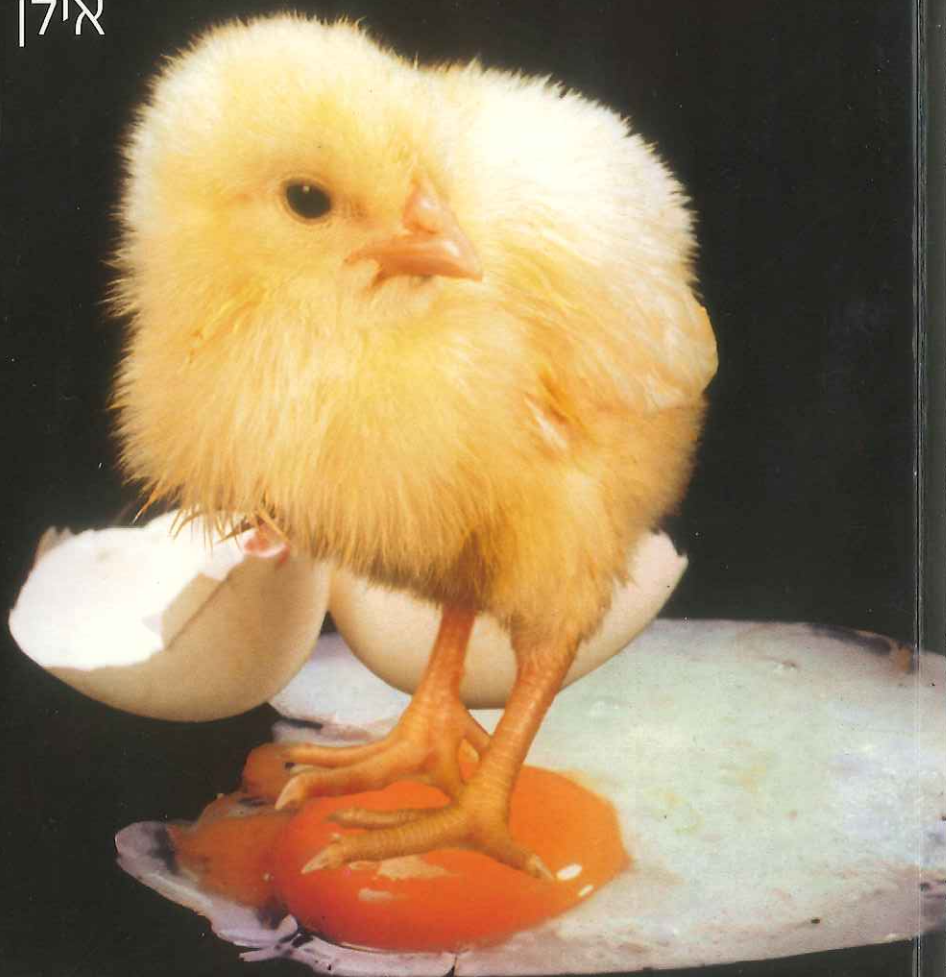


הכימיה-אתגר

והחלבון הזה הוא אני

אילן לולב



מהדורה ניסויית



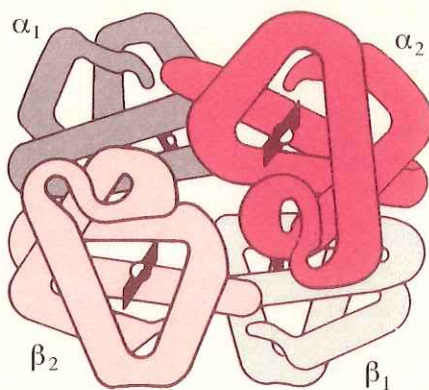
המחלקה להוראת המדעים, מכון ויצמן למדע

תיקון והשלמה

1. בעמוד 48, בטבלה, סמן את החץ האדום במקום הנכון:



2. גזור והדבק את האיור הנתון כאן בעמוד 106, מעל לשם האיור שבשוליים: תרשים סכמטי של מולקולת המוגלובין



3. בעמוד 107, בתרשים הגאומטריה של יון הברזל ו-HisF8 במיוגלובין, צריך להיות:

$\frac{b}{\text{\AA}}$	$\frac{a}{\text{\AA}}$	$\frac{\alpha}{^\circ}$	
2.6	0.52	10.7	דאוקסימיוגלובין
2.3	0.19	4.0	אוקסימיוגלובין

הכימיה-אתגר והחלבון הזה הוא אני

אילן לולב

מהדורה ניסויית



המחלקה להוראת המדעים, מכון ויצמן למדע

יוצא לאור במסגרת

המרכז הישראלי להוראת המדעים ע"ש עמוס דה-שליט

מיסודם של

משרד החינוך והתרבות, האוניברסיטה העברית בירושלים ומכון ויצמן למדע, רחובות

ייעוץ מדעי: פרופ' ליאה אדדי

הדפסה ועריכה במחשב: שושי בנגיו

עיצוב והפקה: נורית מדברי

עטיפה: נורית מדברי

צילום העטיפה: שלום נידם

סריקות, הפרדות, הרצות ולוחות: גרפאור בע"מ

הדפסה: דפוס קל בע"מ

אין לשכפל, להעתיק, לצלם, להקליט, לתרגם, לאחסן במאגר מידע, לשדר או לקלוט בכל דרך או אמצעי אלקטרוני, אופטי, מכני או אחר - כל חלק שהוא מהחומר שבספר זה. שימוש מסחרי מכל סוג שהוא בחומר הכלול בספר זה אסור בהחלט אלא ברשות מפורשת בכתב מהמוציא לאור.



כל הזכויות שמורות למחלקה להוראת המדעים

מכון ויצמן למדע

תשנ"ה - 1995

הביולוגיה המולקולרית מתארת בפנינו את תהליכי החיים ומסבירה את התכונות והביצועים המיוחדים ליצורים החיים, במונחים של המולקולות המשתתפות בהם, והחלבונים כאן הם ראש וראשון. לו יכולנו להתבונן ישירות במולקולות החלבונים שבגופנו, היו שאלות רבות על נפלאות החיים זוכות לתשובות פשוטות של עדי-ראיה. אך בינינו לבין עולם המולקולות מפריד פער ניכר של סדרי גודל: אנחנו נמדדים במטרים וסנטימטרים, והמולקולות - בנאנומטרים. (1 נאנומטר = 10^{-9} מטר = 10 אנגסטרם). לכן אנו פונים אל המודלים ובעזרתן של נוסחות המיבנה והתמונות התלת-מימדיות, אנו מנסים לגשר על פער המידות הזה, על מנת "לראות" את המולקולות, להכיר את צורתן ולתאר את פעולתן.

מחקר החלבונים, שהתקדם עד מחצית המאה באיטיות מרובה, בגלל המורכבות והגיוון הרב שמוצאים בהם, זכה לאחרונה לפריצת דרך בשל שיטות המחקר הביוטכנולוגיות והשימוש במחשב, שהוציאוהו למרחב. אנו יודעים היום, שהכימיה של המולקולות הגדולות, כמוה ככימיה של המולקולות הקטנות ושפת הכימאים, המוכרת לך מלימודיך על המולקולות הקטנות, טובה גם לדו-שיח עם מולקולות החלבונים הגדולות. הספר הזה נועד לתת בידך כלים לדו-שיח כזה עם מולקולות החלבון. הוא נולד בלבטים רבים של מיון וצימצום, כדי להדגיש את קווי המיתאר העיקריים, מבלי "לטבוע" בשפע של פרטים המציפים את עולמן של מולקולות החלבון.

הספר נכתב במסגרת פעילותה של קבוצת הכימיה, במחלקה להוראת המדעים של מכון ויצמן למדע ורבים סייעו בהוצאתו לאור. תודה והוקרה לפרופ' ליאה אדדי מהמחלקה לביולוגיה מיבנית, שקראה את החומר והקפידה בהערות חשובות.

תודה מיוחדת לד"ר מיכל הראל, גם היא מהמחלקה לביולוגיה מיבנית, אשר בסבלנות ובנכונות רבה סייעה בהפקת האיוורים הסטראוסקופיים של נוסחות המיבנה של החומצות האמיניות, הלוקחות מהמודל המולקולרי של האנוים אצטילכולין אסטרזא. תודה לד"ר רות בן-צבי, לד"ר אבי הופשטיין ולגבי יהודית זילברשטיין, מהמחלקה להוראת המדעים, על התמיכה והסיוע בגיבוש פרקי הספר. תודה לשושי בנג'ו ולנורית מדברי, שבתושיה ובהתמדה טפלו בטיטות הרבות ותרמו את חלקן בהדפסה, באיור ובעריכה של הספר.

עם סיום הכנתו של הספר נודע על פטירתו של לינוס פאולינג, מבכירי הכימאים של תקופתנו, אשר תרם תרומה מכרעת להבנת המיבנה המולקולרי של החלבונים. אנו מקדישים ספר זה לזיכרו.

תוכן הענינים

פתח דבר

7 פרק ראשון: לצאת מן החלבון

11 פרק שני: המוגלובין ומיוגלובין: צוות לעניין

1. עקומת קישור החמצן למיוגלובין: עקומת רוויה 13
2. עקומת הרוויה של ההמוגלובין 15
3. גורמים אחרים המשפיעים על עקומת הרוויה 19
- א. אפקט בוהר: יוני $\text{H}_3\text{O}^+_{(\text{aq})}$ כגורם אלוסטרי 20
- ב. DPG כגורם אלוסטרי 21

23 פרק שלישי: משפחת החומצות האמיניות

1. החומצות האמיניות: דו-יון 23
2. מי הן הקבוצות הנושאות מטען? 25
3. כיצד משתנה המטען עם ה-pH? 27
4. כיצד נחשב את מטען של החומצות האמיניות? 31
5. הנקודה האיזואלקטרית 32
6. אלקטרופורזה ומיקוד איזואלקטרי 33

37 פרק רביעי: אנליזה של חלבון

1. הרכב החלבון 37
2. מפוי החלבון: קביעת רצף החומצות האמיניות בשרשרת 43

פרק חמישי: מולקולת החלבון בשלושה מימדים:

53 המיבנה השניוני

1. הקבוצה הפפטידית ועמוד השידרה של החלבון 54
2. משטחים וסלילים: המיבנה השניוני של החלבונים הסיביים 58
- פיברואין 58
- קראטין 61
- קולאגן 67
3. איורים סטראוסקופיים 68

פרק שישי: מולקולת החלבון בשלושה מימדים:

79 המיבנה השלישוני של החלבונים הגלובולאריים

79 1. מיוגלובין

87 2. הריבונוקלאז כמשל

פרק שביעי: ההצמדה ההידרופובית

95 1. "הצמדה" על דרך השלילה

96 2. התבנית האמפיפאטית של המיבנה השניוני

פרק שמיני: ההמוגלובין – הזמנה להכרות אינטימית

103 1. המודל האלוסטרי: נדנדה מולקולרית;

103 2. מנגנון הנדנדה בהמוגלובין והקשרים היוניים -

107 on and off

111 3. אפקט בוהר: שווי משקל חומצה - בסיס

פרק השלמה למעוניינים: עיצוב חלבונים

115 1. מוטאציות מוכוונות

120 2. עיצוב ההמוגלובין

120 א. הכל נשאר במשפחה

122 ב. ההמוגלובין החולה

125 ג. אנמיה חרמשית

127 ד. מוטאציות מוכוונות בהמוגלובין

131 נספח א': נוסחות המיבנה של החומצות האמיניות

132 נספח ב': המיבנה הראשוני של המיוגלובין וההמוגלובין

137 נספח ג': תרשים מודל נייר של סליל α

139 נספח ד': תרשים מודל נייר של משטח קפלים β

לצאת מן החלבון

בביצה יושב אפרוח

קטן-מקור וצהב-נוצה

הוא מכה במקורו, אך

אין מפלט לו ומוצא.

זע לי, רע,

הדירה

אפלה היא וצרה.

הך בעז,

הך באון,

יש לצאת מן החלבון..."

האפרוח העשירי, נתן אלתרמן.

ראשיתו של הסיפור, לפני דורות רבים, אי אז לאחור, כשהופיעה צורת החיים הראשונית: תא בקטריאלי ארכאי, שממנו היתפתח כל מה שמצוי בעולם החי. הארועים שהולידו אותו נעלמים מאיתנו, והם ניצבים כאתגר קבוע לדימיון המדעי; אך תמונת החיים הפרושה לפנינו כיום, בכל אתר ואתר, מן התא הבקטריאלי ועד פיתולי המוח האנושי, שפע מדהים של צורות, גדלים ודפוסי התנהגות, מצביעה על עובדת יסוד פשוטה: "כל-הארץ שפה אחת" (בראשית י"א, א'); כלומר, מנקודת ראות מולקולארית, כולנו בניינים מאותן אבני-בנין, והתהליכים – דומים ביסודם בתבניות החיים כולן. וכשאנו בוחנים את האוצר העצום של התרכובות הבונות את עולם החי, רובן הגדול מאקרומולקולות, מסתבר במפתיע, שהגוון הדרמטי מצטמצם למספר קטן של יחידות מיבנה, פשוטות יחסית – כמה עשרות סוגי מונומרים בסך הכל: עשרים חומצות אמיניות בחלבונים, פחות מעשרה נוקלאוטידים בחומצות הגרעין וכתריסר סוכרים ברב סוכרים.

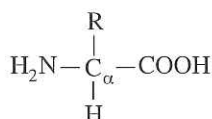
החלבונים הם המרכיב הייחודי המפעיל את כל צורות החיים והם מבצעים תחום רחב להפליא של תיפקודים ביולוגיים: באדריכלות של בנין התא, בזרוז התהליכים ובוויסותם, בגלגולי האנרגיה, בתנועה, בהגנה ועוד כהנה

וכהנה – כמעט בכל הארועים המתרחשים בעולם החי; ושםם בלעז Protein (גזור מיוונית, בה פרושו: ראשוני) – מעיד על מעמדם הבכיר. חקירת החלבונים מאפשרת לנו לבחון את השאלות הביולוגיות במונחים מולקולאריים, כשאחת המטרות המרכזיות היא להכיר את הקשר שבין תיפקודו של החלבון לבין המיבנה המולקולארי שלו.

העניין בחלבונים הולך ומתרחב כיום גם לתחומים קליניים וטכנולוגיים, בעלי משמעות כלכלית הולכת וגוברת, כש"עסקי החלבונים", בתעשייה וברפואה, צומחים במהירות. זה כבר עשרות שנים שמפיקים חלבון לצרכי מזון; אך לאחרונה, עם היבום הביוטכנולוגי של הנדסת התורשה, מתפתחת תעשייה מיוחדת לייצור אנזימים והורמונים, חומרים להמסת קרישי דם, או – ליצירתם, נוגדנים להגנה מפני פולשים זרים ועוד ... ועוד נכוננו להם עתידות!

החלבון הוא קופולימר של חומצות אמיניות

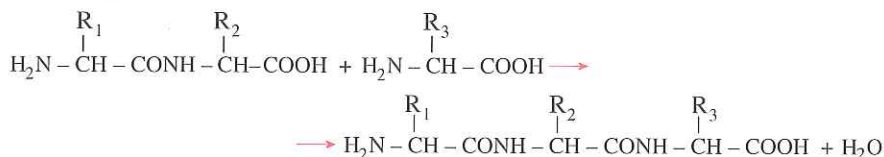
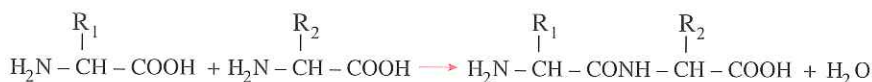
מאז גובש החלבון הראשון (המוגלובין, 1849) בודדו ונבדקו עשרות אלפי חלבונים, וגם אם זהו רק חלק קטן ממספר החלבונים המצוי בעולם החי, אפשר לראות בו בסיס מספיק להכללה הקובעת, שכולם פולימרים הבנויים מאותן יחידות מיבנה, אותם המונומרים: 20 סוגים שונים של חומצות אמיניות; הן רשומות לפניך, אחת לאחת, בטבלה שבנספח I. לכולן קבוצה קארבוקסילית וקבוצה אמינית (רק לפרולין, כפי שתוכל לראות בטבלה, יש קבוצת אמין שניוני), הקשורות לאותו אטום פחמן, המכונה אטום פחמן α ומכאן שמן: חומצות α אמיניות.



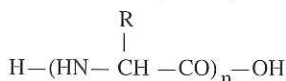
ה-R מייצג שרשרת-צד; ויש, כאמור, 20 "Rים" שונים - ועוד נשוב לכך.

החלבון נוצר כאשר מולקולות החומצות האמיניות מתפלמרות לשרשרת, בתגובת דחיסה בין הקבוצה הקארבוקסילית של חומצה אמינית אחת והקבוצה האמינית

של חומצה אמינית שכנה:

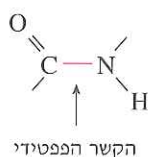


וכך הלאה, שוב ושוב, עד לקבלת השרשרת השלימה:



n – הוא מספר יחידות החומצה האמינית בשרשרת, הנע מעשרות אחדות ועד מאות רבות, וגם עד 1000 ויותר הוא מגיע.

הקבוצה $-\text{CONH}-$, שהיא קבוצת הקישור שבין החומצות האמיניות הנדחסות לשרשרת, נקראת כאן הקבוצה הפפטידית, והשרשרת כולה – פוליפפטיד, (כשהשרשרת קצרה – מסתפקים בשם 'פפטיד'). הקשר הפפטידי – באופן ממוקד יותר – הוא הקשר הקוולנטי שבין אטום הפחמן מן הקבוצה הקארבוקסילית ואטום החנקן מן הקבוצה האמינית. החלבונים הם, אם כן, שרשרות פוליפפטידיות – קופולימרים של חומצות α אמיניות. (את השם הזה קבע, בראשית המאה, הכימאי הגרמני אמיל פישר, שהיה גם הראשון שסינתז פפטיד במעבדה).



הדחיסה הזאת איננה מתרחשת מאליה. בתא החי היא מתבצעת בעזרת אנזימים מתאימים ו-ATP. ובהכוונה תורשתית, על פני אברונים מיוחדים, המצויים בכל תא, הנקראים ריבוסומים. וכדי להפעילה במבחנה, שלא בדרך הביולוגית, יש צורך במגיבים מיוחדים ובסביבה אלמימית – ולא נעסוק בכל אלה כאן.

גם התגובה ההפוכה לדחיסה, ההידרוליזה, שבה חוזרות מולקולות המים ל"מקומן" ומפרקות את השרשרת לחומצות אמיניות ניפרדות – כשהיא מתרחשת בתא החי, היא נעזרת

באנזימים מתאימים; וכשהיא מתרחשת במבחנה, היא נעזרת בחומצה ובחימום. ובאלה עוד נדון.

הטבלה שלפניך מציגה מספר טיפוסי חלבונים המצויים בגוף:

שם החלבון	מסה מולרית, g/mol	תיפקוד ביולוגי
אינסולין	5,730	וויסות רמת הסוכר בדם.
ריבונוקלאז	12,640	הידרוליזה של חומצת הגרעין RNA.
ציטוכרום C	13,370	הולכת אלקטרונים בתגובות חימצון-חיזור.
ליזוזים	13,390	שבירת דופן תאי חיידקים.
מיוגלובין	16,890	איחסון חמצן בשרירים.
טריפסין	23,800	הידרוליזה של חלבונים בתהליך העכול.
המוגלובין	66,700	הולכת חמצן בדם.
נוגדן IgG	160,000	הגנה מפני גופים זרים בדם.
קאטאלאז	247,000	פרוק H_2O_2 למים ולחמצן.
פיברינוגן	330,000	קרישת הדם.
קולאגן	345,000	חומר בנית בעור, בסחוס, בעצמות.
מיוזין	525,000	מרכיב סיבי השרירים.

שים לב למיגוון התיפקודים הביולוגיים של החלבונים, ואין כאן אלא מעט מזעיר ממיכלול הפעולות שהם מבצעים ומאפשרים כך לייצורים החיים לבנות את עצמם, לנוע, לנשום, להגן, להתרבות, לפרוח, לחשוב, לאהוב - בבחינת "אמור לי מי הם חלבונך ואומר לך מי אתה".

בתא החיידק יש יותר מאלף סוגי חלבונים שונים, ובתאי גופנו מצויים עשרות אלפים סוגים שונים של חלבון. כוונתו של הכימאי, ב"אמור לי מי הם חלבונך", היא רצונו לדעת מי הן החומצות האמיניות הבונות כל חלבון ומהו סדר הופעתן בשרשרת הפוליפטידית, כך שאפשר יהיה לייצג את מולקולת החלבון בנוסחת מיבנה מפורטת. ואחר-כך להכיר את צורתה המרחבית של מולקולת החלבון, כדי לבחון את הקשר שבין מיבנה המולקולה ובין הפעילות המיוחדת לה ודרכי תגובתה לסביבה הביולוגית בה היא מצויה. ואפילו - להעזי ולהתערב במיבנה וכך להשפיע על הפעילות. זוהי משימתנו בספר זה - ונתחיל בהמוגלובין...

המוגלובין ומיוגלובין: צוות לעניין

"למה המוגלובין?"

יש לכך כמה סיבות טובות.

ראשית משום שיש לו זכות ראשונים בהיסטוריה של מחקר החלבונים, שהרי הוא החלבון הראשון שגובש (1849), והראשון שידעו להגדיר את תיפקודו הפיסיולוגי (1864); והוא ובן משפחתו, המיוגלובין, היו החלבונים הראשונים שנחשפו למחקר קרני-X ולפענוח המבנה המרחבי שלהם. (פרס נובל, 1962, לפרוץ ולקנדריו (Perutz and Kendrew). וכן משום שהוא נפוץ ומוכר, שהרי ידוע לכל שהוא הנותן לדם את צבעו האדום. מוכר – לא רק להדיוטות, אלא גם המוכר ביותר והמובן ביותר לחוקרי החלבונים.

אך בעיקר משום שהוא שימש עבור הכימאים מעין "שפן הניסיונות" של החלבונים, עליו למדו את פרטי המבנה המולקולארי, את התיפקוד הפיסיולוגי ואת דרך יצירתו והתפתחותו בבעלי-חיים שונים. לכן יכול ההמוגלובין להיות גם עבורינו מודל מתאים להבנת הקשר המבוקש בין המבנה והתיפקוד במולקולות החלבונים.

אל נא תבהל מן הפרטים הרבים שיופיעו במהלך הדיון. לא יהיה צורך לזכור אותם בעל-פה. הם נחוצים לנו, כמו בסיפור בלשי, להבנה שלימה של הרפתקת ההמוגלובין. כך גם תוכל להכיר טוב יותר את ה"ראש הכימי" ...

ההמוגלובין, שהוא נושא החמצן בדם, והמיוגלובין – אסם החמצן בשרירים, שייכים למשפחה אחת. הקשר ביניהם, כמובן, אינו מקרי – הם פועלים כצוות במשימה משותפת: הספקת חמצן לרקמות השונות בגוף. רק יצורים מעטים אינם נזקקים לחלבונים כאלה, כי צרכי נשימתם מתמלאים בפעפוע פשוט של מולקולות החמצן דרך כל גופם. אך הפעפוע איטי מכדי לספק יצורים גדולים, והחמצן המצוי בתמיסות שברקמות בריכוז של כ- $3.5 \times 10^{-5} M$, אינו יכול לקיים בהם את פעילות החיים. כאן נחוצה עזרת ההמוגלובין. ההמוגלובין, המצוי בתאי-הדם האדומים,

קושר אליו את מולקולות החמצן כשהוא עובר בזימים או בריאות, ומוסר אותן אחר-כך, במסעותיו ברקמות. בעזרת ההמוגלובין מגיע ריכוז החמצן בתמיסת הדם לכדי $7-9 \times 10^{-3} M$, שהוא דומה לריכוז החמצן באויר.

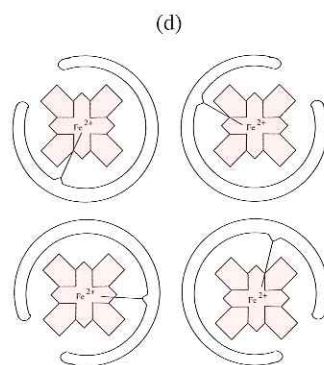
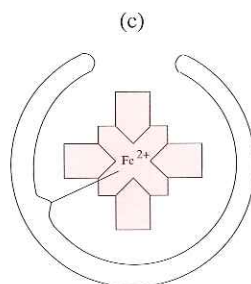
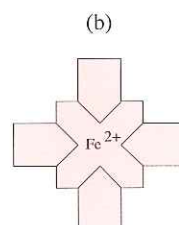
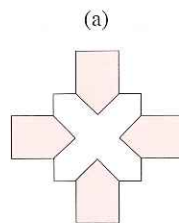
המיוגלובין, המצוי בשרירים הרצוניים, מאחסן את מולקולות החמצן, המגיעות אליו מן הדם עד שתידרשנה לפעילותם. שניהם, ההמוגלובין והמיוגלובין, כצוות, ממחישים את יסודות "הנדסת חלבונים" המתאימה את המבנה לתיפקוד:

א. להמוגלובין צריכה להיות זיקה גבוהה לחמצן, כשהספקה שופעת – בריאות; וזיקה נמוכה לחמצן בסביבה דלת חמצן – כדי שיוותר עליו ברקמות.

ב. למיוגלובין צריכה להיות זיקה גבוהה יותר לחמצן מזו של ההמוגלובין, בריכוזי החמצן הנמוכים יחסית בשרירים, כדי שהמיוגלובין יוכל לקשור את החמצן, בעוד ההמוגלובין מתפרק ממנו.

ג. ההמוגלובין צריך לשחרר חמצן ביתר קלות לשריר עובד, המייצר פחמן דו-חמצני וחומצת-חלב, מאשר לשריר במנוחה הזקוק לפחות חמצן.

"לבו" של ההמוגלובין, כמו במיוגלובין, הוא קבוצת ההם ויון הברזל שבמרכז. למולקולת ההם יש צורה של טבעת מישורית המורכבת מארבע טבעות מחומשות, שאטומי החנקן המוצבים בקדקדן, קושרים את יון הברזל שבמרכז; ויון הברזל הוא נקודת הקישור של מולקולת החמצן. ראה איור בשולי העמוד. במיוגלובין, עטוף ההם בשרשרת חלבון בת 153 חומצות אמיניות, היוצרות את ה"קופסה" שבה הוא נתון. כך גם בהמוגלובין – אלא שכאן יש ארבע שרשרות, ארבע תת-יחידות (לכן הוא מכונה טטראמר), שכל אחת מהן מחזיקה בקבוצת הם משלה: שתי שרשרות זהות, המכונות α , בנות 141 חומצות אמיניות כל אחת; ושתי שרשרות נוספות, זהות אף הן, המכונות β , בנות 146 חומצות אמיניות כל אחת. בסך-הכל מגיע ההמוגלובין, הבנוי מ-574 חומצות אמיניות למסה מולרית כוללת של כ- $67,000 \text{ g/mol}$ – ממש מולקולות ענק. כל תת-יחידה בהמוגלובין, כל שרשרת, בנויה באופן דומה מאד למתכונת שרשרת המיוגלובין; וכך אפשר לתאר את ההמוגלובין,

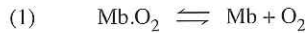


תרשים סכימטי של
 a. פורפירין
 b. הם
 c. מיוגלובין
 d. המוגלובין

בלשונו של פרוץ, כ"ארבע מולקולות מיוגלובין קשורות יחדיו".

1. עקומת קישור החמצן למיוגלובין: עקומת רוויה.

מולקולת המיוגלובין קושרת אליה מולקולת חמצן אחת, ומשחררת אותה בתהליך שווי-משקל:



Mb – מיוגלובין.

נבחן את התגובה הזאת בעזרת הכלים שפיתחנו למערכות שווי-משקל, כשקבוע שווי המשקל של התגובה הזו מבטא את זיקת המיוגלובין לחמצן; ומשום שמוצגת כאן תגובת הפרוק מחמצן, הרי ככל שהקבוע קטן יותר, הזיקה לחמצן גדולה יותר:

$$(2) \quad K' = \frac{[\text{Mb}] \cdot [\text{O}_2]}{[\text{Mb} \cdot \text{O}_2]}$$

החמצן שבתמיסה נמצא בשיווי-משקל עם החמצן שבאוויר. לכן נוח לבטא את ריכוז החמצן לא ביחידות המוכרות לך, מולים בליטר, אלא ביחידות לחץ המתאימות לגזים. ואפשר להראות, בעזרת משוואת הגזים שלמדת, שכאשר הטמפרטורה קבועה, יש יחס ישר בין הריכוז ללחץ, וניתן להחליף יחידות ריכוז ביחידות לחץ:

$$PV = nRT$$

P – לחץ (פסקל)

V – נפח (מטר מעוקב)

n – מספר המולים

T – טמפרטורה (קלווין)

R – קבוע הגזים, שהוא 8.3 J/mol.K

$$P = \frac{n}{V} RT \quad \text{— מכאן}$$

n/V מבטא את ריכוז הגז, ואמנם כאשר T קבוע ו-R קבוע (תמיד), הוא נמצא ביחס ישר ללחץ.

למשל: באוויר יש כ-20 אחוזים נפחיים של חמצן. כלומר, בטמפרטורת החדר (298K) יהיה ריכוזו:

$$8 \times 10^{-3} \text{ M} = 25 \text{ ליטר} / 0.2 \text{ מול}$$

נשתמש במשוואת הגזים כדי לבטא את הריכוז ביחידות לחץ:

$$(0.2 / 25 \cdot 10^{-3}) \cdot 8.3 \cdot 298 = 19,800 \text{ pascal}$$

נעבור ליחידות מיליבר, mbar, שהן יחידות לחץ מקובלות יותר:

$$100 \text{ pascal} = 1 \text{ mbar} = 0.75 \text{ mm Hg}$$

כלומר, "ריכוז" החמצן באוויר, ביחידות לחץ, הוא 198 mbar, או "בשפה המקצועית" – לחץ החמצן באוויר $P_{O_2} = 198 \text{ mbar}$.

באוויר הנשוף יש כ-16% חמצן. מהו לחץ החמצן באוויר הנשוף? 

נציב את לחץ החמצן במקום הריכוז בבטוי שווי המשקל (2) ונקבל לקבוע ביטוי חדש, אך במתכונת מוכרת:

$$(3) \quad K = \frac{[Mb] \cdot P_{O_2}}{[Mb \cdot O_2]}$$

נוח ומקובל להציג את תגובת המיוגלובין בהצגה גרפית, בעזרת גדל חדש, y , שקל לקשור אותו לקבוע שיווי המשקל. y הוא מידת הרוויה של המיוגלובין בחמצן: מנת מולקולות המיוגלובין הקושרות חמצן ביחס לכלל מולקולות המיוגלובין שבמערכת:

$$(4) \quad y = \frac{[Mb \cdot O_2]}{[Mb \cdot O_2] + [Mb]}$$

לפי (3):

$$[Mb \cdot O_2] = \frac{[Mb] \cdot P_{O_2}}{K}$$

נציב זאת ב-(4) ונקבל:

ומכאן:

$$(5) \quad y = \frac{P_{O_2}}{K + P_{O_2}}$$

לפנינו בטוי נוח מאד, שאינו תלוי כלל בריכוז המיוגלובין עצמו, אלא בלחץ החמצן בלבד; וכשיודעים את K אפשר להכין את עקומת הרוויה של המיוגלובין: מהלך y , מידת הרוויה, לפי לחץ החמצן.

P_{O_2} , mbar	0.5	1.0	2.0	4.0	7.0	10	15	20	30	50
y	0.12	0.21	0.35	0.52	0.66					

נתון: $3.66 = K$ (מיוגלובין) השלם את הטבלה
 הנתונה ושרטט על פיה את גרף הרוויה של המיוגלובין.

עקומת רוויה כזאת אפשר לאפיין בערכו של P_{50} , שהוא לחץ החמצן שבו מידת הרוויה של המיוגלובין היא 50% ($y = 0.5$).

$$0.5 = \frac{P_{50}}{K + P_{50}} \Rightarrow P_{50} = K$$

לפיכך, משוואה (5) יכולה לקבל את הצורה:

$$(6) \quad y = \frac{P_{O_2}}{P_{50} + P_{O_2}}$$

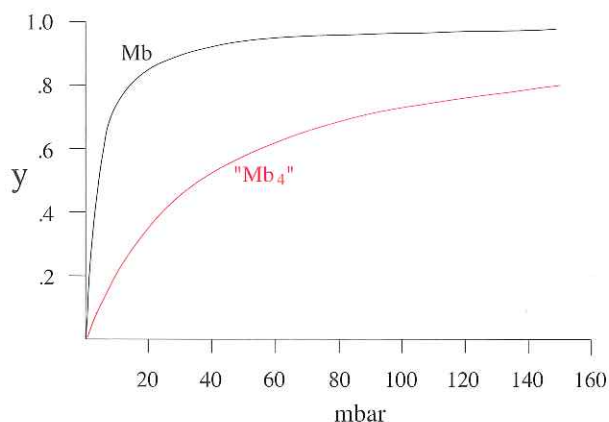
בדוק בגרף הרוויה ששירטטת את ערכו של P_{50} של המיוגלובין.

כמובן, כאשר $P_{O_2} \gg P_{50}$, y מתקרב ל-1 (100% רוויה). הואיל ולחץ החמצן בשרירים הוא כ-20 מיליבר, המיוגלובין מגיע בנקל לרוויה מלאה כמעט.

2. עקומת הרוויה של ההמוגלובין

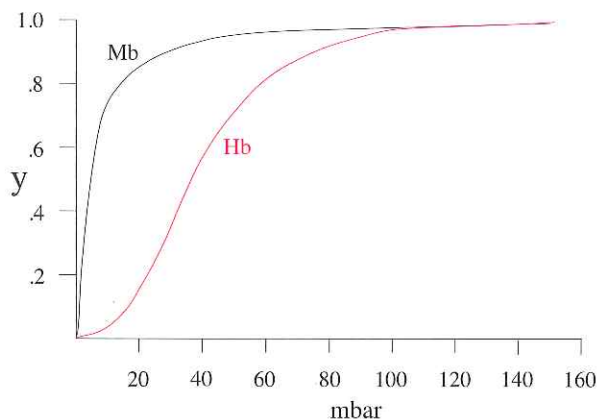
בהמוגלובין, בתמיסת הדם, $P_{50} = 35.5$ mbar; כלומר זיקתו לחמצן קטנה מזו של המיוגלובין (כך "ביקשנו", הלא כן?). אם נתייחס להמוגלובין כלצבר פשוט של ארבע תת-

יחידות "Mb₄", המתפקדות כל אחת לעצמה, כמו המיוגלובין, יהיה עלינו לשרטט עקומת רוויה, שקצב עלייתה איטי ביותר, המתקרבת לרוויה רק כאשר $P_{O_2} \gg 35.5 \text{ mbar}$, כמו בגרף הבא – ובריאות כש- $P_{O_2} \approx 135 \text{ mbar}$, עדיין לא מושגת הרוויה:



דימוי לעקומת רוויה של "Mb₄"
בהשוואה לעקומת רוויה של Mb.

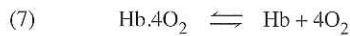
אך הנה מיסתבר שהתמונה מורכבת יותר: לעקומת הרוויה של ההמוגלובין יש צורה שונה, צורה סיגמואידית (צורת S).



עקומת רוויה של המוגלובין
בהשוואה לעקומת רוויה של מיוגלובין

העקומה הסיגמואידית והעקומה הרגילה מגיבות אחרת לשינויים בלחץ החמצן: כשהלחץ עולה מ-0 ל-20 mbar, מגיע המיוגלובין ל 84% רוויה ואילו ההמוגלובין – ל-17% בלבד. ודוקא ה"פיגור" הזה נותן להמוגלובין רגישות יתר לשינויים בלחץ החמצן.

אפשר להסביר התנהגות כזאת בהנחה שההמוגלובין פועל בנוסח של "הכל או לא כלום". כלומר, במולקולת ההמוגלובין פועלות ארבע התת-יחידות במשותף, כיחידה קואופרטיבית אחת, המגיבה עם ארבע מולקולות החמצן במהלך משולב אחד:



Hb – המוגלובין

וכך אמורות להיות במערכת או מולקולות המוגלובין פנויות מחמצן, או מולקולות המוגלובין הנושאות ארבע מולקולות חמצן – ואין מצבי ביניים. במקרה כזה יקבל בטוי שווי-המשקל את התבנית הבאה:

$$(8) \quad K = \frac{[\text{Hb}] \cdot \text{Po}_2^4}{[\text{Hb} \cdot 4\text{O}_2]}$$

ובמהלך אלגברי פשוט, דומה לזה שעשינו לגבי המיוגלובין, נקבל:

$$(9) \quad y = \frac{\text{Po}_2^4}{K + \text{Po}_2^4} = \frac{\text{Po}_2^4}{\text{P}_{50}^4 + \text{Po}_2^4}$$

ב-1913, שנים רבות לפני שהתברר אופן פעולת ההמוגלובין, הציע ארציבאלד היל (Archibald Hill) את המשוואה הנושאת את שמו, המתארת היטב את עקומת הרוויה:

$$(10) \quad y = \frac{\text{P}_{\text{O}_2}^n}{\text{P}_{50}^n + \text{P}_{\text{O}_2}^n}$$

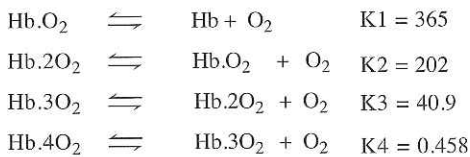
כש- n ניקרא מקדם היל (Hill coefficient).



מהו, אם כן, "מקדם היל" המתאים למיוגלובין?

מקדם היל מראה את מידת השותפות הקיימת בין התת-יחידות בהמוגלובין. אם $n = 1$, אין כלל שותפות, וכל שרשרת קולטת חמצן באופן עצמאי, כמו המיוגלובין. אם $n = 4$ – השותפות מושלמת, וכל השרשרות מגיבות יחדיו, בנוסח: "הכל או לא כלום". למעשה יש שותפות, אך היא איננה "אידיאלית", ובמציאות נימדד n קטן יותר: 2.8. יש אם כן מידת מה של קואופרטיביות בין התת-יחידות בהמוגלובין: הזיקה למולקולת החמצן הראשונה נמוכה ביותר; אך משזו נכנסה כבר למולקולת ההמוגלובין תהיה הזיקה למולקולות החמצן השניה והשלישית גדולה יותר; ולמולקולת החמצן הרביעית יש כבר זיקה גדולה אף מזו של המיוגלובין.

והיפוכו של הסיפור כשההמוגלובין עמוס בחמצן: נטייתו להפסיד את מולקולת החמצן הראשונה קטנה ביותר; אך עם כל מולקולה שיוצאת יורדת הזיקה לנותרות, כך שהבאה בתור יוצאת ביתר קלות.



תמיכה במודל הקואופרטיבי לפעילות ההמוגלובין אפשר למצוא בנתוני ההתפלגות היחסית של מולקולות ההמוגלובין, כש- $y = 0.5$:

ריכוז יחסי	סמל החלקיק
0.370	Hb
0.144	Hb.O ₂
0.038	Hb.2O ₂
0.022	Hb.3O ₂
0.426	Hb.4O ₂

הנה כי כן, רוב המולקולות אמנם מצויות באחד משני המצבים הקיצוניים: Hb או $Hb \cdot 4O_2$; ומצבי הביניים מופיעים בריכוזים נמוכים יותר.

הקואופרטיביות הזאת בהמוגלובין מבטיחה את יעילות הטעינה והפריקה, כשהדם עובר מן הריאות לשרירים, בתחומי השנויים הנתונים בלחץ החמצן:

בריאות — $\sim 135 \text{ mbar}$
בשרירים — $\sim 20 \text{ mbar}$

כאשר $n = 2.8$ יהיה y בריאות — 0.98
ובשרירים — 0.17

ההפרש, $\Delta y = 0.81$, הוא תרומת החמצן שנותן ההמוגלובין לשרירים.

נניח מולקולה מדומה עם $P_{50} = 35 \text{ mbar}$, כמו בהמוגלובין — אך ללא קואופרטיביות כלל; כלומר $n = 1$.

חשב את ערכו של y בריאות ובשרירים, ואת ההפרש בין השניים; השווה אותם לנתונים שלמעלה.

נניח כעת מולקולה מדומה אחרת: $P_{50} = 35 \text{ mbar}$, כמו בהמוגלובין — אך $n = 4$. מהו y בריאות ובשרירים, ומהו ההפרש ביניהם? מסתבר, שיש מקום לשיפורים...

3. גורמים אחרים המשפיעים על עקומת הרוויה

ההמוגלובין שונה מהמיוגלובין לא רק בצורתה של עקומת הרוויה, אלא גם בכך שהיא מושפעת מגורמים שונים המצויים בתמיסה. להשפעה הזאת קוראים השפעה אלוסטרית (allo — אחר, ביוונית), משום שמדובר במולקולות השונות בתכונותיהן ממולקות החמצן, ולפיכך הן גם פועלות עם מולקולת ההמוגלובין באתר פעילות אחר מזה של החמצן.

ג. אפקט בוהר: יוני $\text{H}_3\text{O}^+_{(\text{aq})}$ כגורם אלוסטרי

כריסטיאן בוהר (Christian Bohr), פיסיולוג דני, אביו של נילס הידוע, מצא ב-1904 שפחמן דו-חמצני הנוצר ברקמות מפחית את זיקת ההמוגלובין לחמצן.

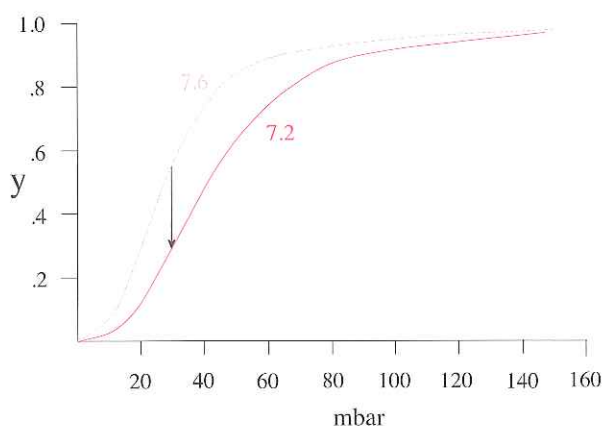
CO_2 מגיב עם המים, בעזרת האנזים קארבוניק-אנהידראז, בתגובה המייצרת יוני הידרוניום:



למעשה התברר, שעלית ריכוז יוני ההידרוניום (וירידה ב-pH) היא זו שפוגעת בזיקת ההמוגלובין לחמצן – תופעה

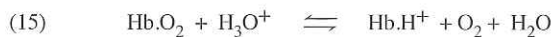
המכונה **אפקט-בוהר**: ב-7.6 pH $P_{50} = 27 \text{ mbar}$

ב-7.2 pH $P_{50} = 41 \text{ mbar}$



עקומת רוויה של Hb, תלות ב-pH.
מה מראה החץ?

נראה שמולקולות החמצן ופרוטוני H^+ הם אנטגוניסטיים – כלומר, "יריבים": כניסת פרוטוני H^+ להמוגלובין (עם הירידה ב-pH) דוחקת ממנו את מולקולות החמצן, וכניסת מולקולות החמצן דוחקת את פרוטוני ה- H^+ . אפשר לכתוב זאת בניסוח תגובת שווי-משקל פשוטה (מבלי להתייחס למספר מולקולות החמצן ופרוטוני ה- H^+ המגיבים):



אמרנו, בראשית דברינו בפרק זה, שראוי לו, להמוגלובין, שישחרר חמצן לשריר עובד ביתר קלות

מאשר לשריר במנוחה.

כיצד מבטיח אפקט בוהר את ביצוע המשימה הזאת?

ב. כגורם אלוסטרי DPG

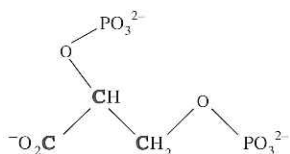
$\text{H}_3\text{O}^+(\text{aq})$ הוא גורם המשפיע על הפעילות השוטפת של ההמוגלובין בטווחי-זמן קצרים, כשהוא עובר מן הריאות אל השרירים. DPG (2,3 Diphospho Glycerate), הוא חומר המצוי בתאי-הדם אדומים בריכוז דומה לזה של ההמוגלובין (כ-4 mM), והוא גורם אלוסטרי המשפיע על טווחי זמן ארוכים יותר.

ה-DPG ניקשר לדאוקסימהמוגלובין וגורם ליציאת מולקולות החמצן מהאוקסימהמוגלובין, גם כאן - בתגובת שווי-משקל:



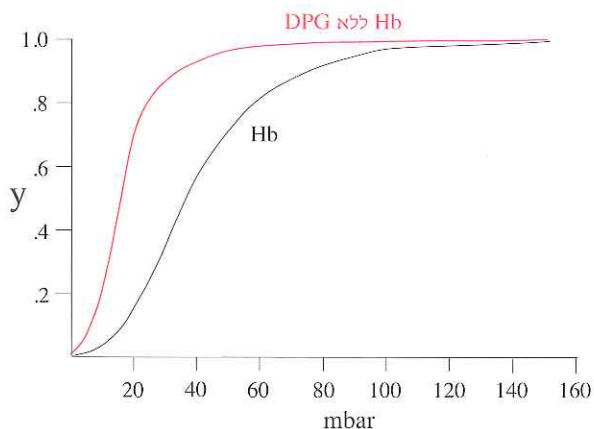
ללא ה-DPG היתה זיקת ההמוגלובין לחמצן גדולה יותר, וגם בלחץ החמצן הנמוך בשרירים היה ההמוגלובין ממשיך להחזיק בחמצן.

(חשב ומצא, כש- $P_{50} = 15 \text{ mbar}$ ו- $P_{\text{O}_2} = 20 \text{ mbar}$.)
 $y = 0.69 \leftarrow$



3,2 דיפוספו גליצראט

Hb.02 : אוקסימהמוגלובין
Hb : דאוקסימהמוגלובין



עקומת רוויה של Hb ללא DPG בהשוואה ל- Hb בנוכחות DPG

בתנאים של מחסור כרוני בחמצן, הגוף מייצר כמות נוספת של DPG, כדי לסייע להמוגלובין בתיפקודו. כך במצב של אנמיה (איבוד המוגלובין); או במעשנים, כש-CO ניקשר להמוגלובין ופוגם בכשרו לשאת חמצן; או בחשיפה לגבהים, בהם האוויר דליל – בבוליביה, למשל, נמצא שלתושבי האנדים הגבוהים יש DPG ב-20% יותר מאשר לתושבי השפלה ו- P_{50} מגיע ל-40mbar ~.

המוגלובין מיוחד במינו הוא ההמוגלובין המצוי בעובר: HbF (Fetus: עובר). הטראמר של ההמוגלובין הזה מרכב משתי שרשרות α ושתי שרשרות γ . שרשרת γ דומה מאד לשרשרת β , וגם היא בנויה מ-146 חומצות אמיניות. אך יש הבדל אחד ברור מאד: הזיקה של HbF ל-DPG קטנה יותר מזו של ההמוגלובין הרגיל המצוי בדמה של האם. בגלל הזיקה הקטנה יותר ל-DPG יש ל-HbF זיקה חזקה יותר לחמצן: $P_{50} = 28\text{mbar}$ – חזקה מזו של ההמוגלובין של האם, ולפיכך עובר החמצן דרך השיליה מדם האם לדם העובר.

לאחר הלידה אין יותר תועלת ב-HbF ויצירתו מסתיימת בהדרגה. תוך 4-6 חדשים הוא נעלם ואת מקומו תופס HbA (כך נקרא ההמוגלובין הרגיל) של הבוגר.

איך מתנהל כל העניין? מהו מקור "התבונה המולקולארית" המיתגלה כאן בתיפקוד ההמוגלובין? במה שונות שרשרות ההמוגלובין מאלו של המיוגלובין, כך שהן זוכות לקיים ביניהן שיתוף פעולה? כיצד פועלים עליהן הגורמים האלוסטריים השונים?

הואיל וכל מה שיש להמוגלובין הן החומצות האמיניות הבונות את שרשרותיו – הרי לחומצות האמיניות הפתרוניים. הגיע, אם כן, הזמן לפנות אליהן בתשומת לב, כדי ללמוד את "שפתן", להכיר את "אורחות חייהן" ולבנות איתן את הכלים להכרת מבנה מולקולות החלבון ככלל, ומולקולות ההמוגלובין בפרט.

ובכן, צעד ראשון – אבני הבנין: החומצות האמיניות.

משפחת החומצות האמיניות

אפשר לראות בנוסחת המיבנה הכללית של החלבונים, הרשומה כאן, שהואיל וכולם פוליפפטידים של חומצות α אמיניות, יהיה, תמיד-תמיד, לכל החלבונים, אותו עמוד-שידרה:



עמוד השידרה של שרשרת החלבון בנוי, אם כן, מאטומי פחמן α ומקבוצות הקשר הפפטידי שביניהם; ואלה, כאמור, שווים בכל החלבונים כולם. ואם יש הבדל בין החלבונים השונים, אלה הן שרשרות הצד ש"עושות את המנגינה". לפיכך, כדי להכיר את החלבון ולהבין את מיבנהו, עלינו להקדים ולעשות הכרות אינטימית יותר עם אבני הבנין שלו: עם החומצות האמיניות למיניהן; וקודם לכל, על פי שמן – עם התנהגותן בתגובות חומצה-בסיס.

1. החומצות האמיניות: דו-יון

כשמתבוננים בנוסחת המיבנה של החומצה האמינית, קל לראות שיש כאן גם קבוצה חומצית וגם קבוצה בסיסית. אם כך, אפשר לשאול, למה לא תגיב החומצה האמינית עם עצמה?

ובכן – היא תגיב!! התוצר הוא דו-יון, Zwitterion בלעז, שפרושו יון-כלאיים, וקיומו מסביר את התנהגותן של החומצות האמיניות, הן במוצק והן בתמיסה. נבחן יחד את הנתונים הבאים:

נקודת היתוך, °C	מסה מולרית, ג'	
-22	74	חומצה פרופאנואית $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$
-50	73	בוטיל אמין $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$
+253	75	גליצין ?
+233	68	נתרן מתאנואט $\text{Na}^+\text{HCO}_2^-$

חומר בעל מולקולות שהמסה המולרית שלהן דומה לזו של מולקולות הגליצין, אמור היה להיות, בטמפרטורת החדר, נוזל נדיף, או גז – אך הגליצין הוא מוצק, כחומרים היוניים, שלהם נקודת היתוך גבוהה יחסית.

ובכן, האם מתאימה לכאן הנוסחה חסרת המטען, או שמא נוסחת הדו-יון?



זהו, כמובן, שאלה רטורית, שכן התשובה, הרי מתבקשת מאליו...

ניסוי 1



תגובת חומצה אמינית בתמיסה עם חומצה ובסיס

א. שים במבחנה אחת כ-5 מ"ל תמיסת 2M NaOH ובמבחנה שניה – נפח שווה של מים. הוסף לכל מבחנה 10 טיפות חומצה הקסאנואית, $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{COOH}$. טלטל מעט וציין את מסיסו החומצה ההקסאנואית במים ובתמיסת הבסיס. הוסף למבחנה הבסיסית מעט תמיסת 2M HCl, עד שתבחין בשנוי במסיסות.



רשום ניסוחים לתגובות שבצעת.

ב. שים במבחנה אחת כ-5 מ"ל תמיסת 2M HCl ובמבחנה שניה – נפח שווה של מים. הוסף לכל מבחנה 10 טיפות הקסילאמין, $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NH}_2$. טלטל מעט וציין את מסיסות ההקסילאמין במים ובתמיסת חומצה. הוסף למבחנה החומצית מעט תמיסת 2M NaOH, עד שתבחין בשנוי במסיסות.



רשום ניסוחים לתגובות שבצעת.

ג. שים בשלוש מבחנות מנה קטנה של חומצה אמינית בעלת מסיסות נמוכה במים, כדוגמת הלויצין או האיזולויצין (במה שוות החומצות האמיניות האלה לחומרים שנבדקו בסעיפים א' ובי'). שים לב למצב הצבירה של החומצה האמינית, השונה מזה של החומצה והאמין.

למבחנה אחת הוסף מעט מים, לשניה – תמיסת 2M HCl ולשלישית – תמיסת 2M NaOH. ציין את מסיסות החומצה האמינית בכל תמיסה.



רשום ניסוחים לתגובות שבצעת.

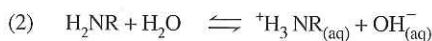
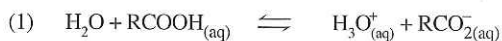
מהניסוחים שכתבת מסתבר, שמטען המולקולות של החומצה האמינית בתמיסה, משתנה לפי ה-pH של התמיסה. והואיל וכולנו מלומדים וכולנו יודעים את תורת שווי המשקל, יש בידינו דרך לחשב את המטען המתאים לכל pH בתמיסה. אך לפני שניפנה לחישובים, נשים לב לכך שיש חומצות אמיניות אחדות שיש להן קבוצה חומצית או בסיסית גם בשרשרת-הצד שלהן, ולכך תהיה כמובן השפעה על מטען המולקולה בתמיסה.



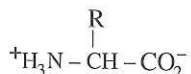
התבונן בטבלת נוסחות המיבנה של החומצות האמיניות וציין מי הן החומצות האמיניות האלה?

2. מי הן הקבוצות הנושאות מטען?

חומצה אמינית מגיבה, אם כן, עם המים בתגובת חומצה-בסיס. אין כאן כל הפתעה: הקבוצה הקארבוקסילית מאבדת פרוטון וזוכה במטען -1 , והקבוצה האמינית קולטת פרוטון וזוכה במטען $+1$.



כך מופיע בתמיסה חלקיק שהוא דו-יון:



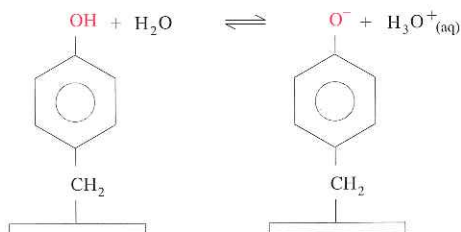
ויש, מסתבר, חומצות אמיניות שגם בשרשרת-הצד שלהן יש קבוצה פעילה היכולה לרכוש מטען בתמיסה המימית:

בחומצה האספארטית ובחומצה הגלוטאמית מופיעה
 בשרשרת-הצד עוד קבוצה קארבוקסילית, והיא, כמו ה- α
 קארבוקסיל, יכולה לשאת מטען -1.
 בליזין, בשרשרת-הצד שלו, יש עוד קבוצת אמין, וגם הוא,
 בדומה ל- α אמין, יכול לקבל מטען +1.

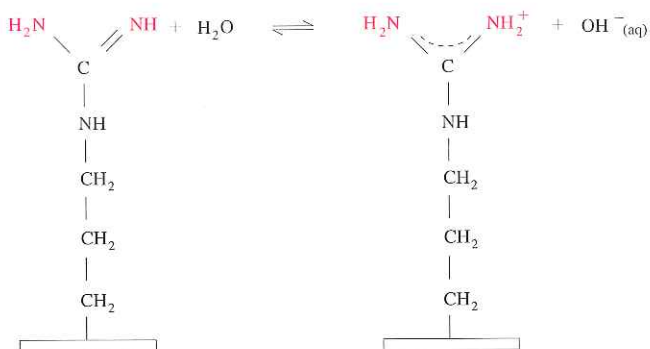
ויש גם:



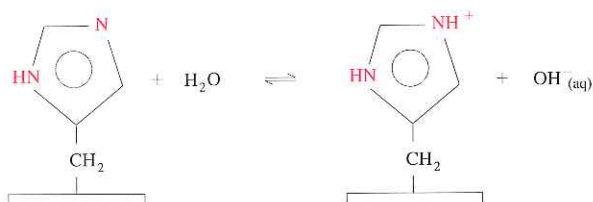
ציסטאין:



טירוזין:



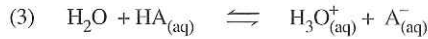
ארגינין:



היסטידין:

3. כיצד משתנה המטען עם ה-pH?

כמצוות כל תגובות החומצה-בסיס, גם אלה שלנו הן תגובות שווי-משקל, שיש לבחון אותן על פי עקרון לה-שטליה, או לחשב אותן על פי קבוע שווי-המשקל. נדון במקרה כללי



כאן המטען של חלקיקי החומצה (HA) הוא אפס, ושל חלקיקי הבסיס הצמוד הוא $1- (\text{A}^-)$. כלומר, יש בתמיסה שתי תת-קבוצות הנבדלות במטען, שהחלוקה ביניהן תלויה בתנאי שווי-המשקל. אם יש עדיפות מכרעת לתוצרים יהיה מטען $1-$ לכל החלקיקים (כמעט), ואם העדיפות למגיבים – לכולם (כמעט) מטען 0 .

ומה יקרה במצבי הביניים?
עלינו לדעת את אופן התפלגות החלקיקים בין שתי התת-קבוצות: חסרי המטען ובעלי המטען $1-$, ואז נוכל לחשב מטען ממוצע: המספר הכולל של המטענים $1-$ מחולק במספר הכולל של אוכלוסיות החלקיקים כולה.
למשל: בתמיסה המכילה 100 מולקולות חומצה HA, אשר 25 מהן הגיבו וזכו במטען, A^- , בעוד 75 נותרו שלימות, חסרות מטען, HA – יהיה המטען הממוצע:

$$-0.25 = 100 : (-25)$$

אין פרוש הדבר ש-25 מולקולות נושאות מטען $1-$ דרך קבע, ו-75 האחרות חסרות מטען תמיד – אלא, שעל פי כללי המשחק בשווי-המשקל הדינמי, כל מולקולה נושאת מטען רבע מן הזמן, בעוד שבשלושה רבעי הזמן היא אינה טעונה:

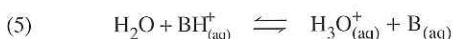
$$-0.25 = 0.75 (0) + 0.25 (1-)$$

לה-שטליה לימד אותנו, שככל שה-pH יורד (עולה ריכוז $(\text{H}_3\text{O}^+_{(\text{aq})})$, מגיבה מערכת שווי-המשקל (3) לכוון המגיבים, יורד חלקן היחסי של המולקולות נושאות המטען, והמטען הממוצע הולך ויורד עד אפס. וכשה-pH עולה (יורד ריכוז

$(\text{H}_3\text{O}^+_{\text{(aq)}})$, מגיבה מערכת שווי-המשקל (3) לכוון התוצרים, עולה גם חלקן היחסי של המולקולות הטעונות, והמטען הממוצע עולה בהדרגה עד 1-.



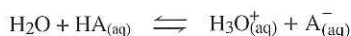
שיקולים מקבילים ינחו אותנו, גם כשנדון בתגובה:



BH^+ מייצג את החומצה הצמודה לבסיס B, כמו למשל NH_4^+ , שהוא חומצה צמודה של NH_3 . כאן, כמובן, ינוע המטען הממוצע בין 0 ל-1+. כשיורד ה-pH – עולה המטען הממוצע עד ל-1+, וכשעולה ה-pH – יורד המטען הממוצע עד 0.

מיינ את הקבוצות הנושאות מטען בחומצות האמיניות השונות, לפי שני הסוגים: HA ו- BH^+ . 

כדי ללמוד את דרך חישוב המטען הממוצע נבחן כאן מערכת שיווי-משקל של חומצה כלשהיא, HA , המצויה בתמיסה מימית:



$$K = \frac{[\text{H}_3\text{O}^+_{\text{(aq)}}][\text{A}^-_{\text{(aq)}}]}{[\text{H}_2\text{O}_{\text{(l)}}][\text{HA}_{\text{(aq)}}]}$$

אנו עוסקים בדרך כלל בתמיסות מהולות, שריכוז המים בהן גדול מאוד לעומת ריכוז החומצה ובמהלך התגובה חלים בו שנויים קטנים מאוד. לפיכך אנו יכולים להתייחס לריכוז המים כאל גודל קבוע, שנצרף אותו ל- K ונקבל

ריכוז המים הוא 55.6 M

$$\frac{1000 \text{ g/l}}{18 \text{ g/mol}} = 55.6 \text{ M}$$

קבוע חדש, K_a :

$$(6) \quad K_a = K \cdot [H_2O(l)] = \frac{[H_3O^+_{(aq)}][A^-_{(aq)}]}{[HA_{(aq)}]}$$

למשל, K_a של החומצה האתאנואית (חומצת החומץ) הוא, כפי שניתן למצוא בספר הנתונים:

$$K_a = \frac{[H_3O^+_{(aq)}][CH_3CO_2^-_{(aq)}]}{[CH_3COOH_{(aq)}]} = 1.8 \cdot 10^{-5}$$

מקובל לטפל בקבועי שיווי-המשקל באמצעות הלוגריתמים שלהם ולהגדיר גודל לוגריתמי מיוחד: " pK_a ". p מייצג: power of 10, חזקה של עשר. שים לב לסימן המינוס שבהגדרה, בהתאמה להגדרת ה- pH שכבר היכרת בלימודיך).

$$(7) \quad pK_a = -\log K_a$$

למשל, pK_a של החומצה האתאנואית יהיה:

$$-\log (1.8 \cdot 10^{-5}) = 4.7$$

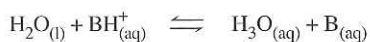
מערכת הייחוס שלנו, לצורך חישוב המטען הממוצע, תהיה תמיסה, שבה ה- pH שווה ל- pK_a ; כלומר תמיסה, שבה $[H_3O^+_{(aq)}] = K_a$. בתמיסה כזאת יהיה גם ריכוז $A^-_{(aq)}$ שווה לריכוז $HA_{(aq)}$. שכן את תבנית הביטוי (6) אפשר לכתוב גם בצורה הבאה:

$$\frac{K_a}{[H_3O^+_{(aq)}]} = \frac{[A^-_{(aq)}]}{[HA_{(aq)}]}$$

ואם נתון ש: $K_a = [H_3O^+_{(aq)}]$ אזי גם $[A^-_{(aq)}] = [HA_{(aq)}]$, והמטען הממוצע יהיה 0.5- למשל, כשנתונות 100 מולקולות, אשר 50 מהן נושאות מטען -1, ו-50 המולקולות האחרות חסרות מטען - יהיה המטען הממוצע: $0.5- = 50 / 100$.

אגב – יש לנו כאן דרך ניסויית, קצרה ואלגנטית, למצוא את ה- pK_a : להכין תמיסה, שבה ריכוז החומצה HA שווה לריכוז הבסיס הצמוד לה A^- , ולמדוד את ה- pH של התמיסה, שהוא, לפי המוסבר למעלה – ה- pK_a של החומצה HA .

רשום את ביטוי קבוע שיווי-המשקל, המתאים לסוג התגובה: 



וציין לעצמך מהו המטען הממוצע במערכת זו, כאשר נתון $pH = pK_a$.

ומה קורה כאשר $pH \neq pK_a$?

אפשר לחשב את המטען הממוצע, בדרגת דיוק רצויה, על פי אותה תבנית ידועה של קבוע שווי-משקל; אך אנו יכולים להסתפק כאן, בהערכה מקורבת של המטען הממוצע: כאשר $pH = pK_a$, המטען הממוצע הוא -0.5 או $+0.5$, לפי סוג התגובה. את זה כבר אמרנו...

וכאשר $pH \neq pK_a$ – "אחרי רבים להטות". כלומר, כשרוב החלקיקים נושאים מטען -1 , נתייחס למטען הממוצע כאילו הוא -1 ; וכשרוב החלקיקים נושאים מטען $+1$, נתייחס למטען הממוצע כאילו הוא $+1$; וכאשר הרוב חסר מטען, נתייחס למטען הממוצע כאילו הוא 0 .

כיצד משתנה המטען הממוצע של מולקולות חומצת החומץ ($pK_a \sim 5$), כשה- pH בתמיסה משתנה מ- 1 ל- 12 , בצעדים של יחידת pH ? 

מהו מהלך המטען הממוצע של מולקולות האמוניה ($pK_a \sim 9$), כשה- pH בתמיסה משתנה מ- 1 ל- 12 , בצעדים של יחידת pH ? 

4. כיצד נחשב את מטענן של החומצות האמיניות?

בררנו עד כה את המטען הממוצע של כל קבוצה בנפרד, אך בחומצה האמינית מופיעות שתי הקבוצות יחדיו (ולעתים גם יותר...) ויש לסכם את תרומתן המשותפת למטען-נטו. אם נסתפק, כמקודם, בהערכה מקורבת, נקבל, באלנין למשל, את תמונת המצב הבאה:

מטען נטו	מטען ממוצע של קבוצת		תחומי ה-pH
	אמין	קארבוקסיל	
1+	1.0+	0	$\text{pH} < 2.3$
0.5+	1.0+	0.5-	$\text{pH} = 2.3^* (\text{pKa1})$
0	1.0+	1.0-	$2.3 < \text{pH} < 9.7$
0.5-	0.5+	1.0-	$\text{pH} = 9.7^* (\text{pKa2})$
1.0-	0	1.0-	$\text{pH} > 9.7$

* pKa1 מתייחס לקבוצה הקארבוקסילית, ו- pKa2 – לקבוצה האמינית.

רשום נוסחת ייצוג (נוסחת מיבנה) של מולקולת האלאנין למצבים המוצגים בטבלה, ביחידות מטען שלמות.



נבחן בדרך זו גם את החומצה הגלוטאמית, שיש בה, כידוע, בנוסף ל- α קארבוקסיל ($\text{pKa} = 2.2$) ול- α אמין ($\text{pKa} = 9.7$), גם קבוצה קארבוקסילית נוספת בשרשרת-הצד ($\text{pKa} = 4.2$):

מטען נטו	מטען ממוצע של קבוצת			תחומי ה-pH
	α אמין	R קארבוקסיל	α קארבוקסיל	
1+	1+	0	0	$\text{pH} < 2.2$
0.5+	1+	0	0.5-	$\text{pH} = 2.2 (\text{pK1})$
0	1+	0	1-	$2.2 < \text{pH} < 4.2$
0.5-	1+	0.5-	1-	$\text{pH} = 4.2 (\text{pK3})$
1-	1+	1-	1-	$4.2 < \text{pH} < 9.7$
1.5-	0.5+	1-	1-	$\text{pH} = 9.7 (\text{pK2})$
2-	0	1-	1-	$\text{pH} > 9.7$

ערוך טבלה לחישוב מקורב של מטען-נטו של הארגינין וההיסטידין. 

5. הנקודה האיזואלקטרית (Isoelectric Point)

הבט בטבלאות שערכנו וראה: בכל חישובי המטען שבדקנו, מצאנו תמיד תחום שבו המטען-נטו הוא אפס. ואם לא נסתפק במספרים מקורבים ונידרוש חישובים מדויקים של מהלך השנוי במטענים, יתברר לנו שקיים pH מסוים, נקודתי, שבו המטען-נטו שווה לאפס והוא נקרא הנקודה האיזואלקטרית, שסימנה pI. אפשר להבין מן הטבלאות ש-pI היא "אמצע הדרך" בין ה-pH שבו המטען-נטו הוא 0.5+ לבין ה-pH שבו המטען-נטו הוא -0.5. באלאנין: "אמצע הדרך" בין 2.3 ל-9.7 הוא 6.0. בחומצה הגלוטאמית: "אמצע הדרך" בין 2.2 ל-4.2 = 3.2.

כאשר $pH < pI$ – המטען-נטו הוא חיובי.

כאשר $pH > pI$ – המטען-נטו הוא שלילי.

מצא, מן הטבלאות שערכת, את pI של הארגינין וההיסטידין. 

כשמוטל עלינו לחשב את המטען-נטו של פפטידים, הכוללים מספר גדול של קבוצות נושאות מטען, נטפל בכל קבוצה בנפרד ואחר-כך נסכם את המטען-נטו. (וראו גם לדעת, שככל שרוב יותר מספר הקבוצות הנושאות מטען – כך גם גדולה יותר השגיאה המצטברת של החשבון המקורב).

אנו מניחים שה-pKa של הקבוצה הפעילה בשרשרת-הצד נשאר כמות שהוא בחומצה האמינית הבודדת. אבל, זאת לדעת, ה-pKa של קבוצת הקארבוקסיל והאמין שבקצוות (קצה-C, קצה-N), שונה מן ה-pKa שלהם בחומצה האמינית החופשית, כי חסרה כאן השפעת המטען הנגדי של הדו-יון:

$pK_a(C) \sim 3.5$ (קצה -)

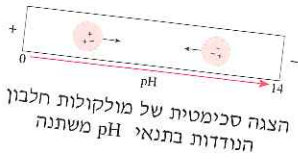
$pK_a(N) \sim 8$ (קצה +)

חשב, בקרוב, את המטען-נטו, של הפפטיד:
12? Ala-Glu-Arg-His-Asp, בערכי ה- pH : 8, 6, 4, 2.
 מהי נוסחת הייצוג של הפפטיד, המתאימה ביותר
 לתמיסה הפיסיולוגית בת $pH = 7.4$? מהו pI של
 הפפטיד?

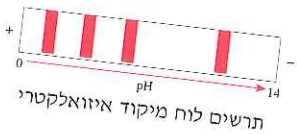


6. אלקטרופורזה ומיקוד איזואלקטרי

אלקטרופורזה היא שיטה להפרדה בין מולקולות נושאות מטען, כשהן נודדות בקצב שונה בשדה חשמלי. אפשר לנצל שיטה זו להפרדה בין חומצות אמיניות שונות, או בין חלבונים: שמים את דוגמת התערובת על פני נייר (או לוח מתאים). מרטיבים את הנייר בתמיסת בופר בעלת pH נתון, ומעבירים דרכה זרם חשמלי. כל חלקיק של חומצה אמינית, או פפטיד, או חלבון, ינוע, על פי מטענו, לכיוון האלקטרודה החיובית או השלילית. מרחק הנדידה תלוי בגדל המטען ובגדלה של המולקולה.



אם, בדרך כלל שהיא, בונים לאורך הנייר מידרג יציב של pH , נוצר מצב חדש! למדנו: כש- $pH < pI$, המטען נטו הוא חיובי והחלקיק הטעון ינוע לכיוון האלקטרודה השלילית (נימינה בשרטוט שלפניך), כלומר לכיוון pH גבוה יותר. וכש- $pH > pI$, המטען נטו הוא שלילי והחלקיק הטעון ינוע לכיוון האלקטרודה החיובית (שמאלה בשרטוט), כלומר לכיוון pH נמוך יותר.



והנדידה עד מתי?
 כיון שהנדידה מפגישה את החלקיק עם pH חדש, יישתנה בהתאמה גם מטענו. לכן, כל חלקיק ימשיך לנדוד עד שיגיע למקום שבו ה- pH מתאים ל- pI שלו, משום שכאן המטען-
 "ו" שלו מתאפס — ואז הוא חונה במקום!

קוד האיזואלקטרי (Isoelectric Focusing), שמצליח
 חלבון במקום המיוחד לו ויכול — בטכניקות

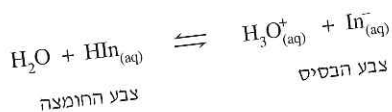
עדינות – להפריד בין מרכיבים, השונים זה מזה ב-pI שלהם כדי 0.001 יחידות pH: תרומה חשובה למחקר החלבונים – בבדיקות מזון, בזיהוי גורמי זהום במים, בזיהוי חלבוני החיסון ובהפרדה ביניהם, באיפיון אנזימים, במעבדה לזיהוי פלילי ועוד ועוד...

הנקודה האיזואלקטרית של מספר חלבונים

חלבוני הדם		
גלובולין	2.0	פפסין
סרום אלבומין	4.7	אינסולין
$\alpha 1$ גלובולין	5.8	היסטונים
פיברינוגן	5.8	ריבונוקליאז
המוגלובין	6.9	ציטוכרום C
$\alpha 2$ גלובולין	7.4	ליזוזים
		11.1

אלקטרופורזה של אינדיקאטורים

קשה להדגים אלקטרופורזה של חלבונים, בגלל מחירו הרב של הציוד והזמן הנדרש לשם כך. לעומת זאת, אלקטרופורזה של אינדיקאטורים יכולה להעשות בכלים פשוטים, וההפרדה ניכרת מיד בשל הצבעים האופייניים להם. אינדיקאטורים של חומצה-בסיס הם בעצמם חומצות חלשות, המיוחדות בכך שלחומצה (HIn) יש צבע שונה מזה של הבסיס הצמוד שלה (In^-) ; כלומר, שנוי במטען החלקיקים, במעבר מחומצה לבסיס הצמוד או להפך, מלווה בשנוי בולט בצבע.



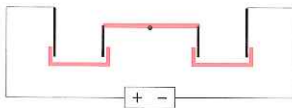
כאשר מוסיפים לתמיסה כלשהיא מספר טיפות של תמיסת אינדיקאטור, משתנים ריכוזי המרכיבים השונים של האינדיקאטור, לפי ריכוז יוני ההידרוניום שבתמיסה הניבדקת. וכפי שלמדנו, כאשר $pH < pKa$, שולטת הצורה החומצית ולכן גם הצבע האופייני לה; וכאשר $pH > pKa$, שולטת הצורה הבסיסית ולכן גם הצבע האופייני לה.

האינדיקאטורים הרבים שונים זה מזה ב- pK_a ובצבעים המיוחדים להם – וכך אפשר לבחור אינדיקאטורים לפי pH שבו מבוקש השנוי בצבע. אנו נדגים כאן אלקטרופורוזה של תערובת של מתיל כתום עם ברומקרוסול ירוק, בתמיסה בעלת $pH \sim 7$. הואיל ולשניהם יש pK_a בסביבות 4 – יהיה לשיניהם מטען שלילי בתמיסת הנתונה. אלא שלאחד מהם יש קבוצה חומצית אחת, התורמת מטען שלילי אחד, ולאחר – יש שתיים... מי הוא מי? את זאת תגלה האלקטרופורוזה.

ניסוי 2



אלקטרופורוזה (הדגמה):



מתקן אלקטרופורוזה

מתקן האלקטרופורוזה בנוי משני כלים שטוחים, המכילים את התמיסה, שבה טבולים חוטי ניכרום, המשמשים כאלקטרודות; ופס נייר סינון יישמש כלוף האלקטרופורוזה.

1. הכן את תערובת האינדיקאטורים: המס מעט ברומ-קרוסול ירוק (כמחצית "גרגיר אורז") ב 100 מ"ל אתאנול 95%. הוסף לתמיסה מנה כפולה של מתיל-כתום.

2. הכן 100 מ"ל תמיסת מלח זרחת, $0.1M$, $pH \sim 7$, ושים 50 מ"ל בכל כלי. (ליצירת התמיסה קח 19.5 מ"ל NaH_2PO_4 0.2M ו-30.5 מ"ל Na_2HPO_4 0.2M והשלם עם מים עד ל-100 מ"ל).

3. הכן פס נייר סינון (2 x 12 ס"מ). סמן בעפרון את מרכזו של הנייר ושים בו מנה קטנה של תמיסת האינדיקאטורים. (קוטר הטיפה על הנייר אינו צריך לעלות על 3-4 מ"מ).

4. הרטב – בזהירות – את פס הנייר בתמיסת הבופר, וייבש אותו בין שתי מגבות נייר. שים לב שלא להרטיב את אמצע הנייר, במקום שבו מצוייה התמיסה הניבדקת.

עדינות – להפריד בין מרכיבים, השונים זה מזה ב-pI שלהם
 כדי 0.001 יחידות pH: תרומה חשובה למחקר החלבונים –
 בבדיקות מזון, בזיהוי גורמי זהום במים, בזיהוי חלבוני
 החיסון ובהפרדה ביניהם, באיפיון אנזימים, במעבדה לזיהוי
 פלילי ועוד ועוד...

הנקודה האיזואלקטרית של מספר חלבונים

חלבוני הדם	
גלובלין	2.0
סרום אלבומין	4.7
$\alpha 1$ גלובלין	5.8
פיברינוגן	5.8
המוגלובין	6.9
$\alpha 2$ גלובלין	7.4
פפסין	1.0
אינסולין	5.4
היסטונים	11.0-7.5
ריבונוקליאז	9.6
ציטוכרום C	9.8
ליזוזים	11.1

אלקטרופורזה של אינדיקאטורים

קשה להדגים אלקטרופורזה של חלבונים, בגלל מחירו הרב של הציוד והזמן הנידרש לשם כך. לעומת זאת, אלקטרופורזה של אינדיקאטורים יכולה להעשות בכלים פשוטים, וההפרדה ניכרת מיד בשל הצבעים האפייניים להם. אינדיקאטורים של חומצה-בסיס הם בעצמם חומצות חלשות, המיוחדות בכך שלחומצה (HIn) יש צבע שונה מזה של הבסיס הצמוד שלה (In^-); כלומר, שנוי במטען החלקיקים, במעבר מחומצה לבסיס הצמוד או להפך, מלווה בשנוי בולט בצבע.



כאשר מוסיפים לתמיסה כלשהיא מספר טיפות של תמיסת אינדיקאטור, משתנים ריכוזי המרכיבים השונים של האינדיקאטור, לפי ריכוז יוני ההידרוניום שבתמיסה הניבדקת. וכפי שלמדנו, כאשר $\text{pH} < \text{pKa}$, שולטת הצורה החומצית ולכן גם הצבע האופייני לה; וכאשר $\text{pH} > \text{pKa}$, שולטת הצורה הבסיסית ולכן גם הצבע האופייני לה.

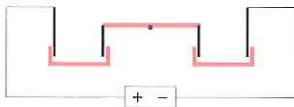
האינדיקאטורים הרבים שונים זה מזה ב-pKa ובצבעים המיוחדים להם – וכך אפשר לבחור אינדיקאטורים לפי pH שבו מבוקש השנוי בצבע.

אנו נדגים כאן אלקטרופורוזה של תערובת של מתיל כתום עם ברומקרוסול ירוק, בתמיסה בעלת $\text{pH} \sim 7$. הואיל ולשניהם יש pKa בסביבות 4 – יהיה לשניהם מטען שלילי בתמיסת הנתונה. אלא שלאחד מהם יש קבוצה חומצית אחת, התורמת מטען שלילי אחד, ולאחר – יש שתיים... מי הוא מי? את זאת תגלה האלקטרופורוזה.

ניסוי 2



אלקטרופורוזה (הדגמה):



מתקן אלקטרופורוזה

מתקן האלקטרופורוזה בנוי משני כלים שטוחים, המכילים את התמיסה, שבה טבולים חוטי ניכרום, המשמשים כאלקטרודות; ופס נייר סינון יישמש כלוח האלקטרופורוזה.

1. הכן את תערובת האינדיקאטורים: המס מעט ברומ-קרוסול ירוק (כמחצית "גרגיר אורז") ב 100 מ"ל אתאנול 95%. הוסף לתמיסה מנה כפולה של מתיל-כתום.

2. הכן 100 מ"ל תמיסת מלח זרחתי, 0.1M, $\text{pH} \sim 7$, ושים 50 מ"ל בכל כלי. (ליצירת התמיסה קח 19.5 מ"ל 0.2M NaH_2PO_4 ו-30.5 מ"ל 0.2M Na_2HPO_4 והשלם עם מים עד ל-100 מ"ל).

3. הכן פס נייר סינון (2 x 12 ס"מ). סמן בעפרון את מרכזו של הנייר ושים בו מנה קטנה של תמיסת האינדיקאטורים. (קוטר הטיפה על הנייר אינו צריך לעלות על 3-4 מ"מ).

4. הרטב – בזהירות – את פס הניר בתמיסת הבופר, וייבש אותו בין שתי מגבות נייר. שים לב שלא להרטיב את אמצע הנייר, במקום שבו מצוייה התמיסה הניבדקת.

5. שים את פס הנייר בין שני הכלים. קצות הנייר צריכים לטבול בתמיסת הבופר, וטיפת האינדיקטורים צריכה להימצא על פס הנייר שבין שני הכלים.

6. חבר את שתי האלקטרודות לספק של 180-200 וולט, למשך 10-15 דקות, עד שתבחין בהפרדה שבין צבעי האינדיקטורים. (זהירות!!! חוטים גלויים במתח גבוה).

7. בדוק בספר הנתונים את צבעם של המתיל כתום ושל הברומקרוסול ירוק ב-pH של התמיסה הנתונה. כך תוכל לדעת מי הוא מי!

ברור לך, אם כן, ששרשרת-הצד אינה חלק אדיש במולקולה של החומצה האמינית ויש לה השפעה על התנהגותה בתמיסה. והואיל ושרשרת-הצד שונות זו מזו במבנה הכימי, כך גם שונה תרומתן לאופיין של החומצות האמיניות. מקובל לסווג את החומצות האמיניות, על פי תגובתן של שרשרת-הצד עם המים לארבע קבוצות:

1. חומצות אמיניות בסיסיות, נושאות בשרשרת הצד שלהן מטען חיובי בתמיסה בת $pH = 6-7$.
2. חומצות אמיניות חומציות, נושאות בשרשרת הצד שלהן מטען שלילי בתמיסה בת $pH = 6-7$.
3. חומצות אמיניות קוטביות, שאינן נושאות מטען בשרשרת הצד שלהן, אך הן יכולות להשתתף בקשרי מימן עם המים.
4. חומצות אמיניות הידרופוביות ("שונאות מים") אשר אין להן – בשרשרת-הצד שלהן – קבוצה קטבית ולכן מסיסותן במים פחותה משל האחרות.

מיין את 20 החומצות האמיניות על פי ארבעת הקבוצות האלה. 

הערה: שרשרות הצד של הטירוזין והטריפטופן נחשבות כהידרופוביות, למרות יכולתן ליצור קשרי מימן, בגלל השפעתה המכרעת של הטבעת הפחמימנית שיש בהן.

אנליזה של חלבון

שרשרת המיוגלובין בנויה מ-153 יחידות חומצה אמינית; ובארבע שרשרות ההמוגלובין יש, ביחד, 574 יחידות. לו היתה כל שרשרת בנויה רק מסוג אחד של חומצה אמינית, אזי היה המיבנה שלה פשוט, יחסית, לתאור. אבל כשיש לכל חוליה בשרשרת עשרים "בחירות" שונות, גדל מספר האפשרויות אלפי מונים, וה"סיפור" מסתבך מאד.



כל מלבן בתרשים מייצג עמדה אחת בשרשרת של טריפטיד. נניח שבכל עמדה כזאת יכולה להיות אחת משתי החומצות האמיניות: A או B — כמה אפשרויות קיימות כאן? כמה אפשרויות תהיינה אם עומדות לרשות הטריפטיד שלוש חומצות אמיניות: A, B או C? וכמה - כשיש עשרים חומצות אמיניות לבחירה?

מספר האפשרויות בשרשרת המיוגלובין יהיה, אם כן, 20^{153} — ובכל זאת המיוגלובין, ההמוגלובין, וכמוהם כל חלבון וחלבון, בנויים מרצף חומצות אמיניות בסדר קבוע הנשמר בקפדנות רבה; זהו הסדר הנקבע ב-DNA — שהוא, כידוע, החומר התורשתי המכתיב לריבוסומים את רצף החומצות האמיניות בחלבון שהם בונים. גילוי הרצף הזה, המכונה המיבנה הראשוני של החלבון, הוא אחת מהבעיות הידועות בביוכימיה המולקולארית, שריכוזו סביבן מאמץ מרשים של חוקרים רבים.

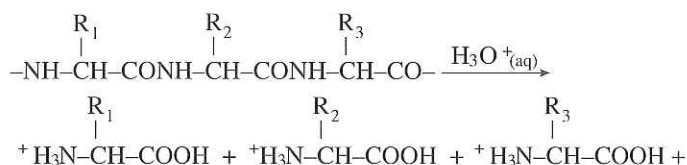
1. הרכב החלבון

באנליזה של החלבון, בדרך אל המבנה הראשוני שלו, שלב הפתיחה הוא להפריד אותו מהחלבונים והחומרים האחרים המצויים בתמיסה. ההפרדה נעשית בשיטות פשוטות למדי, כמו אלקטרופורזה וכרומאטוגרפיה, אך היא מחייבת

הקפדה וזהירות רבה, כדי לא יליפול בפח' עם חלבון, שהוא, בבלי דעת, תערובת של חלבונים אחדים ולא חלבון יחיד.

מהי המכשלה בכך שתערובת חלבונים נבדקת בטעות כאילו היא חלבון יחיד? 

לאחר שיש בידנו חלבון נקי ומבודד, יש אפשרות לקבוע את סוגי החומצות האמיניות הבודות אותו ואת ומספרן. תהליך הבדיקה מתבצע בשני שלבים: ראשית, מפרקים את החלבון למרכיביו על ידי הידרוליזה (תגובת פרוק על-ידי מים):



עמוד השידרה של החלבון אינו פעיל מבחינה כימית והוא יציב למדי, וכדי לבצע בו הידרוליזה, יש לחמם את תמיסת החלבון עד ל-105°C, בתמיסת 6M HCl, במשך 24 שעות ויותר, עד לפרוק השלם לחומצות אמיניות נפרדות.

אחר-כך מפרידים את התערובת שבהידרוליזאט לחומצות אמיניות בודדות, הניתנות לזהוי ולבדיקה כמותית, בשיטות השונות של הכרומאטוגרפיה והאלקטרופורזה. וכך, עניין ראשון בחקירת מיבנה החלבון יהיה מתן תשובה לשאלה: אילו חומצות אמיניות משתתפות בבנינו?

נסוי 3 

כרומאטוגרפיה של חומצות אמיניות.

אמנם במעבדות המחקר קיימות כיום שיטות "חכמות" של כרומאטוגרפיה, אך ניתן להדגים את עקרונות השיטה גם בכרומאטוגרפיה פשוטה על גבי נייר, או על גבי לוח רובד דק, שאפשר לבצעה במעבדה רגילה כשלנו.

א. את הכרומאטוגרפיה תבצע על ידי אחת משתי תמיסות-המריץ הבאות:

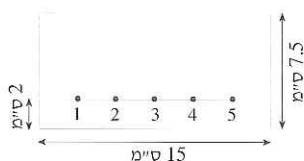
n-Bu : t-Bu : HAc : H₂O : A
5 : 5 : 2 : 4 : יחסים נפחיים

n-Bu : t-Bu : NH₃ : H₂O : B
5 : 5 : 3 : 3 : יחסים נפחיים

מהו ההבדל העיקרי בין שתי התמיסות האלה?

ב. הכנס את תמיסת המריץ (A או B) לכוס 250 מ"ל עד לגובה של כ-1 ס"מ (לא יותר!) וכסה את הכוס בצלחת פטרי.

ג. גזור את נייר הכרומאטוגרפיה (Whatman No 1) במידות:



תרשים נייר הכרומטוגרפיה

15 × 7.5 ס"מ. רשום עליו בעפרון, בעדינות, קו אורך 2 ס"מ מקצה הנייר, וסמן עליו נקודות במרחק 2.5 ס"מ זו מזו. את הטיפול בנייר בשלב זה ובכל השלבים הבאים יש לעשות עם כסיות, כדי לא להכתים את הנייר באצבעותיך.

ד. נתונות תמיסות 0.2% של שלוש חומצות אמיניות שונות: לויצין, ליזין וחומצה גלוטאמית. שים, בעזרת צינורות נימיים נפרדים, טיפה אחת מכל תמיסת חומצה אמינית על הנקודה המיועדת לה: 2-Leu, 3-Lys, 4-Glu; על הנקודות 1 ו-5 שים את טיפות תמיסות שלוש החומצות, אחת על גבי רעותה; אך הקפד על כך, שהטיפה האחת תתיבש לפני שתשים את האחרת.

ה. לאחר שהתייבשו כל הטיפות, חבר את שולי הנייר בעזרת סיכות, מבלי שגיעו זה בזה, כך שתתקבל צורת גליל. שים את הגליל בכוס הכרומאטוגרפיה, באופן שהנקודות תמצאנה בחלקו התחתון. פני המריץ צריכים להיות מתחת לקו המסומן.

ו. תן למריץ לעלות בנייר 30 דקות. הוצא את הנייר מן הכוס וסמן בו, בעפרון, את קו חזית המריץ. העמד את הגליל על זכוכית שעון ויבש אותו בתנור ב-105°C, או במפזר חום, עד שלא יורגש יותר ריחו של המריץ.

ז. המורה ירסס את הנייר בתמיסת נינהידרין 0.2% באצטון (במינדף!) וייבש אותו בתנור כ- 5 דקות.

ח. מדוד את מרחק הנדידה של כל חומצה אמינית והשווה אותו למרחק התקדמותו של המריץ:

$$R_f = \frac{\text{מרחק הנדידה של המומס}}{\text{מרחק הנדידה של המריץ}}$$

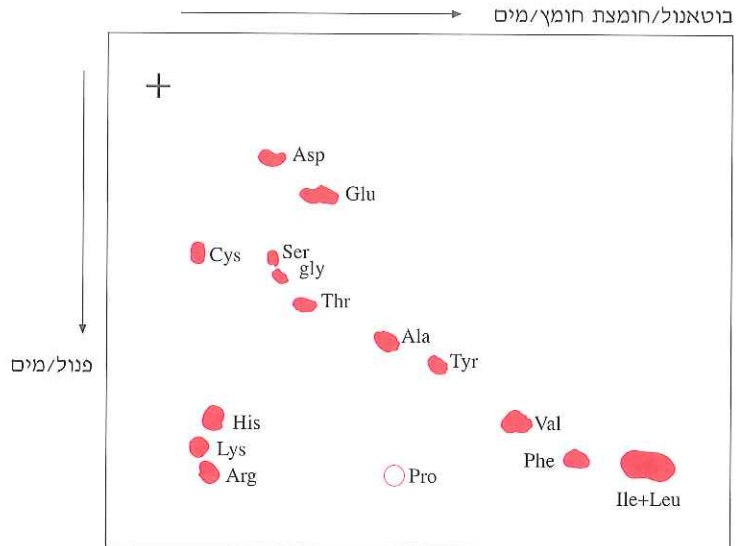
המנה של שני המרחקים האלה, הנקראת R_f , היא אופיינית ומיוחדת לכל חומר לפי המריץ ולפי תנאי הכרומאטוגרפיה, ועל פיה אפשר לזהותו.

מיקומן השונה של החומצות האמיניות השונות בכרומאטוגרם יכול להסביר את מנגנון הפעולה של הכרומאטוגרפיה: החומצות האמיניות שבתמיסה מתחלקות בין שתי הפאזות המרכיבות את תמיסת המריץ, הפאזה הנייחת והפאזה הניידת. הפאזה הנייחת היא המים הניקשרים לתאית שבנייר בזכות קשרי המימן הנוצרים בין מולקולות המים לבין שרשרות התאית. הפאזה הניידת היא המימס האורגאני, המתקדם במעלה הנייר מבלי שהתאית תעכב אותו. כאשר המימס מתקדם בעליה נימית במעלה לוח הכרומאטוגרפיה, מתקדמות איתו גם החומצות האמיניות שבתמיסה; אלא, שאלה המסיסות יותר במים נוטות להיצמד לפאזה הנייחת, ולכן הן נעות לאט יותר במעלה הנייר, בעוד שהחומצות האמיניות ההידרופוביות, הנוטות להיתמוסס בפאזה האורגאנית הניידת, מתקדמות מהר יותר במעלה הנייר.

כיצד משפיע ההבדל בין המריצים על מרחק הנדידה של החומצות האמיניות שנבדקו? 

ודאי שמת לב לכך שממיס אחד לבדו אינו יכול להפריד על לוח הכרומאטוגרפיה בין כל הסוגים השונים של החומצות האמיניות. כדי להשיג הפרדה טובה יותר, צריך לבצע כרומאטוגרפיה נוספת, הפעם בעזרת ממיס אחר, הנע על פני הלוח בכיוון ניצב לראשון. באופן זה מתקבל כרומאטוגרם דו-מימדי של ההידרולזאט של החלבון.

4? לפניך תרשים כרומאטוגרם של הידרוליזאט של אינסולין. בחן את התרשים וציין את מקומן של החומצות האמיניות הבסיסיות, החומציות והנייטרליות, הקטביות וההידרופוביות. אילו מהן נמסות טוב יותר במימס האורגני?



אפשר גם לבצע כרומאטוגרם מדידות כמותיות, ולקבל בדרך זו את הרכב החומצות האמיניות בחלבון, כדוגמת הטבלה שבעמוד הבא.

מה נותנת לנו טבלה כזאת? אפשר, למשל, להשיב בעזרתה על השאלות הבאות:

5? סכם את האחוז המולרי של החומצות האמיניות ההידרופוביות בפיברואין, במיוגלובין ובאחת השרשרות של ההמוגלובין.

6? מנה, בכל אחד מהחלבונים המסיסים את מספר החומצות האמיניות החומציות והבסיסיות, וקבע לפי נתונים אלה את המטען המתאים לכל חלבון בתמיסה בת $pH = 7$. כיצד מתיישבת תשובתך עם נתוני הנקודות האיזואלקטריות של החלבונים האלה? (ראה עמוד 34).

כיצד תיישב את הסתירה בין נתוני הכרומאטוגרם, המצביעים על נוכחות החומצה האספארטית בהידרוליזאט של האינסולין, לנתוני טבלת ההרכב אומרים: 0 חומצה אספארטית?

טבלת הרכב החומצות האמיניות בחלבונים שונים

קואלגן העור	פיברואין המשי	ה מ ו ג ל ו ב י ן			מיוגלובין	אינסולין	החומצה האמינית
		γ	β	α			
1.4	0.6	4	—	—	9	2	איזולוצין
8.4	26.2	11	15	21	17	1	אלאנין
4.2	1.6 {	4	6	4	2	3	אספאראגין
		9	7	8	6	0	ח' אספארטית
6.1	0.5	3	3	3	4	1	ארגינין
1.2	8.4 {	4	3	1	5	3	גלוטאמין
		8	8	4	14	4	ח' גלוטאמית
32.2	45.6	13	13	7	11	4	גליצין
0.5	0.2	7	9	10	12	2	היסטידין
1.4	2.4	13	18	13	8	4	ואלין
0.9	5.6	2	3	3	3	4	טירוזין
0	0	3	2	1	2	0	טריפטופאן
2.3	0.5	17	18	18	18	6	לוצין
3.3	0.4	12	11	11	19	1	ליזין
1.4	0	2	1	2	2	0	מתיונין
4.2	12.1	11	5	11	6	3	סרין
0.5	1.6	8	8	7	6	3	פניל אלאנין
*22.4	0.5	4	7	7	4	1	פרולין
0.2	0	1	2	1	0	6	ציסטאין
2.3	1.0	10	7	9	5	3	תריאונין
100%	100%	146	146	141	153	51	

* כמחצית הפרולין בחלבון זה עוברת הידרוקסילאציה, לאחר יצירת החלבון, כך שמוצאים בקולאגן גם פרולין וגם הידרוקסיפרולין.

בחלבונים המסיסים: אינסולין, מיוגלובין ושרשרות ההמוגלובין, נתון ההרכב במספר החומצות האמיניות במולקולת החלבון; בפיברואין ובקולאגן, שהם חלבונים לא מסיסים – באחוזים מולאריים.

מעניין? אנו סבורים שכן.

מלמד? עדיין מעט מאד. משום שאיננו יכולים לרשום, על פי נתונים אלה בלבד, את נוסחת הייצוג (נוסחת המיבנה הקוולנטית) של החלבון; ובודאי שאיננו יכולים עדיין לומר דבר על הקשר שבין המיבנה לבין התיפקוד הביולוגי המיוחד לו, כפי שרצינו בראשיתו של המהלך. כי בדיקת ההידרוליזאט מספרת לנו אילו חומצות אמיניות מצויות בחלבון – אך לא מהו סדר הופעתן בשרשרת הפוליפטידית.

2. מפוי החלבון: קביעת רצף החומצות האמיניות בשרשרת.

אנו יודעים כבר את הרכב החומצות האמיניות של המיוגלובין ואת ההרכב של שרשרות ההמוגלובין. אך ידיעה זו היא רק צעד ראשון בהכרת המיבנה המולקולרי, כי כדי להציג את נוסחת המיבנה שלהם צריך לדעת את סדר החומצות האמיניות בשרשרות.

קיימת דרך ישירה וקצרה לקבוע את רצף החומצות האמיניות בשרשרת החלבון, כשיודעים את סדר היחידות הנתון ב-DNA של הגן המיוחד לחלבון המבוקש, ומתרגמים אותו, על פי הצופן התורשתי, לרצף החומצות האמיניות שלו. אך כשסדר היחידות ב-DNA אינו ידוע – וכך הוא הדבר לגבי רוב החלבונים המצויים בידינו – יש ללכת בדרך המייגעת והאתגארית, הבונה את התשובה בשלבים.

שנת 1954 היא שנת ציון דרך בהיסטוריה של מחקר החלבונים, כי בה השלים סאנגר (Sanger, ביוכימאי אנגלי) עבודה בת עשר שנים, כשהצליח לקבוע את רצף החומצות האמיניות באינסולין – הופעת בכורה למבנה הראשוני של החלבון. המיבנה הראשוני של החלבון, כבר אמרנו, הוא הכנוי לרצף החומצות האמיניות בשרשרת החלבון, כלומר לנתוני נוסחת הייצוג של המיבנה הקוולנטי שלו. כיום, שוב אין צורך בעשר שנים, משום שעומדות לרשותנו שיטות מהירות, חלקן אוטומאטיות וממוחשבות, למיפוי רצף



המבנה הראשוני:

רצף החומצות האמיניות באינסולין

החומצות האמיניות בחלבון; ואמנם כבר יודעים היום את המבנה הראשוני של עשרות אלפי חלבונים שונים.

לכל חומצה אמינית יש כוון: מהקבוצה האמינית אל הקבוצה הקארבוקסילית. לפיכך גם לשרשרת הפוליפטידית יש כוון: מהקצה האמיני אל הקצה הקארבוקסילי. מוסכם לציין כל חומצה אמינית בשרשרת במספר סידורי, משמאל לימין, (או מלמעלה למטה) החל מהקצה האמיני (קצה-N) וכלה בקצה הקארבוקסילי (קצה-C); זהו גם הסדר שבו נדחסות החומצות האמיניות על פני הריבוסום.

חקירה טיפוסית מתחילה בקביעת החומצה האמינית המצויה בקצה, קצה N או קצה C, על-ידי מגיב ייחודי, הפועל עם הקצה, ניקשר אליו או משנה אותו. לאחר ההידרוליזה מופיעות כל החומצות האמיניות כהגלן, ורק אחת שונה מן המקור בשל תגובתה עם המגיב הייחודי לקצה.

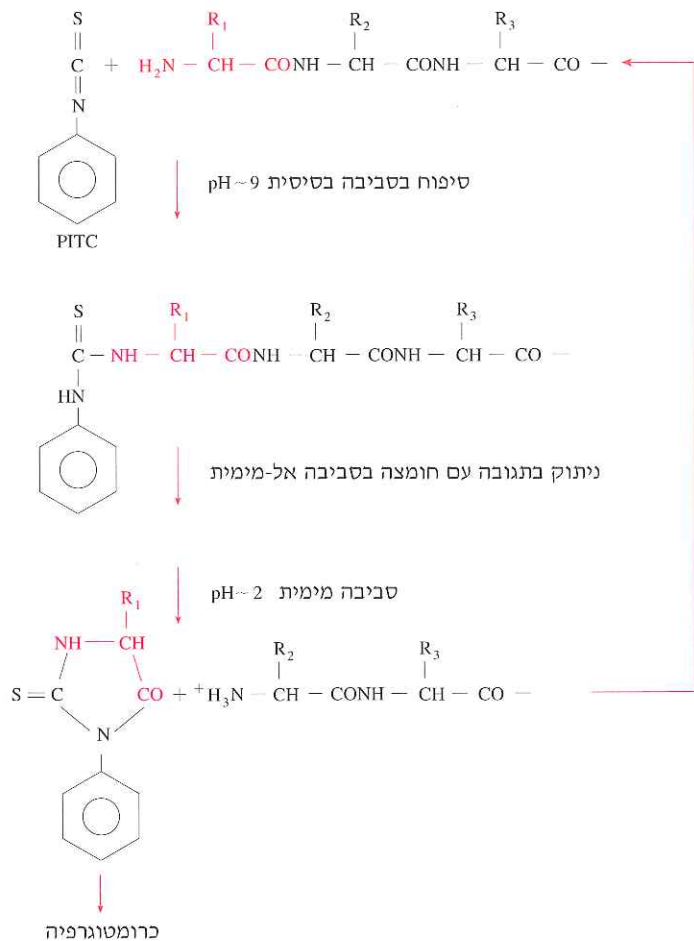
החלבון	קצה N	קצה C
מיוגלובין	Val	Gly
ליזוזים	Leu	Lys
ריבונוקלאז	Val	Lys
אינסולין	Ala,Asn	Phe,Gly
המוגלובין	Val	His, Arg

איך אפשר להסביר את מציאותם של מספר קצוות N (ובהתאמה – מספר קצוות C) באינסולין ובהמוגלובין ?

פריצת הדרך לקביעת הרצף נעשתה, כאמור, על-ידי סאנגר. השיטה שופרה על-ידי כימאי אוסטרלי, אדמאן שמו (Edman), שאיפשר למפות את החלבון במהלך סטנדרטי הניתן לבקרת מחשב.

האסטרטגיה של אדמאן למפוי החלבון מתבססת על תגובה אפיינית לקבוצה האמינית של קצה-N של השרשרת, בתמיסה בת pH=9. קבוצה אמינית זו מיוחדת בכך שה-pKa שלה נמוך יותר מזה של האמינים האחרים המצויים בשרשרות-החלבון. לפיכך, ב-pH=9 קצה-N כבר אינו נושא מטען.

זוג האלקטרונים הבלתי קושרים של האמין הניטרלי פנוי לתגובות עם מגיבים יחודיים, המשמשים בדרך זו "סמן שמאלי" לשרשרת.



"הסמן השמאלי" של אדמאן הוא: PITC, פניל איזו תיו-ציאנאט (Phenyl Iso ThioCyanate), היוצר קשר קוולנטי עם

אטום החנקן של קצה-N. הקשר הזה יוצר מצב חדש בקצה-N, שתוצאתו ערעור יציבותו של הקשר הפפטידי הסמוך, זה שבין החומצה האמינית הראשונה לשניה. וזאת משום שהוא הופך מטרה לזוג האלקטרונים המצוי עכשיו באטום החנקן של האיזו תיוציאנאט.

שלב זה בתגובה מתנהל בסביבה אל-מימית, בעזרת חומצה, התוקפת את הקשר הפפטידי הראשון ואינה פוגעת בקשרים הפפטידיים האחרים. החומצה האמינית הראשונה, "השמאלית", ניתקת מן השרשרת ויוצרת עם מגיב אדמאן, בסביבה חומצית מתונה, מיבנה של טבעת מחומשת, בעוד שיתרת השרשרת נותרת לא פגועה.

אפשר כעת לחזור לסביבת pH=9 ולכרסם מן השרשרת את החומצה האמינית השניה, שהיא עכשיו קבוצת הקצה, וחוזר חלילה...

הנה כך, על-ידי פעולה מחזורית, הניתנת לניהול אוטומאטי ולבקרה ממוחשבת, אפשר לכרסם את השרשרת, ולזהות - בעזרת בדיקה כרומאטוגרפית - את החומצות האמיניות המשתחררות, אחת לאחת, מקצה-N פנימה.

ככלל, אפשר בשיטת הכירסום של אדמאן למפות פפטיד בן כמה עשרות חומצות אמיניות, עד שהצטברות תגובות לא שלישיות פוגעת באמינות התוצאות, ומאלצת את הבודק להפסיק את המיפוי.

בשיטת אדמאן אפשר לקבוע את רצף החומצות האמיניות בפפטידים קצרים. לכן, את החלבונים הגדולים קוטעים תחילה לפפטידים קצרים יותר בתגובת הידרוליזה חלקית, על ידי מגיבים אפייניים, או על ידי אנזימים המפרקים חלבונים (אנזימים פרוטאוליטיים), החותכים את החלבון במקומות יחודיים. את רצף החומצות האמיניות במקטעים הקצרים האלה קובעים בשיטת אדמאן, ומצרפים את הנתונים המתקבלים מן החלקים לתמונת רצף שלימה.

אחד המגיבים המקובלים לענין זה הוא ה**ציאנוגן הברומי**, CNBr, ה"חותך" את הקשר הפפטידי אחרי (משמאל לימין) המתיונין; וכך חלבון שיש בו עשרה מתיונינים, ייתן אחד עשר מקטעים. אנזים אפייני לחיתוך כזה הוא ה**טריפסין**, החותך קשרים פפטידיים רק אחרי ליזין או ארגינין. קוטעים, אם כן, את שרשרת החלבון, בנקודות ייחודיות,

לסידרת פפטידים קצרים הניתנים למיפוי ישיר. חוזרים וקוטעים את השרשרת בנקודות אחרות, ומקבלים סידרת פפטידים אחרת. על ידי השוואת שתי הסדרות ומציאת קטעים חופפים ביניהן, אפשר למפות את הסדר השלם של החלבון המבוקש, כמו בפתרון תשבץ...

רשום על שלוש רצועות נייר רצף זהה בן 7 אותיות, בהן אות אחת החוזרת פעמיים (למשל: שתיקסיל).
 גזור כל רצועת נייר, באקראי, 3 או 4 פעמים, לזוגות וליחידות. מסור לחברך את חבילת הגזירים שלך, וקבל ממנו את שלו.
 מייך את הגזירים שקבלת לשלוש קבוצות שוות-אותיות, ונסה למצוא את רצף האותיות המקורי, כך שיתאים כמובן לתבנית הגזירה בכל אחת מהקבוצות האלה.

כדי לתת למשימה הזאת מסגרת אפשרית עבורנו, נתרגל אותה בפפטידים קצרים בלבד, כדוגמת הפפטיד הבא:

מקטעי CNBr	Phe-Trp-Met-Gly-Lys-Leu-Pro-Met-Asp-Arg-Cys-Ala-Gln
מקטעי טריפסין	

חתכו פוליפפטיד נתון (שונה מהדוגמה שלמעלה)
 לשתי סדרות של מקטעים; פעם על יד ציאנוגן ברומי ופעם על ידי טריפסין, וקבלו את התוצאות הבאות:
 מקטעי ה-CNBr:

1. *Asp-Ile-Lys-Gln-Met*
2. *Lys-Phe-Ala-Met*
3. *Tyr-Arg-Gly-Met*
4. *Lys*

מקטעי הטריפסין:

5. *Gly-Met-Asp-Ile-Lys*
6. *Phe-Ala-Met-Lys*
7. *Gln-Met-Lys*
8. *Tyr-Arg*

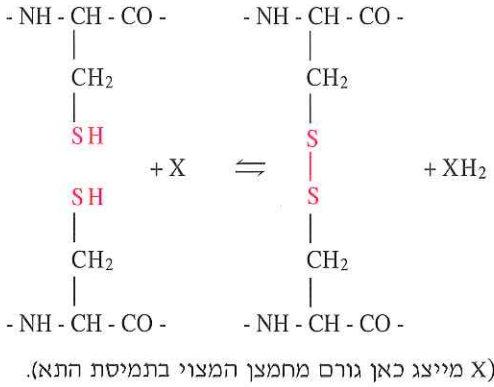
מהו רצף החומצות האמיניות בפוליפפטיד?

בנוסף לטריפסין, מוכרים לנו אנזימים פרוטאוליטיים רבים "היודעים את המלאכה"; כמו, למשל, האנזימים המצויים במערכת העיכול, שיש בהם כאלה החותכים את השרשרת בנקודות ייחודיות האפייניות להם:

האנזים	המקור	מקום החיתוך
טריפסין	לבלב	$\begin{array}{c} \text{Rn} \quad * \quad \text{Rm} \\ \quad \downarrow \quad \\ \text{-NH-CH-CO-NH-CH-CO-} \end{array}$ Lys, Arg = Rn (שרשרת צד טעונה חיובית) Pro ≠ Rm
כימוטריפסין	לבלב	Phe, Trp, Tyr = Rn (שרשרת צד ארומאטית, הידרופובית) Pro ≠ Rm
פפסין	רירית הקיבה	Phe, Trp, Tyr = Rm (שרשרת צד ארומאטית, הידרופובית) Pro ≠ Rn

* החץ מצביע על מקום החיתוך הייחודי.

עוד לא סיימנו. כדי להשלים את תמונת המיבנה הקולנטי של החלבון, צריך לאתר גם את מקומם של קשרי הדוגפריית - אם אמנם יש כאלה, כמו שראינו באינסולין. קשרים אלה נוצרים כאשר שני ציסטאינים מגיבים זה עם זה בשרשרות הצד שלהן:



כשמבצעים הידרוליזה, היא איננה פוגעת בקשרי הדוגפריית, וכך מתקבלים צמדי פפטידים, קשורים יחדיו בקשרי דוגפריית. את הקשר שביניהם ניתן סאנגר על ידי חימצון הקשר הדוגפרי בעזרת החומצה העל-מתאנאית, (HCOOOH):



כעת קובעים את רצף החומצות האמיניות בשני הפפטידים שנפרדו זה מזה, וממקמים אותם בשרשרת על פי התאמתם למיבנה הראשוני הידוע של החלבון.

טיפול בפוליפפטיד עם חומצה על-מתאנואית וקבלו  שני פפטידים בעלי הרצף הבא:

1. *Ala-Phe-Cys-Met-Tyr-Cys-Leu-Trp-Cys-Asn*
2. *Val-Cys-Trp-Val-Ile-Phe-Gly-Cys-Lys*

הידרוליזה של הפוליפפטיד השלם עם כימוטריפסין נתנה את המיקטעים הבאים, שהרכבם הוא (לא על פי הרצף):

3. (Ala, Phe)
4. (Asn, 2Cys, Met, Tyr)
5. (Cys, Gly, Lys)
6. (2Cys, Leu, 2Trp, Val)
7. (Ile, Phe, Val)

מהו מיקומם של קשרי הדוגפרית בפוליפפטיד המקורי?

הנה כי כן, אנו יודעים סוף סוף את המיבנה הראשוני של החלבון, so what?

ובכן, קודם כל, כשיודעים את המיבנה הראשוני, אפשר ליצור את החלבון בדרך סינתטית. וגם - נתוני הרצף יכולים לסייע באיתור קטעי ה-DNA המכתיבים את יצירת החלבון, או להנחות אותנו בהכנת נוגדנים לחלבון, או לאפשר לנו לעקוב אחריו במהלך גלגולו בתגובות בתא.

אטלסים של מיבנים ראשוניים מכילים כיום עשרות אלפי רצפים של חלבונים שונים. לחלבונים הסיביים יש בדרך כלל הרכב אופייני, ועוד נדון בכך. אך לחלבונים הכדוריים, המצויים בתמיסה, יש בדרך כלל הרכב כולל דומה למדי.

הרכב כולל אינו יכול, כמובן, לאפיין חלבון כל שהוא, שכן אורך השרשרת משתנה מאד, מעשרות אחדות ועד למעלה מאלף, כשהממוצע הוא כ-300 יחידות בשרשרת; ולכל חלבון יש כמובן רצף ייחודי משלו. מספר האפשרויות לרצף

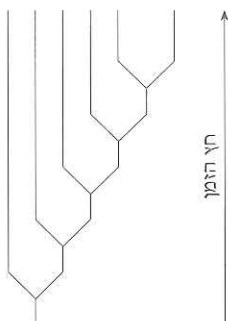
שונה הוא עצום ורב: לשרשרת בת 300 יחידות חומצה אמינית: 20^{300} , שהם 10^{390} – מספר גדול בהרבה מהמספר המשוער של האטומים בתבל כולה. אנו יודעים כבר שהרצף הנתון לכל חלבון אינו נוצר באקראי, אלא הוא תולדה ייחודית של רצף היחידות ב-DNA. לפיכך אם מוצאים בחלבונים שונים קטעים שווים, יש לכך בוודאי משמעות מיוחדת במקור תורשתי משותף. ואמנם, השוואת הרצף של חלבון "חדש" לאוצר אלפי המיבנים הראשוניים הידועים כבר, יכולה לגלות את השתייכותו "המשפחתית", ומציאת קטעי רצף שווים בחלבונים שונים, יכולה להעיד על מיבנים תואמים ועל דמיון בתיפקוד.

במהלך האבולוציה גורמות המוטאציות ב-DNA לשנויים מקבילים ברצף החומצות האמיניות בחלבון, וכך יכולים השנויים האלה להיות מעין "יומן היסטורי" המתעד את האבולוציה, כשהחלבונים הם העדות למהלכה ברמה המולקולארית. אפשר "לתרגם" ליחידות זמן את ההבדלים בין החלבונים השייכים ל"משפחה", ולומר, שככל שמספר ההבדלים רב יותר – נקודת ההסתעפות האבולוציונית רחוקה יותר לאחור.

על פי המתכונת הזאת הדמיון הרב שבין שרשרת המיוגלובין לבין ארבע השרשרות של ההמוגלובין, מצביע על כך שהם תוצר של מקור משותף; וכמוהם שייכים למשפחת הגלובין גם חלבונים דומים בייצורים חסרי חוליות, כשהדמיון והשוני ברצף החומצות האמיניות, מצביע על מידת הקירבה ביניהם.

מספר ההבדלים ברצף החומצות האמיניות של שרשרת α בהמוגלובין של בעלי חיים שונים:

קוף	אדם	קוף	פרה	תרגולת	כריש
קוף	4				
פרה	17	16			
תרגולת	35	35	38		
כריש	88	88	84	92	
רכיכה	124	125	128	128	133



תרשים "עץ אבולוציוני"

11? התאם את הטבלה לתרשים "העץ האבולוציוני" של ששת היצורים המופיעים כאן: רשום בראש כל קו את שם היצור המתאים לו. וציין את מספר ההבדלים המתאים לכל נקודת הסתעפות.

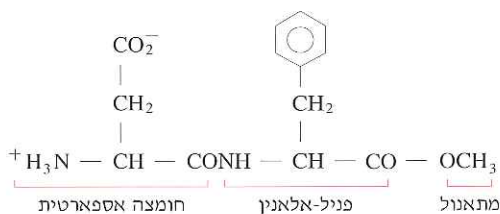
והנה, בתוך שפע ההבדלים, בולטת – בדגש מיוחד – העובדה, שחלק מן החומצות האמיניות שבשרשרת, שומר בקפדנות על מקומו בכל הייצורים החיים, לאורך האבולוציה כולה; מה שמעיד על חשיבותם של המקומות האלה לתיפקוד התקין של ההמוגלובין.

12? בחן את רצף החומצות האמיניות של המיוגלובין ושל שרשרות α ו- β של ההמוגלובין, המופיע בנספח. כמה מקומות שמורים יש בהשוואה שבין שתי השרשרות α ו- β ? וכמה – בהשוואה שבין המיוגלובין ושתי השרשרות גם יחד?

משמעותם של המקומות השמורים האלה לפעולת החלבון אינה מתבארת מן המיבנה הראשוני עצמו, והיא יכולה להתברר רק כאשר בוחנים את המבנה המרחבי שלו. אך זהו כבר עניינו בפרקים הבאים...

אספארטאם: הפפטיד המתוק

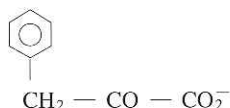
האספארטאם הוא ממתיק מלאכותי, המשווק גם בשם: Nutra-Sweet. הוא אושר לשימוש בארה"ב ב-1981, אחרי בדיקות נרחבות, ומאז יש לו חשיבות מסחרית ניכרת בכל העולם. אחד הצרכנים הגדולים שלו הוא תעשיית המשקאות הקלים, המייצרת משקאות "דיאט". האספארטאם הוא דיפפטיד של חומצה אספארטית ופניל-אלאנין, הקשור בקשר אסטרי עם מתאנול:



אספארטאם

החומצה האספארטית לבדה היא חסרת טעם; הפניל אלאנין – מר, והדיפטיד מתוק פי 150-200 מסוכרוז. ככל פפטיד, גם האספארטאם, מתפרק בהידרוליזה. לכן הוא אינו עמיד בבישול ממושך, וגם במשקאות הקלים החומציים יש לו "זמן מדף" מוגבל. בגוף, לאחר ההידרוליזה, משתלבות החומצות האמיניות בחילוף החומרים הרגיל. אך זו המכשלה, שבגינה הוא אסור לחולי פניל קטונוריה. (Phenylketonuria, PKU).

PKU היא מחלה תורשתית של חסר באנזים ההופך פניל-אלאנין לטרוזין. הפניל אלאנין מצטבר בכל נוזלי הגוף, וחלקו הופך לפניל פירובאט, המופיע בשתן. במולקולת הפניל פירובאט יש קבוצת קטון, ומכאן שם המחלה "פניל קטון בשתן".



פניל-פירובאט

עודפי הפניל-אלאנין גורמים בתינוק לפגיעה קשה ובלתי הפיכה בהתפתחות המוח. החולים סובלים מפיגור שיכלי ורבים מהם מתים בגיל צעיר.

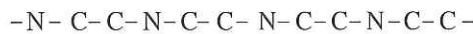
כיום מזהים בקלות את ה-PKU בעזרת בדיקת דם פשוטה, מיד לאחר הלידה. טיפול בדיאטת דלת פניל אלאנין, במהלך כל שנות הילדות, מונע את נזקי המחלה. לאחר כ-10 שנים, שוב אין עודפי הפניל-אלאנין פוגעים במוח ואפשר לעבור לדיאטה רגילה. אך האשה ההרה, אם היא נושאת המחלה, חייבת לזכור, שרמת פניל אלאנין גבוהה בדמה שלה עלולה לפגוע בעובר.

מולקולת החלבון בשלושה מימדים: המיבנה השניוני

נתבונן שוב בנוסחת עמוד השדרה של מולקולת החלבון:



ואם נתמקד רק בציר המרכזי:



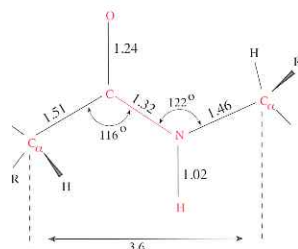
נמצא כאן קשרים פשוטים, יחידים, בלבד; כלומר, יש לצפות לכך, ששרשרות הפוליפפטיד, בשל אפשרויות הסיבוב החופשי סביב הקשרים האלה, תופענה בתמיסה במספר רב מאד של צורות; ויותר מכך – שהצורה הנתונה לכל מולקולה תשתנה ללא הרף, בגלל התנועה התרמית שלה ושל מולקולות המימס סביבה. ובכל זאת ניוכח לדעת, שכל המולקולות בחלבון מסוים "בוחרות" לעצמן באותה הצורה האחת, האופיינית לאותו חלבון, הקובעת את תכונותיו ואת דפוסי פעילותו.

את צורתה של מולקולת החלבון לומדים להכיר בטכניקות פיסיקליות מיוחדות, שהבולטת בהן היא הקרנת גביש חלבון בקרני X. מן הטיפול המתמטי בתוצאות פיזור קרני X מן הגביש, כפי שהן נראות על-גבי לוח צילום, אפשר לקבל את מפת צפיפות החומר; מעין מפה טופוגרפית, הממקמת כל אטום ואטום בסריג המולקולרי. אין עדיין דרך מקבילה לבחינתה של צורת המולקולה בתמיסה, אך יש בסיס סביר ביותר להנחה, שאין הבדל בין זו שבגביש לבין זו שבתמיסה; שכן אנזימים מגובשים מכילים תמיד מים בתוך הגבישים וממשיכים לקיים את פעילותם הביולוגית, שהיא, כידוע, מותנית בקיום הצורה הטבעית של המולקולה. גזים ומומסים שונים מפעפים באופן חופשי דרך הסריג הגבישי ומגיבים עם מולקולות החלבון בדרך האופיינית להן. המוגלובין גבישי, למשל, מגיב עם מולקולות החמצן כמו ההמוגלובין שבתמיסה.

הואיל ועמוד השדרה הפוליפטידי זהה בכל החלבונים, נתבונן תחילה במיבנה הקבוצה הפפטידית, כפי שעשה זאת פאולינג הגדול, כשבחן, לפני כחמישים שנה, מיבנים של חומצות אמיניות ודיפפטידים שונים, כצעד ראשון להכרת המיבנה המרחבי של מולקולת החלבון.

1. הקבוצה הפפטידית ועמוד השדרה של החלבון

בדיקת גבישים של פפטידים שונים מראה שהקשר הפפטידי C-N איבד את האפשרות לסיבוב חופשי; ולפיכך הצמד C-N וארבעת האטומים הקשורים אליו, מצויים במישור צפיד אחד, כשכיוון ה- N-H הפוך לכיוון ה- C=O. הענין מתברר כשמודדים את אורכי הקשרים הקולונטיים שבין האטומים ומגלים את התבנית הרשומה בשולי העמוד.



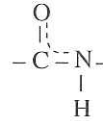
הנתונים הגאומטריים של הקבוצה הפפטידית

השווה את הנתונים הרשומים בתבנית הנתונה כאן, לאלה המצויים בספר הנתונים.

התוצאה המפתיעה ביותר בהשוואה הזאת היא, שהקשר הפפטידי C-N קצר כדי $0.14 \text{ \AA}$ מאורכו של הקשר היחיד הרגיל N-C α ; והקשר בקבוצת ה- C=O שכאן ארוך ב- $0.02 \text{ \AA}$ מן הקשר המקביל שבאלדהיד או בקטון. מכאן הסיק פאולינג, שיש לקשר הפפטידי C-N תכונות אפייניות של קשר כפול, כאילו "על חשבון" הקשר C=O

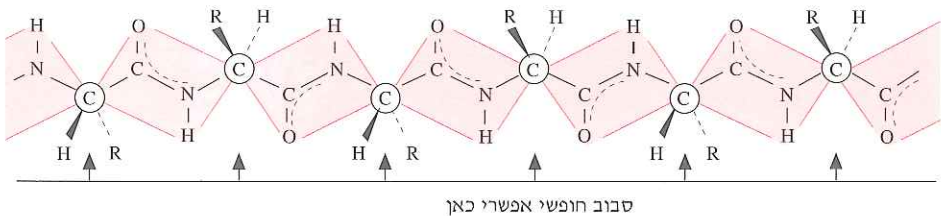
את "המחיר" משלמת למעשה הקבוצה הפפטידית בכך, שהיא אינה מגיבה כבסיס (נוכך גם קבוצת האמיד של האספאראגין והגלוטאמין). כלומר, זוג האלקטרונים "הפנוי" של אטום החנקן אינו זמין לקלוט פרוטון מימן, משום שהוא – בדרך כלל – שותף לקשר הפפטידי שבין אטום החנקן ואטום הפחמן, ומקנה לו את המישוריות והצפידות האפייניות לתבנית הקשר הכפול. כך אנו נדחפים להניח, שקיים קשר כפול גם בין אטום הפחמן ואטום החמצן וגם בין אטום הפחמן ואטום החנקן. איך מתיישבת מסקנה כזאת עם נוסחת הייצוג האלקטרונית

המוכרת לנו, זו שרשמנו בעמוד 3 ? – לא מתיישבת!!
ובכן, מה הפתרון? אפשר, אולי, לרשום נוסחת ייצוג של
"פשרה":



(נראה גם בספרה של נאוה מילנר "תרכובות הפחמן", בהוצאת המחלקה להוראת המדעים, מכון ויצמן למדע: חומר רקע, עמ' 147. אם תגיע ללימודי כימיה באקדמיה, תעסוק בודאי גם בשאלה זו).
ובינתיים, אנו, כאן, נסתפק בנתונים עצמם, החשובים לענייננו: אטום החנקן בקשר הפפטידי מאבד את הבסיסיות שלו והוא משתלב במיבנה המישורי, המאפיין את הקבוצה הפפטידית.

אנו למדים, אם כן, שלצורך הכרת המיבנה המרחבי של עמוד השדרה של מולקולת החלבון, ראוי לבחון אותו לאו דווקא כצרוף של יחידות חומצה אמינית, אלא כסידרת מישטחים מישוריים וצפידים של הקבוצות הפפטידיות, הקשורים ביניהם על ידי אטומי הפחמן הטטרהדריים של $\text{C}\alpha$, שהקשרים היחידים שלהם הם גם היחידים המאפשרים סיבוב חופשי:



ציור סכמטי של חוט השדרה של החלבון

גם לאטום הפחמן $\text{C}\alpha$, שהוא חולית הקישור בין הקבוצות הפפטידיות, יש תרומה גאומטרית ייחודית: הוא אטום פחמן קיראלי.
מהו מיבנה קיראלי? קרא על כך בספרה של נאוה מילנר "תרכובות הפחמן", שכבר הזכרנוהו: חומר רקע, עמודים

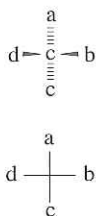
תרגיל 2



בעבודה עם מודלים (מתוך "פנים חדשות במראה",
חוברת לעבודה עצמית, בהוצאת המחלקה להוראת
המדעים, מכון ויצמן למדע).

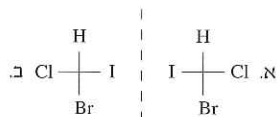
1. בנה מודל של CH_4 טטראהדרי. נכנהו A.
בנה ל-A דמות-ראי (בבואה): B
האם יש ל-A מישור סימטריה?
האם A ו-B חופפים?
האם A הוא מולקולה קיראלית?
2. נתמיר ב-A קבוצה אחת: למשל, Cl במקום H;
ובהתאמה – גם בדמות הראי B.
האם התבניות A ו-B חופפות?
האם יש כאן מישור סימטריה?
האם A (או B) הוא מולקולה קיראלית?
3. נתמיר עמדה נוספת: Br במקום H; ובהתאמה –
גם בדמות הראי B. לפנינו CH_2ClBr .
האם התבניות A ו-B חופפות?
האם יש כאן מישור סימטריה?
האם A (או B) הוא מולקולה קיראלית?
4. נתמיר עוד עמדה אחת: I במקום H; ובהתאמה –
גם בדמות הראי B. קבלנו תבנית אטום פחמן
טטראהדרי שיש לו בארבע הפינות ארבעה שכנים
שונים: $CHClBrI$.
האם יש כאן מישור סימטריה?
האם הדמויות חופפות?
האם A (או B) הוא מולקולה קיראלית?

זוג חומרים, שהמולקולות שלהם אינן חופפות, אך הן כדמות
ראי זו לזו, נקרא אנאנטיומרים (enantiomers), והם דוגמה
לאיזומריה מרחבית, הקרויה גם איזומריה אופטית.
נוסחות המבנה המרחביות, הרשומות במישור הנייר,
אמורות לייצג את תבנית הטטראהדר. לשם כך מוסכם (לפי

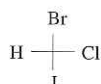


שיטתו של אמיל פישר, (1852-1919) שאת אטום הפחמן הסטראהדרי מציבים במישור הנייר כך, שהקבוצות הקשורות בקווים האפקיים, b ו- d , הן הבולטות ממישור הנייר אל הצופה; והקבוצות הקשורות בקווים האנכיים, a ו- c , נוטות לאחור, לתוך הנייר.

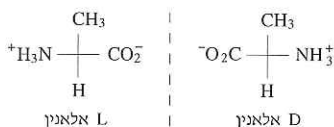
5. לפניך נוסחות מיבנה של שתי מולקולות, שהן דמות ראי זו לזו:



בנה מודל של המולקולה הבאה וקבע אם היא חופפת לתבנית נוסחה א' או ב':



יש כמה סימונים מקובלים לציין השוני בין שתי התבניות האנאנטיומריות. אנו נשתמש כאן בשיטה הותיקה יותר, אמנם פחות מקובלת היום, אך פשוטה יותר לענייננו: סימון באותיות D ו-L. (D בא מ-Dextro, ימין בלטינית; L – Laevo, שמאל). למשל, D ו-L אלאנין:



וכך יש לכל חומצה אמינית שני איזומרים אופטיים, זוג אנאנטיומרים, D ו-L; למעט חומצה אמינית אחת. מי היא?

עובדה מרשימה היא, שהחומצות האמיניות כולן, בכל החלבונים, בכל היצורים החיים, מופיעות – תמיד –

בתבנית L בלבד! וכך, במובן מסויים, חומר החיים הינו "שמאלי"... נשוב לכך כשנדון במיבנה המרחבי של החלבון. (מצויים בעולם החי מספר פוליפפטידים, שאינם נוצרים על-פני הריבוסומים, הכוללים גם חומצות אמיניות D, כמו למשל חלק מהחמרים האנטיביוטיים).

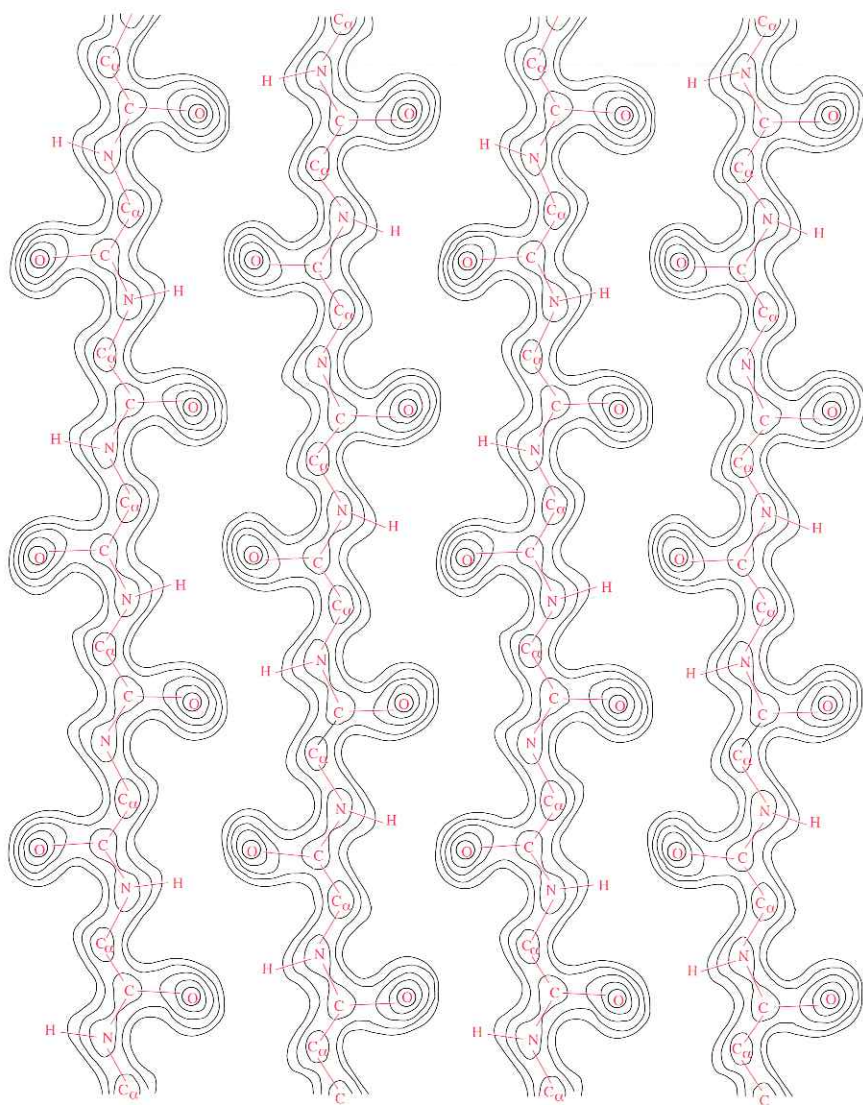
הצורות השונות של החלבון נקבעות, אם כן, על פי אפשרויות הסיבוב סביב קשרי הפחמן הטטרהדרי; ומדרגים אותן, לפי אופיין, בשתי קבוצות, שתי רמות-אירגון כוללות, הנקראות **המיבנה השניוני והמיבנה השלישוני** של החלבון.

2. משטחים וסלילים: המיבנה השניוני של החלבונים הסיביים.

רוב החלבונים הפעילים בתמיסה המימית, כמו האנזימים, לובשים בדרך כלל צורה כדורית של שרשרת מפותלת כפקעת, שלא פשוט להסביר את תבניתה ואת התאמתה לתפקידה. החלבונים הסיביים, לעומתם, מציגים מספר מיבנים פשוטים יחסית של מולקולות חוטיות, ארוכות, בעלות צורה קווית סדירה, שאת מקורה אפשר לחפש בסדירות מקבילה ברצף החומצות האמיניות. הם מתפקדים כחומרי מיבנה ותמיכה ברקמות, ובגלל מיבנם הפשוט קל יותר למצוא בהם את הקשר מיבנה – תיפקוד. נדון כאן בשלושה טיפוסים עיקריים: הפיברואין, הבונה את המשי או את קורי העכביש; הקראטין, הבונה את השער, הצמר, הצפורניים והנוצות; והקולאגן – שהוא החלבון המצוי ביותר בגופנו, בעור, בסחוס, בגידים, בעצמות ובריקמות החיבור השונות.

פיברואין:

הבה נבחן מפת צפיפות שהתקבלה מ"צילום" בקרני X של סיבי משי, שנעשה במרכז למחקר מדעי ותעשיתי באוסטרליה. מפה זו מציגה ארבע שרשרות פוליפפטידיות במישטח משותף, הארוזות יחדיו במיבנה סיבי.



מפת צפיפות שהתקבלה מ"צילום" בקרני x של סיבי משי
שנעשה במרכז למחקר מדעי ותעשייתי באוסטרליה

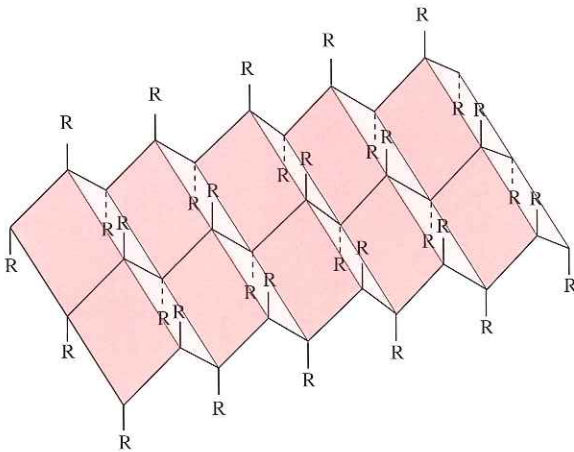
1969 by Scientific American Inc. Keratin by R.D.B. Frazer

ציין את כיוון השרשרות, מקצה N לקצה C.
אילו כוחות מחזיקים יחדיו את השרשרות הפרושות,



זו ליד זו, במשטח הסיבי?

לאמיתו של דבר אין השרשרות יכולות להיתפרש במלואן במישור אחד – הקבוצות הפפטידיות הסמוכות בשרשרת האחת תימצאנה דחוקות מדי זו לזו. לפיכך, אנוסות השרשרות הפוליפפטידיות ליצור קפלים בזיגזג, מעלה ומטה, כשרשרות הצד נמצאות, לסרוגין, מעל למשטח או מתחתיו. קפלים אלה מעניקים לאריזה זו את שמה: מישטח קפלים (pleated sheet), או בכנוי המקובל: מישטח β ; זוהי צורת האריזה האופיינית לסיבי פיברואין המשי.

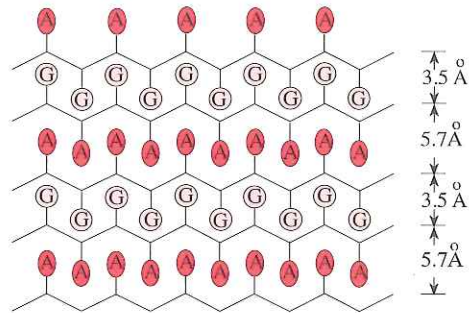


משטח קפלים

אפשר לראות שבאריזה זו ניצבות שרשרות הצד, לסרוגין, מעל למישטח ומתחתיו. טיבן של שרשרות הצד האלה הוא שיקבע את אופן אריזתם של מישטחי הקפלים זה על גבי זה. בחינת המיבנה הראשוני של פיברואין המשי מלמדת שיש בהם מקטעים ארוכים הבנויים מצרף מחזורי של שש החומצות האמיניות: $(\text{Gly-Ser-Gly-Ala-Gly-Ala})_n$, בהתאמה להרכב החומצות האמיניות שראית בטבלה שבעמוד. ההופעה הסרוגית של הגליצין מציבה אותו בצידו האחד של המישטח ואת שרשרות הצד של הסרין והאלאנין - בצידו השני. אטומי המימן של אטומי הפחמן α מצויים במישור הקפלים, ואילו שרשרות הצד - ניצבות לו.

סידור כזה מאפשר אריזה צפופה של המישטחים, האחד על גבי השני, כך ש"פני הגליצין" מצויים מול "פני גליצין", ו"פני אלאנין" - מול "פני אלאנין" (או סרין, שהוא בן גודל דומה).

בסיבי המשי, אם כן, יש קשרים קוולנטיים במימד האחד; קשרי מימן במימד השני; וקשרי ואן דר ואלס, באריזה הצפופה, במימד השלישי.



תרשים אריזת המשי

אך עדיין אין זה הסיפור כולו. עיון בטבלת ההרכב מראה מיד שיש במשי שרשרות צד נוספות – ואלה בדרך כלל גדולות יותר, שונות בצורתן זו מזו (כמו למשל...?) ואינן מוצאות להן מקום בסדר אריזה כזה. לפיכך בצד הקטעים הסיביים מצויים גם קטעים אמורפיים, שהם רכים יותר וגמישים. כלומר, המשי הוא פולימר, הבנוי קטעים סיביים וקטעים אלסטיים לסרוגין - והפרופורציה בין שני החלקים האלה היא הקובעת את תכונותיו המיוחדות.

קראטין:

הקראטין הוא חלבון סיבי, קשיח או גמיש, בלתי מסיס במים, הבונה את מעטפת ההגנה החיצונית בגוף: צפורניים ושריון בזוחלים; נוצות ומקור בצפורים; קרניים, צמר ושער, וכמובן גם צפורניים – ביונקים.

הקראטין, שהיה מצע נוח לבחינת מיבנה מפורטת, דירבן חוקרים רבים לחפש את הקשר שבין מיבנה החלבון לבין תפקידיו. חלוץ בתחום זה, בראשית שנות השלושים, היה המדען האנגלי אסטבורי (Astbury), שבחן את תכונות הקראטין לפי תמונת קרני X של סיבי צמר. ניתוח התמונות האלה מעיד על מיבנה שיש בו תבניות חוזרות בנות $1.5\text{\AA}$ ו- $5.4\text{\AA}$.

חל שינוי בתבנית זו כשמטפלים בסיבי הצמר בקיטור והם זוכים באלסטיות ניכרת; וכאשר סיב הצמר נימתח עד כדי הכפלת אורכו, משתנה תמונת קרני X שלו לאחרת, הדומה לזו של המשי, שבה גודל התבנית החוזרת הוא כ- $7\text{\AA}$, שהם התרומה לציר האורך של שתי יחידות חומצה אמינית במישטח, המוכר לנו כבר. לצורה הרגילה של הצמר קרא אסטבורי: α , ולצורה המתוחה קרא β (מכאן השם מישטח β). ההנחה היתה, אם כן, שצורת β מייצגת את הצורה המתוחה של המולקולה בסיב, כפי שראינו בפיברואין; ואילו בצורת α יש לשרשרת הפוליפטיד צורה מקופלת כלשהיא. במשך כ- 20 שנה התחרו ביניהם מדענים רבים בנסיון לקבוע את טיבו של קיפול α זה, עד שקם פאולינג...

מספר לינוס פאולינג:

"שאלנו את עצמנו איך מתקפלת השרשרת הפוליפטידית? לא ידענו את התשובה, אך הנחנו שהיא מוחזקת על ידי קשרי מימן. ב- 1937 ביליתי זמן רב בבנית מודלים; סברתי שאני יודע כיצד נראית שרשרת פוליפטידית ורציתי לקפל אותה כך שיווצרו קשרי מימן. לא הצלחתי. כנראה, כך חשבתי, יש משהו אודות החלבונים שאינני יודע עדיין.

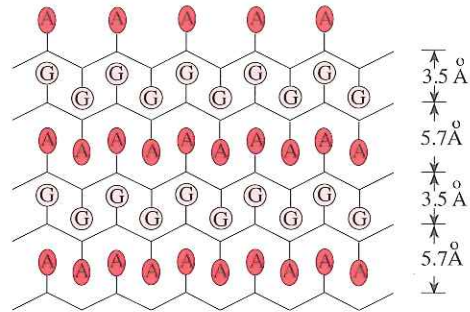
ואז --- התקררתי.

שכבתי במיטה יומיים שלושה וקראתי ספורי בלשים, עד שהתחלתי להשתעמם. פניתי לאשתי ובקשתי 'הביאי נא גליון נייר, אני מתכוון לעבוד על השאלה איך שרשרת פוליפטיד מתקפלת לחלבון'. היא הביאה לי גליון נייר, סרגל ועיפרון והתחלתי לעבוד. שירטטתי על הנייר את תבנית עמוד השידרה של הפוליפטיד וניסיתי לקפל את הנייר כדי לראות איך יכולים להיווצר קשרי מימן לאורך השרשרת. התוצאה היתה מיבנה מפותל סביב עצמו כמו קפיץ...

ובכן — הצלחתי! זה לקח לי מספר שעות באותו יום, במרס

1948, למצוא את המיבנה הנקרא סליל α . "

בסיבי המשי, אם כן, יש קשרים קוולנטיים במימד האחד; קשרי מימן במימד השני; וקשרי ואן דר ואלס, באריזה הצפופה, במימד השלישי.



תרשים אריזת המשי

אך עדיין אין זה הסיפור כולו. עיון בטבלת ההרכב מראה מיד שיש במשי שרשרות צד נוספות – ואלה בדרך כלל גדולות יותר, שונות בצורתן זו מזו (כמו למשל...?) ואינן מוצאות להן מקום בסדר אריזה כזה. לפיכך בצד הקטעים הסיביים מצויים גם קטעים אמורפיים, שהם רכים יותר וגמישים. כלומר, המשי הוא פולימר, הבנוי קטעים סיביים וקטעים אלסטיים לסרוגין - והפרופורציה בין שני החלקים האלה היא הקובעת את תכונותיו המיוחדות.

קראטין:

הקראטין הוא חלבון סיבי, קשיח או גמיש, בלתי מסיס במים, הבונה את מעטפת ההגנה החיצונית בגוף: צפורניים ושריון בזוחלים; נוצות ומקור בצפורים; קרניים, צמר ושער, וכמובן גם צפורניים – ביונקים.

הקראטין, שהיה מצע נוח לבחינת מיבנה מפורטת, דירבן חוקרים רבים לחפש את הקשר שבין מיבנה החלבון לבין תפקידיו. חלוץ בתחום זה, בראשית שנות השלושים, היה המדען האנגלי אסטבורי (Astbury), שבחן את תכונות הקראטין לפי תמונת קרני X של סיבי צמר. ניתוח התמונות האלה מעיד על מיבנה שיש בו תבניות חוזרות בנות $1.5\text{\AA}$ ו- $5.4\text{\AA}$.

חל שינוי בתבנית זו כשמטפלים בסיבי הצמר בקיטור והם זוכים באלסטיות נכרת; וכאשר סיב הצמר נימתח עד כדי הכפלת אורכו, משתנה תמונת קרני X שלו לאחרת, הדומה לזו של המשי, שבה גודל התבנית החוזרת הוא כ- $7\text{\AA}$, שהם התרומה לציר האורך של שתי יחידות חומצה אמינית במישטח, המוכר לנו כבר. לצורה הרגילה של הצמר קרא אסטבורי: α , ולצורה המתוחה קרא β (מכאן השם מישטח β). ההנחה היתה, אם כן, שצורת β מייצגת את הצורה המתוחה של המולקולה בסיב, כפי שראינו בפיברואין; ואילו בצורת α יש לשרשרת הפוליפטיד צורה מקופלת כלשהיא. במשך כ- 20 שנה התחרו ביניהם מדענים רבים בנסיון לקבוע את טיבו של קיפול α זה, עד שקם פאולינג...

מספר לינוס פאולינג:

"שאלנו את עצמנו איך מתקפלת השרשרת הפוליפטידית? לא ידענו את התשובה, אך הנחנו שהיא מוחזקת על ידי קשרי מימן. ב- 1937 ביליתי זמן רב בבנית מודלים; סברתי שאני יודע כיצד נראית שרשרת פוליפטידית ורציתי לקפל אותה כך שיווצרו קשרי מימן. לא הצלחתי. כנראה, כך חשבתי, יש משהו אודות החלבונים שאינני יודע עדיין.

ואז --- התקררתי.

שכבתי במיטה יומיים שלושה וקראתי ספורי בלשים, עד שהתחלתי להשתעמם. פניתי לאשתי ובקשתי 'הביאי נא גליון נייר, אני מתכוון לעבוד על השאלה איך שרשרת פוליפטיד מתקפלת לחלבון'. היא הביאה לי גליון נייר, סרגל ועיפרון והתחלתי לעבוד. שירטטתי על הנייר את תבנית עמוד השידרה של הפוליפטיד וניסיתי לקפל את הנייר כדי לראות איך יכולים להיווצר קשרי מימן לאורך השרשרת. התוצאה היתה מיבנה מפותל סביב עצמו כמו קפיץ...

ובכן – הצלחתי! זה לקח לי מספר שעות באותו יום, במרס 1948, למצוא את המיבנה הנקרא סליל α ."



לינוס פאולינג (1901 - 1994) - עם מודלים של סליל α

תרגיל 3



גם אנחנו יכולים, בעקבות פאולינג, "לקפל את הנייר" ולבנות מודל לסליל α : התרשים שבנספח, מייצג את עמוד השידרה של החלבון, לפי קנה-מידה של $1 \text{ \AA} = 1 \text{ ס"מ}$. גזור את התרשים לפי קווי המיתאר של המיסגרת החיצונית שלו, ואת החתכים המסומנים מול אטומי המימן והחמצן, שאמורים לאפשר לך ליצור את קשרי המימן.

קפל את הדגם שבידך לפי הקווים האלכסוניים שחוצים את אטומי הפחמן α – קווים אלה נטויים כדי 67° לציר השרשרת, והקיפול על פיהם מבטיח את המדרגה הנידרשת לכל יחידת חומצה אמינית: $1.5 \text{ \AA}$ מאטום פחמן α אחד

למישנהו, לפי קנה המידה של התרשים.

וכעת – ליצירת קשרי המימן: חבר את קבוצת ה- CO של הפפטיד הראשון (i) עם קבוצת ה- NH של הפפטיד הרביעי ($i+3$); ואחר כך, בהתאמה, את קשרי המימן הבאים בתור. באופן זה יצרת סליל הבנוי מ- 3.6 יחידות חומצה אמינית לסיבוב. שים לב: יש כאן נצול מלא של כל קשרי המימן האפשריים, כשאתומי H, N ו- O הבונים אותם, מצויים בקו ישר ומקביל לציר האורך של הסליל. מדוד במודל את אורך קשר המימן מאטום החנקן של קבוצת ה- NH אל אטום החמצן של קבוצת ה- CO . זהו אורך הקשר האפייני לקשר-מימן.

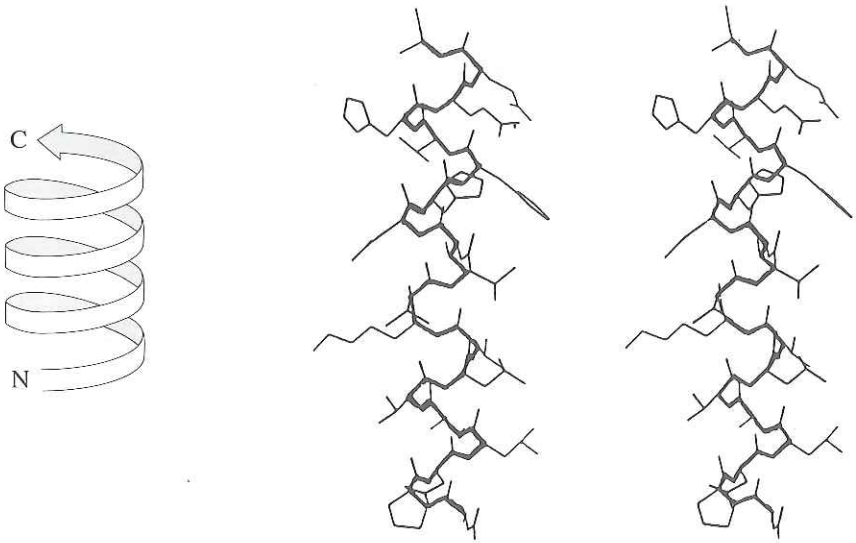
המודל שבידך מדגים גם מדדים נוספים של הסליל: זהו סליל בעל פיתול ימיני של 100° לכל חומצה אמינית, כלומר: 3.6 יחידות חומצה אמינית בסיבוב שלם אחד. תרומת כל יחידת חומצה אמינית לציר האורך של הסליל היא, כאמור: $1.5 \text{ \AA}$, ושל 3.6 יחידות: $5.4 \text{ \AA} = 1.5 \cdot 3.6$, כנידרש לפי תמונת קרני X שמצא אסטבורי. חזרה שלימה של המיבנה הסלילי באה כל $27 \text{ \AA}$, שהם 5 סיבובים שלמים ובהם 18 חומצות אמיניות.

כמה חומצות אמיניות צריכות להתפלמר כל שניה  "בפקעית שורש השער", המייצרת את סיבי הקראטין, כדי להצמיח שער בקצב של 15 ס"מ בשנה? מספר מרשים? העכביש טווה חוטים ארוכים פי 100 בזמן פי 100 קצר יותר!!

ראוי להדגיש, שהסליל אינו חלול כפי שאפשר לדמות בטעות מן המודלים שלנו. מודל ממלא נפח מראה, שיש לסליל מיבנה קומפאקטי של אריזה צפופה, אשר מונעת ממולקולות המים לחדור פנימה – כך מובטחת סביבה נוחה, ללא תחרות, ליצירת קשרי המימן המתאימים.

נסה לקבוע, במודל שבידך, את כיווןן של שרשרות הצד הקשורות לאטומי הפחמן α – לפי נוסחת פישר של חומצה האמינית L , או לפי התרשימים הסטראוסקופיים של החומצות האמיניות – כדי להיווכח שהן מצויות בין קבוצות ה- NH הקטנות יותר מקבוצות ה- CO . קבוצות

ה-CO עצמן אינן מותירות ביניהן מספיק מקום לאטומי $C\beta$, שהם אטומי הפחמן הראשונים של שרשרות הצד, אלה הקשורים לאטום הפחמן $C\alpha$.



תרשים סטריאוסקופי של סליל α של
מיוהמרתין. (על-פי Richardson 1989).

מהי ההפרעה הצפויה לסליל α אם תימצא בו חומצה
אמינית D? (מה שלא קורה, כמובן). ומה יקרה אם תקפל
את המודל שלך בפיתול שמאלי? (כששרטוט נוסחת המיבנה
שעל הנייר ייפנה כלפי פנים – וגם זה יכול לקרות
לכאורה). מסתבר שהתבנית השמאלית של החומצות
האמיניות, היא המכוונת את הסליל לפיתול הימני
דווקא...

הסלילים נארוזים יחדיו לסיבי הקראטין, וקשרי הדוגפרית,
שיכולים להיווצר ביניהם, תורמים את חלקם לתכונותיהם:
תכולת ציסטאין נמוכה, עם מעט קשרי דוגפרית, מאפשרת
רכות וגמישות לצמר ולשער; תכולת ציסטאין גבוהה, עם

קשרי דוגפריט רבים יותר, מבטיחה את קשיותם של הקרן והצפורניים. (בפברואר המשי, למשל – ראה בטבלה – אין כלל ציסטאין).

תרגיל 4

נצל את 'מודל הנייר' גם כדי לבנות מודל של מישטח β :

גזור את דגם הנייר שבנספח לפי קווי המיתאר של המיסגרת החיצונית שלו, ואת החתכים המסומנים מול אטומי המימן והחמצן, שאמורים לאפשר לך – כבר ראית זאת – ליצור את קשרי המימן.

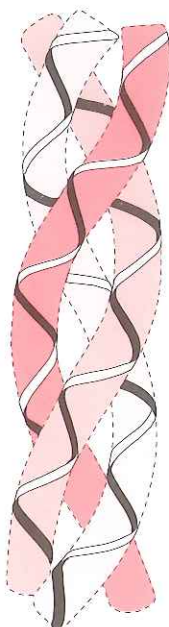
קפל את הדגם שבידך על פי הקווים המשיקים לאטומי החמצן, מעלה ומטה, לתבנית קפלים, תוך תשומת לב לכך, ששרשרת הצד "תוצב" בכיוון הפתוח ולא בכיוון הכלוא בין הקפלים. העזר בנוסחת פישור של תבנית L של החומצה האמינית ובתרשימים הסטראוסקופיים של החומצות האמיניות כדי להבחין בכיוון הנכון של שרשרת הצד.

הצב את מישטח הקפלים שלך מול מישטח הקפלים של חברך וחבר את הקבוצות המתאימות לקשרי המימן. שים לב לכך, ש"תפירת" קשרי המימן מסתדרת ללא עוות, רק אם שתי השרשרות תהיינה אנטימקבילות. גם כאן, כמו בסליל α , יש ניצול מלא של כל קשרי המימן האפשריים, אלא שהפעם הם אינם מקבילים אלא ניצבים לציר האורך של התבנית הסיבית. (יש לעיתים, בחלבונים הכדוריים – שעוד נדון בהם, גם קטעים של תבנית β בין שרשרות מקבילות, אך זוהי תבנית פחות יציבה בגלל העוות הנוצר בה לקשרי המימן).

התבונן במודל משטח הקפלים וציין לעצמך את עמדתן של שרשרות הצד ואת מיקומם של אטומי המימן על אטומי הפחמן α . וכעת נשוב לשאלה, שכמוה שאלנו אודות הסליל: מה יקרה לדעתך למשטח הקפלים, הבנוי מחומצות אמיניות L , אם "תתגב" אליו חומצה אמינית אחת בתבנית D ?

קולאגן:

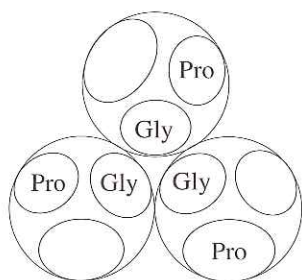
-Gly- Pro- Met- Gly- Pro- Ser- Gly- Pro- Arg- Gly- Leu-Hyp- Gly- Pro- Hyp- 31
 -Gly- Ala- Hyp- Gly- Pro- Gln- Gly- Phe- Gln- Gly- Pro- Hyp- Gly- Glu- Hyp- 46
 -Gly- Glu- Hyp- Gly- Ala- Ser- Gly- Pro- Met- Gly- Pro- Arg- Gly- Pro- Hyp- 61
 -Gly- Pro- Hyp- Gly- Lys- Asn- Gly- Asp- Asp- Gly- Glu- Ala- Gly- Lys- Pro- 76



א. תרשים סכמטי של הסליל המשולש

הקולאגן הוא החלבון הנפוץ ביותר בעולם החי; בגוף האדם הוא מהווה כ- 40% מכלל החלבונים. סיבי הקולאגן יוצרים אריגי רקמות שונות, כמו: עור, צינורות דם, גידים, סחוס ועצמות. בגידים הוא חזק כחוטי פלדה; בקרנית העין הוא שקוף כמים; בסחוס ובעור הוא אלאסטי. יש, אם כן, כמה סוגי קולאגן, אך משותף לכולם הרכב אופייני של חומצות אמיניות: כשליש בהן גליצין וכרבע – פרולין והידרוקסיפרולין. (ההידרוקסיפרולין נוצר מפרולין, כשהוא מצוי כבר בחלבון, בעזרת אנזים מיוחד וויטאמין C). המיבנה הראשוני מראה סדר מונוטוני של שלשות Gly-X-Y, כש- X הוא פעמים רבות פרולין ו- Y – ההידרוקסיפרולין; כדוגמת הרצף המייצג קטע של מולקולת קולאגן מעור חולדה, הרשום בראש העמוד.

תמונת קרני X ובניית מודל מתאים, מראה שמולקולות הקולאגן מעוצבות כמוט, כ- 3000Å אורכו ו- 15Å קוטרו; הוא מורכב משלוש שרשרות פוליפפטידיות, בכל אחת כ- 1000 יחידות חומצה אמינית, הקלועות יחדיו סביב ציר משותף, במיבנה סלילי משולש (Triple Helix). הפרולין, שהוא מוגבל בחופש הפיתול שלו, מקנה לסליל הזה את קשיחותו ואת צורתו הפרושה, כשתרומת כל יחידת חומצה אמינית לאורך הסליל היא 3.12 Å (בסליל α , כזכור 1.5Å בלבד); וכל שלוש יחידות משלימות סיבוב שלם, שאורכו 9.36 Å. כל עמדה שלישית, בכל שרשרת, מצויה במרכז הסליל המשולש, שהצפיפות בו מותירה מקום לגליצין בלבד. הפיתול של כל שרשרת לעצמה אינו יציב דיו, והיציבות מושגת על ידי קשרי מימן שנוצרים בין ה- NH הפפטידי של הגליצין וה- CO של הפפטיד בעמדה X של שרשרת שכנה ממול. גם ההידרוקסיפרולין תורם את חלקו בקשרי המימן הבין שרשרתיים. מולקולות קולאגן הנוצרות בתנאי חוסר ויטאמין C אינן מצליחות לבנות, בטמפרטורת



ב. תרשים חתך המראה את מיקומו של הגליצין בכל שרשרת

קולאגן

הגוף, סליל משולש יציב: קולאגן טבעי "ניתך" ב- 57°C וקולאגן ללא הידרוקסיפרולין – ב- 24°C .

ניסוי 4



הדגמה: "התכת" חוט קולאגן.

1. השרה חוט קולאגן במים, כחצי שעה, כדי לשטוף אותו מן הכהל בו הוא שמור. קשור את קצה החוט לראש מעמד, ובקצהו התחתון תלה חפץ כל שהוא במשקל 5-10 גרם.
2. שפוך על החוט, מלמעלה, מים חמים בטמפרטורה של 90°C .

מה מלמדת התנועה הסיבובית, המלווה את התקצרות החוט?



3. סייע לחוט לחזור לאורכו המקורי על ידי מתיחה זהירה – והוא מוכן ל"סיבוב חדש"..
מן הראוי להזכיר כאן את אהרון קציר, מחלוצי המחקר המאקרומולקולארי, שבנה מכונה מכאנו-כימית, בה נירתם הקולאגן, המתקצר ומתארך חליפות, לביצוע עבודה מכאנית.

מהו, אם כן, לסיכום, המיבנה השניוני? ובכן, זהו כינוי למיבנה הסדיר של עמוד השדרה של החלבון. במישטח הוא מיוצב על ידי קשרי מימן בין שרשרתיים, הניצבים לציר האורך של הסיב; ובסליל – אלה הם קשרי מימן תוך שרשרתיים, המקבילים לציר האורך שלו.

3. איורים סטראוסקופיים

אפשר להבין את הגאומטריה של המולקולות המורכבות בצורה הטובה ביותר כשמתבוננים במודל שלד או במודל ממלא מרחב. אך כשאין מודל כזה, האפשרות הטובה השניה היא: תמונה סטראוסקופית. תחושת העומק של עצם תלת מימדי נוצרת משום שכל עין רואה, בזווית ראייה משלה, דמות שונה במיקצת, בגלל המרחק הקטן שבין שתי העיניים. המוח למד לפרש את ההבדל בין שתי התמונות, כמידה למרחק היחסי של העצם מן המתבונן.

נסה את עצמך: הצב את אצבעך כ- 30 ס"מ לפני עיניך, אך רכז את מבטך אל עצם רחוק כל שהוא. אתה רואה לאצבע שתי דמויות. עצום עין אחת ושניה, לסרוגין, ותוכל להבחין איזו דמות נצפית על ידי כל עין.

בתמונה דו מימדית של עצם תלת מימדי, מאבדים את המידע של המימד השלישי. אך ניתן לשקם את אשליית העומק, אם מתבוננים בו-זמנית בשתי דמויות של אותו העצם, השונות במקצת זו מזו, כך שתהיה לכל עין אפשרות לראות את הדמות המתאימה למראה שהיה נוצר במבט ישיר על העצם במרחב. אפשר להכין 'צמד סטראו' כזה על ידי צילום העצם משתי נקודות שונות, הרחוקות זו מזו כמו המרחק הנתון בין שתי העיניים; או לחילופין, יכול מחשב לשרטט את הדמויות המתאימות לצמד.

בעזרת משקפיים מיוחדות, אפשר לראות כהלכה את התמונות הסטראוסקופיות. יש להציב את המשקפיים על הספר באופן שכל עדשה תהיה על מחצית התרשים, כך שעין ימין תראה את הרישום הימני ועין שמאל תראה את הרישום השמאלי. צמד הדמויות הנפרדות תתאחנה לתמונה תלת מימדית אחת. ייתכן שתצטרכו "לתמרן" את מבטכם, להתקרב אל התמונה או להתרחק ממנה, או אולי גם לסובב קצת את המשקפיים לימין או לשמאל, כדי ששתי הדמויות תראנה מאוזנות באותו המישור, לפני שתצליחו. למזג את שתייהן ו"לנעול" אותן לתמונה תלת מימדית אחת. מרבית האנשים (וגם כותב שורות אלה) זקוקים לתרגול והתנסות כדי להצליח במשימה הזאת. אף כי לעתים זה לוקח זמן להשיג זאת (ויש, כך אומרים, 8% שאינם מצליחים...) אל תמהרו להתייאש!!! אחרי שתצליחו פעם אחת, הפעמים הבאות כבר תבאנה מאליהן. המאמץ כדאי, לא רק בגלל המידע המתקבל מהתמונה התלת מימדית, אלא גם בגלל האסתטיות שלה.

יש גם אפשרות, שכדאי להתנסות בה, לראות את הצורה הסטראוסקופית, ללא משקפי עזר. יש לכך שתי דרכים: הצלבת העיניים והסטת העיניים.

ההצלבה מתרחשת כאשר מכוונים את העיניים לנקודה הנמצאת בין העיניים לבין האזור; וההסטה - כשהעיניים מכוונות לנקודה הנמצאת מעבר לאזור.

אפשר כך ואפשר כך - אלא שבשיטת ההצלבה נראית הצורה ההפוכה, האנאנטיומרית, כשפנים ואחור מתחלפים.

כדי לראות כהלכה, בדרך ההסטה, החזיקו תחילה את האיור כשהוא נוגע באפכם. תנו לעיניים לנוח ולהתבונן ישר "דרך האיור" אל מאחורי הדף. הרחיקו את האיור מפניכם באיטיות, תוך כדי התבוננות "דרך" הצורה הסטראוסקופית המופיעה במרכז האיור. תזדקקו כאן למשמעת עצמית רבה, שלא להתפתות להתבונן ישירות בצורה הסטראוסקופית בדרך ההצלבה ההופכת אותה. ואם לא הצלחתם, אין דבר - אפשר לנסות שוב.

האיורים הסטראוסקופיים הנתונים כאן, לקוחים ממודל מרחבי של מולקולת האנזים אצטילכולין אסטרזא (acetylcholine esterase), שיש לו תפקיד בתיקשורת הבין-תאית במערכת העצבים. את האיורים האלה, וכן את האיורים הלקוחים ממודל האצטילכולין אסטרזא, המופיעים בפרקים הבאים, הכינה ד"ר מיכל הראל, מהמחלקה לביולוגיה מיבנית של מכון ויצמן למדע.

כל חומצה אמינית מוצגת באיור כפי שהיא מוצבת במקום הנתון במודל, בהתאם למיספרה הסידורי בשרשרת. אטומי הפחמן, החמצן, החנקן והגפרית, מסומנים בסמל היסוד; ובמקום הסימון המקובל באות היוונית α , β , γ , δ וכו' - רשום A, B, G, D בהתאמה.

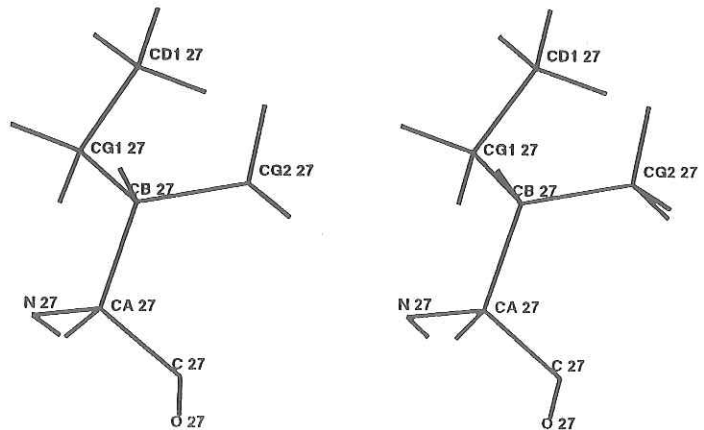
למשל: C α של החומצה האמינית איזולוצין 27, מסומן ב-CA 27. אטומי הפחמן, החמצן והחנקן של הקבוצה הפפטידית מסומנים באות ובמספר בלבד למשל: 27, 0 N 27, C 27.

כאשר יש שני אטומי פחמן בעמדה שווה בשרשרת הצד - ניתן להם גם מיספר סידורי פנימי. למשל: CG 1 27 ו-CG 2 27. וכך גם כאשר יש אטומי חמצן או חנקן בעמדה שווה. למשל: בחומצה האספארטית, OD1 72 ו-OD2 72. אטומי המימן אינם מסומנים כלל.

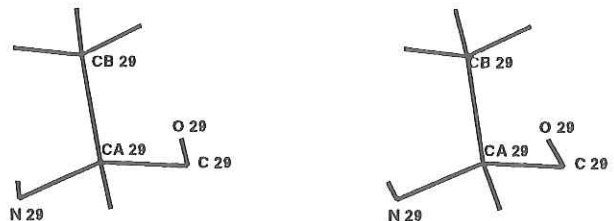
התבונן באיורים הסטראוסקופיים של 20 החומצות האמיניות. 

א. אטומי CA הם אטומי פחמן קיראליים, למעט בגליצין, כמובן. רשום את התבנית הקיראלית של אטומי CA, כפי שהם נראים לך, על פי נוסחת פישר.
 ב. יש חומצות אמיניות, שגם בשרשרת הצד שלהן יש אטומי פחמן קיראליים - מי הן? רשום את תבניתם של אטומי הפחמן האלה על פי נוסחת פישר.
 ג. ציין את החומצות האמיניות שבשרשרת הצד שלהן יש תבנית מישורית. רשום את סימני האטומים השותפים לתבנית המישורית.

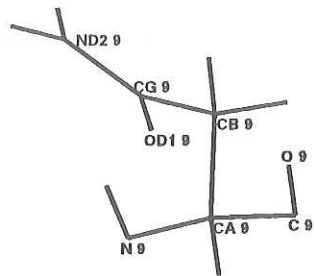
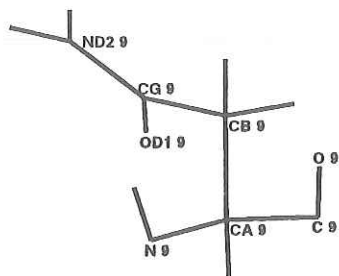
איזולוצין



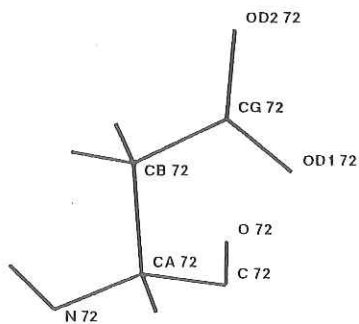
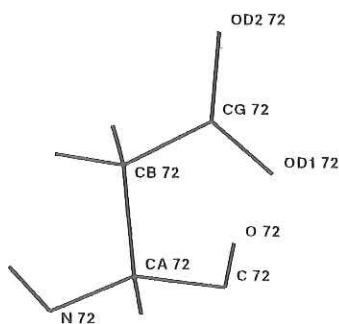
אלאנין



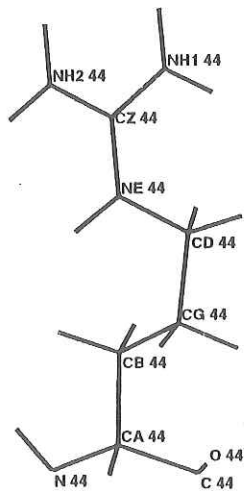
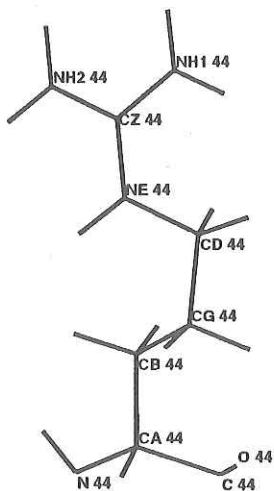
אספאראגין



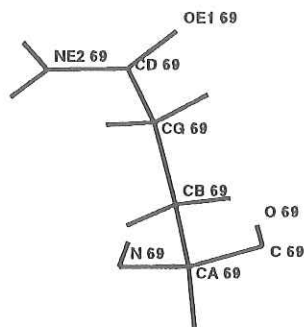
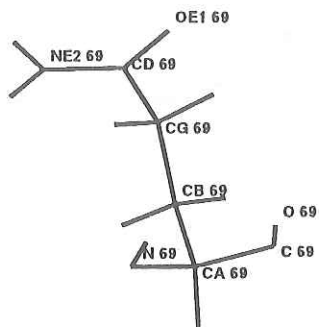
חומצה אספארטית



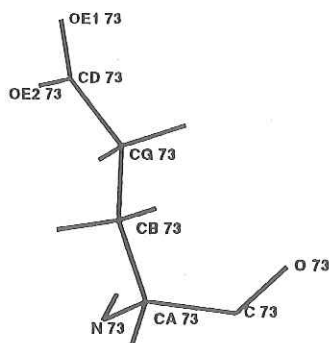
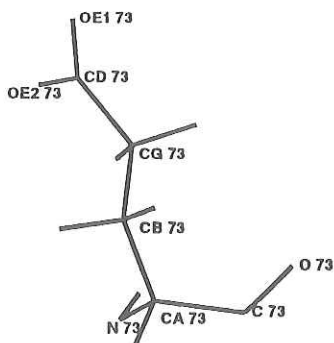
ארגינין



גלוטאמין



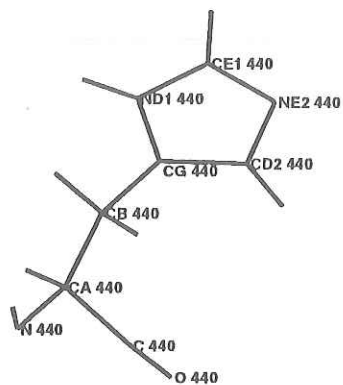
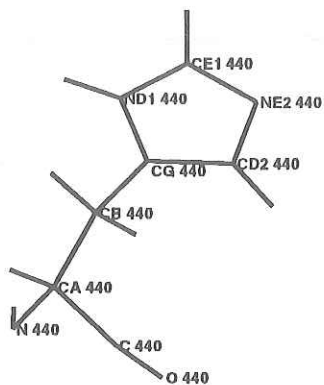
חומצה גלוטאמית



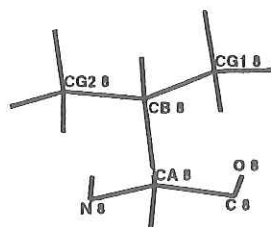
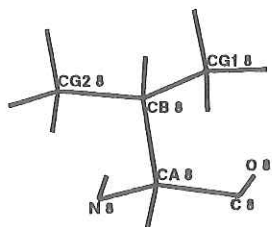
גליצין



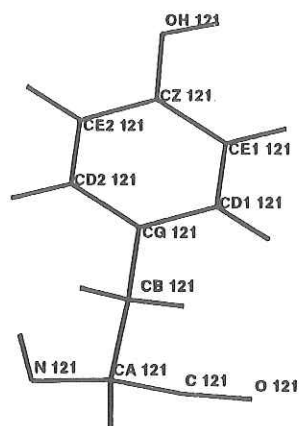
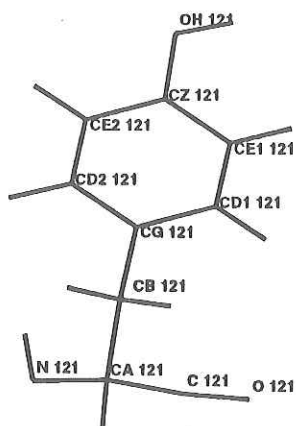
היסטידין



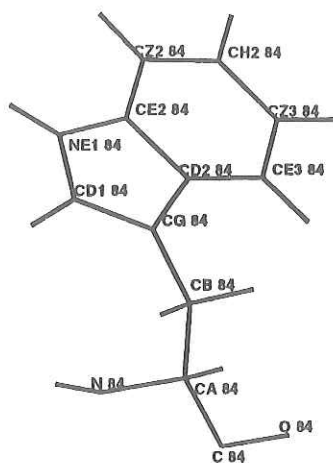
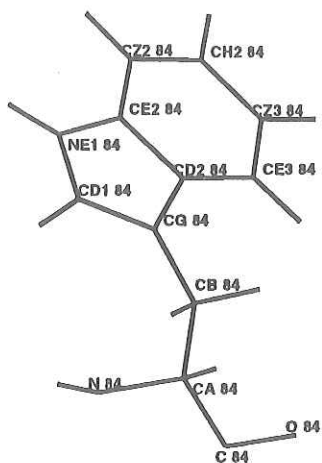
ואלין



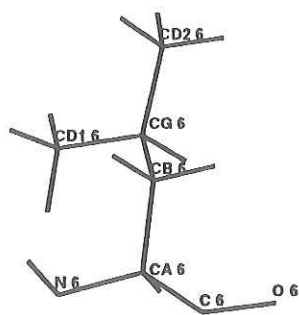
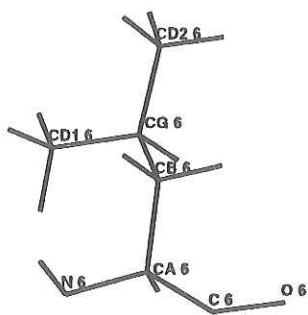
סירוזין



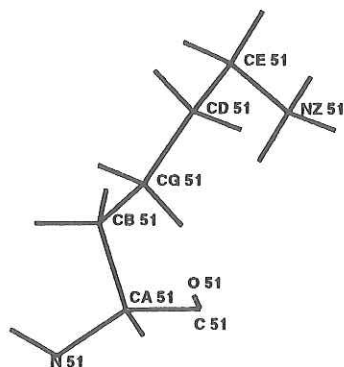
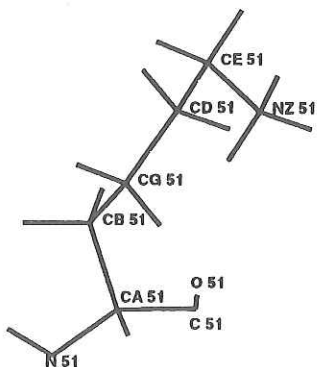
טריפטופאן



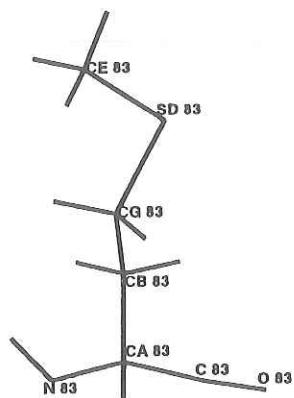
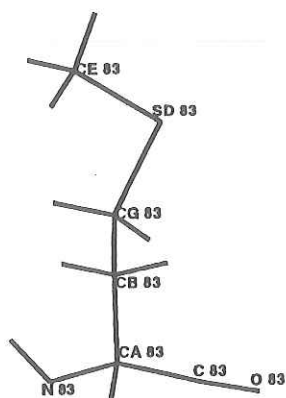
לויצין



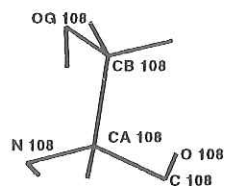
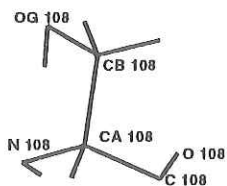
ליזין



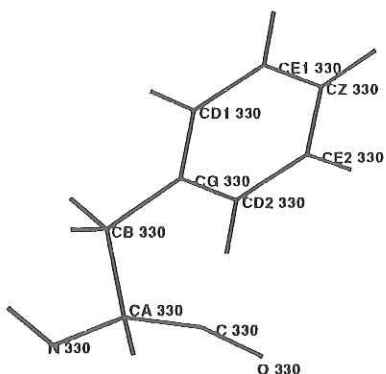
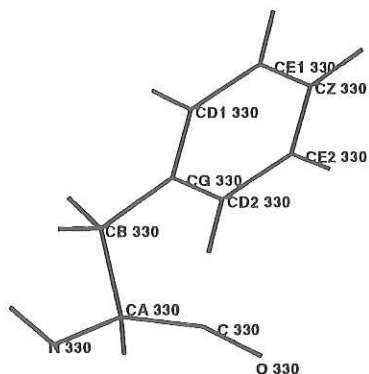
מתיונין



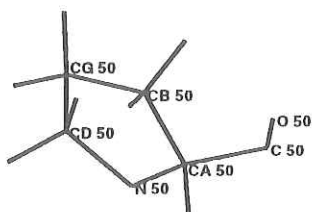
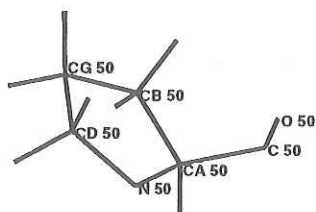
סרין



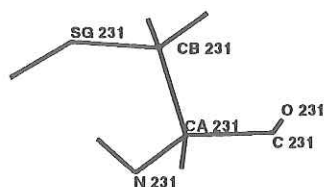
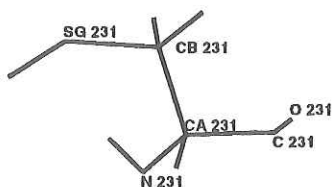
פנילאננין



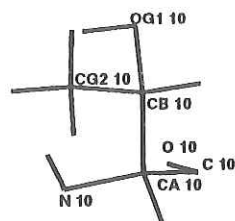
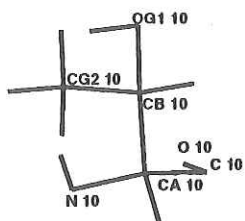
פרולין



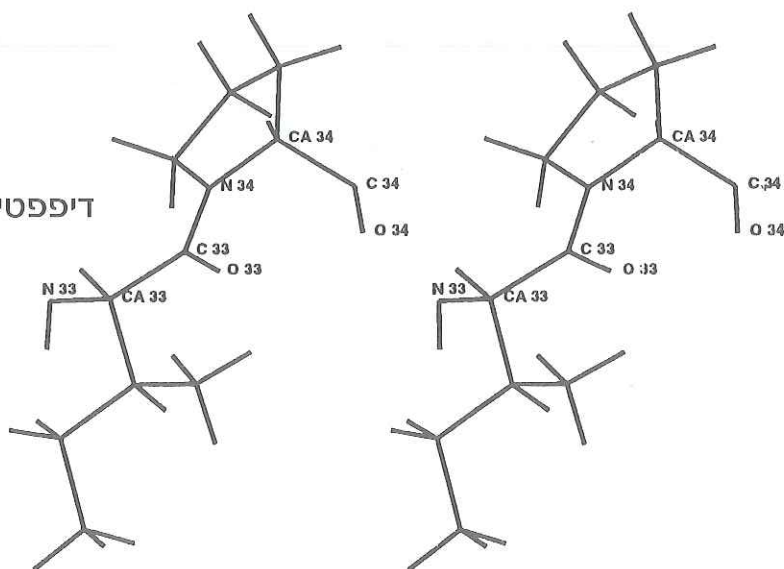
ציסטאין



תריאונין



דיפפטיד 33 – 34

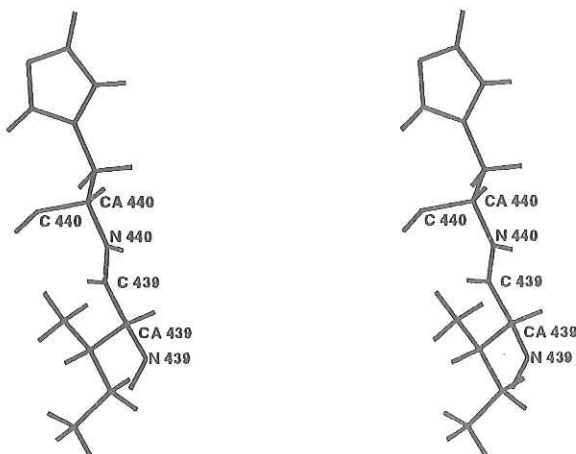


מי הן החומצות האמיניות הבונות את

הדיפפטיד?



דיפפטיד 434 – 440



מי הן החומצות האמיניות הבונות את הדיפפטיד?

סמן את מיקומם של 439 ושל 440.



מולקולת החלבון בשלושה מימדים: המיבנה השלישוני של החלבונים הגלובולאריים

עד כאן הכרנו חלבונים סיביים, שאינם נמסים במים. אך מולקולות של חלבונים רבים – החלבונים הנמסים במים והמקיימים בתמיסה את פעילותם הביולוגית, כמו המיוגלובין וההמוגלובין שלנו – צורתן, כבר אמרנו זאת, כפקעת כדורית. האם גם כאן, בסביבה המימית, קשרי המימן הם האחראיים ליציבות המיבנה המרחבי של מולקולת החלבון? התשובה, מסתבר, אינה פשוטה כל כך; ועל מנת להצביע על הקשרים המייצבים את הצורה הטבעית של מולקולות החלבונים בתמיסה, יש, קודם לכול, להכיר את הצורה הזאת. בעניין זה זכה מחקר קרני ה-X להישגיו הבולטים ביותר: ב-1957 השלים קנדריו (Kendrew), באנגליה, את פענוח מפת הצפיפות של המיוגלובין, והציג, לראשונה, "פסל מולקולארי" של חלבון כדורי (גלובולארי).

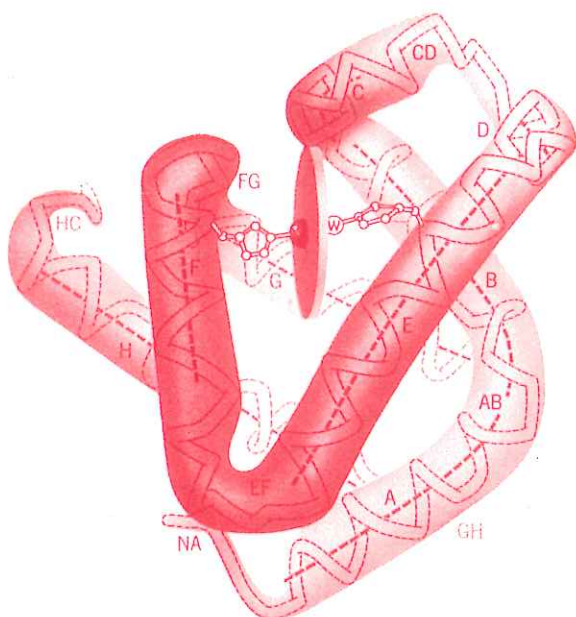
"רגעים כאלה – מראות ראשוניים של עולמות חדשים, כפי שראה קולומבוס בשעתו – הם אחד ממניעי המחקר; ומדי פעם יש למדענים זכות להיות שותפים בהתרגשות ממין זה. רגע כזה הופיע לעמיתי ולי בבקר יום ראשון אחד ב-1957, כשהתבוננו במה שלא ראה איש לפנינו: תמונה תלת מימדית של מולקולת חלבון בכל מורכבותה."

(גיוהן קנדריו, 1961)

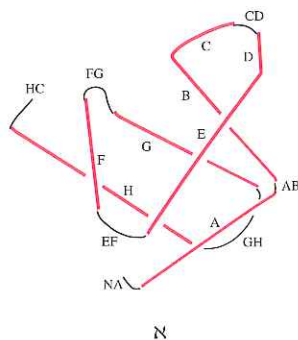
1. מיוגלובין

המיוגלובין הוא חלבון המצוי בשרירים, המאכסן בתוכו את החמצן הבא מן הדם, עד שידרש לפעולתם. הוא מצוי בכמות גדולה יחסית בשרירי היונקים הימיים, כלוייתנים, משום שהם זקוקים למנת חמצן גדולה בעת הצלילה; ומהם לקח קנדריו את המיוגלובין למחקרו. אנו יודעים כבר, שלמיוגלובין מולקולה קטנה יחסית, והשרשרת שלו בנויה מ-153 יחידות חומצה אמינית ש"טעם קיומה" הוא דווקא הקבוצה הלא פפטידית המצטרפת אליה, ה H_2N : טבעת מישורית מורכבת, שבמרכזה מצוי יון ברזל Fe^{2+} , שאליו נקשרות מולקולות החמצן. שרשרת המיוגלובין עצמה

מתקפלת לפקעת העוטפת את ההם כקופסה, שמדותיה הן $44 \cdot 44 \cdot 25 \text{ \AA}$. קופסה זו בנויה מתבניות מוכרות לנו – מ-8 סלילי α הקשורים ביניהם על ידי קטעים לא סליליים. 121 יחידות חומצה אמינית, שהן 79% מכלל ה-153, מצויות בסלילי α אלה, המסומנים בתרשים באותיות A עד H, ובהם 102 קשרי מימן. NA מציין את הקצה האמיני, HC את הקצה הקארבוקסילי, ו-AB, CD, EF, FG, GH – מציינים את הקטעים הקושרים בין הסלילים. הסלילים E ו-F יוצרים את דפנות הצד של הקפסה; B, G ו-H – את קרקעיתה, ו-C, CD, ו-D – סוגרים אותה מאחור.

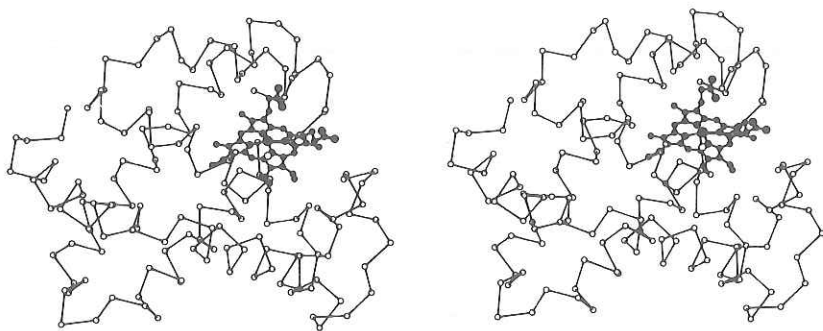


ב



המיוגלובין

- א. שרטוט סכמטי של תבנית המולקולה.
 - ב. תרשים סכמטי של עמוד השדרה של המולקולה, עם קבוצת ההם ושרשרות הצד של ההיסטידין. מושב מולקולת החמצן מסומן ב-W.
 - ג. איור סטראוסקופי (בעמוד הבא).
- (על פי דיקרסון וגאיס. ברשותה האדיבה של הוצאת לוי-אפשטיין-מודן)



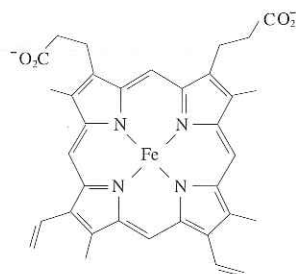
ג

אי אפשר לבנות קופסה כדורית מסלילי α אלא אם כן הם יתקפלו זה על זה, כך שהשרשרת אנוסה לבצע סיבובים חדים ביניהם. יש סיבובים "פתאומיים", ללא יחידות ביניים, כמו בין סליל B לסליל C, או בין סליל D לסליל E; ואפשר לכלול כאן גם את המעבר מסליל A לסליל B, שיש בו יחידה אחת קטנה בלבד, האלאנין. זווית הסיבוב בפינות האלה היא כ- 90° . אך אם נדרשת זווית סיבוב חדה, יש צורך במספר יחידות ביניים כדי לאפשר את הסיבוב הנחוץ, כמו בפינות של CD, EF, GH ו-GH.

הם כולו קבור בתוך מולקולת המיוגלובין: שתי הקבוצות הקרבוקסיליות שלו, שלוחות אל פני המולקולה ויוצרות כאן קשרים עם שרשרות הצד של ארגינין 45, CD3 והיסטידין 97 FG2 (המיספר הראשון מציין את המיספר הסידורי בשרשרת כולה, והמיספר השני הוא המיספר הסידורי בקטע המתאים) – אך בעיקרו של דבר יוצר ההם סביבו, בתוך הקופסה המולקולארית, כ-60 מגעים ון-דר-וואלסיים עם ריפוד פנימי הבנוי משרשרות צד הידרופוביות מובהקות, כמו: Phe, Ile, Leu, Val, Ala.

יון הברזל Fe^{2+} , שהוא "האתר הפעיל" של המולקולה, יושב במרכז ההם וקשור בקשרים קוולנטיים לחמישה אטומי חנקן הנמצאים סביבו: ארבעה אטומי חנקן מצויים במישור ההם עצמו. אטום החנקן החמישי בא משרשרת הצד של ההיסטידין 93, I8, העומד בסמוך, ניצב למישור ההם, ולכן הוא נקרא ההיסטידין "הסמוך", הפרוקסימאלי. ויש ממול, מן הצד השני של מישור ההם מקום לשכן ששי – זוהי

נקודת הקישור המיועדת למולקולת החמצן. בצד זה, קצת מרוחקת מן ההם נמצאת שרשרת הצד של ההיסטידין E7, 64. זהו ההיסטידין "המרוחק", הדיסטאלי, שיוצר מגע של קשר מימן עם מולקולת החמצן הקשורה ליון הברזל ומסייע כך למיקומה הנכון. ששת השכנים בונים ביחד, סביב יון הברזל, צורת אוקטאהדר.



נסחת מיבנה של הם

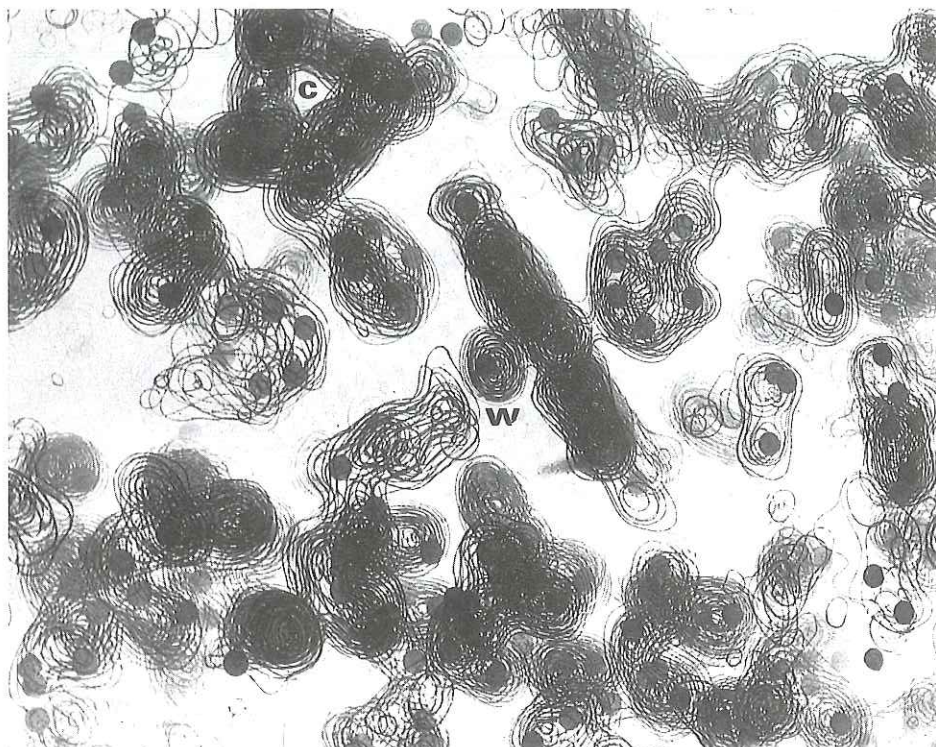
כמה אלקטרונים יש ליון הברזל Fe^{2+} כשהוא לבדו? כמה יש לו ביחד עם תרומת ששת השכנים, הנותן כל אחד זוג אלקטרונים לשותפות? מה מייצג מספר זה?

מעטפת החלבון הזאת, המסובכת ומפותלת סביב ההם – על שום מה? על שום הצורך להגן על יון הברזל Fe^{2+} שבמרכזו מסביבה מימית, שבה הוא מגיב עם החמצן המומס במים בתגובת חימצון מהירה ליון ברזל Fe^{3+} . וזה מהלך קטלני מבחינת התיפקוד הביולוגי, כי יון הברזל Fe^{3+} קושר אליו מולקולת מים, בקשר בלתי הפיך, במקום המיועד למולקולת החמצן. תוכל לראות זאת באיור בעמוד הבא, המציג בפניך מפת צפיפות החומר של המטמיוגלובין (metmyoglobin), כך נקרא המיוגלובין שיון הברזל שבו חומצן ל- Fe^{3+}).

מפות צפיפות החומר, כמו זו שבעמוד הבא, שנולדו ממחקר גבישים בקרני X, נתנו תנופה דרמטית להכרת מיבנה מולקולת החלבון לפרטיה, באמצעות מודל המציב כל אטום ואטום במיקום מוגדר.

אך "אליה וקוץ בה": המודל הקשיח של מולקולות החלבון אינו מתאים עם מחקרים המראים, שמולקולות החלבונים בתמיסה הן דינאמיות מאד, והן משנות את צורתן כשהן מבצעות את תפקידן.

המודל הסטאטי מציג למעשה מבנה ממוצע של המולקולות בגביש לאורך זמן מדידה של שעות אחדות, שהוא גדול לאין שעור מזמן התגובה הביוכימית, הנמשכת בדרך כלל מספר מילישניות. אך למעשה מולקולת החלבון אינה בנויה במיבנה קשיח, וצורתה גמישה ומשתנה כל הזמן, כתוצאה



מפת צפיפות של אזור ההם במיגולובין. קבוצת ההם המישורית נראית במרכז, במבט צד. בתחתית הצילום רואים מבט צד של סליל E ובפינה השמאלית מבט על של סליל C. מושב מולקולת החמצן מסומן ב-W.

© The Nobel Foundation 1963

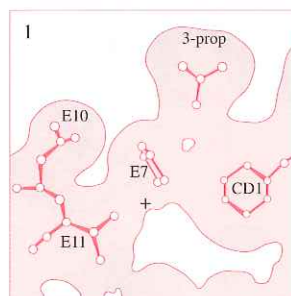
מהתנודה התרמית הבלתי פוסקת והפיתול סביב הקשרים המאפשרים סבוב חפשי. בשום אופן אין להפחית מחשיבות הידיעה את מיקומם של האטומים השונים במולקולה, שהיא תמיד נקודת המוצא; אך פעולת החלבון תהייה בלתי אפשרית מבלי "לתת" להם, לאטומים, חופש תנודה וסיבוב סביב מיקומם "הממוצע".

המיגולובין משמש כאן דוגמה טובה. למדנו שקבוצת ההם של המיגולובין נמצאת בליבת המולקולה, כך שהאריזה הצפופה, ההידרופובית, מגינה עליה מן המים. אלא שהאריזה הצפופה מונעת גם ממולקולת החמצן לחדור לכאן. מסתבר, שאם האטומים במיגולובין יישארו במקומם,

כפי שמציג זאת המודל הסטטי של קרני X, הוא יהיה חסר תועלת – המחסום האנרגטי בדרכה של מולקולת החמצן יהיה כ-400 kJ/mol, והזמן שיידרש לה להיכנס למקומה יארך ממשך חיי הלווייתן.

תרשים חתך של מיוגלובין, 3.2 Å מעל למישור ההם ויון הברזל, המסומן ב +. (על-פי, Brooks 1988)

המודל הדינאמי נותן לכך פתרון: מחסום הכניסה והיציאה ניפרץ על ידי צרוף התנודות והפיתולים של האטומים המצויים בדרך. אפשר לראות במודל, שהמחסום נוצר משרשרות הצד של Tyr E10, His E7 ו-Val E11. הדמיה במחשב של תנועות הסיבוב האפשריות בשרשרות הצד האלה מראה, שיכולה להיפתח דרך, שבה מחסום השיפעול יורד עד כדי 15 kJ/mol בלבד – וזו כבר משימה אפשרית בהחלט למולקולת החמצן בטמפרטורת הגוף.

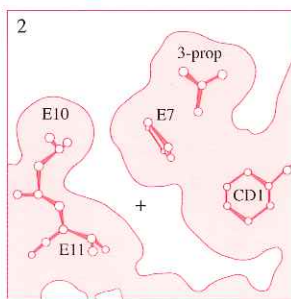


1. הדרך חסומה.

הארכנו בתאור מיבנה מולקולת המיוגלובין, לא רק בגלל זכות הראשונים שלה, ולא על מנת שתזכור, את פרטיו, אלא כדי שתתרשם מייחודה של הצורה שלו – מיבנה קפדני המועיד מיקום מוגדר לכל אחד מ-2500 האטומים שלו. כך גם בכל אחד ממאות החלבונים שצורתם התלת מימדית ידועה כבר – מיבנה אופייני ומוגדר לכל חלבון וחלבון. הכרת המיבנה נותנת לנו כלי ראשון במעלה להבנת דרך תיפקודו של החלבון.

וזהו האתגר שלנו כאן: לתאר את פעולות המיוגלובין וההמוגלובין במונחים של מיבנה-תיפקוד.

לא נדון כאן בפרטי מיבנים אחרים – אך חשוב גם לדעת שהמיוגלובין מייצג רק טיפוס אחד של מיבנה, כזה שרובו סליל α ; כזהו, למשל, גם האינסולין. אך בחלבונים אחרים אנו מוצאים גם טיפוסים מיבנה אחרים. יש, למשל, טיפוס מולקולת חלבון שרובה מיבנה β – כך למשל בנוגדנים, או בחלבון מיוחד הנמצא בפלסמת הדם: חלבון קושר רטינול, RBP (retinol binding protein). זהו פוליפפטיד בן 182 יחידות חומצה אמינית, שמקופלות ב-8 רצועות אנטי-מקבילות, הערוכות כמעטפת של תבנית גלילית הנקראת "חבית β ", המרופדת מבפנים בשרשרות צד הידרופוביות ומסתירה בתוכה את הרטינול. הרטינול (ויטאמין A) הוא כהל שומני הנוצר בכבד; ומולקולת ה-RBP, הנוצרת גם היא בכבד, לוכדת לה מולקולה אחת של רטינול ומובילה



2. לאחר סיבוב של Thr E10, נפתח מסלול לכניסה וליציאה של מולקולת חמצן.

Diagram of a protein structure showing beta-strands numbered 1 through 8. The structure is a complex fold with a central core. Labels include N (N-terminus), C (C-terminus), CH₃, and HO. The strands are numbered 1 through 8, with some numbers appearing on multiple strands.

ויש כמובן חלבונים רבים, שבמולקולות שלהם מופיעים צרופים שונים של סלילים ומישטחים, כמו בריבונקלאז, שעוד נזכיר אותו לטובה. ויש גם חלבונים, שבמולקולות שלהם אין כלל אזורים מוגדרים של מיבנה שניוני, והן נראות כמפותלות ללא סדר, אלא שאין פה מיבנה אקראי, סתמי, שכן אנו יודעים כבר, שהוא חוזר על עצמו בקפדנות מרובה בכל המולקולות של אותו החלבון.

בחינה של 12,433 חומצות אמיניות המצויות בכמה עשרות חלבונים שונים מראה, שלמעלה ממחציתן נתונות במיבנה שניוני מוגדר:

30.4% בסלילי α ,

19.9% במשטחי β ,

12.3% בלולאות סיבוב

ו- 37.4% בפיתול שאינו מוגדר כמיבנה שניוני.

יש כאן, אם כן, חזיון עשיר של מיבנים וצורפי צורות, שאי אפשר לתת להם שם אחיד ופשוט כמו "סליל" או "מישטח" המתארים את המיבנה השניוני. את הצורה המרחבת הכוללת של השרשרת הפוליפטידית, שבה משתלבים יחדיו יחידות המיבנה השניוני, הקטעים שביניהן ושרשרות הצד השונות - אנו מכנים בשם הכולל: המיבנה השלישוני.

סלילים ומישטחים, כחלק מן המיבנה השלישוני, אינם חדשים עבורנו וסדר בנינם מוכר לנו. אך כדי ליצור את המיבנה הכדורי המקופל, יש צורך ביחידת מיבנה נוספת - כבר ראינו אותה: לולאת סיבוב, שתאפשר את הקיפולים הנחוצים לבנין הצורה הכדורית.

לו היו כל 121 יחידות החומצה האמינית, המצויות בשרשרת המיוגלובין בסלילי α , בונות סליל α אחד

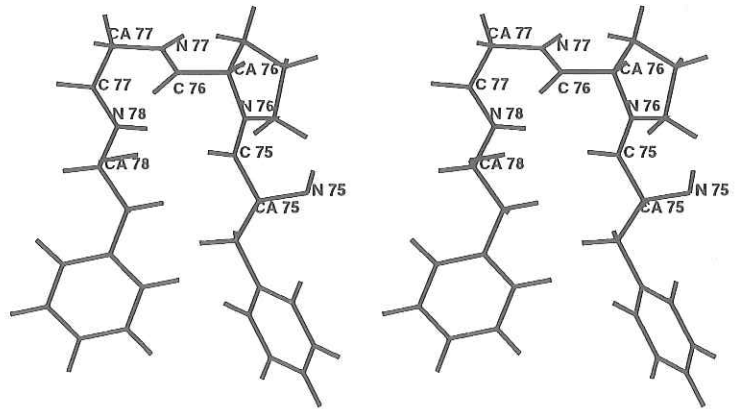


— מה היה אורכו?

ומהו אורכו הממוצע של סליל במולקולת המיוגלובין?

בדרך כלל משתתפות בלולאת הסיבוב לאחר ארבע חומצות אמיניות, כשהקיפול העיקרי נעשה בין השניה לשלישית, והקשר - קשר מימן - נוצר בין הראשונה לרביעית, המופיעה ממולה, כמו במישטח β - לכן ניקרא הקיפול הזה בשם **סיבוב β** . הוא מופיע כמובן על פני המולקולה ולכן אינו נתקל בהפרעה לסיבוב; אך בגלל הצפיפות הנוצרת בתוכו, רק חומצות אמיניות בעלות שרשרת צד קטנה יכולות להתאים לו. הגליצין מתאים לכאן לא רק בגלל שהוא בעל שרשרת צד זעירה, אלא גם משום שהוא אקיראלי, ו"מסתדר" עם פיתול לימין או לשמאל ללא הבחנה. מתאים לכאן גם הפרולין, שאינו משתלב כהלכה, לא בסליל α ולא במישטח β , דווקא בגלל מיגבלות הפיתול על אטום הפחמן α שלו ובגלל השותפות

המוגבלת שלו בקשרי מימן. (מדוע?)



איור סטראוסקופי של סיבוב β במולקולת האנוס
אצטילכולין אסטרז.

מי הן ארבע החומצות האמיניות הבונות את הסיבוב
הנתון כאן? בין מי למי נוצר קשר-המימן המייצב
את הסיבוב?

במיוגלובין עצמו אין דוגמה אופיינית לסיבוב β , אך
יש בו ארבעה פרולינים המצויים בעמדת סיבוב או
סמוך לה, בקצה סליל. מצא אותם וציין את מיקומם על פי
הסימון הסלילי בניספח.
בהמוגלובין יש עוד מספר פרולינים. מצא את מיקומם.

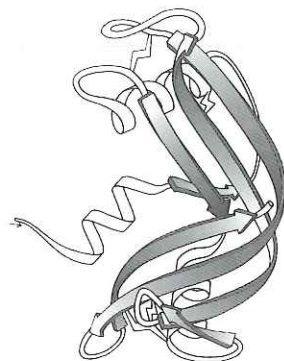
2. הריבונוקלאז כמשל

כיצד נוצרת וכיצד נשמרת הצורה המיוחדת למיוגלובין,
שהרי – לכאורה – יש צורות אפשריות רבות?
אפשר לטעון, שבזמן יצירתה נילחצת השרשרת
הפוליפטידית על-פי תבנית דפוס הכופה עליה את הצורה
המיועדת למולקולה. אך תיתכן גם טענה אחרת, שהצורה
הקיימת נוצרת מעצמה, כי היא זו המתאימה ביותר להרכב
הנתון והיציבה ביותר בתנאי התמיסה בתא-החי.
את התשובה לשאלה מרכזית זו מצא כריסטיאן אנפינסן
(Anfinsen) בשנת 1964. אמנם הוא לא עבד עם מיוגלובין

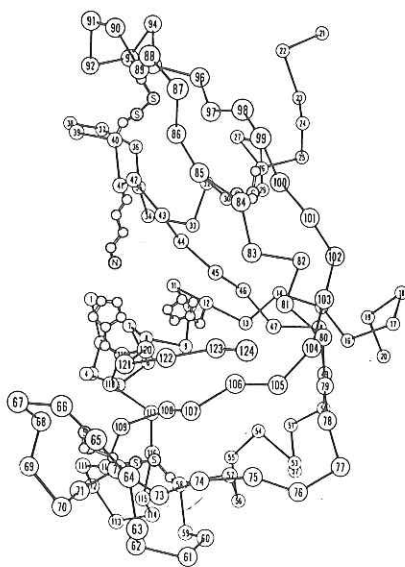
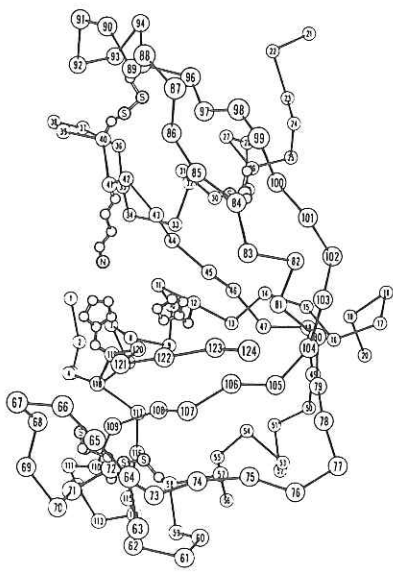
אלא עם חלבון אחר, הנקרא ריבונוקלאז: אנזים המפעיל פרוק הידרוליטי של RNA, הבנוי משרשרת בת 124 יחידות חומצה אמינית – אך התשובה יכולה להנחות אותנו גם לגבי חלבונים אחרים.

כשמתבוננים במודל של מולקולת הריבונוקלאז, מוצאים בו את מרכיבי המיבנה השניוני המוכרים לנו: קטעים סליליים וקטעי משטח β ; אך חלק ניכר מן השרשרת נראה כמפותל ללא סדר. אנו יודעים כבר שאין כאן מיבנה אקראי הנוצר בדרך מיקרה, אלא מיבנה מוגדר ומסודר – אחד ויחיד לכל מולקולות הריבונוקלאז, שתכליתו בנין האתר הפעיל של האנזים: שרשרת הצד של ההיסטידינים 12 ו-119 ושל הליזין 41, וכן מולקולה אחת של מים, המעורבים ישירות בתגובה האנזימטית לפרוק המצע (RNA).

ויש בריבונוקלאז גם מרכיב נוסף, שלא היה במיוגלובין: שמונה ציסטאינים היוצרים ביניהם ארבעה זוגות קשרי דוגפרית. תוכל להבחין בהם באיור המתאים, לפי מספרם: 26-84, 40-95, 58-110 ו- 65-72.



שרטוט סכמטי של מולקולת ריבונוקלאז



איור סטראוסקופי של מולקולת ריבונוקלאז. (באיור זה מנותק הקשר בין 20 ל-21). שים לב לשרשרת הצד של האתר הפעיל. (על פי דיקרסון וגאסי, ברשותה האדיבה של הוצאת ליון-אפשטיין-מודן)

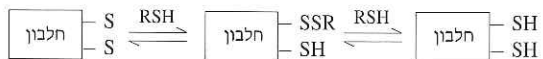
קשרי דוגפריט אלה עושים את הריבונוקלאז נוח לבחינת התשובה לשאלתנו, כי אם צורת הפיתול כפוייה היא וארבעת קשרי הדוגפריט נוצרים אותה – אזי ניתוק קשרי הדוגפריט ישחרר את הניצרה ויאפשר "חפש בחירה" לפיתול אחר. ואם הצורה הקיימת היא גם המתאימה ביותר לשרשרת הזאת, אזי קשרי הדוגפריט אינם אלה הנוצרים אותה, אלא הם פשוט חלק ממנה.

זוהי תכליתו של הניסוי של אנפינסן בריבונוקלאז – תחילה הורסים את המיבנה המרחבי המוגדר של המולקולה, ואחר-כך בוחנים את התנהגותה של השרשרת ה"משוחררת".

ובכן, **בדרך אל האי-סדר ובחזרה:**

השייך (אוריאה), $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, מתחרה על קשרי המימן בחלבון ובמים, ובשל כך הוא מערער את מיבנה מולקולת החלבון. המרקאפטואטאנול, $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{SH}$, שהוא גורם מחזר, מנתק את קשרי הדוגפריט

מרקאפטואטאנול, $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{SH}$ שנסמנו כאן ב-R-SH, מגיב עם קשרי הדוגפריט של הציסטאינים, בתהליך שווי המשקל:



הגורם הפעיל כאן הוא היון: RS^- או S^- חלבון ולכן התגובות מבוצעות ב-pH גדול מ-8, והתוצר נשמר ב-pH נמוך יותר.

שיווי משקל כזה הוא גם סיפורו של סילסול השער: כדי לסלסל שער חלק ב"סלסול תמידי" (או כדי להחליק שער מסולסל) יש צורך, קדם כל, לשחרר את הקראטין שבשער מאחיזת קשרי הדוגפריט. עושים זאת במספרה בעזרת אמון תיוליקולאט: $\text{NH}_4^+ \text{HSCH}_2\text{CO}_2^-$, בתוספת תמיסת אמוניה, דטרגנט ובשמים. השרשרות נפרדות זו



מזו, ואז קל לעצב את השער בפיתולים הרצויים. כעת בא תורה של התמיסה המחמצנת המשקמת את קשרי הדוגפרית בצרופים החדשים. אפשר לעשות זאת בעזרת תמיסת מי-חמצן או תמיסת מלח ברומאט. ה"סלסול התמידי" מתמיד רק בשער שעבר את הטיפול המתאים, ויש לחדשו כשצומח שער חדש.

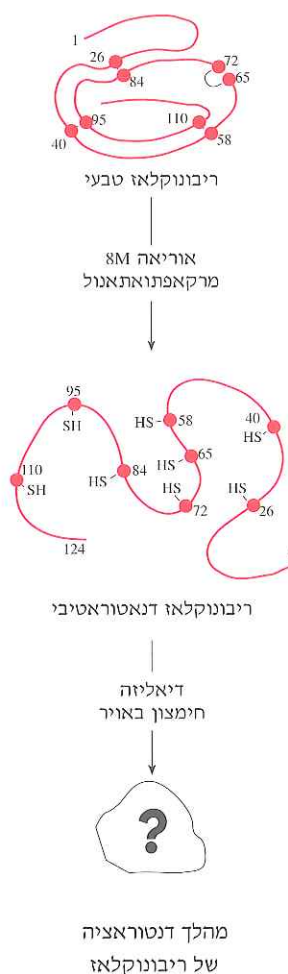
אנפינסן הוסיף לתמיסת הריבונוקלאז שיינן ומרקאפטואתאנול. המיבנה השניוני והשלישוני נהרסו, קשרי הדוגפרית נפתחו והריבונוקליאז עבר **דנאטוראציה**; כלומר, איבד את צורתו הטבעית ואת כושר פעילותו הביולוגית.

לכששתחרר הריבונוקלאז מהשיינן ומהמרקאפטואתאנול – מה יהיה גורלה של השרשרת המפותלת באקראי? האם תישמור לעצמה את ה"הישג" של הפיתול האקראי, או אולי תחזור בעצמה לצורתה הטבעית-המקורית ותשקם את פעילותה הביולוגית?

אנפינסן ניסה ומצא את התשובה: כשמשחררים את הריבונוקלאז מנוכחות השיינן והמרקאפטואתאנול על ידי דיאליזה, חוזרת בהדרגה הפעילות הביולוגית לרמתה המקורית: קבוצות ה-SH מחומצנות על ידי החמצן המומס במים ומחדשות בעצמן את קשרי הדוגפרית, על פי סדר הזוגות הטבעי, והחלבון משקם את צורתו, המצטיינת בכל התכונות המאפיינות את החלבון המקורי: זהו תהליך ה**רנאטורציה** (renaturation).

מכאן למדנו, שהצורה הטבעית והפעילות הביולוגית הן, ללא ספק, תולדה בלבדית של המיבנה הראשוני של החלבון – שהרי אין בשרשרת לעצמה אלא רצף החומצות האמיניות שיש בה. אישור וירטואוזי לכך ניתן על ידי מריפילד (Merrifield), כשהצליח, ב-1969, לסנתז במעבדתו את הריבונוקלאז, 124 חומצות אמיניות אחת לאחת, על פי הרצף הדרוש. והנה אותו ריבונוקלאז סינתטי הפגין את כשרון פעילותו (כלומר "פירק" RNA) בדיוק כריבונוקלאז הטבעי.

מסקנתו הברורה של אנפינסן היתה, שכל המידע הדרוש לעיצוב המבנה המרחבי של הריבונוקלאז מצוי ברצף



החומצות האמיניות שלו: המיבנה הראשוני מכתוב מתוך עצמו את המיבנה השניוני והשלישוני.

מסקנה זו משתלבת יפה במה שמקובל לכנות, בלשון השאלה, "הדוגמה המרכזית" של הביולוגיה המולקולרית: רצף הנוקלאוטידים ב-DNA קובע את רצף החומצות האמיניות בחלבון; ורצף החומצות האמיניות בחלבון קובע את המבנה המרחבי שלו ואת תפקודו הביולוגי.

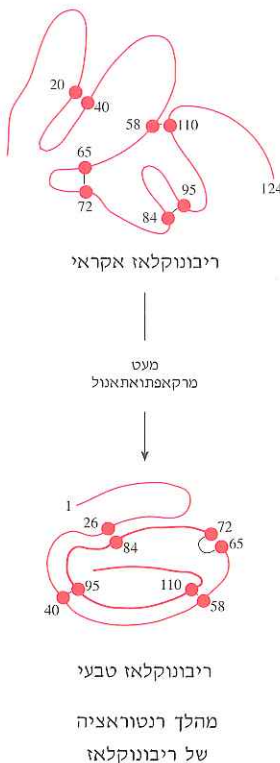
כאשר מסלקים רק את המרקאפטואתאנול ומשאירים בתמיסה את השייך לבדו, החלבון בונה מחדש את קשרי הדוגפרית, בעזרת החמצן המומס במים – אך הפעילות הביולוגית משוקמת הפעם רק כדי 1%. מדוע?

כי קשרי הדוגפרית נוצרים כשהחלבון מצוי עדיין בפיתול אקראי, ולכן – לא בסדר "הנכון". יש בריבונקלאז 105 אפשרויות שונות ליצירת זוגות ציסטאנים $(7 \times 5 \times 3 \times 1)$, ורק אחת מהן היא זו של החלבון הטבעי, הפעיל. בחיבור אקראי תהיה ההסתברות לסדר "הנכון" רק כדי 1 : 105, ואילו כל 104 הצורות האחרות, "המבולבלות", אינן פעילות. במצב זה הריבונקלאז איננו משקם את הפעילות הביולוגית שלו, אפילו אחרי סילוק השייך.

אך יש תקנה! החלבון "המבולבל" יוכל לחזור מעצמו לצורתו הטבעית ולפעילות מלאה, אם מוסיפים לתמיסה כמות קטנה של מרקאפטואתאנול ומחממים קלות את התמיסה. קשרי הדוגפרית השגויים ניתקים ואחרים – הנכונים – נוצרים במקומם. וכך, בתהליכי שווי המשקל, בהדרגה, ניתנת לחלבון "המבולבל" הזדמנות לשוב ולקשור את הזוגות המתאימים ולשקם כך את הצורה הטבעית שלו ואת פעילותו הביולוגית.

וגם כאן המסקנה ברורה: הצורה הטבעית היא גם הצורה היציבה והעדיפה מבחינה תרמודינאמית.

בחלבונים רבים מצויים קשרי דוגפרית, וככל שמספרם במולקולה גדל, גדל מאד גם מספר הצרופים האפשריים ביניהם; ובכל זאת, תמיד, הם בונים צרוף אחד בלבד, המתאים למיבנה המרחבי הטבעי של המולקולה.



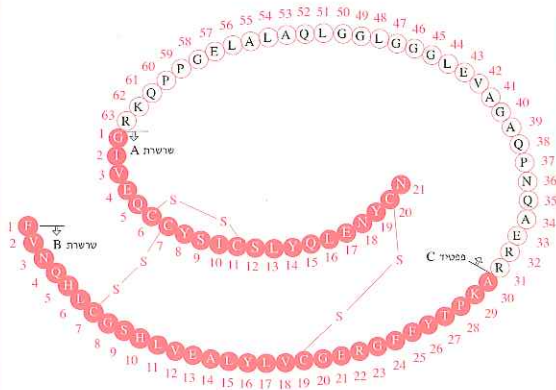
מספר קשרי הדוגפריט	מספר השרשרות במולקולה	מספר החומצות האמיניות במולקולה	שם החלבון
1	1	307	קארבוקסיפפטידאז
3	2	51	אינסולין
4	1	124	ריבונוקלאז
4	1	129	ליזוזים
5	3	241	כימוטריפסין
6	1	229	טריפסין
16	4	1324	IgG (נוגדן)

מהו מספר הצרופים האפשריים כשיש במולקולה שלושה קשרי דוגפריט? וכשיש – ששה?



"מעשה באינסולין ופרואינסולין":

כל הנסיונות לסנתז אינסולין, כדרך שסונתז הריבונוקלאז, אינם עולים יפה. אמנם אין כל קושי ליצר את שתי השרשרות, שרשרת A בעלת 21 יחידות חומצה אמינית ושרשרת B בעלת 30 יחידות חומצה אמינית – אך שתי אלה מיתקשות ליצור ביניהן את קשרי הדוגפריט המתאימים למיבנה ההורמון הטבעי. הקושי נפתר כשהתברר שהאינסולין נוצר בגוף כפרואינסולין – שהוא חלבון הבנוי משרשרת אחת, לפי הרצף הרשום באיור, ויש בו שלושה קשרי דוגפריט, כנדרש, אך אין לו כלל פעילות הורמונאלית.



המיבנה הראשוני של הפרואינסולין

שיפעול ההורמון נעשה בעזרת אנזים המזהה את הצמידים Arg-Arg ו Lys-Arg, חותך מן השרשרת את פפטיד C המורכב מ-33 חומצות אמיניות (31-63, כמסומן באיור), ומותיר הורמון פעיל בן שתי שרשרות. הפרואינסולין, מסתבר, נחוץ להבטחת קפול "נכון" של השרשרת וליצירת קשרי הדוגפרית המתאימים, אך הוא נשאר בלתי פעיל. לחלבון הפעיל יש, כידוע, שתי שרשרות; ואם נהרס המיבנה השלישוני שלו – אין לו תקומה, כי אבד, לבלי שוב, המידע שהיה נתון בפפטיד C.

הנה כי כן, חזרנו ואיששנו את הטענה, שהמיבנה הראשוני הוא הכרחי ומספיק לבנין המיבנה השלישוני.

סיפור האינסולין אינו יחיד במינו. ידועים לנו אנזימים, שמופעלים רק לאחר שנחתך מהם קטע מוגדר, כמו הטריפסינוגן-טריפסין במערכת העיכול, או הפרורומבין-תרומבין במערכת קרישת הדם. לאחרונה התברר, שהספור גם יכול להיות מרכב יותר. יש מולקולות חלבון, גדולות במיוחד, המתקפלות בעזרת בת-לוויה מולקולרית: molecular chaperone. בת-לוויה היא מולקולת חלבון המסייעת למולקולה אחרת להתקפל "נכון", מבלי להיות אחר-כך חלק מהמבנה הפעיל שלה. בת-הלוויה, כנראה, חוסמת זמנית שטחי מגע של קטעי שרשרת ומונעת קפולי ביניים "לא נכונים", כלומר כאלה המוליכים למיבנה לא פעיל; ואפשר לראות בה מעין זרז המכוון את תגובת הקיפול הנכון, במסגרת המוסכמת של הדוגמה המרכזית.

מי הם, אם כן, הגורמים, המצויים במיבנה הראשוני, שמעצבים את המיבנה השלישוני? ואילו קשרים מייצבים אותו?

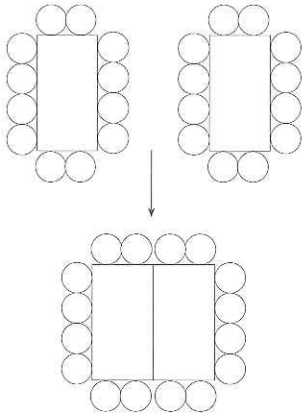
הקשרים הקוולנטיים הם הבונים את המיבנה הראשוני; קשרי המימן – את המיבנה השניוני; והמיבנה השלישוני – מי בונה אותו? לקשרי המימן ולקשרים היוניים יש כאן תפקיד ברור, וקשרי הדוגפרית גם הם תורמים את חלקם –

אך כפי שראינו כבר, אלה קשרים היכולים לייצב את המיבנה המרחבי, אך לא לעצב אותו. בחינה קפדנית של חלבונים רבים – למעלה מ-400 מיבני חלבונים שונים ידועים כיום – מראה, שהתופעה הבולטת המשותפת לכולם היא יצירת הליבה ההידרופובית: שרשרת החלבון מתקפלת כך, שהקבוצות ההידרופוביות מסתתרות בתוך המולקולה פנימה, כפי שראינו כבר במיוגלובין ובריונוקלאז, ואילו שרשרות הצד הקוטביות מוצבות כלפי חוץ. הנה כך התודענו לאחד האדריכלים הבכירים בעיצוב המיבנה המרחבי של מולקולות החלבונים הכדוריים: ההצמדה ההידרופובית.

ההצמדה ההידרופובית

1. "הצמדה" על דרך השלילה

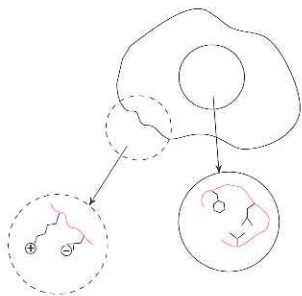
רוב החלבונים הכדוריים מכילים במולקולות שלהם כשליש, ואף יותר, שרשרות-צד לא קוטביות. ובדיקת גבישים בקרני X- מראה בברור, שרוב שרשרות-צד אלה ניקברות בליבה של מולקולת החלבון, מוגנות כך מחשיפה למים; ואילו שרשרות-הצד הקוטביות ובעלות המטען, מסתדרות על שטח הפנים של המולקולה.



הצגה סכמטית של ההצמדה ההידרופובית: העגולים מייצגים מולקולות מים והמלבנים - מולקולות הידרופוביות.

אין כל משיכה מיוחדת בין החלקים ההידרופוביים של שרשרות הצד - פרט לקשרי ון דר-וואלס, כמובן - ובכל זאת עובדה היא שכאשר הם מצויים במים הם מתקבצים יחדיו, במהלך שנכנה אותו בשם: הצמדה הידרופובית. מה שנראה כ"משיכה" בין החלקים ההידרופוביים - ואף זוכה לעתים לשם הלא מוצלח: "קשר הידרופובי" ביניהם - הוא למעשה תגובה שבה המים דוחקים מתוכם את החלקים הלא קטביים האלה ומצמידים אותם זה לזה. מגעי מומס-מים מפנים את מקומם לטובת מגעי מומס-מומס. כך פוחתות נקודות המגע עם המים והם - המים - נפטרים מ"עונשו" של המגע ההידרופובי.

ההצמדה ההידרופובית, אם כן היא הגדרת מצב, שבו מתקבצים יחדיו החלקיקים הלא קטביים, לשם הפחתת מגעם עם המים, כמאמר הכותרת: "הצמדה על דרך השלילה".



תרשים סכמטי של הליבה ההידרופובית והמעטפת ההידרופילית במולקולת חלבון.

בדרך זו, שרשרות-הצד, השייכות לחלקים שונים של השרשרת בחלבון, מתקבצות יחדיו **לליבה ההידרופובית** של המולקולה. תרומת ההצמדה ההידרופובית ליציבות המבנה המרחבי של החלבון מוערכת בכ- 5 kJ/mol לשרשרת-צד - לא ערך גדול כשהוא לעצמו, אך יש כאן תרומה מצטברת של שרשרות-צד רבות, המתמודדת בהצלחה כנגד הנטיה הקיימת לפיתול אקראי.

ההצמדה ההידרופובית הינה, אם כן, הכוח המניע את מהלך קיפול שרשרת החלבון ועיצוב צורתה, בתמיסה המימית.

לבניין הליבה ההידרופובית בשרשרת החלבון מתלווה בעיית-קבע:

על מנת לטמון את שרשרות הצד בליבה, גם עמוד השידרה הנושא אותן צריך להתקפל פנימה. אלא שעמוד השידרה בנוי מקבוצות קוטביות: הקבוצות הפפטידיות! הקבוצות הקטביות האלה, כשהן ניתקות מן הסביבה המימית יכולות לפצות את עצמן על-ידי יצירת קשרי מימן ביניהן, בתוך הסביבה ההידרופובית. כך נפתרת הבעיה בדרך אלגנטית, כשנוצרים המיבנים השניוניים בתוך המולקולה, כחלק מן המיבנה השלישוני.

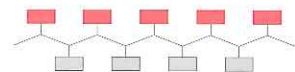
2. התבנית האמפיפאטית של המבנה השניוני

לא כל צרוף אקראי של חומצות אמיניות יכול ליצור מיבנה יציב ומוגדר. אנו יודעים כעת, שחשוב כאן סדר החומצות האמיניות לפי יחסן למים – והוא מה שקרוי "הפרופיל ההידרופאטי" של השרשרת, המייצג את אופיו הקוטבי/לא-קוטבי של הרצף. (פאתוס: רגש, ביונית).

במיוחד בולט הצורך בהכרת הפרופיל ההידרופאטי, כשבוחנים את המיבנים השניוניים, היכולים ליצור תבנית אמפיפאטית: תבנית שצידה האחד הוא הידרופילי וצידה האחר הוא הידרופובי. (ביונית, אמפי: דו-צד).

במשטח β , שיש בו שני צדדים ברורים, הרצף המתאים לענינו הוא סדר סרוגי של שרשרות צד הידרופוביות ושרשרות צד הידרופיליות, הבאות זו אחר זו, לסרוגין, כך שהקפלים במשטח שנוצר בונים צד אחד הידרופובי וצד אחר הידרופילי.

כך מתבקש, למשל, מן הרצף בחלבון RBP, שהכרונוהו כבר כ"חלבון β ".



תרשים סכימטי של משטח β

התבונן ברצף הנתון כאן לשלושה קטעים מתואמים



וסמן בהם את עמדות החומצות האמיניות ההידרו-

פיליות וההידרופוביות. כך תוכל להבחין בסדר הסרוגי

האנכי המופיע בהם: 41-48 I V A E F S V D → רצועה 2

60-53 M S A T A K G P ← רצועה 3

71-78 A D M V G T F T → רצועה 4

גם בסליל α ניתן למצוא תבנית אמפיפאתית, שיש בה צד אחד הידרופובי וצד אחר הידרופילי; אלא שכאן מציב הפרופיל ההידרופאטי דרישות מורכבות יותר. אפשר לבחון את הפרופיל ההידרופאטי של הסליל בדרך גראפית, בעזרת שירטוט מבט-על של הסליל, שניקרא לו "גלגל הסליל".

נדגים זאת עם שני הפוליפפטידים הבאים, הבנויים שניהם מלוצין וליזין בכמויות שוות, אך בסדר שונה:

1. L-K-L-K-L-K-L-K-L-K-L-K-L-K-L-K-L-K

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

2. L-K-K-L-L-K-L-L-K-K-L-L-K-K-L-K-K-L

לשניהם יש קונפורמציה אקראית בתמיסה מימית מהולה, אך הם יוצרים מיבנה שניוני מוגדר בנוכחות מישטח לא קוטבי. פפטיד-1 יוצר מיבנה β אמפיפאתי, בזאת בודאי כבר היבחנו. אך מהו המיבנה המתאים לפפטיד-2? האם יכול להיווצר כאן סליל α שיהיה אמפיפאתי גם כן? את זאת נוכל לבדוק בעזרת "גלגל הסליל": הטל-על של סליל α , המופיע בראש העמוד הבא.

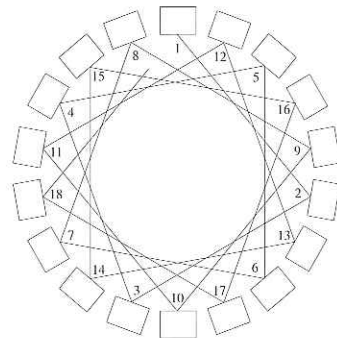
רשום את החומצות האמיניות של פפטיד-2 על



"גלגל הסליל", על פי מספרן הסידורי ברצף, וסמן

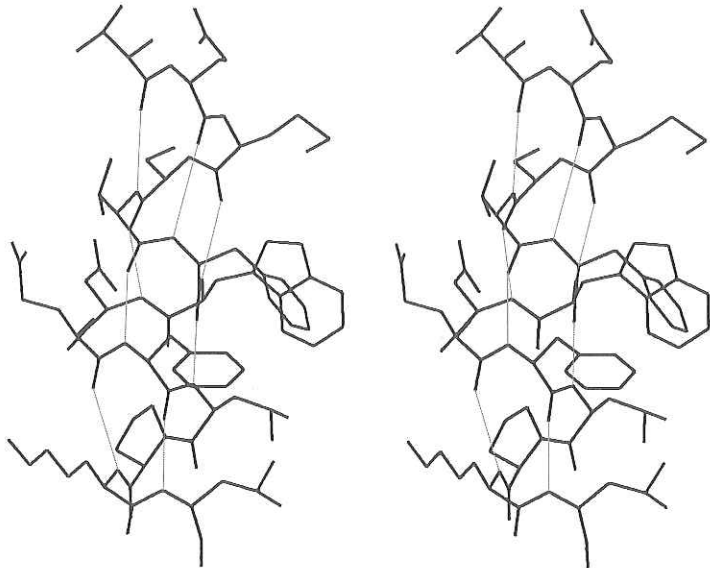
את מיקומן של החומצות האמיניות ההידרופוביות. (אל תיכתוב על הספר! צלם את התרשימים ועבוד עם התצלום).

האם אתה מבחין בתבנית אמפיפאתית?

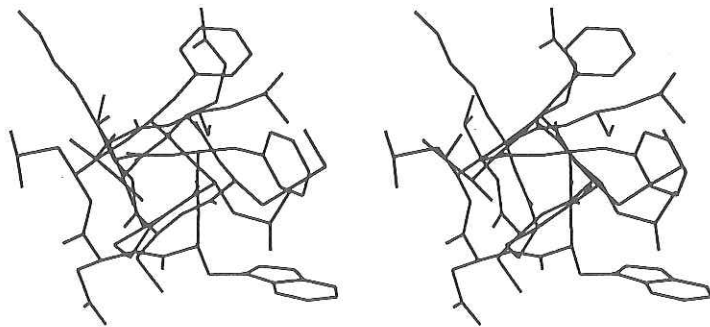


רצף החומצות האמיניות הנתון בסליל הזה, 3?
 מלמעלה למטה, הוא: $VQMCVFWNQFLPKL$.

זהה את שרשרת הצד ובחן את המיבנה האמפיפאטי של הסליל. שים לב למיקומו של הפרולין, קרוב לקצה הסליל, לחסרונו של קשר המימן ולכיפוף הקל הנגרם בשל כך.



א



ב

איורים סטראוסקופיים של סליל α במולקולת אצטילכולין אסטרזא.

א. מבט צד. קשרי המימן מסומנים בקו אפור.

ב. מבט על.

כך אפשר לבחון גם את סלילי המיוגלובין, הבונים את הכיס ההידרופובי, שבו מצוי ההם.

4? רשום, בעזרת "גלגל הסליל" את הפרופיל ההידרופאטי של סליל B או G של המיוגלובין, על פי הרצף הנתון בנספח, ובחן אותו תוך התבוננות באיור הסטריאוסקופי של המיוגלובין.

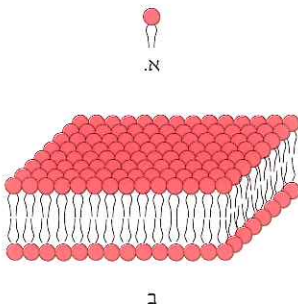
5? הלולאות המחוברות את סלילי המיוגלובין מצויות, בעיקרן, על פני המולקולה.

רשום את הפרופיל ההידרופאטי של הקטעים: CD 1-8, EF 1-8 ו-FG 1-4 - וציין את חלקן של שרשרות הצד ההידרופיליות בקטעים האלה, תוך התבוננות באיור הסטריאוסקופי של המיוגלובין.

החלבונים בממברנה הביולוגית

כל תא בגוף החי עטוף בממברנה מיוחדת, המפרידה בינו לבין סביבתו; וכך גם בתוך התא, עטופים האברונים השונים – כמו הגרעין, המיטוכונדריה, הכלורופלאסטידים – בממברנה משלהם. כבר זמן רב ידוע, שהממברנה מבררת את החומרים הניכנסים אל התא והיוצאים ממנו; ולאחרונה מתברר, שיש לה גם תפקיד מכריע בתהליך ההכרות הבין-תאית, החשוב לקיומן התקין של הרקמות, ובה ממוקמים אתרי הקישור להורמונים, למתווכים העצביים, למרכיבי מערכת החיסון ולאנזימים שונים.

הממברנה מורכבת בעיקר מליפידים ומחלבונים. הליפידים, שהם רוב בנינה, הם בעצמם אמפיפאטיים; כלומר: מולקולות שיש להן צד אחד הידרופובי וצד אחר הידרופילי, ולפיכך הם בונים את הממברנה במיבנה דו שכבתי, שתוכו הוא החלקים ההידרופוביים של הליפידים, ואילו ראשיהם ההידרופיליים פונים לשני הצדדים, כלפי חוץ, ומקיימים מגע עם הסביבה המימית, זו שבתוך התא פנימה וזו שמחוץ לו.



א. הצגה סכימטית של מולקולת ליפיד
ב. תרשים סכימטי של מימברנה

ב. קטע של 20 יחידות, שהוא קטע הידרופובי, המצוי בתוך הממברנה, בתבנית סליל α .

שים לב לרצף החומצות האמיניות של הקטע הזה. מהו אורכו של הסליל הבנוי מהן? 

ג. הקטע של קצה-C, הבולט אל תוך התא, גם הוא הידרופילי, 38 יחידות, אשר כשליש מהן נושאות מטען.

מהו סך כל המטענים של הקטע הזה? 

לפניך שלוש דוגמאות רצף, שלושתן בונות סליל α , הלקוחות משלושה חלבונים מוכרים: 

1. 270-260 של ציטראט סינתאז:

LSFAAAM NGLA

2. 365-355 של אלכוהול דהידרוגנאז:

IEGFDELLRSG

3. 97-87 של טרופונין C:

KEDARG KSEEE

אחד מהסלילים האלה קבור כולו בליבת החלבון, אחד חשוף כולו לתמיסה ואחד – אמפיפאתי, כלומר צידו האחד חשוף וצדו האחר טמון בממברנה. מי הוא מי?

ההמוגלובין - הזמנה להכרות אינטימית

”כמו דברים רבים בטבע,
ההמוגלובין נראה יפה יותר
ככל שאתה מרבה להתבונן בו”.
מקס פרוץ

1. המודל האלוסטרי: נדנדה מולקולרית, אז: החלבון ב”ארבעה מימדים”.

אנו חוזרים אל ההמוגלובין, לאחר שהכרנו כבר את חברו לצוות, את המיוגלובין: בחנו את הרכב החומצות האמיניות של שרשרותיו; בררנו את המיבנה הראשוני שלו ואת התאמתו למיבנהו המרחבי, עם הליבה ההידרופובית וקבוצת ההם שבמרקזה. אנו, אם כן, מוכנים ומזומנים לברר כעת את מיבנהו של ההמוגלובין ואת התאמתו לדרך תיפקודו המיוחדת.

כאשר דנו בהמוגלובין, בפרק השני, מצאנו בו שתי תכונות מיוחדות, הדורשות הסבר: עקומת הרוויה הסיגמואידית, המעידה על שיתוף פעולה בין שרשרותיו, והשפעת הגורמים האלוסטריים עליה. שתיהן, למעשה, היבטים שונים של אותה תופעה, המייצגת את אחת התרומות החשובות של החלבונים לתהליכי החיים: ויסות ובקרה, המאפשרים לייצור החי להגיב על שינויים בסביבתו.

וויסות כזה פועל בכל רמות הארגון במערכת הגוף החי, החל מבקרת המידע התורשתי, כפי שהוא בא לידי ביטוי ברמת התאים והרקמות, ועד לבקרת מערכת העצבים, המכתיבה את התנהגות הייצור כולו. ברמה המולקולרית אלה הם החלבונים האלוסטריים המנהלים ומתאמים את הארועים המתרחשים בתא החי. זה היה הרעיון שהתגבש אצל מונו, ב-1965 (Jacques Monod, מכון פסטר, פריס), כשהצהיר בהתרגשות, שהנה גילה את “הסוד השני של החיים” (הראשון היה, כמובן, מבנה ה-DNA, שהתגלה על-ידי וואטסון וקריק ב-1953). לאחר שבשנים האחרונות קיבל

המודל האלוטרי תנופה ואישוש בפענוח מבנה ודרך פעולה של אנזימים ובקרים תורשתיים, סיפר על כך פרוץ (1989):

"חלבונים רבים נותרים רדומים, עד שהם משופעלים על ידי ממריצים מיוחדים. הרמז הראשון לגורם ממריץ כזה, המסוגל להניע שינוי במבנה החלבון, נחשף ב-1938 בתצפית של פליקס הורוביץ (Felix Haurowitz), אז פרופסור צעיר לביוכימיה באוניברסיטת פראג. הוא גיבש מתוך תמיסה מימית, אוקסימוגלובין של סוס שמסירותו במים נמוכה, וקיבל מחטים בצבע אדום-בהיר. הוא שם אותם במקרר ושכח עליהם. אחרי מספר שבועות, כשמצאם שוב, הוא ראה לפניו מרק ארגמני, כשבתחתית הכלי היו משטחים משושים, ארגמניים, של דאוקסימוגלובין, שנוצר משום שהחיידקים ניצלו את כל החמצן שהיה קשור להמוגלובין.

אוקסימוגלובין: המוגלובין נושא חמצן - אדום בהיר

הורוביץ שם טיפה של תרחיף הגבישים על זכוכית והתבונן בהם במיקרוסקופ. כשהחל החמצן להכנס לתמיסה, השתנה צבעה בהדרגה מארגמן בחזרה לאדום, החל מקצה התמיסה ופנימה. תוך כדי כך התמוססו הגבישים הארגמניים, ובמקומם החלו לצמוח מחטים אדומות. המסקנה המתבקשת היתה, שצורתם השונה של גבישי האוקסי והדאוקסי המוגלובין מעידה על כך, שההמוגלובין משנה את מבנהו בכל פעם שהוא קושר או משחרר חמצן.

דאוקסימוגלובין: המוגלובין ללא חמצן - ארגמני

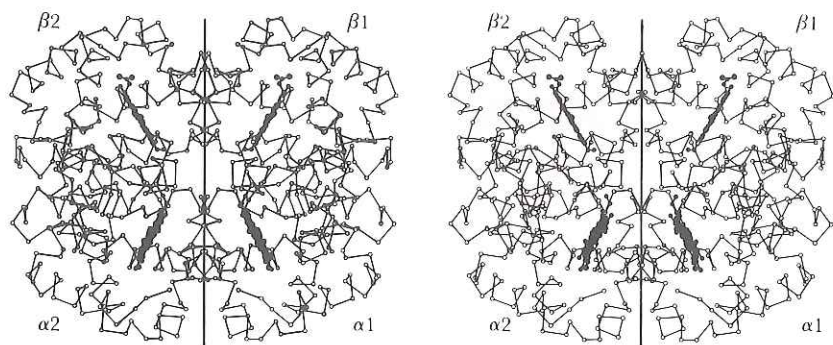
הפרסום זכה אז לתשומת לב מעטה; אך הזכרתי זאת, משום שהורוביץ נשא לאשה את דודניתו, ולמעשה היה זה הוא שדחף אותי לדרך הארוכה של עבודת חיי בקרני X עם המוגלובין.

באוקטובר 62 קיבלה סטודנטית צעירה לפיסיקה, Hilary Muirhead, את מפת צפיפות החומר הראשונה של המוגלובין של אדם, ואנו מיהרנו לבנות על פיה מודל. השוואה עם מודל של אוקסימוגלובין של סוס, שניבנה שלוש שנים קודם לכן, הראתה שהתת-יחידות במולקולה מתרחקות זו מזו עם יציאת החמצן: מולקולת ההמוגלובין שינתה את המבנה הרביעוני שלה (מבנה רביעוני הוא הכינוי למבנה המרחבי של מולקולת חלבון, הבנויה ממספר שרשרות המשולבות בתבנית אחת).

באותו הזמן היה לי קשר עם מונו, שכבר שנה קודם לכן התלהב למשמע הידיעה, שאטום כספית, שקשרתי לקבוצת SH- בהמוגלובין, זו כדי $6\text{\AA}$ עם יציאת מולקולות החמצן. זה היה הרמז הראשון לשינוי המבנה הרביעוני, ומונו שמח לאישו במודל שבנינו."

ההמוגלובין, כבר אמרנו, בנוי מארבע שרשרות – כל אחת מהן דומה למיוגלובין – הקשורות ביניהן למבנה רביעוני משותף. ככלל, הקשרים המייצבים את המבנה הרביעוני,

כמוהם כקשרים האחראים למבנה השלישוני: קשרי-מימן, קשרי-מלח והרבה מגעים הידרופוביים, משום ששטחים חיצוניים בשרשרת המיוגלובין מוצאים את עצמם כשטחי מגע פנימיים בין השרשרות בהמוגלובין.



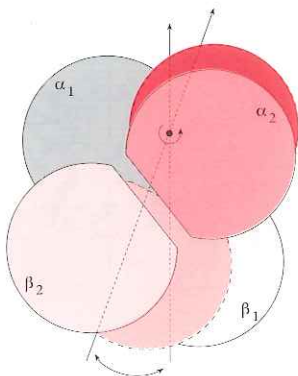
איור סטראוסקופי של מולקולת המוגלובין. על פי דיקרסון וגאיס, ברשותה האדיבה של הוצאת לוי אפשטיין-מודן.

בחן את טבלת הרכב החומצות האמיניות של המיוגלובין ושרשרות α ו- β של ההמוגלובין, וצין את חלקן היחסי של החומצות האמיניות ההידרופוביות, בכל הרכב. ?

בחן את טבלת רצף החומצות האמיניות של המיוגלובין וההמוגלובין, והשווה את "גלגל הסליל" B או G בשניהם. ?

מחקר משווה, בעזרת קרני X, מראה שיש, כצפוי, הבדל משמעותי במבנה הרביעוני בין האוקסי-והדאוקסימהוגלובין, בשל תזוזה בין התת-יחידות בטטראמר: צמדי השרשרות $\alpha\beta$ נעים זה לעומת זה, בתנועה סיבובית של כ- 15° סביב נקודת ציר, הנמצאת בתחום שרשרות α . שרשרות α זזות לכן מעט מאוד, אך שרשרות β זזות באופן ניכר, והמרחק בין יוני הברזל שבהן משתנה מ- $40\text{\AA}$ בדאוקסימהוגלובין ל- $33\text{\AA}$ באוקסימהוגלובין. כך,

שעם כניסת מולקולות החמצן ועם יציאתן מתנדנדות שרשרות β הלוך ושוב - מעין "מולקולה נושמת", שבאופן פאראדוקסאלי מתכווצת כשהיא קולטת חמצן, ומתרחבת כשהיא פולטת אותו.



תרשים סכמטי של שניווי במיבנה הרביעוני של מולקולת ההמוגלובין במעבר בין אוקסי לדאוקסי

תרשים סכמטי של מולקולת המוגלובין

המודל האלוסטרי של מונו מתבסס על השינויים האלה ומייחס להמוגלובין מצב שיווי-משקל בין שתי צורות מבניות, השונות זו מזו בסידור המרחבי של התת-יחידות, בקשרים שביניהן ובזיקתן לחמצן. בצורה האחת התת-יחידות רתומות זו לזו בקשרים, המונעים שינויים במבנה, שינויים הנחוצים ליצירת הקשר עם החמצן. צורה זו סימן מונו באות T (הבאה מ-Tense, מתוח). בצורה האחרת, הקשרים בין התת-יחידות רפויים יותר - סימנה R (Relax, רפוי) - והיכולת לקשור חמצן גדולה יותר. אפשר להמחיש את שני המצבים האלה על-ידי דימוי הנדנדה:

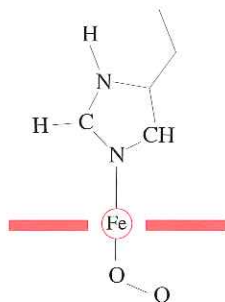
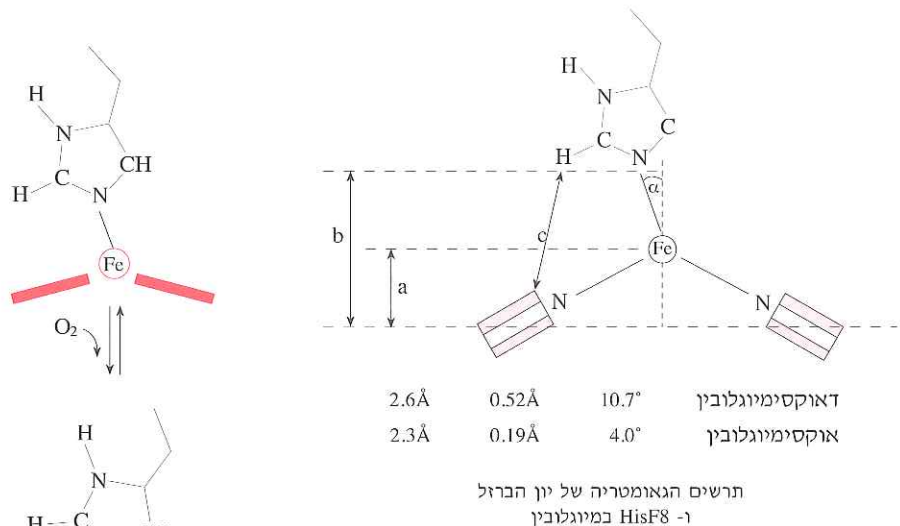


בהעדר חמצן יש עדיפות למצב T, ואילו הקישור לחמצן מסיט את שיווי המשקל באופן חד וברור למצב R. שאלת המפתח בהבנת תפקוד ההמוגלובין תהייה אם כן: כיצד התגובה עם החמצן משפיעה על ההם וסביבתו, כך שהיא מניעה את המעבר מ-T ל-R?

2. מנגנון הנדנדה בהמוגלובין והקשרים

היוניים - on and off

נתחיל במיוגלובין, שכבר הכרנו. דמוי הנדנדה מתחיל כאן ביון הברזל. עמדת הפתיחה, בדאוקסימיוגלובין, מראה את יון הברזל, הקשור לחמישה שכנים, כשהוא מוצב כ- $0.5\text{\AA}$ מעל למישור ההם, וההיסטידין הסמוך, הפרוקסימאלי, הקשור אליו, נוטה מן האנך כ- 11° . באוקסימיוגלובין, לעומת זאת, יון הברזל קרוב יותר למישור ההם, וההיסטידין מתיישר לכיוון האנך.



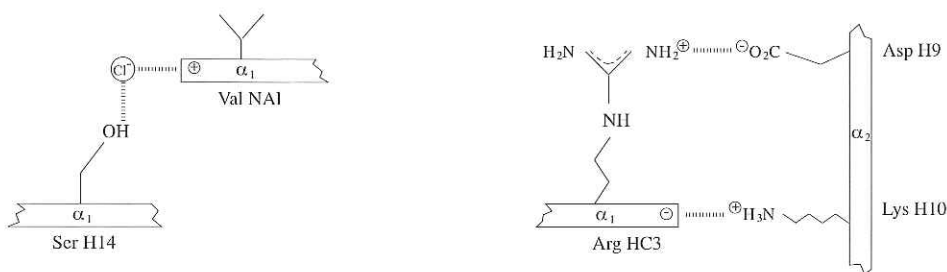
הצגה סכמטית של תנועת יון הברזל בהם.

השינוי המיני, המופיע עם הקישור למולקולת החמצן, מתחיל אם כן בכך, שיון הברזל מתקרב למישור ההם כדי $0.3\text{\AA}$ וההיסטידין הפרוקסימאלי F8 - אחריו. אלא, שההיסטידין אינו יכול להתקרב "סתם כך", בגלל המגע שנוצר בין פני ההם לבין אחד מאטומי המימן של

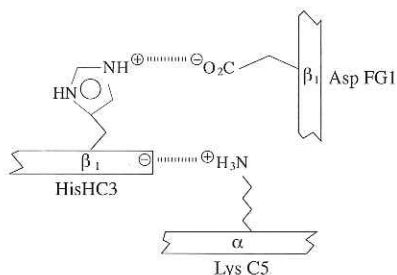
ההיסטידין - זהו אטום המימן השמאלי בתרשים שמרחקו מפני ההם מסומם בחץ C. מגע זה פועל כנקודת סיבוב, וההיסטידין, הנימשך על-ידי יון הברזל מתיישר אל האנך. תזוזה זו של ההיסטידין מניעה את סליל F כ-1Å לכיוון פינת FG וסליל G, ומגיעה כך גם אל פני המולקולה.

במיוגלובין אין לתנועות אלה משמעות רבה, אך בהמוגלובין יש להן תוצאה חשובה, כי הן "לחיצת ההדק", הגורמת למעבר מ-T ל-R. תנועת הנדנדה בין T ו-R מופעלת, אם כן, על-ידי תנועת הנדנדה של יון הברזל, במרכז מישור ההם, פנימה והחוצה. בהמוגלובין, השני הזה, המעבר בין T ו-R, כורך את התנועה במיבנה השלישוני עם תנועה במיבנה הרביעוני:

במבנה T הקצוות C ו-N של כל שרשרת α יוצרים 3 קשרים יוניים עם שרשרות-צד של חומצות אמיניות: אחת מצויה באותה שרשרת α , ושתיים - בשרשרת α הסמוכה.

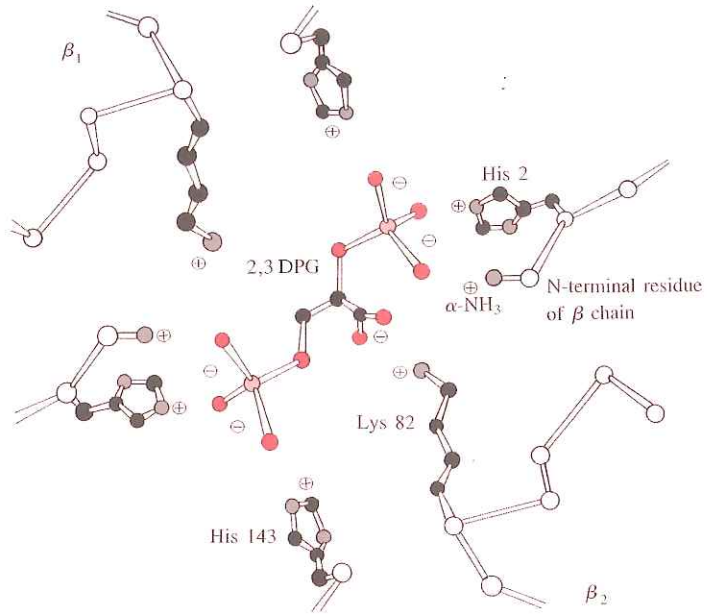


גם שרשרות β שותפות לקשרים יוניים במבנה T. קצה C של כל שרשרת β יוצר שני קשרים יוניים, עם שרשרות-צד של חומצות אמיניות: האחת מצויה באותה שרשרת β , והאחרת - בשרשרת α סמוכה:



ויש לשרשרות β עוד שותף לקשרים היוניים: ה-DPG, המוצא לעצמו מקום במרכז הטטראמר, בחלל שקיים

בדאוקסיהמוגלובין בין שתי השרשרות האלה. כאן מצויות קבוצות נושאות מטען חיובי: קצה N, His 2, Lys 82 ו-His 143, שהמיקום המרחבי שלהן מתאים לצורת מולקולת ה-DPG ולחלוקת המטענים השלילים על פניה.



עם הקישור לחמצן, כשפועלת ה"נדנדה המולקולרית", ניתקים הקשרים היוניים שבין השרשרות, כולם עד אחד. כך נפתחת האפשרות לתנועה הנדרשת במעבר מ-T ל-R; מהלך, אשר מחייב כמובן גם ניתוק הקשרים היוניים עם ה-DPG. כלומר, זיקת ה-DPG לדאוקסיהמוגלובין דווקא, באמצעות הקשרים היוניים שביניהם, תורמת ליציבותה היחסית של צורת T, והמעבר ל-R צריך להתגבר גם על הקשרים האלה.

שים לב למיקומו של יון הכלור בקשר היוני של קצה N של שרשרת α .



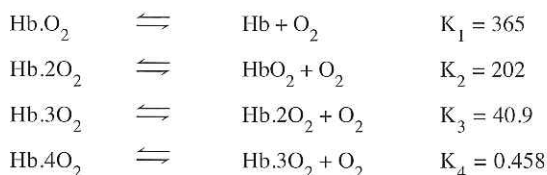
האם זכאי גם יון זה לתואר "גורם אלוסטרי"?

הצע דרך לשכלל את תרשים "מודל הנדסה", על ידי תוספת שת"צ את הגורם האלוסטרי. 

הנה כך עומדים אלה מול אלה, הקשרים היוניים בדאוקסיהמוגלובין וקשרי מולקולות החמצן – יוני הברזל בדאוקסיהמוגלובין. ניתוק הקשרים היוניים אינו מתבצע בבת-אחת, אלא בהדרגה, עם כניסת מולקולות החמצן, זו אחר זו, אל ארבעת קבוצות ההם. ברור, משום כך, שהמעמסה האנרגטית של ראשית המהלך לניתוק הקשרי היוניים מוטלת בעיקרה על מולקולת החמצן הנכנסת ראשונה, פחות מכך על השניה והשלישית, ומולקולת החמצן הרביעית כבר באה אל המוכן...

הקשרים היוניים, אם כן, הם המדרגים את הזיקה לחמצן, והם האחראים לצורה הסיגמואידית של עקומת הרוויה. הם גם אלה שיחזירו את ההמוגלובין לצורת הדאוקסי שלו, עם יציאת מולקולות החמצן ממנו. הם פועלים כעין "קפיץ מחזיר", המושך את התת-יחידות בחזרה לצורת T ומסייע לדחיקת מולקולות החמצן החוצה.

נרשום כאן שנית את קבועי שיווי המשקל של כל אחד מהשלב (פגשנו בהם כבר לראשונה בפרק השני), על מנת לראות את התאמתם למודל:



חישובים תרמודינמיים מאפשרים לנו, בעזרת נוסחה מתאימה*, למצוא את הקשר בין ההבדלים בקבועי שיווי-המשקל לבין ההבדלים בערכי האנרגיה החפשית המתאימים להם.

*

$$\Delta \Delta G^\circ = -RT \ln \frac{K_4}{K_1}$$

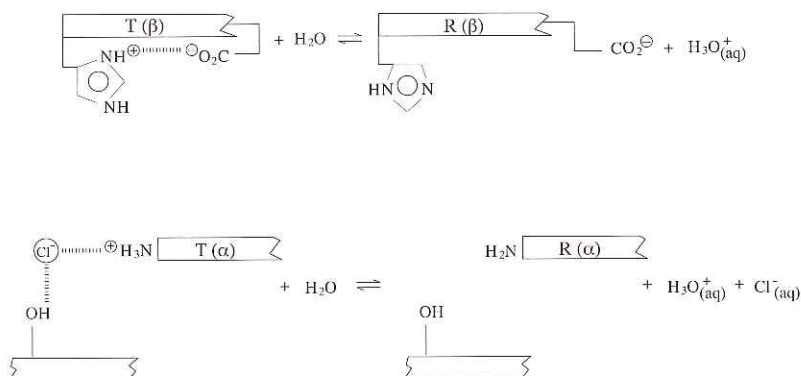
תרמודינמיקה, הכימיה-אתגר.

מסתבר, שזיקת ההמוגלובין למולקולת החמצן הרביעית, בערכים של אנרגיה חופשית, גדולה כדי 16.5 kJ/mol מזיקתו למולקולת החמצן הראשונה; והיפוכו של דבר בתהליך יציאת החמצן ממנו.

3. אפקט בוהר: שיווי משקל חומצה - בסיס

אפקט בוהר, שהכרנוהו כבר בפרק השני, מציג את היון $\text{H}_3\text{O}^+_{(\text{aq})}$ כגורם אלוסטרי, אשר גם הוא, כמו ה-DPG, צריך להיות שותף לקשרים היוניים המייצבים את צורת T.

? התבונן בתרשים הקשרים היוניים שבדאוקסי-המוגלובין ורשום לפניך את כל הקבוצות הנושאות מטען, המשתחררות מן הקשרים במעבר לאוקסי-המוגלובין. ציין ליד כל אחת את ה-pKa שלה. יש בהן כאלה שה-pKa שלהן שונה כל כך מן ה-pH של הדם (7.4, כידוע), כך שהן אינן מגיבות כלל על השינוי במצבן. אך יש קבוצות שה-pKa שלהן מספיק קרוב ל-pH הנתון בדם – כדי יחידה אחת, בערך – והן מגיבות על השינוי בסביבתן... מי הן וכיצד הן מגיבות בתנאים המשתנים?



הנה כי כן, בדאוקסי-המוגלובין נעולות הקבוצות האלה בקשרים היוניים. אך באוקסי-המוגלובין, כשהן חופשיות מן הקשרים האלה, ניתנת להן האפשרות להגיב כחומצה.

משום כך האוקסיהמוגלובין הוא חומצה חזקה יותר מן הדאוקסיהמוגלובין.

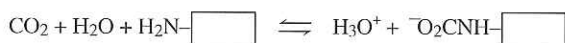
מדידות בתמיסת המוגלובין (25°C , $\text{pH} = 7.4$) הראו, שעם שחרור מול חמצן, במעבר מאוקסי לדאוקסיהמוגלובין, קושר אליו ההמוגלובין 0.3 מול פרוטוני H^+ (בממוצע); בתמיסה שיש בה גם יוני כלור - 0.5 מול פרוטוני H^+ ; ובנוכחות DPG - 0.7 מול פרוטוני H^+ . אפשר, אם כן, להרחיב את נסוח תגובת ההמוגלובין, בלי להתייחס למקדמים המולריים, באופן הבא:



התחרות שבין מולקולות החמצן לבין פרוטוני H^+ , על מקומם במולקולות ההמוגלובין, משפיעה כמובן על שווי-המשקל בין שני מצבי הנדנדה: R ו-T. עליית ריכוז יוני H_3O^+ בתמיסה, התורמת ליצירת המטענים הנחוצים לקשרים היוניים, מייצבת את צורת T ותורמת את חלקה לשיחרור החמצן מן ההמוגלובין.

חשובים תרמודינמיים מראים לנו שזיקת האוקסיהמוגלובין לחמצן, בערכים של אנרגיה חפשית, גדולה יותר כדי 8.9 kJ/mol מזו של הדאוקסיהמוגלובין. כלומר, אפקט בוהר אחראי ליותר ממחצית האנרגיה החפשית המניעה את מנגנון ההמוגלובין, שכל כולה, כנאמר כבר, כ- 16.5 kJ/mol .

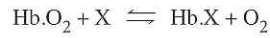
מסתבר, שגם ה- CO_2 עצמו הוא גורם אלוסטרי, המעודד את פריקת החמצן מהאוקסיהמוגלובין המגיע לרקמות, וזאת על ידי תגובה ישירה עם הקצה האמיני הניטראלי של שרשרות האוקסיהמוגלובין, בתגובה הנקראת קארבאמילאציה (carbamylation):



באופן זה קצה N של שרשרת α הזוכה במטען שלילי, יכול ליצור קשר יוני ישיר עם Arg141 (מבלי צורך בתיווך של יון כלור), ולסייע כך למעבר מ-R ל-T. מכאן, שתוך כדי תיפקודו בהולכת חמצן מסייע ההמוגלובין להולכת CO_2 בדם, מן הרקמות אל הראות, לא רק דרך

שיווי-משקל חומצה-בסיס, אלא כשהוא ממש "נושא אותו על גבו" (כ-10% מכל ה- CO_2 נישאים בדרך זו).

סכם לעצמך: מי הם הגורמים האלוסטריים של ההמוגלובין, וכיצד משפיע כל אחד ואחד על שווי המשקל:



איך נבנתה מכונה מולקולרית מורכבת ויפה כזאת? לאבולוציה המולקולרית פתרונים!

עיצוב חלבונים

הטבע מעניק לנו אוסף גדול ומגוון של חלבונים, תולדה של האבולוציה רבת השנים – והאתגר הוא למצות מן המיגוון הנתון הזה את המידע המתאים, לפרשו במונחים של מיבנה ותיפקוד, ולהשתמש בו להכוונה ולשליטה בהתנהגות החלבונים. ב-1982 התפרסם, בקולג' האימפריאלי למדע ולטכנולוגיה בלונדון, דו"ח ראשון על הצלחה לבצע שנויים מובנים בחלבון נתון, באמצעות שנויים מתאימים ב-DNA של הגן שלו. כך נולדה "הנדסת החלבונים", שעניינה לעצב שנויים מיבניים ותיפקודיים, שאפשר "לשתול" בחלבונים, על פי הזמנה; וזאת בעקבות "הנדסת התורשה", המאפשרת שנויים ייזומים ב-DNA, אשר – לפי הוראות "הדוגמה המרכזית" – מולידים שנויים מקבילים בחלבון הנוצר על פי ה-DNA הנתון.

כמובן, ידיעת המיבנה השלישוני של החלבון היא תנאי מוקדם ליכולת "להנדס" אותו, וידיעה זו – למרות ההתקדמות המרשימה – עדיין מפגרת מאד אחרי שפע נתוני המיבנים הראשוניים. מכאן המשקל המיוחד שיש להכרת העקרונות הכלליים המתגלים במיבנים המוכרים לנו, כבסיס ליכולתנו לבא את המיבנה השלישוני ולתכנן בו את השנויים המבוקשים, על פי נתונים ידועים של המיבנה הראשוני.

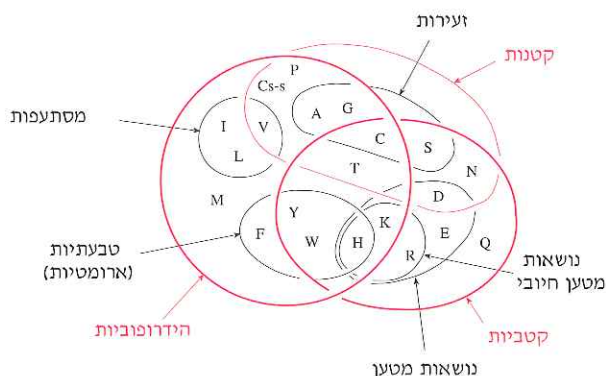
יש כאן תחום חדש, מפתה ומבטיח, האמור לתת ל"מהנדס החלבונים" כלים שיאפשרו לו לשפר את יציבותם של החלבונים המשמשים בתעשיית המזון והתרופות, להגביר את יעילותם של החלבונים הפועלים במערכת החיסון, לתקן חלבונים שנפגמו במחלות תורשתיות ואפילו לעצב חלבונים חדשים, בעלי תכונות מתאימות ופעילות מבוקרת, על פי תכנית ערוכה מראש, שיש לה תכלית רפואית או תעשייתית¹. The sky is the limit ...

1. מוטאציות מוכוונות (site-directed mutations). הטכנולוגיה המתקדמת של העבודה עם חומצות הגרעין

(הנדסת התורשה), מאפשרת "לשתול" בחיידק את הגן המתאים ליצירת חלבון מסויים וכך להפיקו בכמויות ניכרות (אינסולין, למשל). אך גם יותר מזה – "הנדסת" ה-DNA יודעת לבצע מוטאציה מכוונת, כלומר: לשנות נוקלאוטיד אחד במקום מסויים ב-DNA, וכך גם לשנות חומצה-אמינית אחת בשרשרת החלבון הנוצרת לפי ה-DNA הנתון. שינוי כזה בשרשרת החלבון מאפשר לחקור את הקשר שבין המיבנה והתיפקוד ברמת פרוט של שרשרת צד אחת; שיטה זו היא שזכתה למעשה לכינוי "הנדסת החלבון".

בשיטה זו של הנדסת החלבון, הצטבר בשנים האחרונות מידע רב על חלבונים שונים, המלמד אותנו, על חלקן של שרשרות-הצד בעיצוב מיבנה מולקולת החלבון ותיפקודה. אמנם כבר הכרנו את החומצות האמיניות השונות – אך כעת עלינו למקד את תשומת הלב לפרטים התורמים את חלקם למיבנה ולתיפקוד: גדל, מטען, קטביות והידרופוביות. שנוי בכל אחד מן המדדים האלה, עם החלפת חומצה אמינית אחת באחרת, במיבנה הראשוני, מוליך לשנויים אפשריים במיבנה השניוני, השלישוני וגם – ברביעוני, שכן "צעד קטן לחומצה האמינית" יכול להיות "צעד גדול לחלבון".

לשם כך נציג את משפחת החומצות האמיניות בעזרת הדיאגרמה הבאה (המתמטיקאים מכנים אותה בשם דיאגרמת וון, Venn diagram):



הדיאגרמה מדגישה במיוחד את ההידרופאטיות ואת הגודל. שתי הקבוצות העקריות הן, כצפוי, ההידרופובית והקוטבית. ויש גם, מסתבר, חומצות אמיניות "דו-פרצופיות", שמוצבות בקבוצה אחת, אך יש להן גם זיקת שותפות בקבוצה האחרת. שרשרת הצד של הליזין, למשל, יש בה שרשרת פחמימנית שיכולה להיקבר בליבה והמטען שבקציה יהיה חשוף לסביבה המימית.

הדיאגרמה מציינת גם את קבוצת "תשע הקטנות", ובהן ה"זעירות", (נשיש להן, בשרשרת-הצד, אטום פחמן אחד לכל היותר).

הציטאין רשום בשני מקומות, בגלל שני המצבים בהם הוא מצוי: יחידה נפרדת או צמד בקשר דוגפרי.

? אפשר לציין את ההבדל המיבני בין שתי חומצות אמיניות כלשהן לפי הקווים המפרידים ביניהן.

מהו ההבדל המיבני בין E -ל- D ?

בין N -ל- D ?

בין L -ל- V ?

בין S -ל- Y ?

בין F -ל- Y ?

הנדסת החלבון היא לא רק כלי פסיבי ללימוד מרכיבי מיבנה החלבון ותיפקודו, אלא גם ובעיקר דרך להתערבות יזומה בו, בכוונה לשפר את תכונותיו. למשל: שנוי בספציפיות בבחירת מצע לאנזים; שנוי ה- pH האופטימאלי לפעילותו; שיפור יציבותו לחימצון, או שיפור עמידותו בטמפרטורות גבוהות, יחסית. ניבחר דוגמה אפיינית לעיצוב חלבון הקרוי ליזוזים, ונפנה אחר-כך שוב להמוגלובין מודענו.

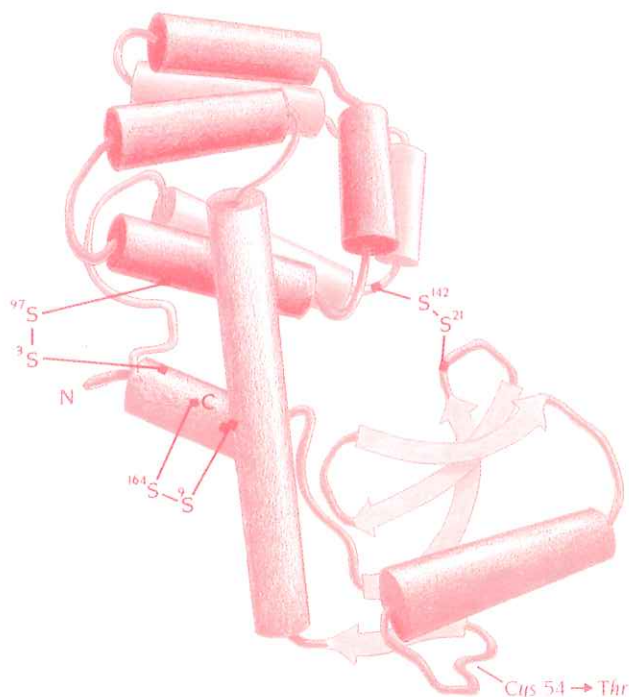
ליזוזים הוא אנזים המצוי, בין השאר, בבאקטריופאג' $T4$ (באקטריופאג' הוא וירוס התוקף חיידקים). ליזוזים $T4$ מופיע בשלב מאוחר של חיי הוירוס והוא נחוץ לו לפרוק דפן התא המארח. הליזוזים הזה הוא חלבון הבנוי מ-164 יחידות חומצה אמינית בשרשרת, המתקפלת לתבנית, המשלבת סלילי α ורצועות β – בדומה לריבונוקליאז. יש בו שני ציסטאינים, בעמדות 54 ו-97 בשרשרת – אך הם אינם קשורים בקשר דוגפרי, כי הם רחוקים מדי זה מזה בצור המיבנה הטבעי.

עם החימום, במהלך הדנאטוראציה, נפתחים הקיפולים של מולקולות האנזים באופן הפיך:

חלבון בפיתול אקראי $\rightleftharpoons$ חלבון בצורתו הטבעית

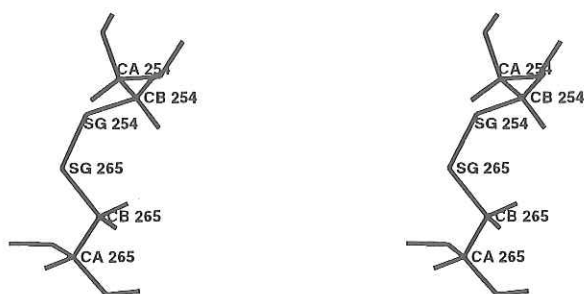
Tu, טמפרטורת הדנאטוראציה, היא הטמפרטורה שבה שני המצבים נמצאים בריכוזים שווים, קבוע שיווי המשקל הוא ΔG ו-1 של התגובה שווה לאפס. הניסויים הראו שתוספת מעלה אחת ב-Tu מעידה על תוספת של כ-2 kJ/mol ל- ΔG של תגובת הדנאטוראציה.

דרך אפשרית להגדיל את יציבותה של הצורה הטבעית ולהעלות את Tu שלה - משימה כללית בהנדסת החלבון - היא לשתול בה קשרי דוגפרי, אשר מורידים באופן דרמטי את האנטרופיה של הפיתול האקראי. ככל שהמרחק ברצף בין שתי יחידות הציסטאין גדול יותר, כך גם גדול יותר קטע השרשרת הנלכד בלולאת הקשר הדוגפרי וגדולה יותר



תרשים סכמטי של מולקולת ליזוזים T₄. הגלילים מייצגים סלילי α והרצועות - משטחי β . (על פי Matsumura, nature 290, 1989)

השפעתו על הפחתת מספר הדרכים לפיתול האקראי – ΔS של הדנאטורציה קטן יותר ומכאן גם תרומה גדולה יותר לעצב קשר דוגפרי אינו עניין של מה בכך, צריך להכיר היטב את המיבנה השלישוני של המולקולה ולאתר בו את המקומות המתאימים מבחינה גאומטרית לקבוצה $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2-$, האמורה לקשור את שתי הנקודות המתאימות בעמוד השדרה של החלבון, מבלי לגרום לעוות בקפול ולחבל ביציבות, במקום לשפרה כמבוקש.



איור סטראוסקופי של קשר דוגפרי במולקולת אצטילכולין אסטרז.

שים לב למהלך הפיתול מ-CA254 ל-CA265.

כשבחנו, בקפדנות רבה, את הגאומטריה של כ-300 צרופי צמידים אפשריים במיבנה השלישוני של הליזוזים T_4 , נמצאו שניים מתאימים ליצירת קשר דוגפרי, מבלי לפגוע בפעילות האנזימטית: 3-97, ו-9-164. בעמדה 97 כבר יש ציסטאין ובעמדות האחרות צריך לשתול אותו. ואילו את הציסטאין הקיים בעמדה 54 צריך להחליף, כדי למנוע את התערבותו הבלתי רצויה ביצירת קשרי הדוגפרי המבוקשים. (ההחלפה שבוצעה היתה: $\text{Thr} \leftarrow \text{Cys54}$). התוצאות מדברות בעד עצמן:

מיקום הקשרים בחלבון	T_m °C	ΔT , °C
ללא קשרי דוגפרי	41.9	
97-3	46.7	4.8
164-9	48.3	6.4
שני הקשרים ביחד	57.6	15.7

בוצעו בליזוזים גם החילופים הבאים:



החילוף $77 \text{ Gly} \leftarrow \text{Ala}$ גרם לעליית T_D ב- 1°C .
החילוף $82 \text{ Pro} \leftarrow \text{Ala}$ גרם לעליית T_D ב- 2°C . מדוע
הגליצין תורם ליציבות פחות מן האלאנין, ואילו הפרולין -
תורם יותר ממנו?

ויש, מסתבר, מקום נוסף שבו אפשר "לשתול" קשר דוגפרי:
142-21. קשר דוגפרי במקום הזה, משפר גם הוא את
היציבות התרמודינאמית - אך אליה וקוץ בה: הוא חוסם
את פתח האתר הפעיל, והאנזים חדל לתפקד. והנה - "מעז
יוצא מתוק" - כך נולד רעיון חדש לניהול פעילותו של
האנזים: להשתמש בקשר הדוגפרי כמתג "המדליק" את
האנזים או "מכבה" אותו.

כשמציבים את שני הציסטיאנים במקום המיוחד להם, 21
ו-142, הם יוצרים, באופן ספונטאני - בסביבה מחמצנת -
קשר דוגפרי, הבולם את הפעילות הקטליטית. על-ידי
חשיפת האנזים לגורם מחזר, הקשר הדוגפרי, שנמצא על-פני
המולקולה, נפתח במהירות, והאנזים המחזר משקם את
מלוא פעילותו. כך אפשר "להנדס" את האנזים, באופן
ספונטנציאל החיזור-חימצון שבסביבתו יוכל לשמש כמנגנון
לניהול מבוקר של פעילותו.

2. עיצוב ההמוגלובין

נפנה תחילה ל"אמא טבע", שהיא, בינתיים, המעצב המנוסה
ביותר והפורה ביותר, ושדה המבחן שלה כולל את משפחת
הגלובינים על פני כל עולם החי; ולמשפחה הזאת יש נציגות
מגוונת בחסרי החוליות ובבעלי החוליות ואפילו בצמחים.
הגלובינים ביצורים השונים רבים ומגוונים מאוד, ולעיתים יש
גלובינים שונים גם באותו יצור עצמו. באדם, למשל, כבר
נפגשנו עם ההמוגלובין העוברי (HbF) וההמוגלובין הבוגר
(HbA); וגם ביצורים אחרים (כמו חרקים, דגים או דו-חיים)
יש ומופיעים המוגלובינים שונים בשלבי חיים שונים. ההבדל
בין HbF ל-HbA הוא, כפי שכבר אמרנו, ההבדל שבין
שרשרת γ לשרשרת β , הגורם לכך שזיקתו של HbF ל-
DPG קטנה יותר.

א. הכל נשאר במשפחה

? בחן בטבלת רצף החומצות האמיניות של ההמוגלובין את אלה המוצבות בשרשרת γ של HbF , בעמדות המתאימות לקישור ה- DPG , בהשוואה לאלה המוצבות בשרשרת β של ההמוגלובין הרגיל HbA . מה למדת?

ריבוי צורות ביצור אחד אינו תופעה ייחודית להמוגלובין. אנזימים רבים מצויים בגוף בצורות אחדות, דומות במבנה המרחבי ושונות בפרטים במבנה הראשוני. יש כאן גיוון המאפשר יתרון תיפקודי, תוך התאמה לתנאים משתנים. אלא, שלא תמיד אנו מוצאים לגיוון הזה משמעות כל שהיא, ולכן אולי אפשר לראות בו יתרון אבולוציוני, לכשיבוא שינוי בלתי צפוי בתנאים. מכל מקום נוצר כך בעבר אוצר גדול של גיוון תורשתי, שממנו התפתחו במשך הדורות הגלובינים המוכרים כיום.

בבעלי החוליות מהדגים ועד האדם, הארכיטקטורה הכללית של כל סוגי ההמוגלובין מבוססת על טטראמר, הבנוי משני סוגים שונים של שרשרות, כדוגמת ה- α וה- β , כשהקואופרטיביות האפיינית כאן מבוססת על אינטראקציה בין השרשרות השונות.

ידועה מחלה תורשתית, המכונה תאלאסמיה (Thalassa =ים, ביוונית; כי המחלה מצויה בארצות הים התיכון, סביב סביב), שמתבטאת בחסר שרשרות α או β . שרשרות α לבדן (ב- β תאלאסמיה) אינן מצליחות כלל להתלכד לטטראמר; ואילו שרשרות β מסוגלות אמנם לבנות טטראמר β_4 (ב- α תאלאסמיה), אך הטטראמר הזה אינו יעיל בהולכת חמצן, כי יש לו עקומת רוויה כמו של מיוגלובין.

גלובין מוזר ומפתיע הוא זה של הקטניות: Leghemoglobin: הוא מצוי בפקעות שבשרשי הקטניות, שבהן מתפתחים חיידקים קושרי חנקן. הגלובין נוצר על ידי הצמח, ואילו ההם מסופק על ידי החיידק. המוזר שבעניין הוא, שתהליך קישור החנקן הוא אנאאורבי, וחמצן חפשי פוגע באנזים ניטרוגנאז. אם כך, לשם מה המוגלובין?

מסתבר, שתפקידו כאן הוא לנקות את הזירה מחמצן, כדי למנוע את הנזק, שהוא יכול לגרום לתהליך קשירת החנקן; וזהו המקרה היחידי, המוכר לנו, שבו תפקיד ההמוגלובין הוא לסלק חמצן ולא לספק אותו.

כשבוחנים את משפחת הגלובינים העניפה, עשרות רבות ביצורים שונים, ומשווים את רצף החומצות האמיניות שלהם, מוצאים גיוון רב ברוב העמדות. אך דווקא לנוכח הגיוון הרב הזה, פרי המוטאציות והאבולוציה על פני מליוני שנים, בולטות אלה השמורות בעמדתן כמעט בכל הגלובינים הידועים:

- ההיסטידין F8, הסמוך (הפרוקסימאלי) ליון הברזל וקשור אליו.

- ההיסטידין E7, המרוחק יותר (הדיסטאלי), בצידו השני של ההם, שם הוא יוצר קשר מימן עם מולקולת החמצן וממקם אותה בעמדתה מול יון הברזל.

- ואלין A15, לויצין B10, פניל-אלאנין CD1, לויצין CD, ואלין E11, לויצין F4, פניל-אלאנין GH5 - המשתתפות כולן בבנין המעטפת ההידרופובית של ההם.

- ליזין H10, היוצר קשר יוני ושותף למנגנון המעבר מ-T ל-R.

- פרולין C2, המעצב את הסבוב החד שבין הסלילים B ו-C.

- הגליצינים B6 ו-E8, הניצבים זה מול זה במירווח הצר הקיים במיפגש הסלילים B ו-E.

ויש גם שינויים משמרים, כאלה המקיימים את אותו התיפקוד גם לאחר החילוף; כמו חילוף ליזין בארגינין, או חילוף לויצין באיזולויצין.

מצא בטבלת הרצף דוגמאות לחילופים משמרים  כאלה.

מנגנון ההמוגלובין, כבר נוכחנו לדעת, תלוי בעבודה מתואמת של חומצות אמיניות רבות, ואפשר אולי להתפלא

ב. ההמוגלובין החולה

על כך שמערכת מורכבת ועדינה כזאת מצליחה בכלל לתפקד. ובכן, לא תמיד! ...

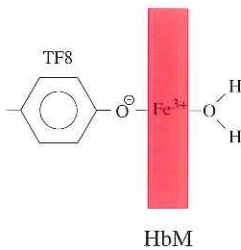
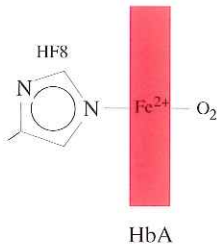
ודווקא בדיקת המוגלובונים שאינם מתפקדים כהלכה, איתור הפגמים שבהם ובחינת השפעתם על הפעילות, מלמדים רבות על עיצוב המיבנה והתיפקוד במולקולת החלבון.

ההמוגלובין החולה הראשון נתגלה בחולים בני משפחה גרמנית אחת, שסבלו מכך, שהדם שלהם לא נשא מספיק חמצן אל הרקמות.

בתחילה ייחסו זאת לפגם בלב, עד שהתברר ב-1943, שבתאי הדם האדומים שלהם יש, יחסית, הרבה מטהמוגלובין. כשהפרידו את ההם מהגלובין שלו ושילבו אותו בגלובין מאדם בריא, קיבלו המוגלובין נורמלי. וכאשר שילבו גלובין מאדם חולה עם הם מאדם בריא, קיבלו המוגלובין "חולה".

כך, להפתעתם, נאלצו החוקרים להסיק שהפגם הוא בגלובין. ואמנם מאוחר יותר, נמצאה המוטאציה שבה מתקיים החילוף: $\text{His } \beta\text{E7} \rightarrow \text{Tyr}$. חילוף כזה הוא דוגמא אפיינית לקבוצה שלמה של מוטאציות, המחליפות את ההיסטידין הדיסטאלי E7, או את ההיסטידין הפרוקסימאלי F8, בשרשרת α או בשרשרת β . במקרה שלפנינו שרשרת הצד של הטירוזין מופיעה כאן כאניון הניצמד ליון הברזל Fe^{3+} , מוריד את פוטנציאל החיזור שלו ומקשה מאד על האנזים רדוקטאז, האמור לחזר אותו ל- Fe^{2+} . להמוגלובין הזה ניתן השם הכולל המוגלובין M (M - בעבור מט).

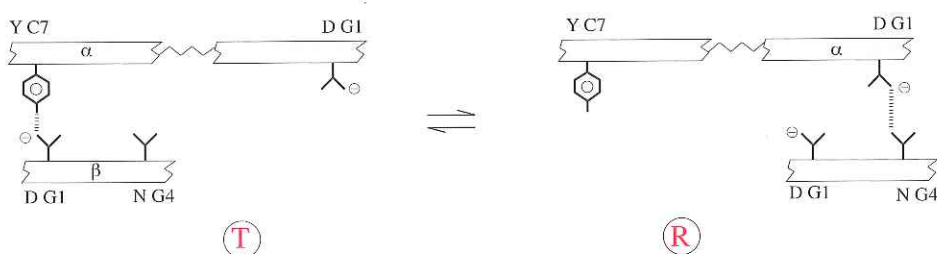
עד כה התגלו כבר מאות המוגלובינים שיש בהם מוטאציות. רובן מוטאציות נקודתיות, שבהן מתחלפת חומצה אמינית אחת באחרת. (יש גם מוטאציות של חסר או תוספת של חומצה אמינית אחת או יותר). חלקן נבדקו בגלל שהן גורמות למחלות הקשורות בכושר לשאת חמצן (כפי שראינו למעלה), או ביציבות הטראמר ורגישותו למצבי דנאטורציה, והאנשים הנושאים אותן נזקקים לבדיקות ולטיפולים. ויש גם מוטאציות ניטרליות, שאין להם כל השפעה על התיפקוד, שניתגלו באקראי, במהלך בדיקות סידרתיות באלקטרופורזה או בכרומטוגרפיה. ויש בודאי



תרשים סכמטי של
המוטאציה ב-HbM.

מוטאציות רבות לא מוכרות עדיין, שהתחמקו מן הבדיקות משום שאינן מזיקות כלל ואינן מטרידות את בעליהן. לא נדון כאן בכל המוטאציות המוכרות לנו, מוטאציות מן הטבע או מוטאציות מוכוונות - נסתפק לענייננו במספר דוגמאות אפיוניות.

למשל, כאלה המתייחסות למערכת קשרי-המימן הבין-שרשרתיים, המתפקדים כמו מתג דו-צדדי המשתתף בהפעלת המעבר מ-T ל-R. אך הואיל ובכל מצב, T או R, מצויה מערכת שונה של קשרי מימן, תהייה כל הפרעה לאחד הקשרים האלה במצב נתון, מתן יתרון למצב האחר והטיית שווי המשקל לטובתו:



בהמוגלובין קנזאס (Kensas), שבו $\text{Asn } \beta\text{G4} \rightarrow \text{Thr}$, נפגם קשר המימן ב-R ושווי המשקל נוטה יותר ל-T, ולפיכך קטנה הזיקה לחמצן. (השם הפרטי של ההמוגלובין החולה, ניתן לו לפי שם המקום, בו זוהתה המוטאציה לראשונה). בהמוגלובין קמפסי (Kempsey), שבו $\text{Asp } \beta\text{G1} \rightarrow \text{Asn}$, נפגמת יציבות T ושווי המשקל נוטה יותר ל-R, וכך גדלה הזיקה לחמצן.



מהי השפעת המוטאציות הבאות על הזיקה לחמצן?

א. בהמוגלובין הלסינקי (Helsinki)

$\text{Lys } \beta \text{ EF6} \rightarrow \text{Met}$

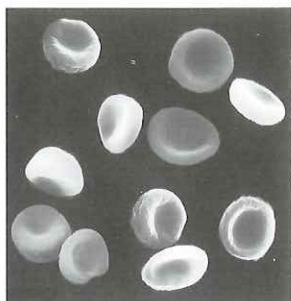
(רמז: בדוק את קשרי DPG עם שרשרות β).

ב. בהמוגלובין הירושימה (Hiroshima):

$\text{His } \beta \text{ HC3} \rightarrow \text{Asp}$

(רמז: בדוק את הקשרים היוניים בדאוקסיהמוגלובין).

ג. אנמיה חרמשית
Sickle-cell anemia



השוואה בין תאי-דם אדומים
נורמליים (כדוריים-פחוסים)
לבין תאי-דם אדומים פגומים
(חרמשיים) התמונות צולמו
במיקרוסקופ אלקטרוני סורק
בהגדלה פי 1,450 (באדיבות
פרופ' אלן ברבי. צילמה ארנה יגר).

מוטאציות על-פני המולקולה בהמוגלובין בדרך כלל אינן מזיקות. ההמוגלובין של האנמיה החרמשית הוא כאן יוצא מן הכלל באופן בולט, שראוי לבחון אותו.

האנמיה החרמשית היא מחלה תורשתית, שמקורה במרכז אפריקה ומערבה. היא זוהתה לראשונה ב-1904, בסטודנט כושי בשיקאגו, שסבל מאנמיה חריפה. בדיקה מיקרוסקופית של תאי הדם האדומים שלו, גילתה בהם הופעה בלתי רגילה: לרבים מהם היתה צורה מעוותת, חרמשית. מכאן השם: אנמיה חרמשית. תאי הדם החרמשיים נלכדים בנימי הדם הזעירים מבלי יכולת לעבור אותם, וכך הם גורמים לנזקים חמורים לרקמות, בעיקר בעצמות ובכליות. תאים חרמשיים אלה אינם יציבים, הם מתפרקים בנקל ומשך חייהם קצר. הירידה במספר תאי הדם ותיפקודם הלקוי של הנותרים, הם הסיבה לאנמיה החריפה וללקויים במערכת הולכת החמצן.

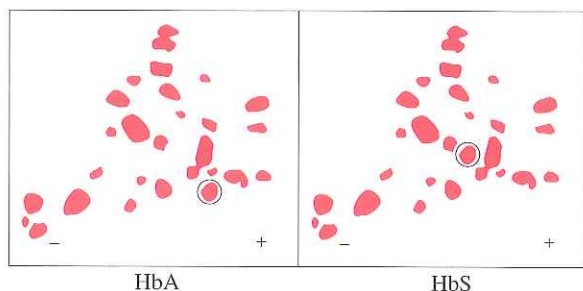
בדיקה מעבדתית של תאי הדם האלה הראתה, שעיוות הצורה מתרחש בתנאים של חסר חמצן בנימי הדם ברקמות. מסיסתו של הדאוקסיהמוגלובין יורדת במידה דרמטית, והוא שוקע כסיבים, הגורמים לשינוי בצורת התאים. היה זה פאולינג מודענו, שקבע לראשונה, לפני כחמישים שנה, שיש לנו כאן ענין עם "מולקולה חולה"; כלומר - המוגלובין פגום, שזכה בשם: המוגלובין S (HbS).

פאולינג בחן, בעזרת אלקטרופורזה, את ההבדלים בין HbA הנורמאלי ו-HbS, ומצא שהנקודה האיזואלקטרית של HbS גבוהה יותר משל HbA:

הנקודה האיזואלקטרית			
Δ	S	A	
0.22	7.09	6.87	דאוקסי
0.23	6.91	6.68	אוקסי

ההבדל המדויק התברר ב-1954, כשבדקו כרומטוגרם דו-מימדי של המוגלובין שטופל בטרופסין. בצמד $\alpha\beta$ יש 27 פעמים לזיון + ארגינין, ולכן מתקבלים 28 מקטעים

פפטידיים. הכרומטוגרם התקבל על-ידי אלקטרופורזה בכיוון אחד וכרומטוגרפיה בכיוון הניצב, והוא נחשב ל"טביעת האצבעות" של ההמוגלובין.

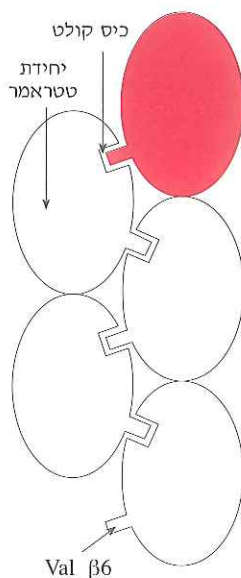


השוואה בין טביעת האצבעות של המוגלובין A והמוגלובין S. מיקומו של הפפטיד השונה בין השניים מצויין בעגול.

כשמשווים את "טביעת האצבעות" של HbA לזו של HbS, רואים שכל הפפטידים שווים, פרט לאחד! זהו הפפטיד של קצה N של שרשרת β שניבדק ונימצא, שיש בו חילוף של חומצה אמינית אחת, בעמדה 6:

β HbA:	Val	His	Leu	Thr	Pro	Glu	Glu	Lys
β HbS:	Val	His	Leu	Thr	Pro	Val	Glu	Lys

העמדה 6, (שהיא $\beta 3$), מצויה בפינת הטטראמר, כלפי חוץ. הופעת שרשרת צד ההידרופובית של ואלין יוצרת כאן מעין "נקודת דביקה" זמינה להצמדה ההידרופובית מתאימה. לרוע המזל, אמנם מצוי על פני המולקולה, במקום אחר, אתר קישור מתאים: כיס ההידרופובי בפינת סליל F של שרשרת β . הכיס הזה מרופד בקרקעיתו ב-Phe 85 וב-Leu 88, הקולטים את שרשרת הצד של הוואלין. כך נוצרת הצמדה ההידרופובית בין β Val 6 של מולקולה אחת לבין פינת F של β של מולקולה אחרת, והטטראמרים מתלכדים לסיבים ארוכים, המעוותים את צורת התאים. כך בדאוקסיהמוגלובין. ואילו באוקסיהמוגלובין, תנועת סליל F, שכבר דברנו עליה, מושכת את Phe 85, שהוא $\beta F1$, לכיוון מרכז המולקולה, ומרחיקה אותו מן הוואלין. הקשר בין הטטראמרים ניתק והסיבים מתמוססים. כשנוצר שוב הדאוקסיהמוגלובין, ברקמות, חוזר ה-Phe 85 למקומו בכיס

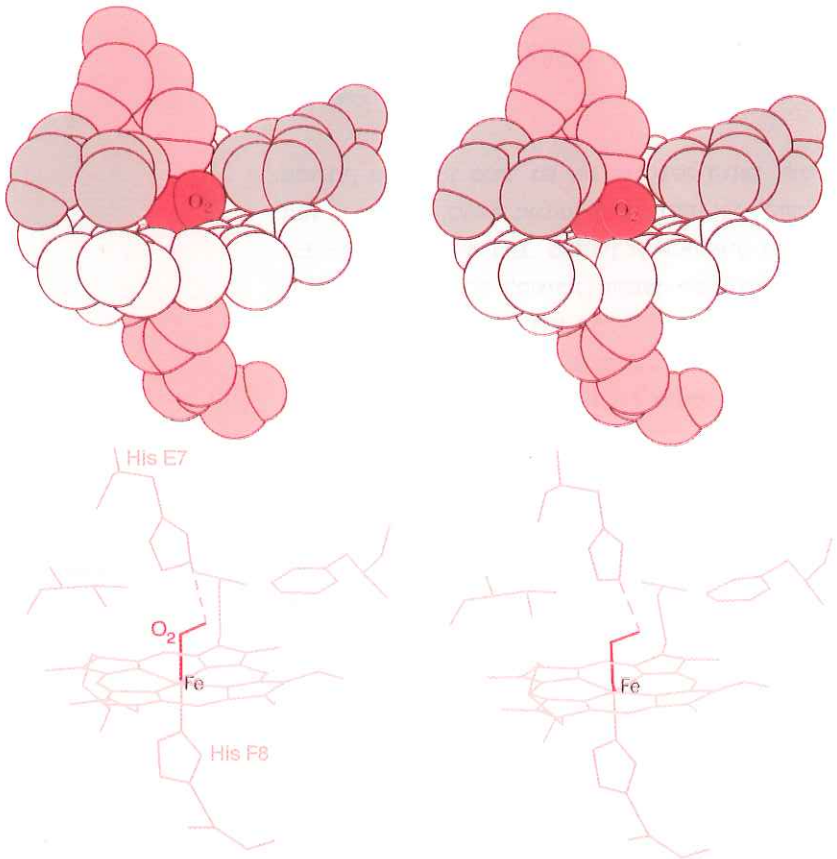


תרשים סכימטי של הצמדה ההידרופובית ביצירת סיבי המוגלובין s.

ההידרופובי, מוכן ומזומן לקלוט את שרשרת הצד של
הואלין, וליצור שנית את הסיבים הקטלניים.

**ד. מוטאציות מוכוונות
בהמוגלובין**

ענין מיוחד עוררו לאחרונה מוטאציות המשפיעות על כשרו
של ההמוגלובין להבחין בין O_2 ל- CO : שתי מולקולות
דומות בגודל ובצורה, אך שונות בהערכות האלקטרונית.



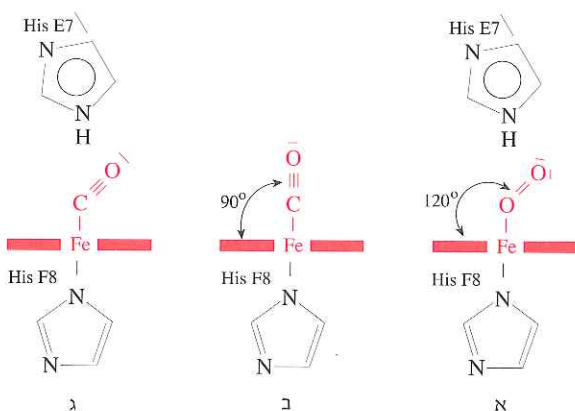
איור סטראוסקופי של מושב מולקולת החמצן במיוגלובין.
למעלה: מודל ממלא נפח. למטה: מודל שלד. הקו הקטוע מסמן את קשר המימן בין
ההיסטידין הדיסטאלי ומולקולת החמצן.
(על פי phillips, J.M.B, 1980)

יון הברזל Fe^{2+} קושר חמצן גם כשהוא נתון בתוך הם חפשי (ללא גלובין), אך הוא סובל משתי מגרעות המונעות ממנו לתפקד כהלכה במערכת הביולוגית.

האחת כבר ידועה לנו: יון הברזל מחומצן במהירות ל- Fe^{3+} שאינו יכול יותר לקשור חמצן באופן הפיך, כי מולקולת מים מתיישבת במקומו; וגם הפתרון כבר ידוע לנו.

והשניה: יון הברזל אינו יכול להתגונן מהפחמן החד-חמצני, שקבוע שווי-המשקל בתגובת הקשר איתו גדול אלפי מונים מזה של הקשר עם החמצן. וזה ענין חשוב, כי CO נוצר בגוף – פרדוקסלית – בתהליך פרוק ההם עצמו, כשהוא משתחרר במהלך ההתמוססות הסדירה של תאי הדם האדומים.

מסתבר, שהגלובין פותר גם את המכשלה הזאת. לומדים זאת כשמחליפים בעזרת מוטאציות מוכוונות, את ההיסטידין E7 או את הוואלין E11, בגליצין או באלאנין, ומוצאים, שקבוע שווי המשקל לקשירת החמצן קטן וקבוע שוויו המשקל לקשירת ה-CO גדל, וכשר ההבחנה בין השניים ניפגם לטובת ה-CO ולרעת ההמוגלובין. קשירת החמצן נחלשת משום שחסרה התמיכה של ההיסטידין E7. אך מדוע מתחזקת קשירת ה-CO?



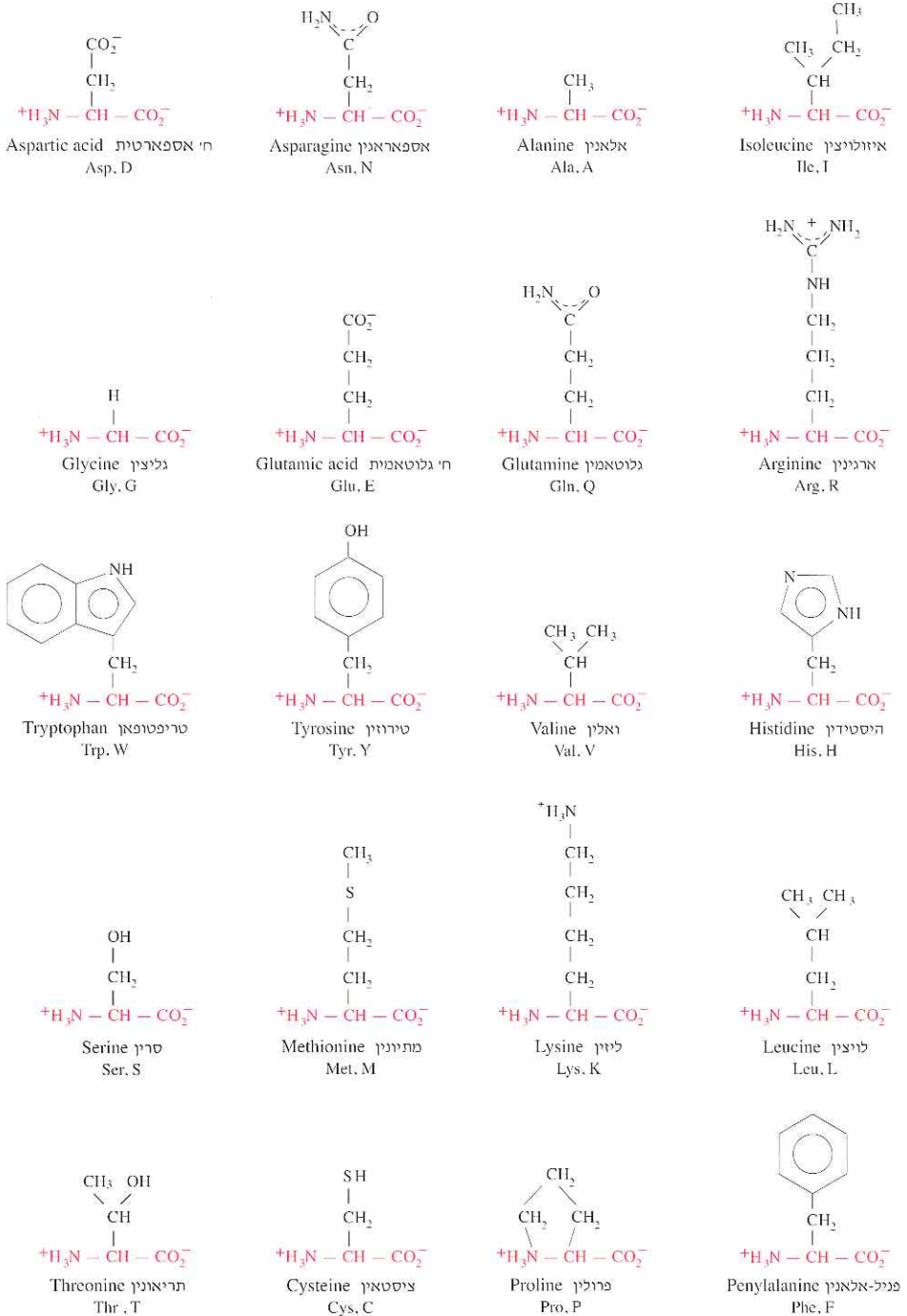
תרשים הגיאומטריה של מושב מולקולת החמצן ומולקולת CO על מישור ההם.

במודל של הם חפשי, כשאין הפרעה מרחבית, נקשרת מולקולת החמצן ליון הברזל בזווית מתאימה של 120° בקשר Fe-O-O, כמתבקש ממודל דחית זוגות האלקטרונים; ואילו מולקולת ה-CO, על פי אותו מודל, אמורה ליצור בקשר Fe-C-O צורה קווית. אלא ששרשרות הצד של E7 ו-EI1 בכיס ההם, במיוגלובין ובהמוגלובין, בנויות כך, שהן מתאימות בסדור המרחבי לזווית הקישור של מולקולת החמצן דווקא; ואם נידחת לכאן מולקולת ה-CO, היא נאלצת לחרוג מהקו הישר ולהסתגל לזווית הכפויה עליה, במחיר ירידה ניכרת בחוזק הקשר איתה.

הנה כי כן, מעיד פרוץ: "האבולוציה היא כימאית מבריקה".

נספח א

נוסחות החומצות האמיניות, המתאימות לתמיסה מימית, $pH = 7$, עם קודים של שלוש אותיות ואות אחת. הסדר נתון לפי הא"ב.



בגלל "סיבות הסטוריות" קיימים הבדלים קלים בסימון הסלילי במיוגלובין ובהמוגלובין. אנו, כאן, "התיישרנו" לפי סימון אחיד לשניהם.

הסימון הסלילי	מיוגלובין	ה מ ו ג ל ו ב י ן		
		α	β	γ
NA1	1 V	1 V	1 V	1 G
NA2	—	—	2 H	2 H
NA3	2 L	2 L	3 L	3 F
A1	3 S	3 S	4 T	4 T
A2	4 E	4 P	5 P	5 E
A3	5 G	5 A	6 E	6 E
A4	6 E	6 D	7 E	7 D
A5	7 W	7 K	8 K	8 K
A6	8 Q	8 T	9 S	9 A
A7	9 L	9 N	10 A	10 T
A8	10 V	10 V	11 V	11 I
A9	11 L	11 K	12 T	12 T
A10	12 H	12 A	13 A	13 S
A11	13 V	13 A	14 L	14 L
A12	14 W	14 W	15 W	15 W
A13	15 A	15 G	16 G	16 G
A14	16 K	16 K	17 K	17 K
A15	17 V	17 V	18 V	18 V
A16	18 E	18 G	—	—
AB1	19 A	19 A	—	—
B1	20 D	20 H	19 N	19 N
B2	21 V	21 A	20 V	20 V
B3	22 A	22 G	21 D	21 E
B4	23 G	23 E	22 E	22 D
B5	24 H	24 Y	23 V	23 A
B6	25 G	25 G	24 G	24 G
B7	26 Q	26 A	25 G	25 G
B8	27 D	27 E	26 E	26 E

הסימון הסלילי	מיוגלובין	המוגלובין			
		α	β	γ	
B9	28 I	28 A	27 A	27 T	
B10	29 L	29 L	28 L	28 L	
B11	30 I	30 E	29 G	29 G	
B12	31 R	31 R	30 R	30 R	
B13	32 L	32 M	31 L	31 L	
B14	33 F	33 F	32 L	32 L	
B15	34 K	34 L	33 V	33 V	
B16	35 S	35 S	34 V	34 V	
C1	36 H	36 F	35 Y	35 Y	
C2	37 P	37 P	36 P	36 P	
C3	38 E	38 T	37 W	37 W	
C4	39 T	39 T	38 T	38 T	
C5	40 L	40 K	39 Q	39 Q	
C6	41 E	41 T	40 R	40 R	
C7	42 K	42 Y	41 F	41 F	
CD1	43 F	43 F	42 F	42 F	
CD2	44 D	44 P	43 E	43 D	
CD3	45 R	45 H	44 S	44 S	
CD4	46 F	46 F	45 F	45 F	
CD5	47 K	47 D	46 G	46 G	
CD6	48 H	–	47 D	47 D	
CD7	49 L	48 L	48 L	48 L	
CD8	50 K	49 S	49 S	49 S	
D1	51 T	–	50 T	50 S	
D2	52 E	–	51 P	51 A	
D3	53 A	–	52 D	52 S	
D4	54 E	–	53 A	53 A	
D5	55 M	–	54 V	54 I	
D6	56 K	50 H	55 M	55 M	
D7	57 A	51 G	56 G	56 G	
E1	58 S	52 S	57 N	57 N	
E2	59 E	53 A	58 P	58 P	
E3	60 D	54 Q	59 K	59 K	
E4	61 L	55 V	60 V	60 V	
E5	62 K	56 K	61 K	61 K	
E6	63 K	57 G	62 A	62 A	
E7	64 H	58 H	63 H	63 H	
E8	65 G	59 G	64 G	64 G	
E9	66 V	60 K	65 K	65 K	

הסימון הסלילי	מיוגלובין	ה מ ו ג ל ו ב י ן		
		α	β	γ
E10	67 T	61 K	66 K	66 K
E11	68 V	62 V	67 V	67 V
E12	69 L	63 A	68 L	68 L
E13	70 T	64 D	69 G	69 T
E14	71 A	65 A	70 A	70 S
E15	72 L	66 L	71 F	71 L
E16	73 G	67 T	72 S	72 G
E17	74 A	68 N	73 D	73 D
E18	75 I	69 A	74 G	74 A
E19	76 L	70 V	75 L	75 I
E20	77 K	71 A	76 A	76 K
EF1	78 K	72 H	77 H	77 H
EF2	79 K	73 V	78 L	78 L
EF3	80 G	74 D	79 D	79 D
EF4	81 H	75 D	80 N	80 D
EF5	82 H	76 M	81 L	81 L
EF6	83 E	77 P	82 K	82 K
EF7	84 A	78 N	83 G	83 G
EF8	85 E	79 A	84 T	84 T
F1	86 L	80 L	85 F	85 F
F2	87 K	81 S	86 A	86 A
F3	88 P	82 A	87 T	87 Q
F4	89 L	83 L	88 L	88 L
F5	90 A	84 S	89 S	89 S
F6	91 Q	85 D	90 E	90 E
F7	92 S	86 L	91 L	91 L
F8	93 H	87 H	92 H	92 H
F9	94 A	88 A	93 C	93 C
F10	95 T	—	—	—
FG1	96 K	89 H	94 D	94 D
FG2	97 H	90 K	95 K	95 K
FG3	98 K	91 L	96 L	96 L
FG4	99 I	92 R	97 H	97 H
FG5	—	93 V	98 V	98 V
G1	100 P	94 D	99 D	99 D
G2	101 I	95 P	100 P	100 P
G3	102 K	96 V	101 E	101 E
G4	103 T	97 N	102 N	102 N
G5	104 L	98 F	103 F	103 F

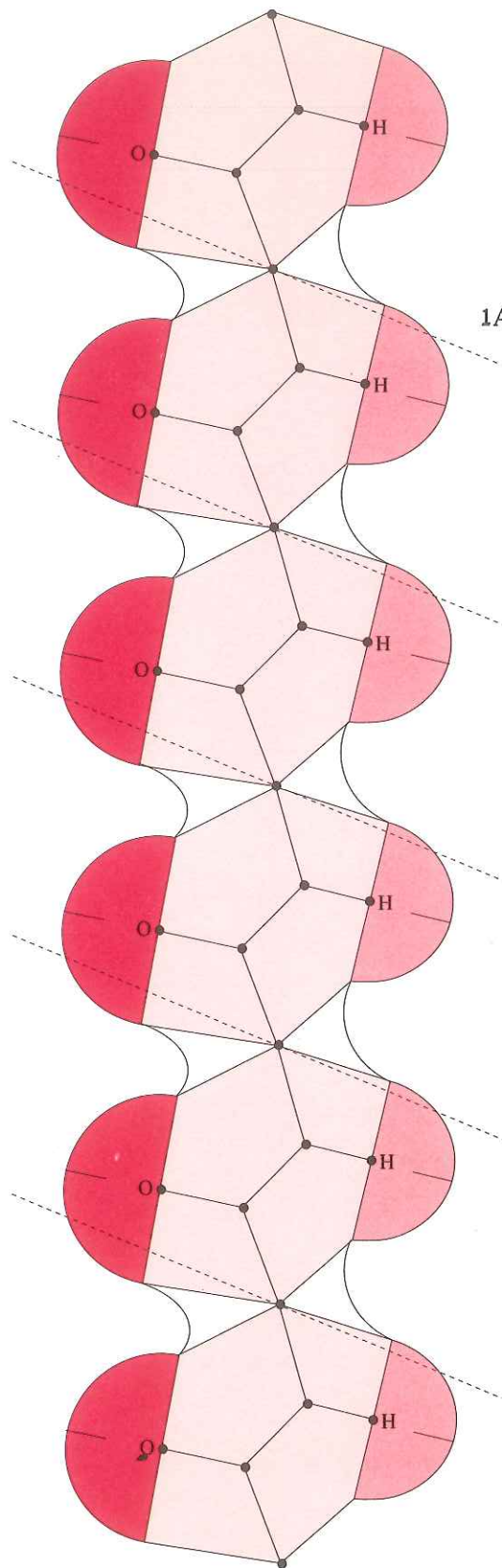
הסימון הסלילי	מיוגלובין	ה מ ו ג ל ו ב ין			
		α	β	γ	
G6	105 E	99 K	104 R	104 K	
G7	106 F	100 L	105 L	105 L	
G8	107 I	101 L	106 L	106 L	
G9	108 S	102 S	107 G	107 G	
G10	109 E	103 H	108 N	108 N	
G11	110 A	104 C	109 V	109 V	
G12	111 I	105 L	110 L	110 L	
G13	112 I	106 L	111 V	111 V	
G14	113 H	107 V	112 C	112 T	
G15	114 V	108 T	113 V	113 V	
G16	115 L	109 L	114 L	114 L	
G17	116 H	110 A	115 A	115 A	
G18	117 S	111 A	116 H	116 I	
G19	118 R	112 H	117 H	117 H	
GH1	119 H	113 L	118 F	118 F	
GH2	120 P	114 P	119 G	119 G	
GH3	121 G	115 A	120 K	120 K	
GH4	122 D	116 E	121 E	121 E	
GH5	123 F	117 F	122 F	122 F	
H1	124 G	118 T	123 T	123 T	
H2	125 A	119 P	124 P	124 P	
H3	126 D	120 A	125 P	125 E	
H4	127 A	121 V	126 V	126 V	
H5	128 Q	122 H	127 Q	127 Q	
H6	129 G	123 A	128 A	128 A	
H7	130 A	124 S	129 A	129 S	
H8	131 M	125 L	130 Y	130 W	
H9	132 N	126 D	131 Q	131 Q	
H10	133 K	127 K	132 K	132 K	
H11	134 A	128 F	133 V	133 M	
H12	135 L	129 L	134 V	134 V	
H13	136 E	130 A	135 A	135 T	
H14	137 L	131 S	136 G	136 G	
H15	138 F	132 V	137 V	137 V	
H16	139 R	133 S	138 A	138 A	
H17	140 K	134 T	139 N	139 S	
H18	141 D	135 V	140 A	140 A	
H19	142 I	136 L	141 L	141 L	

הסימון הסלילי	מיוגלובין		ה מוגלובין					
			α		β		γ	
H20	143	A	137	T	142	A	142	S
H21	144	A	138	S	143	H	143	S
H22	145	K	—		—		—	
H23	146	Y	—		—		—	
H24	147	K	—		—		—	
H25	148	E	—		—		—	
H26	149	L	—		—		—	
HC1	150	G	139	K	144	K	144	R
HC2	151	Y	140	Y	145	Y	145	Y
HC3	152	Q	141	R	146	H	146	H
HC4	153	G	—		—		—	

נספח ג

מודל נייר לסליל אלפא

קנה מידה : 1 ס"מ = $1\text{\AA}$



נספח ד

מודל נייר למשטח קפלים

קנה מידה : 1 ס"מ = $1\text{\AA}$

