

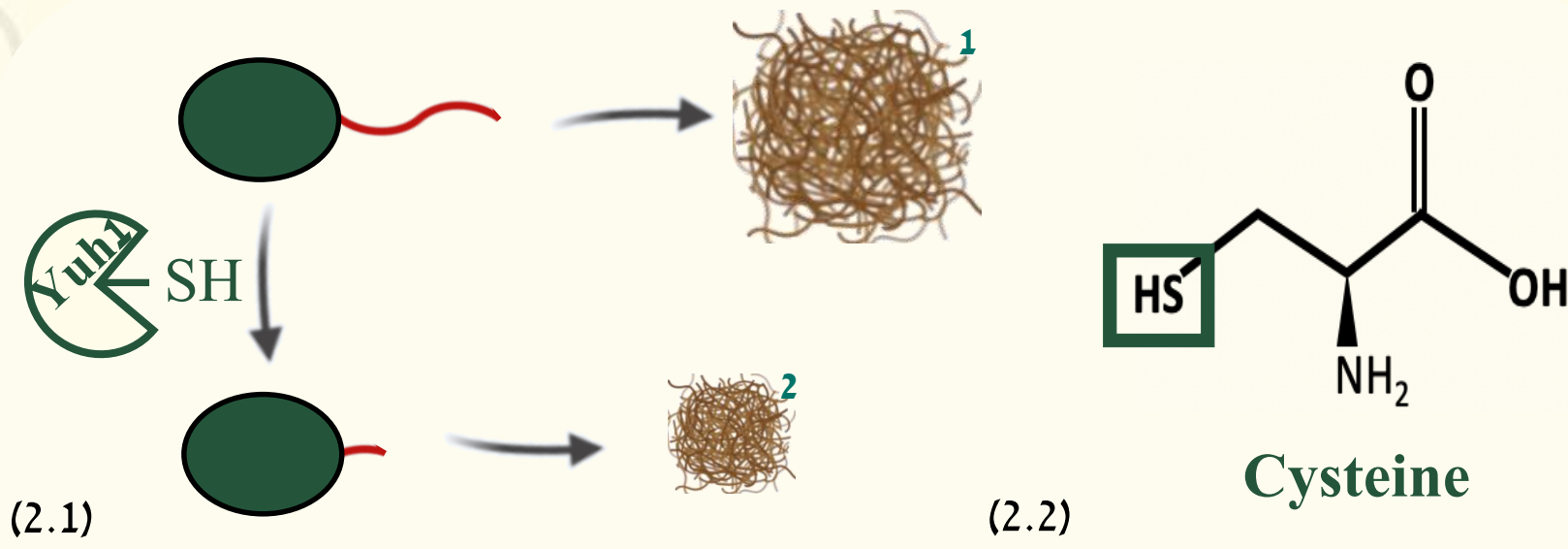
השפעת תנאים מחמצנים על עיבודו של Ubb^{+1} , מוטנט שנפוץ במחלת האלצהיימר

שחף סעד ופרופ' אלה פיק

מבוא



איור 1. תיאור סכמתי של החלבון Ub (Gly 76) והמוטנט Ubb^{+1} (Gly76/Y) הארוך ב-19 חומצות אמיניות בצידו הקרובוקסילי, הנפוץ במחלת האלצהיימר.

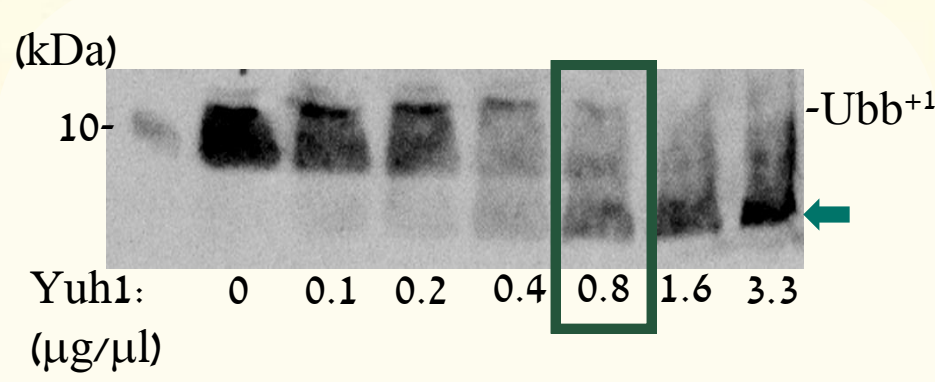


איור 2. תיאור סכמתי של החלבונים המצטברים כתוצאה משקיעת Ubb^{+1} טרם (1) או לאחר (2) עיבודו על ידי האנזים Yuh1 (2.1), המכיל את החומצה האמינית ציסטאין (2.2) באתר הפעיל.

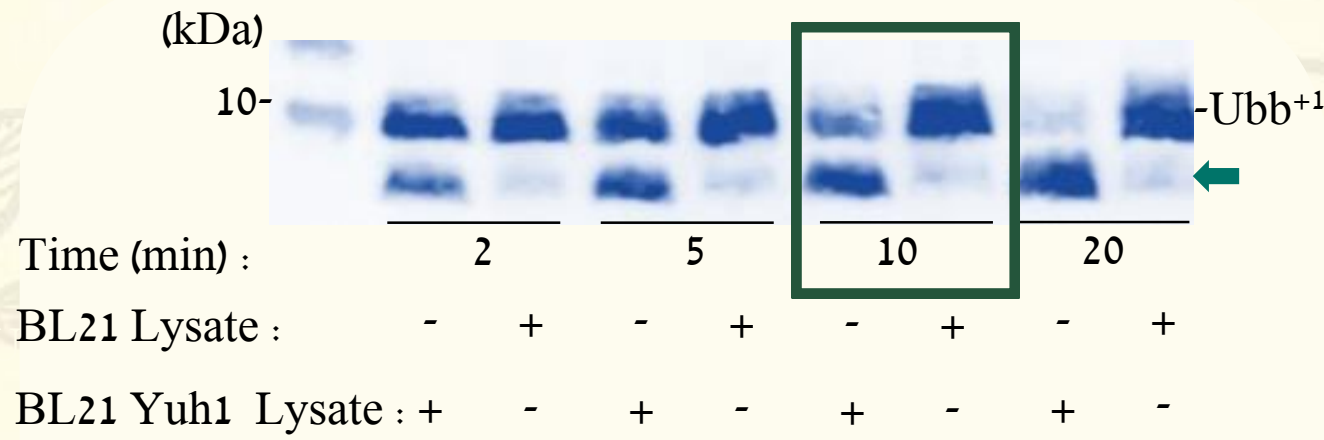
אוביקוויטין (Ub) הוא חלבון חיוני ושומר אבולוציונית בכל היצורים האאוקריוטים. חלבון זה מעורב בשינוי אחר תרגומי של אלפיי חלבונים, ביניהם חלבוני בקרה חיוניים. קשירת החלבונים ל-Ub תלויה בשרשרת של אנזימים המכילים ציסטאין באתר הפעיל. חומצה אמינית זו מהווה לעיתים חיישן בעל תפקיד בבקרה וויסות תהליכי חמצון-חיזור בתא. נמצא שעקה חמצונית עלולה לחסום את הציסטאין, ובכך לפגוע בבקרה התאית ולגרום לעליה ברמת הסיכון ללקות במחלות ניווניות כגון מחלת האלצהיימר. מחלת זו מאופיינת בהצטברות משקעי חלבונים והתפשטותם במוח. אחד החלבונים שמצטברים הוא החלבון Ubb^{+1} אשר מקורו במוטציה ספונטנית ב-Ub. חלבון מוטנט זה אינו מסוגל לבצע את תפקידו בבקרת החלבונים בתא ואינו עומד בדרישות לפירוק חלבונים, מה שגורם לשקיעתו, הצטברותו וכפועל יוצא להובלת התא אל מותו. האנזים UCH-L3 (בשמרים Yuh1) מסוגל לערוך חלקית את החלבון Ubb^{+1} ובכך לגרום להצטברות מופחתת ולמצב פחות רעיל לתא.

מחקר קודם במעבדתנו הציע כי האנזים Yuh1 רגיש לחמצון. עם זאת, עובדה זו לא נבדקה מעולם במערכת *in vitro* המבוססת על חלבונים מבודדים. במחקר זה אפינת את פעילות האנזים Yuh1 ואת רגישותו לתנאים מחמצנים במערכת *in vitro*.

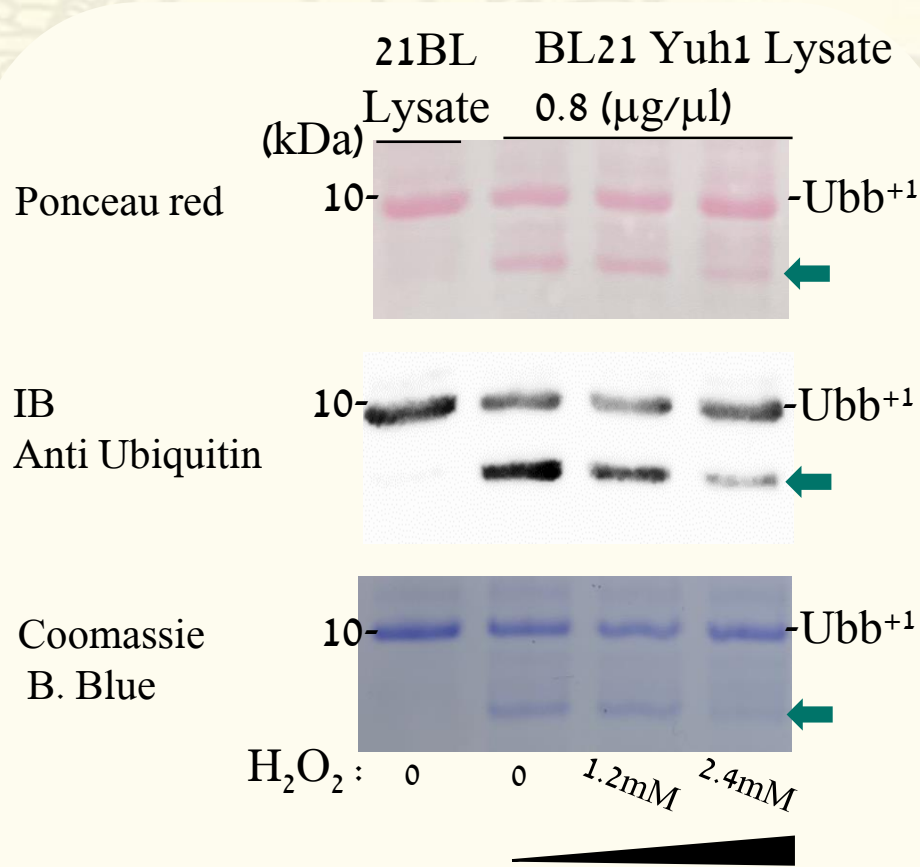
תוצאות



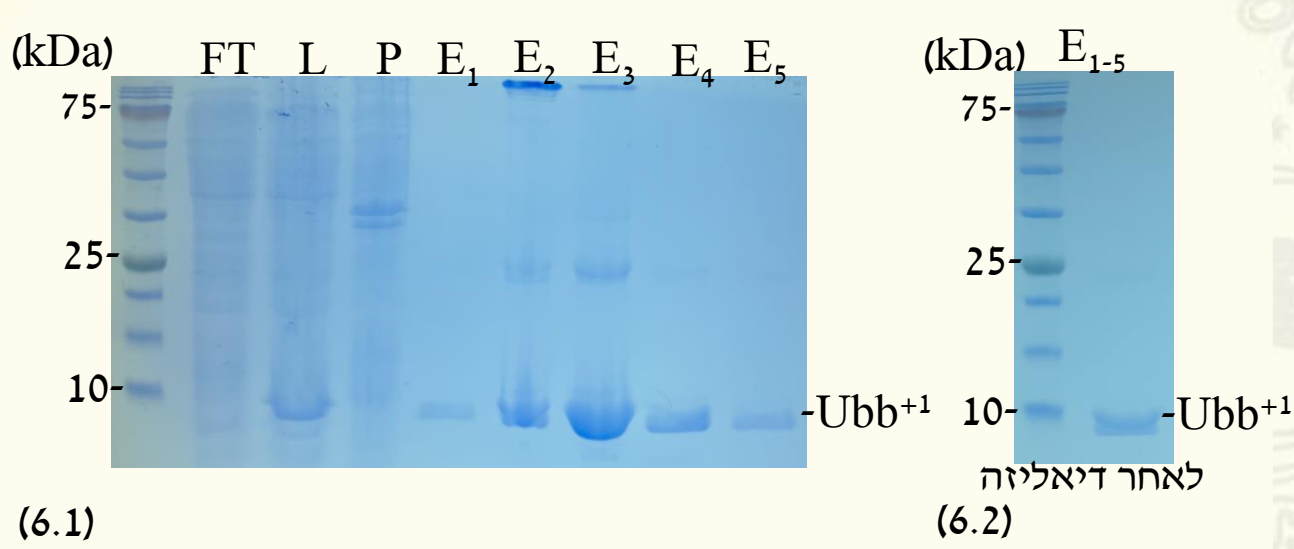
איור 7. קביעת ריכוז האנזים המיטבי לניסוי. הסובסטר המנוקה $6His-Ubb^{+1}$ הוגב למשך 10 דקות עם ריכוזים עולים של אנזים רקומביננטי Yuh1 ליצירת תוצר (→). התוצאות נבחנו בתספיג אימוני כמתואר באיור 5. הריכוז בו הריאקציה לא הסתיימה (0.8 $\mu g/\mu l$) נבחר להמשך הניסויים.



איור 5. כיוול מערכת הניסוי בתנאים סטנדרטיים ובחירת הזמן המיטבי לניסוי (10 דקות). תגובה של Lysate חיידקי BL21 המכיל את האנזים הרקומביננטי Yuh1, או של Lysate חיידקי BL21 ללא אנזים כביקורת, עם הסובסטר הרקומביננטי ($6His-Ubb^{+1}$) ליצירת תוצר (→) לאורך זמן. החלבונים הופרדו בג'ל חלבונים 18% SDS PAGE והועברו לנייר ניטרולולווי שנבחן בתספיג אימוני עם נוגדן anti-6His.

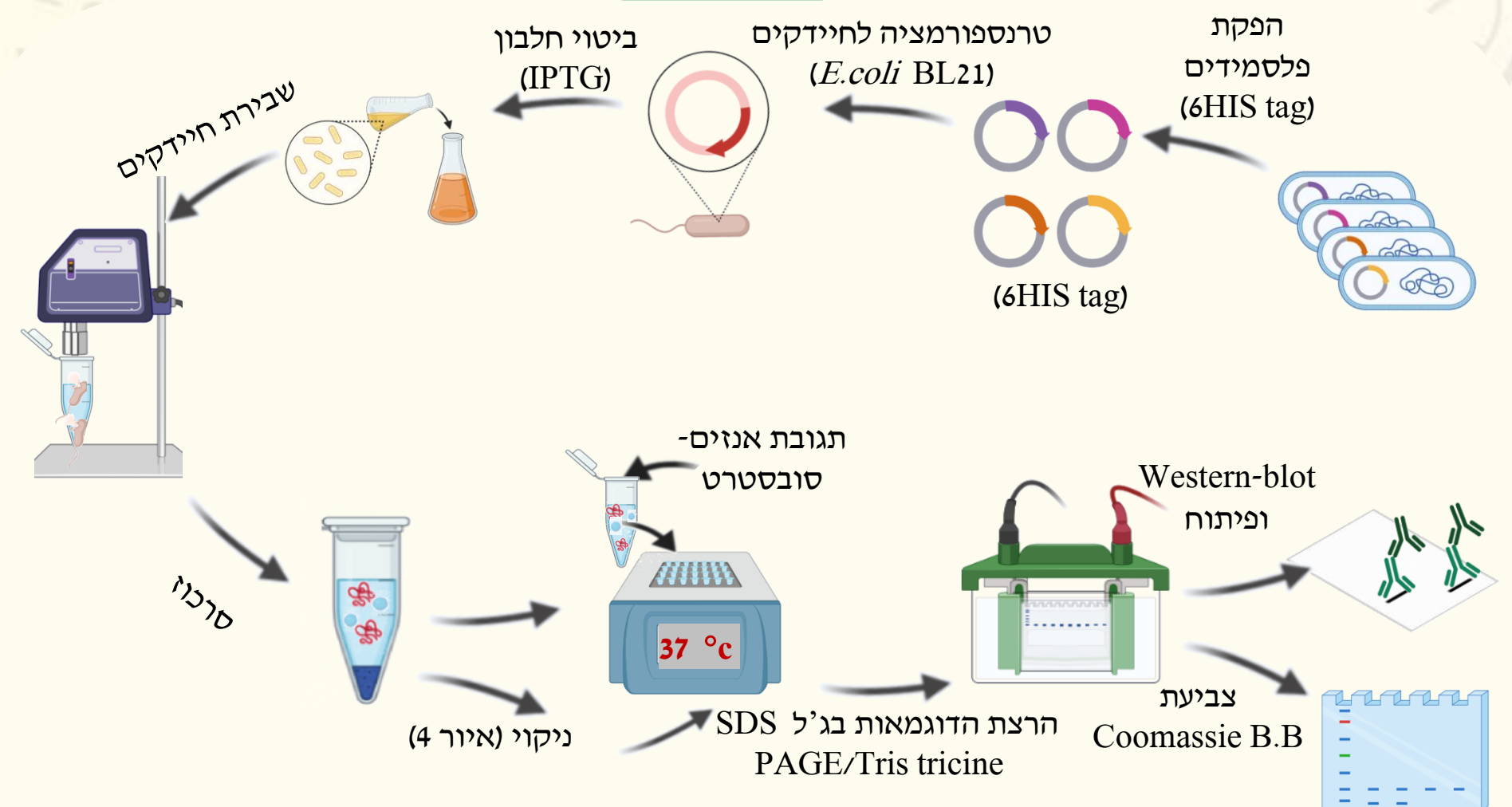


איור 8. ירידה בפעילות האנזים הרקומביננטי Yuh1 בתנאים מחמצנים (H_2O_2). תגובה של Yuh1 עם $6His-Ubb^{+1}$ נקי ליצירת תוצר (→) בתנאים מחמצנים (H_2O_2 -0, 1.2mM, 2.4mM) ל-10 דקות. החלבונים הופרדו בג'ל חלבונים Coomassie B. blue (12%) שנצבע ב-Tris tricine (20%) או הועבר לנייר ניטרולולואזו ששימש לצביעה באדום או לתספיג אימוני. התוצאה המוצגת מייצגת 3 חזרות.

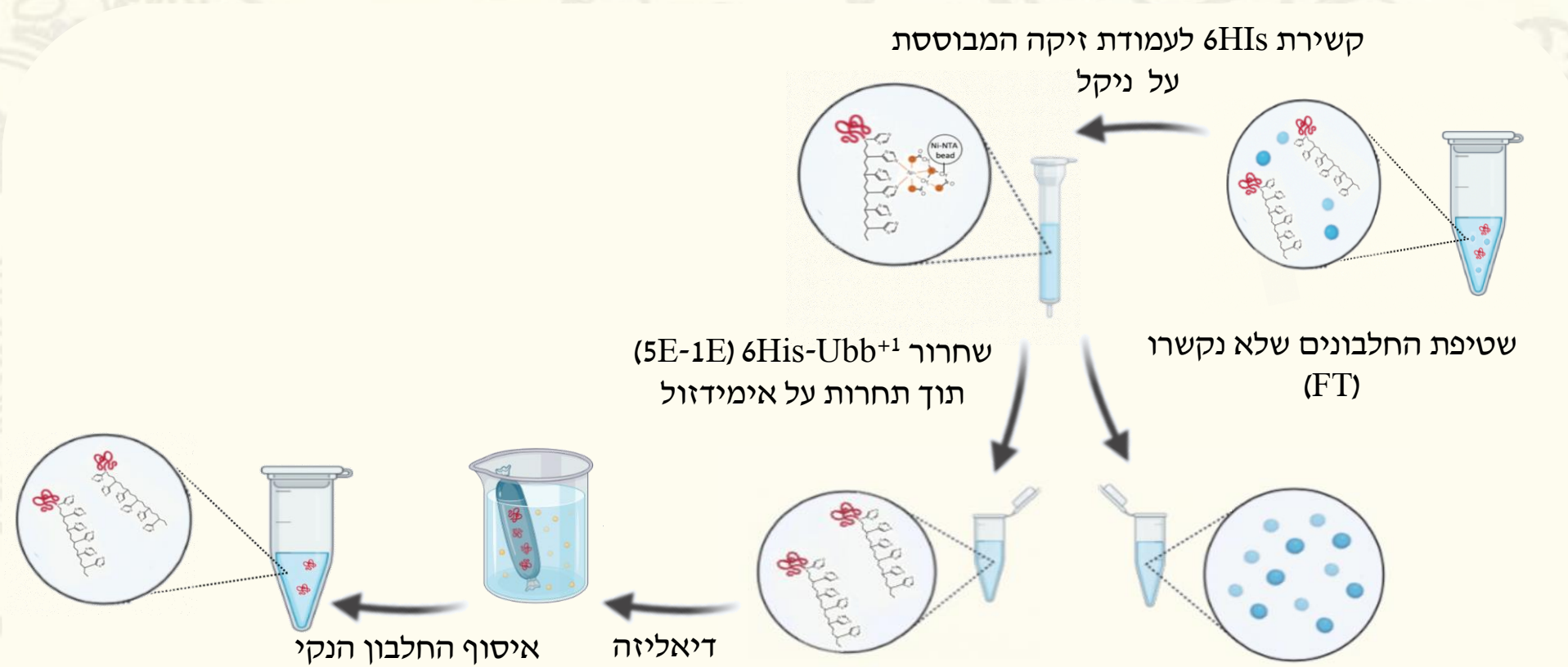


איור 6. שלבי ניקוי החלבון הרקומביננטי $6His-Ubb^{+1}$ והכנתו לניסוי. שלבי ותוצאות הניקוי בעמודת הזיקה כמפורט באיורים 4-5. משמאל לימין (6.1); כלל החלבונים שנשטפו מעמודת הזיקה (FT), Lysate המכיל את כלל החלבונים המומסים (L) והמשקע הנותר (P), לאחר שבירת החיידקים וסרכוז. דוגמאות איסוף החלבון הנקי הרקומביננטי ($6His-Ubb^{+1}$) לאחר שחרורו מהקולונה (E1-5). החלבון הנקי לאחר דיאליזה (6.2). החלבונים הופרדו בג'ל חלבונים 18% SDS PAGE שנצבע ב-Coomassie B. blue.

שיטות

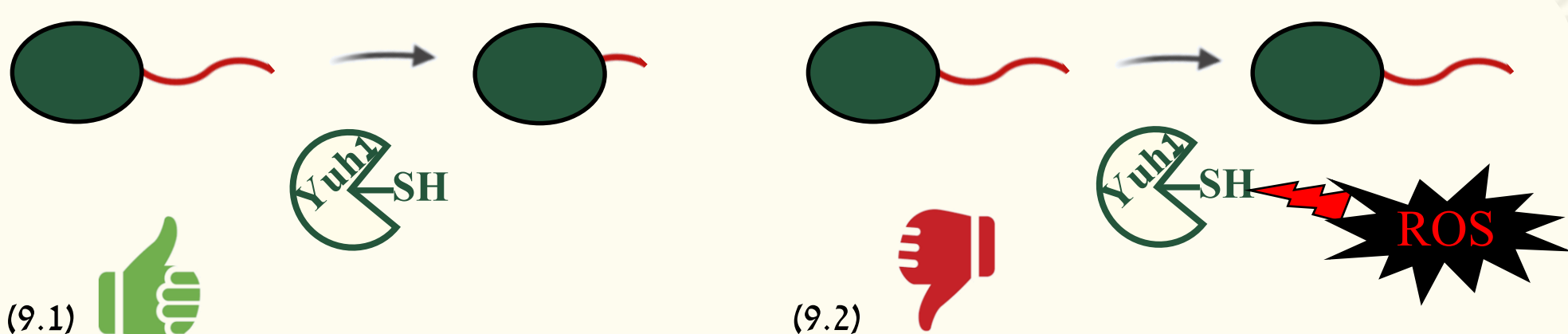


איור 3. תגובת אנזים-סובסטר שמקורם בתמצית חלבונים כללית. פלסמידים המקודדים לסובסטר או לאנזים, המאוחים $6His$, הוחדרו לחיידקים, וביטוי החלבונים הושרנה על ידי IPTG. כלל החלבונים הופקו, והאנזים והסובסטר הוגבו האחד עם השני טרם או לאחר ניקוי הסובסטר (איור 4). הריאקציה נבחנה בצביעה ישירה (Coomassie B. blue) או בתספיג אימוני (Western-blot).



איור 4. ניקוי החלבון הרקומביננטי Ubb^{+1} בעמודת זיקה המבוססת על ניקל. אל הניקל נקשרו שיירי ההיסטידין (HIS) של החלבון $6His-Ubb^{+1}$ ושחררו תוך תחרות על הניקל עם אימידזול.

דיון



איור 9. תיאור סכמתי של עיבוד הסובסטר המוטנט (Ubb^{+1}) בתנאים סטנדרטיים (9.1) ובתנאים מחמצניים (9.2).

החלבון הרקומביננטי Yuh1 שנבדק במערכת *in vitro* נמצא רגיש בתנאי חמצון יתר לאחר שנראה כי פעילותו נפגעה בבופר שהכיל ריכוזי מי חמצן נמוכים. כיוון שחלבון זה שומר מאוד בין אדם לשמר, התוצאות מהוות בסיס להבנת התפקיד הפיזיולוגי של Yuh1 באורגניזמים מורכבים יותר שנתונים בתנאים מחמצנים.