

# עקת חמצון והשפעתה על הפעלת חלבון E3 המשמש בקר מרכזי של מחזור התא

עדן ברדה ופרופ' אלה פיק

החוג לביולוגיה וסביבה, הפקולטה למדעי הטבע, אוניברסיטת חיפה באורנים

## מבוא

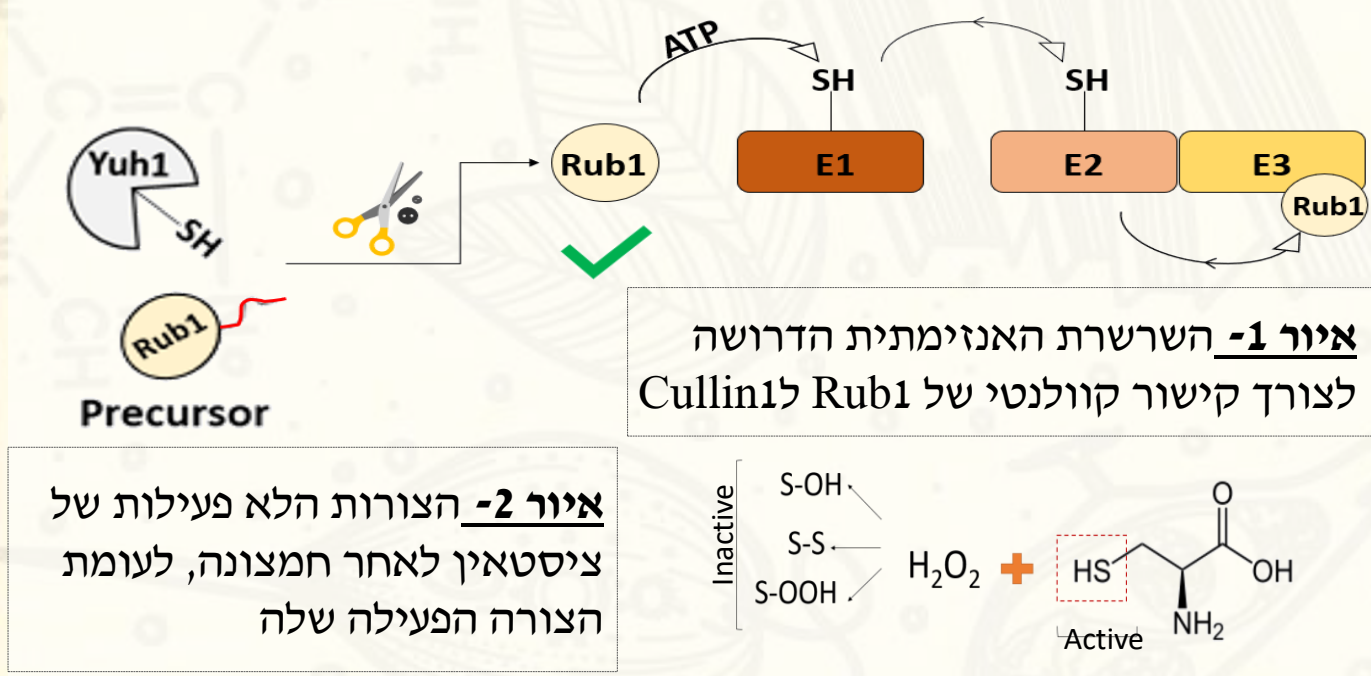
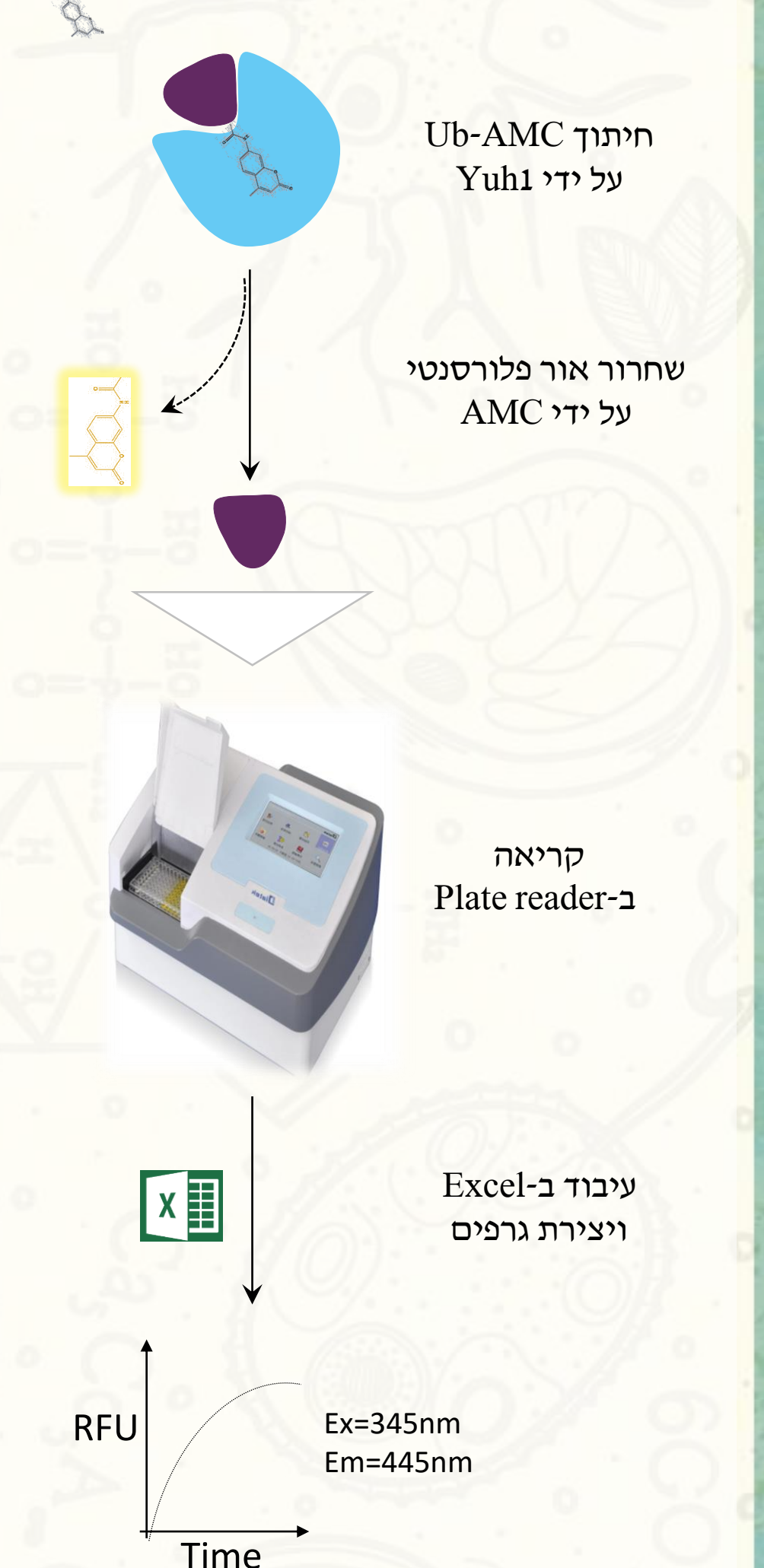
השמירה על שיווי המשקל בין בניה ופירוק החלבונים בתא (פרוטאוסטזיס) מהווה גורם חיוני הדרוש לבריאות התא והאורגניזם. שינוי בפרוטאוסטזיס עשוי להוביל לפתולוגיות כמו סוגי סרטן, מחלות נוירו-דגנרטיביות או הזדקנות מואצת. החלבון Cullin1 (E3) הוא בקר מרכזי של הפרוטאוסטזיס התאי. Cullin1 דרוש לסימון 20% מהחלבונים הפגומים בתא ושליחתם לפירוק במגרסה תאית הנקראת "פרוטאזום". לצורך שפעול Cullin1, ראשית, דרוש קישור קוולנטי שלו לחלבון בשם Rub1. לקישור קוולנטי זה דרושה שרשרת אנזימים (איור 1) כשהראשון בהם הוא Yuh1, פרוטאז שמור בין אדם לשמר המין *Saccharomyces cerevisiae*. Yuh1 מכיל באתר הפעיל ציסטאין, חומצה אמינית שעשויה להראות רגישות לסביבה חמצונית.

במחקר בדקתי וזיהיתי כי האנזים Yuh1 רגיש לחמצון ועקב כך Rub1 לא מועבר ל-Cullin1. נוכח השימור הגבוה של מערכת זו בין אדם לשמר, התוצאות עשויות לרמוז על פגיעה בתזמון של פירוק חלבונים שאינם נדרשים עוד ועקב כך גם בפרוטאוסטזיס התאי באדם.

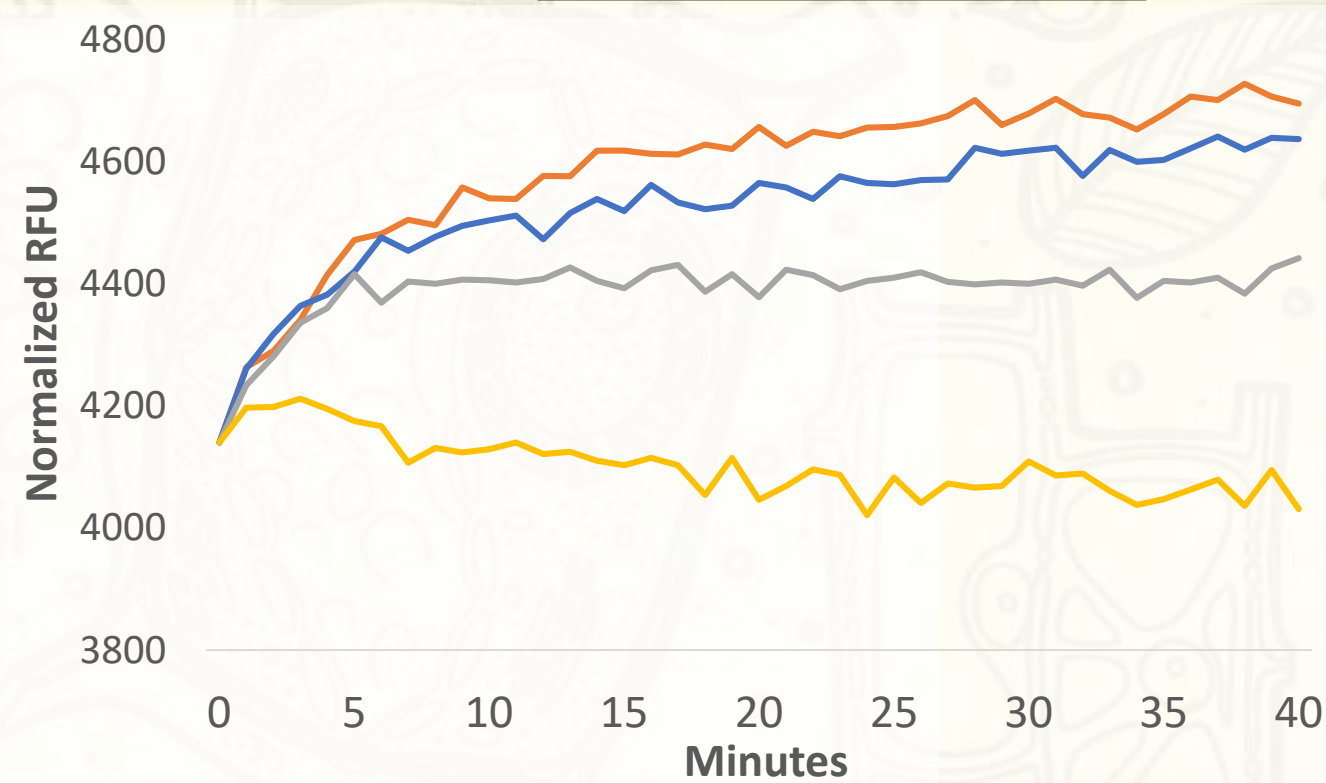
## שאלה מס' 1 – האם האנזים Yuh1 רגיש לחמצון?

## מדידת פעילות Yuh1

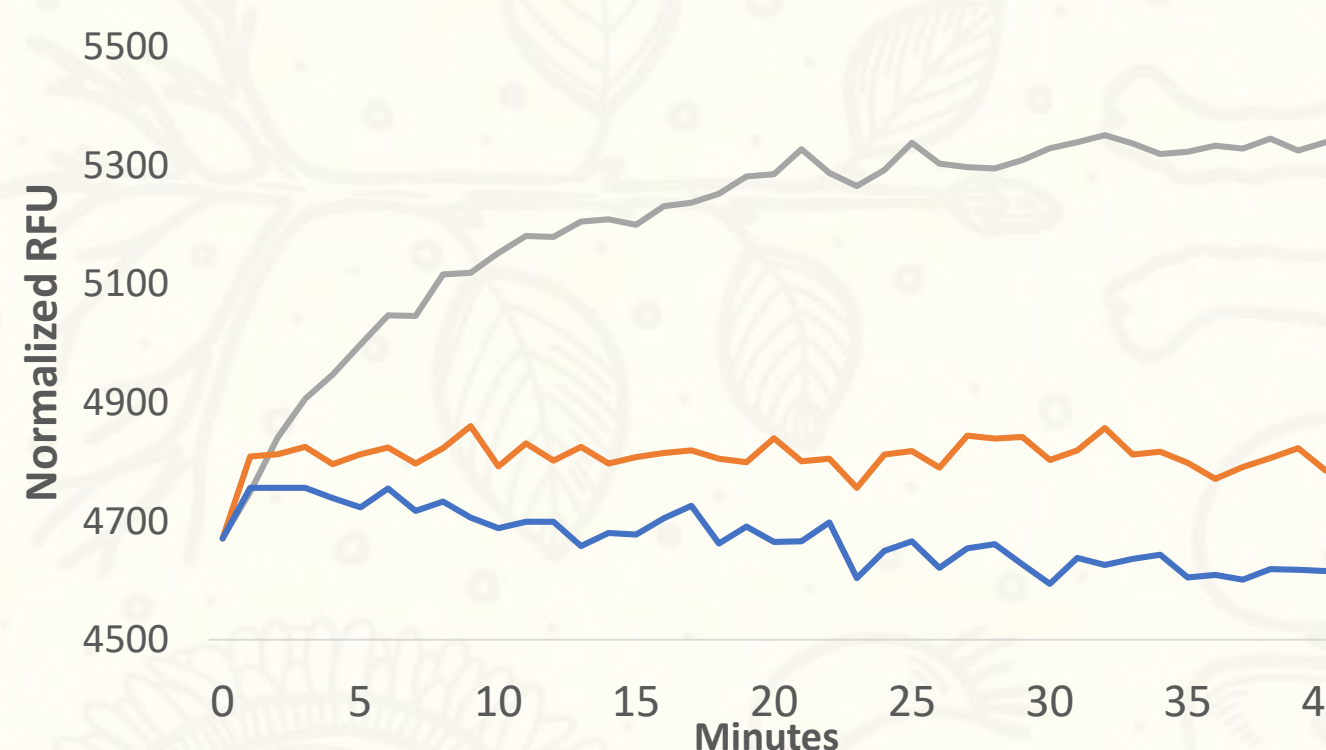
איור 3- מדידה כמותית של פעילות האנזים Yuh1 (●) כנגד הסובסטרט Ub-AMC (●)



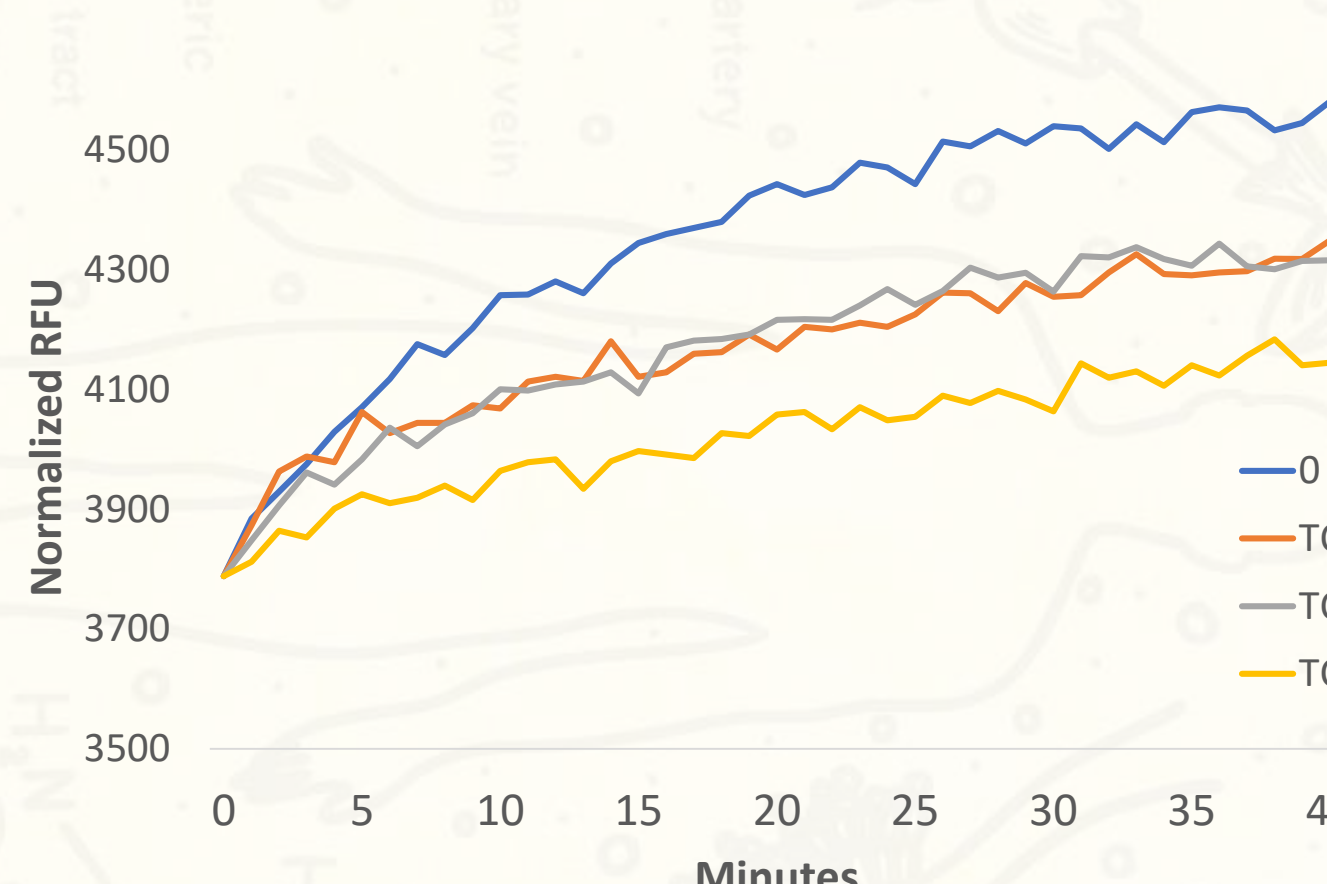
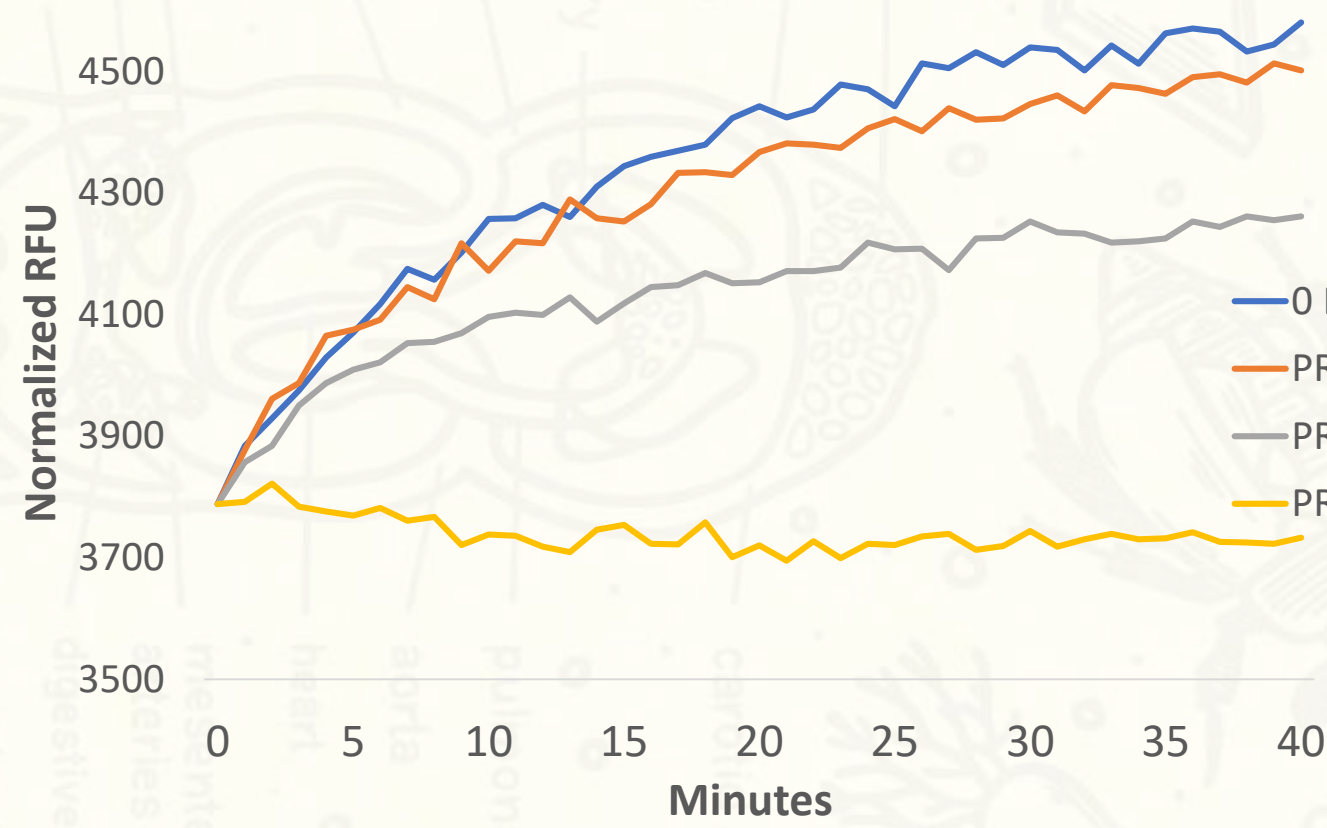
## תוצאות



תוצאה 1- השפעת תנאים מחמצנים המושרים על ידי H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> בריכוזים שונים על פעילות האנזים Yuh1 בתאי שמר מנץ. תרבית של שמר מנץ גדלה עד לשלב הלוגריתמי לפני שהופקה ממנה תמצית כלל החלבונים. התמצית טופלה +/- מי חמצן (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) בריכוזים שונים ונבדקה ב-plate reader יכולתה לעבד Ub-AMC, סובסטרט ספציפי ל-Yuh1 הפולט פלורסנציה בעת פירוקו.



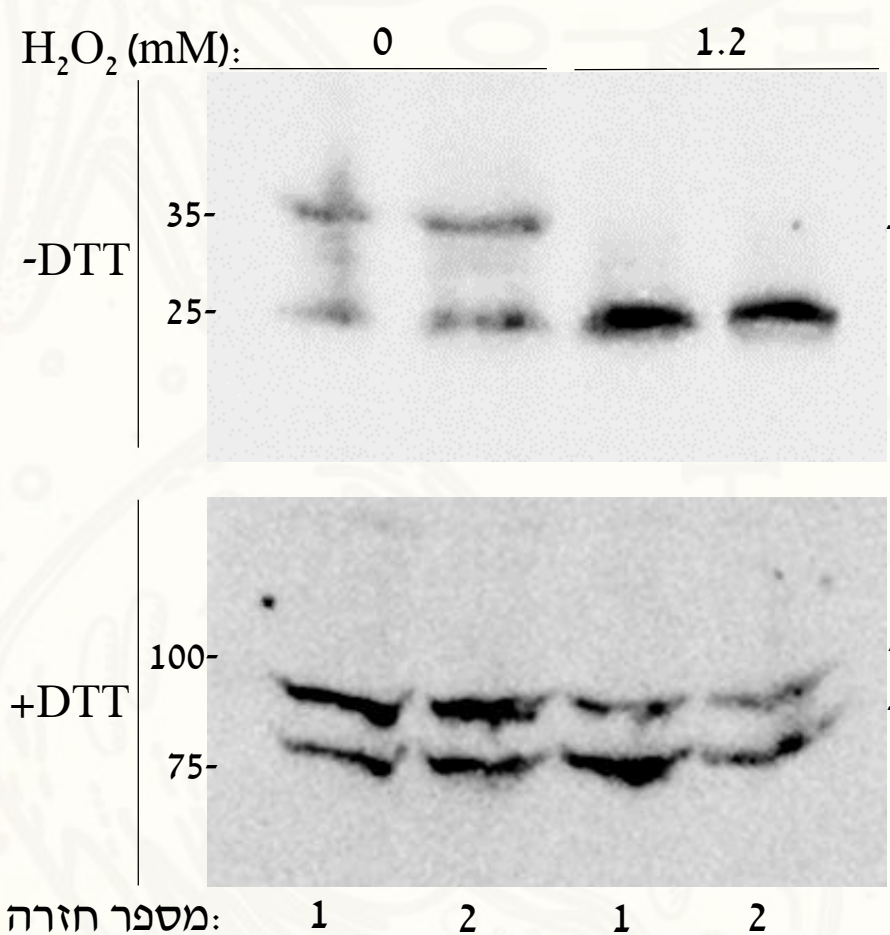
תוצאה 2 - עיכוב החמצון של Yuh1 על ידי חומרים מחזרים. תרבית לוגריתמית נכתשה, סורכזה והוספו לה מי חמצן. לאחר מכן הוספו גם מחזרים שונים (או ביקורת) ו-Ub-AMC. הפלורסנציה שנפלטת בעקבות חיתוך Ub-AMC על ידי Yuh1 נבדקה ב-plate reader. על פי התוצאות רואים ש-DTT ביטל לחלוטין את העיכוב על ידי מי החמצן ואילו GSH ביטל את העיכוב באופן חלקי.



תוצאה 3 - עיכוב פעילות Yuh1 על ידי מעכב ספציפי (TCID) וכללי (PR-619). לתמצית כלל חלבונים השמרה שמקורה בתרבית לוגריתמית הוספו מעכבים בריכוזים שונים ו-Ub-AMC לפני שנבדקה פעילות Yuh1 ב-plate reader כמתואר באיור 3. מתוצאות הקריאה רואים כי המעכב TCID השפיע מעט על חיתוך ה-AMC בריכוז של 5 mM ואילו מעכב PR-619 עיכב לחלוטין את החיתוך.

## שאלה מס' 2 – האם בתנאים מחמצנים מצליחה השרשרת האנזימטית למסור את Rub1 ל-Cullin-1 לצורך הפעלתו?

## תוצאות



תוצאה 4 - Rub1 לא מועבר לסובסטרט בתנאים מחמצנים. תרבית לוגריתמית של שמרים טופלה +/- מי חמצן (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ל-10 דקות. ונבדקה היכולת ליצור קשר תיו-אסטרי בין Rub1 ו-E2 או קשר קוולנטי עם E3 (כמתואר באיור 1) לאחר הניסוי הופקו חלבונים השמרה, והתבצעה אנליזה "יוסטרו" בלוט". על פי התוצאות רואים כי בנוכחות מי חמצן בריכוז 1.2mM לא היה קישור בין E2 ל-Rub1 בנוסף הקישור E3 פחת עם הוספת מי חמצן. \* האיור מציג שתי חזרות ביולוגיות מתוך 6 שנעשו.

## מעקב אחר העברת Rub1

איור 4: הכנת דגימות השמרים וטיפולן במי חמצן



## דיון ומסקנות

- מערכת הרבילציה רגישה לעקה חמצונית. בנוכחות מי חמצן נצפתה ירידה בפעילות האנזים Yuh1 הטבעי של השמרה כמו גם בהמשך התהליך – בקישור התיו-אסטרי של Rub1 עם E2 או בקישור הקוולנטי עם Cullin1 (E3).
- העיכוב של מערכת הרבילציה נעשה על ידי חמצון, זאת ניתן לראות על ידי הוספת מחזרים שביטלו את החמצון של מי החמצן וגרמו לאנזים לפעול שוב.
- המעכב TCID הספציפי ל-UCLH3 עיכב באופן חלקי גם את ההומולוג במשמרים Yuh1, כמו כן המעכב הכללי למערכת הרבילציה, PR-619, עיכב באופן מלא את Yuh1 בריכוז 5mM. הדבר מלמד על שימור אבולוציוני בין האתר הפעיל של Yuh1 בשמרה המנץ, לאתר הפעיל של UCLH3 של אדם, שעבורו הוכנו המעכבים.