

סינתזה כימית של חלבונים מורכבים למטרות מחקר ביולוגי



מאת פרופ' אשרף בריק

הדנ"א מורכב משרשראות ארוכות מאוד של חומרים אורגניים שנקראים נוקלאוטידים, והוא דחוס בגרעין של כל תא ממיליארדי התאים שמרכיבים את גופנו. כל שרשרת כזאת מחולקת למקטעים קטנים שנקראים גנים, כאשר כמעט כל גן מקודד בתוכו מבנה של מולקולה ייחודית וגדולה הנקראת חלבון. הדנ"א של גן ספציפי משועתק קודם לחומר תורשתי אחר שנקרא רנ"א (RNA) (חומצה ריבונוקליאית; Ribonucleic Acid), אשר מתורגם באמצעות מכונה מולקולרית הידועה בשם "ריבוזום" לחלבון ספציפי בעל תפקיד ייחודי בתא. תהליך זה, הנקרא תרגום, הוא מרשים ביותר והוא מונח בבסיסם של כל היצורים החיים.

המבנה הכימי של החלבונים ייחודי מאוד. כפי שהוזכר, כל אחד מהם נבנה בתא לפי הצופן הנמצא בחומר הגנטי, או ליתר דיוק, בגן שמקודד את רצף החומצות האמיניות המרכיבות אותו.

הגוף שלנו, כמו גם הצמחים, בעלי החיים וכל מה שסביבנו בנוי מחומרים שונים בעלי תרכובת כימית ייחודית. חומרים אלה נוצרים מאטומים שמגיבים ונקשרים ביניהם על פי חוקי הכימיה, המקנים להם תכונות גלויות ונסתרות. יש לציין שחומרים אלה פועלים בגופנו בסנכרון אלה עם אלה ובאיזון מושלם, ושיבוש בתפקודם עלול להוביל למחלות, אפילו קטלניות. מה שמדהים הוא שהטבע משתמש במספר מועט של יסודות כדי ליצור את רוב הדברים שסביבנו. כך למשל יותר מ-99% ממסת הגוף שלנו בנויים בעיקר משישה יסודות: חמצן, מימן, פחמן, חנקן, סידן וזרחן, אשר מגיבים בינם לבין עצמם ומייצרים את כל מה שאנחנו צריכים כדי להיות מי שאנחנו. דוגמה לחומר כזה הוא החומר הגנטי הידוע בשמו הנפוץ דנ"א (DNA) (חומצה דאוקסיריבונוקלאית; Deoxyribonucleic Acid), המצוי בגרעין התא ונחשב לחומר המרכזי בכל היצורים אשר מקודד בתוכו את כל המידע התורשתי.

המחקר שלי מתמקד בחקירת חלבונים שעברו שינויים לאחר התרגום ובהשפעתם של שינויים אלו על מגוון תכונות של החלבונים, החל ממעורבותם בתהליכים ביולוגיים שונים וכלה במחלות שונות. יש לציין ששינויים אלה הם למעשה מודיפיקציות כימיות שמתרחשות בעזרת אנזימים שונים בשיירים הצדדיים של חומצות האמינו. שינויים אלה גורמים לשינוי בתכונות הפיזיקליות של החלבון, כמו מסיסות, מטען וגודל, ובכך משנים את תכונותיו הפונקציונליות, כמו מיקומו בתא, האינטראקציה שלו עם סביבתו וגם את גורלו הסופי ופירוקו לאבני הבניין היסודיות. היום ידועים לנו אלפי אנזימים ממשפחות שונות שמעורבים בהוספה של קבוצות כימיות ובהסרתן בעת הצורך. קבוצות אלו יכולות להיות קטנות בהרכבן, כמו קבוצת מתיל שבנויה מפחמן ומשלושה אטומי מימן, או מחלבון שלם כמו אוביקוויטין, המורכב משבעים ושש חומצות אמינו המכילות 1,231 אטומים ($C_{378}H_{629}N_{105}O_{118}S_1$). תהליכים אלו מסונכרנים אלה עם אלה בהתרחשותם, וכל חוסר איזון בהם יכול להוביל לשיבושים ואף למחלות שונות. אין פלא שהרבה מהתרופות המצילות חיים פועלות על אנזימים אלו כדי לתקן כל תקלה בתפקודם.

השאלות הרבות בנוגע להשפעת השינויים לאחר תרגום על תפקודם של חלבונים שונים מונחות בבסיס המדע. תחום זה נחקר ברובו הגדול בידי ביולוגים באקדמיה ובתעשייה, ואכן התקדמות רבה הושגה בו עד היום, והיא השפיעה רבות על חיינו. עם זאת שאלות רבות עדיין נותרו פתוחות בגלל קשיים בהפקת חלבונים שעברו שינויים לאחר התרגום שיאפשרו חקירה מעמיקה יותר. קשיים אלה נובעים מכמה סיבות עיקריות: הקושי בזיהוי האנזים הגורם לשינוי והאתגרים שיכולים להיות בהפקתו; האנזימים מחוץ לתא יכולים לאבד את הסלקטיביות שלהם; האתגר להפיק כמות מספיקה מהחלבון לניסויים המתוכננים. ◀

התא משתמש לרוב בעשרים חומצות אמינו, שהריבזום קושר אותן בקשר כימי מיוחד הנקרא קשר פפטידי, החוזר על עצמו בין כל חומצה אמינית אחת לאחרת. עם תום בניית השרשרת היא מתחילה להתקפל במהירות על עצמה לפי הרכב חומצות האמינו ולובשת צורה מרחבית מרהיבה שקובעת את הפעילות הביולוגית של אותו החלבון. חשוב לציין שהחלבונים הם "סוסי העבודה" של רוב התהליכים המתרחשים בכל רגע נתון בגופם של כל היצורים החיים. כך למשל חלבון ההמוגלובין אחראי להעברת החמצן בגוף בתהליך הנשימה, חלבון האינסולין אחראי לוויסות רמות הסוכר בדם, ולחלבון האופסין, שממוקם ברשתית העין, תפקיד חשוב בתהליך הראייה. למשפחת החלבונים שייכים גם הנוגדנים שמגינים עלינו מפני פולשים זרים והאנזימים שמזרזים את התהליכים הכימיים. למעשה, יש אין-ספור תהליכים שמתרחשים בעודכם קוראים שורות אלה, ובכולם מעורבים חלבונים.

אחת ההפתעות של המיזם למיפוי הגנום האנושי ולריצופו, שתוצאותיו הראשונות התפרסמו בשנת 2000, והוא הושלם במרץ 2022, הייתה מספר הגנים שמוערך בכ-22,000. זהו מספר קטן יחסית ליצור מתוחכם כמו האדם לעומת יצורים אחרים, מתוחכמים הרבה פחות, אשר בהם התגלה מספר גנים דומה או אפילו גדול יותר(!) יש לציין שהיום אנו מבינים שהגורם להיותם של בני אדם מתוחכמים יותר מיצורים אחרים אינו נוגע למספר הגנים אלא לתהליכים ייחודיים, כמו מנגנוני בקרה של גנים, הדנ"א הלא מקודד והשינויים שחלים בחלבונים לאחר תרגום, שמגדילים את מספר החלבונים למספר גדול בהרבה מזה שהיה אמור להיות מהגנים הקיימים. כמובן, לתחכום שלנו יש גם סיבות אחרות, כמו השפה, הקשרים החברתיים וההתפתחות התרבותית.

נוסף על ההבנה העמוקה של המבנה הבסיסי של המקרומולקולות הבסיסיות (דנ"א, רנ"א, חלבונים וסוכרים) שקובע את פעילותם. נושא שריתק אותי במיוחד הוא סינתזה כימית של חלבונים מורכבים ככל האפשר ובמיוחד אלו שעוברים שינוי לאחר תרגום לצורכי מחקרים ביולוגיים. במשך חמש-עשרה השנים האחרונות הכנו במעבדתי עשרות חלבונים, אשר חלקם הגדול קשה מאוד, ואף בלתי אפשרי, להכנה בדרכים אחרות. חלבונים אלו עזרו לנו לשפוך אור על תהליכים ביולוגיים רבים. אנסה להדגים זאת בכמה דוגמאות, אך קודם אסביר בקצרה את תחום הסינתזה הכימית של חלבונים.

כפי שציניתי קודם, לכל חלבון יש רצף של חומצות אמינו הבונה את השרשרת הפוליפפטידית באורך ספציפי. על כן סינתזה כימית של חלבון דורשת את יצירת הרצף הפפטידי בצורתו המדויקת. כבר בתחילת המאה הקודמת חקרו מדענים רבים שיטות כימיות להכנת פפטידים, ונשאו הצלחות מסוימות, כמו למשל הכנת הורמון האהבה, הידוע בשמו המדעי אוקסיטוצין, בידי המדען וינסנט דו ויניו (Vincent du Vigneaud), אשר זכה בפרס נובל לכימיה ב-1953 על תרומתו זו. המהפכה בסינתזה כימית של פפטידים החלה ב-1963 בידי רוברט ברוס מריפילד (Robert Bruce Merrifield), אשר פיתח שיטה מיוחדת שנקראת "סינתזה של פפטידים על מצע מוצק". שיטה זו מאפשרת חיבור זמני של החומצה האמינית הראשונה למצע מוצק, דבר שמאפשר חיבור של שאר החומצות בזו אחר זו באמצעות יצירת קשר פפטידי חדש בכל פעם, עד סיום בניית השרשרת. בסוף הסינתזה מבצעים ביקוע של השרשרת הפפטידית מהמצע תוך כדי הורדת קבוצות ההגנה מהשיירים הצדדיים של חומצות האמינו וניקוי סופי של התוצר הרצוי. היתרון של השיטה נובע מאלה: 1. במהלך כל הסינתזה, אחרי כל צימוד של חומצה לשרשרת שקשורה

על כן יש צורך רב בקבלת חלבונים שעברו מודיפיקציה ספציפית בצורה נקייה, הומוגנית ובכמויות מספקות לצורכי מחקר. לכאן בדיוק נכנס כוחה של הכימיה, המתייחסת לחלבון כאל מולקולה כימית, אומנם גדולה, אך כזו שאפשר להכין אותה מאבני הבניין העיקריות למרות האתגר הייחודי, ובכך להתגבר על הבעייתיות ביישום שיטות של ביולוגיה מולקולרית.

כל לימודי האקדמיים היו בתחום הכימיה. תואר המגיסטר היה בהנחייתו של ד"ר ניזאר חדאד, לשעבר חבר סגל בפקולטה לכימיה בטכניון – מכון טכנולוגי לישראל, ובו התנסיתי באומנות הסינתזה הכימית של חומרי טבע, שהם מולקולות קטנות יחסית, אך מורכבות מאוד מבחינה כימית ומרחבית. הדוקטורט היה בהנחייתם המשותפת של פרופ' אהוד קינן מהטכניון ופרופ' פיליפ דוסון (Philip E. Dawson) ממכון סקריפס בסן דייגו שבארצות הברית. בתקופה זו התנסיתי באומנות הסינתזה הכימית של חלבונים כדי להכין אנזימים מלאכותיים. תקופת הבת-דוקטורט אף היא הייתה במכון סקריפס, בהנחייתו של פרופ' צ'יהוי וונג (Chi-Huey Wong), ובה רכשתי ניסיון בסינתזה כימית של חלבונים שעברו מודיפיקציה עם סוכרים, נוסף על הניסיון ועל הידע בפיתוח מעכבים לאנזימים שונים. אין ספק שתקופות אלו חשפו אותי למדע הרבת-חומי של העולם הגדול, ורכשתי ניסיון רב וידע רחב ומגוון. בעיקר הפנמתי עד כמה חשוב להסיר כל חשש מחקר תחומים חדשים, בעלי עניין רב ומאתגרים במיוחד.

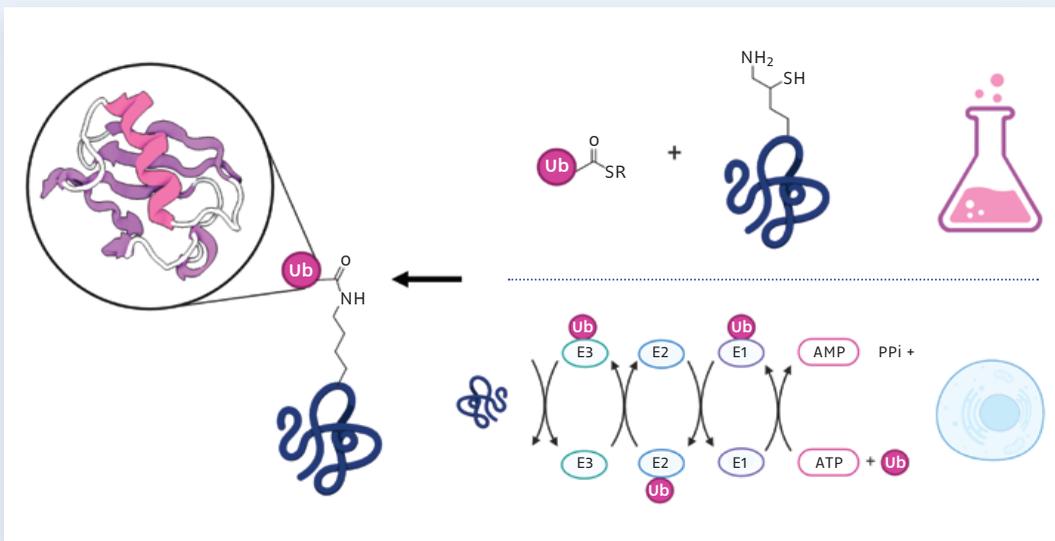
מאז התחלתי את הקריירה האקדמית באוניברסיטת בן-גוריון בנגב, ב-2007, כחבר סגל צעיר, ועד לרגע זה בטכניון, עניין אותי מאוד החיבור בין כימיה לביולוגיה. הבנתי מהר מאוד את הכוח העצום שיש לנו ככימאים, עם הכלים המיוחדים שברשותנו, לתרום להבנה של תהליכים ביולוגיים,

כמו שכבר הזכרתי, המחקר בקבוצתי מתרכז בפיתוח שיטות כימיות-ביולוגיות להבנת ההשפעה של שינויים לאחר תרגום על חלבונים. אחת השאלות שמעסיקות אותי ושמלהיבה אותי במיוחד היא כיצד הוספת חלבון האוביקוויטין, או שרשרת שבנויה מכמה יחידות של האוביקוויטין, לאחד משיירי חומצות האמינו של חלבון מטרה, בתהליך שידוע בשם אוביקוויטינציה, משפיעה עליו ברמה המולקולרית. אוביקוויטינציה היא אחד השינויים החשובים ביותר לאחר התרגום, והיא מעורבת בהרבה תהליכים ביולוגיים, והנפוץ שבהם הוא פירוק חלבונים בעזרת המכונה המולקולרית הנקראת "פרוטאזום". התגלית הזאת העניקה לאברהם הרשקו ולאהרן צ'חנובר מהטכניון – מכון טכנולוגי לישראל ולאירוויין רוז (Irwin Rose) מאוניברסיטת קליפורניה באירוויין שבארצות הברית, פרס נובל לכימיה בשנת 2004.

אוביקוויטינציה (איור 1) נחשבת לא רק לאחד השינויים החשובים ביותר לאחר התרגום, אלא גם למורכבת ביותר, מהרבה סיבות: 1. להבדיל משינויים אחרים שחלים בעזרת אנזים אחד, אוביקוויטינציה דורשת שלושה אנזימים (E1-E3) וחלבוני עזר כדי להוסיף את חלבון האוביקוויטין לחלבון המטרה והם ספציפיים לסוג השרשרת ולחלבון המטרה. כיום ידוע לנו על שני E1, כ-40 E2 ויותר מ-600 E3; 2. התהליך צורך אנרגייה (אדנוזין טרי-פוספט, תרכובת אורגנית המאפשרת בין היתר אגירת אנרגייה בתא) להפעלת חלבון האוביקוויטין בעזרת האנזים E1 והעברתו לאנזים השני E2; 3. האוביקוויטין נצמד בקשר פפטידי (איזופפטידי), לרוב, לקבוצת האמינו של השייר הצדדי של החומצה האמינית ליזין, אך יש מקרים שבהם הוא נצמד לשיירים הצדדיים של החומצות האמיניות סרין, תראונין וציסטאין בקשר אסטרי, או לקבוצה האמינית הטרמינלית של חלבון המטרה בקשר אמיד; 4. האוביקוויטין נצמד לחלבון המטרה כמונומר או כשרשרת אשר

למצע, נדרשת רק שטיפת המצע המוצק מעודף ריאגנטים; 2. בגלל הפשטות היחסית של התהליך ובגלל המחזוריות של השלבים הסינתטיים מתאפשרים אוטומטיזציה של התהליך והשימוש במכשיר מיוחד שמבצע את כל תהליך בניית השרשרת ללא מעורבות יתר של החוקר. בזכות התגלית הזאת זכה מריפילד בפרס נובל לכימיה בשנת 1984.

מאז דווחה, אפשרה סינתזה של פפטידים על מצע מוצק הכנת מיליוני פפטידים המשמשים מדענים בתחומים רבים, מהנדסת חומרים חדשים ועד תרופות מצילות חיים. אחת המגבלות של השיטה היא אורכה של השרשרת שאפשר להכין בשיטה זו, לרוב, השיטה מוגבלת לפפטידים באורך של 30-50 חומצות אמינו, ואילו אורכן של שרשראות פוליפפטידות שמהן בנויים חלבונים הוא לרוב מאות ואף אלפי חומצות אמינו. גם אם נתרזו בחלבונים שאורכם הוא 200-400 חומצות אמינו, ולא מעט חלבונים מצויים בטווח אורכים אלו, הרי ברור שצריך שיטה אחרת שתתגבר על המגבלה של סינתזה של פפטידים על מצע מוצק. פריצת הדרך הייתה בשנת 1994. פורצי הדרך הם סטיבן קנט (Stephen Kent) ופיליפ דוסון. הם הציגו שיטה מהפכנית המאפשרת חיבור יעיל בין פפטידים ליצירת שרשראות ארוכות יותר – בתמיסה מימית. כך, אפשר להכין חלבון המורכב למשל מ-200 חומצות אמינו, מ-4-5 פרזמנטים, והחיבור ביניהם נעשה באמצעות תגובת צימוד שידועה היום בשם "ליגציה כימית טבעית". השיטה אפשרה הכנה של יותר מאלף חלבונים למטרות של מחקר בסיסי ואפילו לטיפולים רפואיים. שלוש שנים לאחר התגלית התמזל מזלי להימנות עם עובדי המעבדה החדשה של פיליפ דוסון במכון סקריפס וללמוד את סודות הכימיה הנפלאה שעד היום משפיעה על המחקר שלי.



איור 1. תהליך האוביקוויטינציה כפי שנועשה בשיטה הכימית במעבדה לעומת התהליך שמתרחש בתא החי

שרשרת מסוג ליזין 6

שרשרת מסוג ליזין 11

שרשרת מסוג ליזין 48

שרשרת מסוג ליזין 63

שרשרת מסוג ליזין 29

שרשרת מסוג ליזין 33

$$Ub-SR + Ub-SH \rightarrow Ub-NH-C(=O)-K-Ub$$

 K=Lys 63, 48, 29, 27, 33, 11, 6

איור 2. סיתתזה כימית של שרשראות האוביקוויטין השונות

בשנת 2009 פיתחנו שיטה כימית המאפשרת לחקות את תהליך האוביקוויטינציה ללא צורך באנזימים (E1-E3). השיטה מבוססת על הכנת חומצה אמינית (תיו-ליזין). כשמכניסים את החומצה הזאת לפפטיד או לחלבון באתר ספציפי בשיטות שהזכרתי לעיל להכנת חלבונים בצורה כימית (איור 1), היא מגיבה ספציפית עם אוביקוויטין מופעל, שאף אותו מכינים בצורה כימית, ליצירת הקשר האיזופפטידי על השייר הצדדי של ליזין.

מאז הפיתוח הזה הכנו במעבדתי מגוון רחב של מצומדי אוביקוויטין למחקרים שונים, כמו שרשראות אוביקוויטין באורכים שונים (2-4) ומסוגים שונים (איור 2), בצורתם החופשית או מצומדים לפפטידים או לחלבונים שונים. חלק ממצומדי האוביקוויטין האלו הוכנו בצורתם המסומנת גם למטרות אחרות, לדוגמה: סימונים איזוטופיים שאפשרו לחקור את המבנה שלהם בעזרת תהודה מגנטית גרעינית (Nuclear Magnetic Resonance, NMR). בחלק הבא אדגים שימושים אלו בפירוט רב יותר, מבלי לפרט על הפיתוחים הכימיים שליוו אותנו כדי לאפשר את הסינתזה המורכבת של חלבונים מצומדי האוביקוויטין, שחלקם שברו שיאים עולמיים מבחינת מורכבותם וגודלם.

אחד החלבונים הראשונים המצומד לאוביקוויטין שהתנסו בהכנתו היה אלפא-סינוקלאין (איור 3), שרובו נמצא במוח, והוא נחשב למרכיב העיקרי של גופי לואי האופייניים למחלת הפרקינסון. בגופים אלה אלפא-סינוקלאין מצטבר כסביבים לא מסיסים וגורם למצב הפתולוגי המאפיין את המחלה. מחקרים רבים הראו שאלפא-סינוקלאין בגופים אלו מצומד ליחידת אוביקוויטין או לשרשרת של אוביקוויטין, אך לא ברור מה התפקיד של מערכת האוביקוויטין בפתופיזיולוגיה של אלפא-סינוקלאין, ועל כן דווחו השערות שונות. ◀

נוצרת מקישור האוביקוויטין עם יחידות אחרות דרך קשרים בין אחד הליזינים של האוביקוויטין לקבוצה הקרבוקסילית הטרמינלית שבקצה החלבון של יחידת האוביקוויטין השני. יתרה מזאת, האוביקוויטין מכיל שבעה ליזינים (שמספרם בשרשרת הפפטידית 6, 11, 27, 29, 33, 48, 63) ואת האמין שבקצה הטרמינלי, שמשמשים לבניית שרשראות מסוגים שונים. הטבע משתמש שימוש אפקטיבי מאוד במערכת האוביקוויטין בהשתמשו בשרשראות השונות כדי להשפיע על תהליכים ביולוגיים שונים. כך למשל שרשרת מסוג ליזין 48 מעורבת בפירוק חלבונים, ואילו זאת של ליזין 63 מעורבת בתיקון דנ"א פגום.

למרות ההתקדמות המרשימה בהבנת מערכת האוביקוויטין, עדיין קיימים אתגרים רבים בהבנת אספקטים שונים, ושאלות בסיסיות רבות עדיין מחכות לתשובות כדי להבין אותה הבנה מקיפה יותר ועמוקה יותר וכדי לנצל הבנה זו בפיענוח התערבותה במחלות שונות ובמציאת דרכי טיפול בהן. מהתהליך שנזכר לעיל קשה מאוד, ולפעמים בלתי אפשרי, להפיק חלבונים שעברו מודיפיקציות באמצעות האוביקוויטין או באמצעות שרשרת האוביקוויטין מסוג מסוים שיהיה בהם כדי לשפוך אור על אופן השפעתם על חלבון מסוים ועל תפקידו בתהליך ביולוגי, מהסיבה שלא תמיד יודעים מהי הקומבינציה של שלושת האנזימים (E1-E3) הדרושים לאוביקוויטינציה של חלבון המטרה, וגם אם יודעים, ייתכן שיהיה קשה להפיקם. גם כשהאנזימים זמינים, מחוץ לתא הם לרוב עובדים בצורה לא סלקטיבית באשר למקום האוביקוויטינציה על חלבון המטרה, לסוגה ולאורכה של השרשרת. נוסף על זה, קשה מאוד לקבל כמות מספקת מהחלבון שעבר את המודיפיקציה למחקר ספציפי. ולבסוף, קשה מאוד להכין נגזרות מיוחדות מחלבון שעבר אוביקוויטינציה למטרות שונות, כמו הכנסת סימון פלואורסצנטי.

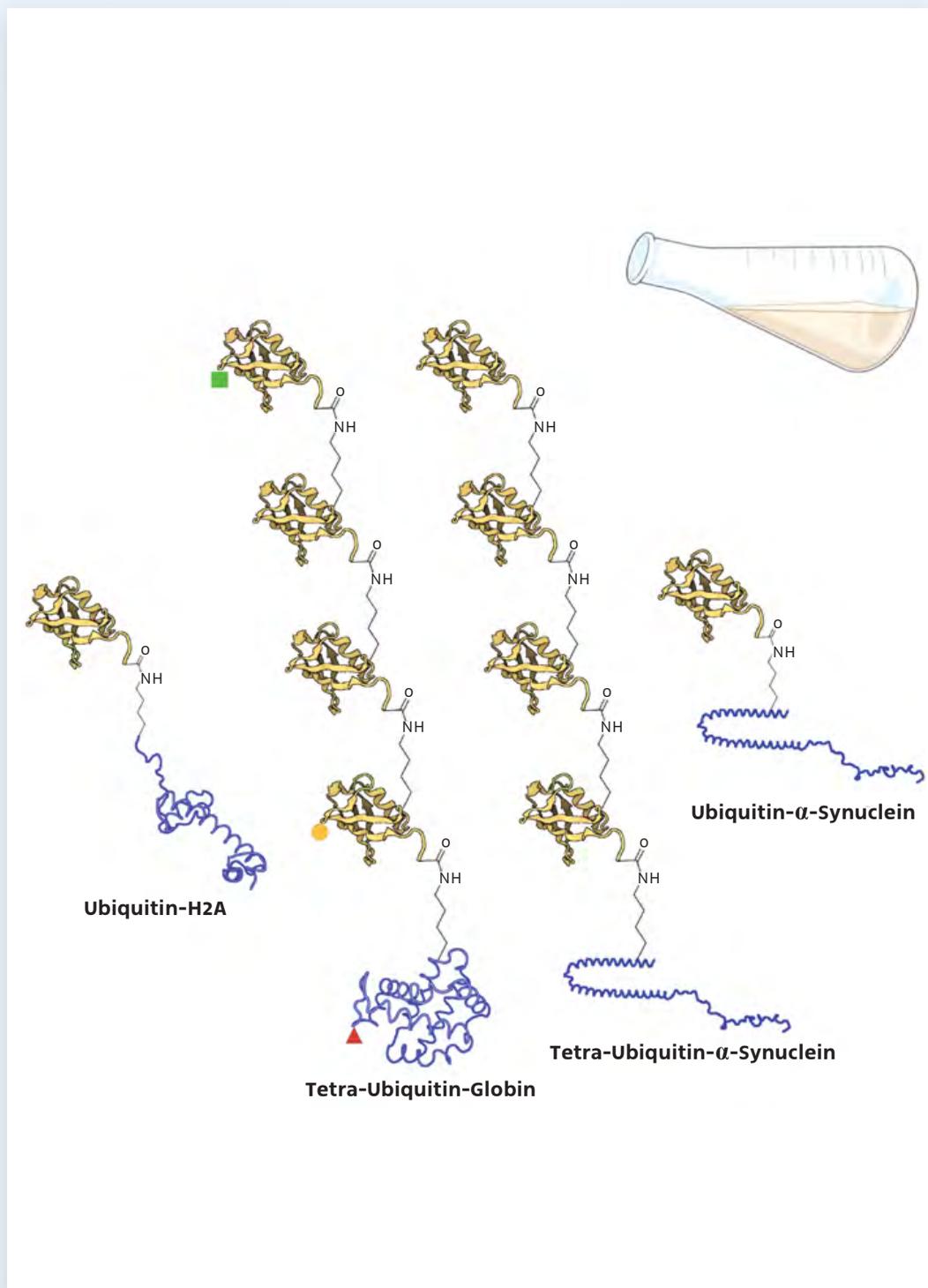
הראו שהאוביקוויטין הראשון והקרוב ביותר לאלפא-גלובין עובר פירוק עם הסובסטרט, ואילו הרביעי עובר הצלה ומשתחרר לשימוש חוזר בתהליך האוביקוויטינציה לחלבונים אחרים. ההשערה שלנו היא שהאוביקוויטין הראשון מאפשר ייצוב של הסובסטרט בחלק הקטליטי של הפרוטאזום לאורך זמן כדי לאפשר פירוק מלא, ובכך האוביקוויטין מקריב את עצמו למטרה זו. ואילו האחרון תפקידו להגן על השרשרת מהאנזימים האחרים שיכולים לשבור את השרשרת למונומרים של אוביקוויטין, ובכך מקבלים פירוק יעיל של חלבון המטרה.

מערכת דומה סונתזה במעבדתי, שבה החלבון סייקלין B, שעובר פירוק בזמן חלוקת התא, שימש חלבון המטרה, ובשיתוף פעולה עם פרופ' מיכאל גליקמן, מהפקולטה לביולוגיה בטכניון, חקרנו את מנגנון פירוק החלבונים באמצעות הפרוטאזום, שהיה עם החלקיקים הרגולטוריים המזהים את הפוליאוביקוויטין כאות פירוק ובלעדיהם.

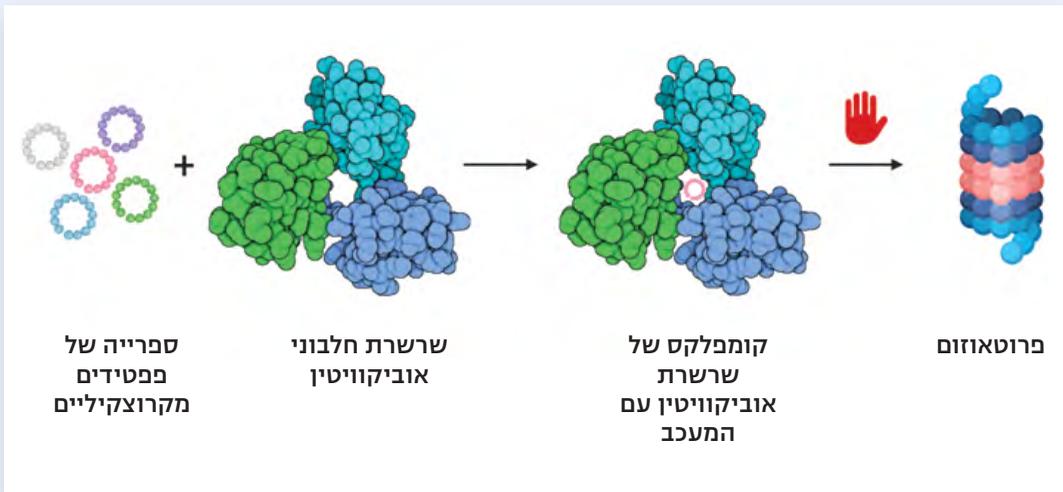
הכלים הכימיים שפיתחנו אפשרו לנו לא רק להבין את מעורבותה של מערכת האוביקוויטין במחלות כמו פרקינסון וסרטן, אלא גם למצוא מולקולות בעלות פוטנציאל רפואי. על כן ניצלנו את היכולת שלנו להכין שרשראות אוביקוויטין בצורה הומוגנית וברמת ניקיון גבוהה, נוסף על האפשרות להכניס, כעיקרון, כל מודפיקציה בשרשרת, כדי לגלות מולקולות שקושרות את השרשרת ומתערבות בתפקידה בתא. כך למשל סינתזנו שרשראות מסוג ליזין 48 באורכים שונים, כאשר בקצה הטרמינלי חובר ביוטין, שנקשר לחלבון אבידין בחוזקה רבה. בשיתוף פעולה עם פרופ' הירואקי שוגה (Hiroaki Suga) מאוניברסיטת טוקיו השתמשנו בשרשראות אלו למצוא, בעזרת סריקת ספרייה ענקית של פפטידים ציקליים, מולקולות שקושרות את השרשראות בחוזקה

קבוצתי הייתה הראשונה להכין אלפא-סינוקלאין מצומד לאוביקוויטין בצורה הומוגנית וברמת ניקיון גבוהה, שאפשרה לנו, בשיתוף פעולה עם פרופ' הילאל לאשוואל (Hilal Lashuel) מבית הספר הפוליטכני הפדרלי של לוזאן, להראות שהאוביקוויטינציה על ליזין 12 מעכבת לחלוטין את יצירת הסיבים הלא מסיסים. לאחר מכן צעדנו כמה צעדים קדימה והכנו את אלפא-סינוקלאין מצומד לשרשרת של ארבעה אוביקוויטין מסוג ליזין 48, ושוב בדקנו את ההשפעה על תכונותיו. במקרה הזה אלפא-סינוקלאין יצר אגרגטים (משקעים לא מסיסים של חלבון) שאינם דומים לעמילואידים (גם אלה משקעים לא מסיסים של חלבון) המאפיינים את המחלה. בשיתוף פעולה עם פרופ' אהרן צ'חנובר הראינו שמצומד כזה עובר פירוק פרוטאזומלי. ובכן, אחת המסקנות מעבודה זו היא שהאוביקוויטינציה של אלפא-סינוקלאין אינה מעודדת יצירת גופי לואי, וייתכן שיש לה תפקיד אקטיבי בפירוק הסיבים הלא מסיסים ובהרחקת אלפא-סינוקלאין באמצעות פירוקו בעזרת הפרוטאזום.

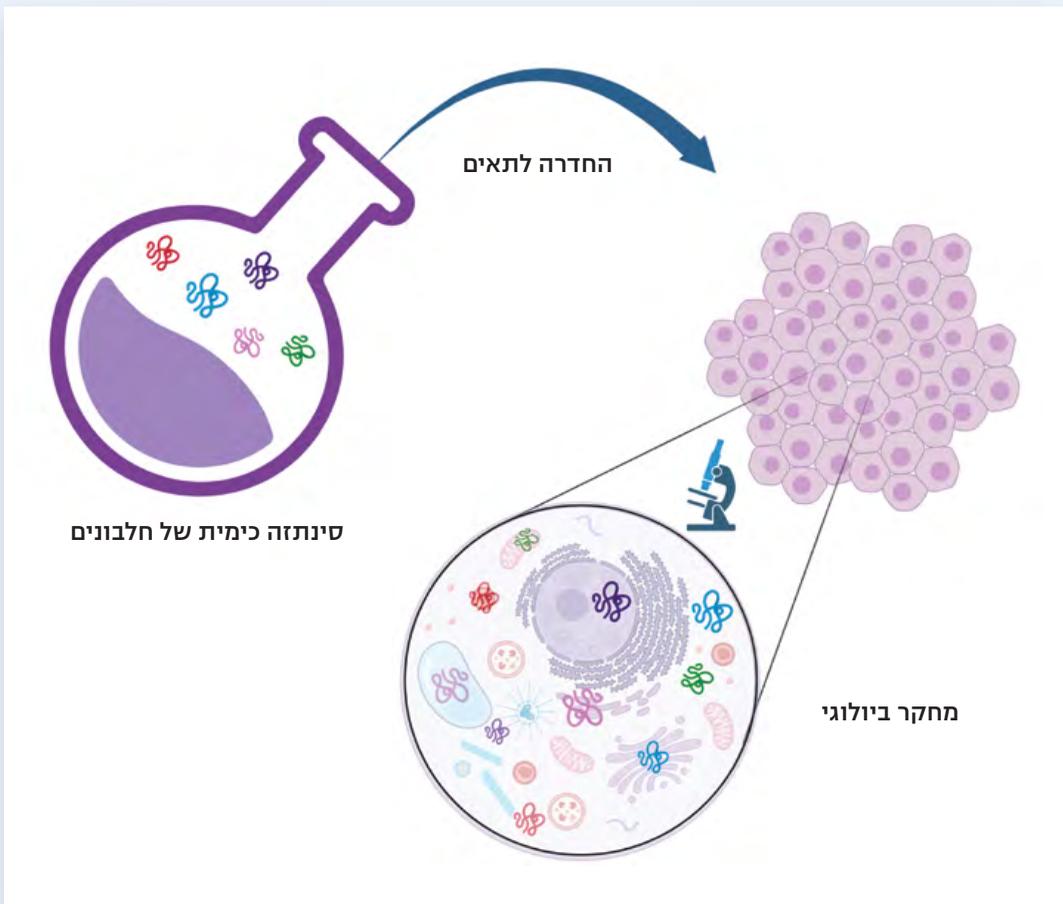
דוגמה נוספת, גם היא מתוך שיתוף הפעולה עם פרופ' אהרן צ'חנובר, קשורה בהבנת גורל האוביקוויטין בשרשרת בתהליך פירוק חלבונים בעזרת הפרוטאזום. כדי לענות על שאלה זו הכנו מצומד אוביקוויטין שבו חלבון בשם אלפא-גלובין שהוכן כימית, וחיברנו לו שרשרת של אוביקוויטין מסוג ליזין 48. מכיוון שכל תהליך הסינתזה נעשה בצורה כימית, התאפשר לנו לסמן את חלבון המטרה (אלפא-גלובין), את האוביקוויטין הראשון בשרשרת ואת הרביעי, שהוא הרחוק ביותר מאלפא-גלובין, בשלושה סימונים שונים (אזור 3). מצומד האוביקוויטין הזה, שהכיל 472 חומצות אמינו והוכן בצורה כימית מאבני הבניין היסודיות, כמו הרכבת מבנה עצום מאבני לגו קטנות, נחשף לפירוק פרוטאזומלי, שבו עקבנו אחרי גורלו של האוביקוויטין בשרשרת. התוצאות



איור 3. סינתזה כימית של חלבונים מצומדים לאוביקוויטין ולשרשראות אוביקוויטין



איור 4. עיכוב פירוק חלבונים מושג בעזרת פפטידים מקרוצקיליים באמצעות קשירה לשרשרת האוביקוויטין



איור 5. סינתזה כימית של חלבונים מסומנים והחדרתם לתאים חיים למטרת מחקר ביולוגי

לאחרונה מושקע מאמץ רב במעבדתי להחדיר חלק מהחלבונים המורכבים שאנו מסנתזים לתוך תא חי כדי ללמוד עליהם יותר בסביבתם הטבעית. כבר הראינו בכמה דוגמאות שהתפרסמו לאחרונה שחלבונים אלו, שאותם אנו מסמנים בצבענים אורגניים קטנים, מראים בתוך התא החי את ההתנהגות המצופה מהם, ובכך הדבר פותח לפנינו אופקים חדשים לחקור אותם בצורה יצירתית וחדשנית כדי להבין את עולמם המופלא מחוץ לתא ובתוכו (איור 5).

בתיאורי כאן השתדלתי להמחיש את כוחה של הכימיה הטמון בבניית ארגז כלים כימי המסייע להבנת תהליכים ביולוגיים בסיסיים. כמו כן ליכולת שלנו לשלוט בהרכב הכימי וברמת האטום הבודד, מתוך אלפי האטומים שמרכיבים מולקולה כלשהי, כמו חלבון, יש כוח עצום בהבנת תפקודו של הטבע. לזה יש השלכות גם על הבנת מנגנוני מחלות ועל פיתוח דרכי טיפול חדשניות בהן. חשובה לא פחות להצלחה ביישום כלים אלה היא יצירת שיתופי פעולה עם ביולוגים שצברו ידע רב על הנושא הביולוגי הספציפי, ובכך לחדד יותר את השאלות המדעיות ולעזור להבין את התוצאות ואת חשיבותן בהקשר הנכון. ■

רבה ובסלקטיביות גבוהה לאורכה ולסוגה של השרשרת (איור 4). פפטידים ציקליים אלו הראו פעילות ביולוגית חזקה בעיכוב פירוק חלבונים בתוך התא ובמודל עכברים שהוחדרו להם תאי סרטן מסוג מיאלומה נפוצה. הדבר דומה לאפקט שיוצרות התרופות שמשמשות בקליניקה, כמו בורטוזומיב, אשר מעכבות פירוק חלבונים בעכבן את החלק הקטליטי של הפרוטאזום. מנגד, הפפטידים הציקליים שגילינו מעכבים פירוק חלבונים במניעתם קישור השרשרת לפרוטאזום, ובכך קיים פוטנציאל רב שמולקולות אלו יעבדו על תאים שפיתחו עמידות נגד התרופות הקיימות. אנו ממשיכים לחקור את המולקולות שגילינו בחברת הזנק, בתקווה שנגיע בקרוב לניסויים קליניים ולהצלחה בטיפול בחולים.

את האסטרטגיה הזאת, שמשלבת סינתזה כימית של שרשראות עם סריקת ספריות ענקיות של פפטידים ציקליים, יישמנו גם בשרשרת מסוג ליזין 63, והמולקולות שהתגלו נחקרו בשיתוף פעולה עם פרופ' נביה איוב מהפקולטה לביולוגיה שבטכניון. מחקר זה הראה עיכוב תוך-תאי לתיקון נזקי דנ"א, שבו מעורבות שרשראות מסוג ליזין 63, שלהן תפקיד חשוב בגיוס האנזימים הדרושים לתיקון.

תודות

ברצוני להודות מקרב לב לחברי הקבוצה שלי, בעבר וכיום, על התרומה הגדולה והמסורה שלהם למחקר שנעשה עד כה. תודה רבה לפקולטה לכימיה באוניברסיטת בן-גוריון בנגב, שהייתה ביתי האקדמי הראשון. לפקולטה לכימיה ע"ש שוליק ולחברי הסגל הנהדרים, על תמיכתם הגדולה זה כעשור. תודה מיוחדת לד"ר גיא קמינצקי על ניהול יוצא דופן של המעבדה ולגברת יעל ניר על העזרה בניהול האדמיניסטרטיבי. תודה ענקית לכל השותפים לדרך על שיתופי הפעולה הפוריים והמהנים מאוד, שלמדתי מהם כה הרבה על העולם המרתק של הביולוגיה. תודה מכל הלב לפרופ' אהרן צ'חנובר, שותפי מאז תחילת דרכי, על התמיכה האינסופית ועל האמון הגדול בכימיה שפיתחנו לאורך השנים. תודה רבה לחברי היקרים על תמיכתם ועל העידוד שהפנינו לאורך כל הדרך, למשפחתי היקרה והאהובה, הורים אחים ואחיות, שלא הפסיקו ליום אחד לעזור, לתמוך ולאהוב. ואחרונים חביבים, לשני ילדיי, היקרים לי מכול, ג'וד וריאן, שמוסיפים הרבה טעם ומתיקות לחיי.