الفصل السادس CHAPTER- 6

البروتينات Proteins

البروتينات ، التي يعني اسمها ((الأول)) ، أو ((المقام الأول)) هي أكثر الجزيئات الحياتية وفرة في الخلايا وتشكل اكبر نسبة من الوزن الجاف لمعظم الكائنات الحية . لقد شرحنا في الفصل السابق الأحماض الأمينية ، وهي الوحدات البنائية لبناء البروتينات والببتيدات البسيطة ، التي تتكون من أحماض أمينية قليلة تتصل مع بعضها بأواصر ببتيدية . وسنقوم الآن بشرح التركيب البنائي للبروتينات التي تتألف من مركبات متعددة الببتيد ، ذات سلاسل طويلة جداً مكونة من كثير من وحدات الأحماض الأمينية.

البروتينات هي عبارة عن الأجهزة التي يتم بواسطتها التعبير عن المعلومات الوراثية . ومثلما توجد آلاف الجينات في نواة الخلية ، وكل واحد من هذه الجينات خاص بصفة معينة من صفات الكائن الحي ، هناك آلاف الأنواع المختلفة من البروتينات ف ي الخلية ويقوم كل واحد من هذه البروتينات بوظيفة معينة يحددها الجين المسؤول عن البروتين المعني . ولهذا فالبروتينات ليست أكثر الجزيئات الحيوية العملاقة وفرة فحسب ولكنها متنوعة الى درجة كبيرة في وظائفها.

ومن الامور الاستثنائية ان تكون جميع البروتينات في جميع أنواع الكائنات الحية بغض النظر عن وظيفتها أو فعاليتها الحيوية مبنية من نفس المجموعة من الأحماض الأمينية القياسية العشرين، التي تكون وحدها عديمة الفعالية الحيوية الداخلية. فما هو الشيء إذاً الذي يمنح احد البروتينات الفعالية الأنزيمية ، ويمنح البروتين الآخر النشاط الهرموني ، ويمنح البروتينات الأخرى كذلك فعالية الأجسام المضادة ؟ كيف تختلف هذه البروتينات كيميائياً ؟ ببساطة تختلف البروتينات بعضها عن البعض لان لكل بروتين سلسلة من الأحماض الأمينية خاصة به ومميزة له. ان الأحماض الأمينية عبارة عن أوليات التركيب البنائي للبروتينات ، لان هذه الأحماض الأمينية يمكن ترتيبها على الأغلب بعدد غير محدود من التسلسلات لتكوين عدد غير محدود من البروتينات المختلفة.

في هذا الفصل سنشرح التركيب البنائي الأولي (Primary Structure) لجزيئات البروتين، والذي تعنيه التركيب البنائي للهيك ل التساهمي وتسلسل بقايا الأحماض الأمينية. وسنشرح كذلك بعض العلاقات بين تسلسل الأحماض الأمينية والوظيفة الحيوية.

توجد آلاف البروتينات المختلفة في كل نوع من الكائنات الحية ، ومن المحتمل ان يكون هناك 10 ملايين نوع من الأنواع المختلفة من الكائنات الحية. هل يمكن للأحماض الأمينية الـ 20 فقط ان يتم ترتيبها حقاً الى 10^{11} أو أكثر من التسلسلات المختلفة ؟

ويمكن للرياضيات فقط ان تخبرنا بالعدد الممكن. ففي مركب ثنائي الببتيد يحتوي على نوعين مختلفين من الأحماض الأمينية ، يمكن ان يكون هناك تسلسلات الهوسريان فقط. أما في المركب ثلاثي الببتيد ، الذ ي يحتوي على ثلاثة أحماض أمينية مختلفة وهي (A، B، C) فيمكن ان توجد ستة ترتيبات متسلسلة وهي : (ABC، ACB، BAC، BCA، CAB، CBA) . ان التعبير العام لحساب عدد التسلسلات الممكنة لمجموعة من المواد هو (n!) من التسلسلات ، حيث يمثل (n) عدد المواد ، فمثلاً ، يكون لمركب رباعي الببتيد ٤ أحماض أمينية مختلفة وعليه سيكون عندنا ما يساوي $1\times2\times3\times4=24$ تسلسلاً ممكناً. فبالنسبة لمركب

متعدد الببتيد مكون من 20 حامضاً أمينياً. كل واحد منها يحدث لمرة واحدة ، فان عدد التسلسلات هو ك ما يلي : 20! وتساوي 20×19×18×..... ويصل الى عدد يبلغ حوالي 2×10^{18} ولكن هذه عبارة عن المركبات متعددة الببتيد الصغيرة جداً مع 20 من مكونات أحماض أمينية ذات وزن جزيئي يبلغ 2600. فبالنسبة لبروتين ذي وزن جزيئي يبلغ 34.000 ويحتوي على 12 حامضاً أمينياً مختلفاً في أعداد متساوية ، يمكن ان يوجد أكثر من 10^{300} من التسلسلات الممكنة. فإذا فرضنا أيضاً ان هذا البروتين يتكون من 20 حامضاً أمينياً توجد في أعداد متساوية ، فان عدد التسلسلات الممكنة سيكون كبير جداً . فإذا كان هناك جزيء واحد فقط لكل سلسلة من الايسومرات ممكنة لمثل هذا البروتين ، فسيكون وزنها الكلي أكثر بكثير من وزن الأرض !

وعليه يمكن ترتيب الأحماض الأمينية العشرين في تسلسلات كافية ليس لوصف آلاف البروتينات في كل واحد من جميع الأنواع الحية فحسب بل كذلك لجميع أنواع الكائنات الحية ا لتي وجدت على سطح البسيطة منذ نشوئها ولحد الآن أو حتى تلك التي ستكون موجودة في المستقبل ويعتقد بان أنواع الكائنات الحية الموجودة حالياً تمثل حوالي واحدٍ بالألف فقط من جميع الكائنات الحية التي وجدت على سطح الأرض. ان المنطق الجزيئي للأحماض الأمينية والبروتينات يسمح بإسهاب للطبيعة المنفرجة للتطور الحياتي.

تصنيف البروتينات حسب الوظيفة البايولوجية

Biological Functions of Proteins

من أهم أهداف الكيمياء الحيوية هي معرفة كيفية تسلسل الأحماض الأمينية المكونة للبروتينات المختلفة والتي يمكنها القيام بالوظائف البايولوجية حيث نستطيع من خلال ذلك ان نشخص الأصناف الرئيسية للبروتينات وحسب أدوارها الحياتية. الجدول (6-1) .

الانزيمات Enzymes

ان أكثر البروتينات اختلافاً وأكثرها تخصصاً هي تلك البروتينات ذات الفعالية التحفيزية . وتكون جميع التفاعلات الكيميائية للجزيئات الحيوية العضوية الخلايا محفزة من قبل الأنزيمات. يوجد لحد الآن أكثر من 2000 أنزيم مختلف وكل واحد منها له القابلية على التحفيز نوع مختلف من التفاعلات الكيميائية. وقد تم اكتشاف وجود الأنزيمات في الأنواع المختلفة من الكائنات الحية.

البروتينات الناقلة Transport Proteins

ان البروتينات الناقلة في مصل الدم تربط وتنقل جزيئات خاصة أو ايونات من عضو لآخر ، يرتبط هيموكلوبين كريات الدم الحمراء بالأوكسجين عند مرور الدم خلال الرئتين ويحمله الى الأنسجة السطحية ، حيث يتم إطلاق الأوكسجين هناك للقيام بعملية الأكسدة المنتجة للطاقة من المواد الغذائية. كما يحتوي مصل الدم على البروتينات الدهنية (Lipoproteins) التي تنقل الدهون من الكبد الى أعضاء أخرى. وتوجد أنواع أخرى من البروتينات الناقلة في أغشية الخلية وهي متكيفة للارتباط بالكلوكوز والأحماض الأمينية وغيرها من المواد الغذائية ونقلها عبر الغشاء الى داخل الخلايا.

البروتينات الغذائية وبروتينات الخزن Nutrient And Storage Proteins

تخزن بذور الكثير من النباتات بروتينات مغذية لازمة لنمو الأجنة النباتية. ولدينا من الأمثلة المألوفة لذلك بروتينات بذور الحنطة والذرة والرز. أما زلال البيض (Oralbumin) فهو البروتين الرئيس لزلال (بياض) البيضة ، والكازئين (Casein) هو البروتين الرئيس للحليب ، وهي من الأمثلة الأخرى على البروتينات الغذائية ويخزن الفرتين (Ferrtin) الموجود في الأنسجة الحيوانية عنصر الحديد.

بروتينات التقلص أو الحركة Contractile Or Motile Proteins

بعض البروتينات تمنح الخلايا والكائنات الحية القابلية على التقلص ، لتغير الشكل أو للتحرك. ان الاكتين (Actin) والمايوسين (Myosin) بروتينات خيطية تعمل في الجهاز التضلعي للعضلات الهيكلية وكذلك في الكثير من خلايا غير العضلات. وهناك مثال آخر هو بروتين التيوبيولين (Tubulin) ، وهو بروتين تبني منه انيبيبات مجهرية ، والانيبيبات المجهرية من مكونات الاسواط والأهداف المهمة ، التي يمكنها دفع الخلايا وتسييرها.

البروتينات النباتية (التركيبية) Structural Proteins

تعمل الكثير من البروتينات عمل خويطات وحبال أو صفائح تقوية لتعطي التراكيب الحياتية القوة والحماية . ان المكون الرئيس للأوتار والغضاريف هو بروتين ليفي يسمى الكولاجين (Collagen) ذي قوة شد عالية جداً. أما الجلد فهو على الأغلب عبارة عن كولاجين نقي. أما الألياف الرابطة (Ligaments) فتحتوي على بروتين الايلاستين (Elastin) وهو بروتين بنائي له القدرة على التمدد (Stretching) ببعدين ويتألف الشعر والأظافر والريش بشكل رئيسي من بروتين خشن غير قابل للذوبان يسمى الكيراتين (Keratin) . أما المكون الرئيسي لخيوط الحرير وشبكات العنكبوت فهو بروتين يسمى فايبروين (Fibroin) .

البروتينات الدفاعية Defense Proteins

تدافع الكثير من البروتينات عن الكائنات الحية أمام هجوم الأنواع الأخرى أو تحميها من الجروح . حيث ان بروتينات الكلوبيولين المناعي (Immunoglobulins) أو الأجسام المضادة للفقريات هي بروتينات متخصصة تصنعها الخلايا اللمفاوية التي يمكنها تمييز وترسيب أو معادلة البكتريا المهاجمة والفيروسات (الرواشح) أو البروتينات الغريبة من الأنواع الأخرى من الأحياء.

أما الفايبرنيوجين (Fibrinogen) والثرومبين (Thrombin) فهي بروتينات تخثر الدم ، تمنع فقدان الدم عند حدوث جرح في النظام الوعائي أما سم الثعابين وسموم البكتريا ، والبروتينات النباتية السامة مثل الرايسين (Ricin) فيبدو أنها تقوم بوظيفة دفاعية.

البروتينات المنظمة Regulatory Proteins

تساعد بعض البروتينات على تنظيم النشاط الخلوي أو الفسلجي. ومن بينها الكثير من الهرمونات، مثل الأنسولين الذي ينظم العمليات الحيوية للسكر الذ ي يسبب نقصه الإصابة لمرض السكري (Diabetes) وهرمون النمو الذي تفرزه الغدة النخامية وهرمون الغدة جنب الدرقية (Parathyroid Hormane) ، الذي ينظم نقل الفوسفات وايون الكالسيوم . أما البروتينات المنظمة الأخرى فتسمى الكوابح (Repressors) التي تنظم البناء الحيوي للأنزيمات بواسطة الخلايا البكتيرية.

الجدول (6-1)

بروتينات أخرى Other Proteins

يوجد عدد كبير من البروتينات الأخرى التي تكون وظائفها غريبة ولا يمكن تصنيفها بسهولة. ان المونيللين (Monellin) عبارة عن بروتين لنبات أفريقي ذي طعم حلو المذاق جداً. وقد تمت دراسته على انه مادة محلية (تكسب المواد الأخرى مذاقاً حلواً) بديلة للسكر لا تسبب السمنة ولا تكون سامة لأغراض الاستهلاك البشري . كما يحتوي مصل دم بعض الأسماك التي تعيش في القطب الشمالي على مادة مانعة للانجماد وهي عبارة عن بروتينات مانعة للانجماد (Antifreeze Proteins) تحمي دمها من الانجماد . وتتكون مفاصل أجنحة بعض الحشرات من بروتين يسمى (Resilin) تكون له صفات مطاطية . ومن الأشياء الاستثنائية ان جميع البروتينات ، مع اختلاف صفاتها ووظائفها ، تتكون من نفس المجموعة الأساسية المتكونة من 20 حامضاً أمينياً.

يمكن تصنيف البروتينات حسب أشكالها
Proteins Can Also Be Classified According To Shape

يمكن ان تقسم البروتينات كذلك الى صنفين كبيرين جداً على أساس أشكالها وبعض الخواص الفيزياوية وهذان الصنفان هما : البروتينات الكروية (Globular) والبروتينات الليفية (Fibrous Proteins) الشكل (6-1).

الشكل (6-1)

تحلل البروتينات Hydrolysis Of Proteins

تم عزل الكثير من البروتينات بشكل بلوري نقي . ان بلورات التربسين (Trypsin) النقي وهو من الانزيمات الهاضمة التي تفرز الى داخل الأمعاء ، وصبغة السايتوكروم (C) وهي عبارة عن بروتين ناقل للالكترونات موجودان في المايتوكوندريا، هذان النوعان من البروتينات موضحة في الشكل (6-8). ومثلما يحدث بالنسبة للببتيدات البسيطة، فان التحلل المائي للبروتينات مع الحوامض أو القواعد ينتج خليطاً من الأحماض الأمينية من نوع الفا ا لطليقة، وهي عبارة عن الوحدات البنائية لتلك البروتينات المتحللة . ينتج كل نوع من البروتينات عند\ تحلله بصورة تامة نسباً خاصة ومتميزة من الأحماض الأمينية وتكون الأحماض الناتجة على شكل مزيج . يبين الجدول (6-9) تركيب خليط الأحماض الأمينية وتكون الأحماض الأمينية الناتجة من التحلل الكامل للسايتوكروم (C) وكيموتربسيوجين البقري (Bovin Chymotrypsinogen)وهي الصيغة الخاملة (المادة الأولية الخاملة) للأنزيم الهاضم (Chymotrypsin). لقد لاحظنا ان هذين النوعين من البروتينات الذين لهما وظائف مختلفة تماماً يختلفان كذلك الى حد كبير في الأعداد النسبية لكل نوع من وحدات الأحماض الأمينية التي تحتويها. لا توجد الأحماض الأمينية العشرين بكميات متساوية في البروتينات مطلقاً. فقد توجد بعض الأحماض الأمينية منفردة في كل جزيء في نوع ما من البروتينات، وقد توجد بأعداد كبيرة، وأكثر من ذلك فلا تحتوي جميع البروتينات على كل الأحماض الأمينية العشرين الشائعة. يحتوي كل نوع من البروتينات على نسب مختلفة من الوحدات البنائية من الأحماض الأمينية.

تحتوي الكثير من البروتينات ، كأنزيمات الرايبونيوكليز (Ribonuclease) والكيموتربسينوجين (Chymotripsinogen) على الأحماض الأمينية فقط ولا تحتوي على أي من المجاميع الكيميائية الأخرى، ولهذا تسمى بالبروتينات البسيطة (Simple Proteins). وعلى أية حال، فان الأنواع الأخرى من البروتينات تنتج عند تحللها مائياً بعض المكونات الأخرى إضافة الى الأحماض الأمينية، وتسمى هذه بالبروتينات المقترنة (Conjugated Proteins). ويسمى الجزء غير الحامض الأميني من البروتين المقترن بالمجموعة المترابطة (Prosthetic Group) تصنف البروتينات المقترنة على أساس الطبيعة الكيميائية لمجاميعها المترابطة، الجدول (6-10). إذ تحتوي البروتينات الدهنية (Lipoproteins) على الدهون . أما البروتينات السكرية (Glycoproteins) فتحتوي على المجاميع السكرية (إذ تعني كلمة "Glykos" الإغريقية (الحلو)) ، وتحتوي البروتينات الفلزية (Metallo Proteins) على معدن واحد أو أكثر ، مثل الحديد والنحاس والخارصين وتلعب المجموعة المترابطة عادة دوراً مهماً في وظائفها الحيوية.

الجدول (6-2)

الجدول (6-3)

السلاسل متعددة الببتيدات للبروتينات Polypeptide Chains Of Proteins

الجدول (6-2) يظهر ان للسايتوكروم (C) البشري (104) وحدة من وحدات الأحماض الأمينية متصلة بسلسلة واحدة ، أما الكيموتربسينوجين البقري فيحتوي على (245) وحدة من الأحماض الأمينية. وقد تكون للبروتينات متعددة الببتيد الموجودة في البروتينات المختلفة من 100 الى 1800 وحدة من بقايا الأحماض الأمينية. والبروتينات ليست عبارة عن مزيج من عدد من متعددات الببتيد ذات أطوال مختلفة وذات تركيب مختلف أو تسلسل مختلف. جميع الجزيئات لأي نوع من البروتينات متشابهة في تركيب الأحماض الأمينية وتسلسلها وكذلك طول السلسلة متعددة الببتيد.

تحتوي بعض البروتينات على سلسلة متعد دة الببتيد واحدة، في حين تحتوي الأخرى المسماة البروتينات قليلة الوحدات (Oligometric Proteins) على اثنين أو أكثر ، الجدول (6-4). فمثلاً ، ان الأنزيم المسمى رايبونيوكليز (Ribonuclease) ذي سلسلة متعددة الببتيد واحدة فقط في حين يكون للهيموكلوبين أربعة سلاسل متعددة الببتيد.

ان الأوزان الجزيئية للبروتينات التي يمكن تحديدها بوساطة الطرق الكيميائية الفيزيائية ، قد تبلغ حوالي (12.000) للبروتينات الصغيرة مثل صيغة السايتوكروم (C) ، الذي يحتوي على (104) وحدة من الأحماض الأمينية ، وتكون بعض البروتينات ذا ت أوزان جزيئية تبلغ حوالي 10^6 أو أكثر ، كما في حالة البروتينات ذات السلاسل متعددة الببتيد الطويلة جداً أو ذات بضعة سلاسل متعددة الببتيد.

يبين الجدول (6-4) الأوزان الجزيئية لبعض البروتينات النموذجية ولا يمكن إيجاد تقييم بسيط عن الأوزان الجزيئية للبروتينات نسبة لوظائفها. تكون للأنزيمات المختلفة مثلاً ، أوزان جزيئية قد تختلف على نطاق واسع.

يمكن حساب العدد التقريبي لوحدات الأحماض الأمينية في بروتين بسيط لا يحتوي على مجموعة مترابطة (Prosthetic Group) وذلك بتقسيم وزنه الجزئي على (110). ومع ان متوسط الوزن الجزيئي للأحماض الأمينية العشرين في البروتينات يبلغ حوالي (138) ، فان الأحماض الأمينية الأصغر التي تسود في معظم البروتينات ، ولهذا فان متوسط الوزن الجزيئي يكون قريباً من (128). ويما انه لا تزال جزيئة ماء (وزنها الجزيئي 18.0) لتوليد كل آصرة ببتيدية ، فان متوسط وزن مكونات الحامض الاميني هو حوالي 128 – 18 = 110 . يعطي الجدول (6-4) عدد مكونات الأحماض الأمينية الموجودة في البروتينات المختلفة.

الجدول (6-4)

تحتوي الخلايا على مئات ان لم تكن آلاف البروتينات المختلفة . ولهذا من الضروري الحصول على تحضيرات نقية من بروتين ما قبل ان نستطيع تحديد تركيب البروتين من الأحماض الأمينية وتسلسل هذه الأحماض. فكيف يمكن فصل بروتين معين وليكن أنزيماً ما من مئات الأنواع الأخرى من البروتينات الموجودة في مستخلص خلية أو نسيج معين وتنقيته ؟

<u>أولاً:</u> يمكن فصل البروتينات عن المواد ذوات الأوزان الجزيئية الواطئة الموجودة في مستخلص خلية أو نسيج معين بعملية تسمى الديلزة (Dialysis)- فصل البروتينات أو المواد الغروية باستخدام غشاء معين، الشكل (6-11) حيث تسترجع الجزيئات الحيوية العملاقة مثل البروتينات في داخل كيس من مواد ذات ثقوب متناهية في الصغر مثل السيلوفين (Cellophane) ، وعليه فعندما يوضع مثل هذا الكيس الذي يحتوي على مستخلصات الخلية أو النسيج في الماء، فان الجزيئات الصغيرة في مستخلصات الخلية أو النسيج كالأملاح مستمر من خلال الثقوب لكن البروتينات ذوات الأوزان الجزيئية العالية ستبقى داخل الكيس . وحالما يصبح مزيج البروتينات خالياً من الجزيئات المجهرية بواسطة عملية النفاذ، يمكن فصل البروتينات، بالاعتماد على

حجم الجزيئات باستخدام الترشيح الهلام ي (Gell Filtration). في هذه الطريقة التي هي ا حد أشكال الكروماتوكرافي ، يمرر المحلول الذي يحتوي على خليط البروتينات خلال عمود يحتوي على كريات صغيرة جداً مثقبة من متعدد الجزيئات م حياً (Hydrated) الى حد كبير. فتستطيع جزيئات البروتينات الأصغر من ان تمر الى الفتحات الموجودة في الكرات وعليه تعاق في انسيا بيتها خلال العمود ، الشكل (6-12) ، إلا ان الجزيئات الحيوية العملاقة من البروتينات لا تستطيع ان تنفذ الى الكرات وتمر خلال العمود بسرعة اكبر . وستمر جزيئات البروتينات ذات الحجوم المتوسط خلال العمود بسرعات متوسطة، معتمدة على الدرجة التي تنفذ بها الى الكرات . ويسمى هذا العمود من الترشيح الهلا مي بالغربيل (المنخل) الجزيئي (Molecular Sieve).

ثانياً: يمكن فصل البروتينات بعضها عن بعض بواسطة عملية الترحيل الكهربائي على أساس نوع الشحنة وعدد الشحنات الكهربائية التي تشتر ك بها مجاميع (R) التي يحتويها وكذلك بواسطة مجاميع النهاية الأمينية المشحونة والنهاية الكاربوكسيلية التي تحمل شحنة كهربائية . فكما هو الحال في الببتيدات البسيطة ، فان السلاسل متعددة الببتيد من البروتينات ، تكون ذوات نقاط تعادل الشحنة متميزة ، تلك التي تعكس العدد النسبي من مجاميع (R) الحامضية والقاعدية ، الجدول (6-13). عند أي أس هيدروجين (PH) سيحتوي مزيج البروتينات على بعض البروتينات ذوات الشحنة السالبة ، وبعض البروتينات ذوات الشحنة الموجبة وقسماً آخر لا يحتوي على شحنة كهربائية. وعند وضع مثل هذا المزيج في مجال كهربائي ، فان البروتينات ذوات الشحنة الموجبة ستتحرك نحو القطب السالب ، في حين تتحرك البروتينات ذوات الشحنة السالبة نحو القطب الموجب بينما تبقى الجزيئات البروتينية عديمة الشحنة ثابتة في مكانها بدون ان تنجذب لأي من القطبين. وأكثر من هذا فان تلك الجزيئات البروتينية ذوات الكثافة الغالبة نسبياً من الشحنات ستتحرك نحو القطب بأسرع مما تحرك جزيئات البروتينات ذوات الكثافة الواطئة نسبياً من الشحنات . وغالباً ما تتم عملية الترحيل الكهربائي في قالب (Matrix) يتألف من قطعة من الورق أو خلال السليلوز أو شريحة من مادة هلامية محية للماء للإبقاء على جزيئات البروتين المفصول من الانتشار بسرعة خلال الطور المائي ، الشكل (6-13).

ثالثاً : هناك طريقة فعالة لفصل البروتينات بعضها عن بعض هي كروماتوغرافي التبادل الأيوني (Ion - Exchange Chromatography) مبنية على أساس الفرق بين البروتينات بخصوص الكثافة وإشارة شحناتها الكهربائية عند أس هيدروجين معين . ولهذا يمكن استخدام كروماتوكرافي التبادل الأيوني لفصل الأحماض الأيونية والببتيدات والبروتينات.

ولفصل بروتين معين عن بروتينات كثيرة أخرى نحتاج الى وسائل معينة لقياس البروتين لأجل ضبط خطوات التنقية التي ستستمر . فإذا كنا نريد تنقية أنزيم معين ، مثلاً ، يمكن قياس نشاطه التحفزي الذي سيميز ذلك البروتين عن غيره عن البروتينات الأخرى.

الجدول (6-5)

تعاقب الأحماض الأجنبية للسلاسل الببتيدية المتعددة:

Amino Acid Sequence Of Polypeptide

لقد أسرع اكتشافان رئيسان في عام 1953 في ظهور عصر الكيمياء الحيوية الحديثة. ففي خلال هذا العام استطاع كل من جيمس داتسون (James D. Watson) وفرانسيس كريك (Francis Crick) من جامعة كامبردج في انكلترا ان يستنتجا البنية الحلزونية المزدوجة للـ (DNA) واقترحا اسساً تركيبية للتكرار المضبوط للـ (DNA). ومن الأشياء الموجودة ضمناً في مقترحهم كانت نكرة ان تسلسل الوحدات النيوكليوتيدية في الـ (DNA) يحمل رموز معلومات وراثية . وفي تلك السنة نفسها استطاع فريدريك سانجر (Frederic Sanger) الذي يعمل في نفس الجامعة ، ان يضع تسلسل الأحماض الأمينية في السلاسل متعددة الببتيد لهرمون الأنسولين، وهذه بحد ذاتها أكثر الانجازات أهمية ، إذ كان يعتقد منذ زمن بعيد بان توضيح تسلسل الأحماض الأمينية لمتعدد الببتيد هو هد ف بدون جدوى . لقد جاء انجاز سانجر بنفس وقت فرضية واتسون كريك ، وكذلك اقترح بان تسلسل النيوكليوتيد للـ (DNA) وتسلسل الأحماض الأمينية للبروتينات ذات علاقة بعضها ببعض. لقد قادت هذه الفكرة، خلال فترة عقد من الزمن ، الى تشخيص كلمات الشفرة النيوكليوتيدية للـ (DNA) والـ (RNA) التي تحدد تسلسل جزيئات البروتين.

الشكل (6-13)

ولحد انجاز سانجر ، الذي تطلب بضع سنوات من العمل ، لم يكن مؤكداً حتى ذلك الحين ان جميع الجزيئات لأي نوع معين من البروتينات متشابهة تماماً في الوزن الجزيئي والب نية الحامضية الأمينية أم الآن ، فان تسلسلات الأحماض الأمينية لمئات البروتينات المختلفة من الكثير من أنواع الكائنات الحية المختلفة باتت معروفة لنا. ان تسلسل الأحماض الأمينية لسلسة متعدد الببتيد قد تم تحديده بواسطة الأسس التي وضعها سانجر أولاً . ولا تزال هذه الأسس مستخدمة لحد الآن ، وان كانت تستخدم الآن مع وجود العديد من الاختلافات والكثير من التحسينات وبالتفصيل. توجد ستة خطوات أساسية لحل تسلسل الأحماض الأمينية لأي مركب متعدد الببتيد.

الخطوة الأولى: تعين البنية الحامضية الأمينية

Step-1: Determining The Amino Acid Composition

ان الخطوة الأولى هي تحلل جميع الأواصر الببتيدية للمركب متعدد الببتيدات النقي . ثم يتم تحليل مزيج الأحماض الأمينية المتكون من عملية التحلل المائي بواسطة الكروماتوكرافيا التبادل الأيوني ، لغرض تعين نوعية الأحماض الأمينية الموجودة والعدد النسبي لكل واحد منها.

الخطوة الثانية: تشخيص مكونات النهايات الطرفية الأمينية والكاربوكسيلية

Step-2: Identifying The Amino – And Carboxyl – Terminal Residues

أما الخطوة اللاحقة فهي لتشخيص بقايا الحامض الأميني عند نهاية سلسلة متعدد الببتيد التي تحمل مجموعة حامض الفا الحر، وهي النهاية الأمينية . ولهذا السبب (الغرض) طور سانجر الكاشف المسمى 1- فلورو- 4,2 داي نايتروبنزين ، الذي يمكنه ان يوسم مكون النهاية الأمينية للسلسلة على شكل مشتق اصفر

اللون وهو مشتق 4,2 - داي نايتروفنيل (DNP). وعندما يتعرض مثل هذا المشتق لـ (DNP) لمتعدد الببتيد للتحلل المائي مع حامض ما ، فان جميع الأواصر الببتيدية في السلسلة تتخلل وعلى أية حال ، فان الآصرة التساهمية الموجودة بين مجموعة 4,2 - داي نايتروفيل ومجموعة الفا امين (الأمينية من نوع الفا) لبقية النهاية الأمينية ستكون موجودة في المواد المتحللة كمشتق 4,2 - داي نايتروفيل ، الشكل (6-6) ويمكن فصل هذا المشتق بسهولة عن الأحماض الأمينية الحرة غير البديلة ويتم تشخيصه بواسطة المقارنة الكروماتوكرافية مع مشتقات قياسية لمركب داي نايتروفيل للأحماض الأمينية المختلفة.

الشكل (6-14)

أما المادة الكاشفة الأخرى التي تستخدم لتوسيم بقية النهاية الأمينية فهي (Danysl Chloride)- كلوريد الدانسيل- الشكل (6-14) الذي يتفاعل مع المجموعة الأمينية من نوع الفا (Amino Group-) لإنتاج مشتقات الداتسيل . ان هذا المركب شديد التألق ويمكن لذلك كشفه وقياسه بتراكيز واطئة اوطيء من تراكيز مشتقات الداي.

كما يمكن كذلك تشخيص النهاية الكاربوكسيلية لبقايا الحامض الأميني لمتعدد الببتيد. ففي إحدى الطرق يتم حضن متعدد الببتيد مع الأنزيم المسمى كاربوكسي ببتيديز (Carboxy Peptidase) الذي يحلل فقط الآصرة الببتيدية الموجودة عند النهاية الكاربوكسيلية للسلسلة وبواسطة تحديد أي نوع من الأحماض الأمينية يتم إطلاقه

أولاً بفعل الأنزيم كاربوكسي ببتيديز (Carboxy Peptidase) على متعدد الببتيد ، يمكن تشخيص مكون النهاية الكاربوكسيلية.

وبوساطة استخدام مكونات النهاية الأمينية والنهاية الكاربوكسيلية لمتعدد الببتيد الذي تم تشخيصه، فسوف نثبت نقطتين مهمتين كمصدر في تسلسلها الحامض الأميني.

الخطوة الثالثة: تكسير السلسلة متعددة الببتيد

Step-3: Fragmenting The Polypeptide Chain

تجري الآن تكسير نموذج آخر من السلسلة متعددة الببتيد السليمة، الى قطع اص غر من ببتيدات مفيدة تحتوي على (10-15) وحدة من وحدات الأحماض الأمينية كمعدل. والهدف هو فصل هذه الوحدات وتعين التسلسل الحامض الأميني لكل واحدة منها.

يمكن استخدام بضعة طرق لتكسير سلسلة متعدد الببتيد . والطريقة الشائعة والمألوفة هي التحلل المائي الأنزيمي الجزئي لمتعدد الببتيد بواسطة الأنزيم الهاضم وهو التربسين (Trypsin). ان هذا الأنزيم محدد جداً في فعاليته التحفيزية. فهو يحفز التحلل المائي لهذه الأواصر الببتيدية التي تكو ن فيها مجموعة الكاربوكسيل قد أسهم بها أما الحامض الأ ميني اللايسين أو الارجنين ، وبغض النظر عن الطول أو تسلسل الأحماض الأمينية للسلسلة ، الجدول (6-6). ان عدد الببتيدات الأصغر التي ينتجها انشطار التربسين يمكن استنتاجه من العدد الكلي لمكونات اللابسين أو الارجنين في متعدد الببتيد الأصلي. فمتعدد الببتيد ذي خمسة مكونات لابسين / ارجنين سينتج عادة ستة ببتيدات اصغر عند شطره بالتربسين . وأكثر من هذا ، فستحتوي جميع هذه الببتيدات عدا واحدة ، على بقايا اللابسين أو الاجنين عند موقع النهاية الكاربوكسيلي. ان الشظايا التي تنتج بفعل أنزيم

الجدول (6-6)

يتم فصلها بعد ذلك بعضها عن البعض بواسطة كروماتوكرانيا التأين الأيوني على عمود بواسطة الترحيل الكهربائي الورقي ، أو بواسطة الكروماتوكرافي، غالباً ما تجري باتجاهين لغرض الحصول على الخريطة الببتيدية ، الشكل (6-15).

الشكل (6-15)

الخطوة الرابعة: تشخيص تسلسلات القطع الببتيدية
Step-4: Identifying The Sequences Of The Peptide Fragments

ان تسلسل الأحماض الأمينية في كل قطعة ببتيدية نتجت من الخطوة الثالثة يتم تحديده بعد ذلك، وقد صممت طريقة كهربائية من قبل بيهرايدمان (Pehr Edman) استخدمت عادة لهذا الغرض. ان طريقة تكسير ايدمان (Edman Degradation) توسم وتزيل مكونات النهاية الأمينية من الببتيدات فقط، في حين تترك كل الأواصر الببتيدية الأخرى سليمة ، الشكل (6-9) بعد إزالة وتشخيص مكونات النهاية الأمينية بهذه الطريقة ، فان مكونات النهاية الأمينية التي تعرضت يمكن الآن ان توسم وتزال بإعادة نفس السلاسل من تؤدي ال ى الحصول على التسلسل الحامضي الأميني الكلي للببتيد باستخدام نموذج واحد فقط . وبين الشكل (6-9) كيف تعمل تجزئة ايدمان.

إذ ان الببتيد يتفاعل أولاً مع الفنيل ايسو تايوسينيت (Phenylisothiocyanate) الذي يتحد مع المجموعة الأمينية (الفا) الحرة لمكونات النهاية الأمينية. ان معاملة الببتيد بالحامض المخفف البارد يزيل مكونات النهاية الأمينية ويحولها الى مركب (Phenylthiohydantion) الذي يمكن تشخيصه الآن بواسطة الطرق الكروماتوكرافية.

أما لكون السلسلة الببتيدية سليماً. ويتعرض الببتيد المقطوع الآن الى جولة أخرى من هذه التفاعلات والتي تسمح بتشخيص مكون النهاية الأمينية الجديدة. ولهذا فبواسطة الإزالة المتكررة لمكونات النهاية الأمينية لببتيد ما بفعل هذه الطريقة (طريقة الطرح) فان تسلسل الأحماض الأمينية للببتيدات ذوات مكونات تتراوح ما بين 10 – 20 يمكن تحديدها بسهولة.

ويتم تحديد تسلسل جميع القطه الببتيدية الناتجة بفعل أنزيم التربسين بهذه الطريقة . وعليه بقيت عندنا مشكلة تحديد الكيفية التي تترتب بها هذه القلع في السلسلة متعدد الببتيد الأصلية.

الشكل (6-16)

الخطوة الخامسة: انشطار سلسلة متعدد الببتيد الأصلية بطريقة ثانية

Step-5: Clearage Of The Original Polypeptide Chain By A Second Procedure

لأجل ترتيب القطع الببتيدية التي كونها التربسين ، ينشطر نموذج آخر من متعدد الببتيد السليم الى قطع اصغر بطريقة أخرى ، وهي طريقة تسمح بشطر الأواصر الببتيدية عند النقاط الأخرى غير التي يشطرها التربسين. وهناك فائدة من استخدام طريقة كيمياوية بدلاً من استخدام طريقة أنزيمية. ان الكاشف (Reagent) المسمى بروميد السيانوجين (Cyanogen Bromide) مفيدة بشكل خاص ، لأنها تشطر فقط تلك الأواصر الببتيدية التي تكون فيها مجموعة الكاربوفيل قد ساهمت بها بقايا الميثيونين ، الجدول (6-6). ولهذا ، فا ذا كان متعدد الببتيد يحتوي على ثمانية وحدة من المثيونين ، فان انشطاره مع بروميد السيانوجين سينتج تس ع قطع ببتيدية. وتفصل القطع الناتجة بهذه الطريقة عن بعضها بطرق الترحيل الكهربائي (Electrophoresis) أو الكروماتوكرافي. وكل واحدة من هذه الببتيدات الصغيرة سنتعرض الآن الى تكسير ايدمان . كما هو في الخطوة الرابعة أعلاه لتشخيص تسلسل مكوناتها من الأحماض الأمينية.

أصبحت لدينا الآن مجموعتان مختلفتان من القطع الببتيدية ، احدها بفعل التربسين والأخرى بفعل الانشطار الكيميائي مع بروميد السيانوجين ونحن نعرف كذلك تسلسل الأحماض الأمينية في كل مجموعة من القطع الببتيدية.

الخطوة السادسة: تسلسل القطع الببتيدية وذلك بإثبات وجود التداخلات

Step-6: Ordering Peptide Fragments By Establishing Overlaps

نتطرق الآن الى شرح تسلسلات الأحماض الأمينية في كل قطعة يتم الحصول عليها من متعددات الببتيد الأصلية بواسطة طريقتي الانشطار ، وهدفنا من ذلك هو إيجاد الببتيدات من الطريقة الثانية التي كانت تسلسلاتها قد أثبتت استمرارية أو تداخلات بين القطع التي تم الحصول عليها بطريقة الانشطار الأولى. ويوضح الشكل (6-17) الأساس لذلك. ان الببتيدات المتداخلة التي تم الحصول عليها من عملية التكسير الثانية تنتج التسلسل الصحيح للقطع الببتيدية الناتجة من الانشطار أول. وأكثر من هذا ، فان مجموعتي القطع تدقق تحدها الأخرى الممكنة في تحديد تسلسل الأحماض الأمينية في كل قطعة.

الشكل (6-17)

وفي بعض الأحيان فان طريقة الانشطار الثاني تفشل في ان تجد تداخلات لاثنين أو أكثر من الببتيدات من الانشطار الأول. وفي هذه الحالة يجب استخدام طريقة انشطار ثالثة أو حتى طريقة رابعة لأجل الحصول على مجموعة من الببتيدات يمكنها ان توفر التداخلات الضرورية لإتمام التسلسل. أما انشطار متعدد الببتيد بواسطة أنزيمات أخرى محللة للبروتينات مثل الكيموتربسين (Chmotrypsin) أو الببسين (Pepsin) ، فقد تستخدم ، مع ان هذه الأنزيمات هي لكل خصوصية في تأثيراتها على الأواصر الببتيدية من التربسين.

الأنسولين Insulin

لقد رأينا ان المنطق والوسيلة قد استخدما لتحديد تسلسل الأحماض الأمينية للسلاسل متعدد الببتيد. ولنشرح نتائج تحديد سانجر لتسلسل الأحماض الأمينية للأنسولين البقري ، والموضحة في الشكل (6-18) . للأنسولين البقري وزن جزيئي يبلغ حوالي (5700) . ويحتوي على سلسلتين متعدد الببتيد، إذ تحتوي سلسلة (A) على بقايا (21) حامضاً أمينياً. وسلسلة (B) تحتوي على مكونات (30) حامضاً أمينياً. ترتبط السلسلتان بواسطة جسور عريضة ثنائية الكبريتيد (-S-S-) ، وإحدى السلاسل تحتوي على أواصر داخلية ثنائية الكبريتيد.

لقد تم فصل السلسلتين عن بعضها أول مرة بواسطة انشطار الأواصر ثنائية الكبريتيد. ولهذا الغرض فقد استخدم سانجر الكاشف المؤكد المسمى (Performic Acid) الذي يشطر كل بقية من السيستين الى اثنين من مكونات حامض السيستيك (Cysteic Acid) ، الشكل (6-19) ، واحدة في كل سلسلة من السلاسل. ثم تم فصل

السلسلتين عن بعضهما وان تسلسلات الأحماض الأمينية لكل سلسلة منهما قد تم تحديدها . ولا يظهر فحص تسلسلات الأحماض الأمينية لكلا السلسلتين أي نمط واضح أو الظهور الدوري لأي واحد من الأحماض الأمينية ، وأكثر من هذا ، فان التسلسلات الأحماض الأمينية للسلسلتين مختلفة تماماً.

التحديد الناجح لتسلسل الأحماض الأمينية لسلاسل الأنسولين اقتضى إجراء دراسة مكثفة للعلاقات بين تركيب هرمونات الأنسولين التي تم عزلها من الأنواع المختلفة من الكائنات الحية ونشاطها الحياتي في تحفيز العمليات الحيوية للكلوكوز. وتكون كل من سلسلتي الأنسولين (أ) و (ب) مطلوبة في فعاليتها الحياتية ، وأكثر من ذلك ، فان الجسور ثنائية الكبريتيد يجب ان تكون سليمة . ان إزالة أجزاء من أي من السلاسل بواسطة الانشطار الانتقائي ينتج عنه فقدان لبعض أو لكل الفعالية الحياتية. ومع ان هرمونات الأنسولين التي تم عزلها من غدة البنكرياس لبضعة أنواع من الأحياء ، كالبقر والخنزير والأغنام والحوت ، تكون فعالة هرمونياً في حالة استخداماتها للإنسان وتستخدم في معالجة المرضى المصابين بداء السكر ، فان هذه الجزيئات الهرمونية غير متشابه مع الأنسولين البشري. أما الشيء المهم فهو ان الأحماض الأمينية الموجودة في مواقع معينة في كل واحد من سلاسل الأنسولين تكون دائماً متشابهة بغض النظر عن نوع الكائن الحي الذي تم الحصول على الأنسولين منه. وعلى أية حال ، قد تختلف الأحماض الأمينية الموجودة في مواقع أخرى من السلسلة من نوع لآخر من الكائنات الحية. ان مثل هذهِ الملاحظات توحي بقوة الى ان الفعالية الحياتية للأنسولين تعتمد على تسلسلات الأحماض الأمينية في سلاسلها. وكذلك على ربط السلاسل بالجسور العرضية في نقاط محددة.

بعد النجاح الذي حققه سانجر بفترة وجيزة تشجع الباحثون الآخرون على العمل لتحديد تسلسل الأحماض الأمينية حتى للسلاسل متعددة الببتيد الطويلة ففي تسلسل قصير تم تحديد تسلسل الأحماض الأمينية في هرمون الموجه القشري (الموجهة القشرية) (Corticotropin) وهو الهرمون الذي يفرزه الجزء الأمامي من الغدة النخامية والذي يحفز قشرة " الغدة الكظرية ". ولهذا الهرمون سلسلة واحدة متكونة من بقايا (39) حامضاً أمينياً وذات وزن جزيئي يبلغ حوالي (4600). ففي أواخر الخمسينات تم التوصل لأول تحليل لتسلسل الأحماض الأمينية لبروتين الأنزيم المسمى رايبونيوكليز (Ribonuclease) من قبل ستانفورد مور (Stanford Moore) ووليم ستين (William Stein) في مؤسسة روكفلير (Rockefeller) وكذلك من قبل كريسيتين انفنسين (Christian Anfinsen) ومجموعة من الباحثين في المؤسسات الصحية الوطنية . لأنزيم الرايبونيوكليز (Ribonuclease) بقايا (124) حامضياً أمينياً في السلسلة الواحدة والتي تحتوي على أربعة جسور عرضية من ثنائي الكبريتيد (S-S) ضمن السلاسل ، الشكل (20-6).

أما نقطة التحول الأخرى اللاحقة فكانت تشخيص تسلسلات الأحماض الأمينية لنوعين من السلاسل متعددة الببتيد من الهموكلوبين البلوري. وكان ذلك أول تحليل لتسلسل الأحماض الأمينية للبروتين قليل الجزيئات. يحتوي الهيموكلوبين على أربعة سلاسل متعددة الببتيد ، تسمى الكلوبينات (Globins) اثنين منها الفا- كلوبين متشابهة (ذات 146 مكوناً . وهذه السلاسل لا ترتبط تساهمياً بعضه ا ببعض في جزيء الهيموكلوبين ولكنها متحدة بقوة من خلال الأواصر الهيدروجينية وبواسطة التفاعلات الكارهة للماء . لقد تم فصل الكلوبيولبنات الفا وبيتا وان تسلسل الأحماض الأمينية لكل واحد منها تم تحديده من قبل مجموعتين واحدة في الولايات المتحدة والأخرى في ألمانيا . ومن ضمن السلاسل الببتيدية الأطول التي تم استنتاج أحماضها الأمينية الكاملة هو التربسينوجين البقري (229) مكوناً ، والكيموتربسينوجين البقري (245) مكوناً ، وأنزيم كليسر الديهايد ديهايدروجينز (333) مكوناً والسلسة المنفردة لزلال مصل الدم البشري (582) مكوناً.

الشكل (6-20)

يمكن القيام بالكثير من الخطوات المنفردة والمتسلسلة اللازمة لتحديد تسلسل الأحماض الأمينية للسلاسل الطويلة متعددة الببتيدات وذلك بمساعدة أجهزة التحليل الذاتية والمبرمجة. حتى ان تكسير ايدمان يمكن القيام بها بواسطة ماكنة مبرمجة تسمى جهاز قياس التسلسل (Sequenator) الذي يخرج المواد الكاشفة بنسب

مناسبة ، ويقوم بعملية فصل المنتوجات وتشخيصها وتدوين النتائج على ورقة تسجيل خاصة. وقد أدت مثل هذه الأجهزة الى اختزال الوقت والجهد اللازمين لتحديد تسلسل الأحماض الأمينية لمركبات متعدد الببتيد . وأكثر من ذلك ، فان هذه الطرق الحديثة حساسة جداً. فيمكن لأجهزة تحليل الأحماض الأمينية ان تحدد بسرعة كم تبلغ كمية كل حامض أميني موجود في طبعة إبهام أصبع واحدة للإنسان ! ونحتاج الى مليغرام واحد فقط من البروتينات لتحديد تسلسله العام من الأحماض الأمينية.

المسخ Denaturation

لقد ركزنا خلال هذا الفصل على العلاقة بين تسلسل الأحماض الأمينية للبروتينات وفعاليتها الحيوية وتخصصها النوعي . وهناك الكثير مما يخص البروتينات أكثر م ن تركيبها البنائي الأولي " Primary Structure " وهو المصطلح الذي نستخدمه لنشير الى تركيبها التساهمي وتسلسل " الأحماض الأمينية ". ويبدو هذا بسهولة في الخاصية المألوفة للبروتينات التي لم نتطرق إليها حتى الآن ، فعندما يسخن محلول بروتين ما كزلال البيض الى حوالي 60 أو 70° م يصبح المحلول عكراً (غير صافي ، بالتدريج وتتكون مواد متخثرة خيطية وهذه هي عملية مألوفة ، لأنها تحدث عند سلق بيضة ما . إذ ان بياض البيض الذي يحتوي على الزلال ، يترسب (يتخثر) على شكل مادة صلبة بيضاء اللون عند تسخينه ، وبعد تخثر بياض البيض بفعل الحرارة لهذه الطريقة ، فانه لا يذوب من جديد عند تبريده لينتج محلولاً نقياً مثلما كان في بياض البيض الأصلي غير المسخن . ولهذا فان التسخين قد غير بياض البيض ، بطريقة لا عكسية . يحدث هذا التأثير للحرارة مع جميع البروتينات الكروية ، بغض النظر عن الحجم أو الوظيفة الحياتية ، مع العلم ان درجة الحرارة المضبوطة التي يحدث عندها تغير الصفات الطبيعية للبروتينات مختلفة . ان هذا التغير في البروتين الذي ينتج بواسطة الحرارة يسمى المسخ (Deneturation) أو تغير الصفات الطبيعية للبروتين. تسمى البروتينات في حالتها الطبيعية بالبروتينات الأصلية ((الأم)) (Native Proteins).

أما الخطوة الثانية المهمة في مسخ البروتينات ، فهي فقدان البروتينات لفعاليتها الحيوية دائماً . ولهذا ، عندما يتم تسخين محلول مائي لأنزيم ما الى درجة الغليان لبضع دقائق ويتم تبريده بعد ذلك، فانه يصبح عديم الذوبان وأكثر أهمية من ذلك ، فانه يكون غير فعال تحفيزياً. ويحدث تغير الصفات الطبيعية للبروتينات ليس بفعل الحرارة فقط ، بل بفعل تغير قيم الأس الهيدروجيني المتطرفة ، وبفعل مذيبات عضوية مثل الكحول أو الأسيتون وكذلك بواسطة بعض المواد الذاتية مثل اليوريا أو عند تعرض البروتين الى مواد منظفة ، أو بواسطة التحريك أو الرج الشديد لمحلول البروتينات مع طور هوائي حتى تتكون فقاعات . وكل واحدة من هذه العوامل ، تسبب فقدان البر وتين لصفاته الطبيعية وهي في حقيقتها معادلة خفيفة التأثير . وفي الحقيقة فان الفحوصات المباشرة أظهرت انه عندما تجري عمليات مسخ (تغير في الصفات الطبيعية) ، لا تتكسر أي أواصر تساهمية في هيكل سلسلة متعدد الببتيد. ولهذا فان تسلسل الأحماض الأمينية المميز للبروتين لا يزال سليماً بعد عملية المسخ ، مع ان معظم الفعالية الحيوية للبروتينات قد تم فقدانها . ويمكن ان نستنتج ان الفعالية الحيوية للبروتينات تعتمد على شيء ما أكثر من تسلسل الأحماض الأمينية وحده.

فما هو الجواب عن هذا الشيء المهم ؟ وبكل بساطة نجيب بان البروتينات ذوات تراكيب عالية ، أعلى من تركيبها البنائي الأولى. وباختصار ، فان السلاسل متعددة الببتيدة المرتبطة تساهمياً للبروتينات الأم تكون مطوية بثلاثة أبعاد بنمط خاص بكل نوع من البروتينات . ان الطريقة المحددة التي تلتف بموجبها السلسلة تمنح كل بروتين صفة نشاطه الحيوي ، الشكل (6-21)

الشكل (6-21)

عندما تتغير الصفات الطبيعية لبروتين ما، يتمزق الترتيب المميز ثلاثي الأبعاد لسلاسل متعددة الببتيد وينفك التواءه على شكل تراكيب عشوائية، دون إحداث أي عطب في البناء التساهمي . وعليه فان جزيئات ا لبروتينات الأصلية (الأم) تكون هشة جداً وتتمزق بسرعة بفعل الحرارة وغيرها من المعاملات الخفيفة . فعندما نحاول فصل وتنقية البروتينات وندرس سلوكيتها الحياتية يجب ان نتعامل معها بلطف لكي نتجنب تشويه صفاتها الطبيعية.

يمكن تصنيف البروتينات الى نوعين رئيسيين : الروتينات الليفية (Fibrous Proteins) التي تكون سلاسلها متعددة الببتيد مرتبة على شكل خيوط طويلة او صفائح والبروتينات الكروية (Globular protein) التي تكون سلاسلها المتعددة الببيتد ملتفة بقوة على هيئة اشكال كروية . ومن الناحية الحيوية تلعب البروتينات الليفية ادوارا مهمة جدا في تشريح وفسلجة الحيوانات وقد تشكل نصف او اكثر من نصف وزن بروتينات الجسم الكلي في الحيوانات الفقرية الكبيرة. فهي توفر الحمناية الخارجية لانها المكونات الرئيسية للطبقة الخارجية للجلد والشعر والريش والاظافر والقرون . وتوفر البروتينات الليفية الدعم والشكل والهيئة لانها المكونات العضوية الرئيسية في الانسجة الرابطة وتشمل الاوتار والغضاريف والعظام وطبقات الجلد الداخلية .

الفا- كيراتين & - Keratin

ان مركبات الفا- كيراتين (& - Keratin) هي البروتينات الليفية الرئيسية وهي التي توفر الحماية الخارجية للفقريات :- فهي تؤلف حوالي كل كل الوزن الجاف للشعر ، الصوف ، الريش ، الاظافر ، المخالب ، الاصداف ، القرون ، الاظلاف ، صدفة الترس للسلاحف ومعظم الطبقة الخارجية للجلد . ان مركبات الفا- كيراتين ه ي عبارة عن عائلة من البروتينات. وهي على العموم متشابهة في تركيبها من ناحية الاحماض الامينية وهي تحتوي بشكل خاص على بقايا السبستين ولها نفس الترتيب الفراغي لسلاسلها متعددة الببتيد.

ويعتقد بأن الشعر والريش والاظافر وغيرها من التراكيب الخارجية هي من هذا النوع من المركبات حيث تكون واقعة خارج الخلايا . وفي الواقع ان مركبات الكيراتين تتكون ضمن خلايا بشرة الجلد التي تشتق منها الاظافر والريش والشعر . ان السلاسل متعددة الببتيد للكيراتين اصبحت منظمة على شكل خويطات في خلايا الشعر. وتترتب هذه الخويطات على شكل سوط او قابلو ، يملأ خلية الشعر . ثم تتسطح خلاياالشعر وتموت ، ثم تكون جدران الخلايا غطاء يشبه الانبوب حول الشعرة يدعة البشرة (Cuticle) وتنمو الاظافر والريش والقشور عند الزواحف بالطريقة نفسها ،ولكن بنمط اكثر تعقيدا الشكل (6-1)

لعبت مركبات الفا- كيراتين و خاصة الشكل الموجود في الشعر والصوف دورا مهما في تطور المعرفة الحالية لتركيب البروتين. وتوجد سلاسلها متعددة الببتيد على شكل صفوف طويلة ملتوية منحتها سهولة التحليل بطرق الاشعة السينية ولهذا تصبح القاعدة التي نقف عليها لفهم مثل هذه التركيب وغيرها من التركيب ا لاكثر تعقيدا وهي البروتينات الكروية.

درس كل من بولنج وكوري كيف يمكن للسلسلة متعددة الببتيدات تلتف او تنطوي على ضوء التقيدات التي تسلطها الاواصر الببتيدية المسطحة والصلبة. وبخاصة تلك التي تؤلف اشكالا بنيوية يمكن ان تعزى الى الوحدة المتكررة ذات 0.54 نانومتر في الفاكيراتين الشعر . ان ابسط الترتيبات التي يمكن للسلسلة متعددة الببتيدات ان تتخذها مع اواصرها الببتيدية الصلبة هو التركيب الحلزوني الموضح في الشكل (6-2) ، الذي يسمى حلزون الفا (Helix -&) ففي هذا التركيب يكون الهيكل الساند لمتعدد الببتيد ملتويا بقوة حول المحور الطولي للجزئ ، في حين ان مجاميع (R) لبقايا الاحماض الامينية تمتد نحو الخارج من الهيكل الحلزوني . ان الوحدة المتكررة هي عبارة عن دورة واحدة للحلزون ، تمتد الى حوالي 0.54 نانومتر على امتداد المحور الطولي ، وشبيهة جدا بالتكرارية التي تمت ملاحظتها عند تحليل كيراتين الشعر بواسطة الاشعة السينية . اما السؤال الذي يطرح نفسه فهو اما هي القوى التي تمسك بحلزون الفا بهذه الهيئة ؟ لماذا يتكون مثل هذا الحلزون عندما تكون التشكيلات الاخرى ممكنة ؟ والجواب هو ان حلزون الفا يكون ثابتا ، وهي التشكيلات المضلة للسلسلة متعددة الببتيد للكيراتين من نوع الفا ، لانها تسمح لاصرة الهيدروجين لان تتكون بين كل ذرة هيدروجين متصلة بذرة النتروجين ذات الشحنة السالبة للاصرة الببتيدية. وذرة الاوكسجين الكاربونيلي السالبة الشحنة ، لحامض الاميني الرابع الواقع خلفها في الحلزون الشكل (6-3). وتشترك كافة الاواصر الببتيدية في السلسلة في عملية تكوين الاواصر الهيدروجينية هذه . وعليه فكل لفة من حلزون الفا تمسك باللفات الملامسة لها بواسطة بضع اواصر هيدروجينية ، فنعطي التركيب ثبوتية . ولهذا نرى ان حلزون الفا هو تركيب بنيوي ثابت ، للسلسلة متعددة الببتيد بسبب وجود نوعين من التقيدات المسلطة على الدوران الحر حول الاواصر المفردة وهي ان الاواصر الببتيدية المسطحة لاتدور وتكون الاواصر الهيدروجينية داخل السلاسل . وتمكننا الان الكثير من الادلة ان نكون متأكدين من ان السلاسل متعددة الببتيد لمركبات الفا- كيراتين نمتلك مثل هذه التشكيلات الحلزونية من نوع الفا المميزة. وقد اظهرت التجارب الاضافية المتعلقة بدراسة النماذج المجسمة بان حلون الفا يمكن ان يتكون مع الاحماض الامينية من نوع (L) او (D) ، وعلى اية حال يجب ان تكون جميع الاحماض الامينية من ايسومر فراغي واحد او اكثر ، وبما انه لايمكن ان يتكون حلزون من السلسلة متعددة الببتيد التي تحتوي على خليط من بقايا (L) و(D) واكثر من ذلك ، يمكن بناؤ لفات حلزونية يمينية او يسارية من الاحماض الامينية الطبيعية من نوع (L) حيث يكون الحلزون الايمن هو الشكل الموجود في معظم البروتينات الليفية

الشكل (6-2)

الشكل (6-3)

الشكل (6-4)

الكولاجين والألاستين Collagen And Elastin

يتكون النسيج الرابط من التراكيب الخارجية والعناصر المقوية للجسم التي تشكل جزء كبيرا من المادة العضوية الكلية الراقية . اذ ان الاوتار والالياف الرابطة والغضاريف والحشوة العضوية للع ظام هي من اكثر عناصرها المألوفة. ويغلف النسيج الرابط كذلك الاوعية الدموية مكونا طبقة تركيبية مهمة تحت الجلد ، فتساعده على ربط الخلايا مع بعضها مكونا نسيجا ، وتكون المادة الارضية واقعة خارج الخلايا والموجودة بين الخلايا . توجد ثلاث مكنوات رئيسية جزيئية للنسيج الرابط وهي : اثنان من البروتينات الليفية وهي الكولاجين والألاستين والتي توجد مع بعضها في معظع الانسجة الرابطة ولكنها تختلف في نسبها والمكون الثالث هو مركبات السكريات

البروتينية (Protegoglycans) وهي عائلة من الجزيئات الهجينة تتالف من البروتينات مرتبطة تساهميا بالسكريات المتعددة ، لا تتمدد لييفات الكولاجين ، في حين تكون لييفات الالاستين مطاطية.

اما الاوتار التي ترسل الشد العضلي الى الهيكل العظيمي فتتكون الى حد كبير من الكولاجين . اما الرباط (Ligament) والذي يكون غنيا بالألاستين فيرتبط ويمسك العظام مكونا مفاصل هيكلية ويكون مرنا مطاطيا . عند تمدد الاربطة الموجودة حول الركبة والكتف الى مسافة طويلة تخرج هذه المفاص عن اماكنها الطبيعية ولكنت يمكن ارجاعها الى اماكنها الاولى . تختلف السكريات البروتينية (Protegoglycans) عن البروتينات السكرية الاخرى (Glycoproteins) في ان الاولى تحتوي على الكثير من السكريا المتعددة وعلى كمية قليلة من البروتين في حين تحتوي السكريات البروتينية (Protegoglycans) بصفتها المادة الاساسية (Ground Substance) ، والتي تكون فيها العناصر الليفية للنسيج الرابط مضمورة او مغطاة . وتعمل كذلك عمل انسجة لاصقة ولتوفر الانزلاق والحركة للمفاصل .

يتكون الكولاجين والألاستين والبروتينات السكرية من قبل الخلايا اورمة ليفية (Fibroblasts) والخلايا الغضروفية الاولية (Chondrocytes). وهي خلايا منتظمة في شكل تراكيب النسيج الرابط المختلفة .

ثانيا : البروتينات الكروية Globular Proteins

تكون السلسلة متعددة الببتيدات في حالة البروتينات الكروية مطوية على شكل كروي مضغوط . وكصنف من اصناف البروتينات فهي مركبات معقدة جدا في الشكل اكثر تعقيدا من البروتينات الليفية وذات تنوع اكثر في الوظائف الحياتية او تكون اكثر ديناميكية من السكون في فعالياتها . وتكون جميع الانزيمات ال (200) او اكثر هي بروتينات كروية. وتقوم البروتينات الكروية الاخرى بنقل الاوكسجين و المواد الغذائية والايونات اللاعضوية في الدم ويكون القسم من البروتينات الكروية كأجسام مضادة وبعضها كهرمونات وتكون البروتينات الكروية كمكونات للاغشية والرايبوسومات.

يشير اثنان من الادلة المهمة الى ان السلاسل متعددة الببتيدات من ابروتينات الكروية مطوية بأحكا م وان اشكالها المطوية مهمة لوظائفها الحيوية. واول هذه الادلة هو ان البروتينات الكروية الاصلية تعاني من عملية مسح (Denaturation) عند تسخينها وتعرضها لدرجات عالية من المرقم الهيدروجي (pH) ، او عند معاملتها مع اليوريا عند مسخ البروتينات الكروية فأن هيكلها التساهمي يبقى سليما الا ان السلسلة متعددة الببتيدات تكون غير ملتفة بشكل عشوائي وغير منتظم وتغير الاشكال الفراغية. ويصبح البروتين الكروي المفسخ غير الذائب في الانظمة المائية عند الاس الهيدروجيني بالقرب من (pH=7) ويفقد عادة فعاليته الحيوية.

والدليل المهم الاخر حول التواء البروتينات الكروية بأن من مقارنة اطوال السلاسل متعددة الببتيدات مع ابعادها الجزيئية الحقيقية كما توضحها القياسات الكيميائية الفيزيائية . فمثلا ، تكون لزلال مصل الدم (الوزن الجزيئي 64.000) سلسلة متعددة الببتيدات ذات (584) مكون الاحماض الامينية. فاذا ما ، كانت هذه السلسلة بشكل ببتادي التمدد على اقصى ما يمكن فأنها ستكون على الاغلب بطول (200) نانو ميتر وبسمك (1.1) نانو نميتر الشكل (6-5)

الشكل (6-5)

وعلى اية حال فأن القياسات الكمياوية الفيزيائية على زلال مصل الدم الاصلي اظهرت ان طولها حوالي (13) نانوميتر وانها بعرض يبلغ حوالي (3) نانوميتر الشكل (6-5) . وبوضوح فأن السلسلة متعددة الببتيدات لزلال مصل الدم يجب ان تكون مطوية بأحكام لتلائم هذه الابعاد ومن المؤكد لان ان جميع البروتينات الكروية مطوية بشكل مضغوط يطرق خاصة مهمة لوظيفتها الحيوية .

البعد الثلاثي لتركيب جزيئات البروتين
The Three_ Dimensional Configuration Of Protein Molecules

من اصعب المشاكل التي تواجه دراسة كيفية وجود جزيئات البروتين في الحالة الط بيعية (Native State) هي معرفة كيفية انطواء (Folding) السلاسل متعددة الببتيد. وقد ساعد استعمال الاشعة السينية (X- ray diffraction) للخصول على معلومات دقيقة في هذه المجال للبروتينات ذات الشكل الكروي او النسيجي. وكانت الجهود التي ب ذلها العالم بولنك (Panling) تمثل اول جهود ناحجة في دراسة تركيب البروتين المسمى الفا- كيراتين (Keratin - &) بأستعمال الاشعة السينية. وقد اشارت النتائج الى ان جزيئات هذا البروتين تكون منطوية على ن فسها في حالتها الطبيعية لتكون تركيب ذو شكل حلزوني يسمى

الفا- هيلكس (Helix -&) بسبب وجود الاواصر الهيدروجينية بين (NH-) و (C=O-) في السلسلة الببتيدية ، الشكل (6-6). ويوجد 3.6 حامض اميني في الدورة الواحدة للـ (Helix -&) وتلعب المجاميع الطرفية (R-Groups) دورا اضافيا في تكوين التركيب النه ائي لجزيئات البروتين . حيث من المعروف ان الاحماض الامينية تقسم الى اربعة اقسام نسبة الى المجاميع الطرفية وهي اللاقطبية والقطبية عديمة الشحنة والقطبية ذات الشحنة الموجبة والقطبية ذات الشحنة السالبة. وتوجد الكثير من الاثباتات في الوقت الحاضر انه عند وضع جزئية بروتين في محلول مائي ، فان العدد الاكبر من المجاميع القطبية سوف تكون معرضة بحيث تواجه المحلول المائي بينما تتمركز معظم المجاميع اللاقطبية داخل جزيئة البروتين . ان ترتيب المجاميع الطرفية القطبية واللاقطبية بهذا الشكل يساعد على تثبيت البعد الثلاثي لجزيئة البروتين.

الشكل (6-6)

ومن المفيد في هذا المجال ذكر بعض المصطلحات المهمة في تعريف جزيئات معقدة كجزيئات البروتين .

١. التركيب الاولي (Primary Structure): ويشير هذا المصطلح الى عدد والترتيب الدقيق للاحماض الامينية والى ارتباط هذه الاحماض الامينية مع بعضها البعض بواسطة الاواصر الببتيدية في جزيئة البروتين. ولايشمل هذا المصطلح الى قوى او اواصر اخرى موجودة بين الاحماض الامينية.
٢. التركيب الثانوي (Secondary Structure): ويشير هذا المصطلح الى درجة احتواء السلسلة الببتيدية او البروتين على تركيب الشكل الح لزوني (Helix -&) والذي يتكون بواسطة الاواصر الهيدروجينية بين مجاميع (NH-) و (C=O-) وقد تتكون هذه الاواصر الهيدروجينية بين سلسلتين ببتيديتين او ضمن السلسلة الواحدة كما موضح في الشكل (6-7).
٣. التركيب الثلاثي (Tertiary Structure) يشير هذا المصطلح الى قابلية السلسلة الببتيدية للانطواء (Folding) وتوجد عدة عوامل او قوى تساعد على ثباتية هذا النوع من التركيب ، الشكل (6-7).

الشكل (6-7)

ان القوى والاواصر التي تساعد في اعطاء جزيئة البروتين تركيبها الثانوي والثلاثي تكون درجة كبيرة من الهمية في الحفاظ على الثباتية القصوى لزيئة البروتين بالاضافة الى ان هذه القوى تساعد على تماسك جزيئة البروتين وان تاخذ حالتها الطبيعية (Native State) خاصة بالنسبة للانزيمات حيث ان التركيب النهائي لجزئ الانزيم هو نتيجة الفعل المشترك او المحصلة النهائية للتركيبيين الثنائي والثلاثي .بحيث يكون الموقع الفعال للنزيم في وضع يسهل تماسه مع المادة التي يعمل عليها الانزيم (active site) بالاضافة الى ان الفعل المشترك للتركيب الثانوي والثلاثي الابعاد هو الذي يقرر ايضا وجود بعض الاحماض الامينية الخاصة في الموقع الفعال للانزيم والتي بدونها لايظهر الانزيم اي فعالية حيوية حيث تساعد هذه الاحماض الامينية في ربط المادة التي يعمل عليها الانزيم بالموقع الفعال .

٤. **التركيب الرباعي (Quaternary Structure): ويعرف هذا المصطلح بأنه عدد وحدات البروتين التي يجب ان ترتبط مع بعضها لتكون الصيغة الفعالة لذلك البروتين من الناحية الحيوية . فمثلا الصيغة الفعالة لانزيم المسمى فوسفورليز (Phosphorylase) تحتوي على وحدتين متشابهتين . وفي حالةفصل هاتين الوحدتين عن بعضهما ، لايظهر الانزيم اي فعالية حيوية ويسمى هذا النوع من التركيب الرباعي بالمتجانس (Homogenous Quaternary Structure) اما اذا كانت الوحدات غير متشابهة كما في فايروس موزاييك التبغ حيث تجد الحامض النووي مع البروتين ليكون الفايروس الفعال. فيسمى بالتركيب الرباعي غير المتجانس (Heterogenous tertiary Structure)**