



פפטידים אנטי מיקרוביאליים לעצירת תגובה דלקתית לא מבוקרת עיצובים ברמת החלקיקים

רונית פיס דוד, מורה ורכזת כימיה, תיכון עירוני א' ת"א ומורה לכימיה בתיכון מקיף י"ב, המעיין ראשל"צ
לידיה ליבוב, מורה לכימיה, תיכון נווה גן ע"ש יצחק שמיר

(Rushton, Lotter, & Singer, 2011) - כיוון שתפיסות שלהם לגבי השאלות - מהו ידע? ומהו מחקר מדעי? - משתנות אף הן. לפיכך ספקטרום התלמידים שיהיו מן ההתפתחות המקצועית של המורים שייקחו חלק בפרויקט הינו רחב. הוראת הכימיה מתבצעת ע"י קבוצת מורים איכותית אך בוגרת ברוכה, ולכן רחוקה כ-20 שנה ממעבדות המחקר ומחזית המחקר. שכבת מורים זו כמהה לקשר עם מעבדות המחקר, והחיבור החדש הזה משדרג את המורים בצורה משמעותית. היכרות עם שיטות מחקר חדשות מכשור מתקדם המאפשר צפייה באטומים בודדים מולקולות והאינטראקציות ביניהם. מעקב אחר התקפלות חלבונים ניתוחים קריסטלוגרפיים ועוד. במסגרת הקורס המורים הצטרפו בזוגות למעבדת מחקר

בשנת תשע"ה התקיים במרכז מורי הכימיה הקורס "מורים לכימיה חוזרים למעבדת המחקר". הקורס הועבר בהנחייה של ד"ר רון בלונדר וד"ר שלי רפ מן המחלקה להוראת המדעים במכון ויצמן. קורס זה מהווה גישה ייחודית להכשרת מורים מובילים ולתמיכה בהתפתחות המקצועית שלהם. בספרות המחקרית המתארת דרכים שונות להתפתחות מקצועית של מורים (Loucks-Horsley, Stiles, Mundry, Love, & Hewson, 2010) ישנה התייחסות להתפתחות מקצועית של מורי מדעים דרך עבודה אותנטית במעבדות מחקר. שהייה ועבודה של מורים בתוך מעבדות מחקר פעילות, תומכת בהתפתחות המקצועית שלהם. מחקרים מראים כי גם ההוראה של מורים שמתנסים במחקר פעיל משתנה

מושגים:

אנטיגן: חומר או תאים זרים החודרים לגוף וגורמים להפעלת המערכת החיסונית נגדם.

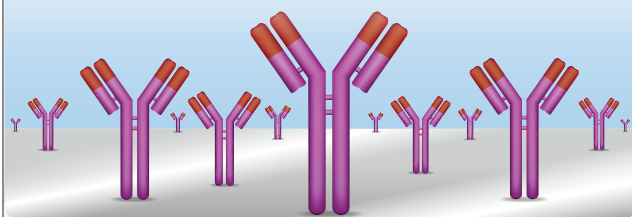
האנטיגנים יכולים להיות חיידקים, וירוסים (נגיפים), פטריות, ארס נחשים, ארס דבורים, חומרים שונים.

נוגדנים: חלבונים הנוצרים ע"י תאים במערכת בחיסון כתגובה לחדירת אנטיגנים לגוף. תפקיד הנוגדנים הוא להיקשר לאנטיגנים העלולים להזיק לגוף. חיבור הנוגדן לאנטיגן מאפשר את חיסולו של הפולש במספר דרכים.

ציטוקינים: חלבונים קטנים המקשרים בין תאי הגוף ואחראים להנעתם של תהליכים מרכזיים בתאים רבים. מכאן ניתן להבין את משמעות השם ביונית, תא - cyto, תנועה - kinos. רבים מהציטוקינים מופרשים מתאים של מערכת החיסון ופועלים על התאים שהפרישו אותם או על תאים סמוכים. הציטוקינים אינם מיוצרים כל הזמן אלא כתגובה לאנטיגן. הציטוקינים נקשרים לקולטנים יחודיים לסוג תאים מסוים אשר ממוקמים על גבי ממברנות התאים ומפעילים או מעכבים אותם. קישור ציטוקין לקולטן שלו מעורר שרשרת תגובות כימיות באמצעותה מועבר האיתות (signal) הנדרש לתגובה הביוכימית בתוך התא המופעל.

תאים בולעניים (פגוציטים): אחד ממגנני ההגנה של מערכת החיסון המולדת. הפגוציטים הם תאים המתמחים בבליעה, הרג ועיכול של מיקרואורגניזמים שונים.

דלקת: תגובה חיסונית מורכבת הנגרמת עקב זיהום או נזק לרקמה ואשר כרוכה בגיוס מגוון תאים ומולקולות של מערכת החיסון אל אתר הזיהום.



תמונה אופיינית של נוגדנים

פעילה ועסקו באחד מן המחקרים שמקיימים בה. לאחר העבודה המעשית במעבדה כתבו המורים מאמר לעלון המורים "על-כימיה" או הכינו סרטון לשימוש מורי ותלמידי הכימיה בארץ. המאמר המוצג בעלון זה הוא התוצר הראשון מן הקורס אשר מתפרסם. את המאמר "פפטידים אנטי מיקרוביאליים לעצירת תגובה חיסונית לא מבוקרת" כתבו רונית פיס דוד ולידיה ליבוב אשר השתתפו בקורס והצטרפו למעבדה של פרופ' יחיאל שי בהנחיה של הדוקטורנטית הדר כהן.

הקדמה

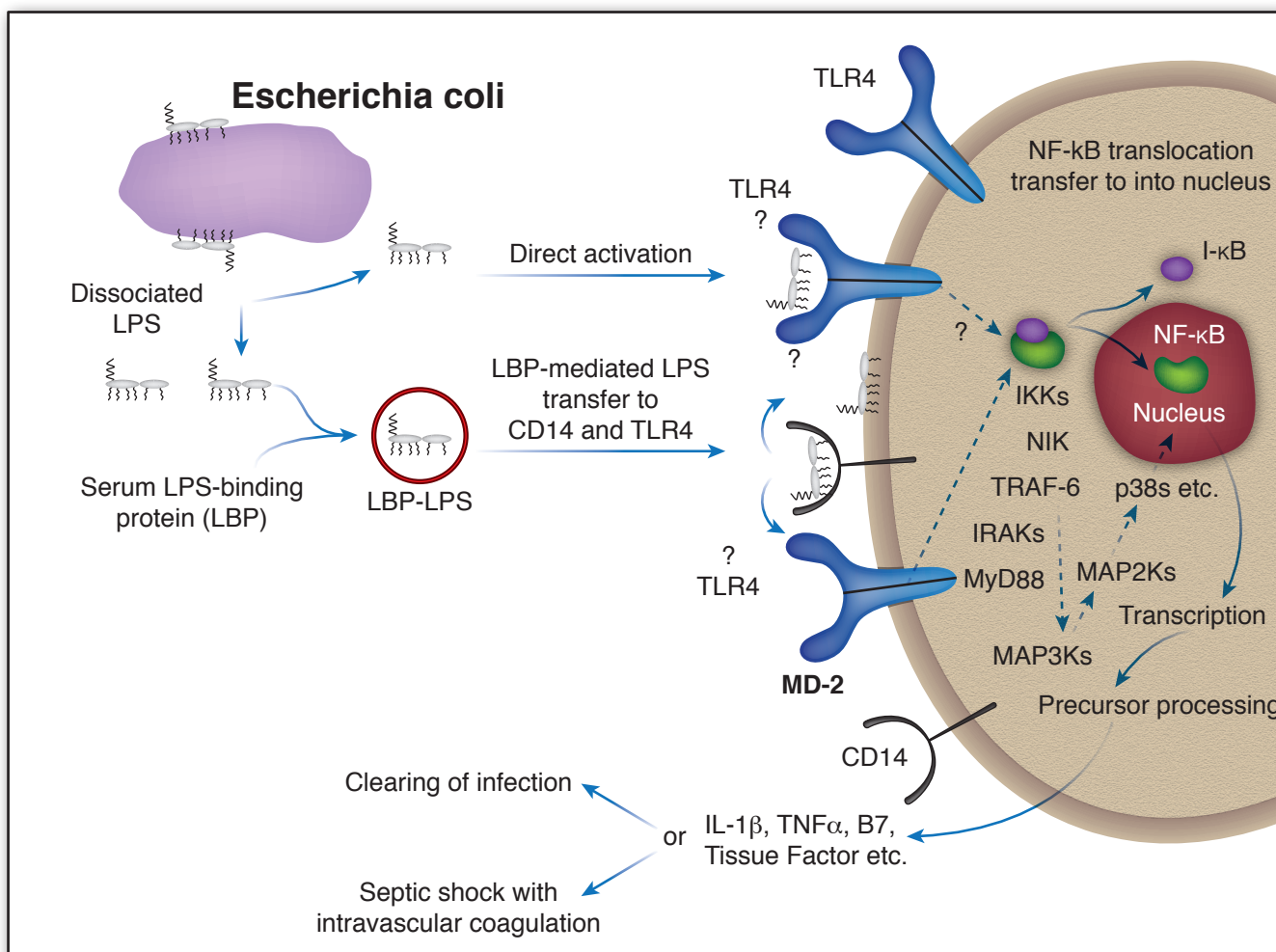
מערכת החיסון מורכבת ממכלול של תאים, רקמות ואיברים אשר עובדים יחד כדי להגן על הגוף מפני התקפה של אורגניזמים זרים, מחוללי מחלה כגון: חיידקים, וירוסים ופטריות. מערכת החיסון נחלקת למערכת החיסון המולדת ומערכת חיסון נרכשת. מערכת החיסון המולדת כוללת מחסומים פיסיקליים של העור, תאים בולעניים (פגוציטים) ותגובה דלקתית ואילו מערכת החיסון הנרכשת הינה בעלת זיכרון חיסוני וכוללת את הלימפוציטים מסוג T ו-B ואת הנוגדנים

תגובה חיסונית בלתי נשלטת

במערכת החיסון המולדת מעורב חלבון שנקרא Toll Like Receptor 4 (TLR4), אשר מאוקטב ופועל כתגובה לחשיפה לחיידקים גראם שליליים או לרעלן שהם מפרשים הנקרא LPS. ברגע שנוצר קישור בין ה-LPS ל-TLR4, יש הפרשה של חלבונים פרו דלקתיים, הנקראים ציטוקינים, זאת על מנת שיעודדו תהליך דלקתי בגוף שימגר את החיידק (איור 1). תהליך דלקתי לא מבוקר יכול לגרום להתפתחות של מחלות כגון: סכרת, סרטן, קרן וספסיס (אלח-דם).

בדרך אל הפפטיד האנטי-מיקרוביאלי

במעבדה של פרופ' יחיאל שי מסנתזים פפטידים אנטי-מיקרוביאליים בעלי יכולת הן להרוג חיידקים והן לנטרל את הרעלן, LPS ובכך להפחית את רמת הפרשת הציטוקינים הפרו-דלקתיים. תכנון רצף חומצות אמיניות הוא השלב היצירתי בפיתוח משום שישפיע על פוטנציאל הפעילות שלו והאפקט הסופי שלו. כיאה לכל תחום של עיצוב יש להתאימו לאובייקט המטרה הלא הוא LPS (ראו איור 2). המבנה כימי של LPS הינו ברור: איזור הידרופובי ליפיד A המכיל 6 שרשראות Acyl, אזור של חיבור לסוכר ומטען שלילי שמקורו מהמצאות פוספטים. הכרות עם המבנה הכימי



איור 1. תא המאוקטב כתגובה להפרשת LPS חיידקי.

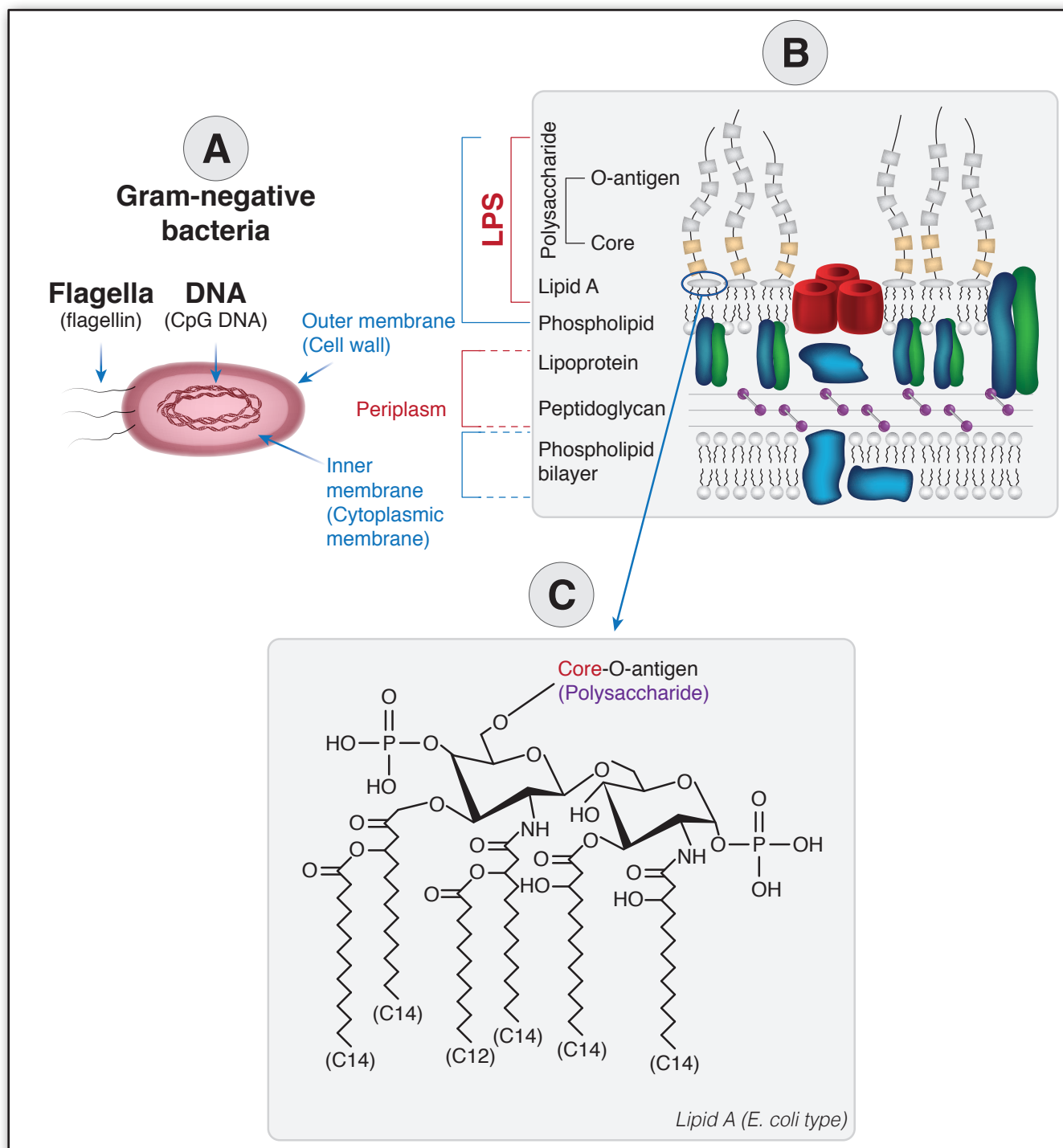
בגודל של מיקרון הנקרא רזין (resin) אשר מהווה את הפאזה המוצקה עליה יסונתז הפפטיד. על הרזין קשורה חומצה אמינית מהצד הקרבוקסילי שלה כאשר הצד האמיני מוגן בקבוצת הגנה (איור 3, A) ובשלב הראשון יש להסירה לשם התחלת התהליך (איור 3, B). כל חומצה אמינית אשר מוסיפים במהלך בניית הרצף הפפטידי מוגנת אף היא בקבוצת הגנה על הקבוצה האמינית כאשר הקצה הקרבוקסילי שלה משוחרר ופנוי לקשר (איור 3, C). החומצה האמינית המוגנת שהוכנסה נקשרת בתהליך דחיסה מהצד הקרבוקסילי שלה אל הצד האמיני של החומצה האמינית הקשורה לרזין (איור 3, D). הקשר הנוצר בין כל שתי חומצות אמיניות בתהליך הדחיסה נקרא קשר פפטידי ובמהלכו נפלטת מולקולת מים. בשלב הבא שוב יש להסיר את קבוצת ההגנה שעל הקצה האמיני של הפפטיד הקשור לרזין כדי לאפשר התארכותו וחוזר חלילה. הסרת קבוצת ההגנה נעשית בהדרגה לאורך כל

מובילה לכך שהעיצוב של מולקולות לנטרול יהיה בעל אופי הידרופובי מחד ומאיך טעון חיובי וכל זאת על מנת להיקשר למולקולות ה-LPS ובכך לנטרל את הפעולות שלו ולשמש כמעכב תחרותי. תכנון רצף חומצות אמיניות הוא השלב היצירתי בפיתוח משום שישפיע בין היתר על האפשרות של הפפטיד להתקפל עם יצירתו דבר שממנו מנסים להימנע.

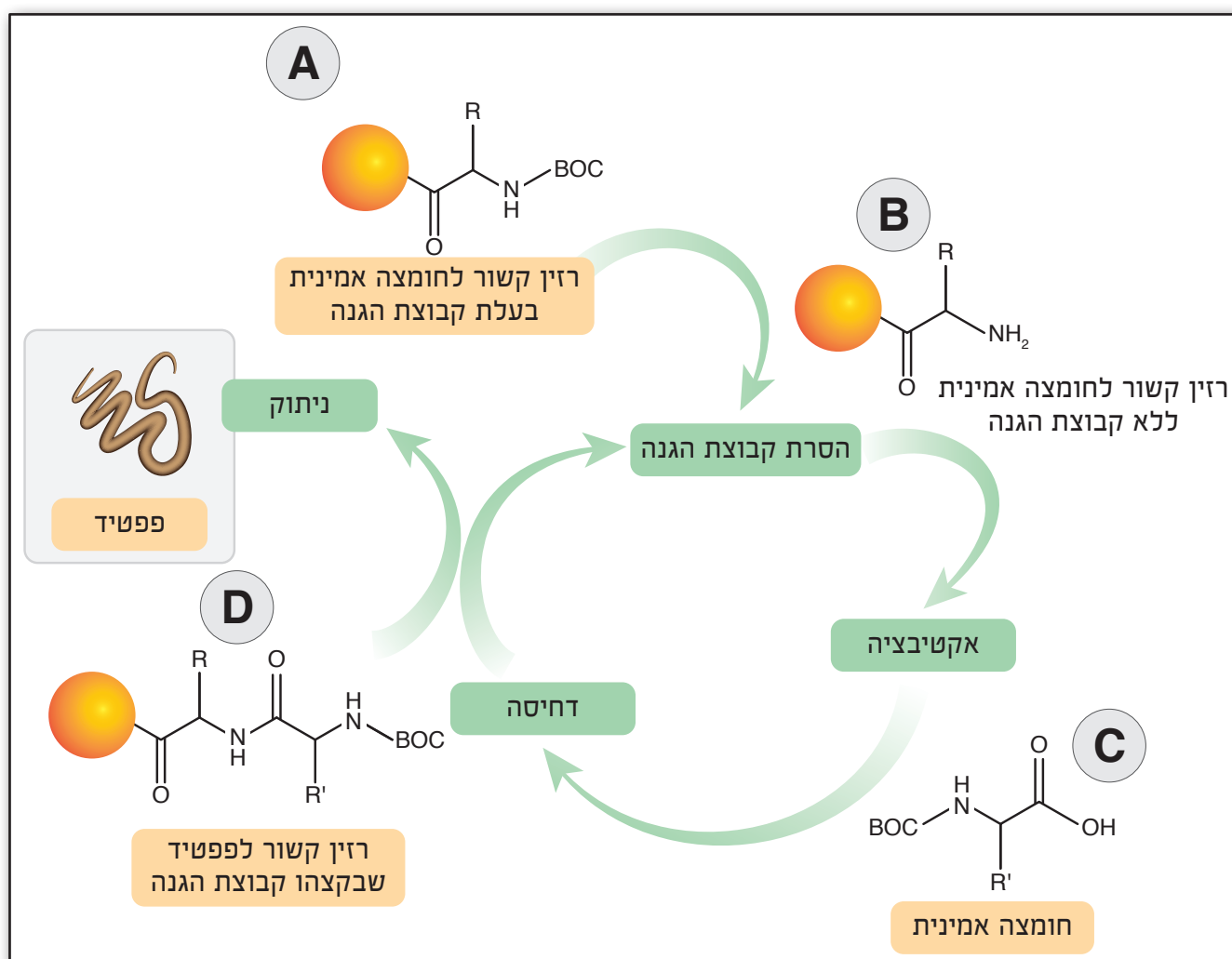
מחשיבה לסיתזה

סיתוזת הפפטידים במעבדה נעשית על מצע מוצק בשיטת SPPS (Solid-phase peptide synthesis) והינה בעלת ניצולת גבוהה יחסית. שיטה זו פותחה על ידי רוברט ברוס מריפילד בשנת 1963 (זכה על כך בפרס נובל בשנת 1984). באיור 3 השיטה מתוארת באופן סכמתי.

ה"עוגן" ממנו מתחיל תהליך הפילמור הוא חלקיק פולימרי



איור 2. (A) מבנה חידק גראם שלילי. (B) מבנה ממברנה של חידק גראם שלילי מורכבת משתי שכבות פוספוליפידיות. בחלק החיצוני של הממברנה יש מולקולות LPS אשר "שקועות" כאשר ה"זנב" הפוליסכרידי מופנה כלפי חוץ. יש אזור בפרי פלזמה שמורכב מפפטידוגליקן זה שמבדיל בין גראם חיובי לשלילי. חידקים עם שכבה מסיבית וגדולה של מפפטידוגליקן מכונים גראם חיוביים משום שנצבעים בצבעת גראם ואלו המכילים שכבה דקה של פפטידוגליקן מכונים גראם שליליים כמו החידק המוכר *E. coli*. (C) אזור הליפיד A של מולקולת LPS.



איור 3. שלבים בסינתזת הפפטיד על מצע מוצק בשיטת SPPS

סינתזת פפטידים (synthesizer) ומוצג בתמונה 1. מכשיר זה מורכב משני חלקים עיקריים:

1. מיכל תגובה עם צנרת הנועד להכנסת תמיסות ולהוצאתן.
2. לוח פיקוד ממוחשב המפקח על הסדר המתאים של החלפת תמיסות ועל תזמון של התהליכים השונים. התמיסות עצמן נתונות בתוך שורת מיכלים והללו נפתחים לפי תוכנית פעולה. התמיסה המתאימה נדחסת אל מיכל התגובה בעזרת משאבה. התרחיף המצוי במיכל התגובה נבחר במשך זמן קבוע מראש. התמיסה שסיימה את תפקידה נשאבת ונשטפת מן המיכל ותמיסה אחרת באה על מקומה. כל תגובת דחיסה פירושה מגע בין הפולימר, רזין, נושא הפפטיד המתארך ובין התמיסות השונות כאשר כל אחת מהן מכילה חומצה אמינית אחרת.

תהליך הסינתזה ורק לאחר סיום תהליך הדחיסה ויצירת הקשר הפפטידי הרצוי מסירים את קבוצת ההגנה ומוסיפים ח"א אחרת לפי הרצף המתוכנן מראש וזאת לצורך בקרה על תהליך הסינתזה. במעבדה של פרופ' יחיאל שי משתמשים בעיקר בקבוצת ההגנה מסוג (9-Fluorenylmethyloxycarbonyl) (Fmoc) (איור 4, A) ולעיתים עם קבוצת הגנה מסוג tert-butyl (Boc) (איור 4, B). הסרת קבוצת ההגנה של הקבוצות האמיניות נעשית ע"י חומר הנקרא פיפירדין. בסופו של תהליך נותר לנתק את הקשר הראשוני בין הקצה הקרבוקסילי של הפפטיד המוגמר ובין העוגן. צעד זה נעשה באמצעות 95% TFA שזו חומצה חזקה. קישור [לסרטון](#) המתאר את סינתזת הפפטיד בשיטה זו.

הפפטידים מסונתזים במעבדה במכשיר הנקרא עורך



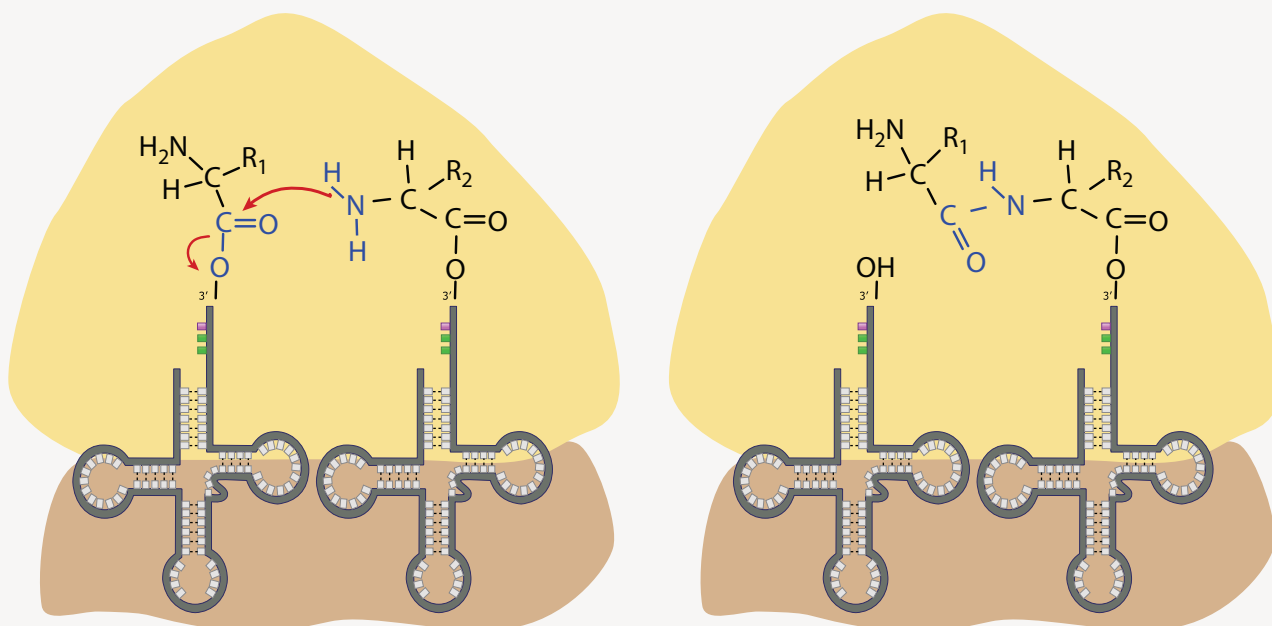
תמונה 2. מכשיר HPLC



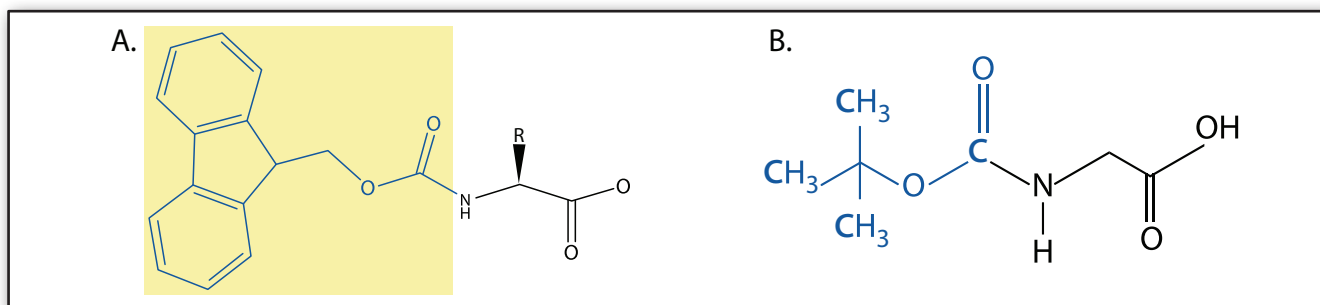
תמונה 1. עורך סינתזת פפטידים (synthesizer).

סינתזת פפטידים ביצורים חיים

סינתזת פפטידים הינה תהליך המתרחש באופן טבעי בכל רגע ובכל אחד מתאי גופינו. התהליך מתרחש באברונים הנקראים ריבוזומים אשר נמצאים בציטופלזמה של התא ובהם הצופן הגנטי הנמצא על מולקולת ה-mRNA מתורגם לחלבון שהוא שרשרת פולי פפטידית אחת או יותר. אחד ההבדלים המשמעותיים בין הסינתזה בריבוזום לסינתזה בשיטת SPPS הוא כיוון הסינתזה. באופן טבעי הסינתזה היא בין הקצה האמיני של החומצה המתוספת לקצה הקרבוקסילי של החומצה האמינית האחרונה בשרשרת ואילו בשיטת SPPS הכיוון הוא הפוך.



יצירת קשר פפטידי בין חומצות אמיניות הקשורות ל-tRNA בריבוזום



איור 4. (A) קבוצת הגנה (Fmoc) 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl (B) קבוצת הגנה (BOC) tert-Butyloxycarbonyl.

ניקיון הפפטיד

ולהעמיק בהבנת ההסברים התאורטיים, תוך עבודה מעשית במעבדה. ההתנסות תרמה לפיתוח המקצועי שלנו וצידדה אותנו בידע וכלים חדשים להוראת נושא החלבונים.

ביבליוגרפיה

אילנה שמידט הופפלד (1988), מולקולות ותאים במערכת החיסון, מכון ויצמן, דפוס יעל עמנואל

עמוס כרמל, שיטה מהירה, כמותית ואוטומטית לסינתסה של פפטידים ארוכי שרשרת, "מדע" עיתון מדעי לכל כך כ"ט מספר 2

Berg, J.M., Tymoczko, J. L. and Stryer, L. (2002). Biochemistry, 5th Edition N.Y.: W.H. Freeman and Company

Nelson, D.L. and Cox, M.M. (2004). Lehninger Principles of Biochemistry 4th Edition. N.Y.: W.H. Freeman and Company

Loucks-Horsley, S., Stiles, K. E., Mundry, S., Love, N., & Hewson, P. W. (2010). Strategies for professional learning Designing professional development for teachers of science and mathematics (Third ed., pp. 157-278). California: Corwin

Rushton, G. T., Lotter, C., & Singer, J. (2011). Chemistry teachers' emerging expertise in inquiry teaching: The effect of a professional development model on beliefs and practice. J. Sci. Teacher Educ., 22, 23-52. doi:DOI 10.1007/s10972-010-9224-x

כאמור, תהליך הסינתזה הינו בעל ניצולת גבוהה אך אין אפשרות לשליטה מלאה. וכך במהלך הסינתזה מתקבלים מספר תוצרים ויש צורך בניקוי התוצר הרצוי משאר התוצרים הלא רצויים. תהליך הניקוי נעשה במכשיר הנקרא (High-performance liquid chromatography HPLC) (תמונה 2). לאחר ההפרדה במכשיר, מקפאים את הדוגמא באמצעות קרח יבש (טמפרטורת קיפאון -78°C) ומעבירים תהליך של ליופליזציה (הקפאת הדוגמא, ונידוף המים על ידי עבודה בלחצים מאוד נמוכים - כלומר בואקום) כמו שעושים במפעל "סטסר צ'ויס" כאשר מייצרים את הקפה המגורען. באופן כזה מקבלים את החומר הנקי כאבקה בלי צורך לחמם כדי לסלק את הממס.

בדיקות לפפטיד המוגמר

לפני בדיקת יעילות הפפטיד על תרבויות תאים, יש לבצע בדיקת רעילות הפפטיד בריכוזים שונים על מנת לקבוע מהו הריכוז המקסימלי שניתן לשימוש ללא פגיעה בתאים. לאחר מכן בוחרים ריכוז ספציפי ובודקים את יכולת נטרול ה-LPS שלהם. הבדיקה נעשית בשיטות שונות ובבדיקים פוטנציאלי הפעולה שלו על פתולוגיות/מחלות שונות כגון אלח דם. תהליך היצירה והפיתוח אורך שבועות ספורים עד לקבלת החומר הנקי.

רפלקציה

לסיכום, ברצוננו להודות לדוקטורנטית הדר כהן על ההנחיה, לד"ר רון בלונדר וד"ר שלי רפ על התמיכה. העבודה במעבדת המחקר של פרופ' יחיאל שי עם הדוקטורנטית הדר כהן היתה עבורנו חוויה מרתקת ומעניינת. הכרנו מחקרים פורצי דרך, מכשור מהמתקדמים בתחום, ניתנה לנו הזדמנות להשתמש בציוד ובחומרים עליהם אנו מלמדות, לבסס