



”יצירת תאים רגישים להדבקה נגיפית על ידי עריכה גנומית של גן אנטי נגיפי”

סאלם סרחאן*^{1,2}, אלכס רובינסקי², שרון קרניאלי¹,

החטיבה לוירולוגיה, המכון הווטרינרי ע"ש קמרון, משרד החקלאות ופיתוח הכפר¹,
המחלקה למיקרוביולגיה וגנטיקה מולקולרית, האוניברסיטה העברית בירושלים²

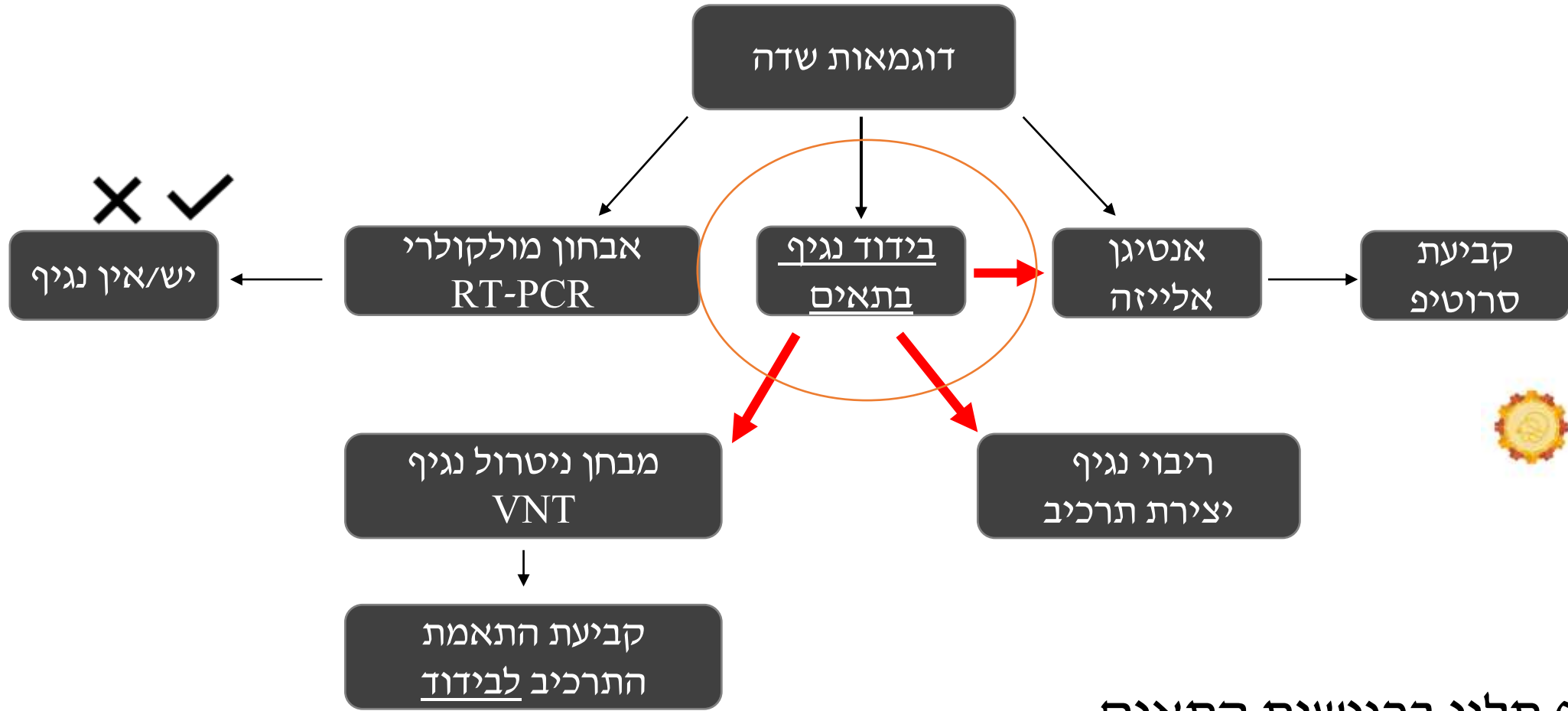
מציג : סאלם סרחאן

הכנס השנתי ה-31 למדעי הבקר והצאן

מבוא:

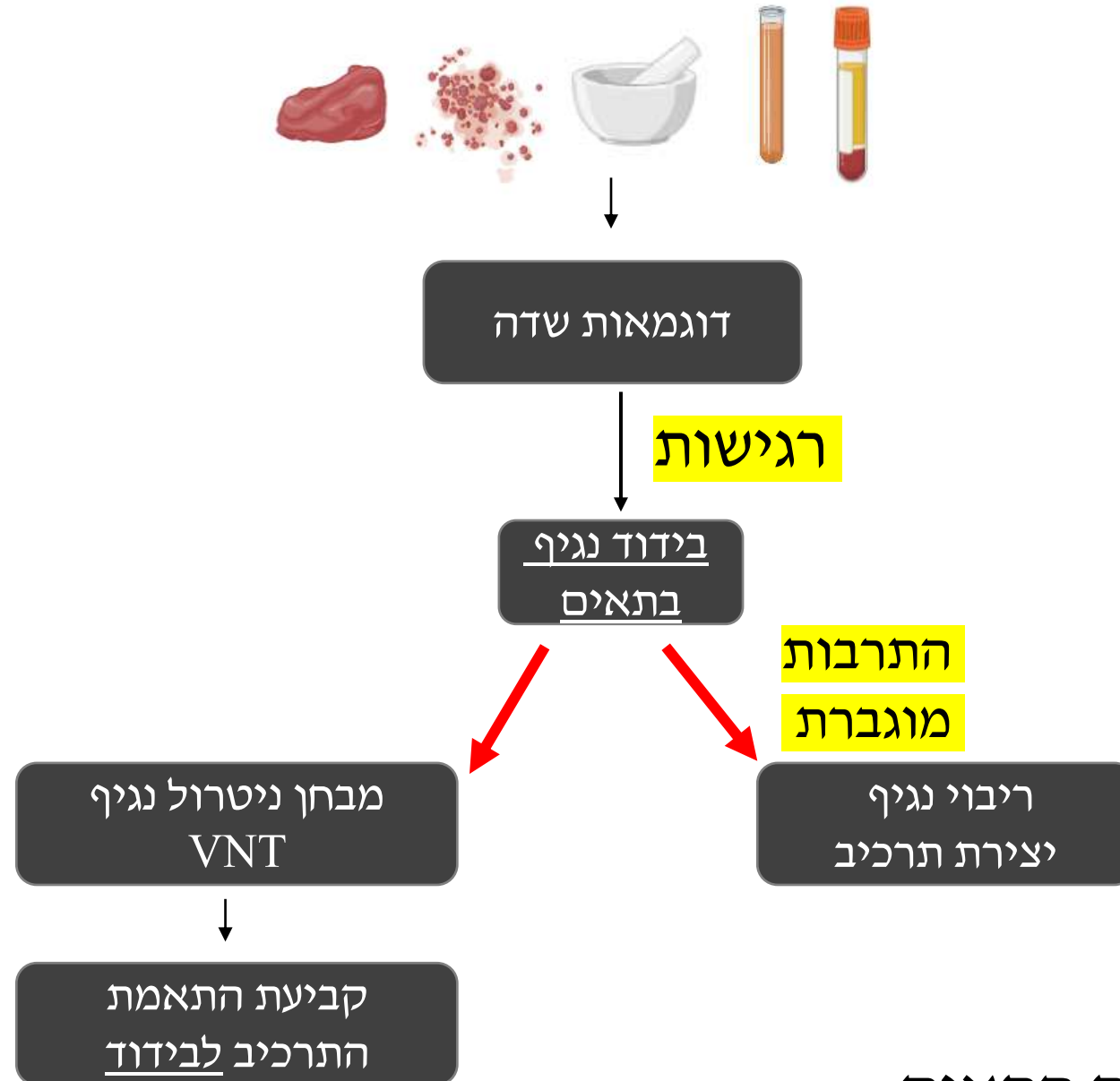
- תאים בתרבית משמשים לאבחון, בידוד וריבוי של נגיפים, בהם נגיף מחלת הפה והטלפיים (פוי"ט).
- תאי אפיתל ראשוניים רגישים ביותר לרוב זני פוי"ט אך הם קשים לתחזוק ויקרים להכנה.
- שורות תאים אלמותיים קלות ונוחות יותר לעבודה, אולם לתאים רגישות מופחתת לנגיף פוי"ט ביחס לתרביות ראשוניות.

אבחון פו"ט



בדיוד נגיף תלוי ברגישות התאים

מה ניתן לשפר?

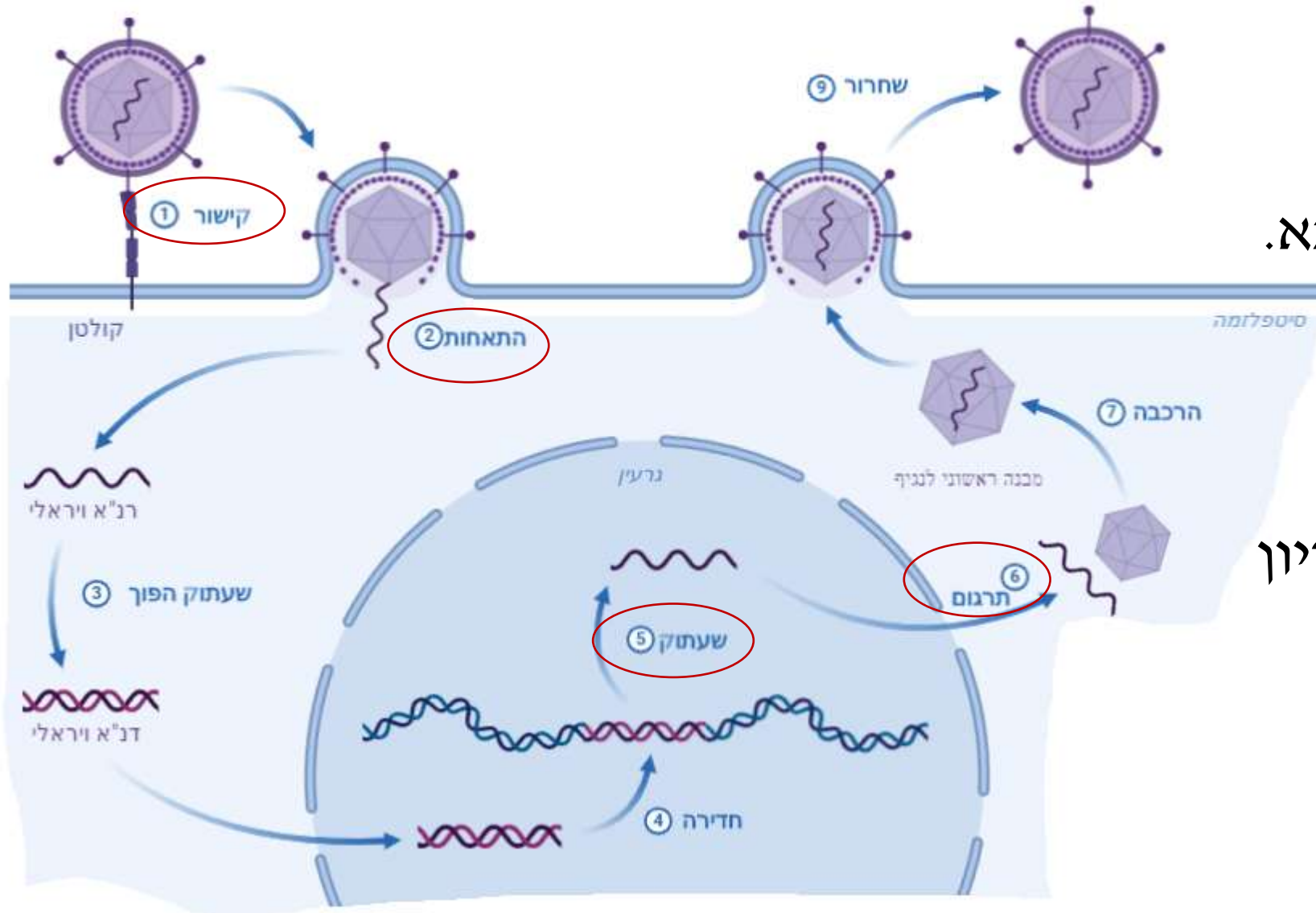


בידוד נגיף תלוי ברגישות התאים

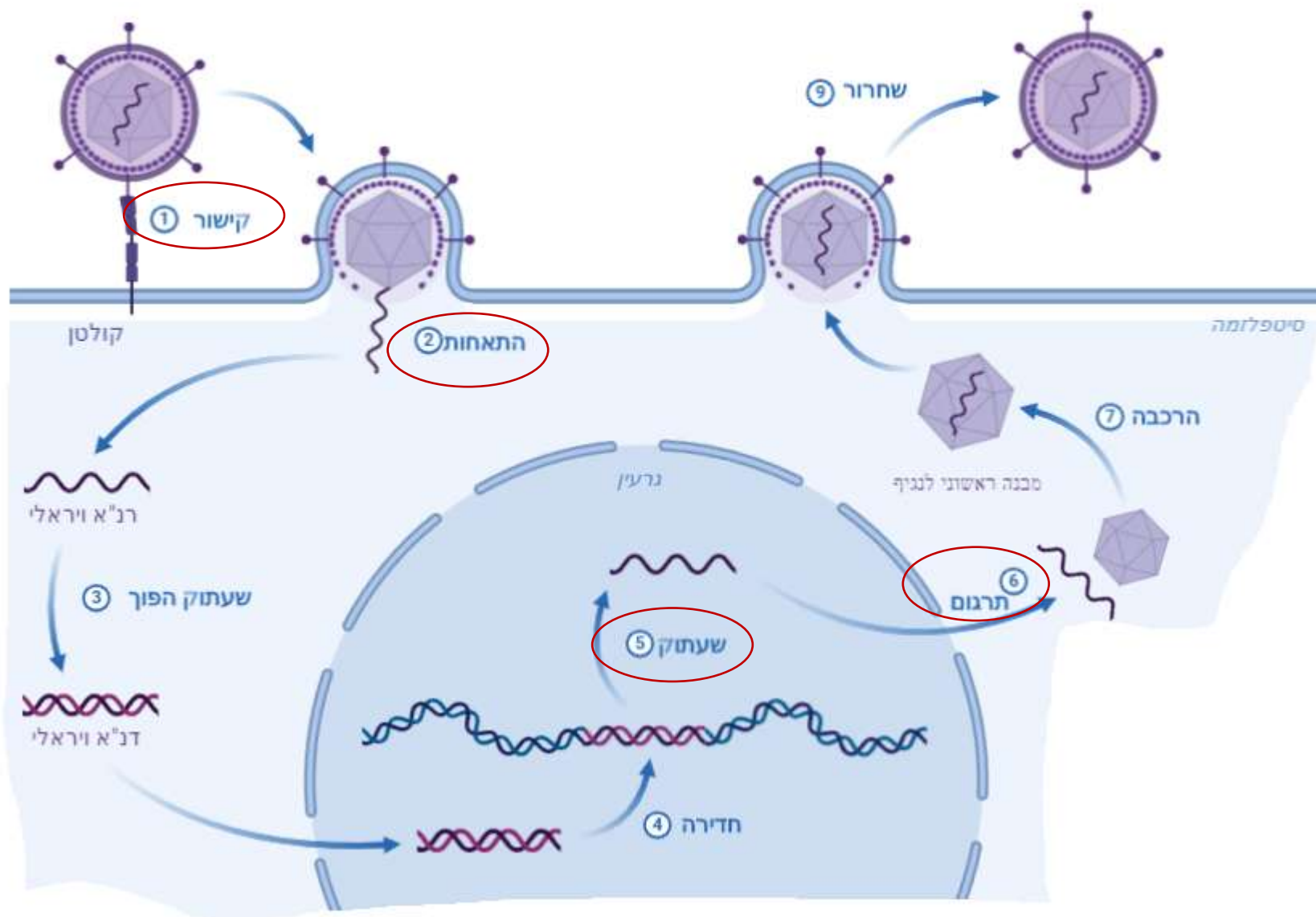
מה מגביל התרבות נגיפים בתאים?

א. הגבלות על כניסת הנגיפים:
ספיחה, קשירת קולטנים,
אנדוציטוזה, איחוי עם קרומי התא.

ב. מגבלות לאחר כניסה (חדירה):
יציבות ושכפול של הגנום הנגיפי,
תרגום חלבוני הנגיף, הרכבת הויריון
ושחרורו.



איך ניתן לשפר את רגישות התאים להדבקה נגיפית?



• ביטוי של קולטנים

• ספציפים לקשירת הנגיף.

LaRocco, M., L. Rodriguez (2013).

• פגיעה במנגנונים התאיים

• שמעכבים את שכפול הנגיף.

(פגיעה בגנים אנטי ויראליים)



השערת המחקר:

פגיעה בגנים אנטי ויראליים תשפר את רגישות התאים והתרבות הנגיפים בהם

✓ בחרנו בגן PKR

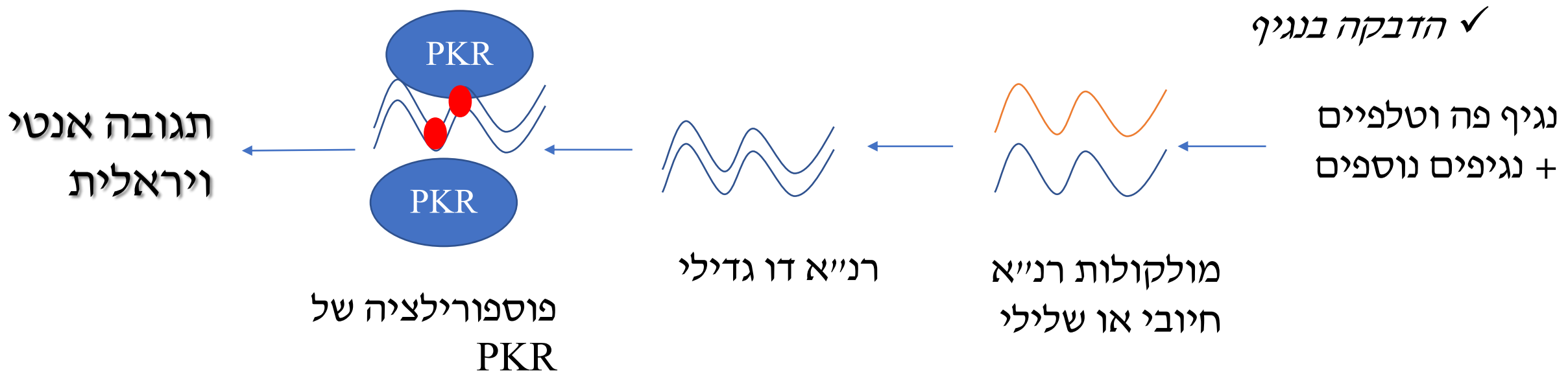
מחקר קודם: הפרעה לביטוי בגן PKR ע"י ביטוי זמני של מולקולות רנ"א קטנות הביאה עלייה בכייל לאחר הדבקה בנגיף מחלת הפה והטלפיים.



(Guo, Jin et al. 2015)

מה זה PKR ?

- חלבון PKR הינו חיישן אנטי-ויראלי מרכזי.
- PKR מופעל על ידי זיהוי רנ"א דו-גדילי, תצורה אשר מופיעה בתאים בעקבות הדבקה בנגיפים, ובאמצעות שרשרת העברת אותות תוך תאית מפעיל מנגנונים נוגדי הכפלה נגיפית כדוגמת מערכת האינטרפרון.



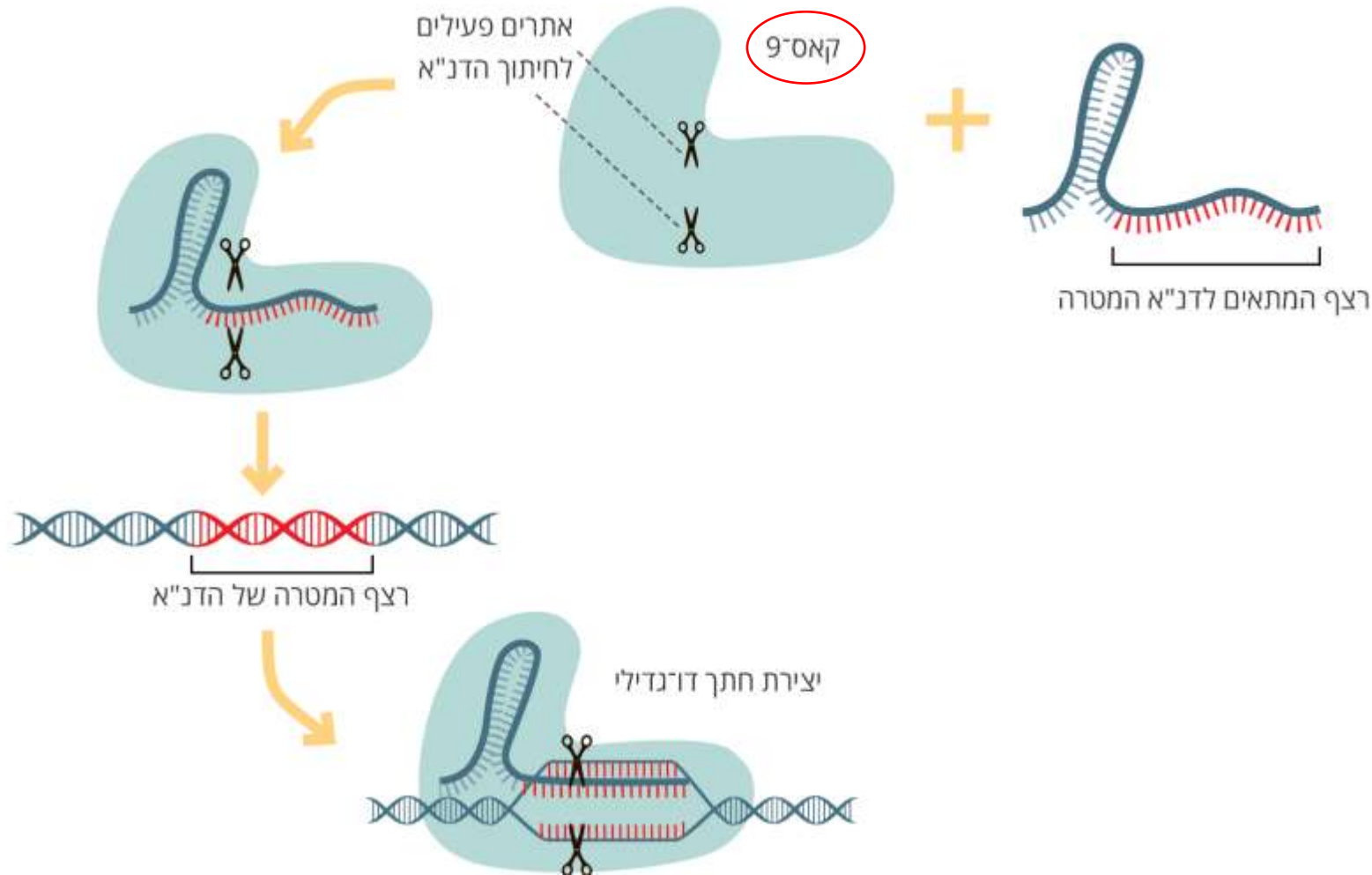
מטרת המחקר:

יצירת תאים רגישים להדבקה נגיפית על ידי פגיעה בביטוי החלבון PKR, תוך שימוש במערכת CRISPR/Cas9 לעריכה גנומית.

שיטות:

- שיבוט מערכת העריכה הגנומית והחדרתה לתאים.
- בחינת רמת ביטוי החלבון בשיטת תספיג חלבון (western blot).
- בידוד תאים שבהם פגיעה יעילה ב PKR .
- מיפוי גנטי לזיהוי השינויים שהושרו ע"י מערכת העריכה.
- בדיקת רגישות של התאים על ידי הדבקה בנגיפים שונים.

מערכת עריכה גנטית CRISPR/Cas9



- מערכת עריכה גנומית מתקדמת ממקור חיידקי.
- למערכת שני מרכיבים עיקריים:
 - הנוקלאז (CAS9)
 - רנ"א המכוון לאזור באתר המטרה בדנ"א (guide RNA).
- התא מתקן את אזור החיתוך אבל התיקון מלווה בשינוי גנטי (מוטציות).

יצירת וקטורים לנטי ויראליים לביטוי gRNAs כנגד הגן PKR

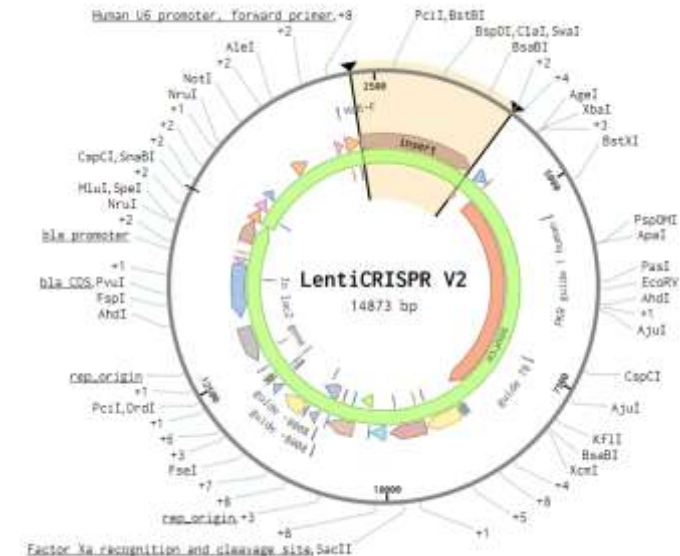
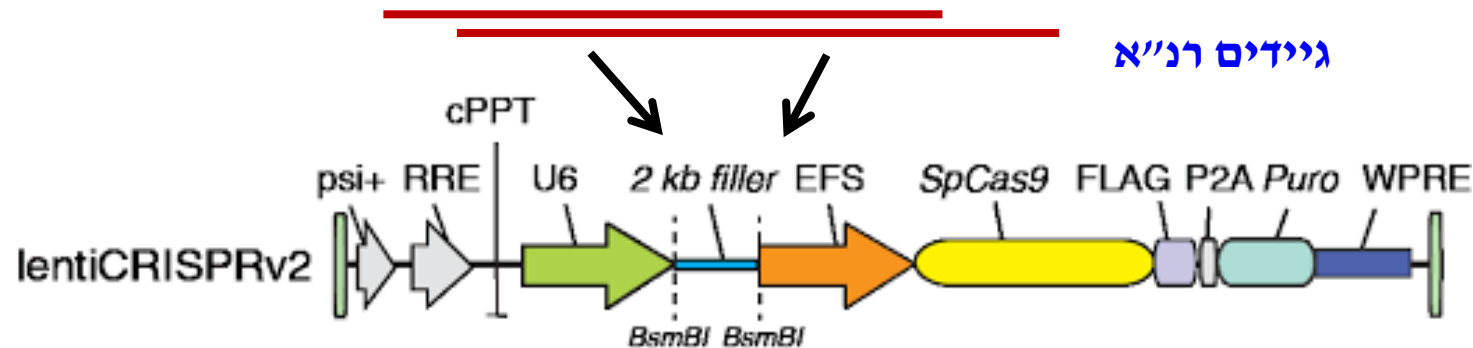
אסטרטגיה:

1. תכנון רצפי רנ"א מכוונים (gRNAs) לאזורים שונים בגן PKR: אקסון ראשון ושני ואזור תחילת השעתוק.
תחילת השעתוק.

Algorithm: <http://crispr.mit.edu>

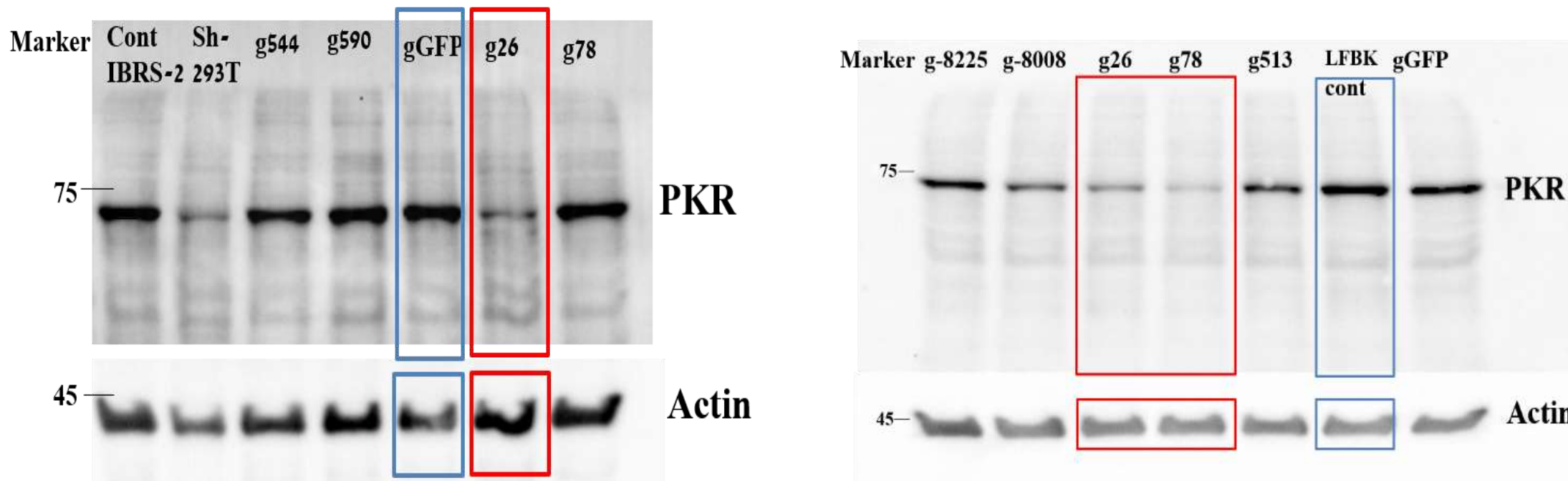


2. שיבוט של הרצפים המכוונים לתוך וקטור לנטי ויראלי המבטא את Cas9 וטרנסדוקציה לתאים.



תוצאות:

סריקה לביטוי של גן PKR בתאי LFBK ו IBRS-2 לאחר הפגיעה.



✓ קיבלנו תאים עם ביטוי חלקי של גן PKR.

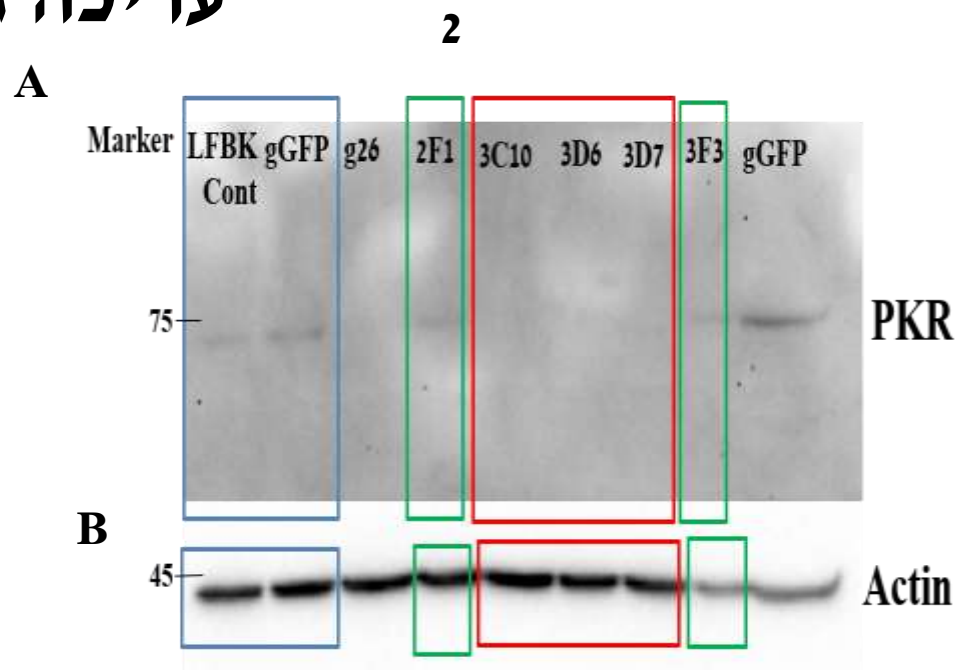
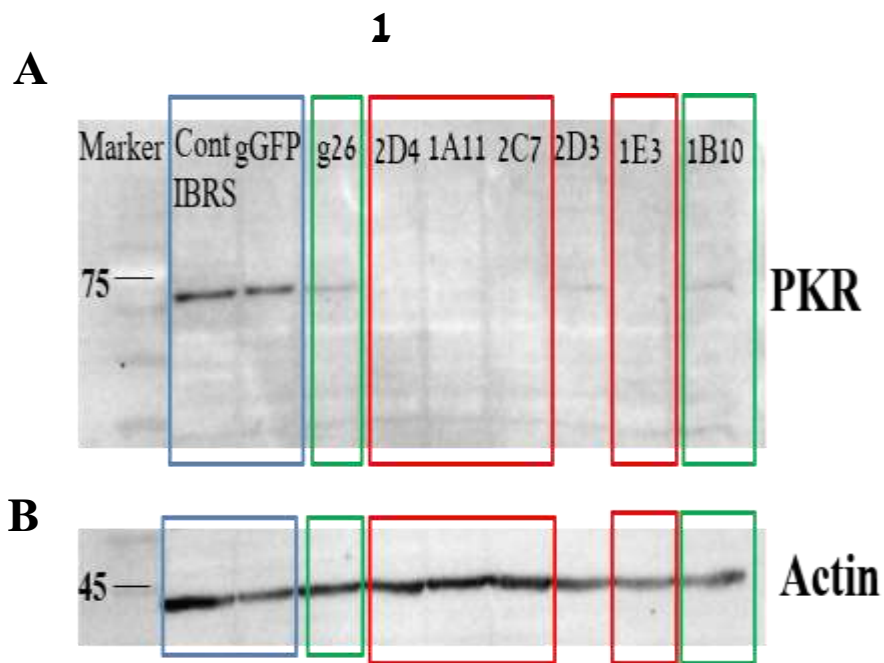
כחול - תאי ביקורת
אדום - ביטוי חלקי

✓ ביטוי חלקי התקבל בסריקה ראשונה של התאים.

➤ כדי להגיע לחסר מלא ואוכלסיה הומגינית של תאים בודדו תאי g26 לשבטים בשני סוגי התאים IBRS ו LFBK.

ביטוי של גן PKR בשבטים שבודדו מתאי LFBK ו IBRS-2 לאחר

עריכה גנטית



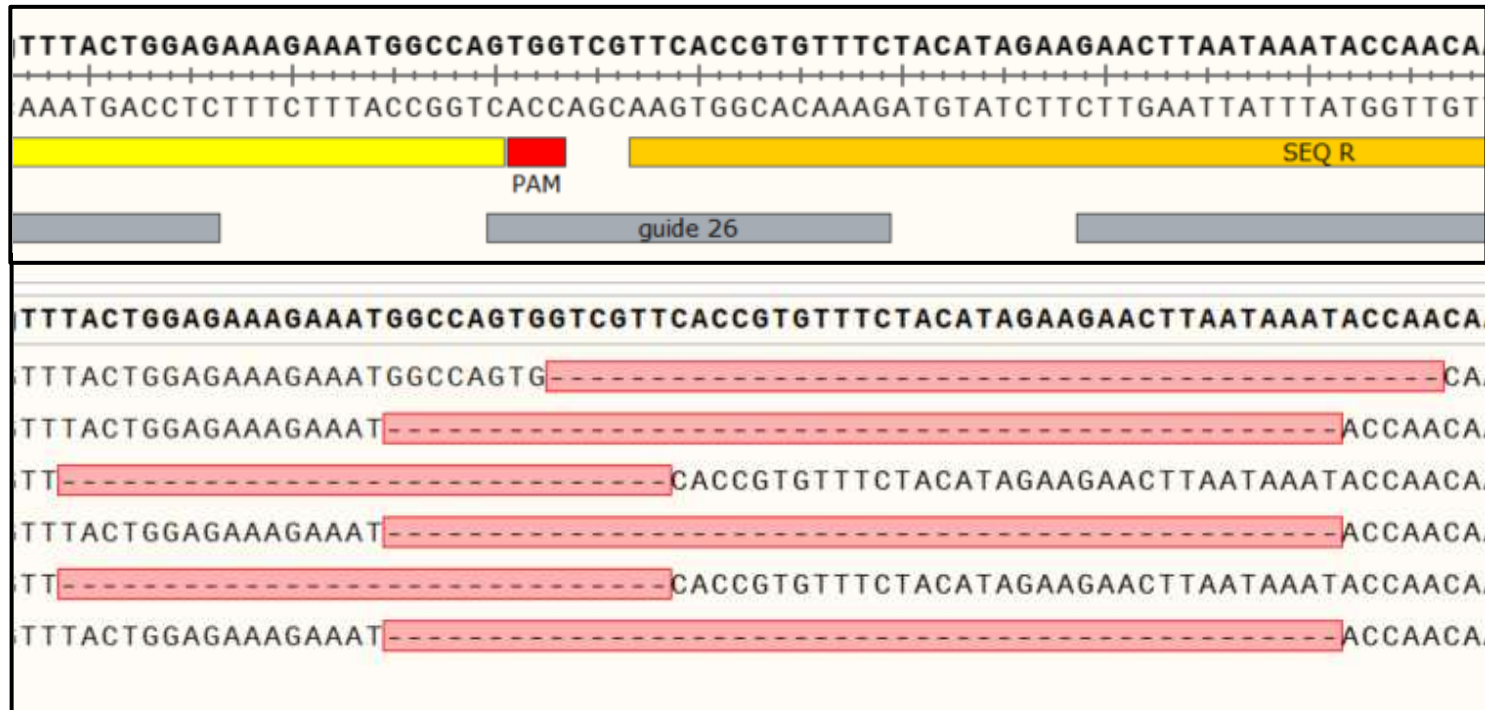
✓ קיבלנו תאים עם חסר מלא בביטוי PKR

כחול - תאי ביקורת
ירוק - ביטוי חלקי
אדום - חסר מלא בביטוי

אפיון גנטי לשבטים שבודדנו באתר בגן PKR שכוון לשינוי



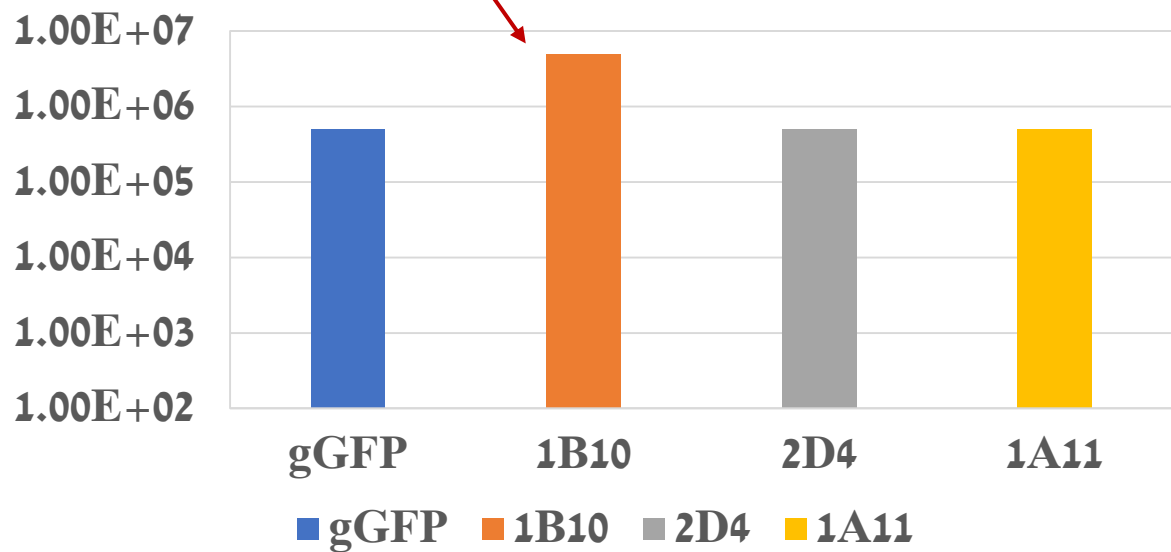
ירידה חלקית בביטוי PKR (1B10)



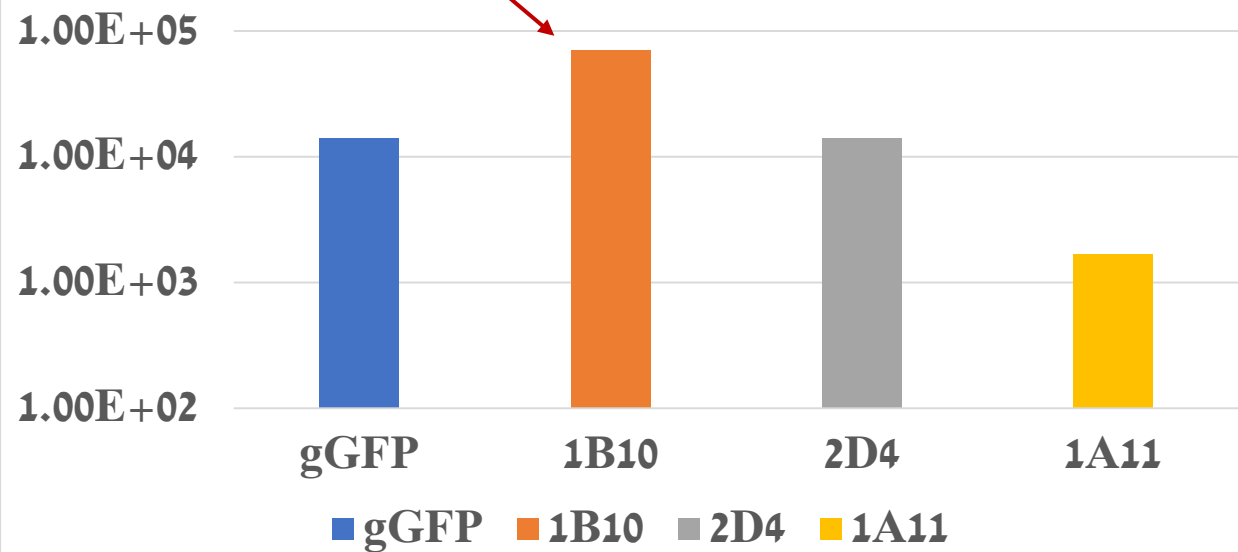
חסר מלא בביטוי PKR
(1A11)

זיהוי שבט תאים בעל רגישות משופרת להדבקה בנגיפי פו"ט ואקבנה

FMDV titration on IBRS-2 guide 26 clones



AKABANE titration on IBRS-2 guide 26 clones



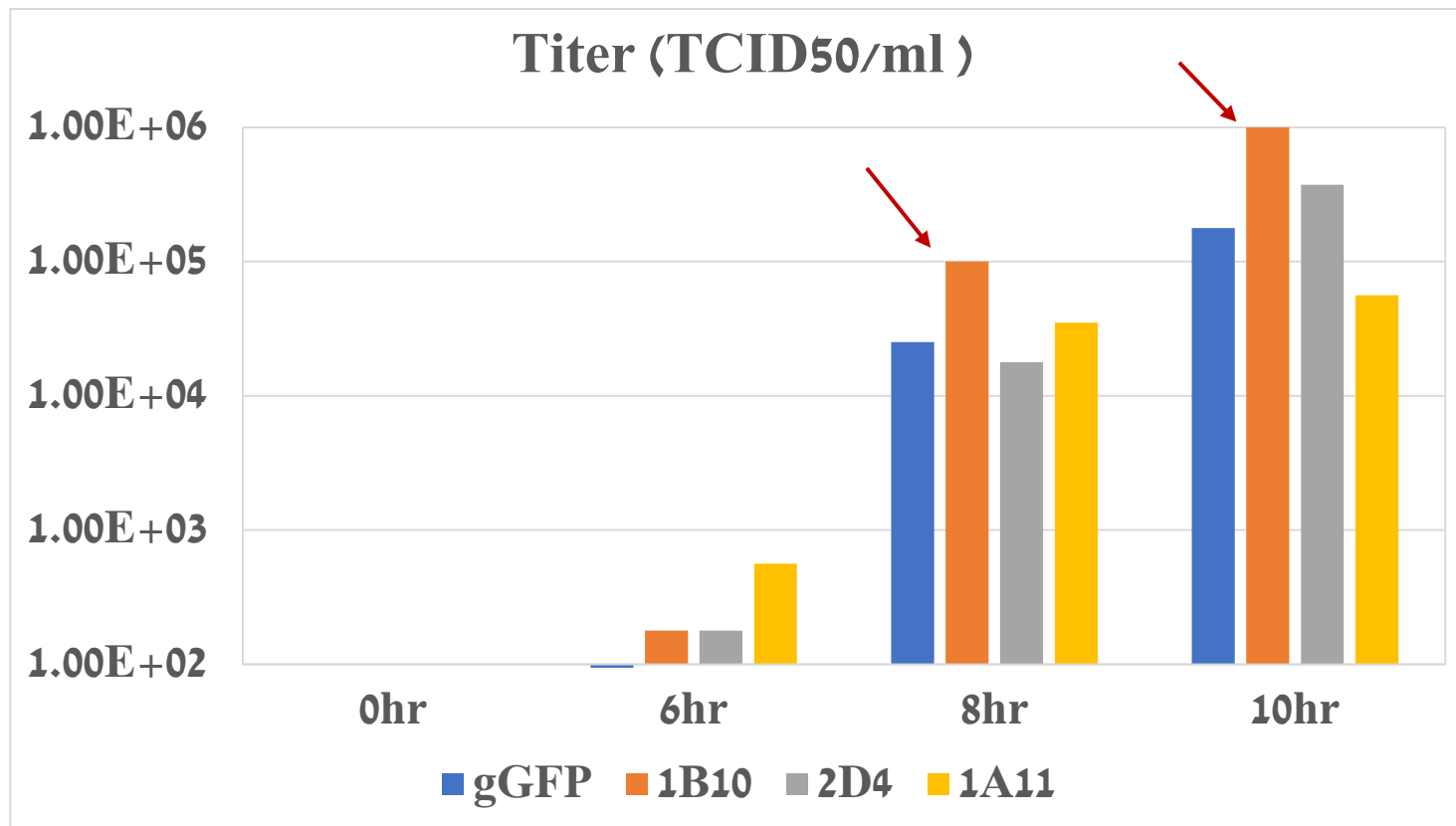
1B10 הראה רגישות גבוהה לשני הנגיפים לעומת תאי הביקורת ✓

gGFP - תאי ביקורת
 1B10 - ביטוי חלקי
 2D4, 1A11 - חסר מלא

**שיפור רגישות בידוד נגיף פו"ט מדוגמאות שדה בשבט 1B10
ביחס לתאי המקור**

תא 1B10 48 שעות	תא 1B10 24 שעות	תאי מקור IBRS 48 שעות	תאי מקור IBRS 24 שעות	דוגמאת שדה	
--	--	--	--	לב בקר	ביקורת שלילית 2019
++	++	--	--	פרובנג בקר	עין איילה O 2019
++	+	--	--	מטוש בקר	טמרה O 2019
++	+	--	--	אפיתל בקר	יונתן O 2019
--	--	--	--	אפיתל בקר	קיבוץ גונן O 2019
++	+	+	--	אפיתל בקר	נחל תבור O 2018
--	--	--	--	לב בקר	חברון O 2018
++	+	--	--	אפיתל בקר	עראמשה A 2017
++	++	++	+	אפיתל בקר	מסעדה רמת-הגולן A 2017

ייצור מוגבר של נגיף פו"ט בשבט התאים 1B10



✓ 1B10 הראה עלייה ביצור של הנגיף בהשוואה לתאי הביקורת

gGFP - תאי ביקורת
1B10 - ביטוי חלקי
2D4, 1A11 - חסר מלא

סיכום:

- הצלחנו ליצור שורות תאים בהם יש פגיעה קבועה בביטוי החלבון PKR.
- מיפינו את השינויים הגנטיים שהושרו בגן PKR.
- בודדנו שבט מתאי IBRS-2 שהראה שיפור ברגישות להדבקה נגיפית והגברה של התרבות הנגיפים.

תוכניות עתידיות:

- בדיקה להוכחת התלות בין פגיעה בביטוי PKR לשינוי ברגישות להדבקה נגיפית.
- סריקה רחבה יותר לשבט התאים הרגיש שבודדנו IBRS-2 לנגיפים נוספים, וגם שבטים מתאי LFBK.

תודות :

***המנחים שלי*:**

ד"ר שרון קרניאלי
ד"ר אלכס רובנסקי



שאלות?

המכון הוטרינרי- מעבדת פו"ט:

בוריס גלמן

ניק סטורם

יבגני איינגור

המכון הוטרינרי- החטיבה

לויולוגיה:

נטליה גולנדר

מימון ע"י:

השירותים הוטרינרים