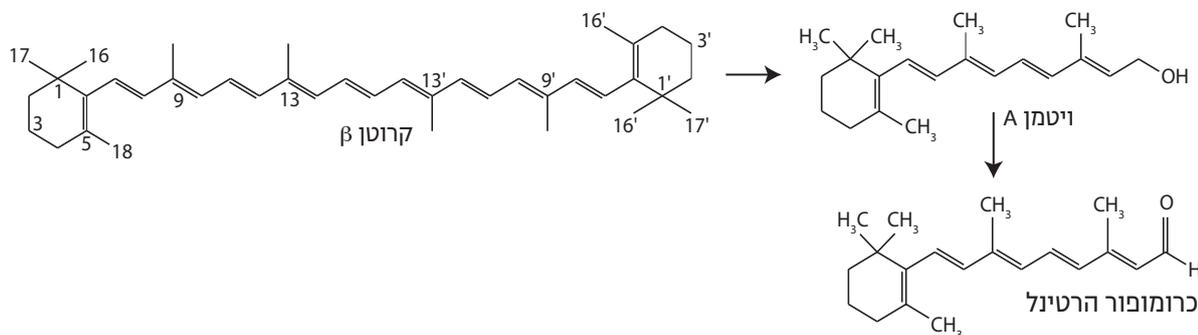


חלבוני הרטינל – "הפיגמנטים של הטבע" בקטריורודופסין ופרוטורודופסין

ימית שרעבי נאור*

הגליל ואחראי על קליטת המידע החזותי בשחור-לבן). במשך שנים רבות סברו המדענים כי חלבון הרודופסין קיים בבעלי חיים בלבד. אולם לפני כשלושים שנה התגלו חיידקים הגדלים בתמלחות (בִּרְכוֹת עם ריכוזי מלח גבוהים במיוחד, ~6M) והמכילים חלבון חדש שנמצא דומה לחלבונים הקולטים את האור בתהליך הראייה. בשל הדמיון לחלבון הרודופסין נקרא החלבון החדש בקטריורודופסין. נמצא כי חלבון זה מתמיר את אנרגיית האור לאנרגיה כימית ובכך משמש כמערכת פוטוסינתטית בטבע שאינה מבוססת על כלורופיל. בקטריורודופסין הוא פיגמנט סגול (בעל שיא בליעה ב-570 nm) הנמצא בהלובקטריום סלינארום, מיקרו-אורגניזם הלופילי ("אוהב מלח"). זהו חלבון בעל משקל של 25 kDa שאליו קשורה קוולנטית מולקולת רטינל. הרטינל היא מולקולת כרומופור שמורכבת מ-20 פחמנים שמסודרים בקשרים כפולים הבונים מערכת מצומדת הבולעת אור בתדרי האור הנראה. הרטינל שייך למשפחת הקרטינואידים, והוא נוצר מחמצון של ויטמין A שמופק מבטא-קרופן (סכמה 1).

בעלי החיים נבדלים מצמחים בדרך שבה הם משתמשים באור. צמחים וחיידקים פוטוסינתטיים מנצלים את האור הנופל עליהם לייצור חומרי מזון עתירי אנרגיה (סוכרים). לעומתם, בעלי חיים ובני אדם מנצלים את האור להפעלת חוש הראייה שלהם. אולם בשני המקרים השלב הראשון של ניצול האור מתחיל בפגיעה של פוטונים בפיגמנטים (מולקולות צבע שקולטות אור באורך גל ספציפי). אלה מגיבים על הפגיעה בדרך מורכבת ופותחים בזה תהליך שרשרת ארוך, שבמקרה אחד (צמחים) מסתיים בייצור סוכר, ובמקרה אחר (בעלי חיים, בני אדם) מסתיים בקליטה של תמונה המועברת לעיבודו של המוח. התהליכים הראשונים האלה מתחוללים בפרקי זמן קצרים במיוחד: פחות ממיליונית מיליונית השנייה. הפיגמנט הבולע את האור בצמחים הוא הכלורופיל. בבעלי חיים ממלאים את התפקיד הזה פיגמנטים המכונים "חלבונים רטינליים". בעין האדם קיימים שלושה פיגמנטים: כחול, ירוק ואדום (הנמצאים בתאי החרוט ואחראים על קבלת תמונה צבעונית) וחלבון המכונה "רודופסין" (נמצא בתאי

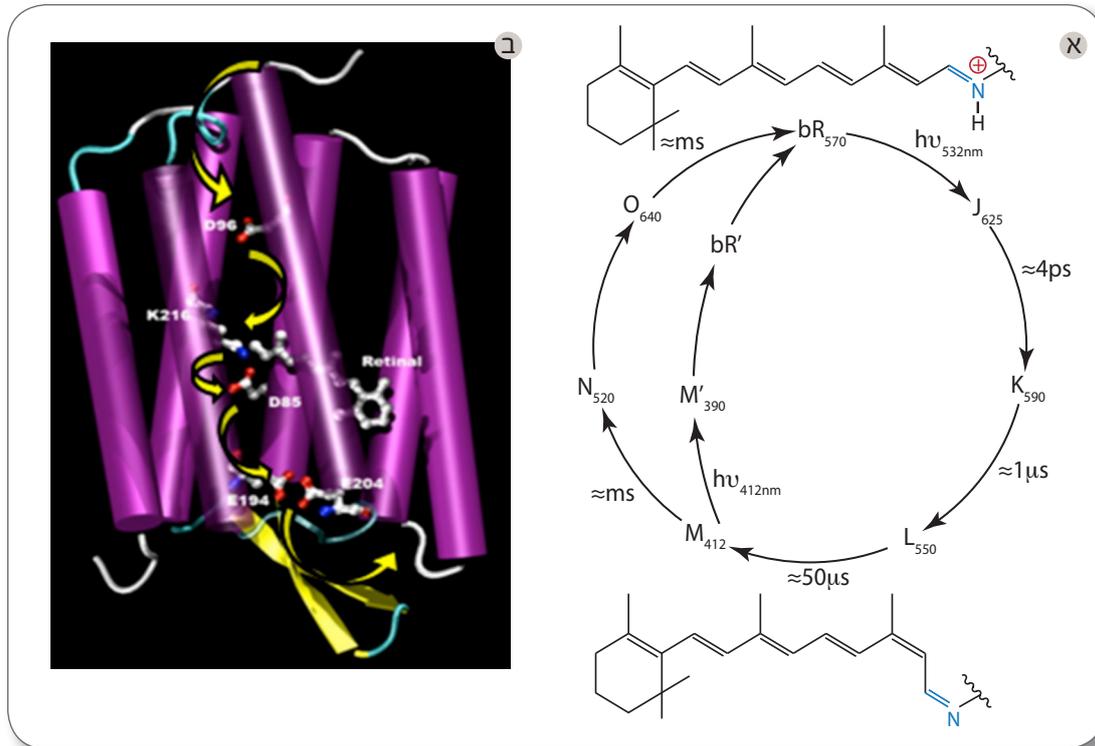


סכמה 1: מולקולת הכרומופור הרטינלי מופקת מויטמין A שמופק מ- β קרופן.

*ד"ר ימית שרעבי נאור, כתבה זו הינה חלק מעבודת הדוקטורט בהנחיית פרופ' מודי שבס. כיום, פוסט-דוקטורנטית במחלקה להוראת המדעים בהנחיית ד"ר יעל שורץ.

החלבונים הרטינליים חולקים מוטיבים מבניים דומים. הם מורכבים משבעה סלילי אלפא (סכמה 2 ב) שחוצים את הממברנה ויוצרים מבנה קומפקטי מאורגן שעוטף את מולקולת הכרומופור הרטינלית (סכמה 1). מולקולת הרטינל ממוקמת בכיס קטן המצוי בין סלילי החלבון. הרטינל הוא זה שמעניק לחלבון את צבעו וקובע את אורך הגל שבו ייבלע. למשל, בחיידק הלובקטריום סלינארום צבעו של החלבון הרטינלי בקטריורודופסין הוא סגול, ואילו צבעו של הרודופסין שבעין האדם הוא אדום. בחלבונים הרטינליים מולקולת הרטינל קשורה לליזין (חומצה אמינית שמורה) בקשר כימי

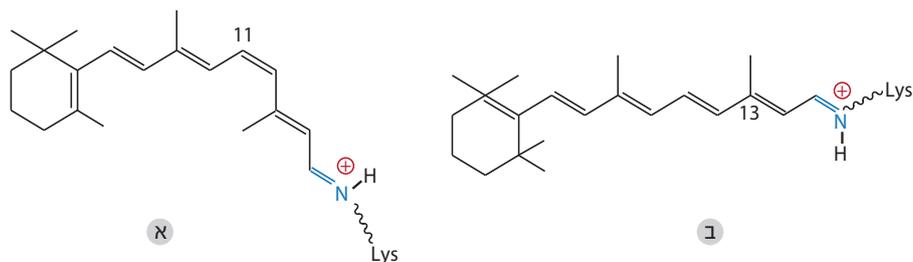
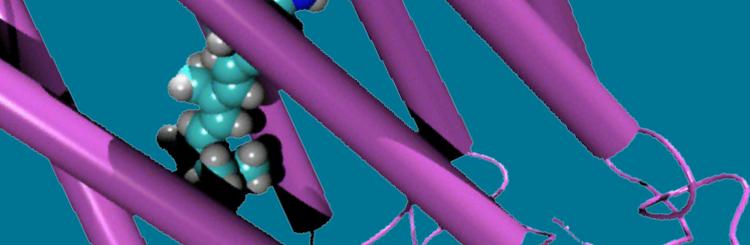
כאשר פוטון נבלע על ידי בקטריורודופסין (שיא בליעה 570nm), מתרחש תהליך מחזורי, קרי מעגל אור (סכמה 2 א) שמסתיים בתוך כמה מילי שניות שבו המולקולה משנה את התכונות האופטיות שלה. בתהליך זה המולקולה עוברת שינויי קונפורמציה (שינוי מבנה) יחד עם איזומריזציה (סיבוב של הקשר הכפול בפחמן מס' 13) של הרטינל. כל מצבי הביניים ניתנים לזיהוי ספקטרוסקופי (סכמה 2 א). במהלך המחזור עובר פרוטון (H^+) מהצד הפנימי של קרום התא דרך החלבון ונפלט בצד החיצוני, כך שנוצר מפל ריכוזים של פרוטונים משני צדי הקרום (סכמה 2 ב). התא מנצל את מפל הריכוזים ליצירת אנרגיה.



סכמה 2: (א) מעגל האור של בקטריורודופסין (bR), (ב) מבנה הפגמנט בקטריורודופסין שמראה את וקטור מעבר הפרוטון מפנים לחוץ מברנת התא.

הנקרא "פרוטוניטד שיף בייס" (PSB) (סכמה 3). הקשר הכימי בין הליזין לרטינל יוצר מטען חיובי שקבור בתוך החלבון באזור ההידרופובי של הממברנה. המטען החיובי של ה-PSB יכול לנוע בתוך החלבון כאשר אור פוגע בחלבון, וכך הוא תורם לתפקודם של חלבונים אלו.

בתחילת שנות האלפיים החלו להתגלות חלבונים רטינליים נוספים. בתחילה התגלו רטינלים ספורים, כיום כבר ידועים אלפים רבים. למעשה ניתן לראות שהחלבונים הרטינליים מגיעים ממקורות שונים, החל מאורגניזמים פרימיטיביים שבהם הם מתפקדים כמשאבת יונים מאוקטבת על ידי אור השמש, סנסורים וכו' ועד לאורגניזמים עיליים שבהם הם משמשים כפיגמנטי ראייה.



סכמה 3: קונפיגורציה איזומרית של מולקולת הרטינל בפיגמנטי הראייה (א) ובפיגמנטים מבקטריה (ב).

הקבלה של שרשרת צורות הביניים מסתיים יחד עם הביקוע של גשר "השיף-בייס" (SB) שמחבר בין הכרומופור הרטינלי לחומצת האמינו לזין בחלבון. לעומת זאת בבקטריות וחד-תאים אאוקריוטיים, בסוף התהליך של קבלת שרשרת צורות הביניים החלבון חוזר למצבו ההתחלתי שבו הוא מוכן לקליטה הבאה של הפוטון, וכך מתקבל תהליך מחזורי (לדוגמה, בבקטרירודופסין, סכמה 2 א).

כאמור, בשנים האחרונות התגלו אלפי זנים חדשים של חלבונים רטינליים בבקטריות שמאכלסות את מקורות המים השונים (ים מלח, הפסיפיק, המרינות וכו'). חלבונים אלו נקראים חלבוני "הפרוטורודופסין", והם מצויים בכמות גדולה בממברנות הבקטריות. זנים שונים של הבקטריות שמכילות חלבוני פרוטורודופסין מראים כ-80% הומוולוגיה (זהות) ברצף חומצות האמינו ולמרות זאת החלבונים השונים מראים בליעות באורכי גל שונים ותפקידים שונים (משאבות פרוטונים, סנסורים וכו'). דבר זה הופך את משפחת חלבוני הפרוטורודופסין למערכת אינדאלית שניתן לחקור בה את הקשר בין המבנה לתפקיד ואת הגורמים לספקטרום הבליעה הרחב שמראים החלבונים שבאוקלוסיית הבקטריות. נהוג לחלק את משפחת חלבוני הפרוטורודופסין לשתי קבוצות עיקריות: הקבוצה הירוקה שכוללת בתוכה את החלבונים שבולעים באורך גל ירוק, והקבוצה הכחולה ובה חלבונים שבולעים באורך גל קצר יותר, הגל הכחול. ידוע כי הבקטריות שמכילות את חלבוני הפרוטורודופסין פזורות לרחב כדור הארץ ולעומק מקורות המים, ונמצא כי יש התאמה בין אורך הגל המקסימלי שבו החלבון בולע לכמות האור שמגיעה לאזור. לדוגמה, חלבוני פרוטורודופסין מהקבוצה הכחולה שבולעים אור באורך גל קצר, מגיעים מאזורים פחותי אור כמו אנטרקטיקה או משכבות עמוקות של מי הים שכמות האור שמגיעה אליהן

לצד הדמיון שקיים בין החלבונים הרטינליים, הם גם נבדלים זה מזה. הם שונים ברצף חומצות האמינו ובאופן שבו שבעת סלילי החלבון ערוכים בתוך הממברנה (הקונפורמציה המרחבית). לכל חלבון מבנה אלקטרוסטטי ורשת קשרי מימן ייחודיים המותאמים לתפקידים השונים שהחלבונים הללו ממלאים. בנוסף קיים שוני בקונפיגורציה האיזומרית והקונפורמציה (מבנה) של הטבעת/שרשרת במולקולת הרטינל. שוני זה מחלק את חלבוני הרטינל לשתי קבוצות ברורות. בפיגמנטי הראייה מולקולת הרטינל נמצאת בצורת האיזומר 11-cis (סכמה 3 א) שעובר פוטואיזומריזציה ל-trans. all בפיגמנטים שמקורם מאורגניזמים פרמיטיביים, מולקולת הרטינל נמצאת בצורת all trans (סכמה 3 ב) שעוברת פוטואיזומריזציה ל-13-cis. למעשה, חלבוני הרטינל השונים יוצרים סביבה שונה בעבור מולקולת הרטינל, כך שבאינטראקציה הספציפית בין הרטינל לחלבונים השונים יתקבלו פיגמנטים בצבעים שונים, בטווח שבין הסגול לאדום (מקסימום בליעה של הפיגמנט באורכי גל, 380-635 nm).

כאשר חלבוני הרטינל באים באינטראקציה עם אור הם מציגים שרשרת של צורות ביניים שניתנים לזיהוי ספקטרוסקופי (לדוגמה, בקטרירודופסין, סכמה 2 א) ומשקפים שינויים במבנה הרטינל והאפו-פרוטאין (חלבון ללא הרטינל). שינויים ספקטרוסקופיים אלו מצומדים לתפקידים השונים שממלאים החלבונים כגון תהליך הראייה (פיגמנטי הראייה), משאבת פרוטונים (בקטרירודופסין, סכמה 2 ב), משאבת כלורידים (הלורודופסין-חלבון השואב יוני כלור על ידי אור), חיישן לאור (סנסורי-רודופסין - חלבון שמניע להתרחק מאור מזיק או להתקרב לאור) וכו'. כשמדובר על פיגמנטי הראייה, תהליך

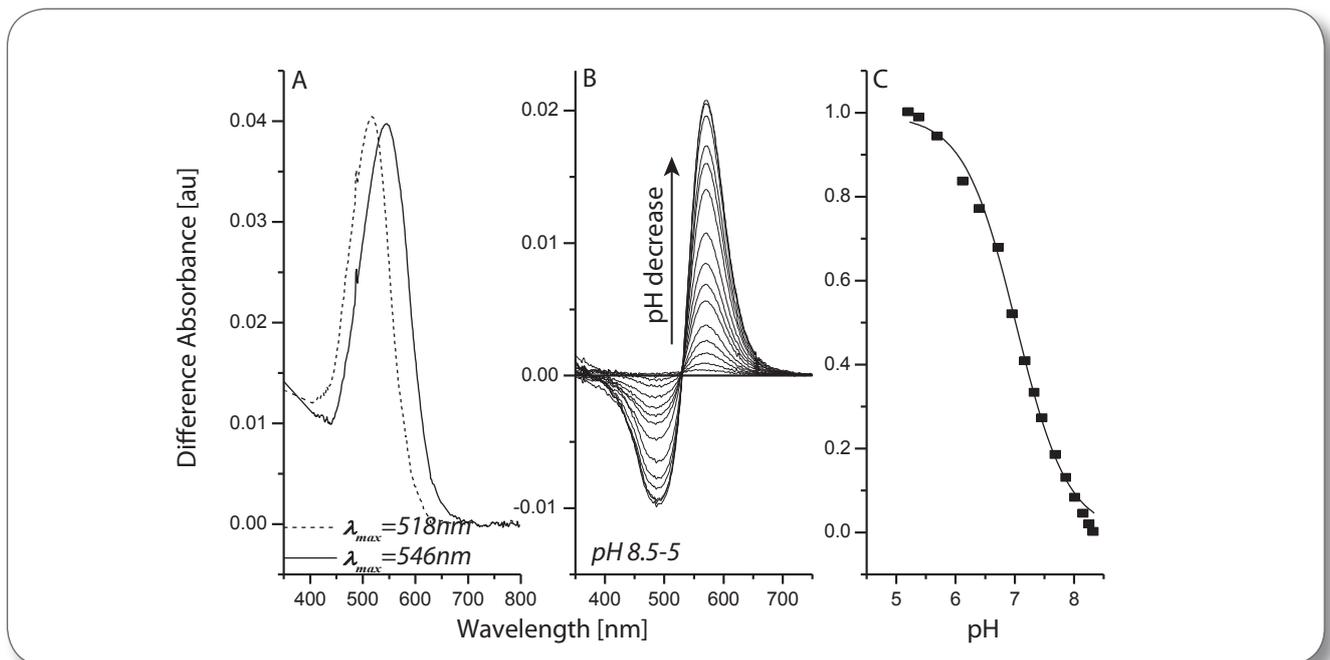
נמוכה יחסית לשכבות העליונות.

תלוי מאוד בתנאי הסביבה.

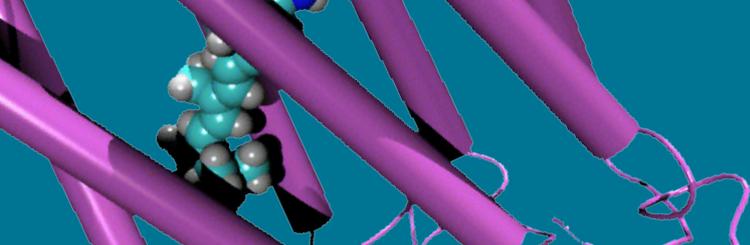
במעבדתו של פרופ' מרדכי שבס מן המחלקה לכימיה אורגנית במכון ויצמן, נחקרים במשך שנים רבות מגוון רחב של חלבונים רטינליים. במסגרת עבודת הדוקטורט חקרתי את החלבון "פרוטורודופסין" שמגיע מהקבוצה הירוקה ובה חלבונים בעלי בליעה מקסימלית באורך הגל הירוק. מטרת המחקר הייתה ללמוד ולהבין את התכונות הספקטרוסקופיות, את המנגנון של מעבר הפרוטון בתוך החלבון ואת מעגל האור של החלבון. ישנן מספר חומצות אמינו החשובות למבנה ולתפקוד של "פרוטורודופסין". קבוצות אלו נחקרו ונחקרות עדיין במעבדתנו במטרה להבין את הקשר בין מבנה החלבון לבין תפקיד החלבון.

במאמר זה אציג חלק קטן מהמחקר שביצעתי על החלבון "פרוטורודופסין" במסגרת הדוקטורט. אדבר בעיקר על אחת מחומצות האמינו החשובות בחלבון, Asp97. ל-Asp97 תפקיד חשוב במבנה ובפעילות של "פרוטורודופסין" כמשאבת פרוטונים. ערך ה- pK_a של Asp97 הוא קריטי, ונראה בהמשך כיצד הוא

"פרוטורודופסין" הוא פיגמנט בעל שיא בליעה ב-518nm ומתפקד כמשאבת פרוטונים שמאוקטבת על ידי אור. "פרוטורודופסין" מראה מעגל אור הדומה לזה של בקטריוודופסין שבו מאופיינים ספקטרלית מספר מצבים; מצבים שבהם החלבון עובר שינויים מבניים כתוצאה מבליעת הפוטון. מעגל האור מצומד לתפקודו של החלבון כמשאבת פרוטונים כך שבסיום מעגל האור (~15 מילי שניות) משתחרר פרוטון אל חוץ התא. ל"פרוטורודופסין" תכונות ספקטרוסקופיות מיוחדות שתלויות מאוד בתנאי הסביבה כגון ריכוז מלחים, pH, כמות החשיפה לאור וכו'. בסביבה חומצית שיא הבליעה של ה"פרוטורודופסין" הוא ב-546nm, ובמעבר לסביבה בסיסית הפיגמנט מראה הסחה בבליעה לכחול ושיא הבליעה הוא ב-518nm (איור A). התזוזה בבליעה של הפיגמנט מקושרת עם השינוי במצב הפרוטונציה של החומצה האמינית האספרטית (השייכת לקבוצת החומצות הקרבוקסיליות) הנמצאת בעמדה

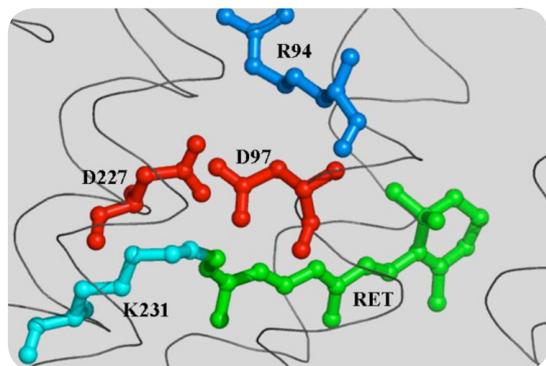


איור 1: תלות של ספקטרום הבליעה של הפיגמנט "פרוטורודופסין" (שנמצא בסביבת מלח הכלוריד, 300mM NaCl) ב-pH שונים. (A) הצורה הבסיסית (קו מקווקו) והצורה החומצית (קו מלא). (B) ספקטרום הפרשים בתחום (8.5-5.0) pH כאשר כל הספקטרום מוחסרים מספקטרום ב-pH~8.5. (C) עקומת טיטרציה משורטטת באורך גל של 570nm, כאשר הקו המלא מראה את ההתאמה הטובה ביותר ל- $pK_a=7$.



ה-pKa של Asp85 נמצא בטווח ערכי ה-pKa השכיח בקרב החומצות הקרבוקסיליות. מכאן נובע שה-pKa של Asp97 ב-"פרוטורודופסין" אינו טיפוסי. בשביל לאפשר ל-pKa גבוה כל כך להתקיים בחלבון "פרוטורודופסין", חייב להיווצר מערך מבני מיוחד מאוד בתוך הכיס שבו ממוקם כרומופור הרטינל ולאוורך הווקטור של מעבר הפרוטון בחלבון (איור 2).

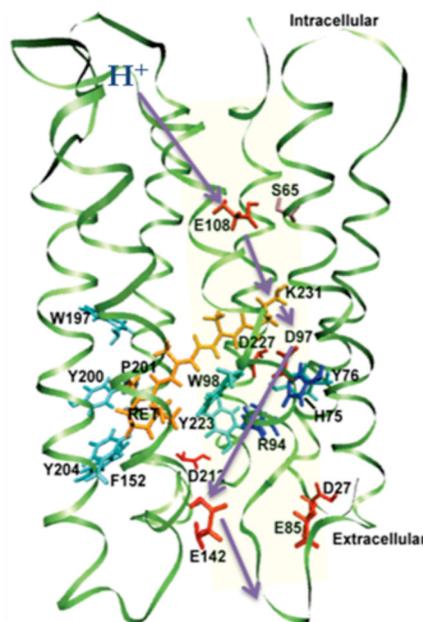
ל-"פרוטורודופסין" ולבקטריוודופסין יש חומצות האמינו שהדמיון ביניהן רב במיוחד באלו שנמצאות בכיס שבו ממוקם כרומופור הרטינל. Asp97 ב-"פרוטורודופסין" אנלוגית ל-Asp85 בבקטריוודופסין ונמצא ששתיהן ממלאות אותו תפקיד חשוב בחלבון. שתיהן מתפקדות כקבוצה הראשונה שמקבלת את הפרוטון מה-PSB בתהליך מעבר הפרוטון אל מחוץ לתא. בתהליך זה Asp97 (בבקטריוודופסין) נמצאת במצבה האניוני, מוכנה לקבלת פרוטון מה-PSB. היא עוברת פרוטונציה ומשנה את צורתה לניטרלית. חשוב להדגיש שמעבר הפרוטון בחלבון מצריך ש-Asp97 תהיה בצורתה האניונית שאם לא כן המעבר לא יכול להתקיים. בנוסף, Asp97 ב-"פרוטורודופסין" (Asp85 בבקטריוודופסין) ביחד עם הקבוצות Asp227 ו-Arg94 מהוות את הקומפלקס שאחראי על הייצוב האלקטרוסטטי של המטען החיובי של ה-PSB (מטען הקבור בתוך החלבון באזור בעל אופי הידרופובי)



איור 3: מודל מבנה של אתר הקישור של הרטינל בתוך החלבון "פרוטורודופסין". המודל מבוסס על המבנה הקריסטלוגרפי של בקטריוודופסין (1.43 Å) (1M0K). המבנה שמוצג כאן מראה את הקבוצות בחלבון שמרכיבות את הקומפלקס שאחראי על ייצוב המטען החיובי הקבור בחלבון (באזור ממברנלי הידרופובי) של ה"פרוטוניטד שייף בייס" (PSB).

מספר 97, (Asp97). מחקרים מראים שכאשר Asp97 מוחלפת בחלבון לחומצה אמינית ניטרלית (Asn), הפיגמנט מאבד את צורתו הבסיסית ומראה בליעה ב-546nm (בליעה שמזוהה עם הצורה החומצית); המעבר הספקטרי מתבטל ואינו מראה תלות ב-pH. המעבר בין הצורה החומצית לבסיסית מאופיין ב-7~pKa ומיוחס לפרוטונציה של החומצה האמינית Asp97 (איור 1C).

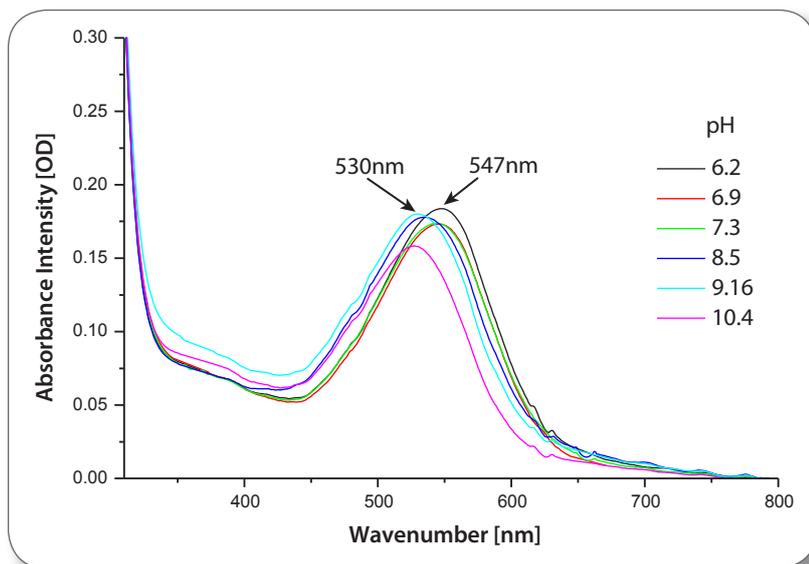
ההתנהגות הספקטרלית של הפיגמנט "פרוטורודופסין" כתלות ב-pH נצפתה קודם לכן בבקטריוודופסין. בקטריוודופסין מראה מעבר ספקטרי מהצורה הסגולה (צורה בסיסית, 570 nm) לצורה הכחולה (צורה חומצית, 605nm) כתלות ב-pH של הסביבה. מעבר ספקטרי זה משייך לשינוי במצב הפרוטונציה של חומצה אמינית אספרטית הנמצאת בעמדה מספר 85 (Asp85), והוא מאופיין ב-pKa בסביבות 2.6. זה המקום לציין שערך ה-pKa של Asp97 ב-"פרוטורודופסין" נחשב גבוה מאוד ואין הוא שכיח בקרב חומצות קרבוקסיליות. בדרך כלל ערכי ה-pKa של חומצות קרבוקסיליות בתמיסה נמוך בהרבה מ-7. לדוגמה, ה-pKa של החומצה אספרטית בתמיסה הוא בסביבות 2, וזה של חומצה אצטית - 4.5~. גם בבקטריוודופסין ערך



איור 2: מודל מבנה של "פרוטורודופסין" שמבוסס על המבנה הקריסטלוגרפי של בקטריוודופסין. במבנה זה ניתן לראות מודל לווקטור מעבר הפרוטון ב-"פרוטורודופסין" (בדומה לבקטריוודופסין) וכן את הקבוצות שמשותפות בתהליך זה.

במחקרנו מצאנו שאניונים שונים משפיעים על ערך ה-pKa של Asp97 בריכוז אניונים גבוה: בריכוז של 300mM כלוריד (-Cl) או 300mM סולפט (SO4-2) - ה-pKa(Asp97) הוא ~7 (איור 1), בעוד שאניונים ממשפחת האצטוהלוגנים - כגון; טריפלורואצטאט (-CF3COO), טריכלורואצטאט (-CCl3COO) וטריברומואצטאט (-CBr3COO) - מעלים את ה-pKa. לדוגמה, טריברומואצטאט (-CBr3COO) בריכוזים קטנים של 10mM ומעלה מעלה את Asp97(pKa) לערך הגבוה מ-10 (איור 4 מראה טיטרציה של Asp97 ב"פרוטורודופסין" בנוכחות [CBr3COO-] 70mM.

יתרה מכך, גילינו שהריכוזים של האניונים משפיעים על ערך ה-pKa(Asp97). לדוגמה, בריכוזים שונים של כלוריד או סולפט הנעים בין 0.07mM ל-300mM, התקבלו ערכי pKa הנעים בין 7.9 לבין 7.0 בהתאמה, וריוויין הושג ב-150mM (איור 5). כאשר הכנסנו למערכת החלבון תערובת של אניוני הכלוריד (300mM) ואחד מהאניונים מקבוצת האצטוהלוגנים, גילינו שיש תחרות קישור בין שני סוגי האניונים, ובעוד שהאחד (כלוריד) מוריד את ה-pKa, השני (טריברומואצטאט) מעלה אותו.



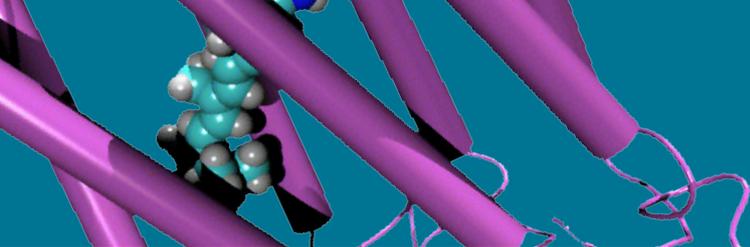
איור 4: ספקטרום בליעה של "פרוטורודופסין" בנוכחות [CBr3COO-] 70mM ב-pH שונים. ניתן לראות שב-pH ~10 הפיגמנט מקבל את צורת הביניים שלו (530nm) שהיא מדד לערך ה-pKa של Asp97. לא ניתן לחשב במדויק את ערך ה-pKa משום שהחלבון עובר תהליך נוסף ב-pH ~10 (לא נעסוק בזה כאן). נראה ש-[CBr3COO-] 70mM מעלה בצורה דרמטית את ה-pKa של Asp97.

(איור 2). מכאן נראה ש-Asp97 היא קבוצה חשובה שמשפיעה מאוד על המבנה ועל פעילות החלבון "פרוטורודופסין".

למרות שחומצות האמינו של בקטריוודופסין ו-"פרוטורודופסין" דומות מאוד, במיוחד אלו שנמצאות בכיס של כרומופור הרטינל, עדיין ישנם הבדלים גדולים ב-pKa של Asp85 (~2.6) בבקטריוודופסין לעומת הקבוצה האנלוגית, Asp97 (~7) ב"פרוטורודופסין". ערכי ה-pKa השונים של קבוצות אלו בשני החלבונים גורמים לכך שבקטריוודופסין מתפקד כמשאבת פרוטונים כבר ב-pH ~5, ואילו פרוטורודופסין מראה פעילות מלאה ב-pH גבוה (>8). שני החלבונים הללו מראים פעילות רק בסביבת pH שגבוהה מערכי ה-pKa של Asp85 (בבקטריוודופסין) ו-Asp97 ("פרוטורודופסין"). במחקר שביצענו במעבדתנו (נתונים עדיין לא פורסמו), גילינו שכאשר Glu142 מוחלפת בחומצה אמינית ניטרלית, יש לה השפעה ניכרת על ה-pKa של Asp97 ומתקבלים שני ערכי pKa לקבוצה. הערך הראשון pKa1 יורד ל-~6, והשני pKa2 יורד דרמטית ל-~2. ערכו של pKa2 במוטנט מזכיר את ערך ה-pKa של Asp85

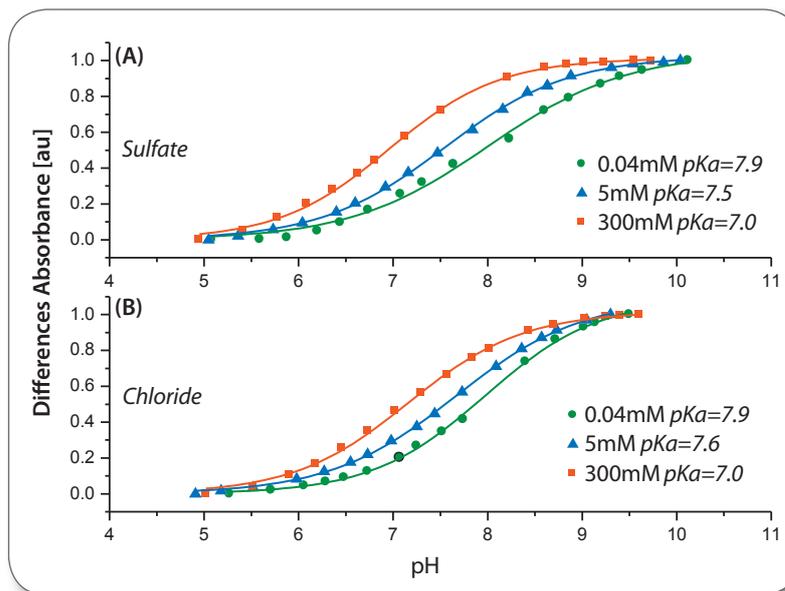
בבקטריוודופסין. Glu142 ב"פרוטורודופסין" ממוקמת קרוב לצד החיצוני של הממברנה ולמרות שהיא במרחק ~12Å מ-Asp97 על פי המודל של מבנה החלבון (איור 2), היא מראה השפעה חזקה על ערך ה-pKa של Asp97. סביר להניח שבחלבון המקורי "פרוטורודופסין" Glu142 נמצאת בצורתה האניונית ותורמת לערך הגבוה של ה-pKa של Asp97. התרומה יכולה להתקיים דרך מערך של קשרי מימן ספציפיים בין Glu142 ל-Asp97, ואולי מעורבות בכך קבוצות נוספות. הבנת ערכו הגבוה והלא שכיח של ה-pKa של Asp97 ב"פרוטורודופסין" מצריך מחקר נוסף. ישנן חומצות אמינו נוספות בחלבון "פרוטורודופסין" שסומנו כמטרה למוטציות, וחלקן נחקרות עדיין במעבדה במטרה לנסות להבין מדוע ה-pKa של Asp97 גבוה כל כך.

כפי שצינתי לעיל, התכונות הספקטרוסקופיות של "פרוטורודופסין" תלויות מאוד בתנאי הסביבה.



אניונים אלו, ה- pK_a של Asp97 הוא גבוה יותר, בסביבות 8 וב- pH זה רק מחצית מ-Asp97 נמצאת במצב האניוני, דבר המוריד את האפקטיביות של פעילות החלבון. מיקום הקישור של האניונים ב"פרוטורופסין" עדיין אינו ידוע. על מנת לגלות זאת נדרש מערך ניסויים נוסף.

החשיבות של קישור אניונים בחלבונים הרטינליים מוכרת כבר בבקטריוורופסין (משאבת הפרוטונים) ובהלורודופסין (משאבת הכלורידים). ישנו מחקר המראה השפעה של אניונים על מעגל האור של הלורודופסין. מחקר אחר הראה שבהיעדר יוני הכלוריד, הלורודופסין מאבד את תפקודו כמשאבת כלורידים. בנוסף ידוע שגם בקטריוורופסין מראה קישור של אניונים כמו יוני כלוריד ב- pH נמוך (<1). לסיכום, נראה שיש מערך ספציפי מאוד של חומצות אמינו בכיס שבו מצוי הרטינל בחלבונים הרטינליים. מערך זה נותן אופי ספציפי לכל חלבון, ודבר זה מתבטא בתפקיד הייחודי של חלבוני הרטינל השונים, כדוגמת "פרוטורודופסין", בקטריוורופסין והלורודופסין. כל שינוי שנעשה בחומצות האמינו החשובות הממוקמות באתר הקישור של הרטינל משפיע על האופי של החלבון מבחינה ספקטרלית, מעגל האור והתפקיד. בנוסף, מאחר שמערך המבנה האלקטרוסטטי ורשת קשרי המימן שקיימים באתר הקישור של הרטינל הם ספציפיים מאוד לכל חלבון, סביר להניח שקישור של אניונים לחלבונים אלו עלול להשפיע על מערך זה בתוך החלבון ולהוביל לשינוי באופי החלבון. מחקר נוסף הנעשה במעבדה שלנו מתעסק בשינוי pK_a של Asp97 כפונקציה של מוטציות בקבוצות מסוימות בחלבון בנוכחות של אניונים שונים. תוצאות אלו אינן מובאות כאן, אך הן תומכות בהנחה שלפיה שינוי במספר מצומצם של חומצות אמינו שממוקמות באזורים חשובים גורר שינויים גדולים בספקטרום הבליעה, ב- pK_a של Asp97, במעגל האור ובתפקיד. מכאן נובע שההיכרות עם כמה שיותר חלבונים רטינליים יכולה להוביל אותנו להבנה רחבה יותר על הקשר שבין המבנה לתפקיד החשוב שחלבונים אלו ממלאים בטבע.



איור 5: התלות ב- pH של דוגמאות מהחלבון "פרוטורודופסין" שנמצאות בריכוזים שונים של האניונים (A) סולפט, (B) כלוריד. כל סמל מייצג ריכוז שונה של האניונים [0.04-300mM]. עקומות הטיטרציה שורטטו באורך גל 570nm, והקו השלם מתאר את ההתאמה הכי טובה.

במחקר זה גילינו קישור של אניונים ל"פרוטורודופסין". הסקנו שקיימים לפחות שני אתרי קישור לאניונים בחלבון, ובשניהם הבחנו בתחרות קישור בין אניוני הכלוריד/סולפט לבין אניוני האצטטה. במחקר זה הבחנו שקישור האניונים לחלבון חשוב מאוד היות שהוא משפיע על ערך ה- pK_a של אחד השיירים החשובים בחלבון Asp97. "פרוטורודופסין" יכול לתפקד כמשאבת פרוטונים רק כאשר Asp97 נמצאת במצבה האניוני, מוכנה לקבל פרוטון מה-PSB ובזה להתחיל את תהליך מעבר הפרוטון אל מוחץ לתא. אנו יודעים שבתנאי מעבדה הפיגמנט מתפקד כמשאבת פרוטונים רק בסביבה בסיסית שבה Asp97 נמצאת במצבה האניוני. בנוסף אנו יודעים שה- pH בסביבה הטבעית הוא גבוה ועומד על הערך ~ 8 ולכן, כדי ש"פרוטורודופסין" יתפקד כמשאבת פרוטונים בסביבתו הטבעית, ה- pK_a של Asp97 צריך להיות נמוך מ-8. במי ים המכילים יוני סולפט ובעיקר כלוריד, Asp97 מאמצת pK_a נמוך מ-8 ($pK_a \sim 7$) ובזה (מאפשרת ל"פרוטורודופסין" לתפקד כמשאבת פרוטונים בסביבתו הטבעית (בים, אוקינוסים וכו'). בהיעדר קישור של

אזכורים

- Strader, C. et al. (1994) *Annu. Rev. Biochem.* 63, 101-132.
- Oesterhelt, D. (1998) *Curr Opin Struct Biol.* 8, 489-500.
- Lanyi, J. (1993) *Biochim. Biophys. Acta.* 1183(2), 241-261.
- Chang, C. H. et al. (1986) *Biophys. J.* 49, 731-739.
- Jonas, R. & T. Ebrey. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 149-153.
- Beja, O. et al. (2000) Bacterial rhodopsin: Evidence for a new type of phototrophy in the sea. *Science* 289, 1902-1906.
- Beja, O. et al. (2001) Proteorhodopsin phototrophy in the ocean. *Nature* 411, 786-789.
- Man, D. L., Spudich, J. L., & Beja, O. (2003) Diversification and spectral tuning in marine proteorhodopsins. *EMBO J.* 22, 1725-1731.
- Yamit Sharaabi, Vlad Brumfeld & Mordechai Sheves (2011) Binding of Anions to Proteorhodopsin Affects the Asp97 pKa.

אולי בעתיד נוכל להשתמש בחלבונים אלו ולבנות בעצמנו מערכות יציבות שמתאימות לתפקידים השונים כגון: משאבת פרוטונים, כלורידים, סנסורים וכו'. למעלה מ-30 שנה של מחקר שנעשה עד היום על חלבון הבקטריורודופסין הביאו (השנים, במקרה זה) לפרסומם של פטנטים רבים שנרשמו לשימושים אפשריים בחלבון. ניתן להשתמש במולקולה זו כחומר אופטי-אלקטרוני להפקת הולוגרמות. ממשטחי בקטריורודופסין ניתן להכין לוחות זיכרון ומעבדים למחשבים, וייתכן שהטכנולוגיה המתפתחת תוביל בעתיד לדור חדש של מחשבים. השימוש בבקטריורודופסין מבוסס על השינוי האופטי - מבליעה ב-570nm לבליעה ב-420nm ובחזרה. בעזרת קרן לייזר ניתן "לכתוב" על המולקולות ו"לקרוא" את המידע השמור בהן. עם השימושים האפשריים לבקטריורודופסין נמנים הפיכת אנרגיית האור לאנרגיה חשמלית, שימוש בחיישנים לאור ועוד. כל זה מתאפשר הודות ליציבות הגדולה של חלבון הבקטריורודופסין. החלבון יציב בנוכחות מלח ובהיעדרו, והוא עמיד בחשיפה לטמפרטורות גבוהות.