

פלטפורמת סקירה פנוטיפית לזיהוי השפעת מולקולות קטנות על גידול, תנועתיות ופוטוסינתזה של האצה

Chlamydomonas reinhardtii

Simon E Alfred^{1,2,3}, Anuradha Surendra^{1,2,4}, Chris Le¹, Ken Lin¹, Alexander Mok¹, Iain M Wallace^{1,6}, Michael Proctor⁵, Malene L Urbanus^{1,4}, Guri Giaever^{1,3,4} and Corey Nislow^{1,2,3*}

תקציר

ביולוגיה כימית, דיסציפלינה ממשקית המשתמשת במולקולות קטנות כגששים כדי לחקור ביולוגיה, היא גישה חזקה המפתחת כלים ספציפיים הפועלים במהירות ושניתן ליישם על אורגניזמים שונים. האצה הירוקית החד-תאית *Chlamydomonas reinhardtii* מהווה מודל מצוין בשל היכולות הפוטוסינתטיות, תנועתיות ריסית (CILIA RELATED MOTILITY), והגנטיקה הפשוטה. אנו מדווחים על תוצאות של סריקת כשירות אוטומטית של 5,445 מולקולות קטנות ובחינות נוספות לתנועתיות/פוטו-טקסיס ופוטוסינתזה. ניתוח כימו-אינפורמטי חשף מבני-ליבה פעילים, ושימש לבניית מודל בייז נאיבי, שחזה בהצלחה תרכובות ביו-אקטיביות הפועלות על האצה.

רקע

ביולוגיה כימית עושה שימוש במולקולות קטנות כדי לחקור ולהשפיע על מערכות ביולוגיות (ראה סקירה [1]). ע"י שינוי המצב הנורמלי של אורגניזם, ובכך השפעה על גדילה או התפתחות, אנו יכולים ללמוד על התרומה של תהליכי ההתערבות לכושר, פיזיולוגיה והומאוסטסיס של האורגניזם. הגישה אנלוגית למניפולציה גנטית ליצירת פנוטיפ נצפה (ראה סקירה [2]). מולקולות קטנות, בנוסף תמיכתם במניפולציה גנטית, הן בעלות יתרון: ניתן ליישמן על ריכוזים שונים, במהלך שלבי התפתחות שונים ועל רקמות מסוימות, על אורגניזמים שונים; וניתן להשתמש באפשרות להיפוך התוצאות (reversibility) במהירות כדי לאפנן תהליכים דינמיים.

האצה הירוקית החד-תאית *Chlamydomonas reinhardtii*, הקרויה לעיתים גם "שמרים ירוקים" [3], היא אורגניזם-מודל עוצמתי, שעליו ניתן לבצע בקלות מניפולציות באמצעות גנטיקה ישירה, וטווח רחב של פנוטיפים אינפורמטיביים. יתר על כן, הביולוגיה שלה רלוונטית גם לצמחים ובעלי חיים וגם למחלות אנושיות, למשל, ciliopathies [4,5]. ממצאי מפתח התגלו ממחקר של הכלורופלסט של *Chlamydomonas* [6, 7], כמו גם של מרכיבים של תפיסת האור שלה [8] ומנגנוני התגובה לאור [9]. מחקרים התפתחותיים התמקדו בהתפתחות של כשירות תחת לחצים (פחמן דו-חמצני גבוה, אוכלוסיות מיניות/א-מיניות) וההתפתחות של רב-תאיות [10-13]. *Chlamydomonas* סיפקה מידע רב על היווצרות ותפקוד שוטונים, ותעבורה בתוך השוטון נצפתה לראשונה ב-*Chlamydomonas* [14]. כאורגניזם-מודל מהמעטים בעלי שוטון המשמש לתנועה, יחד עם העניין המחודש בריסיות ראשיות ובפגעים בשוטונים ובריסיות, *Chlamydomonas* מהווה מערכת בחינה קלינית חשובה להתערבויות.

מחקרי התערבות כימית על אצות ירוקיות התמקדו בעיקר באינהיביציה של הפוטוסינתזה, במיוחד למטרת יישומים במחקר חקלאי [16, 17]. הרגישות הכימית של *Chlamydomonas* שימשה גם להערכת רעלים סביבתיים כגון קדמיום ופלאואקסיפיר ממקור קוטל עשבים [18, 19], לאספקת מידע על איסוף וצבירה ביולוגית של מולקולות קטנות [20, 21]. בנוסף, סקירות

כימיות-גנטיות בחנו מולקולות קטנות ויכולתן להשפיע על כושר התנועה של התא [22, 23], פוטו-טקסיס [24], ומבנה השוטון והיווצרותו מחדש [25, 26]. אולם, סקירה מקיפה, בסדר גודל רחב, של מולקולות קטנות כאינהיביטורים של כשירות, לפי ידיעתנו, טרם דווח. הנסיון שלנו עם התערבות כימית בשמרים הראה שנתונים שנגזרו מסקירות כשירות פשוטות הינם בעלי ערך רב, כאשר גדילה היא "הפנוטיפ השילובי" האולטימטיבי. מידע בשלב זה יכול להיות בעל ערך רב, לפישוט גישות גנטיות וגנומיות לקביעת מנגנונים אפשריים של פעולות של אינהיביטורים לגדילה של מולקולות קטנות [27-28].

כאן אנו פיתחנו סקירה של מולקולות קטנות בתפוקה גבוהה מאוד לזיהוי אינהיביטורים של כשירות של *Chlamydomonas reinhardtii*, המתבססת על שתי סקירות: אחת לכשירות לטווח ארוך בנוכחות של תרכובת, וסקירה נוספת להשפעות פנוטיפיות על פוטוסינתזה ועל תנועתיות/פוטו-טקסיס באמצעות חשיפה לפרקי זמן קצרים. אנו מציגים את היעילות של *Chlamydomonas* בנושא בכימיה ביולוגית, ומגדירים וממדלים פרמטרים פיזיו-כימיים המאפיינים פעילות של מולקולות קטנות על *Chlamydomonas*. כחלק מהמחקר, יצרנו מאגר מידע לביולוגיה כימית של *Chlamydomonas*, בו ניתן לחפש לפי מזהה או מבנה, ושמשפק מדדי גדילה ומדדים פנוטיפיים למולקולות קטנות על *Chlamydomonas* [29].

תוצאות

Chlamydomonas כמודל בביולוגיה כימית

כדי לסקור מולקולות קטנות המעכבות גדילה של *Chlamydomonas* ביצענו בדיקת כשירות של 80 שעות (איור 1a). הבדיקה שלנו משתמשת ביתרונות של כלים שפותחו לגידול שמרים, אשר מנטרים דחיסות אופטית (OD) של צלוחיות מיקרוטיטר נפרדות מספר פעמים בשעה, לקבלת עקומת גידול ברזולוציה גבוהה [27,30]. שיטת תפוקה גבוהה זו משלבת רובוט לטיפול בנוזלים, קורא צלוחיות ותוכנת אינטגרציה [30]. הגידול נעשה בטמפרטורה קבועה (22°C), אגיטציה (150 סל"ד) ותאורה (40 $\mu\text{mol photons/m}^2\text{s}$) ואומת בלוחות של 96-386 צלוחיות.

כדי לקבוע תנאים לסקירת מולקולות קטנות על *Chlamydomonas* ביצענו בדיקות גידול על מצעי TAP מוצקים ונוזליים עם ריכוזים משתנים של ממס (DMSO) או מולקולות קטנות יותר. DMSO הוא מדלל מועדף מפני שרוב הכימיקלים מסיסים ב-DMSO בריכוזים גבוהים, וספריות כימיקלים רבות ערוכות מראש עם DMSO. אנו בחנו CC-125, זן מעבדה נפוץ, במנות DMSO בטווח מ-0.25 ועד 2.5%, על מצעים נוזליים ומוצקים כדי לקבוע מנה מתאימה לסקירה (איור S1 בקובץ Additional File 1). במצעי TAP נוזליים, לריכוזי DMSO מעל 1.0% (v/v) היה אפקט שלילי, בו תאים נאספו בתחתית הצלוחיות, וריכוז של 2.5% הקטין את הגידול בצורה קיצונית. על מצעים מוצקים, DMSO הזיק לגידול בריכוז של 2.0%, שלב בו התאים הפכו נפוחים וכלורוטיים. בהתבסס על מבחנים אלה, בחרנו בריכוז של 0.5% DMSO למצעים TAP נוזליים, ו-1.0% למצעים TAP מוצקים [16,31,32].

בהמשך בחנו את הכשירות של *Chlamydomonas* באמצעות נפיצות אור (OD_{600}) ב-96 וב-386 צלוחיות כדי לקבוע את צפיפות התאים שנותנת את עקומות הגידול הכי ניתנות לשחזור ברזולוציה גבוהה עם הטווח הדינמי הגדול ביותר. נפחים מתאימים לכל סוג צלוחית נקבעו אמפירית, 200 מיקרו ליטר עבור לוח 96-צלוחיות, ו-70 מיקרו ליטר עבור לוח 384-צלוחיות. בנוסף, מזערנו את בחינות הכשירות של *Chlamydomonas* עוד יותר על ידי סקירת 9 מיקרו ליטר בלוחות 1,536-צלוחיות (איור S2 בקובץ Additional File 1).

במחקר פיילוט, סקרנו 168 מולקולות קטנות חדשות (לוחות 723N5890 ו-723N5803 מאוסף צ'מבריג' נובקור [33]) במנות בטווח של 25 עד 200 מיקרו ליטר, כדי לקבוע מנת סקירה מתאימה. כמעט כל התאים מתו בריכוזים מעל 100 מיקרו ליטר בלי קשר למבנה (לא מוצגים נתונים). בהשוואה ל-*Saccharomyces cerevisiae*, *Chlamydomonas* הינה יותר רגישה למולקולות קטנות באופן משמעותי. בחרנו מנת סקירה ראשונית של 25 מיקרו ליטר מפני שהיא הנפיקה את המאזן הטוב ביותר בין אינהיביציה ובין רעילות. מנה זו דומה לזו שבה משתמשים בסקירות של צמחי *Chlamydomonas* ודגי-זברה בסדר גודל קטן [16,24,32,34,35].

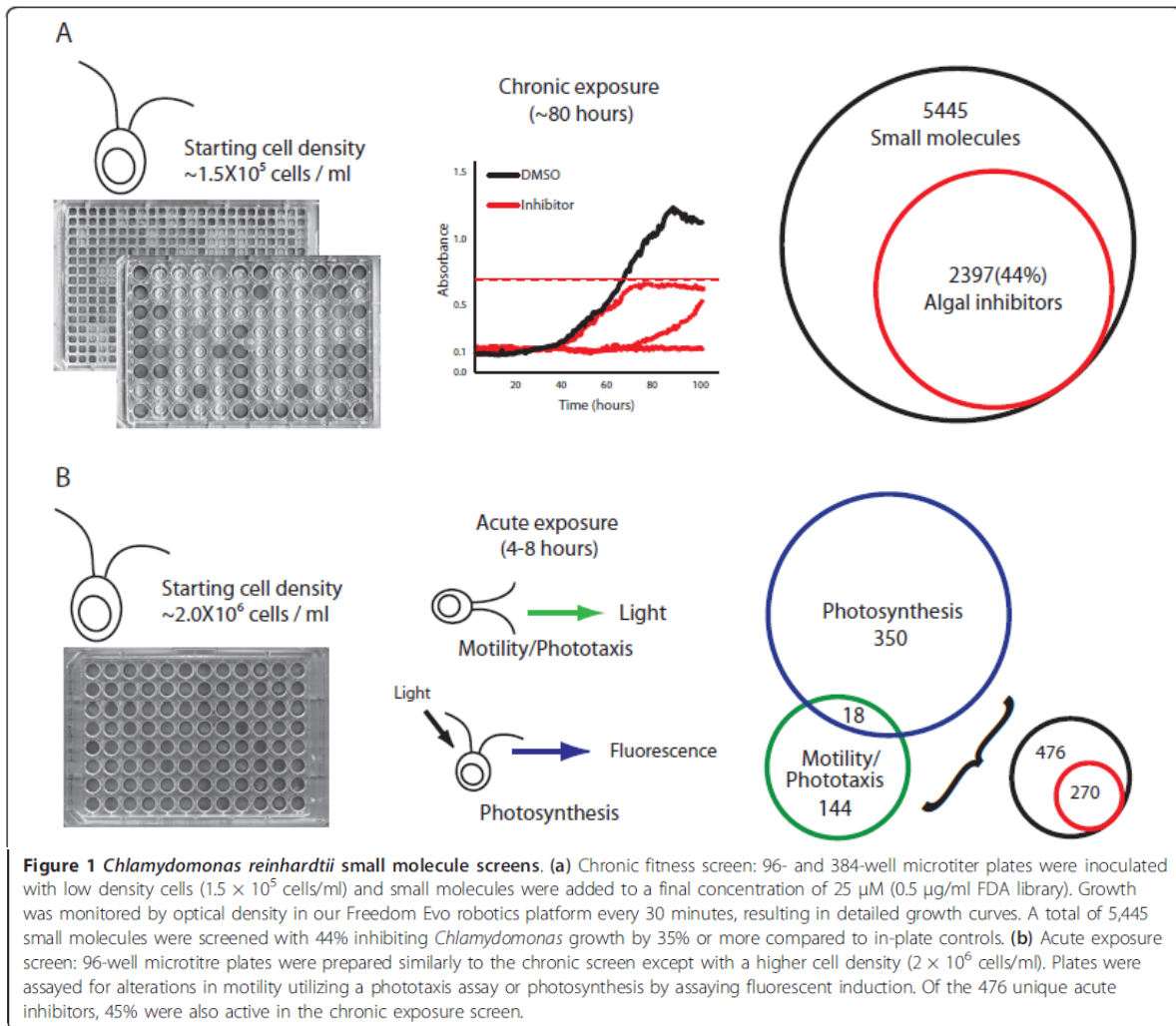
למרות שחזינו שדופן התא של *Chlamydomonas* העשירה בהידרוקסיפירוליין עשויה להוות מחסום פיזי המונע איסוף של מולקולות קטנות [36]; בהתבסס על היעילות של המבחנים שלנו ואלה בספרות, *Chlamydomonas* הינה מספיק חדירה למבנים כימיים מגוונים. כדי להעריך ישירות את החדירות של מולקולות קטנות ל-*Chlamydomonas*, כימתנו את ההצטברות התוך-תאית של כימיקלים ממקור חיצוני (אקסוגני) באמצעות כרומטוגרפית נוזלים בלחץ גבוה (HPLC). בקיצור, תאי *Chlamydomonas* טופלו במבחר מולקולות קטנות במשך 2-4 שעות, נשטפו, עברו טיפול ליזיס (lysis), והחומר ששימש לליזיס הוסר באמצעות כרומטוגרפית נוזלים בלחץ גבוה (HPLC) [37]. מצאנו שתרופות מצטברות באופן תלוי-מינון, בהתבסס על הופעת שיא בדגימות מטופלות, שנשטף בזמן דומה ועם אותן תכונות ספקטרליות כמו התרופה בחוץ (איור S3 בקובץ נוסף 1). התוצאות שלנו מצביעות על כך שספיגה וצבירה של מולקולות קטנות ב-*Chlamydomonas* הינן יותר יעילות מאשר ב-*Caenorhabditis elegans* או ב-*S. cerevisiae* [37,38].

בחנו את הגידול של זני-בר, מוטנטים חסרי תנועה, מוטנטים המציגים פוטו-טקסיס ופוטוסינתזה, בבחינת הכשירות האוטומטית שלנו כדי להשוות עקומות גידול בין הזנים השונים (טבלה S1 בקובץ נוסף 2). כל הזנים שבדקנו הראו דינמיקת גידול בת השוואה (CC-125); אולם, מוטנטים של תנועה, *bld2* (CC-478) ו-*pf14* (CC-1032), מציגים לעיתים עקומות גידול משוננות, המציעות שאי-התנועתיות שלהם גורמת לתאיהם להיאסף ו/או להיאגר בתחתית הצלוחיות, מה שעלול לגרום לקריאות דחיסות אופטית לא-יציבות מנקודת זמן אחת לבאה. כדי למזער את האפקט, הצלוחיות מנוענעות במהירות של 150 סל"ד במשך הגידול.

סקירות למולקולות קטנות ב-*Chlamydomonas*

סקרנו *C. reinhardtii* (CC-125) לרגישות לתרכובות כנגד מספר אוספי כימיקלים הזמינים מסחרית, כולל "ספריית ה-FDA", אוסף של 640 תרופות מאושרות מהשוק (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA); "Tim Tec", ספרייה של 240 מוצרים טבעיים, המורכבת מקוטלי-עשבים ומתמציות טבעיות (Tim Tec LLC, Newark, DE, USA); ו"ספריית yactives", אוסף מולקולות קטנות חדש שקיבצנו, ומתבסס על אינהיביציית גידול שמרים מאת ChemBridge (NOVACore and ChemDiv) ואוספים של (Divers) ChemDiv [38] (טבלה S2 בקובץ נוסף 2). בסך הכל סקרנו 5,445 מולקולות קטנות בשלישיות (למעט ספריית TimTec בשל כמויות מוגבלות ושתי צלוחיות NOVACore מסקירת הפיילוט). חישבנו את סטיית התקן כדי להעריך שינויים בין העתקים ופיתחנו ציון פעילות לתרכובת המבוסס על הממוצע של שלישיות הנתונים. הפעילויות קיבלו ציון בהתבסס על השטח מתחת לעקומת הגידול כנגד קבוצת ביקורת DMSO בתוך המגש. תרכובות שגרמו לשיעור גידול של 0.65 או פחות (כלומר 35% אינהיביציה), הוגדרו כאינהיביטורים לכשירות *Chlamydomonas*. לפי מדד זה, 44% (2,397) מהמולקולות הקטנות בסקירה שלנו של 5,445 השפיעו על גידול האצה (איור 1a). העשרה זו היא די גבוהה, וכנראה משקפת את כך שמרבית המולקולות נבחרו מראש בשל היותן פעילות ביולוגית. אכן, הראנו

שבהשוואה לתרכובות אקראיות הספרייה הפעילה [במקור: yactive שגיאת דפוס] מועשרת פי 3 עד 12 בהשוואה לסקירה של *Escherichia coli*, תולעים שלמות ותרבויות תאי יונקים [38].



כדי להשלים את סקירת הכשירות, ביצענו סקירת חשיפה קיצונית, כדי למדוד פנוטיפים הקשורים לאור ולתנועתיות. על ידי טיפול ב-*Chlamydomonas* במשך שעות (בניגוד לימים) ניתן לראות תוצאות מידיות של הפעילות הכימית על תאים בתוך מחזור תא יחיד. בחנו תנועתיות / פוטו-טקסיס ופוטוסינתזה כי הם פנוטיפים שנחקרו היטב והם נוחים לניתוח עוקב בהמשך (איור 1b). סקירות אלו בוצעו בדומה לסקירת הכשירות אבל עם דחיסות תאית התחלתית גבוהה יותר (2×10^6 כנגד 1.5×10^5 תאים/מיליליטר) ולמשך זמן קצר יותר (4 עד 8 שעות כנגד כ-80 שעות).

פוטו-טקסיס הוערך על ידי התגובה של *Chlamydomonas* למקור אור כיווני חזק; צולמה תמונה 3 דקות לאחר חשיפה והתגובה קיבלה ציון. בחנו יעילות פוטוסינתטית על ידי בחינת השראה פלואורסצנטית באורך-גל 685 ננומטר, הגבול העליון של פלואורסצנט ל-photosystem-II (PSII). באופן ספציפי, צלוחיות הועברו מאור נמוך לקורא-צלוחיות, נוענעו במהירות 100 סל"ד בחושך למשך 20 שניות, ואז רוגשו באמצעות אור באורך-גל 470 ננומטר, אורך גל אופטימלי עבור תפקוד פוטוסינתטי. בהליך זה, אות פלואורסצנטי גבוה יותר תואם יכולת פוטוסינתטית מוקטנת, מפני שהאור שנפלט משוחרר כאור פלואורסצנטי, ולא נקלט לשימוש בפוטוסינתזה [39].

מתוך 5,445 הכימיקלים שסקרנו במבחן הכרוני, 4,841 (88.9%) נסקרו גם במבחן החשיפה הקיצונית. בקבוצת התרכובות הזו זיהינו 144 חומרים מווסתי תנועתיות/פוטו-טקסיס וגם 350 מעכבי פוטוסינתזה, שאר בהם 18 נמצאו בשני המבחנים (איור 1b). מתוך אלה, 476 מולקולות קטנות שהיו פעילות בסקירה הקיצונית, 270 גם היו מעכבי גדילה, מה שמציע שעיכוב הגדילה הוא תוצאה של רכיבים מווסתיים המעורבים בתנועתיות/פוטו-טקסיס או בפוטוסינתזה, או לחילופין, כאפקט משני על תהליכים תאיים חיוניים. חומרים מווסתי פוטו-טקסיס הופרדו לשתי מחלקות, 106 מעכבי תנועתיות (אי תגובה למקור אור כיווני) ו-38 מווסתי סימני פוטו-טקסיס (שינוי בתגובה למקור אור כיווני). Vinpocetine, פוספודיאסטרז ומעכב ערוץ Na^+ [40,41], היו מווסת פוטו-טקסיס שהביא לתוצאות של פוטו-טקסיס חיובי במבחן שלנו (תאים שלא טופלו בחומר הציגו פוטו-טקסיס שלישי; איור S4 בקובץ נוסף 1), וייתכן שהוא מווסת פוטו-טקסיס על-ידי שינוי ריכוזי יוני Ca^{2+} ויוני Na^+ .

לאחר מבחני החשיפה הכרוני והקיצוני, ריתקנו את התאים בכל צלוחית לאגאר (TAP) agar) ללא תרכובת כדי לקבוע אילו כימיקלים תחת כל טיפול היו ציטוסידיים או ציטוסטטיים. ביצענו את מבחן הציטוסידי/ציטוסטטי עבור תאים שטופלו בסקירת הכשירות (בערך 80 שעות) ומצאנו ש-11.5% הינם ציטוסידיים ו-33.2% הינם ציטוסטטיים. ההבדל באחוזי ציטוסידי/ציטוסטטי בין המבחנים הכרוני והקיצוני מציע שמשך זמן החשיפה הוא קריטי, ושרוב המולקולות הקטנות תחת חשיפה קצרת טווח ניתנות-להיפוך. אולם, מצאנו שרק 0.9% (44/4841) מהכימיקלים הם ציטוסידיים ו-0.3% (14/4841) הם ציטוסטטיים, תחת החשיפה הקצרה של הסקירה הקיצונית (4 עד 8 שעות). התוצאות מהסקירה הקיצונית מצביעות על כך שגם אינהיביטורים של כשירות הם בעלי השפעה בניסויי החשיפה הקיצונית שלנו, ומדגימות שמבחן כשירות מזהה אינהיביטורים של תהליכים תלויי-גדילה מסוימים.

כדי לקבל תמונה של התכונות הפיזיו-כימיות שיוצרות פעילות ב-*Chlamydomonas*, קיבצנו את כל המולקולות הקטנות הפעילות לפי דמיון מבני, ומיפיו אותן לכל פנוטיפ (כשירות, תנועתיות/פוטו-טקסיס, ופוטוסינתזה) כדי להגדיר תתי-מבנים מועשרים לפעילויות מסוימת. חישבנו דמיון ECFP_4 [42] עבור כל מולקולה קטנה, כנגד כלל האוסף של 5445 המולקולות שנסקרו, ובעזרת Cytoscape [43] וגבול של 0.5 (בסולם מ-0 עד 1.0, כש-1.0 מייצג תרכובות זהות), קיבצנו והצגנו את הנתונים באמצעות טופולוגית רשת (איור 2). לאחר מכן מיפנו את הנתונים הפנוטיפיים באמצעות Cytoscape לרשת המולקולות הקטנות, כדי לזהות קבצים שמתאגדים לפי מבנה ופנוטיפ.

מספר מחלקות מבניות עיקריות של תרכובות הודגשו כדי להראות שמבנים קשורים מתקבצים סביב פנוטיפים מסוימים (איור 2 וטבלה 1). הדגשנו חמישה קבצי כימיקלים (קבוצות IV-I) על בסיס פרופיל ההתנהגות הפנוטיפית שלהם. אינהיביטורים של כשירות הינם המחלקה הגדולה ביותר של מולקולות קטנות שזוהו בסקירות שלנו. אינהיביטורים מקבוצה-I, המתאפיינים בכך שהם חולקים בנזיל-מתיל-פנילאטיל-פיפרידיניל-מתילאמין, מעכבים גדילה בדרך כלל. תרכובות מקבוצה-II המשפיעות על תנועתיות/פוטו-טקסיס, כפי הנראה מעכבות תנועתיות עקב רעילותן הגבוהה, היות ותאים במבחן הפוטו-טקסיס לא מראים תגובה למקור אור כיווני ורוב התאים האלה עברו טיפול לייס. מצאנו שאינהיביטורים פוטוסינתטיים פזורים באופן שווה על פני הרשת שלנו, מה שמצביע שמגוון רחב של מבנים כימיים יכולים להשפיע על הפוטוסינתזה. זה לא מפתיע שיש חפיפה גבוהה בין אינהיביטורים של פוטוסינתזה ואינהיביטורים של גדילה – לדוגמה, קוטלי-עשבים משפיעים על הגידול על בסיס היעילות שבה הם משפיעים על הפוטוסינתזה. קבוצה-III מהווה שילוב של שני קבצים בלתי קשורים, בתרכובות פניל-פיפרידין-אוקסזול ותרכובות בנזיל-פיפרידין, שהועשרו לעיכוב פוטוסינתזה. כדי להעריך את אופן הפעולה של אינהיביטורים פוטוסינתטיים אלה, סקרנו תת-קבוצה של 350 אינהיביטורים

פוטוסינתטיים על זן מוגדר היטב ועמיד בפני DCMU, ושיש לו מוטציית $v > 1$ בחלבון D1 במשקע 219 [44]. בהתבסס על העמידות של המוטנט לאינהיבטורים פוטוסינתטיים בלתי מאופיינים, אנו יכולים לקבל תמונה של אופן הפעולה שלהם ולתעדף אינהיבטורים פוטוסינתטיים חדשים למעקב. בין 48 אינהיבטורים פוטוסינתטיים פעילים, מצאנו 23 כימיקלים שמשפיעים על זן-פרא (CC-125) אבל לא על הזן העמיד בפני DCMU (CC-1403), עובדה שמציעה שמוטציית D1 מביאה לעמידות בפני לתרכובות באוסף שלנו של אינהיבטורים בלתי מוגדרים. מולקולות קטנות מקבוצה-IV פעילות בכל הפנוטיפים שנבחנו, מה שמצביע שתת-מבנה ביפניל-פיראזול פעיל במיוחד. בצורה מעניינת, רוב הכימיקלים המשמרים תגובת Chlamydomonas לאור נמצאים בקבוצה-IV.

מודל מבני לתרכובות Chlamydomonas ביו-אקטיביות

באמצעות ניתוח טביעות אצבע כימיות של מולקולות קטנות פעילות ובלתי-פעילות, בנינו מודל לחיזוי אינהיבטורים פעילים לאצות. מבנים כימיים של מולקולות קטנות פעילות ובלתי-פעילות נותחו באמצעות מזהה טביעות אצבע כימיות ECFP-4 [42], ובו השתמשנו לאמן מודל בייז נאיבי (naïve Bayes model) לזהות קבוצות כימיות המיוצגות יתר על המידה במחלקה הפעילה. על מנת לבחון את ביצועי המודל, אימנו אותו בעזרת ארבע חמישיות ממערך הנתונים, ואז חיזנו מולקולות פעילות בחמישית הנוותרת. תהליך זה נחר על עצמו חמש פעמים כדי להבטיח שכל חמישית מהנתונים שימשה כקבוצת השוואה. אז יצרנו מודל אחד עבור כל פנוטיפ כדי לחזות תרכובות שהיו פעילות במבחני הכשירות, תנועתיות/פוטו-טקסיס ומבנים פוטוסינתטיים. באמצעות מודלים אלה דירגנו מולקולות קטנות לפי הפעילות האצתית הצפויה והשווינו את מספר התרכובות האצתיות הפעילות שנבחנו וזוהו, כנגד קבוצה שסודרה באופן אקראי. בשיעור חזוי של 10% (בבחירת תרכובות המדורגות ב-10% העליונים, כנגד בחירה אקראית), המודלים לכשירות, לתנועתיות/פוטו-טקסיס ולפוטוסינתזה הראו העשרה של [התרכובות] הפעילות בסך $1.6x, 3.8x, 2.8x$ בהתאמה (איור 3a-c). העשרות אלה יכולות בקלות לחסוך עלויות משמעותיות בעבודה ובזמן (לדוגמה, סקירת 10% מספריה של 10k עם אחוז פגיעה של 44% מנפיק תוצאה של 440 פגיעות אקראיות, לעומת 704 פגיעות מרשימה מתועדפת עם העשרה של $1.6x$). בהמשך השתמשנו במודל לחיזוי [תרכובות] פעילות אצתיות בספריה של 50,000 מולקולות קטנות (NOVACore, ChemBridge, San Diego, CA, USA) ובחנו אמפירית 253 מהתרכובות שנחזו. המודל שלנו חזה במדויק מולקולות קטנות פעילות בספריה הבלתי סקורה, תוך העשרה של אינהיבטורים לכשירות $2.8x$ מעבר לקבוצה לא מתועדפת מאותה ספריה. זה הראה את התועלתיות של מודלי חיזוי כאלה לתיעודף של מולקולות לסקירה.

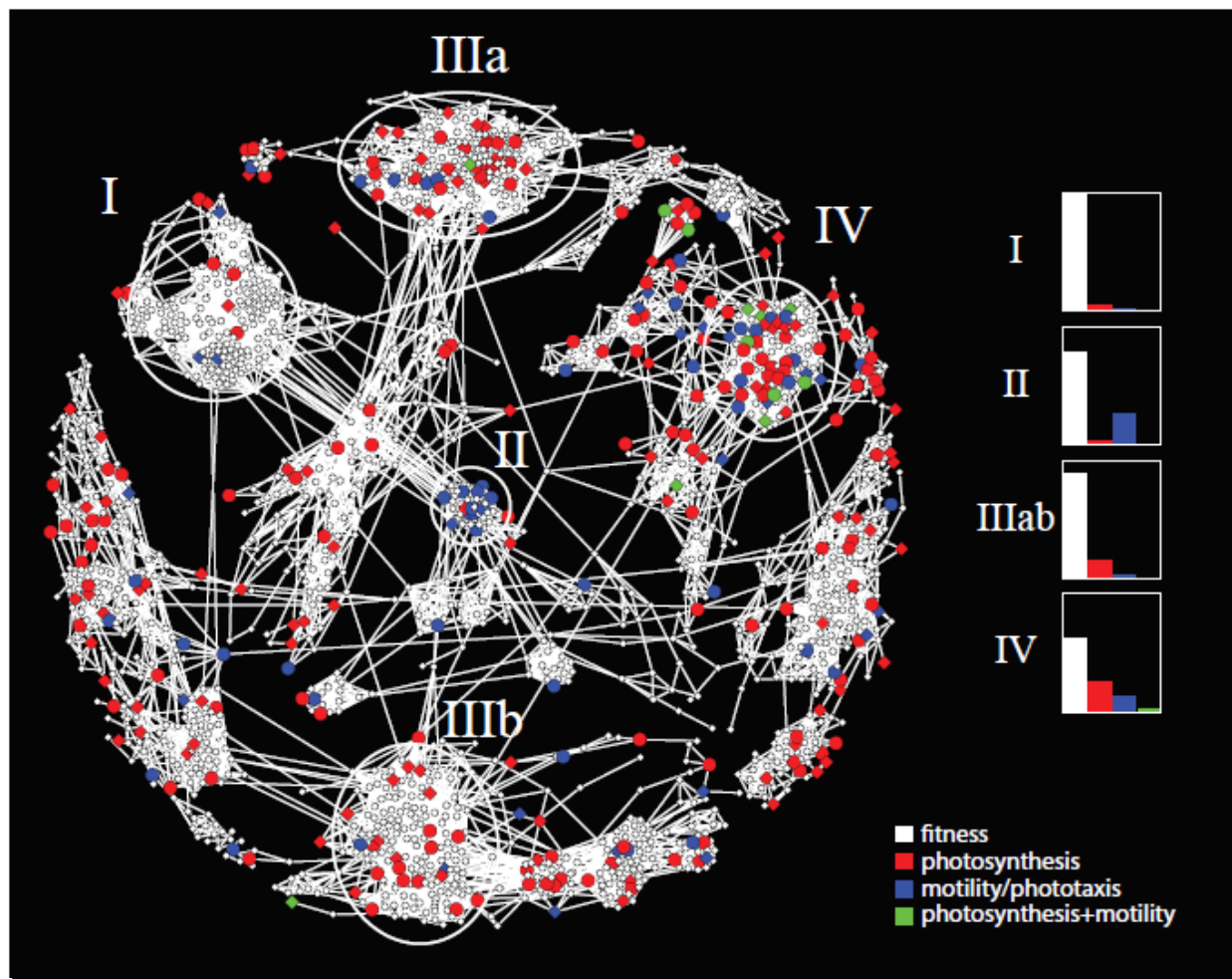


Figure 2 Network view of active molecules. All active small molecules were clustered according to their ECFP_4 chemical fingerprints. Each node represents a unique small molecule: 1,802 small molecules cluster together and are shown here. Edges represent structural relatedness at a cutoff of ECFP_4 greater than 0.5. Core structural clusters are outlined and designated groups I to IV. Acute screen data were mapped onto the active network with white fitness inhibitors, red photosynthetic inhibitors, blue motility/phototaxis modulators, and green photosynthetic and motility/phototaxis; circles indicate fitness inhibition, diamonds indicate no fitness inhibition. Bar graphs: phenotypes for each chemical group are displayed as a percentage.

Table 1 Groups I to IV core chemical structures and reported activities

Core structure group	Phenotype	PubChem bioassays (AID)	Named drugs and uses
I	Fitness	PubChem AID 317390, 317391, 317396, 317399, 317400, 5512, 52703; displaces binding of sigma receptor, binds sigma receptor, binds 5HT-2A receptor, inhibits chemokine receptor 3 (CCR3)	
II	Motility/ Phototaxis	PubChem AID31792; acetylcholinesterase inhibitor	Cyclizine, antihistamine; benethamine,
IIIa	Photosynthesis	PubChem AID1865, 2314, 2315, 2546, 504333, 493056; epigenetic regulator, shiga toxin inhibitor, inhibits retinoic acid related orphan receptor gamma, inhibits BAZ2B, increases thyrotropin releasing hormone receptor	Darglitazone, muraglitazar, peroxisome proliferation activated receptor gamma, antiglycemic; oxaprozin, NSAID
IIIb	Photosynthesis	PubChem AID894, 1529, 145655, 5512; binds 5HT-2A receptor, inhibits MEK5 kinase, inhibits 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase	Tolperisone, muscle relaxant
IV	Active in all phenotypes	PubChem AID265123, 265124, 265125, 265126, 265127; binds dopamine receptors D2, D3, D4, D1A	Fezolamine, antidepressant; lonazole, NSAID, COX2 inhibitor

[חומרים] אנטי-פסיכוטיים אנושיים משנים תנועתיות של *Chlamydomonas*

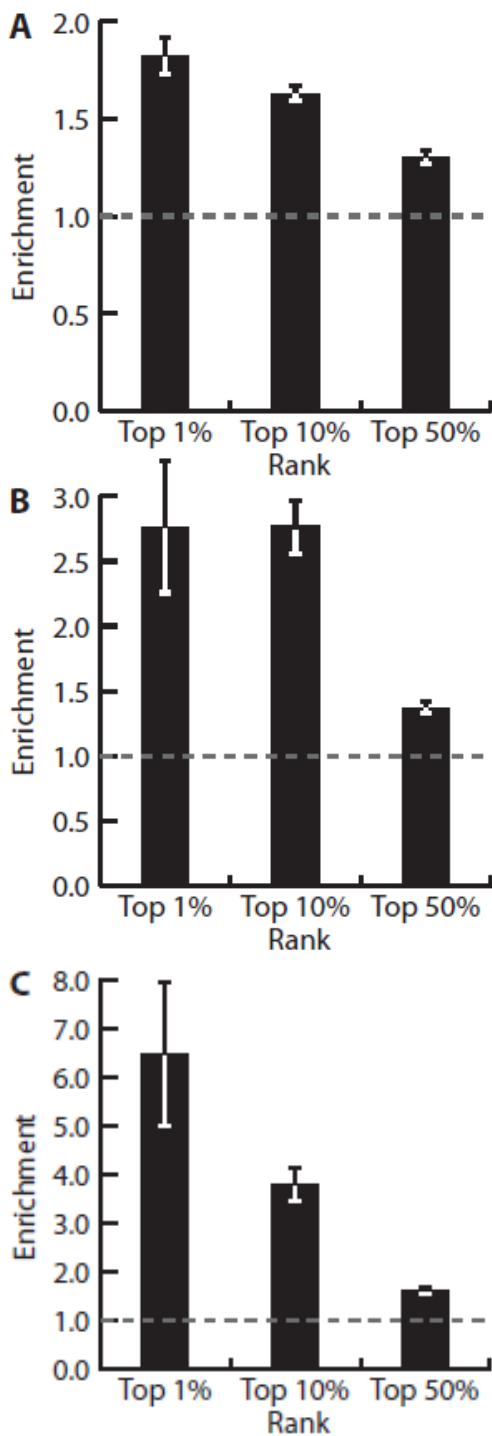


Figure 3 Naïve Bayes modeling for active small molecule prediction. (a) Fitness model. (b) Photosynthesis model. (c) Motility/phototaxis model. (a-c) The model was trained on four-fifths of the active set and tested against the remaining fifth. Assessment is repeated five times and compared to random selection of active small molecules to calculate the model enrichment factor. Error bars represent standard error of five replicates.

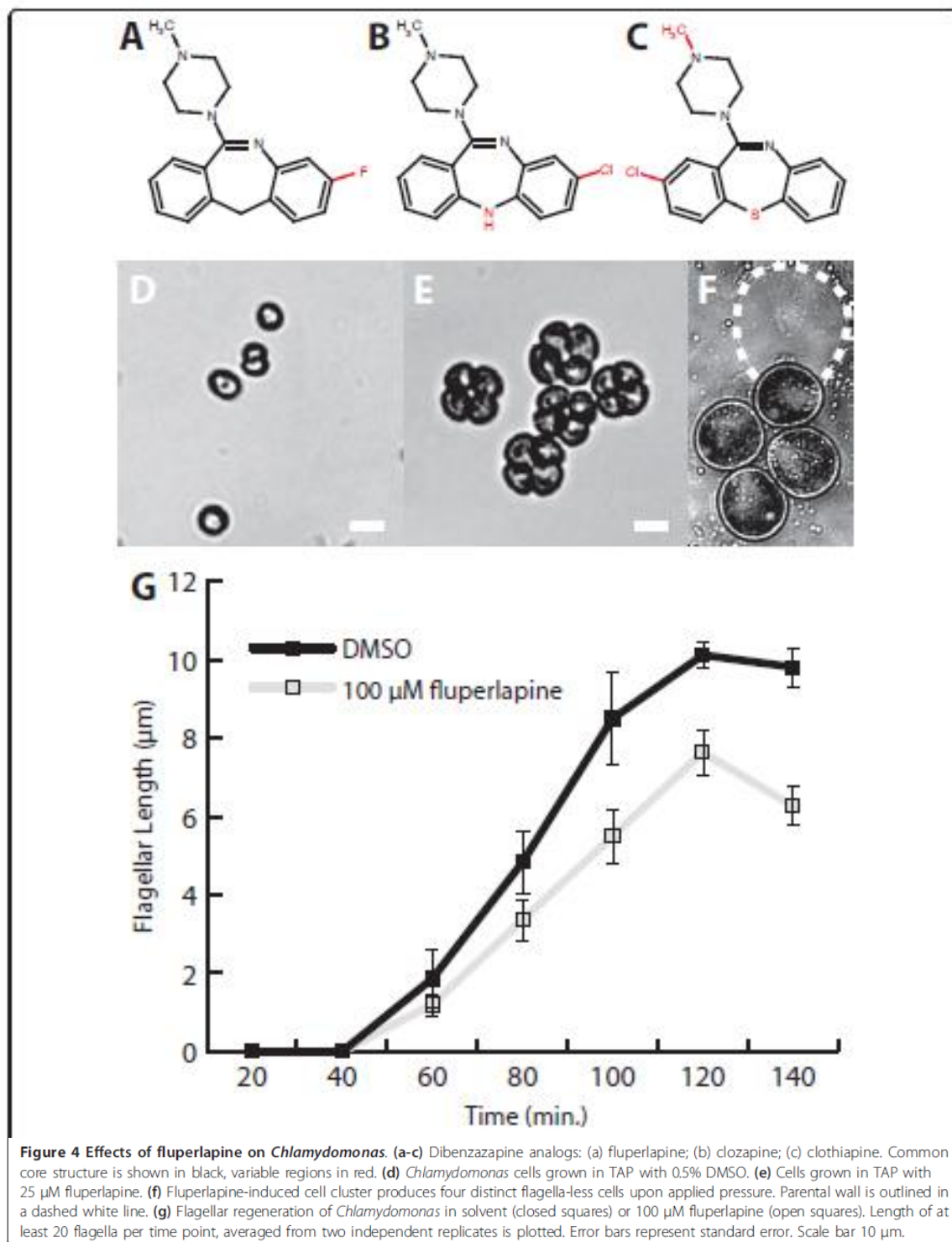
הסקירה שלנו כוללת שני אוספי מולקולות קטנות של אינהיביטורים מוכרים, ספרית FDA וספרית TimTec, מהן כ-7% (61) הן [תרכובות] אצתיות פעילות. תרכובות אלו הועשרו עבור מטרת כלורופלסט ומיטוכונדריה, ואינהיביטורים אנטי-פטרייטיים כולל ארגוסטרול, ו[חומרים] אנטי-פסיכוטיים הועשרו עבור אלה המעורבים בסימון דופמין וסרוטונין. באופן מעניין, מצאנו שלרוב הקבוצות הכימיות שלנו (איור 2) יש פעילות במבחני דופמין וסרוטונין מגוונים (טבלה 1).

כדי להיטיב ולהבין את פעילות האנטי-פסיכוטיים על *Chlamydomonas* התמקדנו בחומרים אנטי פסיכוטיים א-טיפוסיים דיבנזופינים, בשל הפעילות שלהם בסקירות שלנו, הרלוונטיות הטיפולית והזמינות של [חומרים] אנאלוגיים. במאגר הנתונים שלנו הקובץ הזה מורכב מאנלוגיות מבניות של קלחפין, כולל קלותיאפין (איור 4a-C), אינהיביטור גדילה אצתית פעיל במבחנים שלנו, ופלופרלפין שמצאנו שהוא גורם קיבוץ תאים בסקירת החשיפה הקיצונית, אך אינו משפיע על הכשירות במנות של הסקירה. מעניין שקלחפין, השונה מפלופרלפין באטום אחד, לא מציג אינהיביציית גדילה באותו ריכוז. כשטווח הריכוזים הרחב נבחן, קלחפין ו[חומרים] דומים אחרים, לוקספין, קוויטאמין, וקלותיאפין, יצרו פנוטיפי אגרסיבי כמו פלופרלפין, והיו כולם מעכבים בריכוזים גבוהים. זה מעיד על עוצמות שונות אבל אופני-פעולה דומים.

כדי לאפיין את האפקט של דיבנזופין, תאים נצפו במיקרוסקופ, לאחר שטופלו בפלופרלפין (איור 4d, e). שתי קבוצות עיקריות של תאים נצפו; תאים גדולים ושקופים (36/80) ומקבצים קטנים של (בדרך כלל) ארבעה תאים (31/80).

התאים הגדולים היו כלורוטיים עם כלורופלסטים ריקים, מה שמעיד שתאים אלה היו מתים או בתהליך מיתה. התאים במקבצים של ארבעה הראו נורמליים, אבל נותרו עטופים בדופן התא ההורה. באמצעות לחץ מכני שוחררו ארבעה תאים עם שוטונים, מה שמעיד על פגם בבקיעה (איור 4f). היות ולבקיעה צריך אנזים המפרק דופן-תא מסוג ספורנג'ין, אשר מופיע רק בשוטונים [45], תאים חסרי שוטון מתקשים לבקוע [45]. בהתחשב בדמיון הפנוטיפי בין טיפול

בפלופרלפין ובין מוטציות בשוטונים, אנו מניחים שפלופרלפין ודומיו יכולים לשנות צמיחה/התפתחות של שוטונים, כדי למנוע בקיעה.



כדי לקבוע אם פלופרלפין משפיע על גידול שוטונים, ביצענו מבחן יצירה-מחדש [regeneration] של שוטונים בנוכחות של פלפרלפין. מספר אינהיביטורים ידועים כמקצרי שוטונים, כולל IBMX, קולצ'יסין, ציטוצ'לסין D [46,47]. הסרנו את השוטונים מתאים בשיטת שוק-pH [48] ובחנו אורך שוטון כל 20-30 דקות (איור 4g) בנוכחות פלופרלפין בריכוז של 100 מיקרו-מול/ליטר [μM]. ריכוז זה גרם לתוצא נראה לעין, אך לא השפיעה על היכולת להתקיים לאחר שטיפה. לאחר כשעתיים, שוטונים נוצרו מחדש כמעט לאורך המקורי לפני הסרת השוטון

(8.97 ± 0.5 מיקרון; קדם הסרת-שוטון 10.9 ± 0.7 מיקרון) בתאים שטופלו בממס, בעוד שבתאים שטופלו בפלופרלפין שוטונים נוצרו מחדש רק לאורך של קצת מעבר שמחצית האורך המקורי (7.0 ± 0.5 מיקרון). טיפולנו גם בתאים במספר ריכוזים של פלופרלפין וקלזפין במשך 12 שעות. לתאים שטופלו בפלופרלפין (50 מיקרו-מול) היו שוטונים (7.2 ± 0.4 מיקרון), דומה לאלה שנצפו במבחן היצירה מחדש של שוטונים; אולם, תאים שטופלו בקלזפין (50 ו-100 מיקרו-מול) וריכוז גבוה של פלופרלפין (100 מיקרו-מול) היו חסרי שוטון וחסרי יכולת קיום.

דין

במחקר זה אנו מראים סקירה בתפוקה גבוהה של אצת-מודל *C. Reinhardtii* היא אמצעי אפקטיבי לזיהוי מולקולות קטנות חדשות כגושים. העבודה שלנו בנויה על מחקרים קודמים, שהתמקדו במולקולות קטנות המשמשות כקוטלי עשבים ואינהיביטורים מאופיינים היטב, ומשלבת אותם עם שיטות של תפוקה גבוהה שפותחו לבקטריות ולשמרים. לדוגמה, אינהיביטורים PSII, DMCU ואטרזין, וגם מודולטורים אחרים של פוטוסינתזה, תרמו להבנתנו את הפוטוסינתזה ואיתות [44,49]. אנטיביוטיקה הממוקדת על הכלורופלסט היתה כלי חשוב בהדגמת הורשת כלורופלסט חד-הורית [6]. מחקר על תנועתיות ועל מחזור התא הציתו עניין במספר קבוצות של תרכובות משפיעות, כולל אינהיביטורים של מיקרו-צינוריות [50,51], כשרבות מהן מבדילות בין טובולינים (tubulins) של בעלי-חיים ושל צמחים ולכן שימושיות בחקלאות [52]. מחקרי אינהיביטורים גם שפכו אור על הביולוגיה של צמיחה מחדש של שוטונים [46] וארגון מחדש של מיקרו-צינוריות [31]. חקירה כימית של פוטו-טקסיס באמצעות סקירות כימיות זיהתה מודולטורים של תנועתיות ותפיסת אור [24,53,54]. בנוסף, מחקרים על קבוצה מגוונת של מחלקות של כימיקלים, כולל חומרי-הרדמה [26,46,55,56], מעכבי פוספודיאסטרזא [23,57], תרופות המזיקות ל-DNA [58], אנטיפסיכוטיים [22], אינהיביטורים אנטי-פטרייתיים ושל העתקה [translation] [55,56,59,60], הראו את הרגישות של *Chlamydomonas* למחלקות כימיקלים ולמבנים מגוונים. לאחרונה נעשה מאמץ להשתמש ברגישות של *Chlamydomonas* למולקולות קטנות, כדי לפתח אותה כמוניטור-ביולוגי של קוטל-טפילים, קוטל-עשבים והצטברות של מתכות כבדות במערכות מים [19,61].

הסקירות שלנו הן כמותיות (מספקות עקומות גדילה ברזולוציה גבוהה עבור כל מולקולה קטנה) והן גדולות דיון כדי לזהות תרכובות פעילות, שאותן ניתן לסווג לקטגוריות פנוטיפיות. סקירות פרופיל בשילוב עם קריאות כשירות הראו יכולת חיזוי מרשימה במיזוג אינהיביטורים ידועים עם ספריות של מולקולות קטנות [28,38,62-64].

באמצעות תוצאות הסקירות שלנו, יצרנו מודל שחזה באפקטיביות את הביו-אקטיביות של תרכובות על *Chlamydomonas* ושמאפשר לדרג ולתעדף ספריות לסקירה. על ידי אימון מודל-בייזי נאיבי בעזרת נתוני טביעות אצבע כימיות מפעילויות אצתיות, יכולנו לחזות אינהיביטורים של כשירות בספרית מולקולות קטנות שלא נסקרה, וכתוצאה מכך העשרנו את החומרים הפעילים המזוהים פי 2.8x. ניתן לשפר את המודל שלנו באופן איטרטיבי [חזרתני], כשעוד נתונים הופכים זמינים לאימון [המודל] ומגדילים את דיוק החיזוי.

כל הסקירות נגישות לשאילתות נפרדות או להורדה מקובצת מאתר האינטרנט שלנו [29]. אתר זה מכיל מדדי כשירות ומדדים פנוטיפיים לכל מולקולה קטנה שנבחנה, כמו גם קישורים למספר מאגרי כימיקלים, כולל [65] PubChem, [66] ChenBank, [67] PharmGKB. כמו כן כלולים שם מספר ספריות כימיקלים שלא נסקרו עם תחזית של ציוני הפעילות שלהן על *Chlamydomonas* כמקור לסקירות נוספות.

לבסוף, זיהינו מחלקה של חומרים נירו-לפטיים, דומי קלזפין שנראה שמשפיעים על גדילת/תפקוד שוטונים ב-Chlamydomonas. בבעלי חיים תרופות אלה פועלות על קולטני סרטונין ודופמין; אולם, באצות ירוקיות אין מטרות כאלה, ולכן הנתיבים המושפעים ב-Chlamydomonas עשויים לייצג פונקציות עתיקות שהשתמרו מבחינה אבולוציונית. לדוגמה, Avasthi ושות' [22] דיווחו לאחרונה על תוצאות מסקירת תנועתיות של Chlamydomonas באמצעות הספרייה הכימית LOPAC (Library of Pharmacologically Active Compounds), שבהן הם מצאו העשרה בחומרים אנטי-פסיכוטיים עם מטרה מדווחת של קולטנים שחלבון-G צמוד אליהם, ונצפו שינויים באורך של ריסיות של יונקים. הממצאים שלנו לגבי תאים שטופלו בפלופרלפין מציעים שינויים בגידול שוטונים, על בסיס היעדרות שוטונים בתאים שגדלו כרונית, בקיעה לקויה, וירידה ביצירה-מחודשת של שוטונים.

מסקנות

עלייתה של Chlamydomonas לדרגת "צמח" מודל הופכת את התיאור שלה כשמרים ירוקים יותר מתאים עכשיו מאי פעם. הגנומיקה [genomics] של Chlamydomonas, בשילוב עם המאפיינים שהפכו אותה למערכת גנטית מצטיינת, מבטיחים יישומים מעבר לכותלי המעבדה – לדוגמה, בפיתוח דלק ביולוגי. לאחרונה תצפיות הראו ששינויים בתנאי התרבית יכולים לגרום לתאי Chlamydomonas ליצר עודפים של טריאציל-גליצרו, עד שהוא ממלא את רוב נפח התא (נסקר ב-[68]). הפלטפורמה שאנו מתארים כאן מתאימה ל: (i) סיסטמטיזציה של ניסויים לפיתוח מולקולות (ii) לחקור את המרחב הכימי והסביבתי כי לחשוף התערבויות המביאות לפנוטיפ רצוי. שילוב סקירה כזו בתפוקה גבוהה עם התערבויות גנטיות על פני הגנום של Chlamydomonas, יאפשר תובנות מחקריות חדשות להבנת ביולוגיה "לא-שמרית" – לדוגמה, סיליופתיה, פוטוסינתזה, וייצור חומר-מקדים [precursor] לדלק ביולוגי, אם למנות כמה. אכן, התפתחויות בריצוף גנטי של הדור הבא להערכת אוספי מוטנטים על פני כל הגנום (נסקר ב-[69]) הופכות את פיתוח האיסוף השיטתי של מוטציות Chlamydomonas (למשל, שימוש בטרנספוזונים עם ברקוד מחיקה מוחלטת [70,71]) לא רק לאפשרי, אלא לחיוני.

חומרים ושיטות

זנים ותנאי גידול

סקירות בוצעו באמצעות Chlamydomonas מזן CC-125 (nit1-, nit2-; מתנה ממעבדת Dutcher) גודלו במדיית TAP [72] תחת תאורה קבועה (שרשרת נורות Lumicrest, LED, טורונטו, אונטריו, קנדה). התאים לסקירה הורכבו מתרביות מקדימות, בהן 4 מ.ל. TAP הורכב מתרבית יחידה, תאים גודלו עד ל- OD₆₀₀~0.1 לכרוני, או OD₆₀₀~0.4 לסקירה הקיצונית.

מבחיני גדילה בוצעו בלוחות מיקרוטיטר של 96 ו-384 צלוחיות שקופות עם תחתית שטוחה (VWR International, מיסיסוגה, אונטריו, ארה"ב) שנאטמו באמצעות אטמי לוחות דביקים (מס' קטלוגי AB-0580) תוך שימוש בקורא מגשי טיטר שפותח במיוחד מסוג Safire2 ו-Freedom EVO (Tecan-US, דארהם, צפון קרוליינה, ארה"ב). סקירות כרוניות בוצעו בדחיסות תאים ראשונית של 1.5×10^5 תאים/מ.ל. (OD₆₀₀~0.1). ריכוז הסקירה האחרונה של 25 מיקרו-מול (10 µg/ml ספרית FDA) עם MDSO גבוה מ-0.5%, במבחיני נוזלים הביא לצמיחה לקויה (צבירי תאים; איור S1 בקובץ Additional File 1). הצלוחיות נוענעו תחת אור קבוע, עד למהירו של 150 סיבובים בדקה במשך 3-4 ימים, עם לפחות 4 DMSO לביקורת בכל לוח. גידול האצה נבחן באמצעות קורא צלוחיות Tecan Safire2 שמדד OD כל 30 דקות ב-OD600 nm. קריאות OD נרשמות כפלט

כדי לספק עקומות גידול מפורטות (OD על פני זמן) שיכולות להבחין בשנויים של אחוז אחד בגדילה. יכולנו גם להעריך כשירות בלוחות 1,536-צלוחיות כמו לעיל. צלוחיות הוכנו על ידי הרכבת 50 מיקרו ליטר של תאים עם תרופה או ממס בריכוז המתאים, חלוקת 9 מיקרו ליטר לכל צלוחית, וסחרור מטה במהירות 500 סל"ד במשך 10 ש' להסרת בועות.

סקירות קיצוניות הוכנו כדלעיל אלא שהן בוצעו רק בלוחות-מיקרו טיטר של 96-צלוחיות בדחיסות תאית ראשונית של $2/0 \times 10^6$ תאים/מ.ל. (OD $_{600}$ ~0.4) ועברו אינקובציה של 4-8 שעות. תגובת פוטו-טקסיס נבחנה על ידי הנחת לוח 96-צלוחיות תחת מקור אור עם כיוונית גבוהה למשך 3 דקות. צולמו תמונות של כל לוח והמבחן חזר על עצמו לפחות 15 דקות לאחר מכן בצד השני של הלוח, כדי להגדיל הזלוציה של הצלוחיות בצד הרחוק מהאור. הצילומים קיבלו ציון של אינהיביטורים של תנועתיות, אי-תנועה, או תנועה לכיוון האור, ההיפך מתאים שלא טופלו. יעילות פוטוסינתזה נבחנה על ידי אינדוקציה פלורסנטית בקורא הלוחות Safire2. הלוחות נשמרו באור נמוך לפני המבחן. הערכנו יעילות פוטוסינתטית על ידי ריגוש עם אור אקטיבי באורך גל 470 ננומטר ומדידת פליטת אור באורך גל 680 ננומטר, אשר בה קריאה גבוהה מעידה על פוטוסינתזה מעוכבת. כדי לקבוע רעילות תאית (ציטוסידי/ציטוסטטי) ריתקנו תאים שטופלו ל-2% אגאר בלוחות 96-צלוחיות ונתנו להם לגדול במשך 10 ימים בטמפרטורה של 24° לפני שהם עברו בדיקה וניתוח.

כימיקלים וספריות

ספריות הכימיקלים שנסקרו היו FDA BML-640 (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA), Yactives (NOVACore and DIVERSet, San Diego, CA, USA), ערכת פעילי שמרים שנסקרה מראש מ-ChemBridge (NOVACore, San Diego, CA, USA) וכך ChemDiv (Divers, San Diego, CA, USA), ושני לוחות מאגר מ-ChemBridge (TimTec NPL-280 (TimTec LLC, Newark, DE, USA). ספרית (NOVACore, San Diego, CA, USA). סופקה ב-5.0 מילי-מול ב-DMSO והיתה מתנה מאת D Desveaux (University of Toronto). הכתם של Lugol's התקבל מ-Sigma (62650-100ML-F, St Louis, MO, USA) ודולל ל-10 מיקרו-מול במים. פורמלין 10% (Polysciences, Warrington, PA, USA, 04018) דולל ל-1% במים. פלופרלפין הזומן מ-Enzo Life Sciences (BML-NS109, Farmingdale, NY, USA) ושוקע ב-DMSO לריכוז של 100 מילי-מול.

סקירת ספריות כימיקלים על C. reinhardtii

תרכובת נחשבה לפעילה על C. reinhardtii אם השטח תחת עקומת הגדילה לאחר הרוויה היה פחות מ-65% מה-DMSO לביקורת (המנה [תרכובת\ביקורת] קטנה מ-0.65). דיגול אוטומטי של חומרים פעילים אושר באמצעות בדיקה ויזואלית של הנתונים. תרכובות נוספו לתרבית באמצעות מכשיר סיכה 2 מיקרו ליטר או 600 ננו ליטר (V&P Scientific, San Diego, CA, USA) עבור לוחות 96-צלוחיות או 384-צלוחיות, בהתאמה, כדי לדלל את התרכובות פי 200 לריכוז ה-DMSO הסופי של 0.5%.

אנליזה כימו-אינפורמטית

עבור כל הכימיקלים חושבה דומות ECFP₄ באמצעות חבילת הכימו-אינפורמטיקה בתוכנת Pipeline Pilot version 6.1 (Scitegic Inc. Accelrys, San Diego, CA, USA). כימיקלים עם דומות של יותר מ-0.5 (כאשר 1.0 משמעו זהות) אוירו באמצעות Cytoscape version 2.8.2; תוצאות מסקירות פנוטיפיות התווספו כתכונות ונעשה בהן שימוש לשינוי צבע וצורה של קודקודים.

נעשה שימוש בתוכנת Marvin version 5.4.1 (ChemAxon, Budapest, Hungary) כדי לצייר ולהציג מבנים כימיים. בניית מודל בייז נאיבי התבצעה כפי שתואר [38].

יצירה מחדש של שוטונים

תאים גודלו במשך יומיים במחזור של 16-ש' אור / 8-ש' חושך עד ל- $OD_{600} \sim 0.4$. שוטונים הוסרו מהתאים בשיטת שוק pH [48] על ידי הוספת 350 מיקרו ליטר של חומצה 0.5N אצטית, הוזנה ל-40 שניות ונוטרלה עם 125 מיקרו ליטר Na_2CO_3 , לתרבית של 6 מיליליטר. הסרת השוטון אושרה על ידי תצפית על התא בהגדלה פי-40 באמצעות מיקרוסקופ DMIL אור מוחזר (Leica). תאים שהוסר מהם השוטון חולקו למבחנות בכמויות של 1.5 מיליליטר והתרופה או הממס הוסף אליהם. שוטונים נצפו כל 20-30 דקות על ידי קיבוע תאים עם פורמלין בריכוז $6.67 \times 10^{-3}\%$, ריכוז ששימר שוטונים לפרק הזמן של 20 הדקות של התצפית. שוטונים נצפו בהגדלה פי 100 באמצעות מיקרוסקופ Axiovert 200 M ועם תוכנה AxioVision שנרכשה (Carl Zeiss).

HPLC אנליזה

תרבית של 100 מ.ל. גודלה במשך 4 ימים, סוחררה מטה ושוקעה מחדש ב-20 מ.ל. TAP טרי. מנות שוות (1 מ.ל.) טופלו בתרופה או ממס במשך 3 שעות. אז התאים נשטפו שלוש פעמים עם TAP, שוקעו מחדש ב-50 מיקרו ליטר TAP, הועבר למבחנות 1.5 מ.ל. נקיות ואוחסנו בהקפאה ב: $-20^\circ C$. הדגימות נפתחו מאוחר יותר באמצעות באפר 50 מיקרו ליטר SDS-EB (2% SDS, 400 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, 40 mM NaCl, pH 8.0) ועברו אינקובציה ב- $60^\circ C$ למשך 1 שעה. דגימות הוקפאו בטמפרטורה של $-80^\circ C$ ומאוחר יותר עובדו באמצעות HPLC כמתואר [37].

חומר נוסף

[לא תורגם, עיין במקור]

קיצורים, תרומת כותבים, תודות, פרטי המחבר, הפניות

[לא תורגם, עיין במקור]