגן לרעלן, והיא מהגבוהות שדווחו עד היום בכל הנוגע לצמחים מהונדסים. כמות הרעלן הגבוהה נשמרה גם לאחר שהעלים הצהיבו. זחלי עשים שונים שאכלו את עלי הצמחים המהונדסים, הפסיקו לאכול ומתו כעבור זמן קצר. תוצאות אלה סוללות דרך ביוטכנולוגית חדשה ליצירת צמחים מהונדסים.

מבוא

זחלים של חרקים הניזונים מגידולים חקלאיים הם אחת הבעיות המרכזיות של החקלאות בעולם כולו. פתרון חדיש לבעיה זאת הוא הנדוס צמחים בעזרת גן המקודד לרעלן של חיידק ה-*Bacillus thurigensis* – Bt. בחיידק זה נוצר חלבון רעיל לזחלים של חרקים. חלבון זה מתגבש לגביש הנצמד ל**נבג**[1] שיוצר החיידק (איור 1).

איור 1: נבג של חיידק ה-Bt (*Bacillus thurigensis*) ובצמוד לו גביש של הרעלן

הרעלן בצורתו הגבישית אינו רעיל לחרקים. אולם במערכת העיכול של זחלי חרקים מסוימים (בעיקר חרקים מסדרת הפרפראים), רמת ה-pH היא בסיסית (pH=9), ובסביבה כזו מתמוסס הגביש. הרעלן המסיס נקשר **לקולטנים**[2] המצויים על גבי תאים הבונים את דופן המעי. קישור הרעלן לקולטנים גורם להרס דופן המעי. בתוך דקות או שעות מפסיק הזחל לאכול, וכעבור שעות או ימים הוא מת מהרס מערכת העיכול ומזיהום בדם. רעלן ה-Bt אינו פוגע כלל בחרקים שבהם רמת ה-pH במערכת העיכול שונה (למשל חרקים טורפים), או ביצורים שהם חסרי קולטנים ייחודיים לרעלן ה-Bt (למשל: דו-חיים, דגים, יונקים וביניהם בני אדם).

בחיידק ה-Bt הרעלן הגבישי מקודד על ידי אופרון. האופרון מורכב מגן המקודד לחלבון הרעלן עצמו, ומשני גנים נוספים המקודדים לחלבונים המאפשרים את התגבשות הרעלן לגביש. בעבודות קודמות דווח על בידוד הגן המקודד לחלבון הרעלן מחיידקי Bt ועל הנדוסו לגרעין של תאי צמח.

[1] **נבג:** גופיף רבייה, חד-תאי או בעל תאים אחדים, שניתק מההורה וגורם להיווצרות פרט חדש. נבגים יכולים להיווצר בצורה מינית או אל-מינית בצמחים, בפטריות, בחיידקים ובפרוטוזואה, בדרך כלל כתגובה לשינויים קיצוניים בתנאים (לדוגמה, היעדר מזון בסביבה).

[2] **קולטן:** מולקולה בתא שיכולה לקשור באופן ייחודי מולקולה אחרת. כתוצאה מהיקשרות זו חלה שרשרת של אירועים ביוכימיים בתוך התא או מחוצה לו.

תאי צמחים שלגרעין שלהם הוחדר הגן לרעלן שבודד מחיידק ה-Bt, בטאו את הגן. חלבון הרעלן שנוצר כתוצאה מכך בתאים אלו היה מסיס ונמצא בכל תאי הצמח, ובכלל זה בגרגירי אבקה ובשורשים. ניסויים במעבדה ובשדה הראו שהצמחים המהונדסים הללו עמידים בפני חרקים שונים, ביניהם זחלי עש ההליותיס (המזיק העיקרי לגידולי הכותנה בארץ ובעולם) וזחלי נברן התירס האירופי, חרק שנגדו לא נמצא עדיין חומר הדברה כימי יעיל.

צמחים מהונדסים המכילים את הגן לרעלן בגרעין, מעוררים מספר בעיות, ואלה העיקריות שבהן:

1. הרעלן נוצר בכל תאי הצמח ויכול לחדור לקרקע ולפגוע בחרקים החיים באזור בית השורשים.
2. רמת ביטוי הרעלן בתאי הצמח נמוכה, והוא נוטה להתפרק מהר היות שבצורתו המסיסה הוא בלתי יציב.
3. הרעלן נוצר כחלבון מסיס ולכן יכול לפגוע במגוון רחב יותר של חרקים.
4. הגן לרעלן יכול לעבור לצמחים אחרים באמצעות גרגירי האבקה.

אחת האפשרויות להתגבר על הבעיות הללו היא להחדיר לצמח את אופרון הרעלן כולו, ובכך לאפשר היווצרות גביש יציב של הרעלן בתאי הצמח. אולם היות שהגנום האיקריוטי של הגרעין אינו מאפשר ביטוי של אופרון פרוקריוטי, לא ניתן להנדס את אופרון הרעלן לגנום הגרעין. עבודות שבהן ניסו להנדס לגרעין מספר גנים זרים בנפרד, כל אחד תחת בקרה נפרדת, נמשכו זמן רב והמחישו עד כמה תהליך זה מורכב ומסורבל. לכן לא נעשו עד היום ניסיונות להכניס לגרעין את כל הגנים המרכיבים את האופרון המקודד לרעלן הגבישי. על מנת להתגבר על בעיות אלו השתמשנו בשיטה חדישה המאפשרת החדרת גנים זרים לגנום של **הכלורופלסטים**[3]. היתרון המרכזי בהחדרת גן לכלורופלסט הוא שכמות החלבון שיקודד מגן המוחדר לכלורופלסט תהיה גבוהה יותר מכמות החלבון המקודד מגן המוחדר לגרעין. זאת מאחר שבכל תא צמח יש מאות כלורופלסטים, ובכל אחד מהם יש מספר רב של מולקולות DNA כלורופלסטי. יתרון נוסף הוא הדמיון בין גנום הכלורופלסט לגנום של פרוקריוטים המאפשר החדרה וביטוי של **אופרון**[4] שלם ובו מספר גנים המעורבים בתהליך ביוכימי מסוים ונמצאים תחת בקרה אחת, בניגוד להחדרה של גן בודד. לפיכך החדרת אופרון רעלן ה-Bt לכלורופלסט יכולה לאפשר יצירת גבישים של הרעלן גם בתאי צמחים.

בעבודה זו אנו מתארים יצירת צמחי טבק מהונדסים המכילים את אופרון רעלן חיידק ה-Bt בכלורופלסטים. בצמחים אלו נבדקה כמות רעלן ה-Bt ורעילות הצמחים לזחלים של חרקים שונים מסדרת **הפרפראים**[5], בהשוואה לצמחים שבהם הגן לרעלן הונדס לגרעין.

שיטות וחומרים

אורגניזמים

במחקר זה נעשה שימוש בשלושה זנים של צמחי טבק:

א. צמחי טבק לא מהונדסים.
ב. צמחי טבק מהונדסים שבהם הגן לרעלן הוחדר לגרעין התא.
ג. צמחי טבק מהונדסים שבהם אופרון רעלן ה-Bt הוחדר לגנום הכלורופלסט.

[3] **כלורופלסט:** כלורופלסט הוא אברון המכיל חומר תורשתי יחודי, בעל כושר שכפול עצמי. בתאים ירוקים הכלורופלסט מכיל כלורופיל ומתבצע בו תהליך פוטוסינתזה. ה-DNA של הכלורופלסט – הגנום הכלורופלסטי – הוא ממוצא פרוקריוטי.

[4] **אופרון:** צבר של גנים הנמצאים בסמיכות זה לזה על פני הכרומוזום של יצור פרוקריוטי. הבקרה על ביטוי הגנים באופרון היא משותפת, ולרוב משתתפים תוצרי הגנים שבאופרון באותו התהליך בתא.

[5] **סדרת הפרפראים:** סדרה השייכת לחרקים. כוללת את הפרפר והעש.

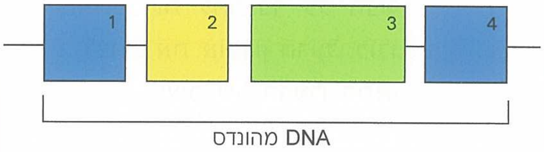
לאחר ההנדוס גודלו הצמחים בתרביות תאים בתנאים סטריליים.

לבדיקת רעילות הצמחים המהונדסים שימשו זחלים של שלושה מיני עשים המזיקים ליבולים חקלאים: זיפית (עש הכותנה) (*Helicoverpa zea*), עש הסלק (*Spodoptera exigua*) ועש הטבק (*Heliothis virescens*) וזחלים של פרפר הדנאית (*Danaus plexippus*) אשר אינם מזיקים ליבולים חקלאיים. את הזחלים מגדלים במעבדה בתנאים מבוקרים.

איור 2: זחלים ובוגרים של עש הטבק, עש הסלק, עש הכותנה ודנאית

הכנת הנשא[6] להנדוס גן הרעלן

יצירת DNA מהונדס (איור 3): לאחר בידוד האזור המבני של האופרון המקודד לרעלן מחיידקי Bt (*Bacillus thurigensis*) (להלן: האופרון המקודד לרעלן מחיידקי ה-Bt), הוצמד אליו אזור בקרת תעתוק שבודד מאחד הגנים הייחודיים לכלורופלסט, וגן המקנה עמידות לאנטיביוטיקה (שמקורו בחיידק ה-*E. coli*) ומשמש כגן בורר. הגן לעמידות מבוקר אף הוא על ידי אותו אזור הבקרה. בסוף אופרון הרעלן הוצמד מקטע DNA המורה על הפסקת התעתוק, שמקורו גם כן בכלורופלסט. שני אזורי הבקרה להתחלת התעתוק ולסיומו שמקורם בכלורופלסט, מבטיחים שאופרון רעלן ה-Bt והגן לעמידות יתבטאו אך ורק בכלורופלסט ולא בגרעין. כנשא לאופרון ה-Bt שימש פלסמיד המכיל רצפים מגנום הכלורופלסט. הנשא מסוגל לחדור לתא הצמח ולכלורופלסטים ולהשתלב בגנום הכלורופלסטים. גם הגן הבורר יתבטא רק כשהנשא נמצא בכלורופלסט.



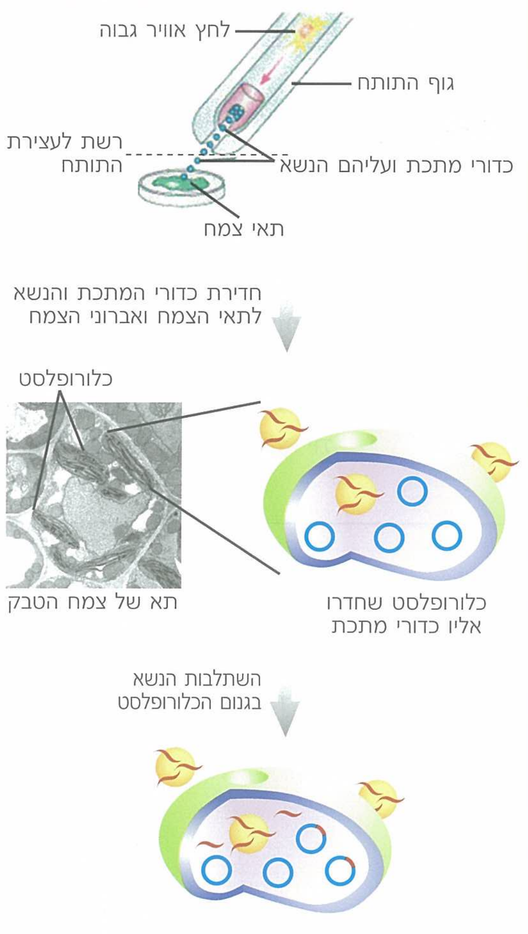
1. אזור בקרה להתחלת התעתוק שמקורו בגנום הכלורופלסט
2. גן לעמידות לאנטיביוטיקה שמקורו מחיידק ה-*E.coli*
3. אופרון רעלן ה-Bt המכיל שלושה גנים שמקורו מחיידק ה-Bt
4. אזור בקרה לסיום התעתוק שמקורו בגנום הכלורופלסט

איור 3: DNA מהונדס המכיל את אופרון הרעלן של חיידק ה-Bt

[6] **נשא:** אמצעי להעברת קטעי DNA לתוך תאים, כמו פלסמיד או נגיף.

החדרת אופרון רעלן ה-Bt לתאי צמח טבק באמצעות הפגזה ביוליסטית

ביוליסטיקה[1] משמשת להחדרת DNA לתאים של צמחים באמצעות מכשיר המכונה "תותח גנים". מכינים כדורי מתכת בקוטר 1 מיקרומטר ומצפים אותם בנשא. 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 4). בסביבה המימית שבתא מולקולות הנשא ניתקות מהכדורים. חלק מהן משתלבות בגנום הכלורופלסטים וחלק בגנום הגרעין. בגלל שאזורי הבקרה על שלבי ההתחלה והסיום של תעתוק האופרון המהונדס הם יחודיים לכלורופלסט, האופרון יתבטא רק מגנום הכלורופלסט ולא יהיה ביטוי שלו אם הוא חדר לגרעין.



איור 4: תיאור סכמתי של החדרת האופרון המקודד לרעלן לתוך כלורופלסט של צמח טבק על ידי הפגזה ביוליסטית

בידוד תאי צמח המכילים את אופרון רעלן ה-Bt וגידולם

כדי לברור את התאים שקלטו את ה-DNA הזר בכלורופלסטים, מגדלים את התאים בתנאים סטריליים בנוכחות אנטיביוטיקה. האנטיביוטיקה שבה משתמשים מונעת סינתזה של חלבונים בכלורופלסט, 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 הנשא בכלורופלסטים יתפתחו לצמח שלם בנוכחות האנטיביוטיקה.

קביעת רמת חלבון הרעלן בשיטת ה-ELISA

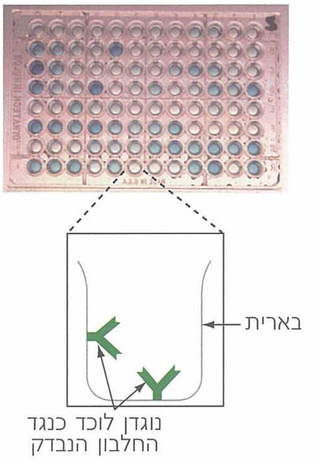
בדיקת ריכוז חלבון הרעלן Bt במיצוי מעלים של צמחים מהונדסים, שאליהם הוחדר הגן המקודד לרעלן ה-Bt נעשית בשיטת ה-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). שיטה זו מאפשרת גילוי נוכחותם של חלבונים שונים בדוגמה (כמו הורמונים, אנזימים, רעלנים, ועוד) וקביעת כמותם. השיטה מורכבת מארבעה שלבים עיקריים: ציפוי בארית בנוגדנים, הוספת דוגמה המכילה את החלבון הנבדק, חשיפה לנוגדן שני המחובר לאנזים ותגובת צבע. בין השלבים הללו שוטפים מרכיבים שלא נקשרו, כפי שיוסבר בהמשך (ראה איור 5).

[1] **ביוליסטיקה:** שיטה שבה מחדירים קטעי DNA לתאים, לרוב לתאי צמחים, באמצעות הפגזה של חלקיקי מתכת המצופים בקטעי ה-DNA.

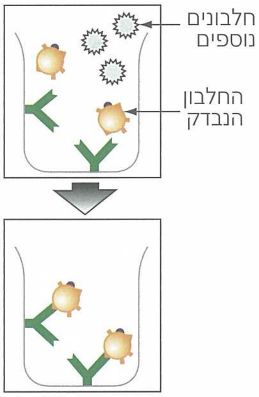
איור 5: השלבים של שיטת ה-ELISA לקביעת ריכוז של חלבון

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

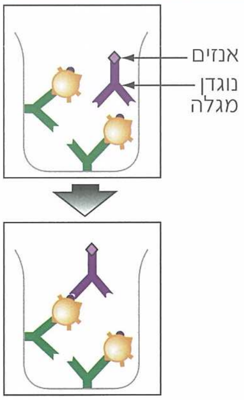
1. **ציפוי הבאריות בנוגדנים לוכדים**
מכניסים לתוך כל בארית תמיסה המכילה נוגדנים שנקשרים באופן ייחודי לחלבון שאת כמותו מעוניינים לבדוק. אלה הנוגדנים הלוכדים. הנוגדנים נצמדים באופן כימי לדפנות הבארית, כך שכל בארית מכילה מספר רב של נוגדנים המצפים את הדפנות. בסוף שלב זה שוטפים את הנוגדנים שלא נקשרו לדפנות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



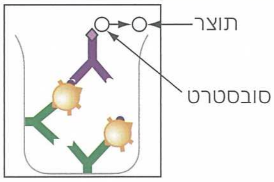
2. **הוספת דוגמה המכילה את החלבון הנבדק**
מוסיפים דוגמה המכילה תערובת חלבונים. רק החלבון הנבדק שכנגדו הוכנו הנוגדנים הלוכדים ייקשר אליהם. בסוף שלב זה שוטפים את החלבונים שלא נקשרו לנוגדנים הלוכדים.



3. **חשיפה לנוגדנים המחוברים לאנזימים - נוגדנים מגלים**
מוסיפים לבארית נוגדנים אחרים, כנגד החלבון הנבדק. אל הנוגדנים הללו מחוברות מולקולות של אנזימים היוצרים תגובת צבע בנוכחות סובטרט מסוים ולכן הם נקראים נוגדנים מגלים. נוגדנים אלו נקשרים לאזור אחר בחלבון הנבדק. נוצר תצמיד (שניתן לדמותו לכריך): נוגדן לוכד-חלבון נבדק-נוגדן מגלה. בסוף שלב זה שוטפים החוצה את עודפי הנוגדן המגלה שלא נקשרו לחלבון הנבדק.



4. **תגובת צבע**
מוסיפים סובטרט אשר מגיב עם האנזים הקשור לנוגדן המגלה, וכתוצאה מכך צבע התמיסה משתנה. היות שלכל בארית מוסיפים כמות שווה של סובסטרט, ככל שיש יותר מולקולות אנזים, עצמת הצבע חזקה יותר. כמות האנזים בבאריות נמצאת ביחס ישר לכמות החלבון הנבדק הקשור לנוגדן הלוכד. לכן, עוצמת הצבע נמצאת ביחס ישר לכמות החלבון הנבדק. אפשר להכין עקומת כיול על-ידי בדיקת עוצמת הצבע הנוצר בנוכחות כמויות ידועות מראש של החלבון הנבדק. בעזרת עקומת כיול כזו ניתן להעריך את כמותו של החלבון הנבדק בדוגמה.

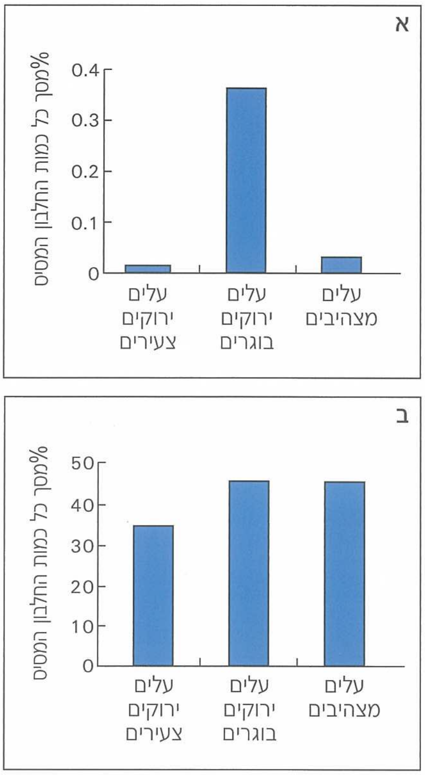


קביעת ריכוז חלבון הרעלן של חיידקי ה-Bt נעשית באמצעות **עקומת כיול**[8]. לבאריות המצופות נוגדן כנגד חלבון ה-Bt מוסיפים כמויות ידועות של חלבון ה-Bt. לבאריות אלו מוסיפים נוגדן שני, שאליו צמוד אנזים. לאחר הוספת סובסטרט ייחודי לאנזים, בודקים את עוצמת הצבע בבאריות השונות. ניתן לבנות עקומה המבטאת את עוצמת הצבע כתלות בריכוז החלבון. בעזרת עקומה זו ניתן לקבוע את כמות החלבון Bt בדגימות שונות שבהן כמותו אינה ידועה. לצורך ביצוע המדידה, יש להמיס תחילה את החלבונים הלא מסיסים בתא, וביניהם גם את הגביש של הרעלן. לכן, מבטאים את כמות הרעלן כאחוז מסך כל החלבונים המסיסים של התא.

תוצאות

ביטוי הרעלן בעלים של צמחי טבק

בדקנו בשיטת ELISA אם נוצר רעלן ה-Bt בצמחי טבק מהונדסים ובאיזו כמות (גרף 1). בצמחי טבק שבהם מהונדס הגן לרעלן ה-Bt לגרעין, כמות הרעלן בעלים ירוקים בוגרים היא 0.4% מכלל כמות החלבון המסיס בתא. בעלים ירוקים צעירים או מצהיבים של צמחים מהונדסים אלו כמות הרעלן נמוכה (פחות מ-0.1%). לעומת זאת, בצמחים שאליהם הוחדר אופרון רעלן ה-Bt לכלורופלסטים, כמות הרעלן בעלים ירוקים בוגרים גבוהה (48% מכלל כמות החלבון המסיס בתא). בצמחים אלה כמות הרעלן עולה ככל שגיל העלה עולה ונשמרת גבוהה גם בעלים מצהיבים (גרף 1). למרות הכמות הגדולה של החלבון המהונדס בכלורופלסטים, לא נצפתה פגיעה בכושר הפוטוסינתזה, וצמחי הטבק פרחו והניבו זרעים באופן תקין (התוצאות אינן מוצגות כאן).

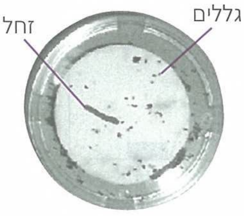
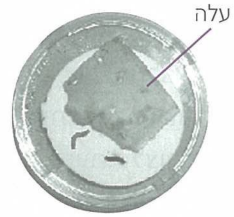


גרף 1: ריכוז חלבון רעלן ה-Bt בעלים של צמחי טבק מהונדסים
6א. צמחים מהונדסים כך שהגן לרעלן Bt נמצא בגרעין
6ב. צמחים מהונדסים כך שהגן לרעלן Bt נמצא בכלורופלסט

תגובת חרקים לצמחים המהונדסים

במטרה לבחון את תגובת החרקים לצמחים המהונדסים, ניתנו לזחלים של שלושה מיני עשים המזיקים ליבולים חקלאיים: זיפית (עש הכותנה), עש הסלק ועש הטבק, עלים של צמחי טבק מהונדסים משני סוגים – צמחים מהונדסים המכילים את הגן לרעלן בגרעין וצמחים מהונדסים המכילים את אופרון רעלן ה-Bt בכלורופלסטים. כביקורת ניתנו לזחלים

[8] **עקומת כיול:** אוסף הנתונים המתקבל כתוצאה ממדידת משתנה ידוע מראש באמצעות משתנה אחר. לדוגמה: מדידת עצמת הבליעה באורך גל מסוים של סדרת מבחנות המכילות ריכוזים ידועים הולכים ועולים של אנזים מסוים. נתונים אלה משמשים להשוואה עם דגימה שבה אין ידועים הנתונים אודות המשתנה הנבדק.

סוג הצמח / סוג הזחל	צמח טבק לא מהונדס	צמח טבק מהונדס המכיל את גן הרעלן בגרעין	צמח טבק מהונדס המכיל את אופרון רעלן ה – Bt בכלורופלסטים
זחל עש הסלק	 העלים נאכלו תוך 24 שעות. ניתן להבחין בריבוי גללים. כל הזחלים נותרו בחיים.	 נאכלה כמות קטנה מהעלים. הזחלים הפסיקו לאכול כעבור 24 שעות ומתו 48 שעות אחר-כך.	 העלים כמעט ולא נאכלו. הזחלים הפסיקו לאכול כעבור 24 שעות ומתו 48 שעות אחר-כך.
זחל עש הטבק	 העלים נאכלו תוך 24 שעות. ניתן להבחין בריבוי גללים. כל הזחלים נותרו בחיים.	 העלים כמעט ולא נאכלו. הזחלים מתו כעבור חמישה ימים.	 העלים כמעט ולא נאכלו. הזחלים מתו כעבור שלושה ימים.
זחל עש הכותנה	 העלים נאכלו תוך 24 שעות. ניתן להבחין בריבוי גללים. כל הזחלים נותרו בחיים.	 העלים נאכלו בחלקם. זחלי עש הכותנה המשיכו לאכול מעלי הצמח במשך שלושה ימים ומתו חמישה ימים אחר-כך.	 נאכלה כמות מסוימת מהעלים. הזחלים אכלו במשך 24 השעות הראשונות, הפסיקו לאכול ומתו כעבור שלושה ימים.

טבלה 1: השפעת אכילת צמחי טבק שונים על זחלי עשים

עלים של צמחי טבק לא מהונדסים (טבלה 1). שלושת מיני הזחלים אכלו עד תום את העלים של צמחי הטבק הלא מהונדסים. לפי כמות הגללים שבצלחות ניתן לשער שהם אף עיכלו את העלים שמהם ניזונו. כאשר ניתנו לזחלים ממינים אלו צמחי טבק מהונדסים המכילים את רעלן ה- Bt בכלורופלסט או בגרעין, אכלו כל הזחלים מעט במשך פרק זמן קצר, הפסיקו לאכול ומתו כעבור מספר שעות או ימים. אפשר לראות הבדלים קטנים בין השפעת צמחי טבק מהונדסים המכילים את הגן לרעלן בגרעין לבין צמחים מהונדסים המכילים את אופרון רעלן ה-Bt בכלורופלסטים. זחלי כל העשים מתו בין 3-4 ימים לאחר אכילת עלי צמחים מהונדסים המכילים את אופרון רעלן ה-Bt בכלורופלסטים, ואילו זחלים שאכלו מעלי הצמחים המהונדסים המכילים את הגן לרעלן בגרעין מתו כעבור 3-8 ימים (תלוי בסוג העש). זחלים של דנאית, אשר אינם מזיקים ליבולים חקלאיים, שניזונו מעלים שרוססו בגרגירי אבקה של הצמחים שהונדסו בכלורופלסט לא נפגעו כלל (התוצאות אינן מוצגות כאן).

דיון

מחקר זה מדווח על שיטה חדשה המאפשרת החדרה של אופרון ממקור חיידקי לכלורופלסטים של תאי צמח והפעלתו בהם. תוצאות המחקר מראות שאופרון רעלן ה-Bt חדר לכלורופלסט. מאחר שבכל תא צמח יש כמה מאות כלורופלסטים ובכל כלורופלסט מספר מולקולות של DNA כלורופלסטי, רמת הרעלן הנוצר בתאים המהונדסים היא גבוהה ומגיעה לפי 100 ויותר מרמתו בצמחים מהונדסים המכילים את הגן לרעלן בגרעין. בנוסף לרמת הביטוי המוגברת בגלל ההחדרה לכלורופלסט, רמת חלבון הרעלן בצמחים המכילים את אופרון רעלן ה-Bt בכלורופלסטים נשמרת גבוהה וקבועה בכל שלבי ההתפתחות של העלה, מכיוון שהאופרון מאפשר יצירת גביש של הרעלן. הגביש הנוצר בצמחים אלו מקנה יציבות לחלבון, כך שהוא פחות רגיש לפירוק על ידי אנזימים מעכלי חלבונים בתוך התא. זאת בניגוד לצמח שאינו מכיל את אופרון הרעלן, אלא את הגן לרעלן בלבד, ובו הרעלן רגיש יותר לפירוק ולכן נמצא שהוא מתבטא רק בעלים ירוקים בוגרים וברמת ביטוי נמוכה יחסית (גרף 1).
כאשר האכילו זחלי עשים המשתייכים לשלושה זני חרקים שונים, עלים מצמחי הטבק המהונדסים, נמצא שבתנאי מעבדה גרמה אכילת העלים של צמחי הטבק המהונדסים לתמותת כל הזחלים (טבלה מספר 1). נמצא הבדל קטן בלבד בין השפעת הצמחים המכילים את הגן לרעלן בגרעין לבין השפעת הצמחים המכילים את אופרון רעלן ה-Bt בכלורופלסטים. ניתן להניח שמאחר שצמח המכיל את האופרון מייצר כמות גבוהה יותר של הרעלן, השפעתו בהדברת חרקים בתנאי שדה תהיה יעילה יותר מזו של צמח המכיל את הגן לרעלן בגרעין התא.
החדרת אופרון רעלן ה-Bt לכלורופלסטים מהווה פתרון למספר בעיות אקולוגיות שהתעוררו כאשר הוחדר הגן לגרעין של תאי צמח. צמחים שמכילים את אופרון רעלן ה-Bt בכלורופלסט ויוצרים את הרעלן כגביש, רעילים למגוון מינים צר יותר של חרקים. הסיבה לכך היא שכדי שהרעלן ייקשר לתאי המעי ויגרום למוות, הגביש צריך להתפרק לחלבון מסיס. פירוק גביש הרעלן מתרחש רק בסביבה בסיסית (pH=9). סביבה זו מאפיינת את מערכת העיכול של זחלים מסדרת הפרפראים, שניזונים מצמחים כגון זחלי העשים המזיקים לגידולים חקלאים שנבדקו כאן.
אחת הטענות כנגד שימוש בצמחים מהונדסים העמידים לחרקים היא שצמחים אלו יפגעו גם בחרקים שאינם מזיקים לגידולים. טענה זו מבוססת על תוצאות ניסויים שנעשו בעבר, שבהם הראו שגרגירי אבקה של צמחים מהונדסים המכילים את הגן לרעלן בגרעין פגעו בזחלי פרפר הדנאית. בניסוי שתוצאותיו לא תוארו במאמר זה, הואכלו זחלי דנאית בגרגירי אבקה של צמח המכיל את אופרון רעלן ה-Bt בכלורופלסטים. הזחלים המשיכו לאכול ולייצר גללים במשך כל ימי הניסוי. מכאן ניתן לשער שגרגירי האבקה

של צמחים אלו אינם מכילים את הרעלן. חשש נוסף הקשור בגידול צמחים מהונדסים הוא הופעת חלבון זר בחלקי צמח שונים כגון פרות, זרעים או תאי שורש שיכולים להפריש אותו לקרקע. בצמחים מהונדסים המכילים את אופרון רעלן ה-Bt בכלורופלסטים, שימוש באזור בקרה של גנים המעורבים בתהליך הפוטוסינתזה יבטיח שהאופרון יבוא לידי ביטוי אך ורק בכלורופלסטים. יתרון נוסף בהחדרת אופרון רעלן ה-Bt לכלורופלסטים הוא שהגן לא יימצא בגרגירי האבקה, וכך פוחתת הסכנה שהתכונות הזרות יעברו באמצעות גרגירי האבקה לצמחי טבע שאינם מהונדסים. הצלחת השיטה בצמחי הטבק תאפשר ליישם אותה בגידולים חקלאיים אחרים. החדרת גנים או אופרונים לגנום הכלורופלסט יכולה להוות לא רק פתרון יעיל להדברת חרקים מזיקים, אלא מודל לשימוש בצמחים כמייצרי מגוון חלבונים זרים למטרות שונות.

רעיונות מרכזיים

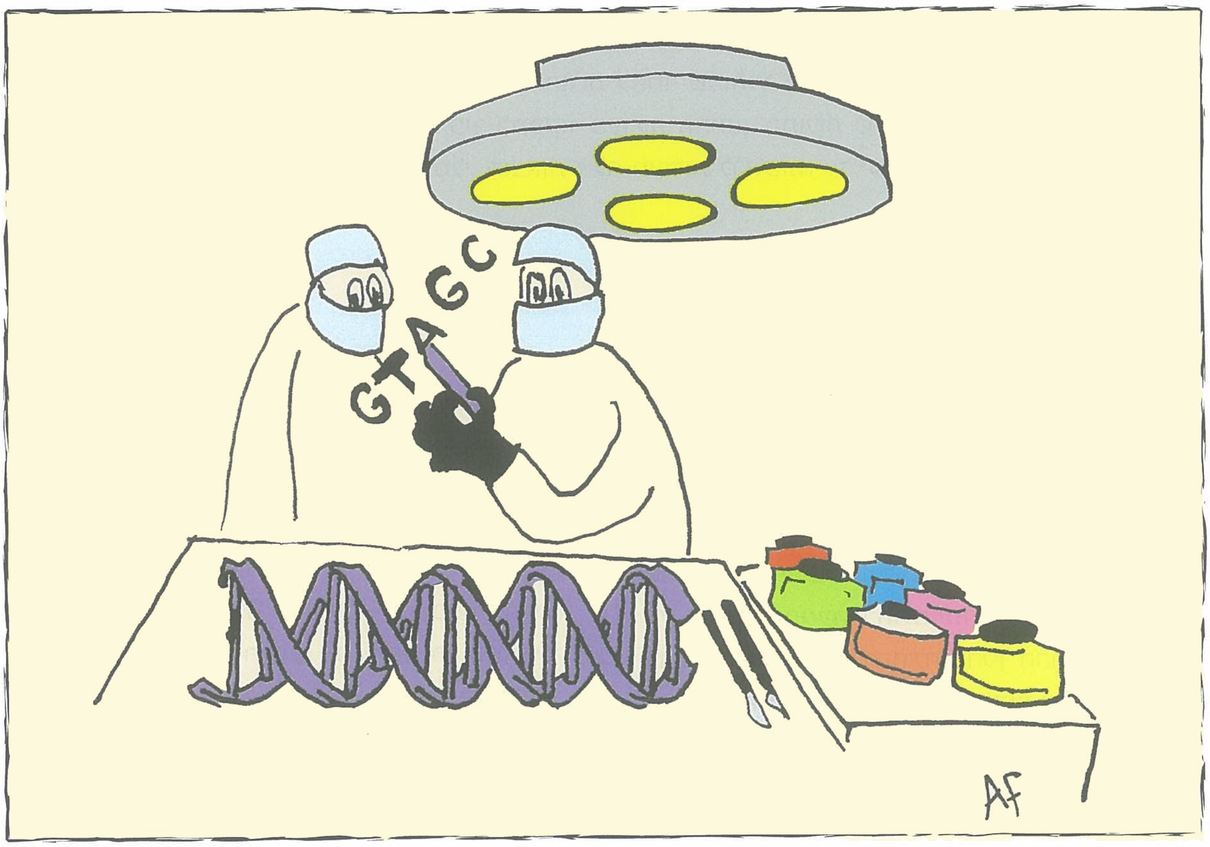
1. אפשר לנצל יצורים הפוגעים ביצורים מזיקים לצורך הדברה ביולוגית.
2. צמחים מהונדסים המכילים את הגן המהונדס בתוך הגרעין, יכולים להעביר אותו לצמחים אחרים בתהליך ההאבקה, בניגוד לצמחים מהונדסים המכילים את הגן המהונדס בכלורופלסט.
3. ביטוי גנים מהונדסים על ידי צמחי בר יכול לגרום להפרת שיווי המשקל של מערכת אקולוגית.
4. בגלל הדמיון של גנום הכלורופלסט לגנום יצורים פרוקריוטים, אזורי הבקרה של גנים המתבטאים בכלורופלסט, שונים בדרך כלל מאזורי בקרה של גנים המתבטאים בגרעין.
5. כאשר קיימת התאמה ייחודית גבוהה בין מולקולה רעילה לקולטן שלה, נמנעת פגיעה ביצורים אחרים חסרי קולטן.
6. ניתן לבחון תוצאות של ניסוי ליצירת אורגניזם מהונדס ברמת ה-DNA, ברמת ה-RNA שליה, ברמת נוכחות החלבון הזר וברמת פעילותו.
7. כאשר חלבון מהונדס מיועד לפגוע באורגניזמים אחרים, חשוב לבדוק את טווח פעילותו הביולוגית על מספר אורגניזמים, ביניהם אורגניזמים שיש עניין לפגוע בהם או לחילופין – להימנע מפגיעה בהם.
8. הכרה ייחודית בין נוגדן לחלבון משמשת בסיס לשיטות אבחון וכימות של חלבונים.

שאלות

בתשובות אתם מתבקשים לשלב ידע מהמאמר וממבנית המבוא. הסבירו את תשובותיכם.

1. א. מדוע קיימת סכנה להתפתחות חרקים עמידים בתגובה לשימוש בחומרי הדברה כימיים?
   ב. האם קיימת סכנה כזאת גם בתגובה לשימוש בהדברה ביולוגית?
   ג. האם קיימת סכנה כזאת גם בתגובה לשימוש בצמחים מהונדסים עם הגן המקודד לרעלן של חיידק ה-Bt?
2. מדוע לדעתכם יש צורך לרסס בחיידק ה-Bt מספר רב של פעמים במשך עונת הגידול?
3. הגמטות הזכריות של הצמח, שמרכיבות את גרגירי האבקה, מכילות גרעין וכמות אפסית של ציטופלסמה. כיצד נתון זה מסביר את העובדה שצמחים עם גן מהונדס בגרעין יכולים להעביר אותו לצמחים אחרים, אך צמחים עם גן מהונדס בכלורופלסט אינם יכולים לעשות זאת?
4. מהי הסכנה שבהעברת הגנים הבאים לצמחי בר:
   א. גן המקנה עמידות נגד חרקים.
   ב. גן המקנה עמידות נגד קוטלי עשבים.
5. כיצד אפשר להסביר את העובדה שרעלן החיידק Bt אינו פוגע ביונקים?
6. מדוע טוענים החוקרים שהרעלן שהונדס בכלורופלסטים פוגע פחות בחרקים לא מזיקים מאשר הרעלן שהונדס בגרעין?
7. בהפגזה ביוליסטית הנשא המכיל את האופרון של רעלן החיידק Bt, חודר באופן אקראי לחלקי התא השונים. איזה מרכיב של הנשא מבטיח שהאופרון יתבטא רק בכלורופלסטים?
8. בבניית הנשא נעשה שימוש בגן המקנה עמידות כנגד סוג מסוים של אנטיביוטיקה, הפוגעת באופן ייחודי בסינתזה של חלבונים בכלורופלסט. כיצד תשפיע אנטיביוטיקה זו על התפתחותם של תאי קאלוס שבהם הנשא המהונדס חדר רק לגרעין?
9. הסבירו את הצורך להשתמש במרכיבים הבאים של שיטת ה-ELISA: נוגדן לוכד, נוגדן מגלה, שטיפה אחרי הכנסת הנוגדן המגלה, סובסטרט, עקומת כיול. מהי הבקרה המתאימה למהימנות השיטה?
10. התבוננו בגרפים המתארים את ריכוז חלבון הרעלן בעלים מסוגים שונים. נסחו את שאלת המחקר, ציינו מהו המשתנה התלוי והבלתי תלוי. מדוע בחרו החוקרים להציג את התוצאות בגרף עמודות?
11. מה הן שאלות המחקר שהובילו לתוצאות המופיעות בטבלה 1? ציינו את המשתנים השונים.
12. האם התוצאות שמתקבלות בניסוי האכלת הזחלים תואמות את תוצאות הניסוי לקביעת רמת הרעלן בצמחים המהונדסים? אם לא, כיצד אפשר להסביר את ההבדל בין התוצאות?
13. על מנת לבדוק אם תהליך ההנדוס של הגן המקודד לרעלן הצליח, חוקרים יכולים להשתמש במספר שיטות: גלאי המורכב מקטע של DNA, גלאי המורכב מנוגדן או מבחן ביולוגי. מהו סוג המידע שיתקבל באמצעות כל אחת מהשיטות?

טיפול במחלה ADA-SCID על-ידי ריפוי גני של תאי גזע ממוח העצם



עובד על-פי המאמר:

Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning

מאת א. איוטי וחובריו ביניהם פרופ' ש. סלוין מביה"ח הדסה עין-כרם, ירושלים.

Aiuti, A., Slavin, S., Aker, M., Ficara, F., Deola, S., Mortellaro, A., Morecki, S., Andolfi, G., Tabucchi, A., Carlucci, F., Marinello, E., Cattaneo, F., Vai, S., Servida, P., Miniero, R., Roncarolo, MG. & Bordignon, C. (2002). Science, 296, 2410-2413

טיפול במחלה ADA-SCID על ידי ריפוי גני של תאי גזע ממוח העצם

תמצית

המחלה ADA-SCID היא מחלת דם תורשתית הפוגעת בתפקודה של מערכת החיסון, בשל מוטציה בגן המקודד לאנזים ADA. הטיפול במחלה ADA-SCID כרוך בהשתלת מוח עצם או בתלות תמידית בזריקות של האנזים התקין, ואינו מרפא את כל החולים במחלה. ניסיונות ראשונים לטיפול במחלה באמצעות ריפוי גני שבמהלכו הוחדר הגן ADA התקין לתאי החולים, לא הניבו עד כה תוצאות חד משמעיות. מחקר זה מתאר תהליך של ריפוי גני שנעשה בשתי פעוטות חולות ADA-SCID, שטיפולים בהשתלת מוח עצם מתורם או בזריקות של האנזים ADA לא היו אפשריים עבורן. החזרת תאי גזע ממוח עצם של החולות לאחר שהוחדר אליהם גן ADA תקין, גרמה להן לעלייה ברמת תאי הדם הלבנים מכל הסוגים ולשיפור בתפקוד מערכת החיסון. החולות כרגע בביתן, ללא סימנים קליניים של המחלה, גדלות ומתפתחות באופן נורמלי. תוצאות אלה מעידות לראשונה על יעילות הריפוי הגני לטיפול בחולי ADA-SCID.

מבוא

מחלות כשל חיסוני חמור ומורכב (Severe Complex Immunodeficiency, SCID) הן **מחלות תורשתיות**[1]. מאפיין אותן תפקוד כושל (או לקוי) של **תאי דם לבנים**[2], שהם חלק ממרכיביה של מערכת החיסון. במקרים חמורים נגרם מוות, שכן ילדים הנולדים עם המחלה אינם יכולים להתגונן בפני גורמים זרים כמו חיידקים, וירוסים או פטריות הגורמים למחלות זיהומיות. בעבר נהוג היה לשמור על ילדים חולי SCID בבידוד מוחלט בתוך בועה סטרילית על מנת שלא ייחשפו לגורמים מזהמים, ולכן דבק בהם השם "ילדי הבועה".

מחקרים הראו שבחלק מהמקרים הפגם הגנטי הגורם למחלה הוא **מוטציה**[3] בגן המקודד לאנזים ADA (אדנוזין דאמינאז), המשתתף בתהליך הפירוק של מולקולות אדנוזין. כתוצאה מהמוטציה נוצר אנזים פגום שאינו מסוגל לתפקד כראוי, ובתא מצטברות מולקולות אדנוזין שבכמות גדולה הן רעילות לתאים. מסתבר שהצטברות של אדנוזין גורמת בעיקר למוות של **תאי הגזע**[4] במוח העצם שאמורים להתמיין **לתאי T**[5]. כלומר, הפגיעה **בהתמיינות**[6] של תאי T במחלה ADA-SCID חלה כבר בתחילת תהליך ההתמיינות של תאי T מתאי המוצא שלהם. באופן עקיף יש לכך השפעה גם על תפקודם של **תאי דם לבנים מסוג B**[7]. שמה של המחלה "כשל חיסוני חמור ומורכב" ניתן לה, אם כן, בשל חומרת המחלה ובשל העובדה שמדובר בפגיעה בתפקוד של סוגים שונים של תאי דם לבנים.

[1]**מחלה תורשתית:** מחלה הנגרמת מפגם בחומר התורשתי. הפגם קיים בכל תאי הגוף, כולל בתאי הזוויג, ולכן יכול לעבור בתורשה לצאצאים.

[2]**תאי דם לבנים:** תאי דם שמהווים חלק ממערכת החיסון.

[3]**מוטציה:** שינוי ברצף, בארגון או בכמות של החומר התורשתי. מוטציה יכולה להיות שינוי בנוקלאוטיד אחד ב-DNA או חסר של קטע בכרומוזום.

[4]**תאי גזע:** תאים בלתי ממוינים שיכולים להתמיין למגוון סוגי תאים וכן ליצור תאי גזע אחרים. לדוגמה: תאי גזע במוח העצם משמשים מקור לכל סוגי תאי הדם בגוף.

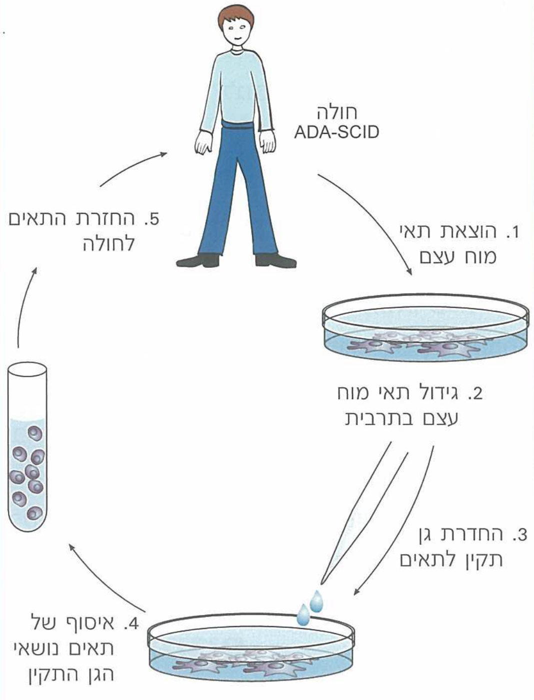
[5]**תאי דם לבנים מסוג T:** סוג של תאי דם לבנים המשתתפים בתגובה החיסונית של הגוף. תאים אלה מזהים גורמים זרים המוצגים על פני תאים אחרים של מערכת החיסון ומגייסים תאים נוספים על מנת לסלקם.

[6]**התמיינות:** תהליך שבו תאים בגוף הבוגר או בעובר המתפתח רוכשים בהדרגה את הצורה והתפקיד שלהם ביצור הרב תאי. לדוגמה, תאי מוח עצם מתמיינים לסוגים שונים של תאי דם, שלכל אחד מהם תפקיד ייחודי וצורה אופיינית.

ניסיונות לרפא חולים ב-ADA-SCID מתבססים על שתי גישות טיפוליות. בגישה אחת מבצעים השתלת **תאי מוח עצם**[8] או **השתלת תאי גזע מחבל הטבור**[9] מתורם בריא: מכיוון שתאי T נוצרים מתאי גזע במוח העצם ויכולים להיווצר גם מתאי גזע מחבל הטבור, מוחלף מוח העצם של החולה במוח עצם או בתאי גזע מחבל הטבור של אדם בריא, שמייצר תאי T תקינים. אולם הצלחת ההשתלות תלויה במציאת תורם מתאים, כדי שלא תיווצר דחייה חיסונית. חולים רבים אכן מטופלים על ידי השתלה מתורם, אלא שבערך ב-30% מהחולים נכשלים ניסיונות ההשתלה, בעיקר בשל בעיות של דחייה. גישה טיפולית אחרת ב-ADA-SCID מתבססת על הזרקה של האנזים ADA התקין לחולים. גם טיפול זה אינו נותן מענה מושלם למחלה: הזרקת האנזים יעילה למשך כשבוע בלבד, ויש לחזור עליה מדי שבוע. הטיפול המתמשך באנזים גורם לחולים קושי וסבל ועלותו גבוהה מאוד.

הקושי בטיפול במחלה ADA-SCID ובמחלות תורשתיות קשות אחרות הוביל לרעיון של טיפול באמצעות **ריפוי גני**[10]. היתרון העיקרי בריפוי גני הוא שהגן התקין שמוחדר לתאים של החולה אמור לאפשר יצירה מתמדת של חלבון תקין באמצעות מנגנון טבעי בתא. לכן טיפול יחיד אמור לרפא את החולה ללא צורך בטיפולים חוזרים. בנוסף לכך, כיוון שמדובר בתאים של החולה עצמו, הסיכוי לדחייה חיסונית קטן.

ניסויים קליניים[11] ראשונים שבהם נבדקה האפשרות לרפא באמצעות ריפוי גני נעשו בשלושה חולי ADA-SCID. לתאי T שבודדו מכל אחד משלושת החולים הוחדר הגן המקודד ל-ADA תקין, והם הוחזרו אחר כך לגופם של החולים (איור 1).



איור 1: איור סכמתי המתאר את שלבי הניסויים הקליניים שנעשו בשלושת חולי ADA-SCID

בשל הראשוניות של הניסוי הקליני, חויבו החוקרים והרופאים שניהלו את הניסוי להמשיך ולהזריק לחולים את האנזים ADA במקביל להחזרת התאים המטופלים לגופם של החולים. שלושת החולים חיים עד היום, ובאחד מהם נמצאו תאי T המכילים את

[7] **תאי דם לבנים מסוג B:** תאי דם לבנים המפרישים נוגדנים ייחודיים כתוצאה ממפגש עם גורם זר (אנטיגן זר).

[8] **השתלת מוח עצם:** שיטה טיפולית שבה מוחלף מוח העצם של חולה במוח עצם של אדם בריא. תהליך ההשתלה כרוך בטיפולים מקדימים בחולה המקבל את השתל, שיאפשרו קליטה טובה יותר של מוח העצם המושתל. לדוגמה, יש חולים שעוברים הקרנות הפוגעות במוח העצם שלהם, על מנת שתהיה רמת תאים נמוכה מאוד ואפילו אפסית לפני ההשתלה.

[9] **השתלת תאי גזע מחבל הטבור:** בדומה לתאי מוח העצם, חבל הטבור משמש מקור לתאי גזע. בעת הלידה נלקחים תאים מחבל הטבור של תינוקות במשפחות שבהן קיימת מחלה תורשתית מסוימת. התאים נשמרים בהקפאה עד לתחילת הטיפול ומשמשים להשתלה אצל אחים/אחיות חולים במשפחה, בתנאי שהם לא יידחו על ידי הגוף.

[10] **ריפוי גני:** טיפול במחלות תורשתיות על-ידי תיקון תפקודו של גן פגום באמצעות גן אחר. התיקון מתבצע על ידי הוספת גן תקין לתאים של החולה או על ידי החלפה של גן פגום בגן תקין.

[11] **ניסויים קליניים:** ניסויים שנועדו לבדוק יעילות של תרופה או של טיפול מסוים בבני אדם חולים. לרוב קיים שלב המקדים את המחקר הקליני (פרה-קליני) שבו נבדקים התרופה או הטיפול בבעלי חיים או בתאים.

הגן התקין גם כ-10 שנים לאחר הטיפול. אולם בשל רציפות ההזרקה של האנזים במשך כל אותן שנים, אין לדעת אם חולים אלה חיים עד היום בזכות התאים שעברו את הריפוי הגני, או בזכות האנזים המוזרק להם. גם בכל המחקרים הקליניים שנעשו לאחר מכן הוזרק האנזים התקין לגופם של החולים, והתוצאות שהתקבלו היו דומות לניסוי הקליני הראשון.

לאחרונה פיתחנו שיטה להחדרת הגן ADA התקין לתאי גזע ממוח העצם, שיכולים להתמיין למגוון של תאי דם לבנים במערכת החיסון. השתמשנו בשיטה זו כדי לרפא גנית שתי חולות ADA-SCID, שלא נמצא להן תורם מוח עצם מתאים, ואשר מסיבות טכניות הטיפול בהזרקת אנזים תקין לא היה אפשרי עבורן. בעבודה זו מתוארים השיטה לריפוי הגני של אותן חולות והמעקב אחר הצלחתו של הטיפול. טיפול ללא הזרקת האנזים יכול להצביע לראשונה על הצלחת הגישה של ריפוי גני בטיפול במחלה ADA-SCID.

שיטות וחומרים

א. הטיפול בחולות

החולות

חולה 1: תינוקת בת 7 חודשים שאובחנה כחולת ADA-SCID מיד עם לידתה וסבלה מדלקות ריאה חוזרות ונשנות. לתינוקת לא נמצא תורם מתאים להשתלת תאי גזע מחבל הטבור מבין אחיה הבריאים.

חולה 2: פעוטה בת שנתיים וחצי. הפעוטה סבלה לפני הטיפול הנוכחי מדלקות ריאה, משלשולים ומגרדת ואובחנה כחולת ADA-SCID בגיל 6 חודשים. בגיל 7 חודשים עברה השתלת מוח עצם שתרם אביה. ההשתלה לא הצליחה.

אישור תהליך הטיפול

המחקר נעשה בשיתוף פעולה בין קבוצת מחקר ישראלית מבית החולים הדסה עין כרם בירושלים לקבוצת חוקרים מאיטליה. תהליך הטיפול אושר על ידי ועדת האישורים של בית החולים הדסה עין כרם, על ידי משרד הבריאות הישראלי וכן על ידי הוועדה הלאומית האיטלקית לביואתיקה. הוריהן של כל אחת מן החולות התבקשו לחתום על טופס הסכמה רשמי לביצוע הטיפול הניסיוני. זאת לאחר שהוסבר להם אופיו של טיפול זה, תרומתו ויתרונותיו יחד עם הסיכונים הכרוכים בו בהשוואה לטיפולים אפשריים אחרים (השתלת מוח עצם מקרוב משפחה או מתורם מתאים). מסיבות טכניות לא היה אפשר לטפל בחולות בהזרקת האנזים עצמו (ADA).

הוצאת תאי מוח עצם מן החולות ובידוד תאי המוצא לתאי דם לבנים

כדי להחדיר את הגן ADA התקין לתאי החולות (ראו להלן), יש להוציא מגופן את התאים המיועדים להחדרה. תאי מוח עצם הוצאו מעצם האגן של החולות תחת הרדמה. מתאים אלה נוצרים כל הסוגים של תאי הדם. מתוך תאי מוח העצם הופרדו תאי המוצא לתאי דם לבנים בעזרת שיטות העושות שימוש בנוגדנים ייחודיים המזהים תאים אלה כפי שפורסם בעבודות קודמות. את תאי המוצא לתאי דם לבנים שבודדו מגדלים בתרבית רקמה על מנת להרבותם ולהחדיר להם את הגן התקין, כפי שיפורט בהמשך.

החזרת התאים לחולות

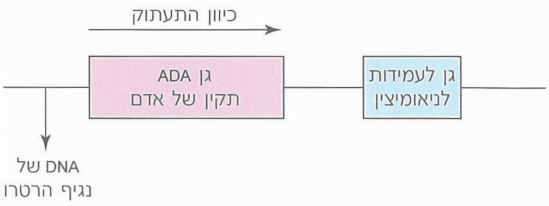
במשך שלושת הימים שקדמו להחזרת התאים עם הגן המתוקן, קיבלו החולות לתוך הוריד תרופה הגורמת לירידה מתונה בכמות של תאי גזע במוח העצם. מטרת טיפול זה הייתה לפנות מקום במוח העצם לתאים שיוחזרו אל החולות לאחר החדרת הגן התקין ל-ADA. למתן התרופה לא נודעה השפעה רעילה כלשהי על החולות, ולא נוצר צורך במתן מנות דם.

ב. החדרת הגן התקין ל-ADA לתאי גזע של החולות

הכנת הנשא לגן ADA

כדי להחדיר את הגן התקין ל-ADA לתאי גזע במוח עצם של חולות ה-ADA-SCID, נעשה שימוש בנגיף רטרו כנשא.

ממולקולת DNA **משלים של הנגיף**[12] הוצאו גנים המקודדים לתכונות בלתי רצויות של הנגיף והונדסו לתוכו שני מקטעי DNA נוספים (איור 2):



איור 2: נשא נגיף הרטרו
נשא המכיל גן ADA תקין של אדם והגן המקנה עמידות לאנטיביוטיקה ניאומיצין

א. הגן ADA התקין מאדם.
ב. גן בורר שהתוצר שלו מקנה לתא עמידות בפני האנטיביוטיקה ניאומיצין. הוספת ניאומיצין לתאים שנחשפו לנשא חשובה לתהליך יצירת הנשא בכמויות גדולות, עוד לפני החדרתו לתאי החולות.

החדרת הנשא לתאי מוח עצם של החולות

תאי המוצא לתאי דם לבנים שבודדו מהחולות גודלו בתנאי תרבית המאפשרים חלוקת תאים מוגברת. בשלב מסוים הועברה לתרבית זו תמיסה עם נגיפי רטרו נשאים לגן ADA ולגן עמידות לניאומיצין. התאים גודלו בתרבית בנוכחות הנגיפים הנשאים 4 ימים על מנת לאפשר את חדירת הנשאים והשתלבותם ב-DNA של תאי החולות. מקום ההשתלבות של נגיפי הרטרו הנשאים שהכילו גן תקין ל-ADA ב-DNA של תאי החולות היה אקראי. היות שהחדירה של הנשא לתאים יעילה מאוד, לא היה צורך בהוספת ניאומיצין לתרבית התאים. בסיום התהליך, כאמור לעיל, הוצאו התאים מן התרבית, נשטפו והוחזרו לחולות בעירוי דרך הווריד ($1x10^7$ תאים לק"ג משקל גוף לחולה 1, $1x10^6$ תאים לק"ג משקל גוף לחולה 2). משם הם הגיעו למוח העצמות. יום ההחזרה של התאים לחולות נקרא להלן יום אפס.

ג. בדיקת התאים הנושאים את הגן התקין ל-ADA לאחר שהוחזרו לחולה

מעקב אחר כמות תאי דם לבנים בעלי גן תקין ל-ADA בדם של החולות

על מנת לבדוק לאחר הטיפול איזה אחוז מתאי T בדם של כל אחת מן החולות מכיל את הגן התקין ל-ADA, נעשה שימוש בשיטת ה-PCR הכמותי. שיטה זו מבוססת על כך, שכאשר מופסקת תגובת ה-PCR זמן קצר לאחר תחילתה (כלומר, לאחר מספר קטן של מחזורי שכפול), מתקבלת כמות של DNA הנמצאת ביחס ישר לכמות ה-DNA ההתחלתית שקדמה לשכפול. מכיוון שגם בתאים שלתוכם לא חדר הנשא קיים הגן ADA בצורתו הלא תקינה, אי אפשר להרבות באמצעות PCR את הגן הזה, ויש להשתמש בגן שנמצא אך ורק בתאים שלתוכם הוכנס הנשא – הגן המקודד לעמידות לניאומיצין. הגן לניאומיצין יכול לשמש כסמן לגן ADA התקין. זאת משום שהוא הוחדר יחד עם הגן התקין ל-ADA על גבי אותו נשא והוא אמור להשתלב יחד אתו בגנום של התאים שעברו טיפול, וכן משום שבתאים שלא עברו את הטיפול לא קיים גן כזה.

לשם ביצוע הבדיקה הכמותית ב-PCR, נלקחו מן החולות דגימות דם המכילות כמות שווה של תאים בזמנים שונים מתחילת הטיפול, ותאי T הופרדו משאר התאים בכל דגימה. ה-DNA שהופק מתאי T

[12] החומר התורשתי של נגיפי רטרו הוא למעשה RNA. לכן, בשלב מאוחר יותר בתהליך הכנת הנשא יוצרים ממולקולת ה-DNA המשלים לאחר השינויים, את מולקולת ה-RNA של נשא נגיף הרטרו.

בכל דגימה נחשף לשני תחלים שמשלימים לרצפים שנמצאים בגן לעמידות לניאומיצין. הבדיקה הכמותית מתבססת על כך, שככל שיש בדגימת הדם יותר תאי T המכילים את הגן לניאומיצין (כלומר, את הגן התקין ל-ADA), כך תתקבל כמות רבה יותר של DNA בתגובת ה-PCR הכמותי. אחוז התאים המכילים את הגן המקנה עמידות לנאומיצין הוצג בגרף באופן לוגריתמי.

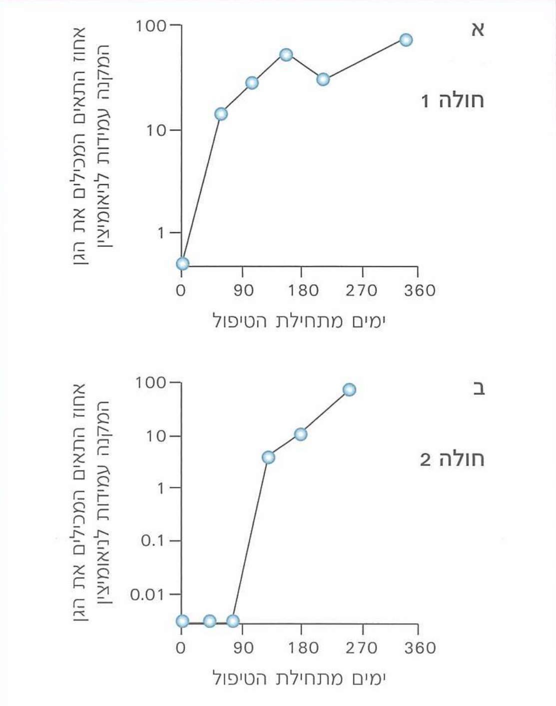
בדיקת פעילות האנזים ADA

חלק ממולקולות האנזים ADA מוצאות את דרכן לפלסמת הדם, ואין הן נותרות בתוך התאים בלבד. עובדה זו מאפשרת לבדוק את פעילות האנזים מחוץ לתאים על ידי דגימת דם מהחולה ובידוד הפלסמה. פעילות האנזים ADA נבדקה על ידי הוספת אדנוזין בריכוז ידוע לפלסמת הדם ועל ידי בדיקת קצב הופעתם של תוצרי הפירוק.

תוצאות

רוב תאי T של החולות לאחר הטיפול מכילים את הגן התקין ל-ADA

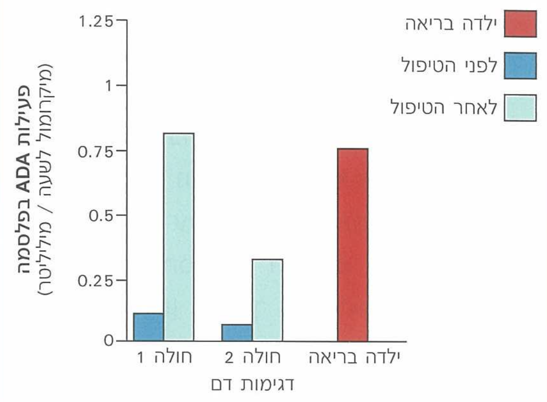
מעקב אחר תאי T של החולות שמכילים את הגן התקין ל-ADA הראה, שאחוז התאים האלה מתוך כלל תאי T של החולות הלך ועלה מאז החזרת התאים המטופלים לחולות. אצל חולה 1 החלה עלייה ברמת תאי T המכילים את הגן התקין לאחר כ-45 ימים מיום החזרת התאים, ו-11 חודשים לאחר הטיפול הגיע ריכוזם ל-70% (גרף 1-א). אצל חולה 2 החלה ההתאוששות רק לאחר כ-80 ימים מההחזרה, אך ריכוז תאי T הגיע ל-100% לאחר כ-8 חודשים (גרף 1-ב). יחד עם תאי T נמצאו גם תאי דם לבנים מסוגים רבים שהכילו את הגן התקין ל-ADA והראו דגם דומה של עלייה בריכוזם בדם של החולות (התוצאות אינן מובאות כאן).



גרף 1: *אחוז תאי T המכילים את הגן המקנה עמידות לניאומיצין בשתי החולות בזמנים שונים מתחילת הטיפול*

תאי T של החולות לאחר הטיפול מראים פעילות תקינה של ADA

בדיקות ביוכימיות בפלסמת הדם של החולות הראו, שהריפוי הגני שיחזר לגמרי את פעילותו התקינה של האנזים ADA (גרף 2). רמות הפעילות של ADA בפלסמת הדם של חולה 1 לפני הטיפול הגיעו ל-0.15 מיקרומול לשעה למיליליטר, ושל חולה 2 – ל-0.10 מיקרומול לשעה למיליליטר. לעומת זאת, רמות הפעילות של האנזים הגיעו ל-0.8 מיקרומול לשעה למיליליטר לאחר הטיפול אצל חולה 1, ול-0.35 מיקרומול לשעה למיליליטר אצל חולה 2, לעומת 0.7 מיקרומול לשעה למיליליטר אצל ילדה בריאה בגיל דומה (גרף 2).



גרף 2: רמת הפעילות של ADA בפלסמת דם של החולות לפני ואחרי הטיפול הגני ושל ילדה בריאה

דיון

במחקר זה מתואר טיפול על ידי ריפוי גני לשתי חולות ADA-SCID. הריפוי בוצע בהחדרת הגן ADA התקין לתאי דם לבנים של החולות באמצעות נגיפי רטרו וללא טיפול בהזרקת האנזים ADA. רמת תאי הדם הלבנים מסוג T של החולות עלתה מאז הטיפול, ואף נמצאה פעילות תקינה של האנזים ADA בפלסמת הדם שלהן. בנוסף לכך נמצאו במוח העצם ובדם של החולות סוגים רבים של תאי דם לבנים אשר מכילים את הגן התקין ל-ADA, ואשר מעידים על כך שחלק מהתאים שהוחדר להם הגן התקין היו תאי מוח עצם שטרם התמיינו (תאי גזע). תאים אלה שמרו על כושרם להתמיין לסוגי תאים רבים של מערכת החיסון, בדומה לתאי מוח עצם נורמליים. המעקב אחר תאי הדם הלבנים של החולות שנעשה עד כ-14 חודשים מהחזרת התאים המטופלים לגופן, מעיד על הצלחת הטיפול עד כה.

העובדה שהחולות לא קיבלו טיפול של הזרקת האנזים ADA תומכת במסקנה שהריפוי הגני של החולות הצליח. זאת בניגוד לניסויים שנעשו עד כה בריפוי גני של חולי ADA-SCID, שבהם חויבו הרופאים להמשיך את הזרקת ADA במקביל לתהליך הריפוי הגני. עובדה זו מיסכה על האפשרות להסיק, שהטיפול הגני הוא שתרם להחלמת החולים ולא הזרקת האנזים ADA. מספר גורמים יכולים להסביר את הצלחת הטיפול במקרה של החולות המתואר במחקר זה. ייתכן שעל מנת לאפשר לתאים שאליהם הוחדר הגן המתוקן להתרבות בנוכחות התאים הפגועים של החולה, יש צורך להעניק להם יתרון כלשהו על פני שאר תאי מוח העצם. נוכחות הגן ADA התקין אשר מפרק את מולקולות האדנוזין הרעילות בתאים המתוקנים, יכולה להוות יתרון לתאים אלה על פני התאים הפגועים ולעודד את הישרדותם. יתרון זה אינו קיים כאשר במקביל לריפוי הגני מוזרק גם האנזים ADA עצמו. בנוסף לכך הורדה מתונה יחסית של מספר תאי מוח העצם של החולות לפני הטיפול מסייעת לקליטה טובה יותר של התאים המוחזרים. גורם נוסף שבוודאי סייע להצלחת הטיפול הוא החדרת הגן התקין לתאים שיכולים להתמיין לסוגים רבים של תאי דם לבנים, כך שהתמיינותם של תאי T תקינים נעשתה בגוף החולה עצמה. עובדה זו כשלעצמה היא בעלת חשיבות להצלחת הטיפול לאורך זמן, שכן חייהם של תאי גזע ארוכים מאלה של תאי T ממוינים, ויכולים לשמש מקור תמידי לתאי T בגוף החולות, בלי שיהיה צורך לחזור על הטיפול ועל החזרת תאים חדשים המכילים את הגן התקין.

במהלך המעקב אחר התקדמות הריפוי הגני בחולות ניכרו הבדלים בין שתי החולות. הבדלים אלה התבטאו בקצב ההתאוששות של תאי הדם הלבנים (גרף 1). כמו כן רמת הפעילות של האנזים ADA של חולה 1, לעומת רמתה של חולה 2 (גרף 2) הייתה קרובה יותר לזו של ילדה בריאה. להבדלים אלה יכולים להיות מספר הסברים: חולה 1 קיבלה מלכתחילה כמות גדולה יותר של תאים לאחר החדרת הגן התקין. בנוסף לכך חולה 1 הייתה צעירה יותר בתחילת הטיפול (7 חודשים) לעומת חולה 2 (שנתיים וחצי). למרות ההבדלים בין החולות, הריפוי הגני ששתיהן עברו הצליח, והראיה היא ששתיהן החלימו קלינית מן המחלה.

אחד הסיכונים בריפוי גני נובע מן העובדה, שהחדירה

של נגיפי רטרו נשאים עם הגן התקין לתאים של החולה נעשית באופן אקראי למקומות שונים ב-DNA של התאים המטופלים. לעתים יכולים נשאים כאלה לחדור לתוך רצף של גן ולשבש את תרגומו לחלבון תקין. פגיעה כזו יכולה ליצור מחלה אחרת. אפשרות נוספת היא שהחדירה תתבצע בקרבת גן אחר, שיהיה מושפע מאזורי הבקרה על ביטוי הגנים שמביא אתו הנשא. במקרה כזה יכול אופן הביטוי של הגן בתא להשתנות. לדוגמה, גן שעד עתה התבטא רק בשלב מסוים של חלוקת התא, עלול להתבטא באופן תמידי ברמה גבוהה ולגרום לסרטן. לאור זאת יש לציין שקביעה חד משמעית בדבר הצלחת הריפוי הגני בחולות, דורשת עדיין המשך מעקב אחר החולות ואחר מערכת החיסון שלהן לאורך זמן רב, ייתכן שאף למשך כל חייהן.

הצלחת הטיפול בחולות עד כה יכולה לשמש דוגמה לטיפול בחולים נוספים ב-ADA-SCID ולעודד את המשך המחקר על טיפול גני גם במחלות SCID אחרות. אחד הכיוונים הרצויים לשיפור הטיפול ולהקטנת הסיכון הכרוך בו הוא יצירת נשאים המשתלבים במקומות ידועים מראש ב-DNA של אדם, שהם מקומות שאינם רצפים של גנים ושאינם מושפעים מאזורי הבקרה של הנשא עצמו.

1. בדרך כלל במחלות תורשתיות קיים פגם בגן בכל תאי הגוף, אולם המחלה מתבטאת רק בתאים שבהם גן זה רלוונטי לתפקודם התקין.
2. תאי גזע הם תאים שיכולים להתמיין למגוון של סוגי תאים וכן ליצור תאי גזע אחרים – לכן שינוי גני שלהם יכול להשפיע לאורך זמן.
3. נגיפי רטרו משמשים כנשאים לחומר תורשתי זר, משום שיש להם אפשרות לחדור לתאים ולשלב בגנום את החומר התורשתי שלהם.
4. ניסויים בבני אדם מוגבלים על-ידי אמנות בינלאומיות ומתנהלים על פי כללים המבוססים על אתיקה.
5. בכל מהלך שבו מהונדס גן לתא, לא די להראות שהגן חדר – יש לבדוק את תפקודו על מנת להראות שהושגה מטרת ההנדוס.
6. שיטת ה-PCR יכולה לשמש לשכפול של מקטעי DNA ולבדיקת כמותם.
7. כניסה אקראית של גן מהונדס לתאים עלולה להיות מסוכנת.

שאלות

בתשובות אתם מתבקשים לשלב ידע מהמאמר וממבנית המבוא. הסבירו את תשובותיכם.

1. מדוע החליטו החוקרים להכניס את הגן התקין דווקא לתאי גזע של מוח העצמות ולא לתאים אחרים, למשל, לתאי כבד?
2. האם ילד של חולה שעבר ריפוי גני צפוי לשאת את המוטציה הגורמת ל-ADA-SCID?
3. מה ההסבר לכך שיש להזריק את האנזים ADA לחולים כל שבוע?
4. ציינו את מאפייניה של המחלה SCID שבזכותם התמקדו דווקא בה מחקרי החלוץ בריפוי גני.
5. מהם הגנים שחשוב להשאיר בנגיפי הרטרו המשמשים כנשא, ואילו גנים חשוב להרחיק מתוך החומר התורשתי שלהם?
6. אתם מבצעים תגובת PCR במעבדה על מנת להרבות גן שבודדתם. למבחנה אחת אתם מוסיפים עותק אחד של הגן A, ריכוז גבוה של שני סוגים של תחלים (האחד משלים לתחילת הגן והשני - לסופו) ואת האנזימים והנוקליאוטידים הדרושים לשכפול ה-DNA. למבחנה שנייה אתם מוסיפים שני עותקים של הגן A ואת שאר המרכיבים הזהים למבחנה הראשונה. כמה מולקולות DNA תקבלו לאחר 10 מחזורי שכפול בכל אחת מהמבחנות? אם הנוקלאוטידים שבהם השתמשתם מסומנים בצורה כלשהי, מה יהיה ההבדל בין עוצמות הסימון של שתי המבחנות?
7. כיצד ייתכן שהגן ADA התקין הופיע לאחר הטיפול בסוגים שונים של תאי דם, למרות שהוכנס לסוג אחד של תאים?
8. השוו בין התוצאות שהתקבלו עבור שתי הילדות. האם ניתן להסיק שהטיפול הצליח באופן זהה בשתיהן? נמקו.
9. איזו בדיקה נוספת הייתם עורכים על מנת לאמת את הצלחת הטיפול?
10. אחד הקריטריונים שנבדקו במחקר הוא פעילות האנזים ADA (גרף 2), המקודד על ידי הגן התקין שהוכנס לתאי החולות.

    לפניכם תרשים המתאר את הקשר בין DNA לתכונה:

    עובר תעתוק ל-   עובר תרגום ל-   משתתף בקביעת
    DNA ← RNA שליח ← חלבון ← תכונה

    א. ציינו על גבי הסכמה איזה שלב נבדק על ידי החוקרים.
    ב. אילו שלבים נוספים בתרשים אפשר היה לבדוק ובאיזו דרך?
11. במחקר שנעשה נבדקו שתי חולות בלבד. מה יכולה להיות הבעיה בהצגת תוצאות של שתי חולות בלבד? כיצד ניתן לפתור בעיה זו באופן עקרוני? האם הפתרון שהצעתם אפשרי במחקר מסוג זה? נמקו תשובתכם.
12. כיצד החוקרים מסבירים את הצלחתם בטיפול בשתי הילדות?
13. מה הם הסיכונים בתהליך הריפוי הגני?

מילון מונחים

אופרון (Operon)
צבר של גנים הנמצאים בסמיכות זה לזה על פני הכרומוזום של יצור פרוקריוטי. הבקרה על ביטוי הגנים באופרון היא משותפת, ולרוב משתתפים תוצרי הגנים שבאופרון באותו התהליך בתא.

אורגניזם מהונדס/טרנסגני (Transgenic organism)
יצור שמכיל מקטע של DNA שמקורו ביצור אחר, כתוצאה מהתערבות מלאכותית באמצעות שיטות של הנדסה גנטית.

אזור בקרה (Regulatory region)
אזור ב-DNA שאינו עובר תרגום ואחראי על הבקרה על ביטוי הגן.

אזור מבני (Structural region)
אזור ב-DNA שמקודד לחלבון. האזור נחשב לחלק של הגן.

אינסולין (Insulin)
הורמון המווסת את רמת הגלוקוז בדם ומשפיע על תהליך קליטת הגלוקוז על ידי תאי הגוף. האינסולין מופרש מתאים בלבלב.

אנזים הגבלה (Restriction enzyme)
אנזים חיידקי שמזהה רצף בסיסים ייחודי ב-DNA דו-גדילי ומזרז את חיתוך ה-DNA ברצף זה.

אנזים מתעתק במהופך (Reverse transcriptase)
אנזים שמקורו בנגיפי רטרו, המזרז תהליך של יצירת שרשרת חד-גדילית משלימה של נוקלאוטידים של DNA על פני תבנית של RNA.

אנטיביוטיקה (Antibiotics)
קבוצה מגוונת של חומרים הנוצרים על ידי יצורים חיים ויכולים לעכב את התפתחותם או את התרבותם של יצורים אחרים (לדוגמה, חומרים שמייצרות פטריות כנגד חיידקים). כיום קיימות אנטיביוטיקות שמיוצרות גם באמצעות תהליכים כימיים ואינן מופקות מיצורים חיים.

אריתרופויטין (Erythropoietin)
הורמון המופרש מיותרת הכליה ומשפיע על תהליך ההתמיינות של תאי הדם האדומים.

ביוטכנולוגיה (Biotechnology)
תורה העוסקת בניצול מערכות ביולוגיות, ברמה תאית או מולקולרית, לייצור או לאנליזה בתעשיה, ברפואה ובחקלאות.

ביוליסטיקה (Biolistics)
שיטה שבה מחדירים קטעי DNA לתאים, לרוב לתאי צמחים, באמצעות הפגזה של חלקיקי מתכת המצופים בקטעי ה-DNA.

ביוראקטור (Bioreactor)
מיכל המשמש לגידול של יצורים או לביצוע תהליכים ביוכימיים בנפחים גדולים ובתנאים סטריליים.

בלוטת יותרת המוח (Hypophysis)
בלוטה במוח של חולייתנים, הנמצאת בין המוח לבין תקרת הפה. מפרישה הורמונים חיוניים כמו הורמון הגדילה, גונדוטרופינים הפועלים על בלוטות המין והורמונים המשפיעים על תפקוד הכליה.

בצילוס טורינגייניזיס (Bacillus thuringiensis)
מין של חיידק קרקע, שיוצר גביש של חלבון הרעיל לחרקים מסוימים.

גלאי (Probe)
מולקולה המשמשת לגילוי נוכחותה או כמותה של מולקולה אחרת. הגילוי מבוסס על תכונת הגלאי להיקשר באופן ייחודי למולקולה הנבדקת, ועל סימון הגלאי באמצעות אנזים יוצר צבע, או סימון רדיואקטיבי וכדומה. לרוב משמשות מולקולות DNA ו-RNA כגלאים לאיתור רצפים ייחודיים של DNA ושל RNA, ונוגדנים משמשים כגלאים לאיתור חלבונים.

גן (Gene)
מקטע של DNA המאפשר את יצירתה של יחידה תפקודית שקובעת תכונה תורשתית. המקטע כולל את האזור המקודד לחלבון או ל-RNA (האזור המבני) וכן את אזור הבקרה ואת האזורים שעוברים עריכה ושחבור.

גן בורר (Selective gene)
גן המקודד לתכונה שמאפשרת להפריד בין תאים המכילים גן זה לבין תאים שאינם מכילים את הגן. לרוב הגן מקנה לתאים תכונה שמאפשרת להם לשרוד בתנאים מסוימים, בעוד שתאים ללא הגן מתים בתנאים אלה.

גן מדווח (Reporter gene)
גן המקודד לתכונה שמאפשרת להבדיל בין תאים המכילים את הגן לבין תאים שאינם מכילים אותו. לרוב הגן מקודד לחלבון שגורם להופעת צבע שונה, זהירה או הארה בתא שמכיל את הגן.

גן מהונדס/גן רקומבינגטי (Recombinant gene)
גן המורכב ממספר קטעים שחוברו זה לזה במעבדה, ולכן מהווה צירוף חדש (רקומבינציה) של חומר תורשתי.

הדברה ביולוגית (Biological control)

שימוש ביצורים חיים על מנת להדביר יצורים מזיקים.

הורמון הגדילה (Growth hormone)

חלבון המשפיע על תאים ברקמות גדלות בגוף (שרירים, עצמות) ועל חילוף החומרים בתאים. הורמון הגדילה מופרש מבלוטת יותרת המוח ומשפיע בין השאר על קצב הגדילה של ילדים.

השתלת מוח עצם (Bone marrow transplantation)

שיטה טיפולית שבה מוחלף מוח העצם של חולה במוח עצם של אדם בריא. תהליך ההשתלה כרוך בטיפולים מקדימים בחולה המקבל את השתל, שיאפשרו קליטה טובה יותר של מוח העצם המושתל. לדוגמה, יש חולים שעוברים הקרנות הפוגעות במוח העצם שלהם, על מנת שתהיה רמת תאים נמוכה מאוד ואפילו אפסית לפני ההשתלה.

השתלת תאי גזע מחבל הטבור (Umbilical cord cells transplantation)

בדומה לתאי מוח העצם, חבל הטבור משמש מקור לתאי גזע. בעת הלידה נלקחים תאים מחבל הטבור של תינוקות במשפחות שבהן קיימת מחלה תורשתית מסוימת. התאים נשמרים בהקפאה עד לתחילת הטיפול ומשמשים להשתלה אצל אחים/אחיות חולים במשפחה, בתנאי שהם לא יידחו על ידי הגוף.

התמיינות (Differentiation)

תהליך שבו תאים בגוף הבוגר או בעובר המתפתח רוכשים בהדרגה את הצורה והתפקיד שלהם ביצור הרב תאי. לדוגמה, תאי מוח עצם מתמיינים לסוגים שונים של תאי דם, שלכל אחד מהם תפקיד ייחודי וצורה אופיינית.

זיגוטה (Zygote)

התא הראשון של עוברי יצורים רב-תאיים. הזיגוטה נוצרת כתוצאה מהפריית ביצית על ידי תא זרע.

חומר גנוטוקסי (Genotoxic compound)

קבוצה מגוונת של חומרים בעלי השפעה רעילה על הגנום. חומרים אלה יכולים לגרום למוטציות בשיעור העולה על זה של מוטציות טבעיות (מוטגניים). הם יכולים להיות חומרים מסרטנים (קרצינוגניים) או לגרום לפגמים בעוברים המצויים ברחם (טרטוגניים).

חיישן ביולוגי (Biosensor)

באנגלית ביוסנסור (ביו=חי, סנסור=חיישן). מכשיר שמשתמש בחומר ביולוגי כדי לנטר את הימצאותם של חומרים שונים בסביבה.

חלבוני בקרה (Regulatory proteins)

חלבונים המשפיעים על תהליך יצירת ה-RNA שליח, כלומר על ביטוי של גן. הם יכולים לעכב או לעודד את ביטויים של גנים.

טרור כימי (Chemical terrorism)

פעולות אלימות קיצוניות, המיועדות להטיל פחד על האוכלוסייה, בעזרת חומרים כימיים רעילים. לדוגמה: ריסוס בגז עצבים או זיהום מקורות מים בחומרי הדברה.

כלורופלסט (Chloroplast)

כלורופלסט הוא אברון המכיל חומר תורשתי יחודי, בעל כושר שכפול עצמי. בתאים ירוקים הכלורופלסט מכיל כלורופיל ומתבצע בו תהליך פוטוסינתזה. ה-DNA של הכלורופלסט – הגנום הכלורופלסטי – הוא ממוצא פרוקריוטי.

לוציפראז (Luciferase)

אנזים הפועל על החלבון לוציפרין וגורם לו להאיר.

ליגאז (Ligase)

אנזים המזרז יצירת קשר כימי בין זוג נוקלאוטידים סמוכים שקיים ביניהם נתק, על אחד מגדילי ה-DNA.

מוח עצם (Bone marrow)

מכלול המרכיבים הנמצאים בחלקן הפנימי של עצמות גרמיות: כלי דם, תאי גזע של תאי הדם שמהם מתפתחים כל סוגי תאי הדם, ותאים המפרקים ובונים את העצמות עצמן.

מוטציה (Mutation)

שינוי ברצף, בארגון או בכמות של החומר התורשתי. מוטציה יכולה להיות שינוי בנוקלאוטיד אחד ב-DNA או חסר של קטע בכרומוזום.

מחלה תורשתית (Genetic disease)

מחלה הנגרמת מפגם בחומר התורשתי. הפגם קיים בכל תאי הגוף, כולל בתאי הזוויג, ולכן יכול לעבור בתורשה לצאצאים.

מחסום המינים (Species barrier)

חוסר יכולתם של פרטים ממינים (species) שונים להעמיד צאצאים פוריים. המחסום נובע מהבדלים בצורה ובהתנהגות של המינים השונים ומהבדלים מולקולריים בין תאי הזוויג, שמונעים הפריית ביצית על ידי תא זרע שמקורו ממין אחר.

נבג (Spore)

גופיף רבייה, חד-תאי או בעל תאים אחדים, שניתק מההורה וגורם להיווצרות פרט חדש. נבגים יכולים להיווצר בצורה מינית או אל-מינית בצמחים, בפטריות, בחיידקים ובפרוטוזואה, בדרך כלל כתגובה לשינויים קיצוניים בתנאים (לדוגמה, היעדר מזון בסביבה).

נוגדן (Antibody)

חלבון הנוצר בתאים ממערכת החיסון של חולייתנים כתוצאה מחשיפה לגורם זר שפלש לגוף. החלבון מסוגל להיקשר באופן ייחודי לגורם הזר כדי לפעול נגדו.

נוקלאוטיד (Nucleotide)

מולקולה המורכבת מסוכר (ריבוז או דאוקסיריבוז), בסיס (פוריני או פירימידיני) וקבוצת זרחן, ומהווה את אבן הבניין של חומצות הגרעין (DNA ו-RNA).

ניטור (Monitoring)

מעקב אחרי תנאים או תהליכים באמצעות מכשור.

ניסויים קליניים (Clinical trials)

ניסויים שנועדו לבדוק יעילות של תרופה או של טיפול מסוים בבני אדם חולים. לרוב קיים שלב המקדים את המחקר הקליני (פרה-קליני) שבו נבדקים התרופה או הטיפול בבעלי חיים או בתאים.

נשא (Vector)

אמצעי להעברת קטעי DNA לתוך תאים, כמו פלסמיד או נגיף.

ספרייה גנומית (Genomic library)

אוסף של חיידקים או וירוסים המכילים קטעי DNA והמייצגים יחדיו גנום שלם של יצור מסוים. האוסף נוצר כך שלכל חיידק או וירוס הוחדר מקטע DNA אחר מתוך הגנום של היצור.

עקומת כיול (Standard curve)

אוסף הנתונים המתקבל כתוצאה ממדידת משתנה ידוע מראש באמצעות משתנה אחר. לדוגמה: מדידת עצמת הבליעה באורך גל מסוים של סדרת מבחנות המכילות ריכוזים ידועים הולכים ועולים של אנזים מסוים. נתונים אלה משמשים להשוואה עם דגימה שבה אין ידועים הנתונים אודות המשתנה הנבדק.

עריכה ושחבור (Splicing)

תהליך שבו מוצאים ממולקולת RNA שליח שתועתקה מגן הקטעים שאינם מקודדים לחלבון (אינטרונים), והקטעים הנותרים (אקסונים) מחוברים זה לזה. בסיום התהליך מתקבלת מולקולת RNA שליח המורכבת מאקסונים, והיא זו שיוצאת מהגרעין לציטופלסמה.

פלסמיד (Plasmid)

מולקולת DNA, לרוב מעגלית, שנמצאת מחוץ לכרומוזום של יצורים פרוקריוטים. היא מכילה רצפים שמאפשרים את שכפולה בנפרד מכרומוזום היצור. לרוב מקודד לתכונות המקנות יתרון הישרדותי ליצור, כמו עמידות לאנטיביוטיקה.

קאלוס (Callus)

גוש של תאי צמח לא ממוינים. הגוש נוצר לרוב בתרבית רקמה של תאי צמח שנחשפו לריכוזים מסוימים של הורמונים צמחיים.

קולטן (Receptor)

מולקולה בתא שיכולה לקשור באופן ייחודי מולקולה אחרת. כתוצאה מהיקשרות זו חלה שרשרת של אירועים ביוכימיים בתוך התא או מחוצה לו.

ריפוי גני (gene therapy)
טיפול במחלות תורשתיות על-ידי תיקון תפקודו של גן פגום באמצעות גן אחר. התיקון מתבצע על ידי הוספת גן תקין לתאים של החולה או על ידי החלפה של גן פגום בגן תקין.

רעלן מחיידק ה-Bt (Bt toxin)
חלבון רעיל היוצר גביש בנבג של החיידק *בצילוס טוריגנייזיס* (*Bacillus thuringiensis*). הגביש יכול להתפרק לחלבון רעיל במערכת העיכול של חרקים מסוימים. הוא משמש להדברת מזיקים של גידולים חקלאיים.

שיבוט (Cloning)
יצירת עותקים זהים של מולקולת DNA או של יצורים (חד-תאיים או רב-תאיים) זהים מבחינה גנטית. לרוב, שיבוט של יצורים נעשה באופן מלאכותי אולם ישנם גם מקרים שבהם חל שיבוט באופן טבעי כמו התרבות של חיידק, ייחורים של צמח או תאומים זהים.

תאי גזע (Stem cells)
תאים בלתי ממוינים שיכולים להתמיין למגוון סוגי תאים וכן ליצור תאי גזע אחרים. לדוגמה: תאי גזע במוח העצם משמשים מקור לכל סוגי תאי הדם בגוף.

תאי דם לבנים (White blood cells)
תאי דם שמהווים חלק ממערכת החיסון.

תאי דם לבנים מסוג T (T cells)
סוג של תאי דם לבנים המשתתפים בתגובה החיסונית של הגוף. תאים אלה מזהים גורמים זרים המוצגים על פני תאים אחרים של מערכת החיסון ומגייסים תאים נוספים על מנת לסלקם.

תאי דם לבנים מסוג B (B cells)
תאי דם לבנים המפרישים נוגדנים ייחודיים כתוצאה ממפגש עם גורם זר (אנטיגן זר).

תאים סומטיים (Somatic cells)
כל תאי הגוף שאינם תאי הזוויג.

תותח גנים (Gene gun)
מכשיר המשמש להחדרת DNA לתאים באמצעות הפגזה בכדורי מתכת המצופים בקטעי ה-DNA.

תחל (Primer)
מקטע DNA או RNA קצר הדרוש כנקודת התחלה לאנזים DNA פולימראז בתהליך שכפול ה-DNA. לרוב מורכב התחל מ-17-20 נוקלאוטידים ומשלים לרצף באורך זה באחד מגדילי ה-DNA.

תעתוק במהופך (Reverse transcription)

תהליך של יצירת שרשרת חד-גדילית משלימה של נוקלאוטידים של DNA על פני תבנית של RNA.

תרבית תאים (Cell culture)

שיטה לגידול תאים מחוץ לגוף היצור. צורת גידול זו מחייבת הזנה של התאים באמצעות מצע מיוחד ושמירה על תנאים סטריליים.

DNA משלים (cDNA)

DNA שנוצר על ידי תעתוק במהופך של מולקולת RNA, ולכן אינו מכיל רצפי DNA גנומים כמו אינטרונים או אזורי בקרה על תעתוק.

ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

שיטה שבה אפשר לבדוק כמות בלתי ידועה של חלבון בעזרת נוגדנים ייחודיים לחלבון ותגובת צבע.

GFP (Green Fluorescence Protein)

חלבון זוהר שמקורו במדוזה.

PCR (Polymerase Chain Reaction)

תגובת שרשרת של האנזים DNA פולימראז. שיטה שבה אפשר להרבות במבחנה עותקים של DNA בעזרת כל המרכיבים המשתתפים בתהליך השכפול הטבעי של DNA בתאים. השיטה מאפשרת גם מדידת כמות בלתי ידועה של DNA.

RNA פולימראז (RNA polymerase)

אנזים המתעתק מולקולת RNA על פי הרצף של אחד מגדילי ה-DNA.

מקורות לתמונות, איורים וגרפים:

מבוא:

1. ביוראקטור שולחני, עמוד 7: With kind permission from Paul F. Hamlyn, http://fungus.org.uk

2. ביוראקטור תעשייתי, עמוד 7:
With kind permission from Laboratoire de Genie Proteique et Cellulaire, France

3. תאי דם אדומים, עמוד 9: © ASAP, מאגר תמונות ישראלי

4. עכבר זוהר, עמוד 18:
With kind permission from Andras Nagy, PhD, Mount Sinai Hospital, Samuel Lunenfeld Research Institute, Canada

4. חיידקים על ראש סיכה, עמוד 29: Dr. Tony Brain and David Parker/ Science Photo Library

5. מזרק להורמון גדילה, עמוד 30:
With kind permission from Novo Nordisk, UK

6. תאי CHO בתרבית, עמוד 31: With kind permission from Prof. Doug Kline, Kent State University, UK

7. יצירת צמחים מהונדסים, עמוד 42 ב, ג, ה, ו:
With permission from the Institute of Agriculture and Natural Resources, University of Nabraska, USA

8. גידול תרביות רקמה של צמחים בתנאים סטריליים, עמוד 43:
With kind permission from the School of Chemical and life Sciences, Singapore Polytechnic, Singapore

9. קוף מהונדס, עמוד 46 ב:
Reprinted with permission from Chan *et al.*, Science 291: 309-310 (2001). ©2004 AAAS

10. חזיר מהונדס, עמוד 46 ג:
With permission from Dr. Christian Basi, University of Missouri-Columbia, USA

11. עכברים מהונדסים, עמוד 46 א:

Reprinted with permission from Nature, Palmiter *et al.*, Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes, (1982), Dec 16;300(5893):611-615. © 2005 Nature Publishing Group

12. דגי סלמון מהונדסים, עמוד 48:

With permission from Prof. Hew Choy Leong, Biological Sciences, The National University of Singapore.

קובץ מחקרים:

פיתוח חיישן ביולוגי לאיתור חומרים הפוגעים בחומר התורשתי

גרפים 1-3, עמודים 64, 65:

Reprinted from: Mutation Research, 466 (1): 97-107 (2000), Davidov *et al.*, Improved bacterial SOS promoter: lux fusions for genotoxicity detection , © 2004, with permission from Elsevier

ביטוי רעלן ה-Bt בכלורופלסטים של צמחי טבק מקנה לצמחים עמידות נגד חיידקים

1. *Bacillus thurigensis*, עמוד 70:

With kind permission from José Bresciani, Per H. Damgaard and and Jørgen Eilenberg, Department of Ecology, The Royal Veterinary and Agricultural University, Denmark

2. עש הטבק, זחל, עמוד 72:

With permission from Dr. Curtis E. Swift, Colorado State Cooperative Extension, Colorado, USA

3. עש הטבק, בוגר, עמוד 72: With permission from USDA, ARS, BCIRL, USA

4. עש הסלק, זחל ובוגר, עמוד 72: With permission from Prof. John Capinara, University of Florida, USA

5. עש הכותנה, זחל ובוגר, עמוד 72: With permission from USDA, ARS, BCIRL, USA

6. דנאית, זחל, עמוד 72: G.W. Willis, M.D. ©

7. דנאית, בוגר, עמוד 72: Bob Parks ©

8. איור 6, עמוד 75 וטבלה 1, עמוד 76:

Reprinted with permission from Nature Biotechnology, De Cosa *et al.*, Overexpression of the Bt cry2Aa2 operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals, (2001), 19:71-74. © 2004 Nature Publishing Group

9. תאי צמח הטבק, עמוד 73: באדיבות פרופ. אלי זמסקי, הפקולטה לחקלאות, האוניברסיטה העברית בירושלים

טיפול במחלה ADA-SCID על ידי ריפוי גני של תאי גזע ממוח העצם

גרפים 1-2, עמודים 86-87:

Reprinted with permission from Science, Aiuti *et al.*, Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with Nonmyeloablative conditioning, (2002), 296:2410-2413. © 2004 AAAS

אינדקס

האינדקס אינו מכיל מונחים הנמצאים באיורים ובמילון המונחים.

א

אבחון 49, 50, 53, 78
אגרובקטריום 39, 40, 41, 42
אדנין 15
אופרון 19, 62, 63, 70, 71, 72, 73, 75, 77, 78
אורגניזם טרנסגני 33
אורגניזם מהונדס 20, 33, 78
אזור בקרה 19, 21, 24, 29, 32, 38, 43, 44, 46, 48, 61, 62, 63, 65, 66, 72, 73 78, 88
אזור מבני 19, 22, 35, 37, 38, 43, 61, 62, 63
איקריוט 15, 16, 17, 19, 22, 30, 33, 35, 45, 50, 67
אנזים 23, 24, 28, 29, 36, 47, 50, 53, 54, 62, 73, 74, 75, 82, 84
אנטיביוטיקה 7, 38, 39, 44, 54, 72, 73, 79, 85
אנטיגן 44, 47, 83
אריתרופויטין 8, 9, 10, 13

ב

בופר 50
בידוד 35, 36, 70, 72, 73
ביוטכנולוגיה חדישה 8
ביוטכנולוגיה מסורתית 7
ביוליסטיקה 73
ביוליסטית (שיטה) 40, 73, 79
ביוראקטור 7, 45
ביטוי גנים 14, 18, 19, 78
בסיס 15, 18, 78
בקרה 17, 19, 21, 23, 24, 26, 29, 32, 38, 43, 44, 46, 48, 61, 62, 63, 65, 66, 71, 72, 73, 78, 79, 88

ג

גדיל 15, 16, 22, 24, 50, 51, 63
גואנין-G 15
גלאי 28, 29, 36, 79
גלוקוז 18, 55
גן 14, 16, 19, 20, 24, 25, 26, 29, 33, 34, 36, 38, 40, 43, 44, 46, 47, 49, 54, 56, 61, 62, 66, 67, 70, 71, 72, 79, 82, 83, 85, 88, 89
גן בורר 25, 29, 40, 54, 67, 85
גן מדווח 25, 26, 29, 46, 61, 66, 67
גן מהונדס 20, 24, 38, 39, 61, 79, 88
גנום 36, 39, 40, 43, 44, 45, 49, 53, 54, 63, 70, 72, 73, 85, 88

ד

דו-גדילי 15
דו-פסיגיים 39, 40

ה

הארה 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67
הדברה ביולוגית 33, 34, 78
הורמון 9, 21, 22, 23, 24, 26, 28, 29, 30, 38, 46, 47, 48
הנדסה גנטית 14, 20, 24, 32, 66
השבחת זנים 45
התמיינות 18, 42, 55, 82

ו

ויטמין A 45

ז

זהירה 18, 26
זחל 34, 70, 72, 77
זיגוטה 47
זיהוי פלילי 53
זיהום 60, 64

ח

חבל הטבור 83
חד-גדילי 16, 51
חדירות 25
חומצות אמיניות 17, 18, 20
חומר הדברה 71
חיידקים 6, 14, 15, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 28, 29, 30, 31, 35, 36, 45, 48, 54, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 70, 82

ט

טבק 39, 44, 69, 70, 71, 72, 73, 75, 77, 78
טרנסגני 14, 47
טרנספורמציה 25, 26, 29, 35, 36, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 63, 67

י

יונק 26, 31, 46, 47, 70

כ

כותנה 33, 35, 39, 41, 42, 45, 71, 72, 75
כלורופלסט 44, 70, 71, 72, 73, 75, 77, 78, 79
כרומוזום 15, 29, 62, 71

ל

לוציפראז 62, 63
ליגאז 24, 36, 63, 67

מ

מבנה מרחבי 15
מדוזה 18, 46
מוח עצם 55, 82, 83, 84, 85, 87
מוטנט 64, 65
מושבה 25, 36, 37
מזון מהונדס 44, 45
מחלה תורשתית 83
מחלת הפרה המשוגעת 21
מחסום המינים 14, 18
מיוזה 18, 50
מין 14, 18, 20, 33, 44, 49
מיקרואורגניזמים 6, 7, 43
מפעיל פלסמינוגן רקמתי 32

נ

נבג 70
נגיף 31, 32, 44, 54, 72, 85
נוגדן 36, 73, 74, 75, 78, 79
נוגדן לוכד 74, 79
נוגדן מגלה 74, 79
נוקלאוטיד 15, 17, 23, 24, 50, 51
ננסות 20, 21
נשא 21, 22, 23, 24, 25, 26, 29, 38, 39, 54, 72, 73, 79, 85, 88

ס

סובסטרט 62, 74, 75, 79
סוכר 17, 31
סיב אופטי 64
סיכון 60, 67, 88
סליל כפול 15
ספרייה גנומית 35, 36
סרטן 49, 54, 55, 88

ע

עיבוד שלאחר התרגום 17
עכבר 18, 26, 46
עמידות 25, 26, 33, 38, 39, 44, 45, 69, 70, 72, 73, 79, 85, 86
עקומת כיול 74, 75, 79
עריכה 16, 18, 19, 22, 30
עש 71, 72, 75

פ

פולימראז 16, 22, 24, 50, 51, 53
פרוקריוט 15, 30, 63, 67, 71, 78

צ

ציטוזין-C 15

ק

קוף 46
קופסית 54
קרום התא 63, 65
קשרי מימן 15, 24

ר

רבייה אל-זוויגית 29
רבייה זוויגית 14
רגישות 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66
ריבוזום 17
ריסוס 34, 60
ריפוי גני 54, 81, 82, 83, 84, 87, 89
רעלן 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 41, 42, 44, 45, 69, 70, 71, 72, 73, 75, 77, 78, 79
רפואה 6, 13, 49, 50, 53, 55, 56
רצף 15, 16, 18, 22, 23, 28, 49, 50, 51, 53, 82, 88
רקומבינציה 18

ש

שחבור 16, 18, 19, 22, 30
שיבוט 13, 14, 26, 29
שכפול 22, 50, 51, 53, 56, 71, 85, 89
שפכים 7

ת

תא דם אדום 8, 9
תא דם לבן 82, 83, 84, 85, 86, 87
תותח גנים 40, 41, 42, 73
תחל 50, 51, 53, 86, 89
תימין-T 15
תירס 33, 35, 40, 41, 42, 45
תכונה 14, 16, 18, 19, 44, 89
תנאים סטריליים 7, 30, 31, 43, 45, 72, 73
תסיסה 6, 7
תעתוק 16, 18, 19, 22, 24, 28, 29, 43, 48, 61, 63, 65, 72, 73
תעתוק במהופך 22, 54
תקשורת 6, 9, 10
תרבית חיידקים 25, 29
תרבית רקמה 9, 31, 35, 43, 55, 84
תרבית תאים 31, 32, 54
תרגום 16, 17, 18, 19, 22, 28, 30, 31, 45, 47, 65
תרופה 6, 8, 9, 83, 84

מונחים באנגלית

A

Agrobacterium tumefaciens 39

D

DNA 3, 6, 8, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 28, 29, 31, 35, 36, 37, 39, 40, 43, 44, 47, 49, 50, 51, 53, 54, 56, 59, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 71, 72, 73, 77, 78, 79, 82, 85, 86, 88, 89

DNA משלים 21, 22, 29, 35, 85

E

E. coli 29, 30, 31, 36, 38, 44, 45, 62, 63, 64, 65, 72

ELISA 73, 74, 75, 79

G

GFP – Green Fluorescen Protein 18

P

PCR 50, 51, 53, 56, 85, 86, 88, 89

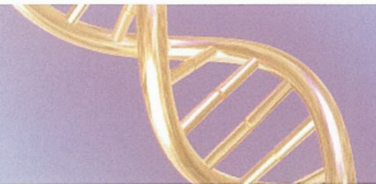
R

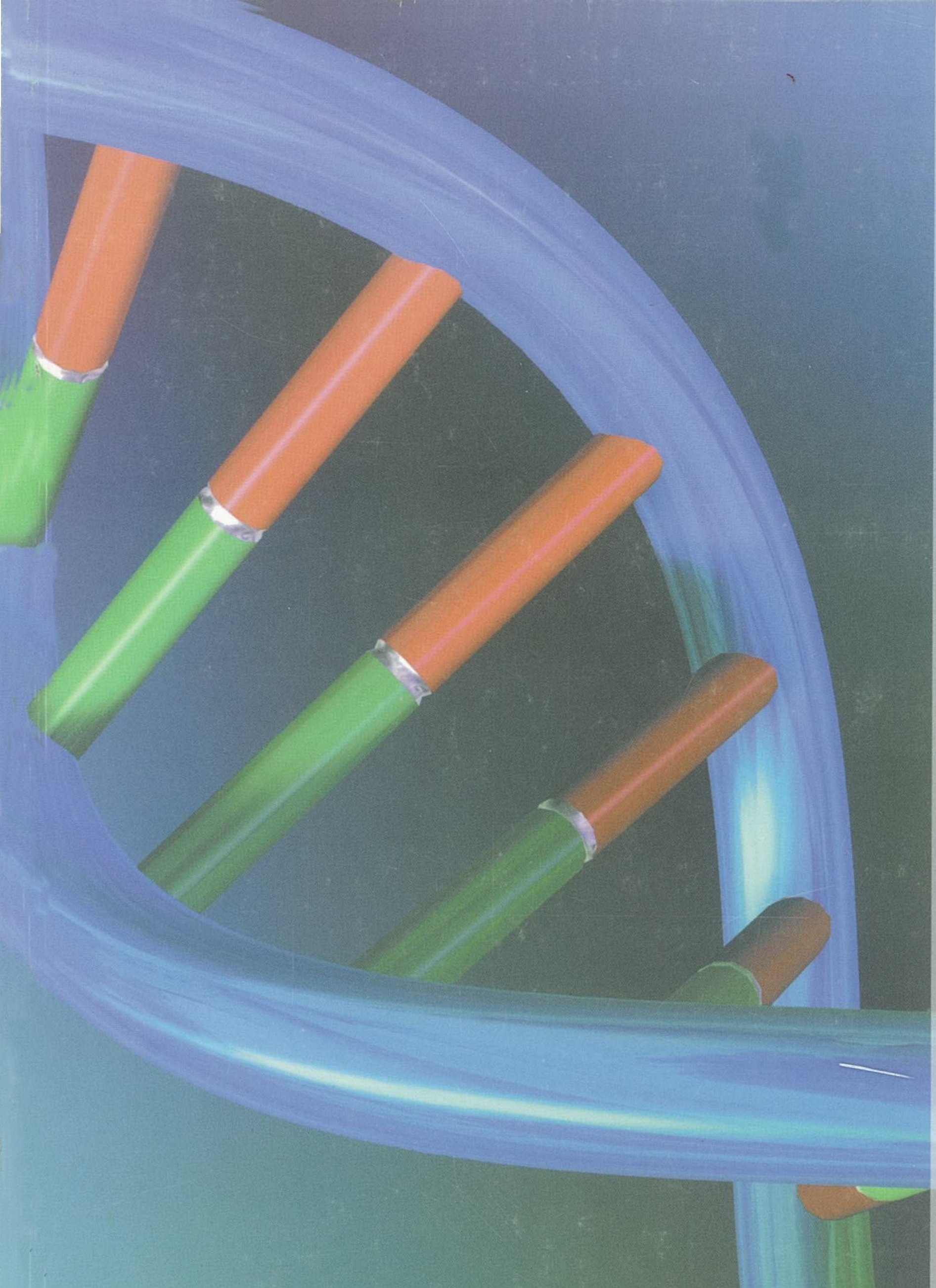
RNA מוביל 16, 17

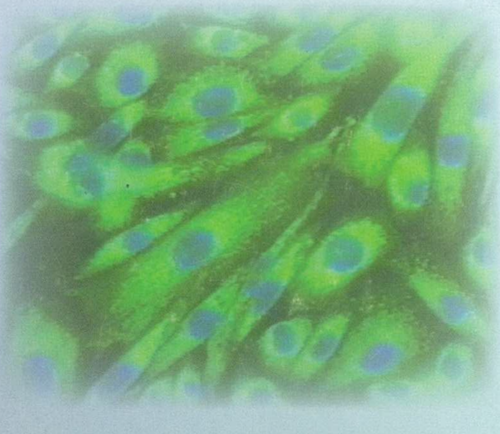
RNA שליח 16, 17, 18, 22, 29, 78

T

T-DNA 73, 74, 75, 79







איך אפשר לרפא ילדי בועה, שמערכת החיסון שלהם פגומה?
האם אפשר להשתמש בחיידקים כדי להגן על המים שלנו?
מה הקשר בין תאי דם אדומים לרמאות בספורט?
כיצד יכול צמח להתגונן מפני זחלים רעבים?
מהו תותח גנים?

בספר "מאלפי הגנים - קובץ מחקרים בביוטכנולוגיה" תכירו פתרונות ביוטכנולוגיים לבעיות מתחום הבריאות, החקלאות, איכות הסביבה והתעשייה. בספר מודגשים עקרונות ביולוגיים אותם מיישמים חוקרים בעבודתם.

הספר מיועד לתלמידי ביולוגיה ברמה מורחבת בחטיבה העליונה, והוא אחד מהנושאים המחקריים לפי תוכנית הלימודים החדשה בביולוגיה (תשס"ג).