

תקציר

ריכוזם של יוני הנחושת בתא נשמר בקפדנות על ידי חלבונים מיוחדים הנקראים צ'פרוני נחושת ותפקידם להעביר את יוני הנחושת (במצב חימצון $+1$) למספר מקומות ייעודיים בתא. החלבונים הללו כוללים רצף שמור (MXCXXC) הקושר יוני נחושת ביעילות ובבררנות. בד בבד הצ'פרונים מאפשרים שחרור של הנחושת לחלבוני מטרה, גם אלו לרוב מכילים את הרצף השמור. הצ'פרונים קושרים את יון הנחושת דרך שתי חומצות הציסטאין השמורות, במספר קואורדינציה נמוך של 2 או 3, כאשר קישור ל-3 נובע מקשירה אפשרית של ליגנד גופריתית חיצוני.

על מנת להבין את תהליכי הובלת הנחושת בתא, יש להבין היטב את מספר הקואורדינציה בו נקשר יון הנחושת. בעבודה הנוכחית ייסדנו שיטה חישובית המאפשרת ללמוד על מספר הקואורדינציה של הנחושת בצ'פרון תוך התמקדות בסביבת הקישור הייחודית של אחד מן הצ'פרונים האנושיים, Atox1.

פתחנו בחיפוש אחר שיטה חישובית המסוגלת לחזות את מספר הקואורדינציה של יון הנחושת במספר קומפלקסים קטנים, המכילים ליגנדים גופריתיים, עבורם מספר הקואורדינציה הוגדר ניסיונית. השתמשנו בתורת פונקציונל הצפיפות (DFT) ובחנו מספר פונקציונליים כמו גם סטים בסיסיים רבים. הראנו כי רוב רמות החישוב אינן מסוגלות לחזות נכונה את מספר הקואורדינציה, אך כולן עוקבות אחר המגמה שנצפתה ניסיונית, לפיה ככל שהליגנד נפחי יותר, כך קטנה נטייתו למספר קואורדינציה של 2. מצאנו כי סט הבסיס הקטן יחסית $m6-31+G^*$, מייצג פשרה טובה בין דיוק ויעילות. עוד הסקנו כי ערכי אנרגיה מוחלטים יחושבו נכון רק בהוספת תיקונים לאינטראקציות לא קושרות מסוג ואן דר ואלס, שלרוב אינן כלולות בפונקציונלים הנמצאים בשימוש תדיר.

בנוסף, פירקנו את אנרגיית הקישור למרכיביה ובחנו את התרומה של כל מרכיב לאנרגיה הכוללת. הראנו כי קומפלקסים בעלי העדפה למספר קואורדינציה שונה, ייוצבו אנרגטית על ידי מרכיבים שונים.

לאחר מכן השתמשנו ברמת החישוב המוצעת בתוך חישוב המשלב שיטות QM (Quantum Mechanics) ו MM (Molecular Mechanics) על מנת ללמוד על מספר הקואורדינציה של הנחושת בחלבון Atox1. מאחר והמרחב הקונפורמציוני הגדול בחלבון אינו מאפשר שימוש בשיטה ישירה כפי שנעשה עבור הקומפלקסים הקטנים, השתמשנו במעגלים תרמו דינמיים ובגישה LRA (Linear response approximation).

המבנה הניסיוני של החלבון Atox1 מורכב מאוסף של שלושים מבנים. חישוב של מספר הקואורדינציה המועדף עבור מבנים שונים מתוך האוסף הראה כי ניתן לחלק את האוסף כולו לשתי תת קבוצות, המראות העדפה שונה למספר הקואורדינציה. ניתוח מבני של האוסף מורה כי שתי הקבוצות נבדלות זו מזו במיקומה של אחת מן הציסטאינים השמורות. בקבוצת הקונפורמרים האחת, אותה הגדרנו כ"חיצונית", הציסטאין חשופה למסמכת וכתוצאה מכך הנחושת יחסית קבורה. בקבוצת הקונפורמרים השניה, אותה הגדרנו כ"פנימית", הציסטאין דווקא

קבורה יחסית, לכן הנחושת חשופה לממס. מצאנו כי קבוצת הקונפורמים ה"חיצונית" מראה העדפה ברורה למספר קואורדינציה של 2, בעוד קבוצת הקונפורמים ה"פנימית" מראה העדפה למספר קואורדינציה של 3.

בהתבסס על התוצאות הללו, הצענו מנגנון העברה והגנה ייחודי לחלבון Atox1. החלבון משתמש באסטרטגיה המשלבת את שתי הקונפורמציות, על מנת להגן על הנחושת מליגנדים מכילי גופרית הנמצאים בסביבת התא (קונפורמציה "חיצונית") מצד אחד, אך לאפשר העברה יעילה של הנחושת לחלבוני המטרה (קונפורמציה "פנימית"), מצד שני.

זאת ועוד, על מנת להעריך תכונות מבניות של צ'פרונים, ניתן להשתמש במודלים פפטידיים המכילים רצף דומה לזה הקיים באזור קושר הנחושת בחלבון. אחד מן המודלים הפפטידיים הללו נגזר מן החלבון Atox1 (הומולוג קרוב של Atox1 הקיים בשמר) ומורכב מן הרצף המעגלי MTCGCSRPG. התוצאות הניסיוניות המפתיעות הראו כי תחת תנאי pH חומציים וניטרליים, הנחושת נקשרת לפפטיד דרך החומצות מתיונין וציסטאין, ולא דרך שתי ציסטאינים, כמקובל. לעומת זאת, בתנאי pH בסיסיים, סביבת הקישור נותרה מעורפלת. על כן הוצע כי לתנאי ה pH ישנה השפעה על מנגנון הקשירה וההעברה של הנחושת.

על מנת לבחון הצעה מעניינת זו, פתחנו באשרור התוצאות הניסיוניות מבחינה חישובית. הראנו כי ניתן לחזות את התוצאות המפתיעות הנוגעות לסביבה חומצית וניטרלית. עוד הראנו כי בסביבה בסיסית הקישור המסורתי של הנחושת לשתי ציסטאינים נשמר. לאחר מכן עברנו לסביבה החלבונית והראנו כי גם בה, קישור הנחושת עלול להיות מושפע מסביבת ה pH, באם המתיונין, שבדרך קבע מהווה חלק מהליבה ההידרופובית של החלבון, תפנה לכוון הנחושת. בנוסף, חישובנו את פרופיל האנרגיה לתגובה בה מתיונין מחליפה ציסטאין בקשירת הנחושת בחלבון Atox1. הראנו כי התגובה מועדפת בתנאי pH חומציים ולכן הסקנו כי בתנאים דומים בתא, מתיונין יכולה לשמש כליגנד לנחושת, על מנת להגן עליה.

לבסוף, כדי ללמוד על שיווי המשקל של הנחושת בתא, ישנו צורך בחישובים (סנסורים) רגישים, המאפשרים לעקוב אחר ריכוזה. חיישנים כאלו המבוססים על שיטת ה FRET (fluorescence resonance energy transfer), מורכבים משני חלבונים פלואורסנטיים, acceptor ו donor, המסוגלים להעביר אנרגיה מהאחד לשני. יעילותה של שיטה זו תלויה במשתנה כיווני, הנקרא k^2 , התלוי בכיוונו של מומנטי דיפול המעבר (transition dipole moment - TDM) של החלבונים המשתתפים בתהליך העברת האנרגיה. למרות האמור לעיל, k^2 אינו נלקח בחשבון כאשר מתכננים ומסנתזים חיישנים, משום שכיווני ה TDM של מרבית החלבונים הפלואורסנטיים אינם ידועים.

הראנו כי כיוון המומנט נגזר ממערכת ה π של הפלואורופור וניתן לחשבו בצורה מדויקת יחסית כבר בפאזה הגזית. חישובנו את כיוונו של מומנט דיפול המעבר עבור חלבונים פלואורסנטיים רבים הנמצאים בשימוש. זאת ועוד, גזרנו כלל אצבע המסייע למציאת כיוונו של הדיפול גם עבור חלבונים פלואורסנטיים שאינם כלולים ברשימה שלנו. הכלל מורה כי הכיוון ניתן להערכה על ידי הציר הארוך של המולקולה, המייצג את אחד הווקטורים העצמיים של הקוודרופול הגרעיני של המערכת המצומדת.