



הליזוזים: מודל לקשר בין מבנה החלבון לפעילותו

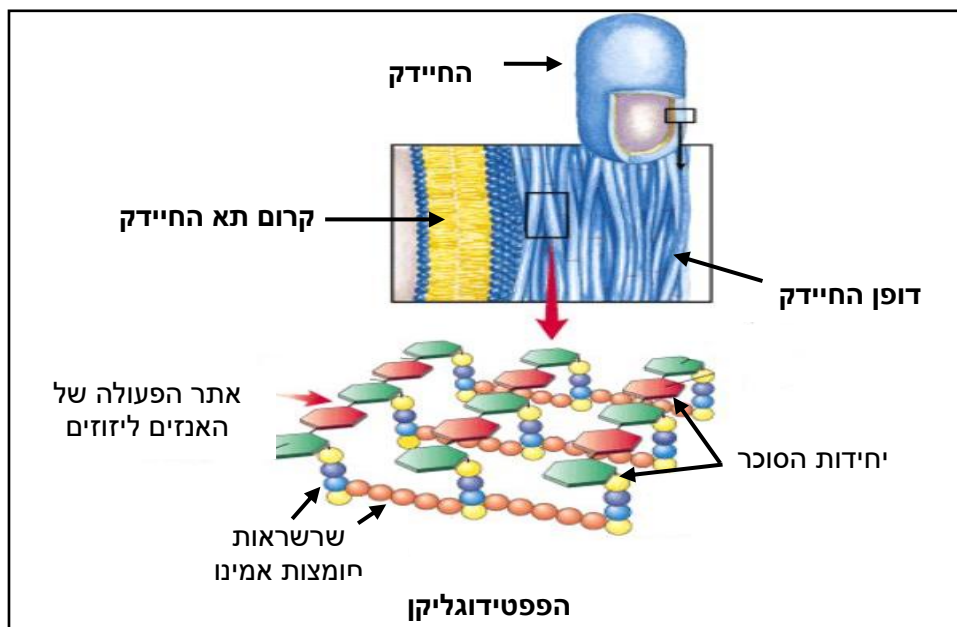
כתבו: ד"ר מיכל מנדלוביץ; ד"ר נורית דורון; ד"ר נעה עפרת

הליזוזים הוא אנזים¹ המפרק דפנות של חיידקים. במעבדה זו נבדוק את השפעתם של גורמים שונים על קצב הפעילות של הליזוזים.

דופן החיידק

למרבת החיידקים דופן המקיפה את קרום התא. דופן החיידק קובעת ושומרת על צורת החיידק ובכך מאפשרת לו להתקיים גם בסביבה היפוטונית. הדופן עשויה מחומר מיוחד הנקרא: **פפטידוגליקן**. הפפטידוגליקן הוא פולימר קשיח היוצר מבנה מרושת בעל חוזק מכני רב. יחידות המבנה הבסיסיות של הפפטידוגליקן, הן שני סוכרים ייחודיים לחיידקים הנקראים בקצרה NAG^2 ו NAM . סוכרים אלה קשורים ביניהם לסירוגין ויוצרים רשת של שרשראות ארוכות המחוברות ביניהן באמצעות שרשראות רחב קצרות של חומצות אמינו. רשת זו אחראית למבנהו הקשיח של הפפטידוגליקן.

איור מספר 1: סכמת המבנה של דופן החיידק ושל הפפטידוגליקן:



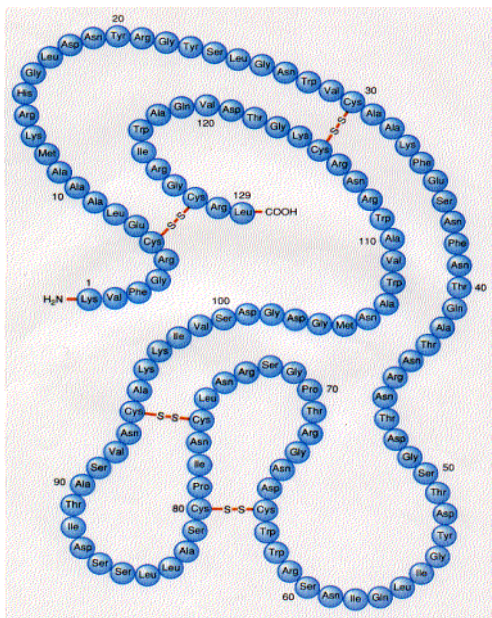
¹ חומר רקע בנושא אנזימים: גרוס, ח., עתידיה, י. (2000) "התא יחידת החיים" עמודים 39-56

² N-acetylglucosamine = NAG; N-acetylmuramic acid = NAM



האנזים ליזוזים

האנזים ליזוזים התגלה בשנת 1921 ע"י הרופא והחוקר הסקוטי אלכסנדר פלמינג. הליזוזים הוא החומר האנטי-חיידקי הראשון ממקור ביולוגי שהתגלה. האנזים מזרז את פירוק הקשר הכימי בין יחידות הסוכר (בין NAM ל NAG) של הפפטידוגליקן ע"י הידרוליזה (ראה איור מספר 1). פעולת הליזוזים גורמת לשברים בדופן החיידק ומביא לאיבוד החוזק המכאני של הדופן. חיידקים חיים בסביבות היפטוניות בדרך כלל ולכן כתוצאה מפעולת הליזוזים תא החיידק מתפוצץ בעקבות כניסת מים לתוכו באוסמוזה. (פיצוץ תא החיידק נקרא גם **ליזיס** ומכאן שם האנזים **ליזוזים** = אנזים ממיס).



הליזוזים מצוי בהפרשות כמו דמעות זיעה ורוק, בתאים לבנים וברקמות נוספות, כמו גם בחלבון ביצה, ובחלב. האנזים גורם להמסה של חיידקים ומסייע בהגנה של בע"ח מפני חיידקים. כמו כן, נמצא הליזוזים גם בצמחים (פאפאיה ופיקוס) ואף בקטריופאזים (וירוסים שתוקפים חיידקים) מכילים ליזוזים המסייע להם בחדירה אל תוך תא החיידק.

במסגרת המעבדה נשתמש באנזים שמוצה מביצה (ליזוזים C). זהו אנזים קטן, המרכיב משרשרת פוליפפטידית אחת המונה 129 חומצות אמינו. מבנהו המרחבי (שלישוני) הינו גלובולרי (כדורי) וכולל 4 גשרי גופרית (קשרי S-S או גשרים די-סולפדיים) בין שיירי חומצת האמינו ציסטאין.

איור 2: תיאור סכמתי של המבנה

המרחבי של האנזים ליזוזים.

באיור 2 ניתן לראות את רצף 129 חומצות האמינו של החלבון. כמו כן מצוינים באיור קשרי S-S בין חומצות האמינו ציסטאין.

מדידת קצב פעילות הליזוזים בתנאים שונים

במעבדה, ניתן לעקוב אחרי קצב פעולת אנזים ע"י מדידת קצב הצטברות תוצר הפעילות האנזימטית או ע"י מדידת קצב העלמות הסובסטרט (המצע).

בניסוי שלפנינו נשתמש בדפנות חיידקים מבודדות כסובסטרט של הליזוזים, ונעקוב אחרי קצב העלמות הסובסטרט.

כיצד יעשה הדבר? ערבוב דפנות חיידקים מבודדות במים יוצר תרחיף עכור. העכירות נובעת מכך שהמולקולות המרכיבות את הדופן גדולות דיין על מנת לשבור ולבלוע חלק מקרני האור המגיעות לתרחיף. בעקבות פעולת הליזוזים, נשברות הדפנות למקטעים קטנים והולכים אשר כושר בליעת האור שלהם הולך ויורד. כתוצאה מכך,



תרחיף דפנות שטופל בליזוזים הולך ומאבד מעכירותו או במילים אחרות, הולך ומצטלל. הירידה בעכירות תרחיף הדפנות מהווה לפיכך מדד לירידה בכמות הסובסטרט ומעקב אחר השינוי בעכירות כתלות בזמן מאפשר לקבוע את קצב פעילות האנזים.

את הצטללות התמיסה ניתן לראות בעין, אך על מנת למדוד אותה באופן מדויק נשתמש במעבדה במכשיר הנקרא ספקטרופוטומטר. (על השימוש בספקטרופוטומטר מפורט בנספח 2).

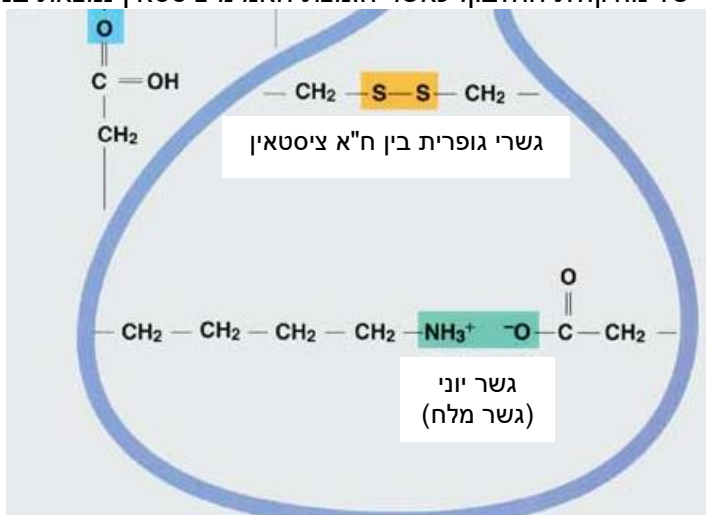
במעבדה נבדוק את השפעתם של שלושה גורמים על קצב פעילות האנזים:

א. השפעת הטמפרטורה

שינוי הטמפרטורה משפיע על קצב תנועת המולקולות ובכלל זה על קצב תנועת מולקולות האנזים ומולקולות הסובסטרט. קצב תנועת המולקולות קובע את מספר ההתנגשויות ביניהן, וקצב ההתנגשויות בין מולקולות האנזים למולקולות הסובסטרט קובע את קצב פירוק הסובסטרט (= קצב פעילות האנזים). מאידך, שינוי הטמפרטורה עשוי להשפיע על המבנה המרחבי של החלבון. כיוון שפעילות האנזים תלויה במבנה המרחבי שלו, צפוי כי לטמפרטורה תהיה השפעה ישירה על פעילות האנזים. במסגרת המעבדה, נבדוק מהו קצב פעולת האנזים בטמפרטורות הבאות: 25°C ; 37°C ; 65°C.

ב. השפעת נוכחות חומר מחזר (β-מרקפטואתנול או DTT)

בתגובות כימיות בין מולקולות שונות, כחלק מן התגובה חל מעבר אלקטרונים בין המולקולות המשתתפות בתגובה. **חומר מחזר** הוא חומר שמגיב עם חומרים אחרים ע"י כך שהוא מוסר אלקטרונים; חומר מחמצן לעומת זאת הוא חומר שמגיב עם חומרים אחרים ע"י כך שהוא מקבל אלקטרונים. גריעה או הוספה של אלקטרונים ממולקולות, משנה את המבנה שלהן. החומרים β-מרקפטואתנול ו-DTT הם חומרים מחזרים שגורמים לחיזור גשרי גופרית (קשרי S-S) בחלבון וע"י כך מביאים לניתוקם. גשרי גופרית קיימים במולקולות חלבון בין חומצות האמינו ציסטאין, והם מהווים מרכיב חשוב ביצירת המבנה המרחבי של מולקולת החלבון. כאשר חומצת האמינו ציסטאין נמצאת במצבה המחוזר



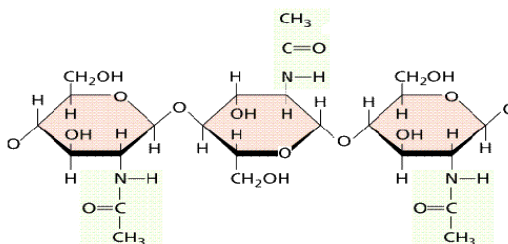


(SH) אַין קשר בינה לבין מולקולת ציסטאין נוספת. ניתוק גשרי הגופרית (קשרי S-S) בחלבון גורם איפא לשינוי במבנה המרחבי של החלבון ומכאן גם לשינוי בפעילותו.
איור 3: תיאור סכמתי של יצירת מבנה מרחבי בחלבון באמצעות קשרים שונים, וביניהם גשרי מלח וגשרי גופרית (קשרי S-S) בחלבון:

באיור 3: הקו הרצוף – הכחול- מתאר את רצף חומצות האמינו היוצרות את המבנה הראשוני של החלבון. חומצות האמינו היוצרות את המבנה המרחבי של החלבון באמצעות גשרי S-S וגשרי המלח מתוארות באופן מעט יותר מפורט.

ג. השפעת נוכחות הסוכר 3-NAG על קצב פעולת האנזים

כאמור, דפנות חיידקים בנויות משרשרות של הסוכרים NAM ו NAG. הסוכר 3-NAG הוא סוכר הבנוי משלוש יחידות של הסוכר NAG הקשורות זו לזו. סוכר זה יכול להתקשר אל האנזים ליזוזים באזור האתר הפעיל של האנזים, אך איננו מפורק ע"י האנזים. אנו נבדוק את השפעת נוכחותו על קצב פעילות האנזים. באיור הבא מתואר המבנה של הסוכר 3-NAG:



ניתוח המבנה המרחבי של האנזים והקשר בין מבנה לתיפקוד:

התיפקוד הביולוגי אותו ממלאים חלבונים קשור ישירות למבנה המרחבי שלהם, כלומר לצורת ההתקפלות המיוחדת של השרשרת הפוליפטידית במבנה השניוני והשלישוני. צורת התקפלות זו תלויה בחומצות האמינו הבונות את החלבון ובסדר הופעתן במסגרת המבנה הראשוני שלו. מזה שנים רבות מתמקד חקר החלבונים בפענוח מבנה החלבון, ובקשר בין המבנה לתיפקוד.

בניית המודל המתאר את המבנה המרחבי של הליזוזים

המבנה המרחבי של הליזוזים פוענח ב 1965 ע"י דיוויד פיליפס ועמיתיו. תהליך פענוח המבנה הוא תהליך המורכב ממספר שלבים שעל חלקם נחזור במסגרת המעבדה:



שלב ראשון והכרחי **בפענוח המבנה המרחבי** של החלבון הוא **גיבוש** החלבון בתהליך הנקרא **קריסטלוגרפיה**. בתהליך זה מתקבל גביש (קריסטל) של חלבון. הגביש הוא החלבון במצבו המוצק, והוא מאופיין במבנה תלת מימדי הבנוי ממספר רב של מולקולות חלבון המסודרות זו לצד זו, כולן באותו כיוון, במבנה שחוזר על עצמו. לתהליך הגיבוש נחוץ חלבון ברמת ניקיון גבוהה מאוד.

מהם התנאים לגיבוש החלבון במעבדה? תהליך הגיבוש יכול לחול כאשר חומר עובר בצורה איטית ממצב נוזלי בתמיסה למצב מוצק. אחת הדרכים לגרום למעבר איטי שכזה היא העלאה איטית של ריכוז תמיסת החלבון עד לנקודת הרוויה, בה חלק מהמולקולות אינו מומס יותר (המולקולות "יוצאות מהתמיסה") וחלבון מתמצק. רק כאשר התהליך נעשה באיטיות מספיקה ובתנאים הנכונים – מתקבל הגביש. גורמים היכולים להשפיע על יצירת הגביש הם מידת ניקיון החלבון, ריכוזו, סוג התמיסות בהן הוא נמצא וריכוזו, חומציות התמיסה, נוכחות יוני מתכת וגורמים רבים נוספים. חשוב לציין שלא ניתן לגבש כל חלבון. ליזוזים C מהווה 3% מכלל החלבונים בחלבון הביצה של תרנגולת, הוא חלבון יציב למדי, קל יחסית להפיק כמויות גדולות שלו, לבודדו ולנקותו. יתר על כן, בניגוד לחלבונים רבים הליזוזים הוא חלבון נח יחסית לגיבוש.

במסגרת המעבדה נבדוק את השפעת ריכוז המלח NaCl ואת השפעת החומציות על **תהליך הקריסטלוגרפיה** של הליזוזים.

השלב הבא בתהליך **פענוח המבנה המרחבי** נעשה באמצעות שיטה הנקראת **דיפרקציה של קרני X** (או: X-ray crystallography). קרני X (קרני רנטגן) הן קרניים קצרות מאוד (0.1-0.2 ננומטר) המסוגלות לחדור ו"להבחין" בין האטומים והמולקולות המרכיבים את הגביש. כאשר מקרינים גבישים של חלבון (בתנאים מאוד מיוחדים) בקרני X, עוברות הקרניים דרך הגביש. בעת מעברן של קרני ה-X בגביש הן נשברות, מוסטות ומתפזרות. פיזור הקרינה מועבר אל גלאי, ויוצר עליו מתאר שנקרא מתאר-דיפרקציה של קרני X (ראו איור בנספח 1). באמצעות מודלים מתמטיים מורכבים ניתן לפענח ממתאר הדיפרקציה את המבנה המרחבי של החלבון. תהליך הפענוח מאפשר את בניית המודל המרחבי המתאר את מבנה החלבון. מתאר הדיפרקציה מושפע מצפיפות האטומים במולקולה מכאן שהרכב וארגון האטומים בכל מולקולה הוא שיקבע את צורת שבירתן והסטתן של קרני ה-X ולכן לכל מולקולה יהיה מתאר דיפרקציה שונה ואפייני לה. חשוב לזכור שהמודל המרחבי של החלבון הוא **מודל תיאורטי** שנבנה על פי מתאר דיפרקציה ונתונים רבים נוספים לגבי מבנה החלבון.

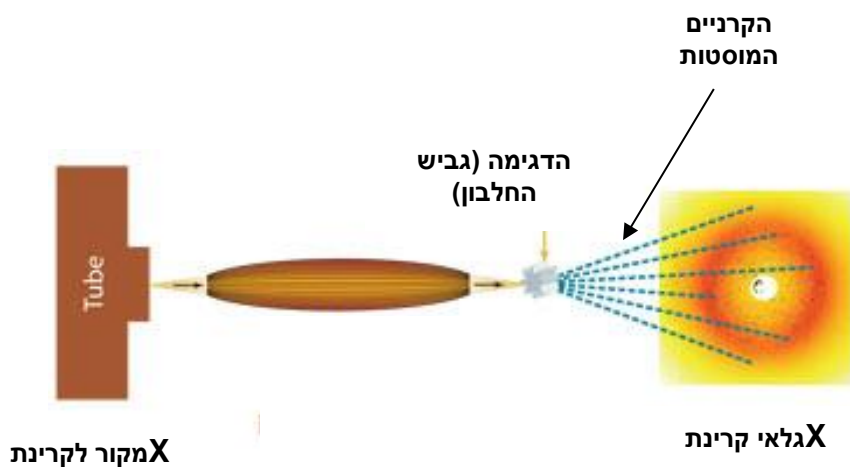
במסגרת המעבדה לא נוכל לבצע דיפרקציה של קרני X, אך במסגרת **תרגיל ממוחשב** נשתמש במאגרי מידע ברשת האינטרנט בהם קיימים **מודלים מפוענחים** של הליזוזים. נשתמש במודלים על מנת **לנתח את מבנה האנזים**, את מבנה האתר הפעיל בו ועל מנת להשוות בין המבנה המרחבי של מולקולות ליזוזים מבעלי חיים שונים: ליזוזים מתרנגולת (ליזוזים C) לעומת ליזוזים מאוזז (ליזוזים G).

לסיכום, נוכל לבסס את התוצאות שהתקבלו בחלק המעשי של המעבדה, על המודלים המתארים את המבנה המרחבי של החלבון, על מבנה ומיקום האתר הפעיל שלו ואף נוכל להשוות בין סוגי ליזוזים מאורגניזמים שונים.

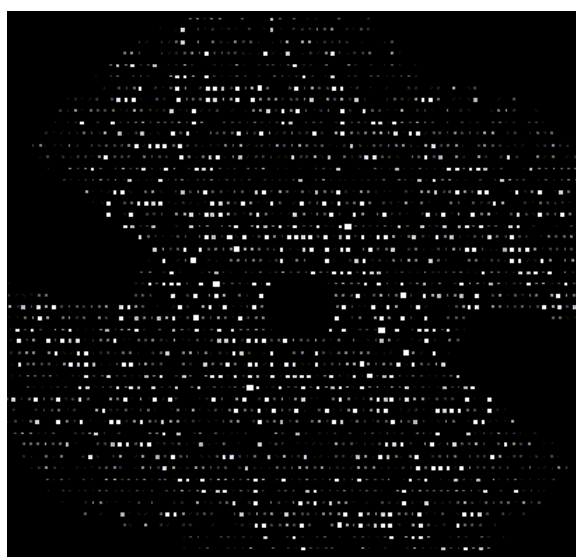


נספח 1: מבנה סכמתי של מכשיר לדפרקציה של קרני X

המכשיר בו מבצעים את תהליך הדיפרקציה, בנוי כך שיש בו מקור לקרני X, הקרניים עוברות דרך גביש החלבון ויוצאות אל גלאי הנמצא מעבר לו כפי שמתואר באיור הבא:



מתאר דיפרקציה: כל נקודה נוצרה ע"י הקרניים לאחר שעברו דרך החלבון.





נספח 2: הספקטרופוטומטר

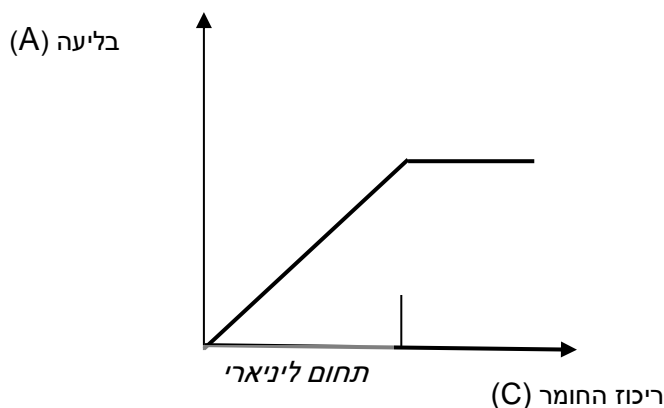
הספקטרופוטומטר הוא מכשיר המודד את אחוז ההעברה ואחוז הבליעה של קרינה אלקטרומגנטית.

כאשר מעבירים קרן אור (= קרינה אלקטרומגנטית) דרך תמיסה של חומר, חלק מהאור עובר דרך התמיסה, חלק נבלע בתמיסה וחלק מוחזר מהתמיסה. ככל שתמיסה מרוכזת יותר, כמות האור המועברת קטנה יותר וכמות האור הנבלעת גדולה יותר.

על פי חוק בר-למברט קיים יחס ישר בין ריכוז התמיסה C (=Concentration) לבין עוצמת הבליעה של הקרינה A (=Absorbance). כלומר שישנו יחס קבוע בין A ל-C בתמיסה נתונה.

חוק זה נכון רק לאורך הגל שבו הבליעה ע"י התמיסה היא מקסימלית כיון שרק אז קיימת האינטראקציה הטובה ביותר בין החומר לבין האור. לכל תמיסה בליעה מרבית באורך גל שונה. מדידת שיעור בליעת האור ע"י תמיסה כלשהי תעשה באורך הגל שבו הבליעה של התמיסה היא מרבית. בספקטרופוטומטר ישנו מקור אור מונוכרומטי כלומר קרן אור בעלת אורך גל אחד, שניתן לשינוי. לקבלת אורך הגל הרצוי במכשיר ניתן לכוונו בהתאם לצורך.

חוק בר-למברט מתקיים בתחום הריכוזים שבו יש יחס ישר בין עוצמת הבליעה לבין ריכוז החומר בתמיסה. בריכוזים גבוהים מאוד של חומר אין יחס ישר בין ריכוז החומר לבליעה. (מעבר לריכוז מסוים, העלאה נוספת של ריכוז החומר לא תביא לשינוי בשיעור הבליעה). תלות עצמת הבליעה בריכוז החומר נראית בגרף הבא:



ספקטרופוטומטריה הנה שיטה אנליטית למדידת ריכוזים נמוכים של חומרים שונים באמצעות מדידת שיעור הבליעה של תמיסות שונות המכילות חומרים אלה. ניתן לגלות בעזרתה ריכוזי חומר של עד 10^{-9} גרם בליטר תמיסה (= 0.000000001 גרם/לליטר!).

בבדיקות פעילות אנזימים, מודדים את קצב התגובה ע"י מדידת השינוי בבליעה כתלות בזמן. דפנות חיידקים יוצרות עכירות בתמיסה. כאשר הליזוזים פועל לפירוק דפנות תאים יש ירידה בעכירות התמיסה. קצב פעילות האנזים נקבע ע"י מדידת השיפוע של הקטע הליניארי של שינוי הבליעה (משתמשים בערך המוחלט).