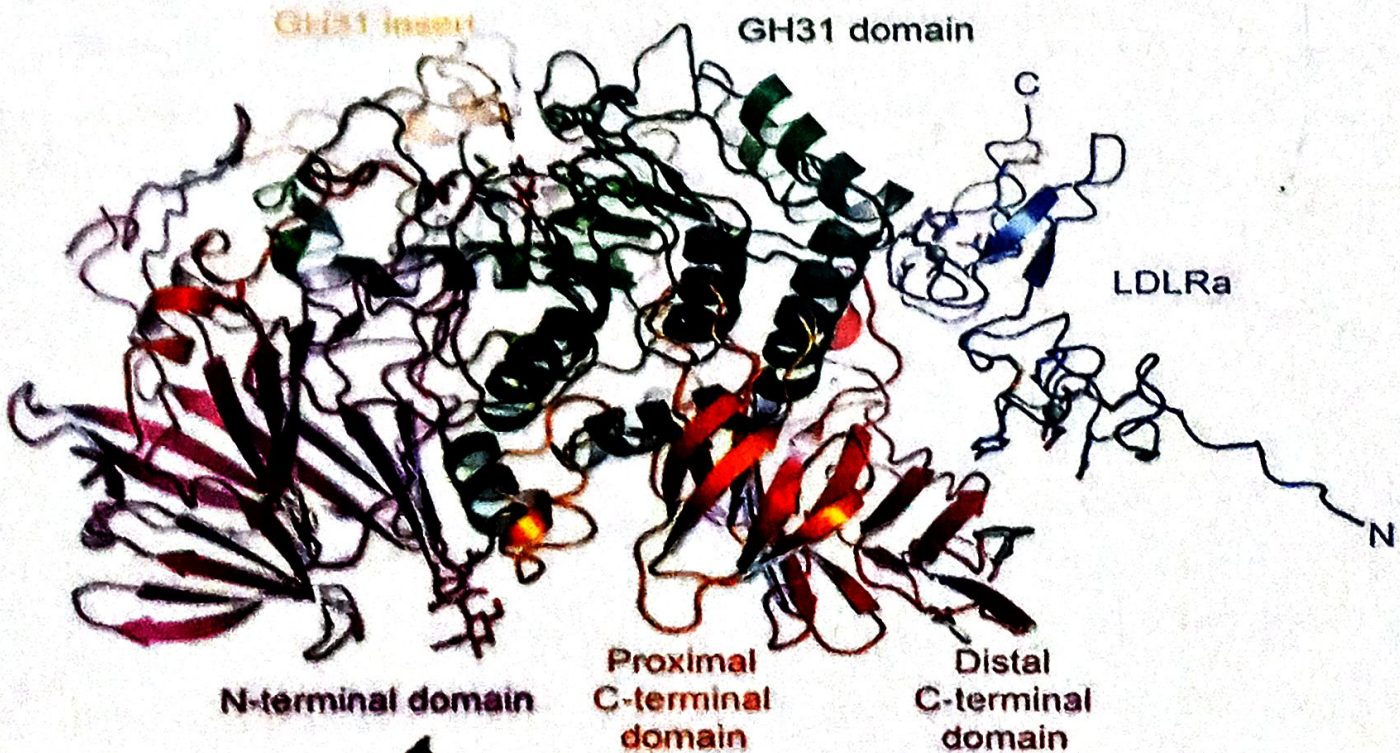


الإنزيمات

التركيب، الحركية، التخصص، الآلية، التثبيت،
تنظيم النشاط وتحليل البيانات

ENZYMES

Structure, Kinetic, Specificity, Mechanism, Inhibition,
Regulation of Activity and Data Analytics



عبد المنعم محمد الأعسر

دكتوراه في الفيزياء الحيوية
أستاذ الكيمياء الحيوية المتفرغ
كلية الزراعة - جامعة عين شمس

الإنزيمات

التركيب، الحركية، التخصص، الآلية، التثبيط،
تنظيم النشاط وتحليل البيانات

ENZYMES

Structure, Kinetic, Specificity, Mechanism, Inhibition,
Regulation of Activity and Data Analytics

عبد المنعم محمد الأعسر

دكتوراه في الفيزياء الحيوية
أستاذ الكيمياء الحيوية المتفرغ
كلية الزراعة – جامعة عين شمس

إهداء

إلى

زوجتي السيدة الفاضلة: نيرمين كمال الدين البغدادي

بكل مشاعر الإمتنان والعرفان بالفضل أهدي إليك هذا الكتاب لما قدمت لي من دعم وتشجيع مستمر لإخراج هذا الكتاب والكتب السابقة.

فجزاها الله خير الجزاء وأطال عمرها وبارك فيه.

~~~~~



## شكر وتقدير

---

شكر وتقدير لكل من ساهم في مراجعة كل أو جزء من هذا الكتاب. وأخص بالشكر الأستاذ الدكتور/ نجاح الشحات الأستاذ المتفرغ بكلية الزراعة – جامعة عين شمس، الأستاذ الدكتور/ صفوت حسن علي الأستاذ المتفرغ بكلية الزراعة – جامعة عين شمس، والأستاذ الدكتور/ هاني سرور الأستاذ بكلية الزراعة – جامعة عين شمس كما أشكر السيدة/ أسماء محمد إبراهيم في وحدة الحساب العلمي بكلية الزراعة – جامعة عين شمس لقيامها مشكورة بكتابة هذا الكتاب.



---

## تمهيد

---

الخلية الحية هي مركز لعدد ضخم من الأنشطة الكيموحيوية التي يطلق عليها الأيض metabolism. والأيض يشتمل على تغيرات كيميائية وفيزيائية التي تحدث بصورة مستمرة في الكائنات الحية. وتستخدم هذه العمليات في تشييد أنسجة جديدة، وإحلال الأنسجة القديمة بأنسجة جديدة، تحويل جزيئات الغذاء إلى طاقة التي تستخدم في أنشطة مختلفة، التخلص من مخلفات الأيض والتكاثر - وهي الأنشطة التي توصف (تميز) بالحياة.

والجزء الأكبر من هذه التفاعلات الكيميائية لا تحدث تلقائياً بذاتها، وظاهرة الحفز catalysis تكون ضرورية لحدوث التفاعلات الكيموحيوية لكل عمليات الحياة. والحفز يعرف بأنه تعجيل (تسريع) acceleration التفاعل الكيميائي بواسطة بعض المواد التي لا تدخل بذاتها في أى تغيرات كيميائية دائمة. والحفز للتفاعلات الكيموحيوية يتم بواسطة الإنزيمات Enzymes (جزيئات بروتينات). والإنزيمات هي المسئولة تقريباً عن حدوث معظم التفاعلات الكيموحيوية في الكائنات الحية. وبدون الإنزيمات، فإن هذه التفاعلات تحدث عند معدلات بطيئة جداً لا تدعم الحياة.

إن أكسدة الحمض الدهني إلى ثاني أكسيد الكربون والماء في أنبوب الاختبار ليس عملية سهلة - فيحتاج إلى pH حادة ودرجة حرارة عالية وكيمائويات مؤكسدة حادة. مع ذلك، فإن مثل هذا التفاعل يحدث في الخلايا الحية بسلاسة (بسهولة) وبسرعة عند درجة الحرارة الفسيولوجية وعند pH قريبة من التعادل، وفي المعمل فإن تحلل البروتين إلى مكوناته من الأحماض الأمينية يحتاج إلى الغليان لمدة ٢٤ ساعة في محلول 20% من حمض HCl، بينما تتم هذه العملية في جسم الإنسان في وقت قصير تحت ظروف فسيولوجية معتدلة من درجة الحرارة والـ pH.



إن الطبيعة الكيميائية للحفازات البيولوجية (الإنزيمات) تم التعرف عليها بفصل وتنقية وبلورة إنزيم اليوريز Urease من البقوليات الصغيرة (اللوبيا) بواسطة سمنر (1926) حيث إتضح أن الإنزيم هو بروتين. ومن ذلك الحين أجريت دراسات موسعة في مدى واسع من الأبحاث الأساسية والتطبيقات الصناعية عن الإنزيمات. إن دراسة الإنزيمات توفر معلومات عن طبيعة الإنزيمات والتحولات الكيميائية والفيزيائية في الكائنات، كما توفر أساس لإستخدام الإنزيمات في الأغراض الصناعية والطبية والصيدلانية.

إن الهدف من هذا الكتاب هو تزويد القارئ بالمعلومات الأساسية عن تركيب الإنزيمات، وعلاقة تركيب الإنزيمات بنشاطها الحفزي والتخصص لنوع التفاعل وإختيارها للمواد الخاضعة وتنشيط الإنزيمات. كما سوف نناقش أيضاً الآليات المختلفة المشتملة في عمليات الحفز وتنظيم النشاط الحفزي في الكائنات. وهذا الكتاب قد نظم في خمسة موضوعات أساسية

- ١- مقدمة عامة وتاريخ الإنزيمات
- ٢- كيمياء الحياة والمكونات التركيبية للإنزيمات
- ٣- حركيات وتخصص وآليات التفاعلات الإنزيمية
- ٤- مثبطات الإنزيمات
- ٥- التعاونية والتنظيم غير الوضعي لنشاط الإنزيمات

يبدأ الجزء الأول: بفصل كمقدمة عامة بسيطة موجزة عن تركيب الإنزيمات وخصائصها العامة. أما الفصل الثاني فيعرض موجز لتاريخ الإنزيمات.

الجزء الثاني يشتمل على ثلاثة فصول (الفصول ٣ إلى ٥). الفصل الثالث يناقش الروابط في الجزيئات البيولوجية والتفاعلات في الكيمياء الحيوية. والفصل الرابع يعرض التركيب الجزيئي للإنزيمات، أما الفصل الخامس والأخير في هذا الجزء يناقش إتزان الإرتباط بين البروتين (الإنزيم) - المتصلة.

الجزء الثالث يشتمل على خمسة فصول (الفصول ٦ إلى ١٠) يناقش فيهما الحركية الإنزيمية لمادة خاضعة واحدة، تخصص الإنزيمات، الآليات الكيميائية في الحفز الإنزيمي، التفاعلات الإنزيمية مع مادتين خاضعتين، وأخيراً القياسات التجريبية لنشاط الإنزيم.

الجزء الرابع يشتمل على ثلاثة فصول (الفصول ١١ إلى ١٣) يناقش فيهما الأنواع المختلفة من المثبطات الإنزيمية: المثبطات العكسية، مثبطات الارتباط المحكم وأخيراً المثبطات المعتمدة على الوقت (المثبطات البطيئة).

الجزء الخامس والأخير يحتوي على فصلين (الفصلين ١٤ و ١٥) ويناقش فيه تنظيم النشاط الإنزيمي بالتأثيرات غير الوضعية والطرق الأخرى.

ولقد حاولت أن يكون هذا الكتاب مبسطاً وشاملاً ومحتوياً على معظم مواضيع الإنزيمات ذات الأهمية لمعظم المتخصصين في مجال الإنزيمات.

وأخيراً، فإني أرحب بأى مقترحات أو ملاحظات من الأخوة الزملاء أو من الطلبة على السواء.

والله الموفق

القاهرة ١٤٤١ هـ

٢٠٢٠ م

عبد المنعم محمد الأعسر



## الرموز والوحدات

## Symbols and Units

أحد المشاكل التي تواجه الكتاب العلمي الذي يعالج المادة التي تشتمل على مجال موضوعين تقليديين أو أكثر هو الانتظام في استخدام الرموز والوحدات. والإنزيما ت كما تعرض في هذا الكتاب تعتمد على العلوم الأساسية: الكيمياء، الكيمياء الفيزيائية والكيمياء الحيوية. وكل من هذه الفروع لها إصطلاحات خاصة تم إنشائها في استخدام الرموز. ففي بعض الحالات قد يستخدم رموز مختلفة لنفس المتغير، مثال ذلك فإن المعدل الأقصى maximum rate لتفاعل إنزيمي يمكن أن يكتب كـ  $V_m$  أو  $V_{max}$ ، كذلك، فإن ثابت ميكليس أحياناً يكتب  $K_m$  أو  $K_M$ . لذلك سوف نستخدم هنا الرموز الأكثر شيوعاً. ولأجل الوصول إلى إتساق، فإن الوحدات سوف تعطي بالوحدات القياسية للنظام الدولي للوحدات SI، إلا أنه قد يوجد بعض الإستثناءات في استخدام بعض الوحدات.

| الرمز                       | التفسير                     | الوحدات                   |
|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| A                           | ثابت أرهينوس                | يعتمد على التفاعل         |
| Å                           | إنجستروم (وحدة قياس)        | $10^{-10} \text{ m}$      |
| AH                          | حمض برونستد                 | —                         |
| : B                         | قاعدة برونستد               | —                         |
| °C                          | درجة حرارة (سليسيوس)        | —                         |
| D                           | ثابت الثنائي الكهربى        | $\text{C}^2 / \text{J.m}$ |
| $E_a (= \Delta G^\ddagger)$ | طاقة التنشيط                | $\text{kJ mol}^{-1}$      |
| [E]                         | التركيز النشط للإنزيم       | pM/L, nM/L                |
| [EI]                        | تركيز معقد الإنزيم - المثبط | $\mu\text{M} / \text{L}$  |

| الرمز                                            | التفسير                                                   | الوحدات                                      |
|--------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| [E <sub>t</sub> ]                                | التركيز الكلي للإنزيم                                     | μM/L, nM/L                                   |
| [ES]                                             | تركيز معقد الإنزيم – المادة الخاضعة                       | pM/L, nM/L                                   |
| [EP]                                             | تركيز معقد الإنزيم – ناتج التفاعل                         | pM/L, nM/L                                   |
| [ES <sup>‡</sup> ]                               | تركيز معقد الإنزيم – الحالة الانتقالية                    | pM/L, nM/L                                   |
| G                                                | الطاقة الحرة للنظام                                       | kJ/mol                                       |
| ΔG                                               | التغير في الطاقة الحرة للنظام                             | kJ/mol                                       |
| ΔG <sub>ES</sub>                                 | الطاقة الحرة لتكوين المعقد ES                             | kJ/mol                                       |
| ΔG <sub>kcat</sub>                               | الطاقة الحرة لتحويل المعقد ES إلى الإنزيم E وناتج التفاعل | kJ/mol                                       |
| ΔG <sub>ES<sup>‡</sup></sub> (= E <sub>a</sub> ) | طاقة التنشيط للتفاعل (طاقة تكوين المعقد ES <sup>‡</sup> ) | kJ/mol                                       |
| H                                                | أنثالي (المحتوى الحراري للنظام)                           | kJ/mol                                       |
| ΔH                                               | التغير في الإنثالي للنظام                                 | kJ/mol                                       |
| h                                                | ثابت بلانك                                                | 6.626176 x 10 <sup>-34</sup> Js              |
| h                                                | معامل هيل                                                 |                                              |
| IC <sub>50</sub>                                 | تركيز المثبط الذي يعطي 50% تثبيط                          | M                                            |
| [I]                                              | تركيز المثبط                                              | M                                            |
| k <sub>1</sub>                                   | ثابت معدل الرتبة الثانية                                  | M <sup>-1</sup> , s <sup>-1</sup>            |
| k <sub>-1</sub>                                  | ثابت معدل الرتبة الأولى                                   | s <sup>-1</sup>                              |
| k <sub>2</sub>                                   | ثابت معدل الرتبة الأولى                                   | s <sup>-1</sup>                              |
| k <sub>cat</sub>                                 | رقم التحول للإنزيم                                        | s <sup>-1</sup> , min <sup>-1</sup>          |
| K <sub>m</sub>                                   | ثابت ميكيلس                                               | M                                            |
| K <sub>d</sub> (K <sub>s</sub> )                 | ثابت التفكك للمعقد ES                                     | –                                            |
| K <sub>B</sub>                                   | ثابت بولتزمان                                             | 1.38062 x 10 <sup>-23</sup> JK <sup>-1</sup> |
| K <sub>eq</sub> (K <sub>a</sub> )                | ثابت الإتزان أو ثابت الاتحاد (الارتباط)                   | M                                            |
| K <sub>i</sub>                                   | ثابت المثبط                                               | M                                            |
| K <sub>m</sub> <sup>app</sup>                    | ثابت ميكيلس الظاهري                                       | M                                            |
| [L]                                              | تركيز المتصلة                                             | M                                            |
| pH                                               | اللوغاريتم السالب لتركيز أيون الهيدروجين                  | M                                            |



| الرمز                   | التفسير                                                                   | الوحدات            |
|-------------------------|---------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| $pK_a$                  | قيمة الـ pH التي عندها يتفكك نصف حمض بروسند – لوري                        |                    |
| R                       | ثابت الغاز                                                                | 8.31441 J/mol K    |
| [R]                     | تركيز المستقبل                                                            | M                  |
| [RL]                    | تركيز معقد المستقبل – المتصلة                                             | M                  |
| [S <sub>0</sub> ]       | التركيز الابتدائي للمادة الخاضعة                                          | M                  |
| [S]                     | تركيز المادة الخاضعة المتبقية بعد زمن t                                   | M                  |
| T                       | درجة الحرارة الترموديناميكية                                              | K                  |
| $\nu$                   | سرعة التفاعل المشاهدة                                                     | $\mu\text{M/s}$    |
| $V_{\max}$              | المعدل الأقصى للتفاعل                                                     | $\mu\text{M/time}$ |
| $V_m^{\text{app}}$      | $V_{\max}$ الظاهرية                                                       | M/L                |
| $\sigma$ (سيجما)        | الرابطة سيجما                                                             |                    |
| $\pi$ (باي)             | الرابطة باي                                                               |                    |
| $\pi \rightarrow \pi^*$ | الانتقال الإلكتروني من المدار الجزيئي $\pi$ إلى المدار الجزيئي $\pi^*$    |                    |
| $\psi$ (يساي)           | زاوية الدوران حول رابطة $C_\alpha$ وذرة الكربون الكربونية في عديد الببتيد |                    |
| $\phi$ (فاي)            | زاوية الدوران بين $N$ و $C_\alpha$ في عديد الببتيد                        |                    |

## المحتويات Contents

| رقم الصفحة           |                                                             |
|----------------------|-------------------------------------------------------------|
| v                    | إهداء                                                       |
| vi                   | شكر وتقدير                                                  |
| lx                   | قائمة بالموضوعات                                            |
| xix                  | تمهيد                                                       |
| xxii                 | الرموز والوحدات                                             |
| <b>الجزء الأول:</b>  |                                                             |
| ١                    | مقدمة عامة وتاريخ الإنزيمات                                 |
| ٥                    | فصل ١ مقدمة عامة عن الإنزيمات                               |
| ٢٩                   | فصل ٢ موجز لتاريخ الإنزيمات                                 |
| <b>الجزء الثاني:</b> |                                                             |
| ٤٣                   | كيمياء الحياة والمكونات التركيبية للإنزيمات                 |
| ٤٥                   | فصل ٣ أساسيات في كيمياء الحياة                              |
| ٩٩                   | فصل ٤ المكونات التركيبية للإنزيمات                          |
| ١٤٥                  | فصل ٥ إيزان الارتباط بين البروتين – المتصلة                 |
| <b>الجزء الثالث:</b> |                                                             |
| ١٧٧                  | الحركية والتخصص والآلية في الحفز الإنزيمي                   |
| ١٨١                  | فصل ٦ حركيات التفاعلات الإنزيمية لمادة خاضعة واحدة          |
| ٢٢٧                  | فصل ٧ تخصص الإنزيمات                                        |
| ٢٥٣                  | فصل ٨ الآليات الكيميائية في الحفز الإنزيمي                  |
| ٣١٣                  | فصل ٩ التفاعلات الإنزيمية مع مادتين خاضعتين                 |
| ٣٣١                  | فصل ١٠ القياسات التجريبية لنشاط الإنزيم                     |
| <b>الجزء الرابع:</b> |                                                             |
| ٣٩٣                  | المتبقيات الإنزيمية                                         |
| ٣٩٧                  | فصل ١١ المتبقيات العكسية                                    |
| ٤٤١                  | فصل ١٢ متبقيات الارتباط المحكم                              |
| ٤٥٧                  | فصل ١٣ والتنشيط المعتمد على الوقت (متبقيات الارتباط البطيء) |
| <b>الجزء الخامس:</b> |                                                             |
| ٤٨٥                  | التأثيرات غير الوضعية وتنظيم نشاط الإنزيمات                 |
| ٤٩١                  | فصل ١٤ التعاونية والتأثيرات غير الوضعية لنشاط الإنزيمات     |
| ٥٢٥                  | فصل ١٥ الطرق الأخرى لتنظيم نشاط الإنزيمات                   |

|     |                                                        |
|-----|--------------------------------------------------------|
| ٥٤٥ | ملحق (أ) النظام الدولي للوحدات                         |
|     | ملحق (ب) برامج الحاسوب ومواقع الشبكة العنكبوتية الخاصة |
| ٥٥٠ | بالإنزيمات                                             |
|     | ملحق (ج). التطوير موجه- الموقع وبحث تركيب المواقع      |
| ٥٥٤ | النشطة في الإنزيمات                                    |
| ٥٥٩ | ملحق (د). إجابات على بعض الأسئلة المختارة              |
| ٥٧٧ | المراجع                                                |

## قائمة بالموضوعات List of Topics

| رقم الصفحة | الجزء الأول: | مقدمة عامة وتاريخ الإنزيمات |
|------------|--------------|-----------------------------|
| ١          |              |                             |

| فصل ١ | مقدمة عامة عن الإنزيمات                                        | ٥  |
|-------|----------------------------------------------------------------|----|
| ١-١   | ما هي الإنزيمات؟                                               | ٦  |
| ٢-١   | ما هو التركيب الكيميائي للإنزيمات                              | ٧  |
| ١-٢-١ | العوامل المساعدة الإنزيمية                                     | ٨  |
| ٢-٢-١ | نظائر الإنزيمات                                                | ٩  |
| ٣-١   | مواضع الإنزيمات في الخلايا                                     | ٩  |
| ٤-١   | الخواص العامة للإنزيمات                                        | ١٠ |
| ١-٤-١ | المواقع النشطة                                                 | ١٠ |
| ٢-٤-١ | كفاءة الحفز                                                    | ١١ |
| ٣-٤-١ | تخصص الإنزيمات                                                 | ١١ |
| ٤-٤-١ | القدرة على التنظيم                                             | ١٢ |
| ٥-٤-١ | ظروف التفاعل                                                   | ١٢ |
| ٥-١   | كيف يعمل الإنزيم؟                                              | ١٢ |
| ١-٥-١ | التغير في الطاقة الذي يحدث أثناء التفاعل                       | ١٣ |
| ٢-٥-١ | كيمياء الموقع النشط                                            | ١٤ |
| ٦-١   | ما هي العوامل التي تؤثر على معدلات (سرعات) التفاعلات الإنزيمية | ١٥ |
| ١-٦-١ | تركيز المادة الخاضعة                                           | ١٥ |
| ٢-٦-١ | درجة الحرارة                                                   | ١٦ |
| ٣-٦-١ | تأثير الرقم الهيدروجيني (pH)                                   | ١٧ |
| ٤-٦-١ | تأثير المثبطات                                                 | ١٨ |
| ٧-١   | تسمية الإنزيمات                                                | ١٩ |
| ١-٧-١ | الإسم المذكي (الشائع)                                          | ١٩ |
| ٢-٧-١ | الإسم النظامي                                                  | ٢٠ |
| ٨-١   | تطبيقات الإنزيمات                                              | ٢٠ |
| ١-٨-١ | الإنزيمات كأدوات في التشخيص السريري                            | ٢٠ |
| ٢-٨-١ | مثبطات الإنزيمات كعقاقير                                       | ٢١ |
| ٣-٨-١ | العلاج بالإنزيمات                                              | ٢١ |



|    |                         |       |
|----|-------------------------|-------|
| ٢١ | الإنزيمات التحليلية     | ٤-٨-١ |
| ٢٢ | الإنزيمات الصناعية      | ٥-٨-١ |
| ٢٢ | الكشافات الحيوية        | ٦-٨-١ |
| ٢٢ | الإنزيمات كمضادات حيوية | ٧-٨-١ |
| ٢٣ | ملحق                    |       |
| ٢٦ | أسئلة                   |       |

|    |                                                        |       |
|----|--------------------------------------------------------|-------|
| ٢٩ | موجز لتاريخ الإنزيمات                                  | فصل ٢ |
| ٣٠ | الإنزيمات في العصور القديمة                            | ١-٢   |
| ٣١ | إكتشاف الإنزيمات وعلم الإنزيمات المبكر                 | ٢-٢   |
| ٣٣ | التطور في دراسة آليات عمل الإنزيمات (كيف يعمل الإنزيم) | ٣-٢   |
| ٣٦ | دراسة تركيب الإنزيمات                                  | ٤-٢   |
| ٣٧ | إكتشاف العوامل المساعد للإنزيمات                       | ٥-٢   |
| ٤٠ | علم الإنزيمات في الوقت الحاضر                          | ٦-٢   |
| ٤١ | أسئلة                                                  |       |

|    |                                             |               |
|----|---------------------------------------------|---------------|
| ٤٣ | كيمياء الحياة والمكونات التركيبية للإنزيمات | الجزء الثاني: |
|----|---------------------------------------------|---------------|

|    |                                                                                 |       |
|----|---------------------------------------------------------------------------------|-------|
| ٤٥ | أساسيات في كيمياء الحياة                                                        | فصل ٣ |
| ٤٦ | المدارات الذرية والمدارات الجزيئية                                              | ١-٣   |
| ٤٦ | المدارات الذرية                                                                 | ١-١-٣ |
| ٥٠ | توزيع الإلكترونات (التشكيل الإلكتروني) للذرات                                   | ٢-١-٣ |
| ٥٢ | المدارات الجزيئية (الروابط التساهمية)                                           | ٣-١-٣ |
| ٥٦ | المدارات المهجنة                                                                | ٤-١-٣ |
| ٥٨ | الإلكترونات غير المشاركة                                                        | ٥-١-٣ |
| ٥٩ | الرنين والعطرية                                                                 | ٦-١-٣ |
| ٦٢ | الانتقالات الإلكترونية والتشكيلات الإلكترونية في الجزيئات                       | ٧-١-٣ |
| ٦٤ | الحركة الحرارية الكيميائية                                                      | ٢-٣   |
| ٦٥ | التغير في الطاقة الحرة $\Delta G$ للتفاعلات وتلقائية التفاعل                    | ١-٢-٣ |
| ٦٨ | الحالة الإنتقالية وطاقة التنشيط ( $\Delta G^\ddagger$ ) في التفاعلات الكيميائية | ٢-٢-٣ |
| ٧٤ | كيمياء الحمض - القاعدة                                                          | ٣-٣   |
| ٧٨ | التشكيل الفراغي والبنية الفراغية للجزيئات                                       | ٤-٣   |
| ٧٨ | التشكيل الفراغي للجزيئات                                                        | ١-٤-٣ |

|    |                                                    |       |
|----|----------------------------------------------------|-------|
| ٧٩ | البنية الفراغية (المجسمة) للجزيئات                 | ٢-٤-٣ |
| ٨١ | الحياة تعتمد على الجزيئات غير المتناظرة            | ٣-٤-٣ |
| ٨٢ | التأثيرات المتبادلة غير التساهمية والارتباط العكسي | ٥-٣   |
| ٨٣ | التأثيرات المتبادلة الكهربية الساكنة               | ١-٥-٣ |
| ٨٥ | الإرتباط الهيدروجيني                               | ٢-٥-٣ |
| ٨٦ | التأثيرات النافرة للماء                            | ٣-٥-٣ |
| ٨٧ | قوى فان دير فالس                                   | ٤-٥-٣ |
| ٩٠ | معدلات التفاعلات الكيميائية                        | ٦-٣   |
| ٩٠ | معادلة المعدل للتفاعل الكيميائي                    | ١-٦-٣ |
| ٩٣ | رتبة التفاعل                                       | ٢-٦-٣ |
| ٩٤ | التفاعلات الكيميائية العكسية                       | ٣-٦-٣ |
| ٩٦ | قياس السرعة الابتدائية                             | ٤-٦-٣ |
| ٩٦ | أسئلة                                              |       |

|     |                                                 |              |
|-----|-------------------------------------------------|--------------|
| ٩٩  | <b>المكونات التركيبية للإنزيمات</b>             | <b>فصل ٤</b> |
| ١٠٠ | الأحماض الأمينية هي الوحدات البنائية للبروتينات | ١-٤          |
| ١٠٠ | الأحماض الأمينية في البروتينات                  | ١-١-٤        |
| ١٠٤ | خواص السلاسل الطرفية للأحماض الأمينية           | ٢-١-٤        |
| ١٠٤ | النافرية للماء                                  | ١-٢-١-٤      |
| ١٠٦ | الإرتباط الهيدروجيني                            | ٢-٢-١-٤      |
| ١٠٧ | الجسور الملحية                                  | ٣-٢-١-٤      |
| ١٠٨ | الأحماض الأمينية كأحماض وقواعد                  | ٣-١-٤        |
| ١١٠ | ارتباط الأيونات بالبروتينات                     | ٤-١-٤        |
| ١١١ | تكوين الروابط التساهمية                         | ٥-١-٤        |
| ١١٢ | الروابط ثنائية الكبريت                          | ١-٥-١-٤      |
| ١١٣ | الفسفرة                                         | ٢-٥-١-٤      |
| ١١٤ | الحجم المجسم للسلاسل الطرفية                    | ٦-١-٤        |
| ١١٤ | الروابط الببتيدية                               | ٢-٤          |
| ١١٨ | التركيب الأولي للبروتين: تتابع الأحماض الأمينية | ٣-٤          |
| ١٢٠ | التركيب الثانوي                                 | ٤-٤          |
| ١٢٢ | الحلزون ألفا يميني الدوران                      | ١-٤-٤        |
| ١٢٤ | الصفائح بيتا الممتدة                            | ٢-٤-٤        |
| ١٢٦ | الدوران بيتا                                    | ٣-٤-٤        |

|     |                                  |     |
|-----|----------------------------------|-----|
| ١٢٧ | التركيب الثالث                   | ٥-٤ |
| ١٣٢ | الوحدات الفرعية والتركيب الرباعي | ٦-٤ |
| ١٣٥ | العوامل المساعدة في الإنزيمات    | ٧-٤ |
| ١٤١ | أسئلة                            |     |

|     |                                                                       |              |
|-----|-----------------------------------------------------------------------|--------------|
| ١٤٥ | <b>إتزان الإرتباط بين البروتين - المتصلة</b>                          | <b>فصل ٥</b> |
|     | إرتباط المتصلة (L) بجزئ كبير (المستقبل R) يحتوي على موقع ارتباط فردي. | ١-٥          |
| ١٤٦ | تعريف ثابت التفكك $K_d$ وعلاقته بالطاقة الحرة للارتباط                | ١-١-٥        |
| ١٤٦ | قياس ثابت التفكك $K_d$ من قياس الحركية                                | ٢-١-٥        |
| ١٥١ | قياس ثابت التفكك عند الاتزان                                          | ٣-١-٥        |
| ١٥٧ | ارتباط المتصلة بمستقبل يحتوي على أكثر من موقع إرتباط                  | ٢-٥          |
| ١٥٨ | مواقع الارتباط المتعددة المتكافئة                                     | ١-٢-٥        |
| ١٥٩ | مواقع الارتباط المتعددة غير المتكافئة والمستقلة                       | ٢-٢-٥        |
| ١٦١ | التأثيرات التعاونية بين مواقع الإرتباط المتعددة                       | ٣-٢-٥        |
| ١٦١ | تحليل الرسم البياني لبيانات ارتباط المتصلة عند الاتزان                | ٣-٥          |
| ١٦٢ | رسم المقلوب المزدوج                                                   | ١-٣-٥        |
| ١٦٣ | رسم سكانشارد                                                          | ٢-٣-٥        |
| ١٦٥ | رسم هانس - وولف                                                       | ٣-٣-٥        |
| ١٦٦ | الارتباط القوي بين المتصلة والمستقبل                                  | ٤-٥          |
| ١٦٨ | التنافس بين المتصلات لموقع ارتباط مشترك                               | ٥-٥          |
| ١٧٠ | الطرق التجريبية لقياس ارتباط المتصلة                                  | ٦-٥          |
| ١٧٠ | اتزان الفرز الغشائي                                                   | ١-٦-٥        |
| ١٧٣ | الطرق الطيفية                                                         | ٢-٦-٥        |
| ١٧٥ | أسئلة                                                                 |              |

## الجزء الثالث: حركيات وتخصص وآليات التفاعلات الإنزيمية ١٧٧

|     |                                                      |              |
|-----|------------------------------------------------------|--------------|
| ١٨١ | <b>حركيات التفاعلات الإنزيمية لمادة خاضعة أحادية</b> | <b>فصل ٦</b> |
| ١٨٢ | السرعة الابتدائية                                    | ١-٦          |
| ١٨٥ | تأثير تركيز المادة الخاضعة على سرعة التفاعل          | ٢-٦          |
| ١٨٧ | نموذج الاتزان السريع لحركيات الإنزيمات               | ٣-٦          |
| ١٩٠ | نموذج الحالة الثابتة (المستقرة) لحركيات الإنزيمات    | ٤-٦          |

|     |         |                                                                      |
|-----|---------|----------------------------------------------------------------------|
| ١٩٨ | ٥-٦     | دلالات قيم $k_{cat}$ , $K_m$                                         |
| ١٩٨ | ١-٥-٦   | ثابت ميكليس ( $K_m$ )                                                |
| ١٩٩ | ٢-٥-٦   | ثابت الحفز ( $k_{cat}$ )                                             |
| ٢٠١ | ٣-٥-٦   | $k_{cat}/K_m$                                                        |
| ٢٠٥ | ٤-٥-٦   | التفاعلات المحكومة بالانتشار والكمال الحركي                          |
| ٢٠٧ | ٦-٦     | القياس التجريبي للثوابت الحركية $k_{cat}$ , $K_m$ من الرسوم البيانية |
| ٢٠٩ | ١-٦-٦   | تقدير $V_{max}$ و $K_m$ من البيانات غير المحولة                      |
|     | ٢-٦-٦   | تقدير $V_{max}$ و $K_m$ من التحولات الخطية لبيانات حركية             |
| ٢١٠ |         | الإنزيمات                                                            |
| ٢١١ | ١-٢-٦-٦ | رسم لينوفر-بورك (المقلوب المزدوج) لحركيات الإنزيمات                  |
| ٢١٤ | ٢-٢-٦-٦ | الرسوم لـ إدى - هوفستي                                               |
| ٢١٥ | ٣-٢-٦-٦ | الرسوم البيانية لـ هانس- وولف                                        |
| ٢١٦ | ٤-٢-٦-٦ | الرسوم البيانية لـ إيسنثال-كورنيس-باودين                             |
| ٢١٧ | ٧-٦     | الانحراف عن حركيات القطع الزائد (حركيات ميكلس- منتين)                |
| ٢١٨ | ٨-٦     | حركيات الطور العابر (حركيات ما قبل الحالة الثابتة)                   |
| ٢٢٣ |         | أسئلة                                                                |

|     |        |                                                                |
|-----|--------|----------------------------------------------------------------|
| ٢٢٧ | فصل ٧  | تخصص الإنزيمات                                                 |
| ٢٢٨ | ١-٧    | تخصص الإنزيمات للمادة الخاضعة                                  |
| ٢٣٠ | ١-١-٧  | التخصص للمادة الخاضعة (التخصص المطلق)                          |
| ٢٣٠ | ٢-١-٧  | التخصص للرابطة (التخصص النسبي)                                 |
| ٢٣١ | ٣-١-٧  | تخصص المجموعة (التخصص المتوسط أو المعتدل)                      |
| ٢٣٤ | ٤-١-٧  | التخصص للمنطقة                                                 |
| ٢٣٦ | ٥-١-٧  | التخصص الضوئي (التخصص الجسم "الفراغي")                         |
| ٢٣٨ | ٦-١-٧  | التخصص الهندسي                                                 |
| ٢٣٩ | ٧-١-٧  | التخصص الموجه بالقالب (بالمصيف)                                |
|     | ٨-١-٧  | التخصص بالتماثل (التناسق) المتكافئ بين الإنزيم والمادة الخاضعة |
| ٢٤٠ |        |                                                                |
| ٢٤٣ | ٩-١-٧  | التخصص الثنائي (المزدوج)                                       |
| ٢٤٤ | ١٠-١-٧ | التخصص للعامل المساعد                                          |
| ٢٤٥ | ٢-٧    | ثابت التخصص للمادة الخاضعة                                     |
| ٢٤٥ | ٣-٧    | تخصص الإنزيمات لنوع التفاعل وتسمية الإنزيمات                   |
| ٢٥٠ |        | أسئلة                                                          |

| ٢٥٣ | الآليات الكيميائية في الحفز الإنزيمي                                   | فصل ٨   |
|-----|------------------------------------------------------------------------|---------|
| ٢٥٥ | الموقع النشط والحفز الإنزيمي                                           | ١-٨     |
| ٢٥٥ | الموقع النشط للإنزيم                                                   | ١-١-٨   |
|     | تكوين معقد الإنزيم - المادة الخاضعة هو الخطوة الأولى في الحفز الإنزيمي | ٢-١-٨   |
| ٢٥٦ | الحفز الإنزيمي                                                         |         |
| ٢٥٩ | تطابق المادة الخاضعة - الموقع النشط وتخصص الإنزيمات                    | ٢-٨     |
|     | الإنزيمات تزيد معدلات التفاعلات خلال تثبيت (استقرار) الحالة الانتقالية | ٣-٨     |
| ٢٦٢ | الآليات الكيميائية المستخدمة في تثبيت (استقرار) الحالة الانتقالية      | ٤-٨     |
| ٢٦٨ | التقريب (التقارب والتوجيه)                                             | ١-٤-٨   |
| ٢٦٩ | الحفز بالحمض / القاعدة العام                                           | ٢-٤-٨   |
| ٢٧٣ | الحفز التساهمي                                                         | ٣-٤-٨   |
| ٢٧٩ | الحفز المحب للشحنة الموجبة                                             | ١-٣-٤-٨ |
| ٢٨٠ | الحفز المحب للشحنة السالبة                                             | ٢-٣-٤-٨ |
| ٢٨٤ | تغير (تشويه) البنية الفراغية (البنية المجسمة)                          | ٤-٤-٨   |
| ٢٩٠ | إعادة تنظيم الموقع النشط للتطابق مع تركيب الحالة الانتقالية            | ٥-٤-٨   |
| ٢٩٩ | إنزيمات السيرين لتحلل البروتين: مثال يوضح الآلية والتخصص في الإنزيمات  | ٥-٨     |
| ٣٠٢ | إنزيمات تحلل البروتين تيسر تفكك الروابط الببتيدية                      | ١-٥-٨   |
| ٣٠٣ | آلية حفز تفكك الرابطة الببتيدية بإنزيم الكيموتريسين                    | ٢-٥-٨   |
| ٣٠٤ | تخصص إنزيم الكيموتريسين                                                | ٣-٥-٨   |
| ٣٠٧ | أسئلة                                                                  |         |
| ٣٠٩ |                                                                        |         |
| ٣١٣ | التفاعلات الإنزيمية مع مادتين خاضعتين                                  | فصل ٩   |
| ٣١٤ | تسمية التفاعلات                                                        | ١-٩     |
| ٣١٥ | الآليات وحركات الحالة الثابتة للتفاعلات الإنزيمية ثنائي ثنائي          | ٢-٩     |
| ٣١٦ | التفاعلات ثنائي ثنائي المتعاقبة العشوائية                              | ١-٢-٩   |
| ٣٢٠ | التفاعلات الإنزيمية ثنائي ثنائي المتعاقبة المنتظمة (الإجبارية)         | ٢-٢-٩   |
| ٣٢٢ | تفاعلات الإزاحة المزدوجة الثنائية الثنائية أو البنج-بونج               | ٣-٢-٩   |
|     | التمييز بين آليات التفاعلات الإنزيمية المتعاقبة العشوائية والمنتظمة    | ٣-٩     |
| ٣٢٤ |                                                                        |         |

|     |                                                          |       |
|-----|----------------------------------------------------------|-------|
| ٣٢٦ | إستخدام تبادل النظائر المشعة للتمييز بين آليات التفاعلات | ١-٣-٩ |
| ٣٢٩ | أسئلة                                                    |       |

|     |                                                             |               |
|-----|-------------------------------------------------------------|---------------|
| ٣٣١ | <b>القياسات التجريبية لنشاط الإنزيم</b>                     | <b>فصل ١٠</b> |
| ٣٣٢ | تحليل منحنيات التفاعل                                       | ١-١٠          |
| ٣٣٦ | قياس السرعة الابتدائية: توليد البيانات التجريبية            | ٢-١٠          |
| ٣٣٧ | أنواع الاختبارات لقياس السرعة الابتدائية                    | ١-٢-١٠        |
| ٣٤٤ | بدأ وإيقاف التفاعل                                          | ٢-٢-١٠        |
| ٣٤٧ | أهمية إجراء القياسات الحاكمة                                | ٣-٢-١٠        |
| ٣٤٩ | ظروف التفاعل                                                | ٤-٢-١٠        |
| ٣٥١ | العوامل التي تؤثر على سرعة التفاعلات الإنزيمية              | ٣-١٠          |
| ٣٥١ | تركيز الإنزيم                                               | ١-٣-١٠        |
| ٣٥٤ | تأثير درجة الحرارة                                          | ٢-٣-١٠        |
| ٣٥٧ | تأثيرات الرقم الهيدروجيني (pH)                              | ٣-٣-١٠        |
| ٣٦٦ | طرق الكشف                                                   | ٤-١٠          |
|     | الاختبارات المعتمدة على المطيافية الضوئية (الامتصاص الضوئي) | ١-٤-١٠        |
| ٣٦٨ |                                                             |               |
| ٣٧١ | ١-١-٤-١٠ إختيار الطول الموجي المستخدم في التحليل            |               |
| ٣٧٣ | ٢-١-٤-١٠ الأوعية الضوئية للعينات                            |               |
| ٣٧٤ | ٣-١-٤-١٠ قياسات الامتصاص                                    |               |
| ٣٧٦ | ٤-١-٤-١٠ الأخطاء في قياسات الإمتصاص الطيفي                  |               |
| ٣٧٧ | ٢-٤-١٠ قياسات التفلور (الفلورسنس)                           |               |
| ٣٨٠ | ١-٢-٤-١٠ الجزيئات التي تعطي إنبعاث التفلور (الفلورسنس)      |               |
| ٣٨١ | ٢-٢-٤-١٠ قياسات الفلورسنس (الفلورة)                         |               |
| ٣٨١ | ٣-٢-٤-١٠ الأخطاء في قياسات الفلورسنس (الفلورة)              |               |
| ٣٨٣ | ٣-٤-١٠ القياسات المعتمدة على النظائر المشعة                 |               |
| ٣٨٤ | ١-٣-٤-١٠ قياس النشاط الإشعاعي                               |               |
| ٣٨٥ | ٤-٤-١٠ طرق الكشف الأخرى                                     |               |
| ٣٨٦ | ٥-١٠ ثباتية الإنزيم                                         |               |
| ٣٨٧ | ١-٥-١٠ المحافظة على ثباتية الإنزيمات أثناء التخزين          |               |
| ٣٨٨ | ٢-٥-١٠ فقد نشاطية الإنزيم أثناء إختبارات النشاطية           |               |
| ٣٨٩ | أسئلة                                                       |               |

|     |                                    |                     |
|-----|------------------------------------|---------------------|
| ٣٩٣ | <b>مُثَبِّطَاتُ الْإِنْزِيمَات</b> | <b>الجزء الرابع</b> |
|-----|------------------------------------|---------------------|

|     |                                                                                             |               |
|-----|---------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| ٣٩٧ | <b>المثبطات العكسية</b>                                                                     | <b>فصل ١١</b> |
| ٣٩٩ | صيغ الاتزان في التنشيط العكسي                                                               | ١-١١          |
| ٤٠٢ | التنشيط التنافسي                                                                            | ٢-١١          |
| ٤٠٢ | طريقة عمل المثبط التنافسي                                                                   | ١-٢-١١        |
|     | حركات الحالة الثابتة في وجود المثبط التنافسي (التمييز الحركي للمثبط التنافسي)               | ٢-٢-١١        |
| ٤٠٣ |                                                                                             |               |
| ٤١١ | التنشيط اللاتنافسي                                                                          | ٣-١١          |
| ٤١١ | طريقة عمل المثبط اللاتنافسي                                                                 | ١-٣-١١        |
| ٤١٢ | التمييز الحركي للمثبطات اللاتنافسية                                                         | ٢-٣-١١        |
| ٤١٣ | التنشيط غير التنافسي                                                                        | ٤-١١          |
| ٤١٧ | طريقة عمل المثبط غير التنافسي                                                               | ١-٤-١١        |
| ٤١٧ | التمييز الحركي للمثبطات غير التنافسية                                                       | ٢-٤-١١        |
| ٤١٧ | التطابق الشامل للبيانات غير المحولة                                                         | ٥-١١          |
| ٤٢٠ |                                                                                             |               |
| ٤٢١ | منحنيات الجرعة- الإستجابة لتنشيط الإنزيم                                                    | ٦-١١          |
| ٤٢٦ | الإرتباط المتبادل قصريا لإثنين من المثبطات                                                  | ٧-١١          |
|     | العلاقة بين التركيب والنشاط للمثبطات وتصميم المثبطات الإنزيمية                              | ٨-١١          |
| ٤٢٩ |                                                                                             |               |
|     | علاقة التركيب- النشاط (SAR) وتصميم المثبطات في غياب المعلومات التركيبية عن الإنزيم المستهدف | ١-٨-١١        |
| ٤٣٢ |                                                                                             |               |
| ٤٣٥ | تصميم المثبط اعتمادا على تركيب الإنزيم                                                      | ٢-٨-١١        |
| ٤٣٧ | أسئلة                                                                                       |               |

|     |                                                                 |               |
|-----|-----------------------------------------------------------------|---------------|
| ٤٤١ | <b>مُثَبِّطَاتُ الْإِرْتِبَاطِ الْمَحْكَم</b>                   | <b>فصل ١٢</b> |
| ٤٤٣ | تمييز التنشيط محكم الإرتباط                                     | ١-١٢          |
| ٤٤٥ | تمييز نوع المثبط للمثبطات محكمة الإرتباط                        | ٢-١٢          |
| ٤٤٦ | تقدير $K_i$ لمثبطات الإرتباط المحكم                             | ٣-١٢          |
| ٤٥١ | إستخدام مثبطات الإرتباط المحكم في تقدير التركيز الفعّال للإنزيم | ٤-١٢          |
| ٤٥٥ | أسئلة                                                           |               |

|     |        |                                                                                                          |
|-----|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ٤٥٧ | ١٣ فصل | مثبطات الإرتباط البطئ (التثبيط المعتمد على الوقت)                                                        |
| ٤٥٨ | ١-١٣   | صيع التأثير المتبادل بين الإنزيم ومثبطات الإرتباط البطئ                                                  |
| ٤٦٢ | ٢-١٣   | منحنيات تقدم التفاعل لمثبطات الإرتباط البطئ                                                              |
| ٤٦٤ | ٣-١٢   | التمييز بين مخططات الإرتباط البطئ                                                                        |
| ٤٦٥ | ١-٣-١٣ | المخطط ب (الارتباط العكسي البطئ البسيط)                                                                  |
| ٤٦٦ | ٢-٣-١٣ | المخطط ج (تشكل الإنزيم)                                                                                  |
| ٤٦٨ | ٣-٣-١٣ | المخطط د (التثبيط غير العكسي)                                                                            |
| ٤٧٢ | ٤-١٣   | التمييز بين طرق التأثير المتبادل بين المثبطات والإنزيم                                                   |
| ٤٧٣ | ٥-١٣   | تقدير المعكوسية                                                                                          |
| ٤٧٤ | ٦-١٣   | عديد من مثبطات الإرتباط البطئ تستخدم كعقاقير                                                             |
| ٤٧٥ | ١-٦-١٣ | مثبطات إنزيم البوستاجلاندين G/H                                                                          |
| ٤٧٧ | ٢-٦-١٣ | البنسولين مثبط غير عكسي لإنزيم جلايكوببتيد ترانس ببتيداز وهو إنزيم أساسي في تخليق جدر الخلايا البكتيرية. |
| ٤٧٩ | ٧-١٣   | المثبطات غير العكسية يمكن أن تستخدم في التعرف على تركيب الإنزيم وآلية التفاعل                            |
| ٤٧٩ | ١-٧-١٣ | الكشافات الخاصة بالمجموعة (الكيمويات المحورة لأحماض أمينية منتقاة)                                       |
| ٤٨٣ | ٢-٧-١٣ | الألفة المميزة للإنزيمات                                                                                 |
| ٤٨٤ |        | أسئلة                                                                                                    |

|     |              |                                             |
|-----|--------------|---------------------------------------------|
| ٤٨٥ | الجزء الخامس | التأثيرات غير الوضعية وتنظيم نشاط الإنزيمات |
|-----|--------------|---------------------------------------------|

|     |          |                                                                                      |
|-----|----------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| ٤٩١ | ١٤ فصل   | التعاونية والتنظيم غير الوضعي لنشاط الإنزيمات                                        |
| ٤٩٥ | ١-١٤     | نماذج السلوك غير الوضعي (الألوستيري)                                                 |
| ٤٩٧ | ١-١-١٤   | نموذج الإنتقال المتوافق أو المتمائل                                                  |
| ٥٠١ | ٢-١-١٤   | نموذج التأثير المتعاقب البسيط                                                        |
| ٥٠٤ | ٢-١٤     | تأثير التعاونية على منحنيات السرعة                                                   |
| ٥٠٩ | ٣-١٤     | مثالين للتعاونية والتأثير غير الوضعي في البروتينات                                   |
| ٥٠٩ | ١-٣-١٤   | الهيموجلوبين ينقل الأكسجين بكفاءة بالإرتباط تعاونياً بالأكسجين                       |
| ٥١١ | ١-١-٣-١٤ | الهيموجلوبين يرتبط بالأكسجين تعاونياً                                                |
| ٥١١ | ٢-١-٣-١٤ | التعاونية في الهيموجلوبين ترجع إلى تغيرات في التركيب الرباعي                         |
| ٥١٣ | ٣-١-٣-١٤ | أيونات الهيدروجين وثاني أكسيد الكربون يعزز تحرير الأكسجين من الهيموجلوبين في الأنسجة |



|     |                                                                                |
|-----|--------------------------------------------------------------------------------|
| ٥١٦ | ٢-٣-١٤ إنزيم ATCase يثبط غير وضعياً بالنواتج النهائي للمسار                    |
| ٥١٧ | ١-٢-٣-١٤ التثبيط بالتغذية الخلفية لـ ATCase ينظم تخليق البريميدات              |
|     | ٢-٢-٣-١٤ ATCase يتألف من وحدات فرعية حفزية ومنظمة يمكن فصلها                   |
| ٥١٨ | ٣-٢-٣-١٤ التأثيرات غير الوضعية في ATCase تحدث نتيجة للتغيير في التركيب الرباعي |
| ٥١٩ | أسئلة                                                                          |
| ٥٢٣ |                                                                                |

## فصل ١٥ الطرق الأخرى لتنظيم نشاط الإنزيمات

|     |                                                                                           |
|-----|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| ٥٢٥ | ١-١٥ نظائر الإنزيمات                                                                      |
| ٥٢٦ | ٢-١٥ التعديل (التحويل) التساهمي هو أحد الطرق لتنظيم نشاط الإنزيمات                        |
| ٥٢٨ | ١-٢-١٥ الفسفرة هي وسيلة فعالة لتنظيم أنشطة عديدة في الإنزيمات والبروتينات                 |
| ٥٣٠ | ٢-٢-١٥ الأدينوزين أحادي الفوسفات الحلقي (cAMP) ينشط إنزيمات الفسفرة                       |
| ٥٣٢ | ٣-٢-١٥ تنظيم أيض الجلوكوجين ودور إنزيمات الفسفرة                                          |
| ٥٣٣ | ٣-١٥ عديد من الإنزيمات يتم تنشيطها بالتحلل البروتيني المتخصص                              |
| ٥٣٦ | ١-٣-١٥ الكيموتريسينوجين ينشط بتفكك خاص لرابطة ببتيدية واحدة                               |
| ٥٣٧ | ٢-٣-١٥ تنشيط الكيمونريسينوجين بالتحلل البروتيني يؤدي إلى تكوين موقع ارتباط المادة الخاضعة |
| ٥٣٩ | ٣-٣-١٥ توليد تريسين من تريسينوجين يؤدي إلى تنشيط مولدات إنزيمات أخرى                      |
| ٥٣٩ | ٤-٣-١٥ بعض إنزيمات التحلل البروتيني لها مثبطات خاصة                                       |
| ٥٤١ | ٤-١٥ متاحة الإنزيم (تنظيم كمية الإنزيم)                                                   |
| ٥٤١ | أسئلة                                                                                     |
| ٥٤٣ |                                                                                           |
| ٥٤٥ | ملحق (أ) النظام الدولي للوحدات والثوابت                                                   |
|     | ملحق (ب) برامج الحاسوب ومواقع الشبكة العنكبوتية الخاص بالإنزيمات                          |
| ٥٥٠ | ملحق (ج) التطهير موجه - الموقع وبحث تركيب المواقع                                         |
| ٥٥٤ | النشطة في الإنزيمات                                                                       |
| ٥٥٩ | ملحق (د) إجابات على بعض الأسئلة المختارة                                                  |
| ٥٧٧ | المراجع                                                                                   |

# الجزء الأول

## مقدمة عامة وتاريخ الإنزيمات General Introduction and History of Enzymes

فصل ١ مقدمة عامة عن الإنزيمات  
فصل ٢ موجز لتاريخ الإنزيمات



هذا الجزء من الكتاب يحتوي على فصلين:

**الفصل الأول:** يشتمل على عرض مبسط مختصر عن الطبيعة الكيميائية للإنزيمات ودورها في الكائنات الحية وصفاتها المختلفة كحفازات بيولوجية. والهدف من هذا الفصل التمهيدي هو التعرف على الإنزيمات بصورة موجزة قبل دراستها بصورة مفصلة.

**الفصل الثاني:** يعرض التطور التاريخي في التعرف على ودراسة الإنزيمات. إن التطور في التعرف على كينونة الإنزيمات وخصائصها استغرق فترة طويلة وارتبط بالتطور في أجهزة القياس التحليلية وطرق الفصل. في العصور القديمة تم الاستفادة من خواص الإنزيمات الحفزية باستخدام الكائنات الدقيقة في بعض العمليات الغذائية. وفي القرن الثامن عشر والتاسع عشر بدأ العلماء في دراسة تأثير الإنزيمات بدراسة هضم اللحوم في الطيور الجارحة وفي عدد من الأنظمة البيولوجية الأخرى. وعندما تم تنقية الإنزيمات في أواخر القرن التاسع عشر وأوائل القرن العشرين تم التعرف على طبيعة الإنزيمات ودراسة خواصها بصورة نظامية حتى وصلت إلى الوضع الحالي.



# فصل 1 مقدمة عامة عن الإنزيمات

## General Introduction on Enzymes

- ١-١ ما هي الإنزيمات ؟
- ٢-١ ما هو التركيب الكيميائي للإنزيمات؟
- ٣-١ مواضع الإنزيمات في الخلايا
- ٤-١ الخواص العامة للإنزيمات
- ٥-١ كيف يعمل الإنزيم
- ٦-١ ما هي العوامل التي تؤثر على معدلات (سرعات) التفاعلات الإنزيمية.
- ٧-١ تسمية وتصنيف الإنزيمات
- ٨-١ تطبيقات الإنزيمات
- ملحق تصوير (رسم) التركيبات الجزيئية

تعتمد الحياة على سلسلة محكمة جيدة التنسيق من التفاعلات الكيميائية التي يطلق عليها الأيض metabolism. والأيض هو العملية الكلية التي يتم بها تفكيك جزيئات الغذاء وتوليد الطاقة الكيميائية وبناء الجزيئات الكبيرة من الجزيئات الصغيرة والتحوللات بين الجزيئات (وهي العمليات المرتبطة بالحياة: النمو، التكاثر، الحركة والاستجابة للمؤثرات الداخلية والخارجية). مع ذلك، فإن معظم هذه التفاعلات بذاتها تسير ببطء شديد لا يعزز بقاء الحياة. لذلك فإن الخلايا الحية تحتوي على بروتينات خاصة تعمل كحفازات catalysts- التي تعرف الآن بالإنزيمات enzymes- التي تعجل إلى درجة

كبيرة معدلات rates (أى سرعات velocities) هذه التفاعلات. والإنزيمات تيسر جوهرياً عمليات الحياة بكل صورها، من الفيروسات إلى الإنسان. ولقد لوحظ أن عديد من الإنزيمات تحتفظ بنشاطها بعد فصلها من الخلايا. ولم يمض وقت طويل قبل أن يدرك الإنسان ويستثمر قدرة الإنزيمات في الطب وبناء وتصميم العقاقير وصناعة الأغذية. ومن ثم فإن دراسة خصائص الإنزيمات وطريقة عملها ليس مهماً فقط من الناحية النظرية (الأكاديمية) ولكن أيضاً لاستخدام هذه المعلومات في التطبيقات العملية. وفي هذه المقدمة سنعرض بإيجاز الطبيعة الكيميائية والخواص الحفزية للإنزيمات.

## ١-١ ماهى الإنزيمات

الإنزيمات enzymes هى حفازات بيولوجية biocatalyst التي تنتج بواسطة الخلايا الحية. ووظيفة الإنزيمات الأساسية هى تعجيل معدلات rates (أى سرعات velocities) التفاعلات الخلوية. ومثل كل الحفازات، فإن الإنزيمات تعجل سرعة التفاعلات الكيوكيوية دون أن تخضع بذاتها لأى تغير كيميائي أو فيزيائي صافي. ومن بين عديد من التفاعلات البيولوجية الممكنة، فإن الإنزيمات توجه انتقائياً التفاعلات (التي يشار إليها بالمواد الخاضعة substrate في مجال الكيمياء الحيوية) إلى مسارات الأيض المفيدة.

حتى الآن تم وصف أكثر من 3000 إنزيم مختلف، ولكن عشر هذا العدد متاح تجارياً. وإعتماداً على التقدير الحالي، فإنه من المحتمل أن يوجد حوالي 25.000 من الإنزيمات في الكائنات الحية. في أى خلية يوجد عدة آلاف من الإنزيمات المختلفة كل منها يحفز تفاعل خاص. كيف للخلية أن تحدد إحتياجاتها لإنزيم ما؟ إن إنتاج الإنزيمات يتم التحكم فيه بواسطة جينات الإنزيمات في DNA الخلوي بمعدل كل من التركيب الخاص والكمية التي تنتج. ومن ثم فإن الخلايا المختلفة في نفس الكائن لها القدرة على إنتاج أنواع مختلفة من الإنزيمات وبكميات مختلفة إعتماًداً على إحتياج الخلية.

### معدل (سرعة) التفاعل الكيميائي

على المستوى الجزيئي فإن التفاعل الكيميائي هو العملية التي يتحول فيها أنواع كيميائية؛ وهي المتفاعلات reactants- جزيئات، ذرات، أيونات أو شقوق حرة- إلى واحد أو أكثر من أنواع كيميائية أخرى وهي نواتج التفاعل products. ومعدل rate (أو سرعة velocity) التفاعل يعبر عنها بالانخفاض في كمية المادة المتفاعلة أو ظهور ناتج التفاعل (بالمول) لكل وحدة زمن حتى الوصول إلى حالة الاتزان.

### حفاز catalyst

مادة تزيد سرعة (معدل) التفاعل الكيميائي للوصول إلى حالة الإتزان ولا تؤثر على موضع الإتزان. ولا يتعرض الحفاز بذاته لأى تغير كيميائي أو فيزيائي صافي نتيجة لعملية الحفز. والحفاز البيولوجي هو الحفاز الذي يعمل على التفاعلات الخلوية

### إنزيم Enzyme

إسم إنزيم enzyme يعني "في الخميرة" اشتق من اللغة اليونانية in = en (في) + zyme = yeast (خميرة) قد أبتكر عام ١٨٩٧ بواسطة كوهن Kühne للتأكيد على وجود شيئاً ما في الخميرة مقابل الخميرة ذاتها الذي يحفز تفاعلات التخمر.

## ٢-١ ما هو التركيب الكيميائي للإنزيمات

معظم الإنزيمات المعروفة هي بروتينات خاصة. مع ذلك، فإن بعض جزيئات الحمض النووي الريبوزي (RNA) لها نشاط حفزي ويطلق عليها ريبوزومات ribosomes، التي عادة ما تحفز شطر أو تكوين روابط الفوسفات ثنائية الإستر.

والإنزيمات مثل البروتينات الأخرى تبنى من الأحماض الأمينية العشرين وهي الوحدات البنائية لكل البروتينات في الخلايا. وتطوي البروتينات الإنزيمية إلى البنية الفراغية (المجسمة) ثلاثية الأبعاد التي تتناسب مع وظيفتها في عملية الحفز. والإنزيمات في الأنظمة البيولوجية يمكن أن تكون أحادية الوحدة monomeric enzymes حيث تتألف من سلسلة عديد ببتيد واحدة، ومن ثم لا تتفكك إلى وحدات أصغر. ومعروف عدد قليل من هذه الإنزيمات، وجميعها تحفز تفاعلات التحلل المائي hydrolytic reactions مثل إنزيمات التحلل المائي للبروتين proteolytic enzymes. والجزء



الأكبر من الإنزيمات تتألف من وحدتين فرعيتين أو أكثر من سلاسل عديدة الببتيد ويطلق عليها الإنزيمات متعددة الوحدات oligomeric enzymes التي ترتبط فيها الوحدات بواسطة روابط غير تساهمية noncovalent bonds. ووحدات سلاسل عديد الببتيد في هذا الصنف من الإنزيمات يطلق عليها الوحدات الفرعية (الثانوية) subunits، وهذه الوحدات قد تكون متماثلة أو مختلفة عن بعضها البعض. والخاصية البيولوجية لهذه الإنزيمات متعددة الوحدات هو تعرضها لتحكم تنظيمي بواسطة المنشطات activators والكابحات (الخامدات repressors).

بعض الإنزيمات توجد في صورة معقد إنزيمي متعدد multi-enzyme complex، ومن أمثلة ذلك المعقد الإنزيمي Pyruvate dehydrogenase الذي يحفز تحول البيروفات إلى  $\text{CO}_2$  و acetyl-CoA. هذا المعقد الإنزيمي يتألف من ثلاثة إنزيمات  $E_1$ ،  $E_2$ ،  $E_3$  الذي يقوم كل منها بنشاط حفزي منفصل. وعملية التحول ككل تتم والمادة الخاضعة مرتبطة مباشرة بالمعقد الإنزيمي. وميزة وجود الإنزيمات في صورة معقد إنزيمي الذي يحفز سلسلة من التفاعلات المتعاقبة هو زيادة كفاءة الحفز.

### ١-٢-١ العوامل المساعدة الإنزيمية

لعدد من الإنزيمات، فإن الأحماض الأمينية البروتينية العشرين التي لها سلاسل جانبية محبة للماء، نافرة للماء، حامضية أو قاعدية تكون كافية لتأسيس كل من الارتباط المتخصص للمواد الخاضعة والجزيئات المنظمة (المنشطات والكابحات) والقيام بحفز التفاعل. مع ذلك فإنه في كثير من الحالات قد يحتاج النشاط الحفزي للإنزيم إلى عامل مساعد cofactor غير بروتيني الذي يشارك في عملية الحفز. وبروتين الإنزيم بدون العامل المساعد يطلق عليه الإنزيم المجرد (غير الكامل) apoenzyme. الذي يكون غير نشط بمفرده. وبروتين الإنزيم مع العامل المساعد يشار إليه بالإنزيم الكامل haloenzyme الذي يكون نشطاً حفزياً. والعوامل المساعدة قد تكون أيونات معدنية (مثل  $\text{Fe}^{2+}$ ،  $\text{Zn}^{2+}$ ) أو جزيئات عضوية صغيرة التي تعرف حينئذ بالمرافقات الإنزيمية coenzymes، وغالباً ما تكون مشتقات للفيتامينات (مثل  $\text{FAD}$ ،  $\text{NAD}^+$ ) والمرافق

الإنزيمي A). وأحياناً يرتبط المرافق الإنزيمي بقوة بروتين الإنزيم، وفي هذه الحالة يشار إليه بالمجموعة التعويضية Prosthetic group (مثال ذلك بروتين في إنزيم Carboxypeptidase).

### ١-٢-٢ نظائر الإنزيمات

قد يتواجد إنزيم ما في الكائنات المختلفة أو في الأنسجة المختلفة لنفس الكائن في صور مختلفة التي تحفز نفس التفاعل ولكنها تختلف في تركيبها وفي كفاءة الحفز وكذلك في حساسيتها تجاه المنشطات والمثبطات. ويطلق على هذه الصور المتعددة لنفس الإنزيم بنظائر الإنزيمات isoenzymes (أو isozymes). وترجع أهمية وجود نظائر الإنزيمات إلى إختلاف الكائنات المختلفة والأنسجة المختلفة في مستوى نشاطها الأيضي، وكذلك إختلاف هذه الكائنات والأنسجة المختلفة في تركيز المثبطات والمنشطات الخاصة بهذا الإنزيم. إضافة إلى ذلك أنه أثناء نمو الكائن، قد تحتاج مرحلة ما من مراحل النمو إلى أحد نظائر الإنزيمات دون النظائر الأخرى. وفي فصل ٤ سناقش المكونات التركيبية للإنزيمات.

### ١-٣ مواضع الإنزيمات في الخلايا

في البيئة الطبيعية فإن معظم الإنزيمات توجد في الخلايا إما حرة مذابة أو كعناصر للأغشية الخلوية أو أغشية العضيات الخلوية. والوظيفة الحفزية للإنزيمات ترتبط بمواقع تواجدتها خلال الخلية. مع ذلك، فإن بعض الإنزيمات تغادر من مواقع ابتنائها في الخلايا لتقوم بوظيفتها في مواقع أخرى. فعلى سبيل المثال فإنه في الإنسان تبنى إنزيمات الهضم في خلايا البنكرياس ثم تغادر حيث تفرز في القناة المعوية حيث تقوم بوظيفتها. وفي الخلايا مميزة النواة، فإن عديد من الإنزيمات تتمركز في عضيات organelles خاصة خلال الخلية. وهذا الفصل المكاني للإنزيمات في أجزاء مستقلة خلال العضيات والأغشية هو أحد آليات تنظيم حفز التفاعلات الإنزيمية عن طريق التحكم في سريان المواد الخاضعة أو نواتج التفاعل خلال الأجزاء المختلفة في الخلية.

إن أهم نظامين لتوليد وحفظ الطاقة في الأنظمة البيولوجية يوجدان في الأغشية التي تحتوي على مجموعة عالية التنظيم من الإنزيمات والبروتينات الأخرى. فالبناء الضوئي الذي يتم فيه حفظ وتحويل الطاقة الضوئية إلى طاقة الروابط الكيميائية يتم في الغشاء الداخلي للكوروبلاست، بينما الفسفرة التأكسدية التي يتم فيها تكوين الجزيئات عالية الطاقة (ATP) من أكسدة جزيئات الوقود تتم في الغشاء الداخلي للميتوكوندريا.

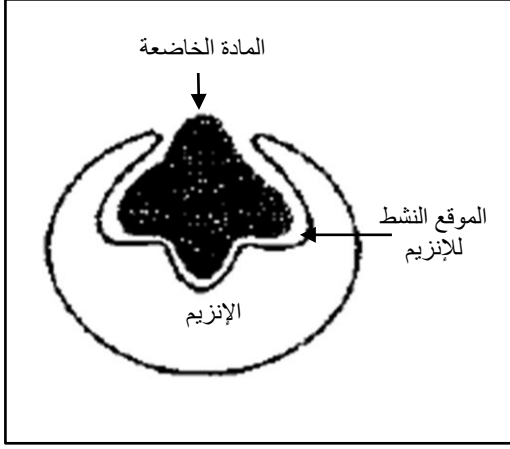
### ١-٤ الخواص العامة للإنزيمات

بالرغم من أن الإنزيمات تخضع لنفس القوانين الطبيعية التي تحكم سلوك المواد الأخرى، فإن الإنزيمات تختلف عن الحفازات الكيميائية العادية في عدة أوجه مهمة. إن أكثر خصائص الإنزيمات على الإطلاق هي معدلات الحفز العالية والتخصص وقدرتها على التنظيم والعمل تحت ظروف تفاعل معتدلة. وترجع هذه الخصائص إلى كون الإنزيمات بروتينات لها تركيب مجسم ثلاثي الأبعاد مرن، وإحتوائها على مواقع تفاعل يطلق عليها المواقع النشطة.

### ١-٤-١ المواقع النشطة Active sites

جزيئات الإنزيمات تحتوي على جيب Pocket أو شق cleft خاص يطلق عليه الموقع النشط (شكل ١-١).

والموقع النشط يحتوي على سلاسل جانبية للأحماض الأمينية التي تنشئ سطح ثلاثي الأبعاد الذي يكون متتام مع المادة الخاضعة. إن الموقع النشط يجلب المادة (أو المواد) الخاضعة في التوجيه الأمثل لتكوين وتفكيك الروابط الكيميائية المشتملة في عملية الحفز (فصل ٨).



شكل ١-١ التوافق المجسم بين المادة الخاضعة والموقع النشط للإنزيم

#### ٢-٤-١ كفاءة الحفز Catalytic efficiency

أحد الخصائص الأساسية التي تنسب للإنزيمات هي كفاءتها الحفزية. فالإنزيمات تزيد معدلات التفاعلات نموذجياً بعامل من  $10^6$  إلى  $10^{12}$  أكبر من التفاعلات غير المحفزة وعلى الأقل عدة أضعاف أكبر عن تلك التفاعلات التي تحفز كيميائياً. نموذجياً كل جزئ إنزيم يكون قادر على تحويل 100 إلى 1000 من جزيئات المادة الخاضعة إلى الناتج كل ثانية. وعدد جزيئات المادة الخاضعة التي تتحول إلى الناتج لكل جزئ إنزيم لكل ثانية يطلق عليه رقم التحول turnover number (فصل ٦).

#### ٣-٤-١ تخصص الإنزيمات Enzyme specificity

للإنزيمات درجة عالية من التخصص لكل من نوع التفاعل الذي تقوم بحفزه وفي إختيارها للمادة الخاضعة. عادة ما يحفز الإنزيم نوع واحد من التفاعلات الكيميائية. ونموذجياً يعمل الإنزيم على مادة خاضعة واحدة أو مجموعة من المواد الخاضعة التي لها سمات تركيبية مشتركة مثل المجموعات الفعالة أو نفس الرابطة في جزيئات مختلفة. إضافة إلى ذلك، فإن الإنزيمات تكون متخصصة تجاه المتناظرات الضوئية اليمينية أو اليسارية (D و L) والمتناظرات الهندسية المضاهي أو المخالف (cis و trans). ونادراً ما تعطي التفاعلات الإنزيمية نواتج ثانوية (فصل ٧).

#### ١-٤-٤ القدرة على التنظيم Capacity for regulation

الإنزيمات لها دور أكثر أهمية من كونها حفازات لتفاعلات الأيض. إن ميزة التفاعلات المحفزة بالإنزيمات ليس فقط الوصول لحالة الإتزان بصورة أسرع، ولكن أيضاً يمكن التحكم في نشاطها. فالنشاط الحفزي لعدد من الإنزيمات يتغير إستجابة لتغيير تركيز مواد خلاف مادتها الخاضعة. وآليات هذه العمليات التنظيمية تشمل التحكم غير الوضعي (الألوستيري allosteric control) (فصل ١٤)، التحويل التساهمي للإنزيم والتنشيط بالتحلل المائي لبروتين الإنزيم والتغيير في كمية الإنزيم المصنعة (فصل ١٥).

#### ١-٤-٥ ظروف التفاعل Reaction conditions

التفاعلات المحفزة بالإنزيمات تتم نسبياً تحت ظروف معتدلة مناسبة لظروف معيشة الكائنات. فعادة ما تكون درجة الحرارة المثلى للنشاط الإنزيمي قريبة من درجة الحرارة الفسيولوجية ( $37^{\circ}\text{C}$ ) في معظم الكائنات، ودرجة حرارة أعلى من ذلك في الكائنات الدقيقة المحبة للحرارة، كما أنها تعمل تحت الضغط الجوي العادي وتقريباً عند الـ pH المتعادلة. بالمقارنة فإن الحفز الكيميائي غالباً ما يحتاج إلى درجة حرارة وضغط مرتفعين بالإضافة إلى pH أبعد عن التعادل.

#### ١-٥ كيف يعمل الإنزيم

إن آلية عمل الإنزيم يمكن النظر إليها من منظورين مختلفين. الأول هو معالجة الحفز بلغة التغيير في الطاقة التي تحدث أثناء التفاعل؛ فالإنزيمات يمكن أن توفر مسار تفاعل بديل موات من ناحية الطاقة مختلف عن المسار غير المحفز. والثاني يصف كيف للموقع النشط كيميائياً أن ييسر الحفز.

### ١-٥-١ التغير في الطاقة الذي يحدث أثناء التفاعل

كل التفاعلات الكيميائية واقعيًا لها حاجز طاقة الذي يفصل المواد المتفاعلة عن النواتج. هذا الحاجز يطلق عليه الطاقة الحرة للتنشيط أو طاقة التنشيط Activation energy، وهى الفرق في الطاقة بين المتفاعلات والمركب الوسيط الذي يظهر أثناء تكوين الناتج. على سبيل المثال شكل ١-٢ يعرض التغير في الطاقة أثناء تحول المادة المتفاعلة S إلى الناتج P خلال الحالة الانتقالية  $S^\ddagger$ .



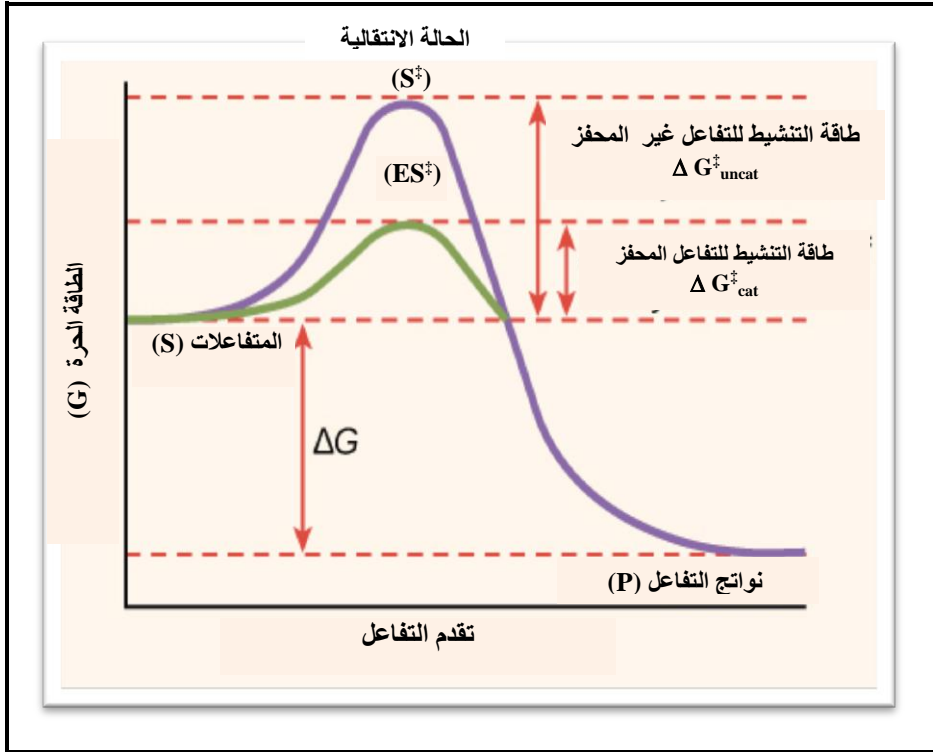
أ- الطاقة الحرة للتنشيط: قمة الطاقة في المنحنى تعبر عن الحالة الانتقالية للمركب الوسيط ( $S^\ddagger$ ) الذي يتكون أثناء تحول المادة المتفاعلة (S) إلى الناتج (P). وبسبب طاقة التنشيط الكبيرة ( $\Delta G^\ddagger$ )، فإن سرعة التفاعل الكيميائي غير المحفز يكون بطيئاً في أحوال كثيرة.

ب- معدل التفاعل: لكي تتفاعل الجزيئات فإنها يجب أن تحتوي على طاقة كافية للتغلب على حاجز الطاقة للحالة الانتقالية. في غياب الإنزيم فإن نسبة صغيرة من الجزيئات تحتوي على طاقة كافية للوصول إلى الحالة الانتقالية. إن معدل التفاعل يتحدد بعدد الجزيئات التي تحتوي على هذه الطاقة. وكقاعدة عامة كلما كانت طاقة التنشيط صغيرة كلما زاد عدد الجزيئات التي تحتوي على طاقة كافية للانتقال إلى الحالة الانتقالية، ومن ثم إسرار معدل التفاعل.

ج- مسار تفاعل بديل: الإنزيم يسمح للتفاعل أن يسير بسرعة تحت الظروف السائدة في الخلية بتوفير مسار تفاعل بديل الذي له طاقة تنشيط منخفضة (أنظر شكل ١-٢). وهذا المسار يشتمل على تكوين معقد الإنزيم المادة الخاضعة ES الذي يكون متبوعاً بخطوات متعاقبة لتثبيت الإنزيم الحالة الانتقالية ( $ES^\ddagger$ ) ومعقد الإنزيم - الناتج (EP) وأخيراً تفككه لإعادة الإنزيم الحر وتحرير نواتج التفاعل:



والإنزيم لا يغير الطاقة الحرة للمتفاعلات (المواد الخاضعة) أو النواتج، لذلك فإنه لا يغير موضع إيزان التفاعل.



شكل ٢-١. تأثير الإنزيم على طاقة التنشيط للتفاعل.

### ٢-٥-١ كيمياء الموقع النشط

الموقع النشط ليس وعاء خامل لإرتباط المادة الخاضعة، ولكن في الواقع هو جهاز (آلة) جزيئي يستخدم آليات كيميائية متنوعة التي تيسر تحول المادة الخاضعة إلى الناتج. وعدد من العوامل تكون مسئولة عن كفاءة الحفز التي تشمل.

أ- تثبيت الحالة- الانتقالية: الموقع النشط كثيراً ما يعمل كقالب جزيئي مرن الذي يرتبط بالمادة الخاضعة في تركيب هندسي يشابه الحالة الانتقالية المنشطة للجزيء ( $S^\ddagger$ ):

قمة المنحنى في شكل ١-٢). وبتثبيت المادة الخاضعة في حالتها الإنتقالية، فإن الإنزيم يزيد بدرجة كبيرة تركيز المركب الوسيط النشط الذي يمكن أن يتحول تلقائياً إلى الناتج ومن ثم يعجل التفاعل.

ب- العوامل الأخرى: الموقع النشط يوفر مجموعات حفزية التي تعزز احتمالية تكوين الحالة الإنتقالية. في بعض الإنزيمات فإن هذه المجموعات يمكن أن تشارك في الحفز الحامضي- القاعدي العام، التي فيها بواقي الأحماض الأمينية تعمل كمناحات أو مستقبلات للبروتون ( $H^+$ ). وفي حالات أخرى فإن الحفز الإنزيمي ربما تشمل على تكوين عابر لمعقد تساهمي بين الإنزيم- المادة الخاضعة، وفي فصل ٨ سوف نناقش الآليات الكيميائية في الحفز الإنزيمي.

### ٦-١ ما هي العوامل التي تؤثر على معدلات (سرعات) التفاعلات الإنزيمية

تتطلب دراسة تركيب الإنزيمات والخواص الأخر (مثل الخواص الحفزية والتنظيمية) من فصل الإنزيمات من مصادرها الطبيعية ودراستها في المعمل (خارج الكائن) *in vitro*. وفي مثل هذه الحالات، فإن العلماء اتجهوا إلى تشييد نماذج تجريبية (معملية) ونماذج نظرية (رياضية) التي تحاكي ظروف الإنزيم في بيئته الطبيعية لدراسة خواصه وهو ما يعرف بالمحاكاة *simulation*. ولقد أوضحت هذه الدراسات أن الإنزيمات المختلفة تظهر إستجابات مختلفة للتغيرات في تركيز المواد الخاضعة ودرجة الحرارة والـ pH والمثبطات. وإستجابة الإنزيمات لهذه العوامل يعطي معلومات موثوقة فيما يتعلق بطريقة عمل الإنزيمات في الخلايا الحية.

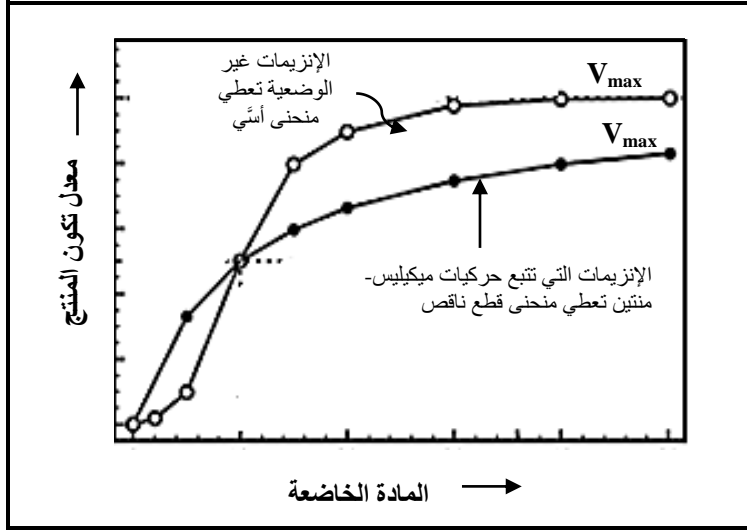
### ٦-١-١ تركيز المادة الخاضعة

أ- السرعة القصوى: معدل أو سرعة التفاعل ( $v$ ) هي عدد جزيئات المادة الخاضعة التي تتحول إلى الناتج كل وحدة زمن وعادة ما يتم التعبير عنها بوحدات ميكرومولات  $\mu\text{moles}$  من الناتج الذي يتكون كل دقيقة. وقد وجد أن معدل التفاعل المحفز إنزيمياً يزيد بزيادة تركيز المادة الخاضعة حتى يتم الوصول إلى السرعة



القصى ( $V_{max}$ ) maximum velocity (شكل ٣-١). إن ثبات معدل التفاعل عند التركيز العالي للمادة الخاضعة يعكس تشبع كل مواقع الارتباط المتاحة على الإنزيم بالمادة الخاضعة.

ب- شكل منحنى السرعة: معظم الإنزيمات تظهر حركيات ميكيلس- منتين (فصل ٦)، ورسم العلاقة بين السرعة ( $v$ ) مقابل تركيز المادة الخاضعة  $[S]$  يعطي منحنى هذلولي (قطع زائد hyperbolic curve) (فصل ٦). بالمقابل فإن الإنزيمات غير الوضعية (الألوستيرية allosteric enzymes) (فصل ١٤) تعطي منحنى أسّي sigmoidal curve (شكل ٣-١).

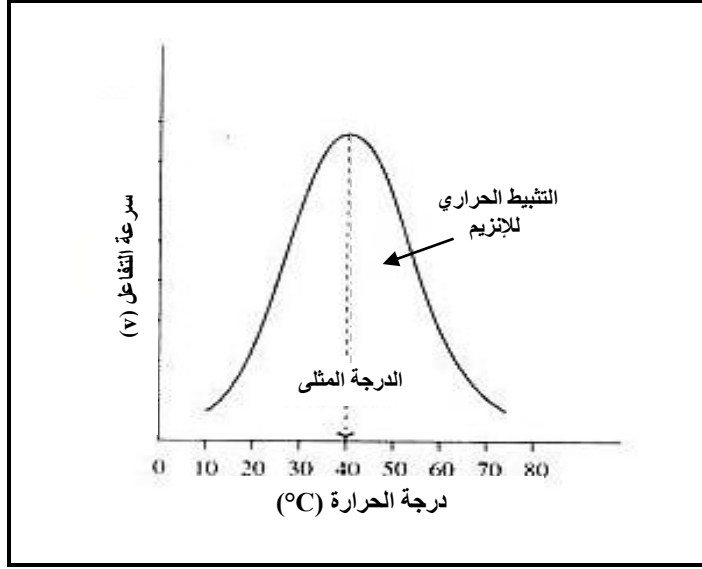


شكل ٣-١ تأثير تركيز المادة الخاضعة على سرعة التفاعل للإنزيمات التي تتبع حركيات ميكيلس- منتين والإنزيمات التي تعطي منحنى أسّي.

## ٢-٦-١ درجة الحرارة

أ- زيادة السرعة مع درجة الحرارة: تزيد سرعة التفاعل المحفز إنزيمياً مع إرتفاع درجة الحرارة حتى تصل إلى قمة السرعة. هذه الزيادة في السرعة ترجع إلى زيادة عدد الجزيئات التي تحتوي طاقة كافية (طاقة حركية) لتتجاوز حاجز طاقة التنشيط وتكون نواتج التفاعل.

ب- إنخفاض السرعة مع درجة الحرارة: الزيادة الإضافية في درجة الحرارة ينتج عنها إنخفاض في سرعة التفاعل نتيجة أن درجة الحرارة العالية تؤدي إلى هدم البنية المجسمة (تغير التركيب الطبيعي) لبروتين الإنزيم (شكل ١-٤) (فصل ١٠).



شكل ١-٤ تأثير درجة الحرارة على التفاعل المحفز إنزيمياً

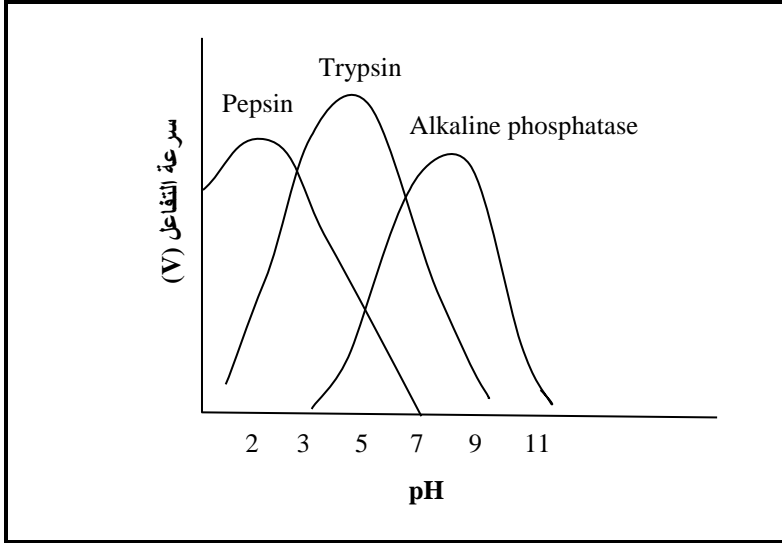
### ٣-٦-١ تأثير الرقم الهيدروجيني (pH)

أ- تأثير الرقم الهيدروجيني (pH) على تأين الموقع النشط والمادة الخاضعة: عملية الحفز عادة ما تتطلب إحتواء الإنزيم والمادة الخاضعة على مجموعات كيميائية في حالة متأينة أو حالة غير متأينة حتى يحدث التفاعل. فعلى سبيل المثال، فإن النشاط الحفزي ربما يتطلب أن تكون مجموعة أمينو في الإنزيم في صورة مرتبطة بالبروتون  $\text{NH}_3^+$ . وعند pH قاعدية فإنه يزال البروتون من هذه المجموعة ومن ثم ينخفض معدل التفاعل.

ب- تأثير الـ pH على تغير طبيعة الإنزيم: قيم الـ pH الحادة تؤدي إلى تغيير التركيب الطبيعي denaturation للإنزيم، الذي يؤدي إلى فقد النشاط الحفزي حيث أن

النشاط الحفزي لجزئ الإنزيم (البروتين) يعتمد على حالة التأين للسلاسل الجانبية للأحماض الأمينية والتركيب المجسم ثلاثي الأبعاد.

ج- pH المثلى تختلف للإنزيمات المختلفة: إل pH التي يظهر عندها الإنزيم السرعة القصوى تختلف من إنزيم إلى آخر، وكثيراً ما تعكس تركيز أيون الهيدروجين  $[H^+]$  التي يعمل عندها الإنزيم في موقعه في الكائن. فعلى سبيل المثال، فالبيبسين pepsin وهو إنزيم هضم في المعدة يكون أعلى نشاط له عند pH 2، بينما إنزيمات أخرى قد صممت للعمل عند pH قريبة من التعادل، ويحدث لها تغير في تركيبها الطبيعي في مثل هذه البيئة الحامضية (شكل ١-٥).



شكل ١-٥ تأثير الـ pH على التفاعلات المحفزة بالإنزيمات

#### ٤-٦-١ تأثير المثبطات

أى مادة يمكن أن تخفض سرعة التفاعل المحفز إنزيمياً يطلق عليها مثبط inhibitor. توجد عدة أنواع من المثبطات اعتماداً على قوة الارتباط ووقت الارتباط. فالمثبطات العكسية (التقليدية) reversible inhibitors ترتبط سريعاً بالإنزيمات خلال الروابط غير

التساهمية. وتخفيف محلول معقد الإنزيم- المثبط يؤدي إلى انفصال المثبط من الإنزيم وإستعادة نشاط الإنزيم. التثبيط غير العكسي irreversible inhibition يحدث عندما لا يستعيد معقد الإنزيم- المثبط نشاطه عند تخفيف معقد الإنزيم- المثبط. بعض المثبطات غير العكسية تعمل عن طريق تكوين رابطة تساهمية مع مجموعات خاصة على الإنزيم. ومن دراسة مثبطات الإنزيمات، فإنه يمكن الحصول على معلومات مفيدة حول تخصص الإنزيمات للمواد الخاضعة وطبيعة المجموعات النشطة (الوظيفية) في الإنزيم وآلية الحفز. إضافة إلى ذلك فإن دراسة تثبيط الإنزيمات يساعد في تصميم العقاقير التي تعمل عن طريق تثبيطها لبعض الإنزيمات المستهدفة في الخلايا. وفي الفصول ١١ و ١٢ و ١٣ سنناقش الأنواع المختلفة من التثبيط وأهميتها في دراسة الإنزيمات.

## ٧-١ تسمية الإنزيمات

منذ إكتشاف الإنزيمات والتعرف على نشاطها الحفزي حاول العلماء تسمية وتصنيف الإنزيمات اعتماداً على طبيعة التفاعلات التي تقوم بحفزها. وفي الوقت الحالي، فإن كل إنزيم يخصص له إسمين: الأول هو الإسم المذكرى (لشائع) القصير الذي يكون مناسباً للإستخدام اليومي. والآخر هو الإسم النظامي systemic name الكامل الذي يستخدم عندما يكون مطلوباً تمييز الإنزيم دون التباس.

### ١-٧-١ الإسم المذكرى (الشائع)

معظم الإنزيمات شائعة الإستخدام تسمى بإضافة اللصقة "ase" للمادة الخاضعة للتفاعل، مثال ذلك glucosidase, urease, ATPase، أو وصف الفعل الذي ينجز، على سبيل المثال lactate dehydrogenase و adenylyate cyclase (لاحظ أن بعض الإنزيمات ما زالت تحتفظ بأسمائها العادية القديمة التي لا تعطي أى إشارة حول نوع التفاعلات التي تقوم بحفزها مثال ذلك تريسين trypsin وببسين pepsin).

## ١-٧-٢ الإسم النظامي

قام الإتحاد العالمي للكيمياء الحيوية والبيولوجيا الجزيئية (IUBMB) بوضع نظام لتسمية وتصنيف الإنزيمات. وفي هذا النظام قسمت الإنزيمات إلى ستة مجموعات اعتماداً على نوع التفاعل، كل منها يحتوي على عديد من تحت المجموعات. واللاصقة "-ase" تضاف إلى الوصف الكامل للتفاعل الكيميائي المحفز، مثال ذلك: D-glyceraldehyde 3-phosphate NAD oxidoreductase. إن التسمية النظامية بـ IUBMB تكون غير ملتبسة وتعطي معلومات تامة عن التفاعل، ولكنه أحياناً يكون ثقیل (مرهق) في الإستخدام العام.

## ١-٨ تطبيقات الإنزيمات

إن المعلومات التي توفرت في العقود السابقة عن خصائص الإنزيمات داخل الكائنات in vivo وفي المعمل (خارج الكائنات) in vitro قد أدت إلى الاستفادة من الإنزيمات في عديد من التطبيقات في من مجالات الطب والعقاقير والصناعة.

## ١-٨-١ الإنزيمات كإدوات في التشخيص السريري

إنزيمات البلازما يمكن تقسيمها إلى مجموعتين، الأولى مجموعة صغيرة نسبياً من الإنزيمات تفرز في البلازما بواسطة بعض الأعضاء. على سبيل المثال، فإن الكبد بفرز مولدات الإنزيمات غير النشطة المشتملة في تجلط الدم. المجموعة الثانية تشمل عدد من أنواع الإنزيمات تحرر من الخلايا خلال التحول الخلوي turnover الطبيعي. هذه الإنزيمات عادة تكون داخل الخلايا وليس لها دور فسيولوجي في البلازما. وفي الأشخاص الأصحاء، فإن مستوى هذه الأنزيمات يكون تقريباً ثابتاً ويعبر عن الحالة المستقرة (الثابتة) التي يكون فيها معدّل التحرر من الخلايا إلى البلازما يوازن بمعّدل مساوي لإزالتها من البلازما. ووجود نشاط عالي لهذه الإنزيمات في البلازما يمكن أن يشير إلى حدوث تلف في الأنسجة الذي يصاحبه زيادة تحرير الإنزيمات من الخلايا إلى مجرى الدم. (لاحظ أن البلازما هي السائل الفسيولوجي من الدم الذي لا يحتوي على

الخلايا، أما السيرم هو السائل المحضر من الدم المتجلط الذي يستخدم في التحاليل المعملية). وعديد من الأمراض التي تحدث تلف للأنسجة يؤدي إلى زيادة في تحرير الإنزيمات من داخل الخلايا إلى البلازما. وعديد من نشاط هذه الإنزيمات يقدر بصورة رتيبة (روتينياً) لأغراض تشخيص أمراض الكبد، القلب وغيرهما.

#### ٢-٨-١ مثبطات الإنزيمات كعقاقير

عدد كبير من العقاقير التي تستخدم عالمياً هي مثبطات للإنزيمات. مثال ذلك فإن مجموعة المضادات الحيوية لاكتام lactam شائعة لإستخدام مثل البنسلين Penicillin وأموكسيسيللين amoxicillin تعمل عن طريق تثبيط واحد أو أكثر من الإنزيمات التي تشارك في بناء جدار الخلية البكتيرية المسببة للمرض.

#### ٣-٨-١ العلاج بالإنزيمات

الإنزيمات مسئولة عن كل نشاط في الحياة. ويوجد صنفين من الإنزيمات في الإنسان (١) إنزيمات الهضم التي تشمل إنزيمات Proteases و amylases و lipases التي تقوم بتفكيك مواد الغذاء: البروتين والكربوهيدرات والليبيدات (الدهون) على التوالي. ولقد استخدمت إنزيمات الهضم لعلاج مدى واسع من أمراض المعدة والأمعاء مثل الامتصاص الضعيف، وضعف كفاءة البنكرياس وأمراض البطن والحساسية للاكتوز. (٢) إنزيمات الأيض التي تحفز تفاعلات الأيض. ومعالجة إنزيمات الأيض يقابل مشاكل أساسية التي تشمل الإستجابة المناعية للجسم التي تثبط أو تزيل المواد الدخيلة.

#### ٤-٨-١ الإنزيمات التحليلية

تستخدم في الكشف عن وتقدير مستوى المركبات التي توجد في العينات البيولوجية ومنها إنزيمات glucose oxidase و cholesterol oxidase وغيرهما.

### ١-٨-٥ الإنزيمات الصناعية

التي تشمل إنزيمات الأميلاز amylases والبروتيز proteases والكاتاليز catalases والأيسومريز isomerases والليباز lipases والبنسلين أسايلاز Penicillin acylases وغيرهم. والجزء الأكبر من هذه الإنزيمات تقوم بعملية تحلل للبوليمرات البيولوجية. وهذه الإنزيمات تستخدم في عديد من عمليات التقنية الحيوية مثل إنتاج المشروبات الروحية (الجعة والنبيذ وغيرهما) وصناعة النشا وصناعة الجلود والمنظفات. من ناحية أخرى فإن إنزيم بنسولين أسايلاز وبعض الإنزيمات الأخرى تستخدم في صناعة العقاقير.

### ١-٨-٦ الكشافات الحيوية

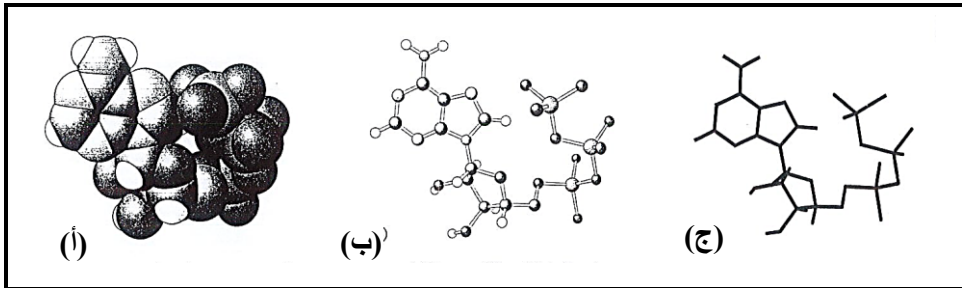
أحد التطبيقات المفيدة للإنزيمات في الأغراض التحليلية هو إستخدامها في الكشافات الحيوية biosensors. وهو جهاز تحليلي يستخدم في الكشف عن وتقدير مادة توجد في مخلوط معقد. ويتألف الجهاز من مكونين. (١) مادة حيوية (غالباً إنزيم مسكن) تتفاعل مع المادة المراد تقديرها، وهذا التفاعل ينتج عنه نوع ما من التغيرات الكيميائية أو الفيزيائية. (٢) وحدة فيزيائية تقوم بتحويل هذا التغير إلى إشارة كهربائية يتم تكبيرها وعرضها في صورة تركيز للمادة.

### ١-٨-٧ الإنزيمات كمضادات حيوية

إن إستخدام المضادات الحيوية كان لها دور كبير في مقاومة الأمراض الناتجة عن الإصابة بالميكروبات. ولكن من المعلوم الآن أيضاً أن عديد من الميكروبات أصبحت مقاومة للمضادات الحيوية، لذلك، فإن مجموعات بحثية عديد على مستوى العالم تبحث في إستخدام الإنزيمات كمضادات حيوية وهو ما يطلق عليه enzybiotics (مشتق من الكلمتين enzymes و antibiotics). وذلك لمعالجة الأمراض البكتيرية والفطرية إما بمفردها أو مع المضادات الحيوية.

### ملحق : تصوير (رسم) التركيبات الجزيئية

إن العلاقة بين التركيبات ثلاثية الأبعاد للإنزيمات ووظائفها الحفزية سوف نتناقص كثيراً في هذا الكتاب. وحيث أنه في الصفحات المطبوعة يكون متاح الرسم في إتجاهين فقط يكون مطلوباً التعبير عن التركيب الجزيئي ثلاثي الأبعاد في إتجاهين. معظم معلوماتنا عن تركيب الإنزيمات (والبروتينات بصورة عامة). قد أتت من دراسات التصوير البللوري بأشعة أكس X-ray crystallography والرنين النووي المغناطيسي (NMR) nuclear magnetic resonance. والإحداثيات الذرية لمعظم هذه التركيبات قد وضعت في قاعدة بيانات بنك معلومات البروتين Protein Data Bank (PDB). وهذه المعلومات تصف نوع العنصر وموضعه كإحداثيات  $(x, y, z)$  لكل ذرة. مع ذلك، فإن القائمة لا تعطي تصويراً للشكل ثلاثي الأبعاد للجزء، ولا تظهر أين تقع الحلزونات والتركيبات الثانوية العليا والقطاعات. إن قائمة إحداثيات الذرات يمكن تفسيرها بواسطة برامج الرسوم البيانية Graphic Programs التي تسمح بتصوير التركيب ثلاثي الأبعاد بدرجات مختلفة. تستخدم خمسة نماذج للتعبير عن هندسة الجزيئات وهي (١) نموذج مأل الحيز (٢) نموذج الكرة والقضيب (٣) نموذج الهيكل (٤) مخططات الشريط (٥) التصوير السطحي، والنماذج الثلاثة الأولى تظهر التركيب على المستوى الذري (شكل ٦-١).



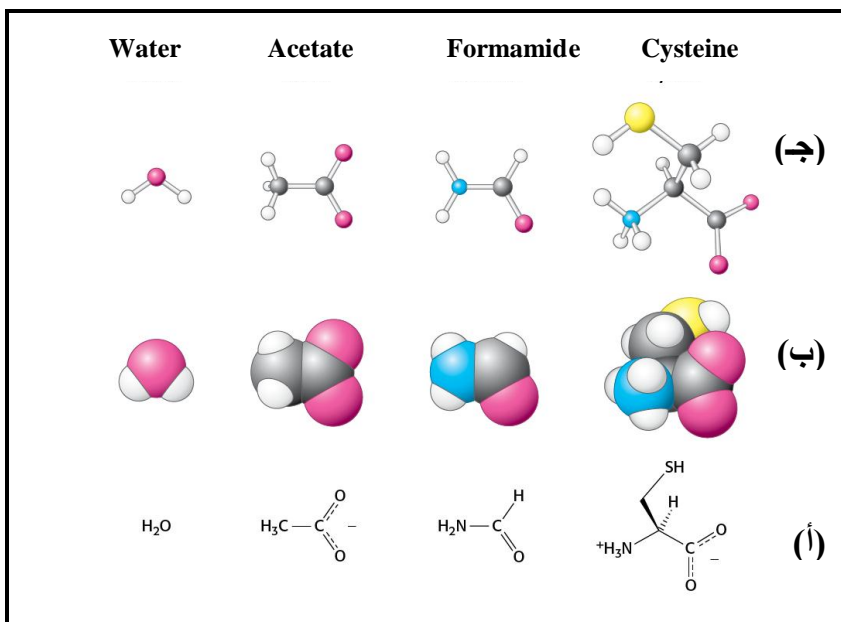
شكل ٦-١ التصوير الجزيئي. مقارنة بين (أ) نموذج مأل الحيز (ب) نموذج الكرة والقضيب (ج) نموذج الهيكل (لجزئ ATP)



١- نماذج ملاء الحيز **Space-filling models**. نماذج ملاء الحيز هي أكثر النماذج واقعية. حجم وموقع ذرة ما في نموذج ملاء الحيز تحدد بواسطة خواص ارتباطها وأنصاف أقطار فان دير فالس أو مسافة التماس. ونصف قطر فان دير فالس يصف إلى أي مدى ذرتين متجاورتين أن يقتريا من بعضهما البعض عندما لا يكونين مرتبطتين تساهمياً. ولون الذرات في النموذج قد وضع بالاتفاق.

الكربون، أسود      الهيدروجين، أبيض      النيتروجين، أزرق  
الأكسجين، أحمر      الكبريت، أصفر      الفوسفور، أرجواني

وشكل ٧-١ يعرض نموذج الكرة والقضيب ونموذج ملاء الحيز لعدد من الجزيئات البسيطة



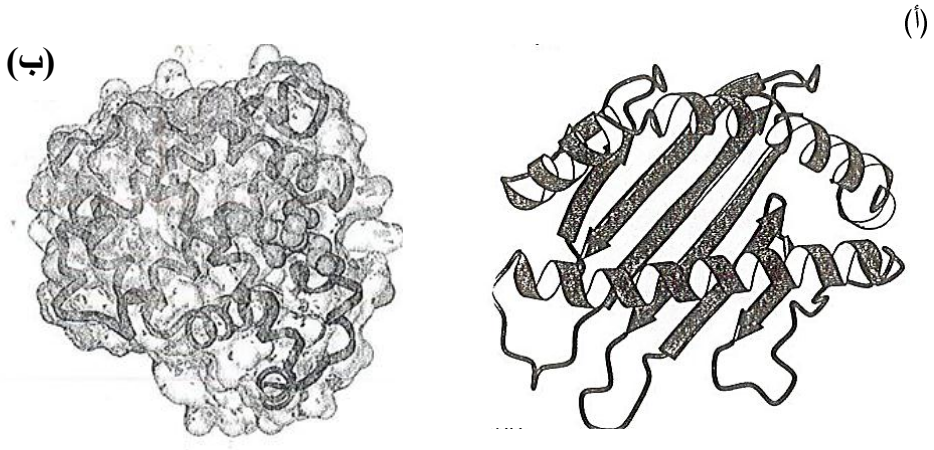
شكل ٧-١ الصيغ الكيميائية (أ) وتعبيرات نماذج ملاء الفراغ (ب) وتعبيرات الكرة والقضيب (ج) لبعض الجزيئات البسيطة

٢- نماذج الكرة والقضيب **Ball-and-stick model**. نماذج الكرة والقضيب ليست واقعية مثل نماذج ملاء الحيز، بسبب أن الذرات يعبر عنها ككرات بأنصاف أقطار أصغر عن أنصاف أقطار فان دير فالس. مع ذلك، فإن ترتيب الارتباط يمكن رؤيته بسهولة لأن الروابط يعبر عنها بوضوح كالقضبان. ونموذج الكرة والقضيب يظهر التركيب المعقد أكثر وضوحاً عن نموذج ملاء الفراغ (شكل ١-٧).

٣- نماذج الهيكل **Skeletal models**. وهو صورة أكثر بساطة الذي يظهر فقط الهيكل (البنية) الجزيئية. في هذه النماذج، فإن الذرات لا تظهر بصورة صريحة. بدلاً من ذلك، فإن موقع الذرات يحدد ضمناً بواسطة نقط ونهايات الروابط. ونماذج الهيكل كثيراً ما تستخدم في تصوير الجزيئات الكبيرة الأكثر تعقيداً. في مجال الكيمياء الحيوية، فإن إهتمام أكبر قد وجه إلى تركيبات الجزيئات البيولوجية الكبيرة ومعقداتها. هذه التركيبات تؤلف من آلاف أو حتى عشرات الآلاف من الذرات. وبالرغم من أن هذه التركيبات يمكن تصويرها على المستوى الذري، فإنه من الصعب تعيين المعالم التركيبية المميزة نتيجة للعدد الكبير من الذرات. من أجل ذلك، تم تطوير مخططات للتعبير عن تركيبات الجزيئات التي فيها لا تظهر الذرات بصورة صريحة (شكل ١-٨).

٤- مخططات الشريحة البيانية **Ribbon diagrams**. هذه الرسوم على درجة عالية من التخطيط وتستخدم في المقام الأول لتوكيد بعض السمات المميزة مثل الحلزون ألفا  $\alpha$  helix (شريط ملفوف a coiled ribbon) والصفائح بيتا  $\beta$  sheet (سهم عريض broad arrow) وعقدة أو انقلاب loops (خطوط بسيطة simple lines)، ومن ثم فإنها تعطي رؤية بسيطة وواضحة عن أنماط الطي في البروتين (شكل ١-٨ أ).

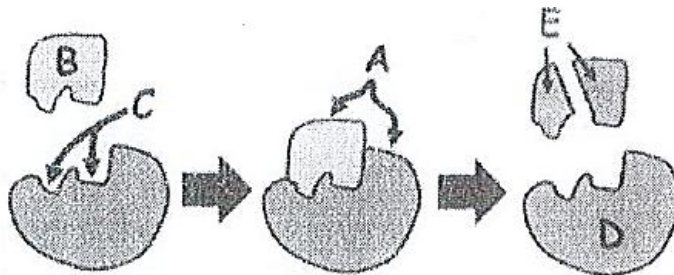
٥- التصوير السطحي **surface representation**. كثيراً ما يكون التأثير المتبادل بين الجزيئات الكبيرة مقصوداً على التأثير بين أسطح الجزيئات، وقد تم ظهور التصويرات السطحية لإظهار أسطح الجزيئات الكبيرة. وهذه التصويرات تظهر الشكل الكلي للجزيئات الكبيرة ويمكن تظليلها أو تلوينها لتبين السمات الخاصة مثل طوبوغرافيا السطح أو توزيع الشحنات الكهربائية (شكل ١-٨ ب).



شكل ٨-١ التعبيرات البديلة لتركيب البروتين (أ) مخططات الشريط: الحلزون الفا (شريط ملفوف) والشريطة بيتا (سهم عريض) وعقدة (خطوط بسيطة U) (ب) التصوير السطحي للبروتين.

## أسئلة

١- في المخطط التالي:



حدد ماذا تشير الحروف التالية:

= B

= C

= A

= D

= E

٢- عرف المصطلحات التالية:

أ- تفاعل كيميائي.

ب- حفاز.

ج- إنزيم

د- نظائر الإنزيمات.

هـ- الموقع النشط في الإنزيم.

و- الحالة الإنتقالية للتفاعل  $(S \rightleftharpoons P)$ .

٣- ما هو دور الإنزيم في التفاعلات الحيوية؟

٤- ما هي الخصائص التي تميز الإنزيمات عن الحفازات الأخرى؟

٥- لماذا تحتاج بعض الإنزيمات إلى عامل مساعد؟

٦- أرسم وميز المناطق المختلفة لمخطط الحالة الإنتقالية لتفاعل مع وبدون الإنزيم.

٧- أذكر بعض تطبيقات الإنزيمات

٨- الإنزيم يزيد معدل التفاعل بخفض طاقة التنشيط.

(أ) صح

(ب) خطأ



---

## فصل ٢ موجز لتاريخ الإنزيمات

### A Brief History of Enzymes

---

|     |                                                        |
|-----|--------------------------------------------------------|
| ١-٢ | الإنزيمات في العصور القديمة                            |
| ٢-٢ | إكتشاف الإنزيمات وعلم الإنزيمات المبكر                 |
| ٣-٢ | التطور في دراسة آليات عمل الإنزيمات (كيف يعمل الإنزيم) |
| ٤-٢ | دراسة تركيب الإنزيمات                                  |
| ٥-٢ | إكتشاف العوامل المساعدة للإنزيمات                      |
| ٦-٢ | علم الإنزيمات في الوقت الحاضر                          |

إن علم الإنزيمات له تاريخ طويل وثري، بدأ مع بداية الحضارة الإنسانية مع المشاهدات الظاهرية لتأثيراتها وتطور إلى أن أصبح في الوقت الحالي علم جزيئي كمي. فقد استخدمت الإنزيمات بواسطة شعوب الحضارات القديمة (خلال استخدام الكائنات الدقيقة والمستخلصات النباتية والحيوانية) في صناعة الخبز والمشروبات الكحولية والخل والجبن وتطرية اللحوم. ومعنى ذلك أن هذه العمليات التقليدية التي تعتمد على التحولات الإنزيمية قد شيدت قبل معرفة أى معلومات عن طبيعتها وطريقة عملها.

وعندما بدأ إستخلاص الإنزيمات من المصادر البيولوجية بدأت دراسة الإنزيمات من عدة إتجاهات مختلفة التي شملت في البداية التعرف على الطبيعة الكيميائية وتركيب الإنزيمات، ثم امتدت الدراسات عن الحركية وآلية الحفز والتخصص. وفي نفس الوقت تم

دراسة خاصة الحفز للإنزيمات النقية وشبه النقية في التطبيقات المختلفة مثل صناعة الأغذية وفي المشروبات وفي التخليق الصناعي وفي الرعاية الصحية. ولقد شهد النصف الثاني من القرن العشرين توسع لم يسبق له مثيل في معلوماتنا عن الإنزيمات في الدراسات الأساسية وفي المجالات التطبيقية المختلفة. وفي هذا الفصل سنعرض باختصار مراحل التطور في دراسة هذه الحفازات غير العادية ونشوء علم الإنزيمات الحالي.

## ٢-١ الإنزيمات في العصور القديمة

من الناحية التاريخية بدأ استخدام الإنزيمات (في صورة كائنات دقيقة) بواسطة الإنسان منذ آلاف السنين في صناعة الخمر والخبز والخل حتى قبل إكتشاف أن التخمر هو العملية المسؤولة عن هذه الصناعات. كما استخدمت بعض المستخلصات والعصائر في صناعة الجبن وتطرية اللحوم.

● أقدم المراجع المعروفة لإستخدام الإنزيمات تجارياً جاءت من وصف صناعة الخمر في مخطوطات حضارة بابل القديمة (٢١٠٠ قبل الميلاد). واستخدم هذه العملية سجّلت أيضاً في الحضارات القديمة الأخرى للمصريين والرومان واليونان والصين والهند.

● مصادر المعلومات القديمة تحتوي أيضاً على عدد من المراجع التي تشير إلى عملية مماثلة لإنتاج الخل الذي يعتمد على التحوّل الإنزيمي للكحول إلى حمض الخليك. ويبدو أن الخل كان سلعة شائعة في الحياة القديمة ليس فقط في تجهيز وتخزين الغذاء ولكن أيضاً في الأغراض الطبية.

● أحد السلع الغذائية الرئيسية التي أنتجت في العصور القديمة هو الخبز. إن تخمر عجينة الخبز بواسطة الخميرة الذي ينشأ من إنتاج ثاني أكسيد الكربون إنزيمياً قد استخدم على نطاق واسع في العصور القديمة وعلى رأسها الحضارة المصرية القديمة (٢٠٠٠ قبل الميلاد)

- منتجات الألبان (الحليب) هي أحد المصادر الغذائية الأخرى في المنتجات القديمة. في تلك الحقبة من الزمن لم يكن ممكناً تخزين اللبن الطازج لفترة زمنية مناسبة، ومن ثم فإن تحويل اللبن إلى جبن أصبح جزءاً أساسياً في إنتاج الغذاء الذي يسمح للمزارعين بنقل المنتج إلى الأسواق البعيدة في صورة مقبولة. وكان يحضر الجبن بواسطة تخثر اللبن خلال تأثير الإنزيمات. والمادة الأكثر استخداماً لهذا الغرض في تلك الأيام كانت فيكين Ficin التي يتم الحصول عليها كمستخلص من أشجار التين، وإنزيم الرنين rennin في صورة رنيت rennet وهو مستخلص من بطانة المعدة الرابعة للحيوانات المجترة مثل الأبقار.
- تطرية اللحوم meat tenderizing هي عملية أخرى تعتمد على الإنزيمات التي استخدمت في العصور القديمة. فاسكان عديد من جزر المحيط الهادي تعرف منذ عدة قرون أن إضافة عصير ثمار البابايا Papaya إلى اللحوم يؤدي إلى طراوتها. والإنزيم الفعّال في عصير البابايا هو أحد الإنزيمات المحللة للبروتين المعروف الآن بإسم البابين Papain الذي يستخدم حتى الآن تجارياً في تطرية اللحوم. وعندما قامت البحرية البريطانية باكتشاف جزر المحيط الهادي في بداية القرن الثامن عشر اكتشفوا استخدام السكان لثمار البابايا كمطري للحوم وفي معالجة مرض القوباء الحلقيّة ringworm (مرض جلدي). والتقارير عن الاستخدام الفطري لهذه الثمار قد أثار اهتمام الأوروبيين وآخرون في القرن الثامن عشر الذي أدى إلى دراسات نظامية على إنزيمات الهضم.

## ٢-٢ اكتشاف الإنزيمات وعلم الإنزيمات المبكر

بالرغم من أن الإنسان في العصور القديمة قد استخدم عملياً نشاط الإنزيمات في إنتاج بعض المنتجات المهمة، فإن الاستخدام المبكر للإنزيمات كان يعتمد بصورة مجردة على الممارسة العملية والعادات والتقاليد الموروثة وحدها بدون معرفة الأساس الكيميائي



والعناصر المسؤولة عن هذه العمليات. وفي القرنين الثامن عشر والتاسع عشر بدأ العلماء في دراسة تأثيرات الإنزيمات بطرق أكثر إنتظاماً.

● عملية الهضم كانت موضوع شائع للبحث والدراسة في نهاية القرن السابع عشر والقرن والثامن عشر. فتم دراسة هضم اللحوم بواسطة الطيور الجارحة بواسطة العالم الفرنسي رومار Reaumur (1683-1757). فقد صمم شركا يحتوي على أنبوب معدني الذي له شبكة من السلك عند أحد أطرافه التي تحمل قطعة صغيرة من اللحم لحمايتها من التأثيرات الفيزيائية لأنسجة المعدة. ولقد وجد أنه عند دخول الأنبوب في معدة الطائر الجارح، فإن قطعة اللحم قد هضمت خلال ٢٤ ساعة. ومن ثم قد استنتج أن عملية الهضم عملية كيميائية وليست فيزيائية، حيث أن قطعة اللحم قد هضمت بالتلامس المباشر مع عصارة المعدة.

● تم التوسع في تجارب رومار بواسطة سبالانزاني Spallanzani (1729-1777) الذي أظهر أن هضم اللحوم الموضوعة في أنبوب معدني تحدث في أنواع عديدة من الحيوانات التي تشمل الإنسان. وباستخدام العصارة المعدية استطاع إجراء تجربة هضم على قطعة من اللحم خارج الكائن (في المعمل) *in vitro*. وهذه التجارب أوضحت بعض الخصائص للمواد الفعالة في العصارة، منها أن عملية الهضم تتأثر بتخفيف العصارة بالماء، كما أنها تعتمد على درجة الحرارة، كذلك فإن الوقت المطلوب للهضم يعتمد على كمية العصارة المضافة لقطعة اللحم. كما أوضح أن المكونات الفعالة في العصارة المعدية تكون غير ثابتة خارج الجسم وأن عملية هضم اللحم تتناقص مع فترة التخزين للعصارة.

● في نفس الفترة تم إكتشاف أنشطة إنزيمية في عدد كبير من الأنظمة البيولوجية. فعلى سبيل المثال تم وصف أنشطة البيروكسيداز Peroxidase من الفجل الحار horseradish، كما شوهد تأثير ألفا-أميليز  $\alpha$ -amylase في الحبوب.

وهذه المشاهدات المبكرة أدت إلى مبدأ أساسي عام "المستخلصات الخام من النباتات والحيوانات تحتوي على نشاط إنزيمي"

● في الجزء الأخير من القرن التاسع عشر وبداية القرن العشرين بدأ العلماء محاولة تجزئة هذه المستخلصات للحصول على المكونات النشطة في صورة نقية. فعلى سبيل المثال فإن برتراند Pertrand في عام ١٨٩٧ نقى جزئياً إنزيم laccase من عصارة الأشجار، وإدوارد بوخنر Edward Buchnor سجل أن مستخلص الخميرة الذي لا يحتوي على خلايا خميرة حية له القدرة على تخمر السكر إلى كحول وثاني أكسيد الكربون. وقد اقترح أن عوامل فعالة يطلق عليها "زيماز Zymase" توجد في خلايا الخميرة وهي المسئولة عن عملية التخمير. وفي نفس الفترة (عام ١٨٩٧) قام كوهن Kühne بدراسة الحفز في مستخلصات الخميرة، وهو أول من أبتكر إسم "إنزيم enzyme" على هذه العوامل وهي كلمة مشتقة من اللغة اليونانية =en في zyme + خميرة والتي تعني في الخميرة in yeast.

● في عام ١٩٢٦ قام سمنر Sumner لأول مرة بتقية إنزيم اليوريز Urease في صورة بلورية من البقوليات الصغيرة (اللوبياء) Jack beans الذي يحفز تحول اليوريا إلى ثاني أكسيد الكربون والأمونيا. وأتضح أن إنزيم اليوريز عبارة عن بروتين وهذا الإنجاز أثبتت بدون شك أن الحفز البيولوجي يجرى بواسطة مواد كيميائية. وتلى ذلك فصل عديد من الإنزيمات في صورة نقية والتعرف على طبيعتها البروتينية.

" إن الوصول إلى حقيقة أن الحفز البيولوجي يتم بواسطة الإنزيمات (جزيئات بروتينات) قد أدى إلى تطور كبير في الكيمياء الحيوية بصورة خاصة وعلوم البيولوجيا بصورة عامة".

## ٢-٣ التطور في دراسة آليات عمل الإنزيمات (كيف يعمل الإنزيم)

عندما أصبحت الإنزيمات متاحة في صورة نقية كلياً أو جزئياً، فإن اهتمام العلماء اتجه إلى دراسة آليات التفاعلات المحفزة بالإنزيمات.

● إن فكرة تكوين معقدات (متراكبات) complexes بين الإنزيم وجزيئات المتفاعلات (المواد الخاضعة) قد نشأت في أواخر القرن التاسع عشر بواسطة إميل فيشر Emil Fischer عام ١٨٩٤. فقد أوضح فيشر أن الإنزيم الذي يحلل مائياً السكرور والذي يطلق عليه إنفرتين "invertin" يعمل على ألفا-D-جليكوسيد ( $\alpha$ -D-glycoside) بينما إنزيم آخر إلمسين "emulsion" يعمل على بيتا-D-جليكوسيد. وقد أستنتج أن هذين الإنزيمين يتألفان من جزيئات غير متناظرة، وأن الإنزيم والجليكوسيد يتطابقان مع بعضهما البعض مثل تطابق القفل والمفتاح حتى يمكن أن يحدث تأثير كيميائي متبادل بينهما. إن فرضية "القفل-المفتاح lock-key" لفischer ظلت مجازة بقوة كطريقة لعمل وتخصص الإنزيمات لعدد من السنين.

● في بداية القرن العشرين أظهرت عدد من الدلائل التجريبية عن تكوين معقد للإنزيم- المادة الخاضعة كمركب وسيط في التفاعل الإنزيمي. أحد الدراسات المبكرة قام بها براون Brown في عام ١٩٠٢، الذي ركز على سرعة التفاعلات المحفزة بالإنزيمات، حيث أوضح أنه عند تركيز ثابت من الإنزيم، فإن معدل التفاعل يزيد مع زيادة تركيز المادة الخاضعة حتى يصل إلى سرعة قصوى (حالة التشبع). بالمقارنة فإن التفاعلات غير المحفزة لا تظهر حالة التشبع هذه. وحقيقة أن التفاعل المحفز إنزيمياً له سرعة قصوى يقترح تكوين معقد للإنزيم - المادة الخاضعة. تلي ذلك عدد من الأدلة عن تكوين معقد الإنزيم- المادة الخاضعة، منها استخدام التصوير البللوري بأشعة إكس للمادة الخاضعة (أو مناظرات المادة الخاضعة) المرتبطة بالإنزيم، وكذلك التغير في الخواص الطيفية للمادة الخاضعة أو الإنزيم نتيجة عملية الارتباط.

● مثل هذه المشاهدات أدت إلى مرحلة للتفكير في اشتقاق معادلة المعدل الرياضية لحركية الإنزيمات التي تشتمل على معقد الإنزيم - المادة الخاضعة كمركب وسيط في سير التفاعل. وفي عام ١٩٠٣ نشر فيكتور هنري Victor Henery أول نموذج رياضي ناجح لوصف حركيات الإنزيمات enzyme kinetics. وفي عام ١٩١٣ قام

ميكليس ومننتين Michaelis and Menten بالتوسع في النموذج السابق لهنري وتم إعادة اشتقاق معادلة المعدل التي تحمل إسمهما في الوقت الحالي. ومعادلة ميكليس- مننتين تمثل الركن الأساسي لمعظم التحاليل الحديثة لحركيات التفاعلات الإنزيمية.

● كيف تقوم الإنزيمات بتسريع معدلات التفاعلات؟ كان هذا السؤال المحير للعلماء حتى ظهور نظرية الحالة الانتقالية transition state theory في النصف الأول من القرن العشرين. ففي عام ١٩٤٨ اقترح لينس بولنج Linus Pauling أن زيادة معدل التفاعل الإنزيمي يتم إنجازه بواسطة تثبيت الحالة الانتقالية transition state للتفاعل الكيميائي بالتأثيرات المتبادلة بين الحالة الانتقالية والموقع النشط active site للإنزيم. هذه الفرضية التي تم قبولها على نطاق واسع دعمت بعد ذلك بواسطة المشاهدات التجريبية أن الإنزيمات ترتبط بقوة بالجزيئات التي صممت لتحاكي تركيب الحالة الانتقالية للتفاعل.

● في خمسينات وستينات القرن العشرين قام العلماء بإعادة مراجعة الموضوع الخاص بتخصص الإنزيمات في ضوء نظرية الحالة الانتقالية لبولنج. وقد ظهرت فرضيات جديدة في ذلك الوقت مثل نموذج "التطابق المستحث induced fit" الذي اقترحه كوشلاند Koshland للمساعدة في تفسير التنافس الضروري لألفة ارتباط المادة الخاضعة وزيادة معدل التفاعل المحفز إنزيمياً.

● أثناء هذه الفترة الزمنية فإن العلماء يتقدمون بصعوبة في فهم ظاهرة أن النشاط الإنزيمي يمكن أن ينظم بواسطة جزيئات صغيرة خلاف المواد الخاضعة أو النواتج المباشرة للإنزيم. ولقد أوضحت الدراسات أن التأثيرات المتبادلة غير المباشرة بين مواقع ارتباط مميزة خلال جزئ الإنزيم يمكن أن تحدث بالرغم من أن مواقع الارتباط هذه تكون بعيدة عن بعضها البعض. وفي عام ١٩٦٥ وضع مونود Monod وومان Wyman وشانجس Changeux نظرية الانتقال غير الوضعي allosteric

transition لتفسير هذه المشاهدات. ونحن الآن نعرف أن عديد من الإنزيمات تظهر هذا النوع من التنظيم غير الوضعي (الألوستيري) allosteric regulation.

## ٢-٤ دراسة تركيب الإنزيمات

أحد المعتقدات في علم الإنزيمات الحديث هي أن عملية الحفز ترتبط جوهرياً بالتأثيرات المتبادلة الجزيئية التي تحدث بين جزئ المادة الخاضعة ومكونات جزئ الإنزيم. وطبيعة وتسلسل هذه التأثيرات المتبادلة تحدد بذاتها آلية الحفز catalytic mechanism. ومن ثم فإن استخدام الطرق الفيزيائية للتعرف على تركيبات الإنزيمات له تاريخ ثري واستمر ليصبح أعظم في الوقت الحالي. الطرق الطيفية والتصوير البللوري بأشعة إكس وحديثاً طرق الرنين النووي المغناطيسي متعدد الأبعاد multidimensional NMR جميعها أعطت معلومات وفيرة وقيمة عن تركيب ونظريات آلية عمل الإنزيمات.

- في الجزء المبكر من القرن العشرين فإن التصوير البللوري بأشعة إكس كان هو الطريقة الرئيسية للتعرف على تركيب الجزيئات الصغيرة. وفي عام ١٩٢٦ أستطاع جيمس سمنر لأول مرة من بلورة إنزيم اليوريز Urease. وهذا الإنجاز لسمنر يعتبر نقطة فاصلة ليس فقط لنجاحه في تطبيق حيود أشعة أكس في التعرف على تركيب الإنزيم، ولكن أيضاً لأن التحاليل الموسّعة التي قام بها أوضحت بصورة جلية لا لبس فيها أن البلورة تتكون من بروتين وعند إذابتها في المذيب تعطي نشاط إنزيمي.
- إن دراسات سمنر على إنزيم اليوريز قد فتحت الباب لدراسة إنزيمات أخرى. وخلال عشرين عاماً من نشر بحث سمنر، فإن أكثر من ١٣٠ إنزيم قد تم تحضيرها في صورة بلورية وتوثيقها ونشرها. مع ذلك فإن مشكلة تركيب البروتينات بواسطة حيود أشعة إكس لم تبدأ إلا في أواخر خمسينات القرن العشرين. ففي عام ١٩٥٧ أستطاع كندرو Kendrew لأول مرة من استخدام حيود أشعة إكس في تعيين التركيب ثلاثي الأبعاد الكلي لبروتين ميوجلوبيين myoglobin. وفي إثر ذلك مباشرة، فإنه تم التعرف على التركيب البللوري لعديد من البروتينات بما فيها الإنزيمات بهذه الطرق.

وفي الوقت الحالي فإن التركيب المفصل المتحصل عليه من دراسات التصوير البللوري بأشعة إكس والرنين النووي المغناطيسي متعدد الأبعاد استخدمت في توضيح تفاصيل آلية الحفز الإنزيمي وفي تصميم جزيئات المثبطات التي ترتبط عند مواقع خاصة خلال جزئ الإنزيم.

- إن الاستدلال على التركيبات ثلاثية الأبعاد للإنزيمات من طرق حيود أشعة إكس أو الرنين النووي المغناطيسي متعدد الأبعاد يتطلب معرفة تنظيم الأحماض الأمينية على طول سلسلة عديد الببتيد للبروتين، وهذا التنظيم يطلق عليه تسلسل الأحماض الأمينية amino acid sequence. ولتعيين تسلسل الأحماض الأمينية للبروتين، فإن مكوناته من الأحماض الأمينية يجب أن تحلل مائياً بنمط تعاقبي من سلسلة عديد الببتيد وتعين هويتها الذاتية بالتحليل الكيميائي أو الكروماتوجرافي. وقد قام إدمان Edman ومساعدوه بتطوير طريقة للتحلل المائي المتعاقب للأحماض الأمينية من الطرف الأميني N-terminus لسلسلة عديد الببتيد. وفي عام ١٩٥٧ سجل سانجر Sanger التسلسل الكامل للأحماض الأمينية لبروتين هورمون الأنسولين باستخدام طريقة إدمان. وفي عام ١٩٦٣ تم تعيين تسلسل الأحماض الأمينية في أول إنزيم وهو الريبونوكليز ribonuclease.

## ٢-٥ اكتشاف العوامل المساعدة للإنزيمات

النشاط الحفزي لعديد من الإنزيمات يعتمد على وجود عوامل مساعدة cofactors. والعوامل المساعدة تصنف إلى مجموعتين: معادن وجزيئات عضوية صغيرة. والعوامل المساعدة التي تكون جزيئات عضوية صغيرة يطلق عليها المرافقات الإنزيمية coenzymes، التي غالباً ما تشتق من الفيتامينات vitamins، فعدد من الفيتامينات أو مشتقاتها تعمل كمرافقات إنزيمية. وتاريخ المرافقات الإنزيمية ارتبط بالتعرف على الفيتامينات ودورها البيولوجي. ففي زمن اكتشاف الإنزيمات في أواخر القرن التاسع عشر وبدايات القرن العشرين تم اكتشاف قسم من الجزيئات الصغيرة المهمة بيولوجياً التي لها

خواص مميزة في علاج بعض الإعتلالات الغذائية. ولقد سميت هذه الجزيئات بالفيتامينات vitamins، وهذا الاسم مشتق من الكلمتين "vitalamins" أى الأمينات النشطة لوصف أهميتها الغذائية (وذلك لأن عديد من الفيتامينات التي أكتشف في البداية كانت أمينات، ولكن هذا ليس حقيقي لكل الفيتامينات). بعد ذلك اتضح أن الفيتامينات تقوم بأدوار خلوية مهمة، وبعض هذه الفيتامينات تعمل كمرافقات إنزيمية لعديد من الإنزيمات.

● أول دليل على أهمية الفيتامينات في غذاء الإنسان كان في عام ١٧٥٣. فقد وجد الطبيب البحري الإسكتلندي جيمس ليند James Lind أن تفشي مرض الاسقربوط scurvy بين البحارة في ذلك الوقت يمكن إيجتابه باشتمال غذاء البحارة على الخضروات الخضراء أو الموالح. وهذا الاكتشاف أستخدم بواسطة القبطان جيمس كوك James Cook للمحافظة على صحة جيدة لطاقم السفينة أثناء رحلاته البحرية الاستكشافية في الفترة من ١٧٦٨ إلى ١٧٧٦. والمادة الفعالة في هذه الأغذية تم التعرف عليها بعد ذلك بفترة طويلة كفيتامين C.

● الفيتامين الأول الذي ميّز كمادة كيميائية كان الثيامين thiamine، الذي يؤدي نقصه إلى مرض بري بري beriberi وأعراضه عجز وترنج. والنقص الغذائي لهذا الفيتامين تم تمييزه في البداية في الأسطول البحري الياباني في أواخر القرن التاسع عشر. وحدث البري البري بين البحارة قد أعزى إلى التغذية على أرز مصقول بواسطة الأميرال تاكاكي Takaki الذي أزال هذا الاعتلال الجسدي عام ١٨٨٥ بتحسين غذاء البحارة. والدراسات التي أجريت بعد ذلك بواسطة إيجكمن Eijkman ميزت مادة كيميائية في قشرة الأرز لها القدرة على علاج البري بري. وهذا الفيتامين اتضح فيما بعد أنه عامل مساعد في تفاعلات إزالة مجموعة الكربوكسيل من المركبات الخلوية.

● وخلال عدد من السنين، فإن عائلة الفيتامينات الموضحة في جدول ٢-١ تم تمييزها وتعيين تركيبها الكيميائي. بعض الفيتامينات مثل فيتامين C لها تركيب بسيط، بينما

البعض الآخر مثل فيتامين ب<sub>١٢</sub> (B<sub>12</sub>) له تركيب شديد التعقيد. ولقد استغرق وقت طويل للتعرف على التفاصيل الجزيئية لطريقة عملها الكيموحيوي. وفي الحقيقة فإن عديد من الفيتامينات تعمل كمرافقات إنزيمية لعدة أنواع من الإنزيمات. وجدول ١-٢ مسجل فيه المرافقات الإنزيمية التي سنقابلها كثيراً في هذا الكتاب.

جدول ١-١ الفيتامينات والمرافقات الإنزيمية المقابلة

| الفيتامين       | الإسم الكيميائي  | مرض النقص الغذائي            | الوظيفة الكيموحيوية            | كيمياء المرافق الإنزيمي                                            |
|-----------------|------------------|------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| A               | Retinal          | العمى الليلي                 | صبغات الإبصار                  | إزالة مجموعة الكربوكسيل من الأحماض الكيتونية ألفا                  |
| B <sub>1</sub>  | Thiamin          | بيرى بيرى                    | المرافق الإنزيمي (TPP)         | تفاعلات الأكسدة والاختزال التي تشتمل على نقل إلكترون فردي أو إثنين |
| B <sub>2</sub>  | Riboflavin       | ضرر الجلد                    | المرافقات الإنزيمية (FMN, FAD) | تفاعلات الأكسدة والاختزال                                          |
| Niacin          | Nicotinamid      | البلاجرا                     | المرافق الإنزيمي NAD           | نقل مجموعة الأمين                                                  |
| B <sub>6</sub>  | Pyridoxal        | تشنج                         | المرافق الإنزيمي PLP           | إعادة تنظيم الشقوق الحرة                                           |
| B <sub>12</sub> | Cobalamine       | فقر الدم الخبيث              | مرافق إنزيمي B <sub>12</sub>   | عامل إختزال (تكوين الكولاجين)                                      |
| C               | Ascorbic         | اسقربوط                      | مرافق إنزيمي، مضاد للأكسدة     | --                                                                 |
| D               | Calciferol       | كساح الأطفال                 | اتزان الكالسيوم                | --                                                                 |
| E               | Tecopherol       | أنيميا التحلل لحديثي الولادة | مضاد الأكسدة                   | --                                                                 |
| H               | Biotin           | ضرر للجلد                    | مرافق إنزيمي                   | إدخال مجموعة الكربوكسيل                                            |
| K               | Phylloquinon     | نزف                          | مرافق إنزيمي                   | إدخال مجموعة الكربوكسيل في ببتيدات الجلوتاميل                      |
|                 | Folic acid       | تضخم خلايا الدم              | مرافق إنزيمي (نتراهيدروفولات)  | نقل ذرة كربون                                                      |
|                 | Pantothenic acid | التهاب جلد القدم             | مرافق إنزيمي (CoA)             | نقل مجموعة الأسايل                                                 |

CoA= coenzyme A; FAD= Flavin adenine dinucleotide; FMN= Flavin mononucleotide, NAD= Nicotinamide adenine dinucleotide; PLP= pyridoxal-5'-phosphate; TPP= Thiamine pyrophosphate



## ٦-٢ علم الإنزيمات في الوقت الحاضر

ما زالت أسئلة عديدة لم يتم الإجابة عليها فيما يتعلق بتفاصيل آليات النشاط الإنزيمي وعلاقته بتركيب الإنزيم. والأداتين الأكثر فاعلية للإجابة على هذه الأسئلة في الوقت الحاضر هم الفيزياء الحيوية للتعرف على تركيب الإنزيم وتطبيق طرق البيولوجيا الجزيئية على الإنزيمات.

● إستمّر استخدام التصوير البللوري بأشعة إكس بصورة رتيبة في التعرف على تركيب الإنزيمات ومعقدات الإنزيم-المادة الخاضعة أو معقدات الإنزيم مع منازرات المادة الخاضعة أو منازرات الحالة الانتقالية. إضافة إلى ذلك فإن طرق الرنين النووي المغناطيسي الجديدة وطرق نقل المغنطة magnetization transfer قد استخدمت في تعيين التركيب ثلاثي الأبعاد للإنزيمات الصغيرة في المحلول وتعيين تركيب المتصلات ligand (أي المواد الخاضعة) المرتبطة بالإنزيمات على التوالي. كما أن تطبيق حيود الإلكترونات المعجلة بالسيكلوترون قد أتاح للباحثين تعيين المركبات الوسيطة أثناء الحفز الإنزيمي، ومن ثم تعطي صورة مفصلة عن الخطوات الفردية في الحفز الإنزيمي. أيضاً فإن طرق الفيزياء الحيوية الأخرى مثل الطرق الضوئية (الأشعة المرئية، فوق البنفسجية، الإشعاع الضوئي والامتصاص الاختياري الدائري circular dichroism) والتحليل الطيفي للاهتزاز (أي الأشعة تحت الحمراء وتفرق الأشعة لرامان) قد استخدمت بالمثل في التعرف على تركيب الإنزيمات ونشاطها في المحلول. والتطور التقني في عديد من هذه الطرق الطيفية قد جعلها فعالة جداً كأدوات في دراسة الإنزيمات.

● من ناحية أخرى، فإن طرق البيولوجيا الجزيئية: الاتحادات الجديدة للحمض النووي منزوع الإكسجين (أو DNA المؤلف) recombinant DNA وتنسبل الجين gene cloning، قد سمحت تنسيل الجين والتعبير عنه في كائنات مضيفة خلاف الكائن مصدر الجين بكفاءة عالية. فالإنزيمات التي لم يكن من الممكن عزلها قد تم تمييزها والتعرف عليها بواسطة التنسيل الجيني. فالتعبير الزائد للإنزيمات في مصيفات

أولية النواة قد سمح بتتقية ووصف خصائص الإنزيمات التي توجد بكميات صغيرة جداً في مصادرها الطبيعية. أيضاً فإن البيولوجيا الجزيئية قد أتاحت للباحثين من تحوير تتابع الأحماض الأمينية في الإنزيم. فاستخدام التطفير موجّه الموقع site-directed mutagenesis (الذي فيه يستبدل باقي حمض أميني بآخر)، والتطفير بالإزالة deletional mutagenesis (الذي فيه تزال أجزاء من سلسلة عديد الببتيد للبروتين) قد أتاحت للعاملين في مجال الإنزيمات من تعيين المجموعات التي تشارك في عملية الإرتباط بالمادة الخاضعة وفي عملية الحفز.

## أسئلة

- ١- ما هي الصور التي استخدمت بها الإنزيمات في العصور القديمة؟
- ٢- ما هي العمليات الصناعية التي استخدمت فيها الإنزيمات في العصور القديمة؟
- ٣- لماذا يعتبر إنجاز سمنر في فصل وبللورة إنزيم اليوربيز نقطة فاصلة في مسيرة تطور دراسة الإنزيمات؟
- ٤- من هو العالم الذي وضع فرضية القفل والمفتاح؟
- ٥- من هم العلماء الأوائل الذين وضعوا معادلة المعدل لحركية الإنزيمات؟
- ٦- من هو العالم الذي اقترح نظرية الحالة الانتقالية لتفسير زيادة معدل التفاعل الإنزيمي.
- ٧- من هم العلماء الذين وضعوا نظرية الإنتقال غير الوضعي لتفسير تنظيم النشاط الإنزيمي.
- ٨- ما هي الطرق الفيزيائية المستخدمة في التعرف على التركيب المجسم ثلاثي الأبعاد للإنزيمات
- ٩- ما هي الطرق التي تستخدم في التعرف على بواقي الأحماض الأمينية في الموقع النشط للإنزيم؟



## الجزء الثاني

# كيمياء الحياة والمكونات التركيبية للإنزيمات

## Chemistry of Life and Structural Components of Enzymes

|                                       |       |
|---------------------------------------|-------|
| أساسيات في كيمياء الحياة              | فصل ٣ |
| المكونات التركيبية للإنزيمات          | فصل ٤ |
| إتزان الارتباط بين البروتين - المتصلة | فصل ٥ |

الإنزيمات أدوات جزيئية التي تحفز تفاعلات الأيض في الكائنات الحية بتفكيك وتكوين الروابط في المواد المتفاعلة (المواد الخاضعة). وتتميز الإنزيمات كحفازات بيولوجية عن الحفازات الكيميائية العادية بكفاءة الحفز والتخصص والقدرة على التنظيم بالإضافة إلى القيام بعملها تحت ظروف معتدلة من درجة الحرارة والـ pH. هذه الخصائص التي تنسب للإنزيمات ترجع إلى خواصها الكيميائية والتركيبية المجسمة التي تسهل ارتباطها بالمواد الخاضعة وإجراء التحولات الكيميائية عليها. لذلك فإن هذا الجزء التحضيري يشتمل على ثلاثة فصول.

**الفصل الثالث:** يعرض بصورة مبسطة الإرتباط الكيميائي في الجزيئات، والتغيرات في الطاقة الحرة أثناء التفاعل مع الإشارة إلى طاقة التنشيط. ثم تنتقل المناقشة إلى التأثيرات المتبادلة غير التساهمية ودورها في التركيب المجسم ثلاثي الأبعاد للبروتينات وإرتباطها بالمواد الخاضعة. وأخيراً مناقشة معدلات التفاعلات الكيميائية التي تكون مهمة في فهم معدلات التفاعلات الإنزيمية.

**الفصل الرابع:** يناقش المكونات التركيبية للإنزيمات مع التركيز على الخواص الكيميائية للسلاسل الجانبية للأحماض الأمينية في البروتينات، وكذلك دور العوامل المساعدة في الحفز الإنزيمي.

**الفصل الخامس:** يناقش إرتباط المتصلات بالبروتينات التي تشمل إرتباط المواد الخاضعة والمثبطات بالإنزيمات والطرق التجريبية لقياس الإرتباط التي تكون مهمة في موضوع حركية الإنزيمات.

---

## فصل ٣ أساسيات في كيمياء الحياة

### Principal of Chemistry of Life

---

|     |                                                    |
|-----|----------------------------------------------------|
| ١-٣ | المدارات الذرية والمدارات الجزيئية                 |
| ٢-٣ | الحركة الحرارية الكيميائية                         |
| ٣-٣ | كيمياء الحمض - القاعدة                             |
| ٤-٣ | التشكيل الفراغي والبنية الفراغية للجزيئات          |
| ٥-٣ | التأثيرات المتبادلة غير التساهمية والارتباط العكسي |
| ٦-٣ | معدلات التفاعلات الكيميائية                        |

إن جوهر العمليات البيولوجية هي أساساً الكيمياء التي تحدث بين الجزيئات التي تتضمن تفاعلات كيميائية. والتفاعلات الكيميائية سواء المحفزة إنزيمياً أو غير المحفزة تحدث أساساً خلال تكوين وتفكيك الروابط الكيميائية. والسمة المميزة للإنزيمات هو قدرتها على حفز تفاعلات كيميائية خاصة بمعدلات عالية جداً مقارنة بالتفاعلات التلقائية غير المحفزة. وهذا التخصص وزيادة المعدل للإنزيمات ينتج من وجود مجموعات كيميائية نشطة خلال موقع الارتباط بالإنزيم (الموقع النشط) بالقرب من مجموعات أخرى في الجزيء المستهدف (المادة الخاضعة) بطريقة تسهل خطوات التفاعل المطلوبة لتحويل المادة الخاضعة إلى ناتج التفاعل. وفي الفصول التالية سنوضح التفاصيل الجزيئية المرتبطة بتخصص الإنزيمات وزيادة المعدل. مع ذلك فإننا أولاً يجب أن نفهم الارتباط

الكيميائي والتفاعلات الكيميائية التي تحدث في كل من الإنزيم والجزيئات البسيطة التي يعمل عليها الإنزيم. وهذا الفصل يعتبر مراجعة للمادة العلمية التي تدرس في مقررات الكيمياء التمهيدية. لذلك فإن فهم الأفكار العامة المعروضة في هذا الفصل (الروابط الكيميائية وبعض التفاعلات البسيطة المصاحبة لهذه الروابط) تعتبر أساسية لفهم المادة العلمية المعروضة في الفصول التالية.

### ٣-١ المدارات الذرية والمدارات الجزيئية

التفاعلات الكيميائية سواء المحفزة إنزيمياً أم لا تنشأ أساساً خلال تكوين وتفكيك الروابط الكيميائية. إن نمط الارتباط الذي يشاهد في الجزيئات هو الروابط التساهمية covalent bonds (أو المدارات الجزيئية molecular orbitals) التي تنشأ من التأثيرات المتبادلة بين المدارات الإلكترونية في الذرات الفردية. ومن ثم فإننا في هذا الموضع سنشرح بإيجاز المدارات الذرية ثم المدارات الجزيئية التي تمثل الروابط التساهمية.

#### ٣-١-١ المدارات الذرية

إننا نعلم من دراسة المقررات الكيميائية التمهيدية أن الإلكترونات في الذرة تحتل مدارات ذرية منفصلة و متميزة التي تحيط بنواة الذرة. والإلكترونات في هذه المدارات يكون لها طاقات مميزة. وعدد الإلكترونات في الذرة المتعادلة يساوي عدد البروتونات في نواة الذرة. وتميز العناصر الكيميائية بعضها عن بعض بعدد البروتونات في نواة الذرة. والدراسات التي تجرى على العناصر الكيميائية تهدف في المقام الأول على التعرف على توزيع الإلكترونات في المدارات الذرية وطاقة هذه الإلكترونات.

والنظرية المرضية حتى الآن لمعالجة التركيب الذري هي ميكانيكا الكم. وناتج هذه المعالجة تعرف بالمعادلة الموجية لشوردينجر Schrödinger (١٩٢٦) التي تم حلها بالضبط لنظام بسيط يتألف من إلكترون واحد ونواة (مثل ذرة الهيدروجين وأيون الهليوم). وميكانيكا الكم تفترض أنه يصاحب حركة الإلكترونات موجة ثابتة. وحل دالة الموجة يعطي معلومات عن موضع وطاقة الإلكترون في الذرة.

وبدون الدخول في التفاصيل الرياضية المعقدة، فإننا يمكن القول أن تطبيق معادلة شورندجر على ذرة الهيدروجين يشير إلى أن المدارات الذرية تكون كمّاء quantized، بمعنى أن مدارات محددة تكون ممكنة وأن الإلكترونات في هذه المدارات يكون لها طاقات محددة مميزة. ولا يمكن للإلكترونات أن يكون لها طاقات بين هذه الطاقات المحددة.

وأى مدار ذرى يمكن وصفه بصورة مفردة بواسطة ثلاثة قيم مرتبطة بالمدار تعرف بأرقام الكم quantum numbers وهى كالتالى:

١- رقم الكم الرئيسي (Principal quantum number (n) يصف الحجم الفعّال للمدار ويحدد طاقة المدار، وله القيم  $n = 1, 2, 3, \dots$  وقيم  $n$  تعطي نوع الغلاف الذي يأخذ الرموز  $K$  ( $n = 1$ ) و  $L$  ( $n = 2$ ) و  $M$  ( $n = 3$ ) جدول ٣-١.

٢- رقم كم شكل المدار (Orbital shape quantum number ( $l$ ) يصف كثافة الاحتمال العامة في الفضاء التي يشغلها الإلكترون في المدار. وقيم  $l$  هى  $l = 0, 1, 2, \dots, n-1$ . ومن ثم فإنه لكل قيمة من  $n$  توجد  $n$  قيمة مسموح بها لـ  $l$ . فعلى سبيل المثال لـ  $n=3$ ، فإن  $l$  قد تكون 0، 1 أو 2. وقيم  $l$  تأخذ رموز خاصة:  $s$  ( $l = 0$ ) و  $p$  ( $l = 1$ ) و  $d$  ( $l = 2$ ).

٣- رقم الكم المغناطيسي ( $m_l$ ) يصف كمية التحرك الزاوي المداري المرتبط بالمدار الإلكتروني، ويمكن اعتباره كوصف لتوجيه المدار في الفضاء بالنسبة لمحور مثبت مختار. وقيم  $m_l$  تكون في المدى من  $-l$  إلى  $+l$ .

ورقم الكم  $l, n$  معاً يصفان التوزيع الإحتمالي في الفضاء للإلكترونات خلال المدار، بينما  $m_l$  يصف توجيه المدار في الفضاء بالنسبة لمحور مثبت مختار.

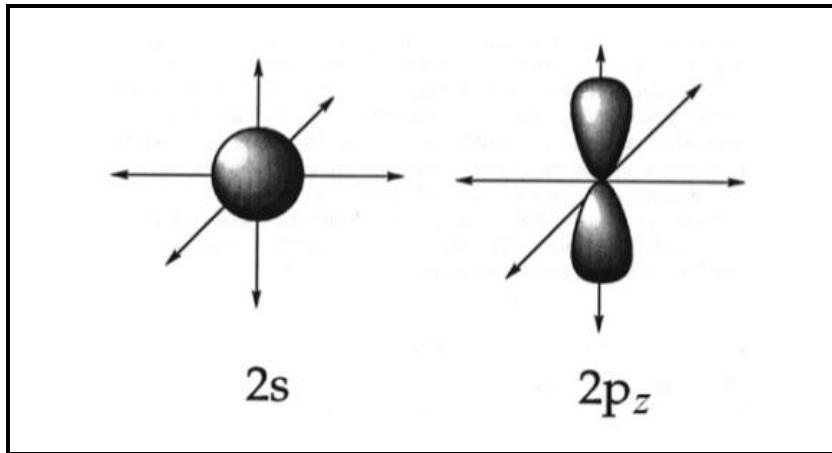
ومن القواعد السابقة فإننا يمكن أن نحصل على قيم  $n$  و  $l$  و  $m_l$ . وكل مجموعة من قيم أرقام الكم الثلاثة تعين المدارات في ذرة الهيدروجين. و جدول ٣-١ مسجل فيه مدارات ذرة الهيدروجين والرموز التي توصف بها. وشكل ٣-١ يعرض التعبير التصويري للمدارين  $2p_z, 2s$ .



جدول ٣-١ المدارات المختلفة المحتملة في ذرة الهيدروجين

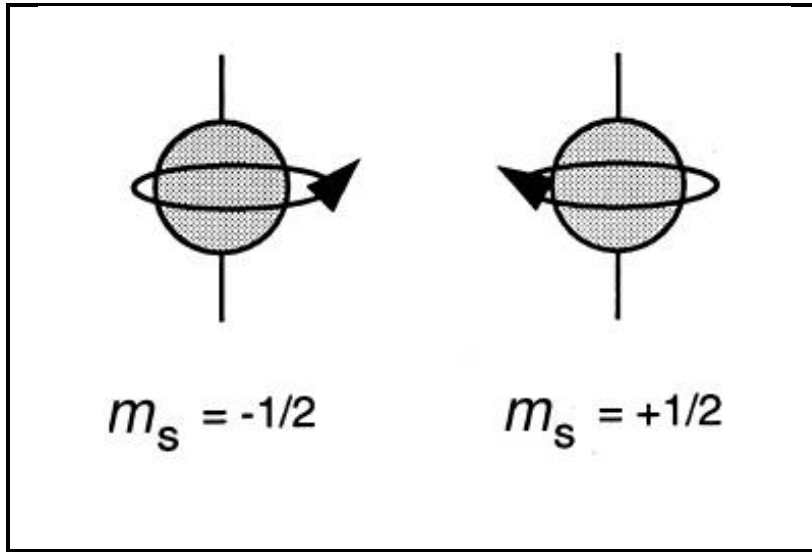
| المدار                                    | تحت الغلاف | الغلاف  |
|-------------------------------------------|------------|---------|
| 1s                                        | $m_l = 0$  | $l = 0$ |
| 2s                                        | $m_l = 0$  | $l = 0$ |
| 2p <sub>x</sub>                           | $m_l = -1$ | $l = 1$ |
| 2p <sub>y</sub>                           | $m_l = 0$  |         |
| 2p <sub>z</sub>                           | $m_l = 1$  |         |
| 3s                                        | $m_l = 0$  | $l = 0$ |
| 3p <sub>x</sub>                           | $m_l = -1$ | $l = 1$ |
| 3p <sub>y</sub>                           | $m_l = 0$  |         |
| 3p <sub>z</sub>                           | $m_l = 1$  |         |
| 3d <sub>z<sup>2</sup></sub>               | $m_l = -2$ | $l = 2$ |
| 3d <sub>z<sup>2</sup>-y<sup>2</sup></sub> | $m_l = -1$ |         |
| 3d <sub>xy</sub>                          | $m_l = 0$  |         |
| 3d <sub>xz</sub>                          | $m_l = 1$  |         |
| 3d <sub>yz</sub>                          | $m_l = 2$  |         |

ونظراً لأن طاقة ذرة الهيدروجين تعتمد فقط على رقم الكم الرئيسي  $n$ ، فإن المدارات التي لها نفس قيم  $n$  ولكن لها قيم مختلفة من  $l$ ، و  $m_l$  يكون لها نفس الطاقة. ويتبع ذلك أن المدارات التي لها نفس قيمة  $l$  تكون متحللة degenerate. والمدارات المتحللة التي لها نفس قيم  $n$  يقال أنها تنتمي إلى نفس الغلاف. والمدارات التي لها نفس قيم  $n$  ولكن لها قيم مختلفة من  $l$  يقال أنها تنتمي إلى تحت أغلفة مختلفة.



شكل ٣-١ التصوير الفضائي (الحيزي) لتوزيع الإلكترون في المدارين 2s و 2p<sub>z</sub>.

٤- رقم كم مغزل الإلكترون ( $m_s$ ). وهو يصف الإتجاه الذي فيه تخيل الإلكترون يدور حول محور إفتراضي في وجود مجال مغناطيسي (شكل ٣-٢). وحيث أنه لا يمكن لإلكترونين أن يكونا لهما نفس قيم أرقام الكم الأربع، فإن ذلك يقتضي أن إثنين من الإلكترونات في نفس المدار يكون أحدهما له دوران حول المحور في إتجاه عقرب الساعة ( $m_s = 1/2$ ) والآخر يجب أن يكون دورانه عكس اتجاه عقرب الساعة ( $m_s = -1/2$ )، أى يجب أن يكون مغزلهما مزدوج (مقترن). وهذه الفكرة يطلق عليها قاعدة بولي الإقصائية Pauli exclusion principle التي غالباً ما يتم التعبير عنها بيانياً بالتعبير عن الحركة المغزلية للإلكترون كسهم موجه إما للأعلى أو إلى أسفل خلال المدار الذري.



شكل ٣-٢ الحركة المغزلية يتم التعبير عنها كدوران الإلكترون في مجال مغناطيسي وإتجاه الدوران للإلكترون إما أن يكون في إتجاه عقرب الساعة ( $m_s = +1/2$ ) ( $\uparrow$ ) أو في إتجاه عكس عقرب الساعة ( $m_s = -1/2$ ) ( $\downarrow$ )

وإستخدام طريقة ميكانيكا الكم للذرات عديدة الإلكترونات تنتج سلسلة من المدارات الذرية، كل منها يكون مميز بأربعة أرقام كم  $n$  و  $l$  و  $m_l$  و  $m_s$  وطاقات مميزة. وهذه المدارات لا تختلف جوهرياً عن مدارات ذرة الهيدروجين. فالإختلاف الأساسي يرجع إلى زيادة الشحنة النووية التي تؤدي إلى إنكماش وتقلص المدارات وبالتالي تغير طاقة هذه المدارات عن طاقة ذرة الهيدروجين. ومن الشائع أن يقال عن هذه المدارات التي ضبظت بواسطة الشحنة النووية بمدارات مشابهة لمدارات الهيدروجين. فبالمقارنة بذرة الهيدروجين التي تعتمد فيها طاقة المدارات على رقم الكم الرئيسي  $n$  فقط، فإن طاقة المدارات في الذرات عديدة الإلكترونات تعتمد على كل من رقم الكم الرئيسي  $n$  ورقم كم شكل المدار (رقم الكم المداري)  $l$ . فالمدارات  $2s$  و  $2p$  التي تكون طاقتهما واحدة في حالة ذرة الهيدروجين يحدث لهما انفصال (أي إختلاف في الطاقة في حالة الذرات عديدة الإلكترونات).

### ٣-١-٢ توزيع الإلكترونات (التشكيل الإلكتروني) للذرات

كل مدار ذري يرتبط به كمية محددة من الطاقة، بمعنى أن المدارات تكون مكمأة. والإلكترونات تملأ هذه المدارات اعتماداً على طاقات الجهد لها طبقاً للقاعدتين التاليتين.

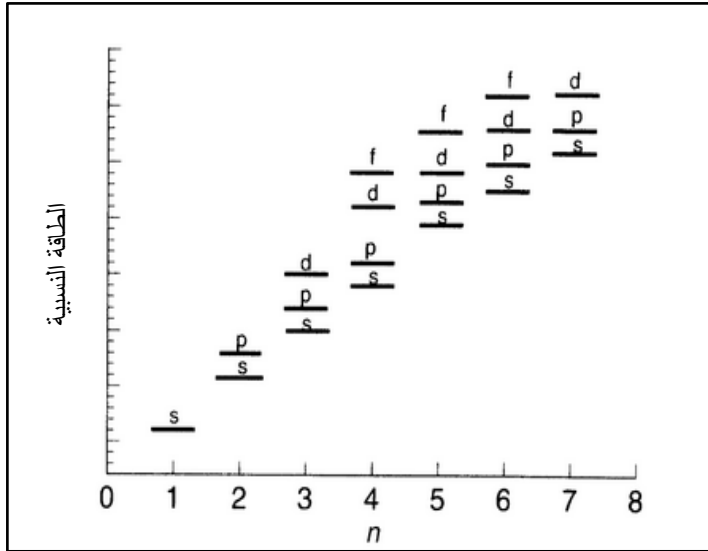
١- في الحالة الأرضية ground state للذرة (الحالة العادية غير المثارة) تملأ المدارات الأقل في الطاقة متبوعة بالمدارات الأعلى في الطاقة بترتيب تصاعدي للطاقة الذي يعرف بقاعدة البناء الصاعد aufbau principle. وفي طريقة البناء الصاعد ترتب المدارات المختلفة بناءً على زيادة الطاقة ثم تضاف الإلكترونات واحد بعد الآخر في المدارات الأدنى في الطاقة حتى يتساوى عدد الإلكترون مع عدد الشحنات النووية (شكل ٣-٣).

٢- بناءً على قاعدة بولي الإقصائية فإنه لا يمكن الإلكترونين في ذرة ما أن يكون لهما نفس أرقام الكم الأربعة. وهذا يعني أنه في مدار ما الذي يكون مميز ب  $n, l, m_l$

فإن أقصى عدد من الإلكترونات يمكن أن يوجد في مدار ما هو إثنين أحدهما له

$$m_s = +1/2 \text{ والآخر له } m_s = -1/2$$

ويمكن الآن الإستناد إلى هاتين القاعدتين في تعيين توزيع الإلكترونات في ذرات العناصر. فذرة الهيدروجين تحتوي على إلكترون واحد يشغل أقل المدارات في الطاقة وهو المدار  $1s$ ، ويشار إلى التشكيل الإلكتروني electronic configuration بالرمز المختصر  $1s^1$ . وكل ذرة في عنصر الهليوم تحتوي على إثنين من الإلكترونات، وحيث أن الإلكترونين يشغلان المدار  $1s$  فنحن نرمز إلى ذلك بالرمز المختصر  $1s^2$ . ذرة الليثيوم تحتوي على ثلاثة إلكترونات وبناءً على شكل ٣-٣ يكون له التشكيل الإلكتروني  $1s^2 2s^1$ .



شكل ٣-٣ قاعدة البناء الصاعد لترتيب ملاء المدارات الذرية s, p, d, f

وعندما نتعامل مع المدارات غير الكروية مثل المدارات p و d و f فيجب أن نتذكر أنه يوجد أكثر من مدار ذري. فعلى سبيل المثال مجموعة المدارات p تتألف من ثلاثة مدارات ذرية،  $2p_x$ ،  $2p_y$ ،  $2p_z$ . ومن ثم فإن مجموعة المدارات  $2p$  يمكن أن تتسع لـ 6

إلكترونات. وبالمثل فإن مجموعة المدارات d يمكن أن تأوى 10 إلكترونات (في 5 مدارات كل منهما يأوى 2 إلكترون في كل مدار)، ومجموعة المدارات f يمكن أن تأوى 14 إلكترون.

ومسجل في جدول ٣-٢ التشكيل الإلكتروني للذرات التي توجد بوفرة في كل الإنزيمات والمواد الخاضعة التي توجد في الأنسجة البيولوجية. ولكل من هذه الذرات، فإن الإلكترونات المدارية s, p, الأعلى في الطاقة هي تلك التي يكون لها القدرة للمشاركة في التفاعلات الكيميائية. وهذه يشار إليها بالإلكترونات التكافؤ Valance electrons (والإلكترونات في المدارات الأدنى في الطاقة تكون خاملة كيميائياً ويشار إليها بالإلكترونات المغلق). ففي ذرة الكربون على سبيل المثال، فإن الإلكترون في المدار 1s هي من نوع الغلاف المغلق، بينما الإلكترونات الأربعة في المدارين 2p, 2s هي إلكترونات التكافؤ، ومن ثم فهي متاحة لتكوين الروابط.

جدول ٣-٢ التشكيل الإلكتروني للعناصر الأكثر إنتشاراً في الأنسجة البيولوجية

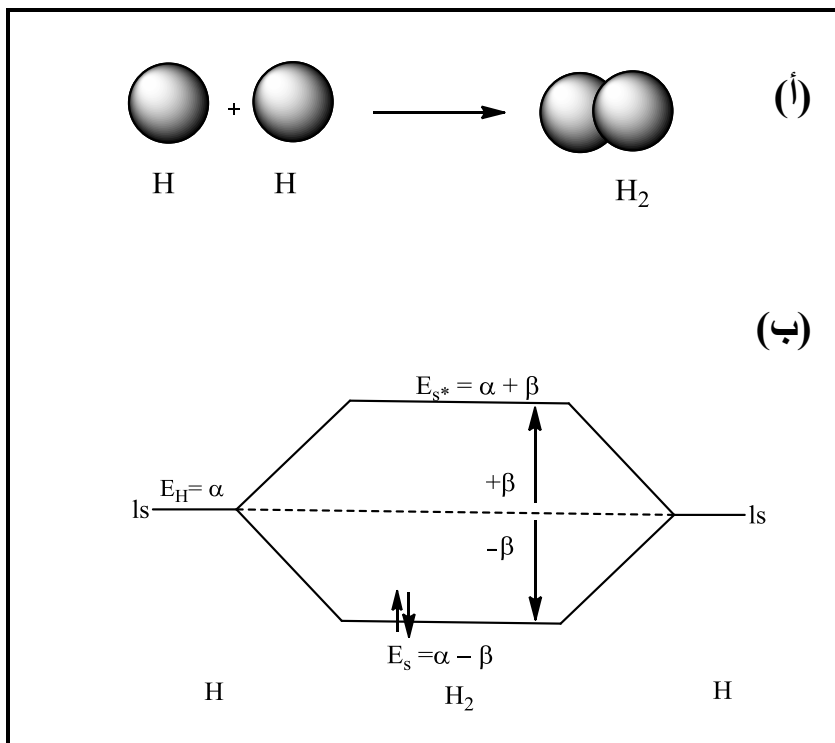
| العنصر     | عدد الإلكترونات | التشكيل الإلكتروني         |
|------------|-----------------|----------------------------|
| الهيدروجين | 1               | $1s^1$                     |
| الكربون    | 6               | $1s^2 2s^2 2p^2$           |
| النيتروجين | 7               | $1s^2 2s^2 2p^3$           |
| الأكسجين   | 8               | $1s^2 2s^2 2p^4$           |
| الفوسفور   | 15              | $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^3$ |
| الكبريت    | 16              | $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^4$ |

### ٣-١-٣ المدارات الجزيئية (الروابط التساهمية)

أقوى الروابط في الأنظمة البيولوجية هي الروابط التساهمية covalent bonds التي تربط الذرات في الجزيئات. وتتكون الرابطة التساهمية كالتالي: إذا اقتربت ذرتين من بعضهما البعض إلى مدى قريب بدرجة كافية، وإذا كانت مدارات التكافؤ الذرية لها طاقات متقاربة

ولهما نفس التماثل (ويحتوي كل منهما على إلكترون فردي) فإن مدارات التكافؤ في كل من الذرتين يمكن أن تتحد وتكون مدارات جزيئية: مدار ربط جزيئي ومدار مضاد الربط. ومدار الربط يكون له طاقة جهد أدنى عن المدارين الذريين الأصليين؛ ومن ثم فإن تسكين الإلكترونات في هذا المدار يعزز الارتباط بين الذرتين نتيجة التثبيت الصافي للنظام (الجزئي). بالمقارنة فإن مدار مضاد الربط له طاقة أعلى عن المدارات الذرية الأصلية، لذلك فإن تسكين الإلكترونين في هذا المدار الجزيئي سوف يؤدي إلى عدم استقرار الجزئي.

دعنا ننظر إلى تكوين جزئي الهيدروجين  $H_2$  من ذرتي هيدروجين. فالمدارين  $1s$  من كل ذرة هيدروجين - الذي يحتوي كل منهما على إلكترون فردي - عند إقترابهما يحدث بينهما تداخل (تراكب) overlap عند النقطة التي يكون عندها الإلكترونين محكومين بكلا نواتي الذرتين (أي الرابطة قد تكونت). عند هذه النقطة تفقد خصيصية المدارات الذرية الفردية ويقال أن الإلكترونين يسكنان المدار الجزيئي الذي ينتج من خلط المدارين الذريين. وينتج عن خلط المدارين الذريين مدارين جزيئيين. وكما هو موضح في شكل ٣-٤ فإن أحد هذين المدارين الجزيئيين يوجد عند طاقة جهد أدنى من المدارات الذرية الأصلية ومن ثم يثبت الرابطة التساهمية ويطلق عليه مدار الربط، وفي هذه الحالة يطلق عليه مدار الربط سيجما ( $\sigma$ ). والمدار الجزيئي الآخر يكون له طاقة جهد أعلى (حيث يزاح بنفس كمية طاقة مدار الربط). ونظراً للطاقة العالية لهذا المدار الذي يجعله يفقد الاستقرار بالنسبة للمدارات الذرية، فيشار إليه بمدار مضاد (مقاوم) للربط ويرمز له بـ  $\sigma^*$ . إن الإلكترونات تملأ المدارات الجزيئية بترتيب تصاعدي لطاقة الجهد وكل مدار له القدرة على إيواء إثنين من الإلكترونات. ومن ثم فإنه بالنسبة لـ  $H_2$  فإن كلا الإلكترون من المدارين  $1s$  من الذرتين سوف يشغلان المدار الجزيئي  $\sigma$  في الجزئي.



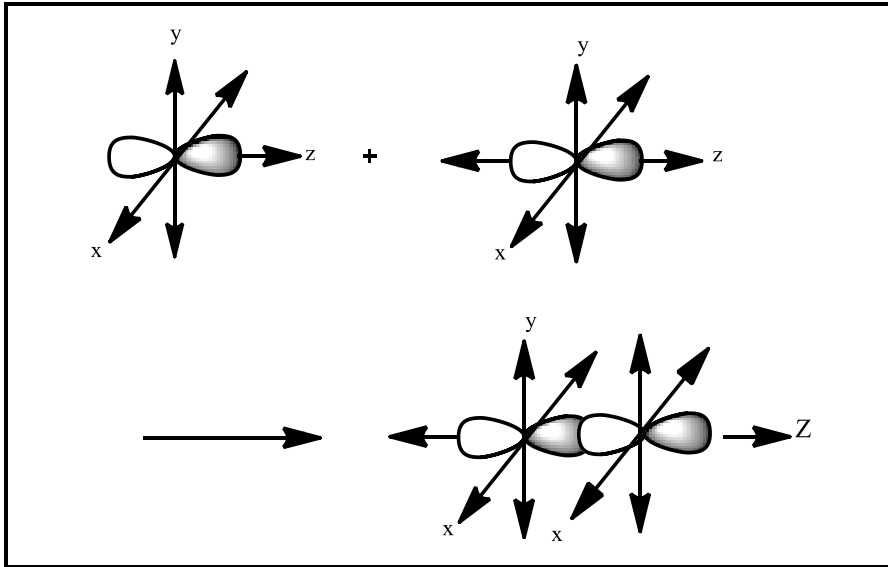
شكل ٣-٤ (أ) تعبير بياني للمدارين 1s في ذرتي الهيدروجين المنفصلتين يتحدان لتكوين مدار رباط جزيئي  $\sigma$  (ب) مخطط مستويات الطاقة لإتحاد مدارين s من ذرتي هيدروجين لتكوين مدار الرباط الجزيئي ( $\sigma$ ) ومدار مضاد الرباط جزيئي ( $\sigma^*$ ) في جزيء  $H_2$ .

### طاقة الرباط Bonding energy

إن تكوين الروابط التساهمية في الجزيئات من تداخل المدارات الذرية يؤدي إلى تحرير طاقة. ففي حالة جزيء الهيدروجين كمثال (شكل ٣-٤) نجد أن الطاقة المتحررة نتيجة لتكوين الرابطة التساهمية  $\sigma$  بين ذرتين هيدروجين تساوي  $-\beta$ ، وهي الفرق بين طاقة ذرة الهيدروجين ( $E_H$ ) و طاقة المدار  $\sigma$  في جزيء الهيدروجين ( $E_\sigma = \alpha - \beta$ ). لذلك كقاعدة عامة، فإن تكون الروابط ينتج عنه تحرير طاقة يعتمد مقدارها على نوع الرابطة، وتفكيك الروابط يحتاج إلى إضافة طاقة. وفي التفاعلات الكيميائية فإن الحد الأكبر للتغير في الطاقة يشتمل على الفرق في طاقة تكوين وتفكيك الروابط بين نواتج التفاعل والمتفاعلات.

شاهدنا في الجزء السابق تداخل المدارين  $1s$  في ذرات الهيدروجين لتكوين الرابطة  $\sigma$ . دعنا الآن ننظر إلى تداخل المدارات  $p$  لتكوين رابطة  $\sigma$  كما في جزئ الفلورين  $F_2$ . التشكيل الإلكتروني لذرة الفلورين هو  $(1s^2 2s^2 2p^5)$  إن المدار  $s$  واثنين من المدارات  $p$  في غلاف التكافؤ تكون مملوءة (يحتوي كل منهما على ٢ إلكترون) ولا تدخل في عملية الربط. والمدارين  $p$  غير المملوءة واحد من كل ذرة فلورين يمكن أن تتقارب من بعضهما البعض ويحدث بينهما تداخل وتكون مدار ربط واحد ومدار مضاد الربط واحد في جزئي  $F_2$  ثنائي الذرات.

وكما هو موضح في شكل ٣-٥ فإن الفصين lobes لمداري التكافؤ  $p$  تتداخل من الطرف إلى الطرف في مدار الربط. والمدارات الجزيئية التي تنتج من التداخل طرف-إلى-طرف يشار إليهما أيضاً بالمدار سيجما  $\sigma$ . ويرمز إلى مدار الربط بالرمز  $\sigma$  ومدار مضاد الربط  $\sigma^*$ . ومرة ثانية فإن الإلكترونين يشغلان المدار الجزئي  $\sigma$  الأدنى في الطاقة في جزئ  $F_2$  في الحالة الأرضية.



شكل ٣-٥ اتحاد مدارين  $p_z$  بالتداخل طرف - إلى - طرف لتكوين مدار جزيئي من النوع  $\sigma$



### ٣-١-٤ المدارات المهجنة

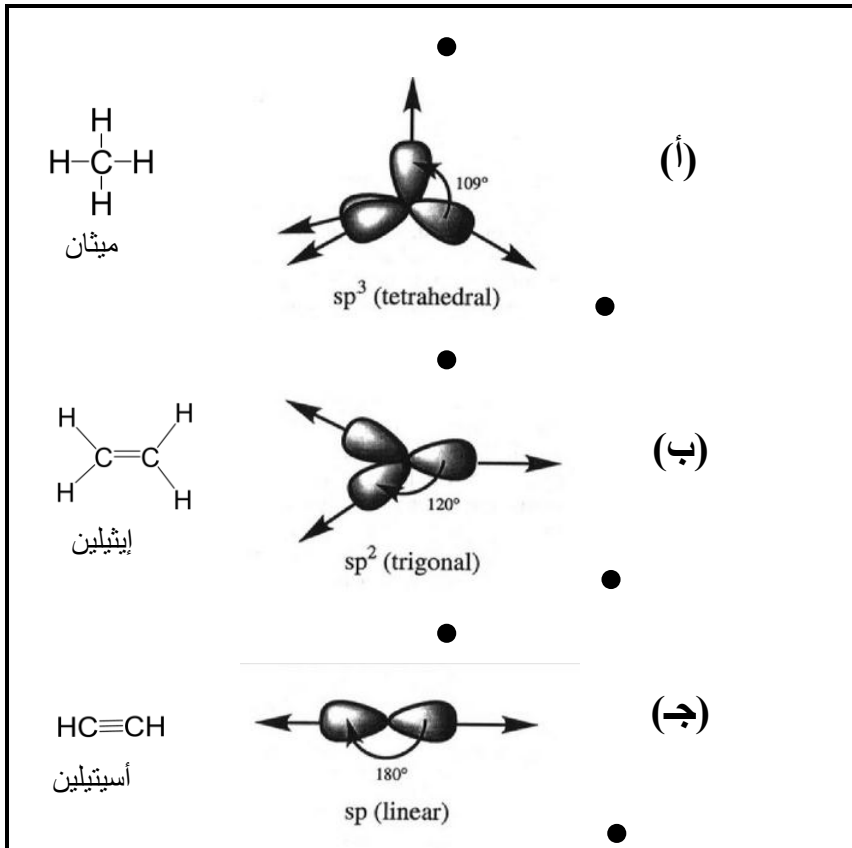
إن العناصر في الصف الثاني من الجدول الدوري (Ne, F, O, C, Be, Li) تكون فيها المدارات  $s, p$  قريبة في طاقاتها الذي يجعلها تتداخل مع بعضها لتكوّن مدارات لها خصائص مختلطة أو متحدة من المدارات  $s, p$ . وهذه المدارات المهجنة hybrid orbitals توفر وسيلة لزيادة الحد الأقصى لعدد الروابط التي يمكن أن تكونها ذرة ما، بينما تحافظ على أكبر مسافة بين الروابط لتخفيض إلى الحد الأدنى قوى التنافر. إن المدارات المهجنة التي تتكون بواسطة الكربون هي الأكثر دراسة وهي مركز إهتمامنا في مناقشة الإنزيمات.

من التشكيل الإلكتروني لذرة الكربون ( $1s^2 2s^2 2p^2$ )، فإننا نلاحظ أن الطاقات المتماثلة لمجموعة المدارات  $2s, 2p$  في الكربون توفر أربع إلكترونات التي يمكن أن تعمل إلكترونات تكافؤ الذي يعطي الكربون القدرة على تكوين أربع روابط مع الذرات الأخرى. ثلاثة أنواع من المدارات المهجنة تكون ممكنة الذي ينتج عنها ثلاثة أنماط من الارتباط

- النوع الأول ينتج من اتحاد مدار  $2s$  مع ثلاثة مدارات  $2p$ . وينتج عن ذلك أربع مدارات مهجنة يشار إليها بالمدارات  $sp^3$  (والرقم العلوي 3 يعكس عدد المدارات  $p$  التي اتحدت مع مدار  $s$  فردي لإنتاج المدارات المهجنة). والمدارات  $sp^3$  (التي يحتوي كل منها على إلكترون فردي) تسمح لذرة الكربون أن تكوّن أربع روابط  $\sigma$  التي تقع على رؤوس الهرم رباعي الأسطح tetrahedral كما في الميثان  $CH_4$ . فتداخل كل مدار  $sp^3$  لذرة الكربون مع المدار  $s$  لذرات الهيدروجين الأربع ينتج الميثان: الكربون يوجد عند مركز الهرم رباعي الأسطح وذرات الهيدروجين الأربع توجد عند الزوايا (شكل ٦-٢ أ).

- النوع الثاني من المدارات المهجنة ينتج من تداخل مدار  $2s$  مع اثنين من المدارات  $2p$ . وينتج عن ذلك ثلاثة مدارات مهجنة يشار إليها  $sp^2$ . وهذه المدارات المهجنة تسمح لذرة الكربون بتكوين ثلاثة روابط  $\sigma$  مستوية كما في الإيثيلين  $H_2C = CH_2$

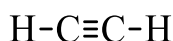
(شكل ٦-٣ ب). وهذا النوع من التهجين يترك على كل ذرة كربون مدار  $p$  نقي الذي يكون له القدرة على تكوين رابطة. هذه المدارات  $p$  على كل ذرة كربون يمكن أن تتداخل مع بعضها البعض لتكوّن رابطة بالتداخل المداري من الجنب إلى-الجنب edge-to-edge أعلى وأسفل السطح المستوى المعين بالروابط سيجمما  $sp^2$  المثلثية trigonal. وكما هو موضح في شكل ٦-٢ ب، فإن تداخل المدارات  $p$  يعطي كثافة إلكترونية أعلى وأسفل المحور بين الذرتين  $C$  الذي ينتج الرابطة باى  $\pi$ . ومثل الروابط  $\sigma$ ، فإنه لكل مدار  $\pi$  يوجد مدار مضاد الربط عند طاقة أعلى الذي يرمز له



شكل ٦-٣ التوزيع الفراغي (الحيزي) للإلكترونات في المدارات المهجنة (أ) التهجين  $sp^3$  (كما في الميثان) (ب) التهجين  $sp^2$  (كما في الإيثيلين) (ج) التهجين  $sp$  (كما في الأسيتيلين).

بالرمز  $\pi^*$ . ومن ثم فإنه عبر المحور بين ذرتي الكربون للإيثيلين توجد رابطتين أحدهما  $\sigma$  والأخرى  $\pi$ . وهذا الاتحاد يقال أنه رابطة مزدوجة بين ذرات الكربون. والتعبير المختصر للإرتباط في هذه الحالة هو رسم خطين متوازيين بين ذرتي الكربون.

- النوع الثالث من المدارات المهجنة ينشأ عندما يتحد مدار  $2p$  مع مدار  $2s$ . وهذه المدارات المهجنة تسمح لذرة الكربون بتكوين إثنين من الروابط  $\sigma$  الخطية linear. في هذه الحالة يبقى على كل ذرة كربون مداريين  $p$  نقية متعامدين تبادلياً التي تكون متاحة لتكوين رابطتين باى ( $\pi$ ). ففي الإيثيلين توجد رابطة  $\sigma$  بين ذرتي الكربون (من المدارات المهجنة  $sp$ ) ورابطتين  $\pi$  على طول المحور بين الذرتين. وهذه الرابطة الثلاثية يتم التعبير عنها برسم ثلاثة خطوط متوازية تربط بين ذرتي الكربون.

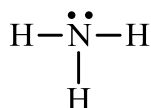


### ٣-١-٥ الإلكترونات غير المشاركة

ليست كل إلكترونات غلاف التكافؤ للذرات في الجزيء تشارك في تكوين الروابط التساهمية. ففي كثير من الحالات تكون بعض المدارات الذرية محتوية على 2 إلكترون الذي يجعل تداخلها يرفع طاقة الجزيء. وهذه الإلكترونات غالباً ما يشار

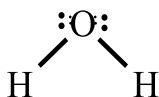
إليها بالإلكترونات غير المشاركة أو الإلكترونات غير المرتبطة أو زوج الإلكترونات المنعزل lone pair electrons. وبينما الإلكترونات خلال مدارات الربط يعبر عنها بخطوط ترسم بين الذرات في الجزيء، فإن أزواج الإلكترونات المنعزلة عادة ما توصف كزوج من النقط التي تحيط الذرة المعنونة. والتعبير عن الذرات والجزيئات بهذه الطريقة يشار إليها بتركيبات لويس. وأثنين من المركبات المعروفة، الأمونيا ( $NH_3$ ) والماء  $H_2O$  يوضحان هذه النقطة.

- في الأمونيا، فإن النيتروجين يماثل الكربون في الميثان. فالتشكيل الإلكتروني للنيتروجين هو  $1s^2 2s^2 2p^3$  حيث يحدث تهجين من النوع  $sp^3$ . ثلاثة من هذه المدارات الأربعة يمكن أن تتداخل مع المدار s في الهيدروجين مكونة ثلاث روابط  $\sigma$ . أما المدار  $sp^3$  الرابع للنيتروجين يحتوي على زوج من الإلكترونات المنعزلة.



والمدار  $sp^3$  الذي يحمل زوج من الإلكترونات المنعزلة يمثل منطقة كثيفة الإلكترونات. وهذه المنطقة تمثل مصدر للإلكترونات للذرات والجزيئات الباحثة عن الإلكترونات، ومن ثم فإن الأمونيا لها خواص قاعدية

- في الماء فإن الأكسجين يماثل النيتروجين في الأمونيا إلا أنه يحتوي على مدارين  $sp^3$  يحمل كل منهما زوج من الإلكترونات المنعزلة، وبذلك فإن مدارين فقط من المدارات  $sp^3$  يمكن أن تتداخل مع مدارين s في ذرتين هيدروجين



وبسبب وجود زوجين من الإلكترونات المنعزلة على أكسجين الماء فإن الماء يعتبر قاعدي لكنه أقل قوة من الأمونيا.

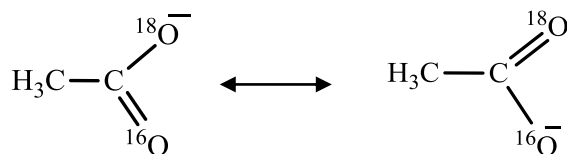
### ٣-١-٦ الرنين والعطرية

لبعض الجزيئات فإنه يمكن كتابة أكثر من نمط للإرتباط التساهمي في الجزيء. على سبيل المثال دعنا ننظر إلى أيون الأسيتات عند الـ pH المتعادلة (القريبة من الظروف الفسيولوجية). إن ذرة الكربون المرتبطة بذرتي الأكسجين تستخدم التهجين  $sp^2$ ؛ وهى تكوّن رابطة  $\sigma$  مع ذرة الكربون الأخرى ورابطة  $\sigma$  مع كل ذرة أكسجين، ورابطة  $\pi$  مع

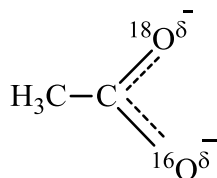
إحدى ذرتي الأكسجين. ومن ثم فإن إحدى ذرتي الأكسجين ترتبط برابطة مزدوجة مع ذرة الكربون، بينما الأخرى ترتبط برابطة فردية مع الكربون وتحمل شحنة سالبة. أفترض أننا بطريقة ما استطعنا تمييز ذرتين الأكسجين الفردية في الجزئ باستخدام نظير الأكسجين ( $O^{18}$  بدلاً من  $O^{16}$ ) عند أحد المواقع. فأى مع الذرتين تكون رابطة مزدوجة من الكربون؟



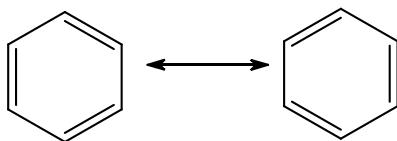
كلا التركيبين يمثلان صورة إلكترونية مقبولة، ولا توجد قاعدة يمكن على أساسها أن نفضل أحدهما على الأخرى. وفي الحقيقة لا هذا ولا ذاك يكون صحيحاً، لأننا في الواقع نجد أن الرابطة  $\pi$  (أو أكثر دقة كثافة الإلكترونات  $\pi$ ) تكون غير متمركزة delocalized أى منتشرة على كلا ذرتي الأكسجين. فإلى حد ما لا أى من الصورتين تكون رابطة فردية ولا رابطة مزدوجة مع ذرة الكربون، ولكن على الأصح كل منهما يسلك كما لو أنهما يشاركان (يتقاسمان) الرابطة  $\pi$  بينهما. ونحن نشير إلى هاتين الصورتين البديلين للجزئ بالتركيبات الرنينية resonance structure، وأحياناً يعبر عن هذا التنظيم برسم سهم ثنائي الرأس بين الصورتين:



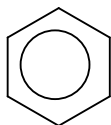
وبالدليل عن ذلك أن توصف الصور الرنينية كالتالي لتوكيد عدم تمركز كثافة الإلكترونات  $\pi$ .



دعنا الآن ننظر إلى التركيبات الرنينية لجزئ البنزين ( $C_6H_6$ ). فكل ذرة كربون في هذا الجزئ تحتوي على ثلاثة مدارات مهجنة  $sp^2$  ومدار  $p$  نقي وذرات الكربون في هذا الجزئ تنظم بنمط حلقي مكونة شكل سداسي الزوايا مسطح. ولتفسير ذلك فإننا يجب أن نفترض ثلاثة روابط مزدوجة بين الكربون - الكربون في الجزئ. وهنا سوف يكون لدينا تركيبين رنينين:



والآن فإن طول رابطة الكربون - الكربون الفردية النموذجية تساوي تقريباً  $1.54 \text{ \AA}$  بينما رابطة الكربون - الكربون المزدوجة طولها حوالي  $1.35 \text{ \AA}$ . وعند قياس التركيب البلوري للبنزين وجد أن رابطة الكربون - الكربون جميعها لها نفس الطول  $1.45 \text{ \AA}$  الذي يكون متوسط طول الرابطة الفردية والرابطة المزدوجة. وتفسير ذلك أن المدارات  $\pi$  ليست متمركزة على المدارات  $p$  المتجاورة، ولكن بدلاً من ذلك فإنها تنتشر على المدارات  $p$  لذرات الكربون الستة. ولتوكيد عدم تمركز الإلكترونات  $\pi$  في البنزين، فإن كثير من الكيميائيين يعبر عن تركيب البنزين كشكل سداسي الزوايا وبداخله دائرة.

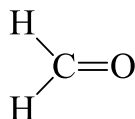


إن عدم تركز النظام  $\pi$  في الجزيئات مثل البنزين يؤدي إلى ثباتيه الجزيئي مقارنة لذلك المتوقع على أساس ثلاثة روابط مختلفة متمركز. وهذا الاختلاف في الثباتية يشار إليه بطاقة الرنين .resonance energy

### ٣-١-٧ الإنتقالات الإلكترونية والتشكيلات الإلكترونية في الجزيئات

لقد رأينا أن الإلكترونات تتوزع على المدارات الجزيئية اعتماداً على طاقة الجهد لهذه المدارات الجزيئية. إن التوزيع الخاص للإلكترونات خلال الجزيء فيما بين المدارات الجزيئية المختلفة يعين التشكيل الإلكتروني electronic configuration أو الحالة الإلكترونية electronic state لهذا الجزيء. إن الحالة الإلكترونية التي تعبر عن أدنى طاقة جهد لهذا الجزيء سوف تكون الصورة الأكثر ثباتاً للجزيء تحت الظروف الطبيعية، وهذا التشكيل الإلكتروني يشار إليه بالحالة الأرضية (الطبيعية) ground state للجزيء. وأى تشكيل إلكتروني بديل له طاقة جهد أعلى عن الحالة الأرضية يشار إليه بالحالة المثارة excited state للجزيء.

دعنا نأخذ كربونيل الفورمالدهيد ( $\text{CH}_2\text{O}$ ) كمثال:

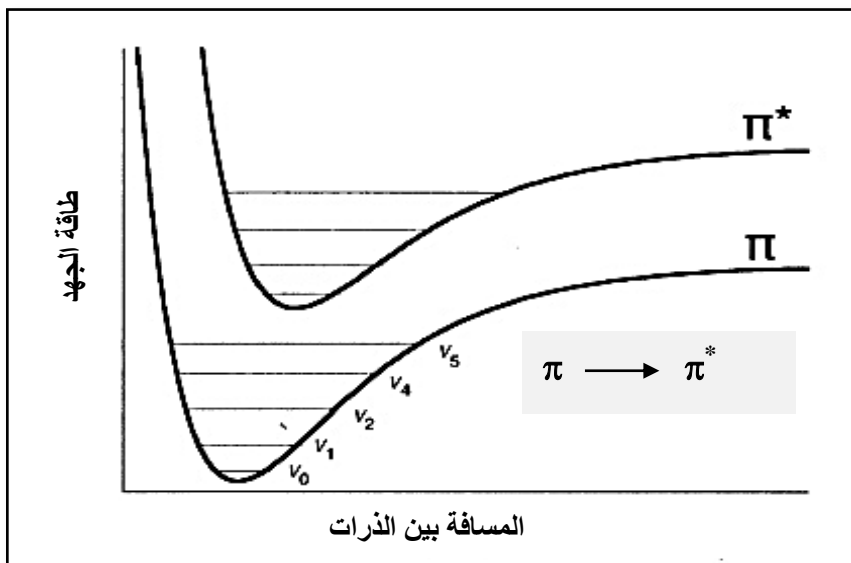


في التشكيل الإلكتروني للحالة الأرضية للجزيء، فإن مدار الربط  $\pi$  هو المدار الأعلى في الطاقة الذي يحتوي على إلكترونات. وهذا المدار يشار إليه المدار الجزيئي الأعلى المشغول (HOMO) highest occupied molecular orbital. إن المدار الجزيئي  $\pi^*$  هو المدار التالي الأعلى في الطاقة، وفي الحالة الأرضية فإنه لا يحتوي على إلكترونات. وهذا المدار يقال عليه المدار الجزيئي الأدنى غير المشغول lowest unoccupied molecular orbital (LUMO). أفترض أنه بطريقة ما استطعنا أن نحرك إلكترون من المدار  $\pi$  إلى المدار  $\pi^*$ ، والذي يشار إليه بالانتقال  $\pi \rightarrow \pi^*$

(باستخدام طاقة الأشعة الكهرومغناطيسية عند طول موجي معين). والجزئ في هذه الحالة يكون له توزيع إلكتروني مختلف الذي يمنح الجزئ طاقة جهد إضافية، بمعنى أن الجزئ يكون في الحالة الإلكترونية المثارة exited electronic state. والآن حيث أنه في هذه الحالة المثارة قد نقلنا أحد الإلكترونات من مدار الربط ( $\pi$ ) إلى مدار مضاد الربط ( $\pi^*$ ) فإن الجزئ ككل قد إكتسب خصائص مضاد ربط أكثر. ونتيجة لذلك فإن الأنوية سوف توجد عند مسافات إتران أكبر بين الذرات بالنسبة للحالة الأرضية للجزئ. وبكلمات أخرى فإن طاقة الجهد الأدنى (أيضاً يشار إليها بطاقة نقطة الصفر zero-point energy) للحالة المثارة تحدث عندما تكون الذرات بعيدة عن بعضها البعض إلى مدى أبعد عما تكون عليه لطاقة الجهد الأدنى للحالة الأرضية. ونظراً لأن الإلكترونات  $\pi$  تتمركز بين ذرتي الكربون والأكسجين في هذا الجزئ، فإن طول رابطة الكربون-الأكسجين سوف تكون الأكثر تأثراً بالتغير في التشكيل الإلكتروني. بينما أطوال الرابطتين بين الكربون. الهيدروجين تكون ثابتة (لا تتغير) بين الحالة الأرضية والحالة المثارة. من ناحية أخرى فإن أنوية الذرات لا تكون ثابتة في الفضاء، ولكنها يمكن أن تهتز (تتذبذب) vibrate في كل من التشكيل الإلكتروني للحالة الأرضية والحالة المثارة للجزئ. ومن ثم فإن كل حالة إلكترونية للجزئ يشيد عليها حالات فرعية substate إهتزازية متعددة للجزئ.

والفكرة السابقة ملخصة في شكل ٣-٧ الذي يظهر مخطط طاقة الجهد لكل من الحالة الأرضية والحالة المثارة للجزئ. والنقطة المهمة التي يمكن إكتشافها من هذا الشكل هو أنه بالرغم من أن طاقة الجهد الأدنى للحالة الأرضية والحالة المثارة تكون عند مسافات إتران مختلفة بين الذرات، فإن الإنبساط الاهتزازي خلال أى من الحالتين الإلكترونيين يمكن أن تجلب الأنوية إلى مواضع الاتزان عند طاقة الجهد الأدنى للحالة الإلكترونية الأخرى. وبكلمات أخرى، فإن الجزئ في الحالة الإلكترونية الأرضية يمكن خلال الحركة الإهتزازية أن يعبر المسافات بين الذرات المرتبطة بطاقة الجهد الأدنى للحالة الإلكترونية المثارة، والعكس صحيح.





شكل ٣-٧ مخطط طاقة الجهد للحالة الإلكترونية الأرضية والحالة الإلكترونية المثارة للجزئ. إن منحنيات طاقة الجهد المعلمة بـ  $\pi$ ،  $\pi^*$  تشير إلى المظهر الجانبي لطاقة الجهد للحالة الإلكترونية الأرضية والحالة الإلكترونية المثارة. وتحت المستويات لكل من هذه المنحنيات  $v_0$ ،  $v_1$ ،  $v_2$ ، ....، تعبر عن تحت مستويات الإهتزاز للحالة الإلكترونية.

### ٣-٢ الحركة الحرارية للتفاعلات الكيميائية

التفاعل الكيميائي هو العملية التي يتحول فيها واحد أو أكثر من الأصناف الكيميائية (جزئ، ذرة، أيون أو شق حر) إلى أصناف أخرى. ويشتمل التفاعل الكيميائي عادة على تفكيك روابط وتكوين روابط جديدة أو نقل إلكترونات، الذي يصاحبه تغيير في طاقة نظام التفاعل.

والفهم الكامل للتفاعلات الكيميائية (ومن ثم التفاعلات الإنزيمية) يتطلب الأخذ في الاعتبار إثنين من خواص الحركة الحرارية (١) التغير في الطاقة الحرة،  $\Delta G$  للتفاعلات وهى الفرق في الطاقة الحرة بين النواتج والمتفاعلات. (٢) طاقة التنشيط  $\Delta G^\ddagger$  (أو  $E_a$ ) وهى الطاقة المطلوبة لبدء تحول المتفاعلات للنواتج. الخاصية الأولى،  $\Delta G$  تحدد ما إذا كان التفاعل سيحدث تلقائياً (أى لا يحتاج إلى إضافة طاقة) أم غير تلقائي (أى يحتاج

إلى الإمداد بطاقة لحدوثه) حيث تحدد موضع الإتزان. أما الخاصية الثانية  $\Delta G^\ddagger$  فتحدد معدل التفاعل. والإنزيمات تعمل فقط على خفض  $\Delta G^\ddagger$  وبذلك تزيد معدلات التفاعل ولكنها لا تؤثر على  $\Delta G$  وبذلك لا تغير مواضع اتزان التفاعلات الكيميائية.

### ٢-٣-١ التغير في الطاقة الحرة $\Delta G$ للتفاعلات وتلقائية التفاعل

نحن نعرف من المقررات الابتدائية فكرة الطاقة الحرة  $\Delta G$  التي هي اتحاد للقانون الأول والقانون الثاني للحركة الحرارية ليعطي الصورة المعروفة التالية للتفاعلات الكيميائية:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (١-٣)$$

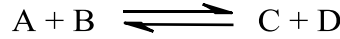
$$\Delta G_{\text{التفاعل}} = G_{\text{النواتج}} - G_{\text{المتفاعلات}}$$

حيث  $\Delta G$  هي التغير في الطاقة الحرة للنظام أثناء التفاعل عند درجة حرارة ثابتة (T) وضغط ثابت (p). و  $\Delta H$  هي التغير في الإنثالبي enthalpy (المحتوى الحراري) و  $\Delta S$  هو التغير في الانتروبي entropy (وهو مقياس للعشوائية) المصاحبة للتفاعل. والطاقة الحرة هي ذلك الجزء من الطاقة الذي يمكن تحويله إلى شغل مفيد. ويجب أن نتذكر بعض خصائص  $\Delta G$  وهي:

- $\Delta G$  تكون أقل من الصفر (سالبة) للتفاعل التلقائي. بمعنى أن التفاعل الذي له  $\Delta G$  سالبة يسير تلقائياً مع تحرير طاقة.
- $\Delta G$  تكون أكبر من الصفر (موجبة) للتفاعل غير التلقائي بمعنى أن التفاعل سوف يحدث فقط إذا أمد بطاقة لدفع التفاعل.
- $\Delta G$  تكون دائماً مساوية صفر عند الإتزان.
- $\Delta G$  لا تعتمد على مسار التفاعل، فقيمة  $\Delta G$  تعتمد فقط على الحالة البادئة والحالة النهائية ولا تعتمد على مسار (آلية) التفاعل.

- وأخيراً فإنه بينما تعطي قيمة  $\Delta G$  معلومات عن تلقائية التفاعل فإنها لا تخبرنا بأى شئ عن المعدل الذي يسير به التفاعل.

دعنا نرى علاقة  $\Delta G$  بتركيز المتفاعلات ونواتج التفاعل. للتفاعل التالي



وعند درجة حرارة وضغط ثابتين، فإنه يمكن اشتقاق المعادلة التالية:

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln \frac{[C][D]}{[A][B]} \quad (٢-٣)$$

حيث:

- $\Delta G^\circ$  هي الطاقة الحرة للتفاعل تحت الظروف القياسية لكل المتفاعلات والنواتج عند تركيز ١ مولر (1.0 M).
- R ثابت الغاز (1.98 x 10<sup>-3</sup> kcal/mol.degree)
- T درجة الحرارة بوحدة الكلفن K (298 K لمتوسط درجة حرارة الغرفة 25°C و 310 K لدرجة الحرارة الفسيولوجية 37°C)
- $\ln$  هو اللوغاريتم الطبيعي للأساس e ( $\log_e$ )
- [ ] يشير إلى التركيز المولاري للمتفاعلات والنواتج للتفاعل.

**ملاحظة:** في التفاعلات الكيموحيوية التي يمثل فيها أيون الهيدروجين أحد عناصر التفاعل، فإن الحالة القياسية لأيون الهيدروجين تكون  $10^{-7} \text{M}$  (pH 7) والطاقة الحرة القياسية يرمز بها بـ  $\Delta G^0$

وحيث أن  $(\Delta G^0 = 0)$  عند الاتزان، فيتبع ذلك أنه عند الاتزان:

$$\Delta G^0 = -RT \ln \left( \frac{[C][D]}{[A][B]} \right) \quad (٣-٣)$$

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_{eq} \quad (٣-٣ \text{ ب})$$

حيث  $K_{eq}$  ثابت الاتزان ويساوي

$$K_{eq} = \left( \frac{[C][D]}{[A][B]} \right)_{eq} \quad (٣-٣ \text{ ج})$$

وبذلك، فإن  $\Delta G^0$  وثابت الاتزان  $K_{eq}$  يرتبطان بعلاقة بسيطة. ولعديد من التفاعلات، ومنها عديد من التفاعلات الإنزيمية، قد تم تقدير قيم  $\Delta G^0$  لها ووضعها في جداول. ومن ثم فإنه بمعرفة قيمة  $\Delta G^0$  فإن يمكن بسهولة تقدير  $\Delta G$  للتفاعل عند أى تركيزات خلاف التركيزات القياسية. وأمثلة من هذه الحسابات توجد في كتب الكيمياء والكيمياء الحيوية الأساسية.

حيث أن الطاقة الحرة للتفاعلات لا تعتمد على المسار، فإنه يمكن دفع التفاعل غير الموازي من ناحية الطاقة (غير التلقائي) بإزدواجه مع تفاعل موات (تلقائي) آخر. افترض على سبيل المثال أن التفاعل  $A \rightleftharpoons B + C$  له  $\Delta G^0$  تساوي  $+4 \text{ kcal / mol}$

والتفاعل  $B \rightleftharpoons D$  له  $\Delta G^\circ$  تساوي  $-7 \text{ kcal / mol}$ . ما هي قيمة  $\Delta G^\circ$  للتفاعل

الصافي  $A \rightleftharpoons B + C$



ومن ثم فإن التفاعل ككل يسير تلقائياً. في هذا المخطط فإن B تظهر على كلا الجانبين في التفاعل الإجمالي، وبذلك يمكن إهمالها. ومثل هذا المركب يشار إليه بالمركب الوسيط العام common intermediate. وهذه الآلية توفر قوة دفع للتفاعلات غير المواتية وهي شائعة في الحفز البيولوجي. فتفاعلات الأكسدة والاختزال للمعادن وFAD وFMN وNAD كثيراً ما تستخدم لهذا الغرض في الإنزيمات. ومن تفاعلات الإزدواج الشائعة هو تحلل ATP إلى ADP والفوسفات غير العضوية الذي يستخدم بواسطة عديد من الإنزيمات لدفع التفاعلات غير المواتية.

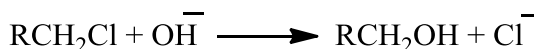
#### التفاعل التلقائي Spontaneous reactions

هو التفاعل الذي يتم تلقائياً (ذاتياً) دون الإحتياج إلى إضافة طاقة ويكون له  $\Delta G$  سالبة، بمعنى أن الطاقة الحرة للناتج أصغر من الطاقة الحرة للمتفاعلات. و  $\Delta G$  ليس لها ارتباط بالمعدل الذي يسير به التفاعل ولكن معدل التفاعل التلقائي يتحدد بالطاقة الحرة للتنشيط  $\Delta G^\ddagger$ . والتفاعل غير التلقائي لا يتم ذاتياً وله  $\Delta G$  موجبة، لذلك يجب إضافة طاقة له ليتم وذلك بازدواجه مع تفاعل له  $\Delta G$  سالبة وكبيرة.

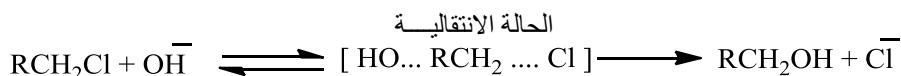
#### ٢-٢-٣ الحالة الإنتقالية وطاقة التنشيط ( $\Delta G^\ddagger$ ) في التفاعلات الكيميائية

يتقدم التفاعل الكيميائي تلقائياً عندما تكون الطاقة الحرة للناتج أصغر من الطاقة الحرة للمتفاعلات (أي أن  $\Delta G < 0$ ). وكما ذكرنا سابقاً. فإن نوع المسار من المتفاعلات إلى الناتج لا يؤثر على الطاقة الحرة للحالة الابتدائية (المتفاعلات) والحالة النهائية (الناتج) ومن ثم لا يؤثر على تلقائية التفاعل. مع ذلك، فإن المسار يمكن أن يؤثر كثيراً على

المعدّل (السرعة) الذي يسير به التفاعل إعتماًداً على الطاقات الحرة للحالات الوسيطة التي يمكن أن تتخذها الجزيئات أثناء سير التفاعل. معظم التفاعلات الكيميائية والتفاعلات المحفزة إنزيمياً تتضمن تفكيك وتكوين الروابط التساهمية، ومن ثم فإنه عند لحظة ما أثناء سير التفاعل توجد كينونات كيميائية التي فيها الروابط القديمة والجديدة تكون روابط جزئية. وهذه الصور الجزيئية تكون غير ثابتة بدرجة كبيرة ومن ثم يكون لها طاقات حرة عالية. ولكي تتحول المتفاعلات إلى النواتج في التفاعل، فإن الجزيئات يجب أن تصل إلى هذه الصورة العابرة والتي تعرف بالحالة الانتقالية transition state للتفاعل. دعنا على سبيل المثال نأخذ تكوين الكحول بتفاعل ألكيل كلوريد مع أيون الهيدروكسيل:



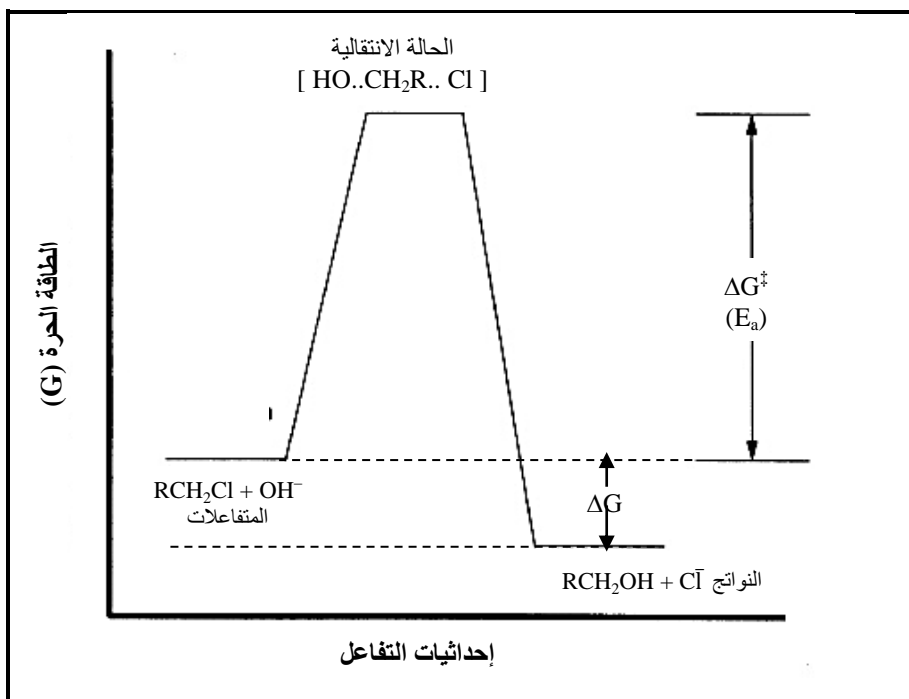
ويمكن لنا تصوير سير التفاعل خلال الحالة الانتقالية التي فيها يرتبط الكربون جزئياً وتزامنياً مع الأكسجين والكلوريد



حيث الأنواع الكيميائية بين القوسين هي الحالة الانتقالية للتفاعل والروابط الجزئية موضحة بالنقط. وشكل ٣-٨ يوضح مخطط التفاعل بدلالة الطاقات الحرة  $G$  للأنواع المشتملة في التفاعل.

في مخطط الطاقة الحرة في شكل ٣-٨ فإن المحور  $x$  يشير إلى إحداثيات التفاعل الذي يتعقب الخطوات المتتالية من المتفاعلات إلى النواتج. والشكل يوضح أن الحالة الانتقالية تمثل حاجز طاقة الذي يجب أن يعبر حتى يتقدم التفاعل. وكلما زادت طاقة الحالة الانتقالية بالنسبة لطاقة المتفاعلات كلما زادت صعوبة تقدم التفاعل. ولكن بمجرد أن يتحصل النظام على طاقة كافية للوصول إلى الحالة الانتقالية، فإن التفاعل يسير ذاتياً

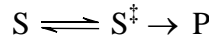
إلى النواتج، أو ينهار ويعود إلى حالة المتفاعلات. والبعض منا له تجربة مشابهة على المستوى العياني (المرئي) لهذه الحالة في ركوب الدراجة. فعندما نقابل هضبة (تل)، فإننا يجب أن ندوس على البدال بشدة ونبذل طاقة لنعود المنحدر. وبمجرد الوصول إلى قمة الهضبة فإننا يمكن أن نرفع أقدامنا من على البدال ونهبط إلى أسفل الهضبة دون بذل مجهود إضافي.



شكل ٨-٣ مخطط الطاقة الحرة لتفاعل كيميائي نموذجي. إن طاقة التنشيط  $\Delta G^\ddagger$  (أو  $E_a$ ) هي الفرق في الطاقة بين الحالى الانتقالية والمتفاعلات. أما  $\Delta G$  للتفاعل فهي الفرق في الطاقة بين نواتج التفاعل والمتفاعلات.

إن الطاقة المطلوبة للتقدم من حالة المتفاعلات إلى الحالة الانتقالية التي يطلق عليها طاقة التنشيط activation energy (أو حاجز الطاقة energy barrier للتفاعل) هي الفرق في الطاقة بين هاتين الحالتين. إن طاقة التنشيط تعطي الرمز  $E_a$  أو  $\Delta G^\ddagger$ .

وحاجز الطاقة هو فكرة مهمة في المناقشات التالية الخاصة بالحفز الإنزيمي، وذلك لأن مقدار حاجز طاقة التنشيط يمكن ربطها مباشرة بمعدلات التفاعل الكيميائي. ولتوضيح ذلك دعنا نأخذ تفاعل أحادي الجزيئية الذي يتحول فيه المتفاعل S إلى الناتج p خلال الحالة الانتقالية  $S^\ddagger$ .



إن طاقة التنشيط لهذا التفاعل هي  $\Delta G^\ddagger$ ، كما أنه يفترض أن  $S^\ddagger$  و S في حالة إتزان  $K^\ddagger = [S^\ddagger] / [S]$  (حيث  $K^\ddagger$  هو ثابت الاتزان)، وبذلك فإن معادلة ٣-٣ أ. تصبح:

$$\Delta G^\ddagger = -RT \ln \frac{[S^\ddagger]}{[S]} \quad (٤-٣)$$

وبإعادة ترتيب معادلة ٤-٣ نحصل على:

$$[S^\ddagger] = [S]e^{-\Delta G^\ddagger/RT} \quad (٥-٣)$$

إن تركيب الحالة الانتقالية يمسك بواسطة القوى الضعيفة، وبذلك فإنه ينفصل عن بعضه بواسطة الاهتزاز. وبذلك فإن الحالة الانتقالية سوف تنحل إلى الناتج بنفس التردد الذي يحدث به اهتزاز تمدد الرابطة.. ويمكن إثبات أن تردد الإهتزاز يعطي بالعلاقة التالية:

$$v = \frac{K_B T}{h} \quad (٦-٣)$$

حيث  $v$  هي تردد الإهتزاز،  $K_B$  هي ثابت بولتزمان و  $h$  هي ثابت بلانك. ومن ثم فإن معدل تحول فقد S يكون:



$$-\frac{d[S]}{dt} = k[S] = v[S^\ddagger] = [S] \left( \frac{K_B T}{h} \right) e^{-\Delta G^\ddagger / RT} \quad (٧-٣)$$

وبذلك فإن ثابت المعدل للرتبة الأولى يعطي بمعالة أرهنيوس :

$$k = \left( \frac{K_B T}{h} \right) e^{-\Delta G^\ddagger / RT} \quad (٨-٣ أ)$$

أو

$$k = \left( \frac{K_B T}{h} \right) e^{-E_a / RT} \quad (٨-٣ ب)$$

ومن المعادلتين ٧-٣ و ٨-٣ نلاحظ التالي:

- أنه بزيادة حاجز طاقة التنشيط (أى عندما تصبح  $\Delta G^\ddagger$  أكبر) فإن معدل التفاعل سوف ينخفض بنمط أسّي. وكما سنرى في فصل ٦ أن الإنزيمات تزيد من معدلات التفاعل بخفض حاجز طاقة التنشيط.

- بارتفاع درجة حرارة نظام التفاعل، أى بوجود زيادة في الطاقة الحرارية المتاحة لدفع المادة الخاضعة فوق حاجز التنشيط فإن معدل التفاعل يزيد. وتستخدم الطاقة الحرارية في زيادة معدلات التفاعلات الكيميائية في المعمل. أما في حالة التفاعلات الإنزيمية، فإن معدل التفاعل الإنزيمي يزيد بارتفاع درجة الحرارة إلى درجة معينة ثم ينخفض المعدل لحدوث تغير في طبيعة البروتين الإنزيمي.

ومن المهم أن ندرك أن الحالة الانتقالية للتفاعل الكيميائي تحت معظم الظروف تكون أنواع غير ثابتة بشدة ولها فترة بقاء قصيرة جداً. من ناحية أخرى فإن بعض التفاعلات

تحدث خلال حالات وسيطة. وفي بعض الحالات فإن الأنواع الوسيطة يكون لها فترة بقاء طويلة بحيث يمكن فصلها ودراستها.

### توزيع بولتزمان The Boltzmann distribution

أحد التعبيرات المهمة في مجال العلوم هو قانون بولتزمان للتوزيع الذي يساعد في تفسير عديد من الظواهر مثل مفهوم الحرارة بالإضافة إلى الخواص العملية للمادة العيانية وتفاعلات المادة واختلافها مع درجة الحرارة.

إن الحركة العشوائية الظاهرية للجزيئات التي تشاهد عند  $T > 0$  يقال عليها الحركة الحرارية thermal motion، والطاقة المرتبطة بهذه الحركة يطلق عليها الطاقة الحرارية thermal energy. والطاقة التي يملكها الجزيء نتيجة للحركة الحرارية تكون  $K_B T$  (حيث  $K_B$  ثابت أساسي يطلق عليه ثابت بولتزمان ويساوي  $1.581 \times 10^{-13}$ ).

وثابت الغاز هو الصورة المولارية لثابت بولتزمان

$$R = N_A K_B \quad (N_A = \text{رقم فاجادرو})$$

والحركة الحرارية تعني أن الجزيئات سوف تنتشر على مستويات الطاقة المتاحة بحيث يكون متوسط الطاقة  $K_B T$ . وعدد الجزيئات في كل مستوى يعتمد على درجة الحرارة والنتيجة المهمة أنه لنظام عند  $T$ ، فإن نسبة عدد الجزيئات  $N_2$  و  $N_1$  في مستويين طاقة  $E_2$  و  $E_1$  على التوالي يعطي بتوزيع بولتزمان:

$$\frac{N_2}{N_1} = e^{-(E_2 - E_1)/K_B T}$$

وعندما يكون  $E_1$  و  $E_2$  كميات مولارية (بالجول أو الكيلو جول لكل مول، كمثال)، فإننا نستبدل  $K_B$  بـ  $R$ ، وتأخذ المعادلة السابقة الصورة التالية:

$$\frac{N_2}{N_1} = e^{-(E_2 - E_1)/RT}$$

ونحن نرى أنه عندما تكون فجوة الطاقة ( $E_2 - E_1$ ) صغيرة كلما زادت النسبة  $N_2 / N_1$  بمعنى أن عدد الجزيئات في المستوى  $N_2$  يصبح كبيراً. من ناحية أخرى، فإنه لفجوة ما من الطاقة ( $E_2 - E_1$ ) مثبتته). فإنه برفع درجة الحرارة يصبح عدد الجزيئات كبيرة في المستوى الأعلى  $N_2$ . إن الحد  $e^{-\Delta G^\ddagger/RT}$  في معادلة ٧-٣ يقابل الحد  $e^{-(E_2-E_1)/RT}$  في توزيع بولتزمان. وهذا يفسّر لماذا يزداد معدّل التفاعل برفع درجة الحرارة (الذي يستخدم في المعمل)، ويزداد معدّل التفاعل بخفض  $\Delta G^\ddagger$  بواسطة الحفز الإنزيمي (الذي يستخدم في الأنظمة البيولوجية)

### ٣-٢ كيمياء الحمض-القاعدية

عديد من التفاعلات الكيميائية- وكذلك المحفزة إنزيمياً- تتضمن على حفز بالحمض أو القاعدة أو كلاهما. لذلك فإننا سنناقش بإيجاز تعريف وسلوك الأحماض والقواعد. بناءً على تعريف لويس Lewis، فإن حمض لويس هو أى مادة يمكن أن تعمل كمستقبل لزوج من الإلكترونات، وقاعدة لويس هي أى مادة يمكن أن تعمل كمانح لزوج من الإلكترونات. بعض الإنزيمات تحتوي على أيونات معدنية (مثل  $Zn^{2+}$ ) التي تعمل كأحماض لويس في الحفز الإنزيمي. مع ذلك فإن عديد من التفاعلات الإنزيمية تتضمن إنتقال للبروتونات ( $H^+$ ) من أحد الأنواع الكيميائية إلى نوع آخر، لذلك فإن تعريف برونستد- لوري البديل يكون مفيداً للتعامل مع هذه التفاعلات. وتعريف برونستد- لوري هو حالة خاصة من تعريف لويس العام. وفي تعريف برونستد- لوري فإن الحمض هو أى مادة يمكن أن تمنح البروتون (أيون الهيدروجين  $H^+$ ) والقاعدة هي أى مادة يمكن أن تستقبل بروتون بالتفاعل مع حمض برونستد- لوري. وبعد أن يمنح حمض برونستد- لوري البروتون، فإن الحمض يتحول إلى القاعدة المرافقة.

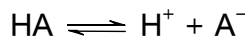
جدول ٣-٣ أمثلة من أحماض برونستد- لوري وقواعد المرافقة

| حمض برونستد - لوري            | $H^+$ + القاعدة المرافقة |
|-------------------------------|--------------------------|
| $HCl \rightleftharpoons$      | $Cl^- + H^+$             |
| $CH_3COOH \rightleftharpoons$ | $CH_3COO^- + H^+$        |
| $NH_4^+ \rightleftharpoons$   | $NH_3 + H^+$             |
| $H_2O \rightleftharpoons$     | $OH^- + H^+$             |
| $H_3O^+ \rightleftharpoons$   | $H_2O + H^+$             |

وجداول ٣-٣ يعرض بعض أمثلة لأحماض برونستد- لوري وقواعد المرافقة. ولكل هذه الأزواج (حمض برونستد- لوري: القاعدة المرافقة)، فإننا نتعامل مع نقل أيون الهيدروجين (البروتون) من الحمض إلى بعض الأنواع الأخرى (مذيب الماء في أحياناً كثيرة) ليكون القاعدة المرافقة. وكل حمض له ميل مميز لمنح أيون الهيدروجين في المحلول المائي. فالأحماض القوية مثل  $HCl$  هي التي تتفكك كلياً إلى القاعدة المرافقة وأيون الهيدروجين، أما الأحماض الضعيفة مثل  $CH_3COOH$  لا تتفكك بصورة كاملة. والوسيلة المناسبة لقياس تركيز أيون الهيدروجين هو مقياس الـ  $pH$ . والرمز " $pH$ " هو رمز مختصر للوغاريتم السالب للأساس 10 لتركيز أيون الهيدروجين:

$$pH = -\log [H^+] \quad (٩-٣)$$

دعنا ننظر إلى تفكك حمض برونستد- لوري ضعيف ( $HA$ ) إلى أيون الهيدروجين (البروتون)  $H^+$  والقاعدة المرافقة ( $A^-$ ) في محلول مائي



إن ثابت التفكك للحمض  $K_a$  يعطي بالعلاقة التالية:

$$K_a = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]} \quad (١٠-٣)$$

دعنا نعرف  $pK_a$  لهذا التفاعل باللوغاريتم السالب للأساس 10  $K_a$   
(أي  $pK_a = -\log K_a$ )

$$pK_a = -\log \left( \frac{[H^+][A^-]}{[HA]} \right) \quad (١١-٣)$$

أو باستخدام العلاقات اللوغاريتمية، فإننا يمكن أن نكتب:

$$pK_a = \log [HA] - \log [A^-] - \log [H^+] \quad (١٢-٣)$$

لاحظ أن الحد الأخير في معادلة ١٢-٣ يماثل تعريف إلـ pH (معادلة ٩-٣) وباستخدام هذه المتساوية، ومرة ثانية باستخدام العلاقات اللوغاريتمية نحصل على:

$$pK_a = \log \left( \frac{[HA]}{[A^-]} \right) + pH \quad (١٣-٣)$$

أو بإعادة الترتيب:

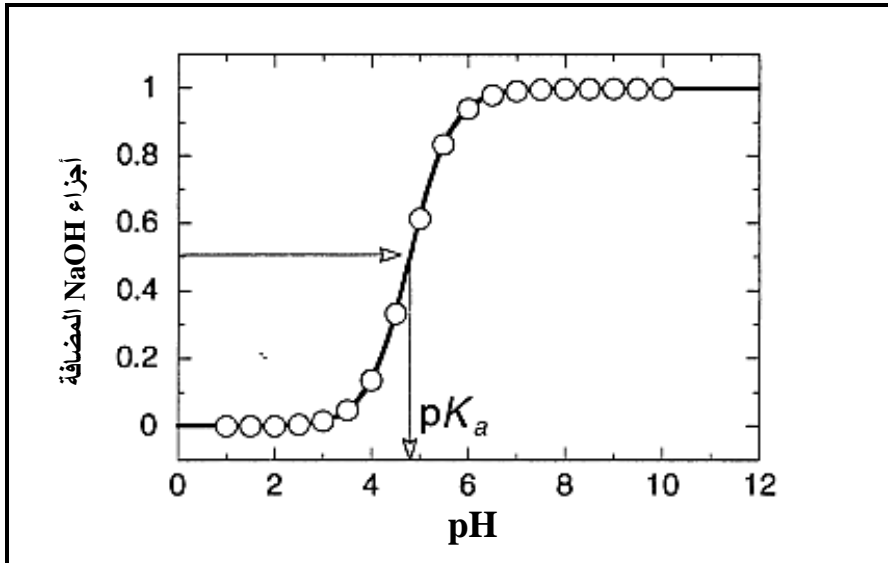
$$pH = pK_a + \log \left( \frac{[A^-]}{[HA]} \right)$$

(١٤-٣)

ومعادلة ٣-١٤ تعرف بمعادلة هندرسون- هاسلبالغ Henderson Hasselblach التي تعطينا وسيلة ملائمة لحساب الـ pH لمحلول من تركيزات حمض برونستد- لوري وقاعدته المرافقة. لاحظ أنه عند تساوي تركيزي الحمض والقاعدة المرافقة فإن قيمة  $[A^-]/[HA]$  تساوي 1.0. ومن ثم فإن  $\log ([A^-] / [HA])$  يساوي صفر. وعند هذه النقطة فإن الـ pH تساوي الـ  $pK_a$ . وهذا يعطينا تعريف عملي لـ  $pK_a$ .

$pK_a$  هي قيمة الـ pH التي عندها يتفكك نصف حمض برونستد - لوري إلى البروتون وقاعدته المرافقة.

دعنا نأخذ أحد الأمثلة البسيطة لتوضيح هذه الفكرة. افترض أننا أذبنا حمض الخليك في الماء وبدأنا معايرة الحمض مع مكافئات أيون الهيدروكسيل بإضافة NaOH. فإذا قمنا بقياس الـ pH للمحلول بعد كل إضافة فإننا سوف نحصل على منحنى معايرة مماثل لذلك في شكل ٣-٩.



شكل ٣-٩ منحنى المعايرة لحمض الخليك (حمض ضعيف) يوضح التقدير البياني لـ  $pK_a$  للأحماض الضعيفة

ويمكن استنتاج إلماعين من هذا المنحنى:

- أولاً: مثل منحنى المعايرة هذا يمدنا بوسيلة ملائمة للتقدير البياني لقيمة الـ  $pK_a$  للمادة التي يتم معايرتها.
- ثانياً: إننا نرى في المنطقة المجاورة لـ  $pK_a$  أن كمية كبيرة من NaOH تحدث تغير صغير في الـ pH. وهذه المقاومة في إلـ pH المجاورة لـ  $pK_a$  للحمض يشار إليها بالكفاءة التنظيمية buffering capacity، وهى خاصية مهمة التي يجب أخذها في الاعتبار عند تحضير المحاليل لدراسة الإنزيمات خارج الخلايا (في المعمل). فقيمة الـ pH التي يجرى عندها التفاعل الإنزيمي لها تأثير كبير على معدل التفاعل وعلى الثبات الكلي للإنزيم. ومن ثم فإنه كقاعدة عامة تضاف جزيئات منظمة - التي يكون لها قيم  $pK_a$  مضاهية لـ pH المثلى لنشاط الإنزيم - إلى محلول الإنزيم للحفاظ على pH قريبة من  $pK_a$  للمنظم.

### ٣-٤ التشكيل الفراغي والبنية الفراغية للجزيئات

إن نظام (نسق) الذرات أو مجموعات من الذرات في الجزيء بالنسبة إلى بعضها البعض توصف بالمصطلحين (أ) التشكيل الفراغي configuration (ب) البنية الفراغية (المجسمة) conformation. وهذين المصطلحين لهما معنيين مختلفين.

#### ٣-٤-١ التشكيل الفراغي للجزيئات

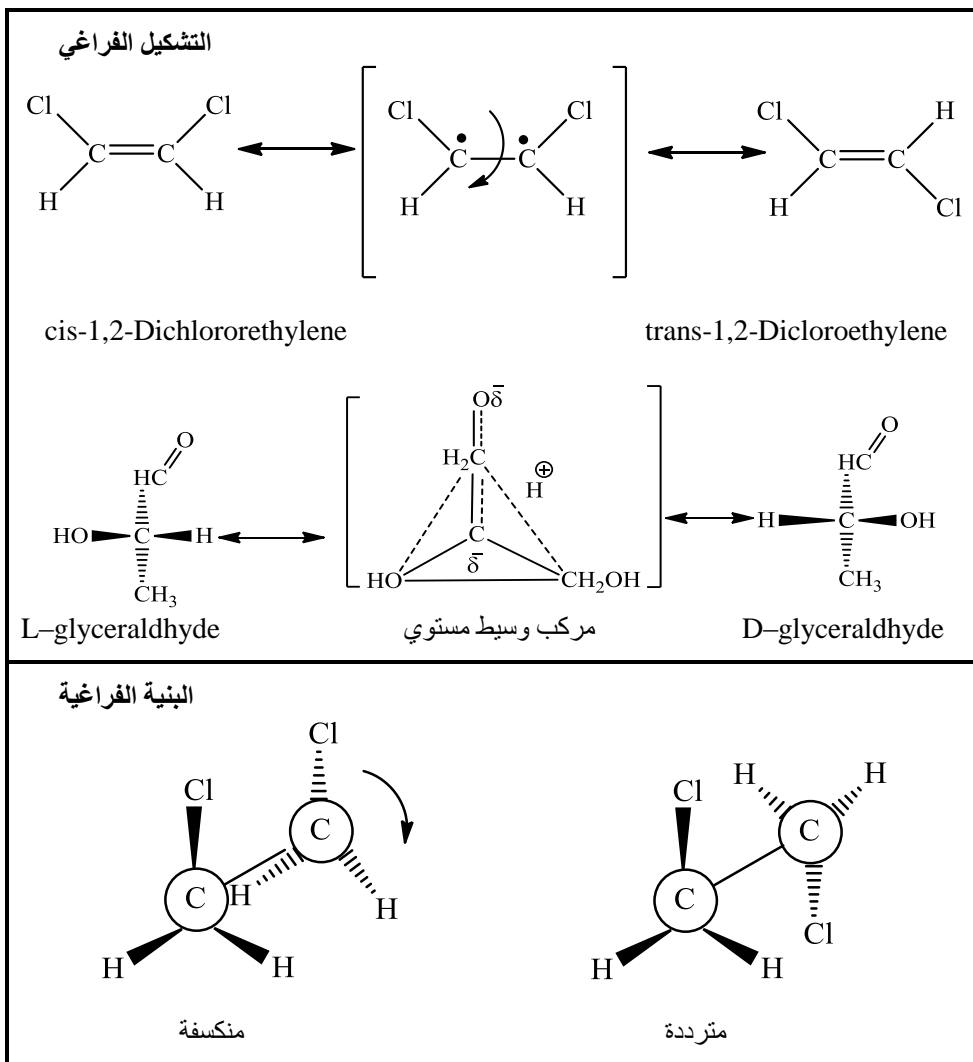
التشكيل الفراغي لجزيء يعين موضع الذرات أو مجموعات من الذرات حول واحد أو أكثر من الروابط التي ليس لها حرية دوران أو حول مراكز غير متناظرة (غير متماثلة) chiral (unsymmetrical) centers وهى ذرات ليس لها مستوى أو مركز تماثل. فعلى سبيل المثال، فإن مركب ثنائي كلورو الإيثيلين المضاهي cis-dichloroethylene يحتوي على ذرتي الكلور على نفس الجانب من الرابطة المزدوجة غير الدوارة (شكل ٣-١٠). وتغيير التشكيل الفراغي للجزيء يحتاج إلى فك الرابطة الكيميائية وإعادة تكوينها. فالتحول من التشكيل الفراغي المضاهي إلى التشكيل الفراغي المخالف - ثنائي الكلورو

إيثيلين يحتاج أولاً إلى فك الرابطة المزدوجة كربون-كربون ثم دوران الرابطة الفردية الناتجة وأخيراً إعادة تكوين الرابطة المزدوجة. والجزئ غير المتناظر البسيط يحتوى على أربع مجموعات كيميائية مختلفة مرتبطة بذرة رباعية الأسطح tetrahedral (عادة ذرة كربون ذات تهجين  $sp^3$ ). ولتغير التشكيل الفراغي لهذا الجزئ فإنه يتم فك أحد الروابط لتكوين مركب وسيط مستوى ثم إعادة تكوين الرابطة على الجانب المقابل. والجزئي الناتج هو المناظر المجسم stereoisomer أو الإنانتيومر enantiomer للجزئ البادئ (شكل ٣-١٠). وبالرغم من أن المناظرات المجسمة تكون متماثلة في مكوناتها الكيميائية فإنها جزيئات مختلفة تماماً ولكل منها خواص مميزة، خاصة في نشاطها البيولوجي.

### ٣-٤-٢ البنية الفراغية (المجسمة) للجزيئات

البنية الفراغية (المجسمة) للجزئ تصف التوزيع الفضائي للذرات أو مجموعات كيميائية حول رابطة (أو أكثر) لها حرية دوران. مثال ذلك أنه في مركب ثنائي كلوروالإيثان dichloroethane لا توجد قيود للدوران حول الرابطة الكيميائية C - C المركزية الذي يسمح بوجود ذرات الكلور على نفس الجانب أو جوانب متضادة على ذرتي الكربون. وهذين الموضعين يعينان المناظرين متقابلين gauche ومضاد anti على التوالي. إضافة إلى ذلك، فإن البنية الفراغية يمكن أن تكون منكسفة eclipsed أو مترددة staggered اعتماداً على ما إذا كانت متراسة aligned أو غير متراسة بالنسبة لبعضهما البعض على الجانبين بالنسبة لرابطة C-C. ومن ثم فإن البنيات الفراغية للجزئ تصف المناظرات التركيبية التي تتولد بالدوران حول الروابط الفردية (شكل ٣-١٠). والجزئ لا يحتاج إلى تغير في الربط الكيميائي للتحويل إلى بنية فراغية جديدة. إن تغير البنية الفراغية للجزئ لا يتولد عنها جزئ جديد ولكنها يمكن أن تغير خواص الجزئ.



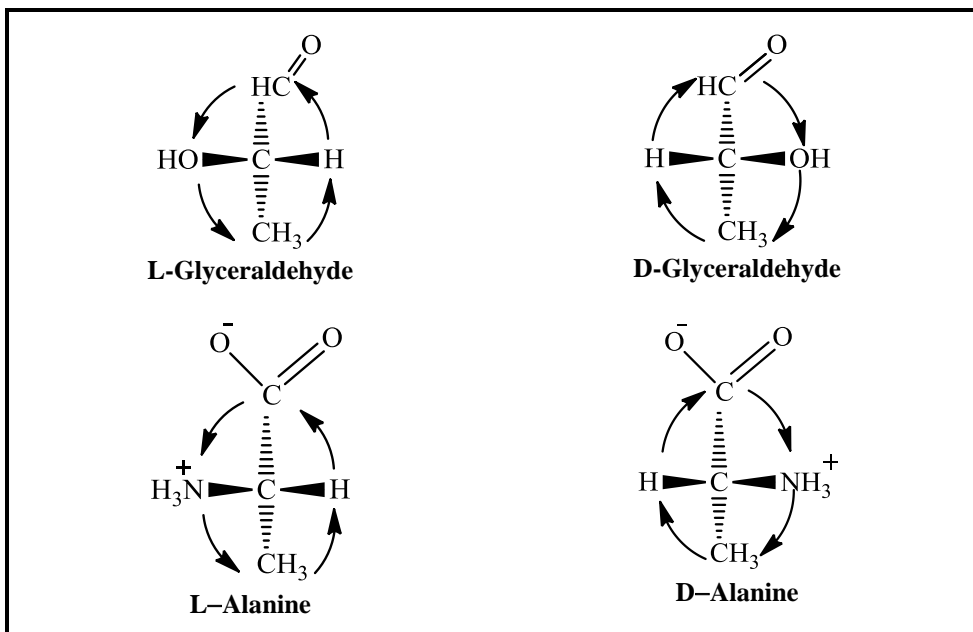


شكل ٣-١٠ التشكيل الفراغي والبنية الفراغية (المجسمة) كلاهما يصف هندسة الجزيء. يمكن تغيير التشكيل الفراغي للجزيء فقط بشرط وإعادة تكوين الروابط الكيميائية كما هو في حالة تحول التشكيل الفراغي المضاهي cis إلى التشكيل الفراغي المضاد trans أو التحول من التشكيل الفراغي L إلى التشكيل الفراغي D للجزيء غير المتناظر. البنية الفراغية (المجسمة) يمكن تغييرها بالدوران حول رابطة فردية.

إن التشكيل الفراغي للجزيئات الكبيرة في الخلية يثبت بواسطة الارتباط التساهمي. من ناحية أخرى فإن البنيات الفراغية للجزيئات الكبيرة تكون عديدة. والبنية الفراغية الطبيعية التي توجد في الخلايا تمثل الصورة النشطة التي تثبت بواسطة القوى الجزيئية الضعيفة (الروابط غير التساهمية) بين الذرات في نفس الجزء أو بين الذرات في جزيئات مختلفة أو بين الجزيئات والوسط المحيط الذي سنناقشه في الجزء التالي (٣-٥).

### ٣-٤-٣ الحياة تعتمد على الجزيئات غير المتناظرة

فيما عدا قليل من الاستثناءات، فإن الوحدات البنائية (المونوميرات) للجزيئات البيولوجية الكبيرة (مثل الأحماض الأمينية في البروتينات) هي جزيئات غير متناظرة chiral molecules حيث تحتوي على واحد أو أكثر من المراكز غير المتناظرة. وتوجد عدة إصطلاحات لوصف الكيمياء الفراغية للجزيئات غير المتناظرة. والكيمياء الفراغية للوحدات البنائية في الكيمياء الحيوية قد عينت اعتماداً على تشكيلها الفراغي المطلق بالنسبة إلى الجليسرالدهيد. فالتشكيل الفراغي للأحماض الأمينية والسكريات تعين بالنسبة إلى الجليسرالدهيد D و L (شكل ٣-١١)، ففي صيغة المسقط القياسية، فإن المجموعات المرتبطة بذرة الكربون غير المتناظرة تدور في اتجاه عقرب الساعة حول الذرة غير المتناظرة بدءاً من مجموعة الألدهيد ذهاباً إلى مجموعة الهيدروكسيل ثم مجموعة الميثيل وأخيراً ذرة الهيدروجين. والتشكيل الفراغي للوحدات البنائية يعين بناءً على ترتيب المجموعات الفعالة المماثلة حول مراكزها غير المتناظرة. والبوليمرات الحيوية (البروتين وعديدات السكر والأحماض النووية) تشيد فقط من نوع واحد من المناظرات المجسمة (الفراغية).



شكل ٣-١١. التشكيل الفراغي المطلق للوحدات البنائية للجزيئات الكبيرة. الكيمياء المجسمة للوحدات البنائية للجزيئات البيولوجية الكبيرة تعين بالنسبة لـ L و D-جليسرالدهيد. بالنسبة للأحماض الأمينية فإن الكيمياء المجسمة تعين بناءً على الدوران بدءاً من مجموعة الكربوكسيل

### ٣-٥ التأثيرات المتبادلة غير التساهمية والارتباط العكسي

التأثيرات المتبادلة بين الذرات في الجزيئات هي الروابط التساهمية وهي أقوى الروابط في الأنظمة البيولوجية. ولقد تركّزت مناقشتنا حتى الآن على تكوين وثباتية وتفكيك الروابط التساهمية بين الذرات في الجزيئات، وهي الأوجه المهمة في التحولات الكيميائية التي تحفز بالإنزيمات. من ناحية أخرى، فإنه يمكن أن توجد تأثيرات متبادلة بين الجزيئات بعضها البعض أو خلال الجزيئات الكبيرة بواسطة عدد من القوى غير التساهمية *noncovalent forces* الضعيفة التي أحياناً يطلق عليها الروابط الثانوية. وقوى التجاذب الضعيفة هذه تكون عكسية وتلعب دوراً مهماً في طي البروتينات والتفاعلات الإنزيمية، وإرتباط المتصلات بالمستقبلات. وفي فصل ٤ سنرى دور هذه التأثيرات غير التساهمية في تركيب البروتين وفي الفصول ٥ و ٨ و ١١ سنرى دور هذه التأثيرات غير التساهمية

في التكوين العكسي للمعقدات الثنائية بين الإنزيم وجزيئات المتصلة ligand (المواد الخاضعة والمنبثبات) التي تكون سمة حاسمة لكل من الحفز الإنزيمي وتنشيط الإنزيمات. توجد أربع أنواع من التأثيرات المتبادلة غير التساهمية التي تكون مهمة في تركيب البروتينات (فصل ٤) وإرتباط الإنزيمات بالمتصلات (الفصول ٥ و ٨ و ١١). وهذه تشمل:

١- التأثيرات المتبادلة الكهربائية الساكنة electrostatic interactions

٢- الإرتباط الهيدروجيني hydrogen bonding

٣- التأثيرات النافرة (الكارهة) للماء hydrophobic interaction

٤- قوى فان دير فالس Van der Waals forces

وهذه القوى غير التساهمية العكسية تختلف في القوة والتخصص والمتطلبات الهندسية (جدول ٣-٤)

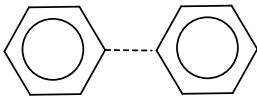
وهنا سوف نصف هذه التأثيرات المتبادلة باختصار، وفي الفصول التالية سوف نرى كيف لهذه القوى أن تشارك في ثبات تركيب الإنزيم وإرتباط الإنزيم بالمادة الخاضعة والمنبثبات.

### ٣-٥-١ التأثيرات المتبادلة الكهربائية الساكنة

عندما توجد مجموعتين لهما شحنتين متضادتين (مثل  $\text{COO}^-$  و  $\text{NH}_3^+$ ) بالقرب من بعضهما، فإن كل منهما تنجذب إلى الأخرى خلال قوة التجاذب الكولومبية التي توصف كالتالي:

$$F = \frac{q_1 q_2}{r^2 D} \quad (٣-١٥)$$

جدول ٣-٤ قوى (طاقة) الروابط غير التساهمية مقارنة بالروابط التساهمية في الجزيئات البيولوجية بالكيلو سعر/ مول ( $\text{kcal mol}^{-1}$ )

| نوع الرابطة             | مثال                                                                                    | قوة الرابطة<br>( $\text{kcal mol}^{-1}$ ) |
|-------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| تساهمية                 | O – H                                                                                   | 109.94                                    |
|                         | C – H                                                                                   | 98.95                                     |
|                         | C – C                                                                                   | 83.17                                     |
| غير التساهمية           |                                                                                         |                                           |
| كهربية ساكنة (الأيونية) | $-\text{COO}^- \cdots ^+\text{H}, \text{N}-$                                            | 20                                        |
| إرتباط هيدروجيني        | $\text{O} - \text{H} \cdots \text{O} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array}$ | 2.5-8                                     |
| نافرة للماء             |        | 0.6 – 7                                   |
| فان دير فالس            | $-\text{CH}_3 \quad \text{H}_3\text{C}-$                                                | < 1                                       |

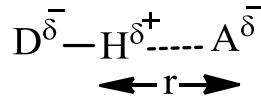
حيث  $q_1$  و  $q_2$  هما الشحنتين على كلا الذرتين المشاركتين ،  $r$  هي المسافة بينهما و  $D$  هو ثابت الثنائي الكهربائي للوسط (الذي يعبر عن قطبية الوسط) الذي توحد فيه المجموعتين. وحيث أن  $D$  تظهر في المقام فإن قوة التجاذب ( $F$ ) تكون صغيرة في حالة المذيبات القطبية التي لها ثابت ثنائي كهربائي كبير مثل الماء ( $D=80$ )، وتكون صغيرة في حالة المذيبات غير القطبية التي لها ثابت ثنائي كهربائي صغير مثل البنزين ( $D=2.3$ ). ومن ثم فإن القوة الكهربائية الساكنة تكون كبيرة في المنطقة الكارهة للماء داخل البروتينات عن المناطق السطحية المعرضة للمذيب (الماء). وهذه التأثيرات المتبادلة التجاذبية يشار إليها أيضاً بالروابط الأيونية أو الجسور الملحية أو الأزواج الأيونية ion

pairs. وهذه المصطلحات لها نفس المعنى: أى تجاذب كهربى ساكن بين المجموعات المتضادة في الشحنة.

ومعادلة ٣-١٥ تصف قوة التجاذب فقط، أما إذا كانت الشحنتين متماثلتين (موجبتين أو سالبتين)، فإنه يحدث تنافر بينهما. وإذا حدث دنو لذرتين - سواء شحنتهما متضادة أم لا- من بعضهما، فإنه يحدث تنافر بين إلكترونات الغلاف الخارجى، والتوازن بين قوة التجاذب وقوة التنافر تحدد المسافة المثلى بين الذرات في حالة الرابطة الأيونية، التي تبلغ  $2.8^{\circ}\text{A}$

### ٣-٥-٢ الارتباط الهيدروجيني

تتكون الرابطة الهيدروجينية (H bond) عندما تشارك ذرة هيدروجين بين ذرتين لهما كهروسالبية عالية. ويمكن التعبير عنها كالتالي:



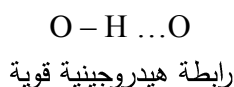
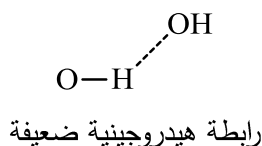
حيث  $\delta^+$ ,  $\delta^-$  يشيران إلى شحنات جزئية سالبة وموجبة على التوالي. والذرة التي ترتبط تساهمياً بالهيدروجين (D) يشار إليها بالذرة المانحة لرابطة الهيدروجين والذرة الأخرى (A) يشار إليها بالذرة المستقبلة لرابطة الهيدروجين. والمجموعة (D-H) المانحة للهيدروجين في الأنظمة البيولوجية تكون مجموعات حمضية ضعيفة مثل O-H و N-H وأحياناً S-H، بينما الذرة المستقبلة (A) تكون ذرة قاعدية ضعيفة مثل N, O وأحياناً S. والرابطة الهيدروجينية تكون طاقاتها أضعف من الروابط التساهمية وتختلف في طاقاتها بين  $2.5-8 \text{ kcal/mol}$ . وقوة الرابطة الهيدروجينية تعتمد على عدة عوامل، لكن أهم هذه العوامل هو طول الرابطة (r) بين الذرة المانحة D والذرة المستقبلة A (جدول ٣-٥). وفي البروتينات حيث يوجد عدد من هذه الروابط، فإنها تعطي ثباتية للتركيبات الثانوية والتركيبات العليا الذي سنناقشه في فصل ٤ الخاص بتركيب الإنزيمات. الروابط

الهيدروجينية تشارك أيضاً في طاقة ارتباط المتصلات (المواد الخاضعة والمثبطات) بالمواقع النشطة للإنزيمات ويمكن أن تشارك بدور مهم في آلية الحفز الإنزيمي.

جدول ٣-٥ أطوال الروابط الهيدروجينية (r) التي توجد في الجزيئات البيولوجية

| نوع الرابطة                | طول الرابطة (r) بالانجستروم (Å) |
|----------------------------|---------------------------------|
| $\leftarrow r \rightarrow$ |                                 |
| O - H ..... O              | 2.70                            |
| O - H .... O <sup>-</sup>  | 2.63                            |
| O - H ..... N              | 2.88                            |
| N - H ..... O              | 3.04                            |
| N <sup>+</sup> - H ..... O | 2.93                            |
| N - H ..... N              | 3.10                            |

أيضاً فإن الرابطة الهيدروجينية تكون موجهة، بمعنى أنها تكون قوية إذا كانت الذرة المانحة وذرة الهيدروجين والذرة المستقبلية على خط مستقيم، بينما إذا كانت الذرات الثلاثة ليست على خط مستقيم (تشكل زاوية) فإنها تكون ضعيفة:



### ٣-٥-٣ التأثيرات النافرة للماء

عند إذابة جزيئات مادة غير قطبية (مثل الهكسان) في مذيب قطبي مثل الماء، فإنها تشوش شبكة الروابط الهيدروجينية للمذيب القطبي (التي تشارك في ثباتية المذيب). دون أن يحدث توازناً بتكوين روابط هيدروجينية جديدة وبذلك توجد خسارة (إنخفاض) في الإنتروبي للنظام (أي تزيد طاقة النظام) عند وجود الجزيئات غير القطبية في المحاليل المائية. ومن ثم فإنه عند خلط مادة غير قطبية (مثل الهكسان) في مذيب الماء، فإنه يكون موات من ناحية الحركة الحرارية لجزيئات المادة غير القطبية أن تتجه للتجمع مع

بعضها ولا تذوب في الماء، وهذه الظاهرة يطلق عليها التأثير النافر للماء hydrophobic effect. فالمركبات القطبية أو المشحونة تذوب في المذيبات القطبية، والمركبات غير القطبية تذوب في المذيبات غير القطبية مثل الكلورفورم. وهذه أحد الأسس الكيميائية العامة: المماثل يذيب المماثل like dissolve like.

وظاهرة التأثير النافر للماء تشاهد في البروتينات، فعلى سبيل المثال فإن الأحماض الأمينية ذوات السلاسل الجانبية غير القطبية عادة ما توجد في قلب جزئ البروتين المطوي حيث تحجب عن المذيب القطبي. بعكس ذلك فإن الأحماض الأمينية التي لها سلاسل جانبية قطبية من الشائع أن تتواجد على السطح الخارجي لجزئ البروتين المطوي. وبالمثل فإن المناطق النافرة للماء في المواقع النشطة لبروتين الإنزيمات تميل لتثبيت إرتباط الجزيئات النافرة للماء. إن فصل الجزيئات النافرة للماء من المحلول بواسطة الموقع النشط للإنزيم يمكن أن تكون عنصر قوي في طاقة الإرتباط.

### ٣-٤ قوى فان دير فالس

توجد قوى تجاذب غير متخصصة بين أى ذرتين عندما تتراوح المسافة بينهما من 3 إلى 4 أنجستروم. والأساس في هذا التجاذب هو أن توزيع الشحنة الإلكترونية- أو ما يطلق عليها السحابة الإلكترونية- حول نواة الذرة يتقلب لحظياً مع الوقت. وهذا التقلب يؤدي إلى عدم تماثل لتوزيع الإلكترونات ونشوء عزم ثنائي القطب dipole moment في هذه الذرة. وعند تقارب الذرات بمسافة مناسبة، فإن عدم التماثل هذا في أحد الذرات يمكن أن يؤثر على توزيع كثافة الإلكترونات حول الذرات المجاورة بصورة مضادة حتى يخفض إلى الحد الأدنى التناثر إلكترون- إلكترون، ومن ثم تنشأ قوى تجاذب بين الذرات. وقوى التجاذب هذه يطلق عليها رابطة فان دير فالس Van der Waals bond. وتقدر طاقة فان دير فالس لزوج من الذرات بحوالي 1 كيلو سعر/ مول التي لا تزيد إلا قليلاً عن متوسط الطاقة الحرارية للجزيئات عند درجة حرارة الغرفة الإعتيادية (0.65 كيلو سعر/ مول). ولكن عندما تسمح الظروف بتكوين عدد كبير من روابط فان دير فالس في نفس الوقت، فإن قوة التجاذب الجمعي لها توفر طاقة تثبيت كبيرة للتأثيرات المتبادلة بروتين- بروتين.



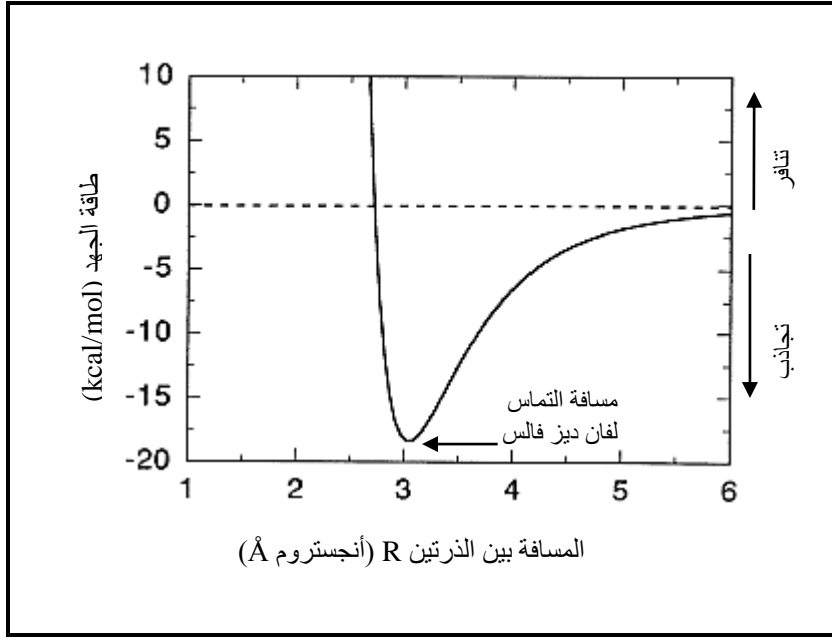
بروتين وبروتين- المادة الخاضعة (أو المثبط). إن قوة التجاذب بين السحابتين الإلكترونية لذرتين يزداد كلما اقتربتا من بعضهما البعض إلى أن يفصل بينهما ما يسمى بمسافة التماس لفان دير فالس (شكل ٣-١١). أما إذا تقاربت الذرتين لمسافة أقل من مسافة التماس لفان دير فالس، فإن ذلك يؤدي إلى تنافر قوي بينهما نظراً لتداخل السحابتين الإلكترونية من بعضهما.

إن قوى التجاذب كونها ثنائية القطب dipolar، فإنها تعتمد على المسافة  $R \leq 1/R^6$ . وقوة التنافر تنشأ من تداخل السحابت الإلكترونية للذرات الفردية التي تحدث عند مسافات قريبة جداً. وهذه القوة تتناقص سريعاً مع المسافة وتظهر اعتماداً بـ  $1/R^{12}$ . ومن ثم فإن طاقة الجهد potential energy الكلية لتأثيرات فان دير فالس تعتمد على المسافة بين الأنوية كجمع لكل من قوى التجاذب وقوى التنافر:

$$PE = \frac{A}{R^{12}} - \frac{B}{R^6} \quad (٣-١٦)$$

حيث PE هي طاقة الجهد، و A و B يمكن اعتبارهما ثابت مميزة لزوج الأنوية المشاركة. ومن معادلة ٣-١٦ نجد أن التجاذب المثالي بين الذرات يحدث عندما تتفصل الذرات بمسافة التماس لفان دير فالس (شكل ٣-١١).

مسافة التماس لزوج من الذرات تعين بواسطة نصف قطر التماس لفان دير فالس لكل ذرة الذي يعتمد بذاته على التشكيل الإلكتروني للذرة. فمثلاً تقدر مسافة التماس بين ذرة أكسجين وذرة كربون بـ  $3.4\text{\AA}$ ، التي هي عبارة عن مجموع أنصاف قطري التماس لذرتي الأكسجين ( $1.4\text{\AA}$ ) والكربون ( $2.0\text{\AA}$ )، ومسجل في جدول ٣-٦ أنصاف أقطار التماس لمعظم الذرات الموجودة في البروتين. وفي هذا التصور، فإنه يمكن اعتبار كل ذرة كجسم كروي بنصف قطر يحدد نصف قطر التماس لفان دير فالس. وهذه الكرات يشار إليها بأسطح فان دير فالس التي تحدد أدنى تماس يمكن للذرات في الجزئ أن تتقدم في اتجاه بعضها البعض، وبالتالي تحدد تعبئة الذرات في التركيب الجزيئي.



شكل ٣-١١ مخطط لطاقة جهد التداخل لفان فالس كدالة في المسافة R بين ذرتين (هليوم)

ونظراً لإختلاف أنصاف الأقطار والتفاعل بين قوى التنافر والتجاذب، فإن قوى فان دير فالس والأسطح يمكن أن تلعب دوراً في توطيد (ترسيخ) تخصص التأثيرات المتبادلة بين موقع الإرتباط في الإنزيم مع المتصلات (المواد الخاضعة والمثبطات).

جدول ٣-٦ أنصاف أقطار التماس لفان دير فالس للذرات في البروتينات

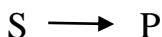
| الذرة | نصف القطر (Å°) |
|-------|----------------|
| H     | 1.2            |
| C     | 2.0            |
| N     | 1.5            |
| O     | 1.4            |
| S     | 1.85           |
| P     | 1.9            |

### ٦-٣ معدلات التفاعلات الكيميائية

إن دراسة المعدلات التي تحدث بها التفاعلات الكيميائية يطلق عليها الحركية الكيميائية Chemical kinetics. ومعدل rate أو سرعة velocity (v) تفاعل ما يصف بأى درجة يحدث التفاعل. ويمكن قياس سرعة التفاعل بمعدل إختفاء أحد المتفاعلات أو معدل تكوين أحد النواتج بالنسبة للوقت. وفي فصل ٦ سوف نعالج حركيات التفاعلات المحفزة بالإنزيمات. وهنا سوف نراجع السمات الأساسية للتفاعلات الكيميائية البسيطة المرتبطة بمعدلات التفاعلات الإنزيمية.

#### ١-٦-٣ معادلة المعدل للتفاعل الكيميائي

إن معادلة المعدل للتفاعل تعطي إعتقاد المعدل على تركيز المتفاعلات ونواتج التفاعل والحفازات. ولعديد من التفاعلات غير العكسية عند درجة حرارة ثابتة وجد تجريبياً أن معدل التفاعل يتناسب مباشرة مع تركيز المواد المتفاعلة. دعنا ننظر إلى تفاعل كيميائي بسيط الذي فيه الجزئ S يتحول غير عكسياً إلى الناتج P:



عند بداية التفاعل يكون لدينا كمية محددة من S التي سنرمز لها بـ  $[S]_0$ ، وعند أى وقت لاحق من بداية التفاعل، فإن كمية S المتبقية سوف تكون أصغر من  $[S]_0$  وسنرمز لها بـ  $[S]_t$ . إن كمية S سوف تنخفض مع الوقت إلى أن تختفي S، وعند هذه النقطة سوف يوقف التفاعل.

ونحن نتوقع أن معدل التفاعل (أيضاً يطلق عليه سرعة التفاعل) سوف يتناسب مع كمية S الموجودة. وتكون معادلة المعدل كالتالي:

$$v = \frac{-d[S]}{dt} = k [S] \quad (١٧-٣)$$

حيث  $v$  هي السرعة و  $k$  ثابت التناسب الذي يشار إليه بثابت المعدل rate constant. وإذا قمنا بتكامل هذه المعادلة التفاضلية يكون لدينا:

$$-\int d[S] = \int k[S] dt \quad (١٨-٣)$$

وبإجراء التكامل لهذه المعادلة نحصل على:

$$[S]_t = [S]_0 e^{-kt} \quad (١٩-٣)$$

ومعادلة ١٩-٣ تشير إلى أن تركيز المادة المتفاعلة ينخفض أسياً من  $[S]_t = [S]_0$  عند الزمن  $t = 0$  إلى  $[S]_t = 0$  عند وقت لا متناهي. وخلال نفس هذه الفترة الزمنية فإن تركيز الناتج  $p$  يزداد أسياً. فعند بداية التفاعل ( $t = 0$ ) لا يوجد الناتج. ومن ثم فإن  $[P]_0 = 0$ . وعند وقت لا متناهي فإن أقصى كمية من الناتج يمكن أن تنتج تعين بواسطة التركيز البادئ للمادة المتفاعلة  $[S]_0$ . لذلك، فإنه عند الوقت الامتثالي  $[P]_t = [S]_0$ . وعند أى وقت بين الصفر واللامتناهية، يجب أن يكون لدينا حفظ الكتلة:

$$[S]_t + [P]_t = [S]_0 \quad (٢٠-٣)$$

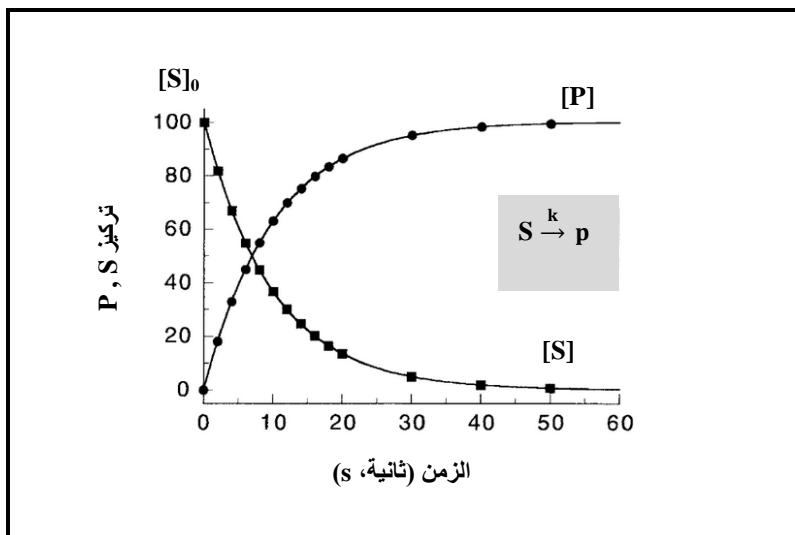
$$[P]_t = [S]_0 - [S]_t \quad (٢١-٣)$$

وباستخدام معادلة ١٩-٣، فإننا يمكن إعادة صياغة معادلة ٢١-٣ كالتالي:

$$[P]_t = [S]_0 - [S]_0 e^{-kt} \quad (٢٢-٣)$$

$$[P]_t = [S]_0 (1 - e^{-kt}) \quad (٢٣-٣)$$

ومن ثم فإنه من معادلة ٣-١٩ ومعادلة ٣-٢٣ نتوقع أن تركيز P, S على التوالي ينخفض ويزداد أسياً، كما هو موضح في شكل ٣-١١.



شكل ٣-١٢ منحنيات سير التفاعل لإنخفاض تركيز المادة المتفاعلة S وزيادة تركيز ناتج التفاعل P لتفاعل رتبة أولى  $S \xrightarrow{k} p$

من المعتاد في التفاعل السابق أن يميز التفاعل ليس فقط بثابت المعدل k ولكن أيضاً بفترة نصف العمر half life ( $t_{1/2}$ ). وفترة نصف العمر هي الفترة الزمنية اللازمة لإنخفاض تركيز S إلى نصف قيمتها الابتدائية. وللحصول على  $t_{1/2}$ ، فإننا نعيد ترتيب معادلة ٣-١٩ كالتالي:

$$\frac{[S]_t}{[S]_0} = e^{-kt} \quad (٣-٢٤)$$

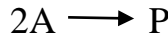
وعندما يكون  $[S]_t$  نصف  $[S]_0$ ، فإن النسبة  $[S]_t / [S]_0$  تساوي  $1/2$ . وباستخدام هذه المتساوية وأخذ اللوغاريتم الطبيعي لكلا الطرفين وبقسمة الطرفين على k، نحصل على:

$$\frac{-\ln(1/2)}{k} = \frac{0.693}{k} = t_{1/2} \quad (٢٥-٣)$$

وقيمة  $t_{1/2}$  تتناسب عكسياً مع ثابت المعدل  $k$ ، وتكون قيمهما بوحدات الزمن الذي يجعل إستخدامها أيسر من  $k$  خاصة في إنحلال النظائر المشعة التي تستخدم في الدراسات الإنزيمية.

### ٢-٦-٣ رتبة التفاعل

في المناقشة السابقة قد عالجنا أبسط عمليات الحركية التي تتضمن مادة متفاعلة واحدة وناتج واحد. ومن معادلة المعدل  $٣-١٧$ ، فإننا نجد أن سرعة هذا التفاعل تعتمد خطياً مع التركيز الابتدائي للمادة المتفاعلة. والتفاعل من هذا النوع يطلق عليه تفاعل رتبة أولى، وثابت المعدل  $k$  للتفاعل يطلق عليه ثابت المعدل للرتبة الأولى. إفتراض أن صورة التفاعل هو 2 جزئ من المتفاعل A وينتج جزئ من الناتج P:



وإذا قمنا بحل معادلة المعدل لهذا التفاعل، فإننا نجد أنها تأخذ الصورة التالية:

$$v = k [A]^2 \quad (٢٦-٣)$$

والتفاعل من هذا النوع يطلق عليه رتبة ثانية. وبصورة عامة فإن رتبة التفاعل الكيميائي هو مجموع حدود الأس لتركيزات المتفاعلات في معادلة السرعة. وبعض الأمثلة مسجلة في جدول ٣-٧.

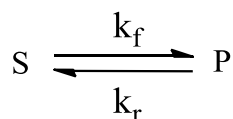
جدول ٣-٧ رتبة التفاعل لبعض التفاعلات الكيميائية البسيطة

| الرتبة | التفاعل             | معادلة المعدل   |
|--------|---------------------|-----------------|
| 1      | $A \rightarrow P$   | $v = k [A]$     |
| 2      | $2A \rightarrow P$  | $v = k [A]^2$   |
| 2      | $A+B \rightarrow P$ | $v = k [A] [B]$ |

وكما رأينا أن التفاعل المشترك على مادتين مثل  $A + B \rightarrow P$  يكون رتبة أولى في A ورتبة أولى في B والرتبة الإجمالية للتفاعل تكون رتبة ثانية. مع ذلك فإنه أحياناً يمكن أن نجعل مثل هذا التفاعل يظهر كما لو أنه رتبة أولى في أحد المواد المتفاعلة عندما توجد المادة المتفاعلة الثانية بتركيز عالي ثابت. وتحت هذه الظروف يقال أن التفاعل رتبة أولى زائف Pseudo-first order بالنسبة للمادة المتفاعلة التي لا توجد بتركيز عالي. ومثل هذه التفاعلات يمكن وصفها بمعادلة معدل الرتبة الأولى. وهذه الحالات المكيفة أحياناً تطبق على التفاعلات الكيموحيوية مثل التفاعلات الإنزيمية.

### ٣-٦-٣ التفاعلات الكيميائية العكسية

إفترض أن التفاعل البسيط  $S \rightarrow P$  يكون عكسي بحيث أنه يوجد تفاعل أمامي من S إلى P بثابت معدل  $k_f$ ، وأيضاً يوجد تفاعل عكسي من P إلى S بثابت معدل  $k_r$ :



ونظراً لوجود التفاعل العكسي، فإن المتفاعل S لا يتحول مطلقاً بصورة كاملة إلى الناتج P. بدلاً من ذلك فإنه ينشأ تركيز إتران لكل من S و P بعد وقت كافي. وثابت الإتران للتفاعل الأمامي يكون كالتالي:

$$K_{eq} = \frac{[P]}{[S]} = \frac{k_f}{k_r} \quad (٢٧-٣)$$

إن معادلة المعدل للتفاعل الأمامي يجب أن تتضمن حد لمعدل التفاعل العكسي، ولذلك فإن سرعة التفاعل تكون:

$$v = \frac{-d[S]}{dt} = k_f[S] - k_r[P] \quad (٢٨-٣)$$

ويتكامل هذه المعادلة نحصل على:

$$[S]_t = [S]_0 \frac{k_r + K_f e^{-(k_f+k_r)t}}{k_f + k_r} \quad (٢٩-٣)$$

ويتكامل معادلة السرعة بالنسبة لتكوين المنتج p، يعطي:

$$[p]_t = \frac{k_f[S]_0\{1 - e^{-(k_f+k_r)t}\}}{k_f + k_r} \quad (٣٠-٣)$$

وعند وقت لا متناهي (أى عند الوصول للاتزان)، فإن تركيزي P, S يعطيان بالمعادلتين التاليتين:

$$[S]_{eq} = \frac{k_r[S]_0}{k_f + k_r} \quad (٣١-٣)$$

$$[P]_{eq} = \frac{k_f[S]_0}{k_f + k_r} \quad (٣٢-٣)$$

ومن ثم فإن منحنى تقدم التفاعل للتفاعل العكسي سوف يتبع نفس الزيادة الأسية للنواتج والانخفاض الأسى للمتفاعل المعروف في شكل ٣-١٢، ولكن الآن فإنه بدلاً من  $[S]=0$  و  $[P]=[S]_0$  عند الزمن اللانهائي فإن المنحنى سوف يدنو إلى قيم الاتزان للنوعين P, S.



### ٣-٦-٤ قياس السرعة الابتدائية

إن التعقيدات في معادلات المعدل المعروضة في قسم ٣-٦-٣ جعلت التقدير البياني لمعدلات التفاعلات مشكلة كبيرة قبل توفر برامج تطابق المنحنى البياني غير الخطي. لهذا السبب اتجه الباحثون إلى قياس المعدل الابتدائي أو السرعة الابتدائية initial velocity للتفاعل كوسيلة لقياس حركات التفاعل. في بداية التفاعل لا يوجد الناتج، فقط يوجد المتفاعل  $[S]_0$ . ولفترة وجيزة بعد بدأ التفاعل حيث يكون  $[P] \ll [S]$ ، فإن تكوين P يكون شبه خطي مع الوقت. ومن ثم فإنه خلال الطور الابتدائي من التفاعل، فإننا يمكن أن نعرف السرعة  $d[P]/dt = -d[S]/dt$  كميل التطابق لـ  $[P]$  أو  $[S]$  كدالة في الوقت. وكقياس تقريبي فإن هذا الطور الابتدائي شبه الخطي للتفاعل عادة ما يمتد بين الفترة الزمنية  $[P] = 0$  و  $[P] = 0.1[S]_0$  (أى حتى استهلاك حوالي 10% من المتفاعل). مع ذلك فإن هذه القاعدة ليست إلا دليل، والفترة الزمنية للطور الخطي لأى تفاعل يجب تقديرها تجريبياً، وقياسات السرعة الابتدائية تستخدم على نطاق واسع في حركات الإنزيمات كما سنرى في فصل ٦ وفصل ١٠.

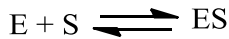
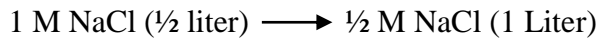
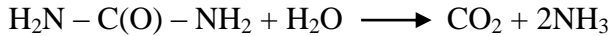
## أسئلة

١. أكتب معادلات المعدل لتفاعلات الرتبة الأولى والرتبة الثانية.
٢. أنظر إلى التفاعل غير الإنزيمي البسيط:  $A \rightarrow B$  : عندما يكون تركيز A يساوي 20 mM، فإن سرعة التفاعل وجدت أنها تساوي  $5 \mu M$  من B كل دقيقة. (أ) أحسب ثابت المعدل لهذا التفاعل. (ب) ما هي جزيئية هذا التفاعل؟
٣. إذا وجد  $10 \mu mol$  من النظير المشع  $^{32}P$  (له فترة نصف عمر " $t_{1/2}$ " تساوي 14 يوم عند  $t = 0$ ) ما هي كمية  $^{32}P$  المتبقية بعد (أ) ٧ أيام (ب) بعد ١٤ يوم (ج) بعد ٢١ يوم (د) بعد ٧٠ يوم؟

٤. افترض أن تفاعل بسيط  $2A \rightarrow B + C$  له ثابت معدل  $10^{-6} \text{M}^{-6} \text{s}^{-1}$ . ما هي سرعة التفاعل إذا كان تركيز A يساوي 10 mM؟
٥. لكل من التفاعلين التاليين، حدد ما إذا كان التفاعل رتبة أولى أو رتبة ثانية وأحسب ثابت المعدل.

| الوقت (s) | تفاعل (1)<br>تركيز المتفاعل (mM) | تفاعل (2)<br>تركيز المتفاعل (mM) |
|-----------|----------------------------------|----------------------------------|
| 0         | 6.2                              | 5.4                              |
| 1         | 3.1                              | 4.6                              |
| 2         | 2.1                              | 3.9                              |
| 3         | 1.6                              | 3.2                              |
| 4         | 1.3                              | 2.7                              |
| 5         | 1.1                              | 2.3                              |

٦. أي منهما يكون له أنثروبي أعلى: الماء السائل عند  $0^\circ\text{C}$  أو الثلج عند  $0^\circ\text{C}$ ؟
٧. هل الإنثروبي يزيد أو ينخفض في العمليات التالية:



٨. تفاعل له  $\Delta H = 15 \text{ kJ}$ ,  $\Delta S = 50 \text{ J.K}^{-1}$ . هل التفاعل تلقائي عند  $10^\circ\text{C}$  (أ) عند  $80^\circ\text{C}$ ؟

٩. صنف الجمل التالية بصح أو خطأ:

أ- يقال للتفاعل أنه تلقائي عندما يمكن أن يسير في الاتجاه الأمامي أو الاتجاه العكسي.

ب- العملية التلقائية دائماً ما تحدث سريعاً.

ج- التفاعل غير التلقائي سوف يسير تلقائياً في الاتجاه العكسي.

د- العملية التلقائية يمكن أن تحدث مع إنخفاض كبير في الانتروبي.

١٠. ما هو الـ pH لكل من المحاليل التالية:

أ-  $10^{-3} \text{ M HCl}$

ب- مخلوط متساوي الحجم من  $0.1 \text{ M}$  من حمض الخليك و  $0.03 \text{ M}$  من أسيتات

الصوديوم.

١١. اشرح كيف للتفاعل غير التلقائي يمكن دفعة للأمام بإزدواجه بتفاعل تلقائي آخر.

١٢. حمض التيروزين له  $\text{pK}_a = 2.20$  لإزالة البروتون من مجموعة الكربوكسيل ما هو التركيز

النسبي للتيروزين وقاعدته المرافقة عند pH (أ) 7 و (ب) 2.2 و (ج) 1.5؟

---

## فصل ٤ المكونات التركيبية للإنزيمات

### Structure components of Enzyme

---

|     |                                                  |
|-----|--------------------------------------------------|
| ١-٤ | الأحماض الأمينية هي الوحدات البنائية للبروتينات. |
| ٢-٤ | الروابط الببتيدية.                               |
| ٣-٤ | التركيب الأولي للبروتين: تتابع الأحماض الأمينية. |
| ٤-٤ | التركيب الثانوي للبروتين.                        |
| ٥-٤ | التركيب الثالث للبروتين                          |
| ٦-٤ | الوحدات الفرعية والتركيب الرباعي                 |
| ٧-٤ | العوامل المساعدة في الإنزيمات                    |

أحد الأسئلة الأساسية في مجال الإنزيمات هو كيف للتركيب الجزيئي للإنزيمات أن يفسر قدرتها العالية للحفز والتخصص وتنظيم نشاطها. في فصل ٣ راجعنا القوى التي تلعب الدور الأساسي في التفاعلات الكيميائية مثل تلك التي تحفز بالإنزيمات. في هذا الفصل سوف نتعرف على المكونات الجزيئية للإنزيمات التي تجلب هذه القوى لممارسة عملها على المتفاعلات والنواتج في التفاعل المحفز. مثل كل البروتينات، فإن الإنزيمات تتألف أساساً من ٢٠ نوع من الأحماض الأمينية. وسوف نناقش في هذا الفصل نمط ارتباط هذه الأحماض الأمينية لتكون سلاسل عديد الببتيد للبروتين، وكيف تطوي هذه السلاسل لتكوين التركيب الجسم ثلاثي الأبعاد للإنزيمات الذي ييسر عملية الحفز. السلاسل

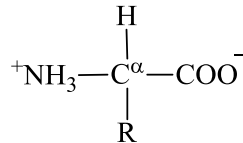
الجانبية لبعض الأحماض الأمينية توفير أنشطة كيميائية متنوعة التي تستخدم بواسطة الإنزيمات في حفز تحولات كيميائية خاصة. بالإضافة إلى الأحماض الأمينية، فإن عديد من الإنزيمات تستخدم عوامل مساعدة cofactors غير بروتينية لتضيف أنشطة كيميائية تحتاجه عملية الحفز. وسوف نصف في نهاية هذا الفصل بعض العوامل المساعدة الشائعة التي توجد في الإنزيمات ودورها في عملية الحفز.

#### ٤-١-١ الأحماض الأمينية هي الوحدات البنائية للبروتينات

تنتمي الإنزيمات إلى فصيل من الجزيئات البيولوجية الكبيرة التي تعرف بالبروتينات. ويتألف البروتين من سلسلة واحدة أو أكثر من سلاسل عديد الببتيد polypeptides. وكل عديد ببتيد عبارة عن بوليمر يشيد من تكاثف الأحماض الأمينية التي ترتبط مع بعضها البعض بروابط ببتيدية (روابط أميد). وتسلسل الأحماض الأمينية في عديد ببتيد ما تكون محددة وتعين بواسطة الجين الذي يشفر لعديد الببتيد هذا. وعندما تشيد سلسلة عديد الببتيد فإنها تطوي لتعطي شكل مجسم ثلاثي الأبعاد مميز (أى بنية فراغية مميزة) التي تكون خاصة به. والبنية الفراغية المكيفة تعتمد على تسلسل الأحماض الأمينية في عديد الببتيد وتثبت بواسطة القوى غير التساهمية.

#### ٤-١-٢ الأحماض الأمينية في البروتينات

الأحماض الأمينية الشائعة في البروتينات هي الأحماض الأمينية ألفا  $\alpha$ -amino acids التي لها التركيب التالي عند الرقم الهيدروجيني المتعادل:



وذرة الكربون المركزية في هذا التركيب يشار إليها بذرة الكربون ألفا ( $\text{C}_\alpha$ )، والمجموعة المستبدلة R تعرف بالسلسلة الجانبية للحمض الأميني، وكل حمض أميني يميز بالتركيب الكيميائي للسلسلة الجانبية R. ومن بين الوحدات الكيميائية R التي يمكن

تصنيفها كأحماض أمينية، فإنه يوجد فقط ٢٠ حمضاً أمينياً التي تستخدم كوحدات بنائية لتشبيد البروتينات في كل الكائنات. وتركيب السلاسل الطرفية للأحماض الأمينية إل ٢٠ التي توجد في البروتينات معروضة في شكل ١-٤. وبعض الخواص الفيزيائية لهذه الجزيئات مسجلة في جدول ١-٤. وحيث أن ذرة الكربون ألفا هي مركز غير متماثل (مركز كيرالي chiral center) فإن كل الأحماض الأمينية العشرين (ما عدا جليسين R = H) توجد في صورة متشكلين isomer من نوع الإنانتيومير enantiomers (يساري L ويميني D، كل منهما تكون صورة للمرآة للآخر كعلاقة اليد اليمنى باليد اليسرى). وكل البروتينات التي توجد طبيعياً - ماعدا حالات قليلة - تتألف فقط من المتشكل اليساري L للأحماض الأمينية.

وتتميز الأحماض الأمينية بناءاً على الخواص الكيميائية والفيزيائية لسلاسلها الجانبية، ويمكن وضعها في خمسة أقسام (شكل ١-٤):

- ١- الأحماض الأمينية الأليفاتية aliphatic وتكون فيها المجموعة الجانبية R أليفاتية وغير محبة للماء hydrophobic وتشمل خمس أحماض أمينية.
- ٢- الأحماض الأمينية المحبة للماء hydrophilic وفيها المجموعة الجانبية R تحتوي على مجموعة قطبية أو تحمل شحنة وتشمل ثمانية أحماض أمينية.
- ٣- الأحماض الأمينية المحتوية على كبريت وتشمل إثنين من الأحماض الأمينية.
- ٤- الأحماض الأمينية العطرية aromatic وتشمل أربع أحماض أمينية.
- ٥- الأحماض الأمينية الحلقية غير المتجانسة heterocyclic وتشمل الحمض الأميني بروتين.

وهذه المجموعات الجانبية تحتوي على مدى واسع من المجموعات الفعالة التي تشمل الهيدروكسيل والكربوكسيلات والثيول وعديد من المجموعات القاعدية وغير القطبية. وعندما تتحد في تسلسلات مختلفة، فإن هذه الشبكة من المجموعات تحدد إلى درجة كبيرة البنية الفراغية للبروتين، كما أنها تمنح أنشطة كيميائية واسعة في عمليات الحفز الإنزيمي. دعنا الآن مراجعة الخواص الكيميائية للسلاسل الجانبية التي يمكن أن تشارك



جدول ٤-١ الخواص الفيزيوكيميائية للأحماض الأمينية الطبيعية.

| الحمض الأميني | الرمز المختصر الثلاثي | الرمز المختصر الأحادي | كتلة باقي الحمض في البروتين | التأثيرية للماء | pK <sub>a</sub> للسلاسل الجانبية المتأينة | % الوجود في البروتين | حجم فان دير فالس (R) |
|---------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------------|-----------------|-------------------------------------------|----------------------|----------------------|
| الالانين      | Ala                   | A                     | 71.08                       | +1.8            |                                           | 9.0                  | 67                   |
| أرجينين       | Arg                   | R                     | 156.20                      | -4.5            | 12.5                                      | 4.7                  | 148                  |
| أسباراجين     | Asn                   | N                     | 114.11                      | -3.5            |                                           | 4.4                  | 96                   |
| أسبارتات      | Asp                   | D                     | 115.09                      | -3.5            | 3.9                                       | 5.5                  | 91                   |
| سستئين        | Cys                   | C                     | 103.14                      | +2.5            | 8.4                                       | 2.8                  | 86                   |
| جلوتامات      | Glu                   | E                     | 128.14                      | -3.5            | 4.1                                       | 3.9                  | 109                  |
| جلوتامين      | Gln                   | Q                     | 129.12                      | -3.5            |                                           | 6.2                  | 114                  |
| جليسين        | Gly                   | G                     | 57.06                       | -0.4            |                                           | 7.5                  | 48                   |
| هستيدين       | His                   | H                     | 137.15                      | -3.2            | 6.0                                       | 2.1                  | 118                  |
| إيسوليوسين    | Ile                   | I                     | 113.17                      | +4.5            |                                           | 4.6                  | 124                  |
| ليوسين        | Leu                   | L                     | 113.17                      | +3.8            |                                           | 7.5                  | 124                  |
| لايسين        | Lys                   | K                     | 128.18                      | -3.9            | 10.8                                      | 7.0                  | 135                  |
| ميثونين       | Met                   | M                     | 131.21                      | +1.9            |                                           | 1.7                  | 124                  |
| فينيلالانين   | Phe                   | F                     | 147.18                      | +2.8            |                                           | 3.5                  | 135                  |
| برولين        | Pro                   | P                     | 97.12                       | -1.6            |                                           | 4.6                  | 90                   |
| سيرين         | Ser                   | S                     | 87.08                       | -0.8            |                                           | 7.1                  | 73                   |
| ثريونين       | Thr                   | T                     | 101.11                      | -0.7            |                                           | 6.0                  | 93                   |
| تريبتوفان     | Trp                   | W                     | 186.21                      | -0.9            |                                           | 1.1                  | 163                  |
| تيروسين       | Tyr                   | Y                     | 163.18                      | -1.3            | 10.1                                      | 3.5                  | 141                  |
| فالين         | Val                   | V                     | 99.14                       | +4.2            |                                           | 6.9                  | 105                  |



في التأثيرات المتبادلة للبروتينات مع الجزيئات الأخرى (مثل المواد الخاضعة) والجزيئات الكبيرة.

#### ٤-١-٢ خواص السلاسل الطرفية للأحماض الأمينية

عند تكوين البروتينات، فإن مجموعات  $\text{COO}^-$  و  $\text{NH}_3^+$  المرتبطة بذرة الكربون ألفا ( $\alpha$ ) في الأحماض الأمينية تستخدم في تكوين الروابط الببتيدية، وتركيب الحمض الأميني المتبقي في سلسلة البروتين يشار إليه بباقي الحمض الأميني amino acid residue. ومن ثم فإن الذي يميز الخواص الكيميائية والفيزيائية لحمض أميني عن آخر في البروتين هو هوية السلسلة الجانبية للحمض الأميني. وكما يظهر في شكل ٤-١، فإن السلاسل الجانبية للأحماض الأمينية العشرين التي تدخل في تشييد البروتينات تختلف في تركيبها الكيميائي من الحالات البسيطة مثل الهيدروجين في جليسين إلى أنظمة معقدة ثنائية الحلقات كما في حالة التريبتوفان. وهذه المجموعات الجانبية تحتوي على مدى واسع من المجموعات الفعالة التي تشمل الهيدروكسيل والكربوكسيلات والثيول وعديد من المجموعات القاعدية وغير القطبية. وعندما تتحد في تسلسلات مختلفة، فإن هذه الشبكة من المجموعات تحدد إلى درجة كبيرة البنية الفراغية للبروتين، كما أنها تمنح أنشطة كيميائية واسعة في عمليات الحفز الإنزيمي. دعنا الآن مراجعة الخواص الكيميائية للسلاسل الجانبية التي يمكن أن تشارك في التأثيرات المتبادلة للبروتينات مع الجزيئات الأخرى (مثل المواد الخاضعة) والجزيئات الكبيرة.

#### ٤-٢-١-١ النافرة للماء

بالرجوع إلى شكل ٤-١ نجد أن عدّة أحماض أمينية (الأنين وفالين وليوسين وفينيل ألانين وغيرهم) تتألف أساساً من هيدرات الكربون أو حلقة عطرية غير قطبية نافرة (كارهة) للماء. وعند إذابة هذه الجزيئات النافرة للماء في مذيب قطبي فإنها تتجه للتجمع مع بعضها البعض لتخضع إلى الحد الأدنى مساحة السطح المعرضة للمذيب.

وهذه الظاهرة يطلق عليها التجاذب النافر للماء hydrophobic attraction أو التأثير النافر للماء hydrophobic effect (قسم ٣-٥-٣). إن تنافر الأحماض الأمينية مع الماء توفر قوة دفع كبيرة لطبي البروتين للبنية ثلاثية الأبعاد التي تعزل الأحماض الأمينية غير القطبية في الداخل أو القلب (الجزء المركزي) النافرة للماء للبروتين. أيضاً فإن الأحماض الأمينية النافرة للماء تساعد في تثبيت ارتباط جزيئات المادة الخاضعة غير القطبية في جيب الارتباط في الإنزيم.

تقاس النافرية للماء hydrophobicity للأحماض الأمينية بنزعتها (ميلها) للتجزئة في نظام مذيب مختلط: قطبي- غير قطبي. ولقد إستخدمت متناظرات الأحماض الأمينية في صورة N-أسيتايل إيثايل استر الأحماض لحجب شحنات مجموعة الأمينو ومجموعة الكربوكسيلات. فيذاب متناظر الحمض الأميني في مخلوط 50:50 من الماء ومذيب غير قطبي مثل الهكسان. وبعد عملية الخلط يتم فصل المذيبين القطبي وغير القطبي ويقاس في كل طور تركيز جزيئات متناظر الحمض الأميني. وثابت الاتزان لنقل جزيئات الحمض الأميني من الهكسان إلى الماء تعطي كالتالي:

$$K_{(النقل)} = \frac{[C_{H_2O}]}{[C_{hexane}]} \quad (١-٤)$$

حيث  $[C_{H_2O}]$  و  $[C_{hexane}]$  هما التركيزين المولاريين لجزيئات متناظر الحمض الأميني في الطور المائي وطور الهكسان على التوالي. والطاقة الحرة للنقل يمكن حسابها من قيمة  $K_{(النقل)}$  باستخدام معادلة ٣-٣. وبإجراء هذه التجارب على مذيبات غير قطبية مختلفة، فإننا يمكن أن نضع سلسلة نظامية للكارهية للماء للأحماض الأمينية العشرين. ومسجل في جدول ١-٤ دليل (عوامل) الكارهية للماء للأحماض الأمينية العشرين. وبصورة عامة فإن الأحماض الأمينية النافرة للماء توجد داخل البروتينات المطوية

(الكربونية)، حيث تحجب من قوى التناافر للمذيب القطبي، والأحماض الأمينية القطبية تميل أن توجد على سطح البروتين المطوي المعرض للمذيب القطبي.

#### ٤-٢-١-٢ الارتباط الهيدروجيني

يتم التعبير عن الرابطة الهيدروجينية بـ  $A \cdots H - D$  حيث D ذرة غير متجانسة مانحة للهيدروجين و A ذرة غير متجانسة مستقبلية للهيدروجين. عديد من السلاسل الجانبية للأحماض الأمينية تحتوي على ذرات غير متجانسة التي تعمل كمانحات للهيدروجين في الارتباط الهيدروجيني. وبعض الأحماض الأمينية الأخرى تشارك كمستقبلات للرابطة الهيدروجينية خلال أزواج الإلكترونات غير المرتبطة على الذرات غير المتجانسة في سلاسلها الجانبية. والارتباط الهيدروجيني للسلاسل الجانبية للأحماض الأمينية والمجموعات في العمود الفقري للبتيد يمكن أن تثبت بدرجة كبيرة تركيب البروتين كما سنرى في نهاية هذا الفصل. إضافة إلى ذلك، فإن الروابط الهيدروجينية يمكن أن تتكون بين السلاسل الجانبية للأحماض الأمينية وذرات المتصلات (المواد الخاضعة والنواتج والمثبطات). ويمكن أن تشارك في طاقة التأثيرات الكلية للتأثيرات المتبادلة بين الإنزيم وهذه الجزيئات. وجدول ٤-٢ مسجل فيه المجموعات المانحة والمستقبلية للهيدروجين في الأحماض الأمينية.

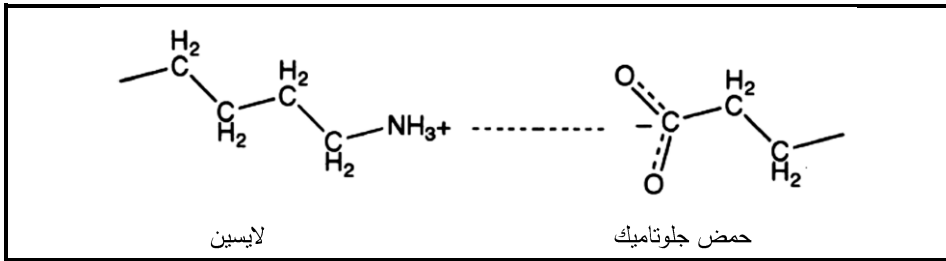
جدول ٤-٢ السلاسل الجانبية في الأحماض الأمينية التي تعمل كمانحات ومستقبلات في الارتباط الهيدروجيني في البروتينات

| السلاسل الجانبية المانحة للهيدروجين في الارتباط الهيدروجيني | الذرات غير المتجانسة في السلاسل الجانبية التي تعمل كمستقبلات في الارتباط الهيدروجيني |
|-------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| تيروزين ( $-O-H$ )                                          | تيروزين ( $-O-H$ )                                                                   |
| سيرين ( $-O-H$ )                                            | جلوتاميك ( $-COO^-$ )                                                                |
| ثريونين ( $-O-H$ )                                          | أسبارتيك ( $-COO^-$ )                                                                |
| تريثوفان ( $-N-H$ )                                         | سيرين ( $-O-H$ )                                                                     |
| هستيدين ( $-N-H$ )                                          | تيروزين ( $-O-H$ )                                                                   |
| سستئين ( $-S-H$ )                                           | هستيدين ( $-S-H$ )                                                                   |
|                                                             | سستئين ( $-S-H$ )                                                                    |
|                                                             | ميثيونين ( $:S:$ )                                                                   |

وبلاحظ أن عدد من الأحماض الأمينية يمكن أن تعمل كمانحات ومستقبلات في الرابطة الهيدروجينية مثال ذلك التيروسين.

#### ٤-٢-١-٣ الجسور الملحية

السلاسل الجانبية لعدة أحماض أمينية في البروتينات تحمل شحنات موجبة (+1) أو سالبة (-1) عند الرقم الهيدروجيني الفسيولوجي: لايسين (+1)، أرجنين (+1)، أسبارتات (-1)، جلوتامات (-1)، وفي بعض الأحيان الهستيدين (+1). ويمكن أن تحدث تأثيرات متبادلة كهربية ساكنة غير تساهمية بين المجموعات سالبة الشحنة والموجبة الشحنة خلال البروتين. وشكل ٤-٢ يوضح تكوين مثل هذا التأثير المتبادل الكهربي الساكن بين السلسلة الجانبية لباقي الحمض الأميني لايسين lysine على أحد سلاسل عديد الببتيد وباقي حمض الجلوتاميك على سلسلة عديد ببتيد أخرى.



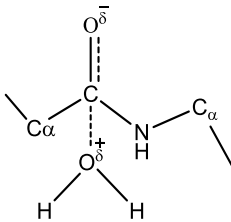
شكل ٤-٢ تكوين الجسر الملحي بين بواقي لايسين وحمض الجلوتاميك عند الـ pH المتعادلة.

ونظراً لأن هذه التأثيرات المتبادلة تماثل التأثيرات المتبادلة الأيونية المسؤولة عن تكوين أملاح الجزيئات الصغيرة، فإنه كثيراً ما يشار إليها بالجسور الملحية salt bridges. والجسور الملحية يمكن أن توجد خلال جزئ فردي بين السلسلة الجانبية لحمض أميني التي تحمل شحنة والمجموعات الأخرى التي تحمل شحنة خلال البروتين، أو توجد بين الجزيئات بين مجموعة حاملة للشحنة في السلسلة الجانبية لحمض في البروتين ومجموعات تحمل شحنات على المتصلة (مثل المادة الخاضعة) أو جزيئات كبيرة أخرى. فعلى سبيل المثال فإن عديد من البروتينات التي ترتبط بالأحماض النووية يرجع ثباتها

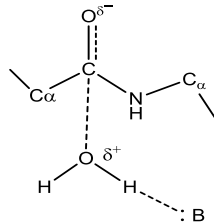
إلى التأثير الكهربائي الساكن بين بواقي الأحماض الأمينية الموجبة (عادة لايسين أو أرجنين) على سطح البروتين ومجموعة الفوسفات سالبة الشحنة في العمود الفقري للحمض النووي.

#### ٣-١-٤ الأحماض الأمينية كـأحماض وقواعد

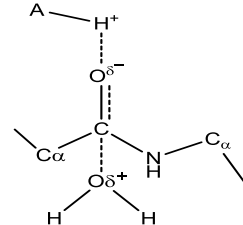
بالرجوع إلى جدول ١-٤ نجد أنه يوجد سبعة أحماض أمينية لها سلاسل جانبية يمكن أن تعمل كأحماض برونستد - لوري وقواعد مرافقة. وهذه الأحماض تشمل ثيروزين، هستيدين، سستئين، لايسين، أرجنين، حمض الأسبارتيك وحمض الجلوتاميك. وقدرة هذه السلاسل الجانبية في المشاركة في كيمياء الحمض - القاعدة توفر للإنزيمات آلية لنقل البروتون من وإلى جزيئات المادة الخاضعة ونتائج التفاعل. بالإضافة إلى نقل البروتون، فإن السلاسل الجانبية للأحماض الأمينية التي تعمل كحمض لويس وقاعدة مرافقة يمكن أن تشارك في التفاعلات المحبة للشحنة الموجبة nucleophilic والمحبة للشحنة السالبة electrophilic الذي يؤدي إلى تفكيك وتكوين الروابط. إن وضع المجموعة الحمضية والقاعدية من السلاسل الجانبية للأحماض الأمينية في مواقع مناسبة خلال الموقع النشط للإنزيم هي آلية شائعة تستخدم بواسطة الإنزيمات لتيسر التفاعلات الكيميائية السريعة مع الجزيئات التي ترتبط بالموقع النشط. فعلى سبيل المثال فإن تحلل الرابطة الببتيدية ورابطة الإستر يمكن أن تحدث خلال المهاجمة المحبة للشحنة الموجبة للببتيد بواسطة الماء.



الحالة الانتقالية  
(غير ثابتة)



تثبيت الحالة الانتقالية بواسطة  
قاعدة B :



تثبيت الحالة الانتقالية بواسطة  
حمض AH

وهذا التفاعل يسير خلال حالة انتقالية التي فيها أكسجين الكربونيل في الببتيد يحمل شحنة جزئية سالبة وأكسجين الماء يحمل شحنة جزئية موجبة. ويمكن تثبيت الحالة الانتقالية هذه بواسطة مجموعة قاعدية أو حمضية:

● إذا وضعنا مجموعة قاعدية (B:) عند موضع مثبت قريب من جزئ الماء، فإنها يمكن أن تثبت هذه الحالة الانتقالية بالانتقال الجزئي لأحد بروتونات الماء إلى القاعدة. وتثبيت الحالة الانتقالية يسمح للتفاعل أن يسير سريعاً.

● البديل عن ذلك، أنه يمكن الوصول إلى نفس الثباتية بوضع مجموعة حمضية (AH) عند موضع ثابت بالقرب من أكسجين الكربونيل، بحيث أن الانتقال الجزئي للبروتون من الحمض للكربونيل سوف يثبت الشحنة السالبة الجزئية على ذرة الأكسجين في الحالة الانتقالية.

وعند فحص المواقع النشطة للإنزيمات التي تحفز شطر الرابطة الببتيدية (وهي مجموعة من الإنزيمات التي تعرف بالإنزيمات المحللة للبروتين proteases)، فإننا نجد عادة مجموعة حمضية أو قاعدية للسلاسل الجانبية للأحماض الأمينية (أو كلاهما) عند موقع مناسب للقيام بهذا النوع من تثبيت الحالة الانتقالية.

في مناقشة الخواص الحمضية والقاعدية للسلاسل الجانبية للأحماض الأمينية فإنه يجب التذكرة أن قيم الـ  $pK_a$  المسجلة في جدول ٤-١ هي لمجموعات السلاسل الجانبية في المحلول المائي. مع ذلك فإن قيم الـ  $pK_a$  في البروتين تتأثر بدرجة كبيرة بالبيئة الموضعية الدقيقة المحيطة بالسلاسل الجانبية للأحماض الأمينية. فعلى سبيل المثال فإن  $pK_a$  للهستيدين في المحلول المائي تكون ٦.٠٤ ، ولكن إنزيم RNase A الذي يحلل RNA لعنصره من النيوكليوتيدات يحتوي على اثنين من بواقي الهستيدين (His 12 و His 119) لهما قيم  $pK_a$  5.4 و 6.04 اللذان يعملان معاً بإنسجام كحفازات أحماض وقواعد عامة. ومن ثم فإن قيم الـ  $pK_a$  في جداول ٤-١ تعطي فقط دلالات عن الأدوار المحتملة لبعض السلاسل الجانبية في التفاعلات الكيميائية.

#### ٤-١-٤ ارتباط الأيونات بالبروتينات

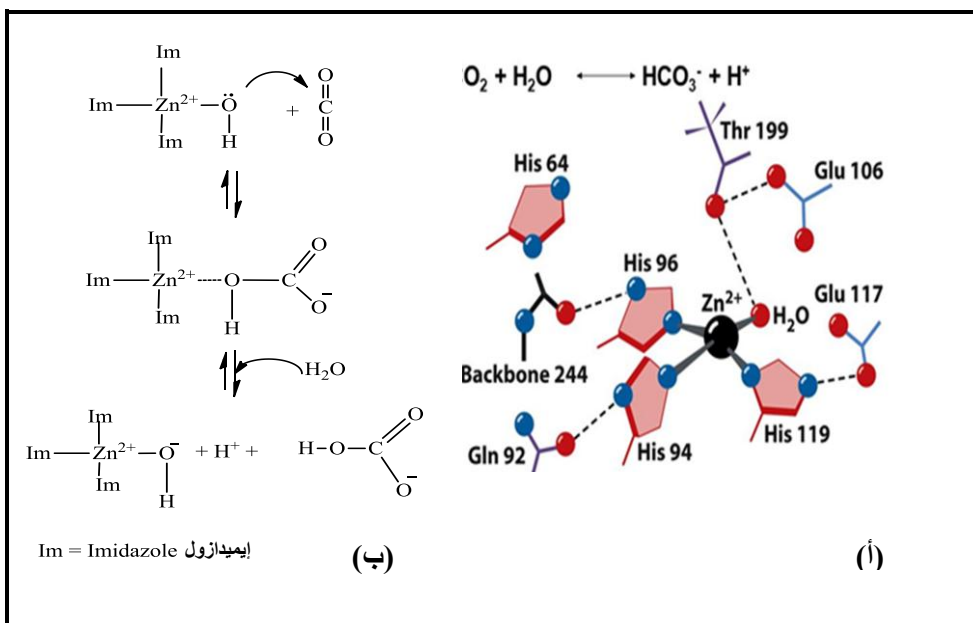
تقريباً ثلثي البروتينات الإنزيمية المعروفة يدمج خلال تركيباتها أيونات ثنائية الشحنة ( $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ) أو أيونات معادن إنتقالية (Fe و Cu و Ni و Co وغيرهم). بالإضافة إلى قيام بعض الأيونات بتثبيت البنية الفراغية ثلاثية الأبعاد للبروتين، فإن عديد من هذه الأيونات تشارك مباشرة في التفاعلات الإنزيمية المحفزة بالإنزيمات بعدة طرق، التي تشمل:

- ١- أيونات المعادن يمكن أن تستخدم كمراكز أكسدة واختزال لعملية الحفز، أمثلة ذلك مراكز الهيم - الحديد، أيونات النحاس والحديد التي لا تكون مرتبطة بالهيم.
- ٢- بعض أيونات المعادن الأخرى يمكن أن تستخدم كمفعالات محبة للشحنة السالبة في الحفز كما في حالة أيونات الزنك في المواقع النشطة لإنزيمات تحلل البروتينات المعدنية metaloproteases.

- ٣- في بعض الحالات يمكن لبعض الأيونات أن تعمل كأحماض لويس.
- ٤- الارتباط بالمواد الخاضعة لتوجيهها في الاتجاه المناسب للتفاعل.
- ٥- يمكن أن تثبت أو تحجب كهربياً الشحنات السالبة.

معظم الأيونات الشائعة ترتبط بالجزء البروتيني للإنزيم بتكوين روابط تناسقية coordinate bonds مع السلاسل الجانبية لبعض الأحماض الأمينية: هستيدين، تيروزين، سستئين، ميثيونين، حمض الأسبارتيك وحمض الجلوتاميك. والسلسلة الجانبية لحلقة الإيميدازول في الهستيدين تمثل بصورة خاصة مركز ارتباط عام للرابطة التناسقية. فبواقى الهستيدين تقريباً ودائماً ما توجد متزاملة مع مراكز ارتباط أيونات المعادن ثنائية الشحنة. فعلى سبيل المثال فإن شكل ٤-٣ يوضح منطقة الارتباط التناسقي للموقع النشط للزنك في إنزيم هيدرة الكربون carbonic anhydrase. فالزنك يكون أربع روابط تناسقية في تنظيم هرم رباعي السطوح حول أيون الزنك. وفي إنزيم هيدرة الكربون، فإن ثلاثة من بين الروابط الأربعة تتكون بين الزنك والسلاسل الجانبية لبواقى الهستيدين في البروتين. وموقع الرابطة التناسقية الرابعة يشغل بواسطة جزئ الماء الذي يشارك مباشرة

في الحفز. وأثناء تقدم التفاعل المحفز إنزيمياً، فإن رابطة الزنك - الماء تشطر وتستبدل مؤقتاً بواسطة رابطة بين المعدن والمادة الخاضعة (ثاني أكسيد الكربون) في التفاعل.



شكل ٣-٤ (أ) الموقع النشط لإنزيم carbonic anhydrase. أيون  $Zn^{2+}$  يرتبط بثلاثة روابط تناسقية بثلاثة مع بواقي الإيميدازول في بواقي الهستيدين His ورابطة مع  $H_2O$ . (ب) أثناء تقدم التفاعل، فإن رابطة  $H_2O - Zn^{2+}$  تشطر وتستبدل مؤقتاً برابطة بين  $CO_2 - Zn^{2+}$  التي تحلل مائياً إلى  $HCO_3^-$  مع إعادة توليد الموقع النشط للإنزيم.

#### ٤-١-٥ تكوين الروابط التساهمية

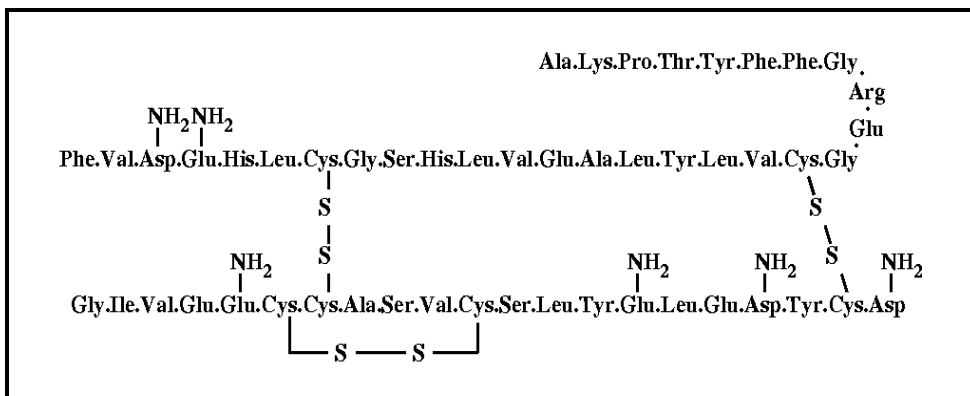
لقد أوضحنا في الأجزاء السابقة أن النشاط الكيميائي لبواقي الأحماض الأمينية في البروتينات تعين بتركيب سلاسلها الجانبية. عديد من الأحماض الأمينية تدخل في تحورات بعد عملية الترجمة (أى تحورات بعد تخليق سلسلة عديد الببتيد على الريبوسوم) التي تغير تركيبها ومن ثم نشاطها وذلك بتكوين روابط تساهمية. في بعض الأحيان تكون التحورات العكسية للسلاسل الجانبية للأحماض الأمينية خطوة مهمة في آلية الحفز



بالإنزيم. وفي الأجزاء التالية سنعرض بعض الأمثلة للروابط التساهمية التي تتكون بواسطة السلاسل الجانبية للأحماض الأمينية في البروتينات.

#### ٤-١-٥-١ الروابط ثنائية الكبريت

إثنين من بواقي السستئين يمكن أن يرتبطا تصاليباً خلال عملية أكسدة وتتكون رابطة كبريت-كبريت (-S-S-) الذي يشار إليه بالرابطة ثنائية الكبريت. وهذه الوصلات المتصالبة يمكن أن تحدث خلال عديد ببتيدي فردي أو تربط بين إثنين من عديد الببتيدي (شكل ٤-٤). وهذه الرابطة المتصالبة ثنائية الكبريت يمكن أن توفر طاقة تثبيت للبنية الفراغية للبروتين. وتوجد أمثلة عديدة من البروتينات التي تستخدم كل من الروابط ثنائية الكبريت خلال سلسلة عديد ببتيدي أو بين سلاسل عديد الببتيدي في الصورة المطوية. والرابطة ثنائية الكبريت يمكن أن تحدث بين باقي السستئين على البروتين ومجموعة سلفهيدريل (-S-H) على جزء صغير مثل المتصلة أو كاشف. وتستخدم الكاشفات في التقدير الكمي لعدد بواقي السستئين الحرة (تلك التي لا تشترك في الروابط ثنائية الكبريت).

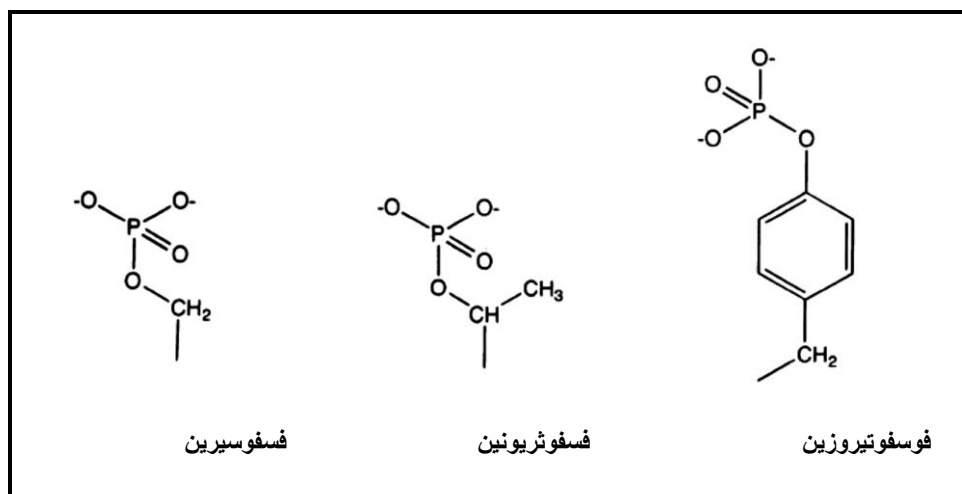


شكل ٤-٤ الروابط ثنائية الكبريت في جزئ أنسولين البقر

#### ٤-١-٥-٢ الفسفرة

السلاسل الجانبية لبعض الأحماض الأمينية يمكن أن تحور تساهمياً بإضافة مجموعة فوسفات من الفوسفات غير العضوية ( $P_i$ ). في الأنظمة البيولوجية فإن عملية الفسفرة لبواقي أحماض أمينية خاصة خلال البروتينات تيسر بواسطة قسم خاص من الإنزيمات تعرف بالكينيز  $kinases$ ، وقسم آخر من الإنزيمات وهي الفوسفاتيز  $phosphatases$  تزيل إنتقائياً مجموعات الفوسفات من هذه الأحماض الأمينية. وهذه العملية العكسية: فسفرة/ إزالة الفسفرة التي تحدث تحت تأثير إشارات هرمونية خاصة لها دور كبير في تنظيم النشاط البيولوجي للإنزيمات.

أكثر المواقع شيوعاً لعملية الفسفرة على البروتينات هي مجموعات الهيدروكسيل في السلاسل الجانبية للسيرين والثريونين، مع ذلك فإن السلاسل الجانبية للثيروزين والهستيدين واللايسين يمكن أن تحور بهذه الطريقة (شكل ٤-٥).



شكل ٤-٥ تركيبات الصور المفسفرة للسيرين والثريونين والثيروزين

يمكن للإنزيمات أن تكون روابط تساهمية مع مجموعات الفوسفات مؤقتاً أثناء سير التحول الحفزي. في هذه الحالات فإنه يتكوّن مركب وسيط من الإنزيم - الفوسفوريل بنقل

مجموعة فوسفات من جزئ المادة الخاضعة أو الفوسفات غير العضوية إلى سلاسل جانبية لأحماض أمينية خاصة خلال الموقع النشط للإنزيم. ومعروف الآن عدة أمثلة من المركبات الوسيطة: إنزيم - فوسفوريل التي تشتمل على فوسفوسيرين وفوسفوهستيدين وكذلك فوسفو أسبارتات.

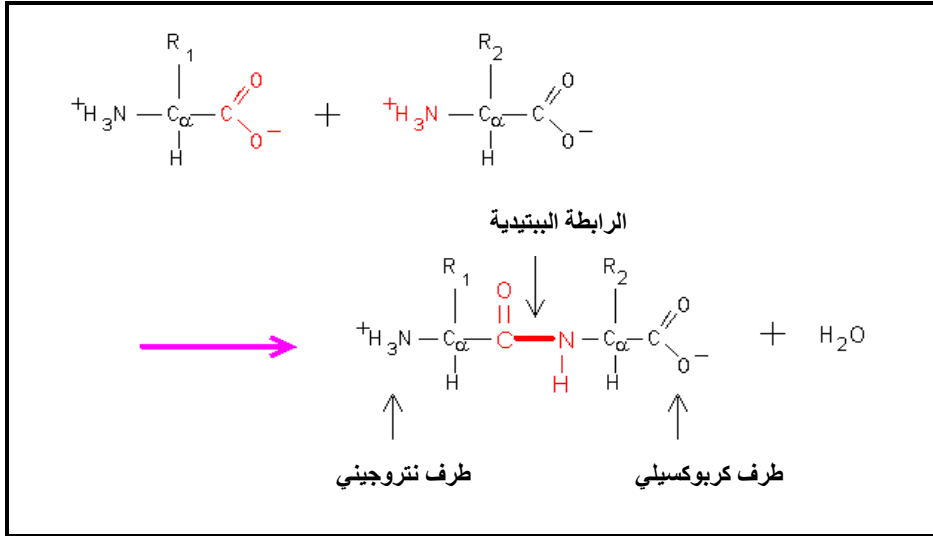
وحيث أن هذه الصور المفسرة للأحماض الأمينية تكون غير ثابتة من ناحية الحركة الحرارية، فإنها تتفكك سريعاً لتحرر الفوسفات غير العضوية.

#### ٤-١-٦ الحجم المجسم للسلاسل الطرفية

بالإضافة إلى النشاط الكيميائي للسلاسل الجانبية الذي سبق مناقشته، فإن الكيمياء المجسمة Stereochemistry للسلاسل الجانبية للأحماض الأمينية تلعب دوراً مهماً في طي البروتين والتأثيرات المتبادلة بين البروتين والمتصلات. وحجم وشكل السلاسل الطرفية يحددان نوع التأثيرات المتبادلة في عملية طي البروتين التي يمكن أن تحدث مع المجموعة المجاورة اعتماداً على أقطار فان ديرفالس. فتعبئة السلاسل الجانبية خلال الموقع النشط لجزئ الإنزيم هي التي تعطي حجم وشكل تجويف (جيب) الارتباط الذي يأوى جزئ المادة الخاضعة، ومن ثم فإن التأثيرات المتبادلة للتعبة تساعد في تحديد تخصص الارتباط لجزيئات المادة الخاضعة والمثبطات عند هذه المواقع. وهذه الخاصية تعتبر سمة حرجية في عملية الخفز.

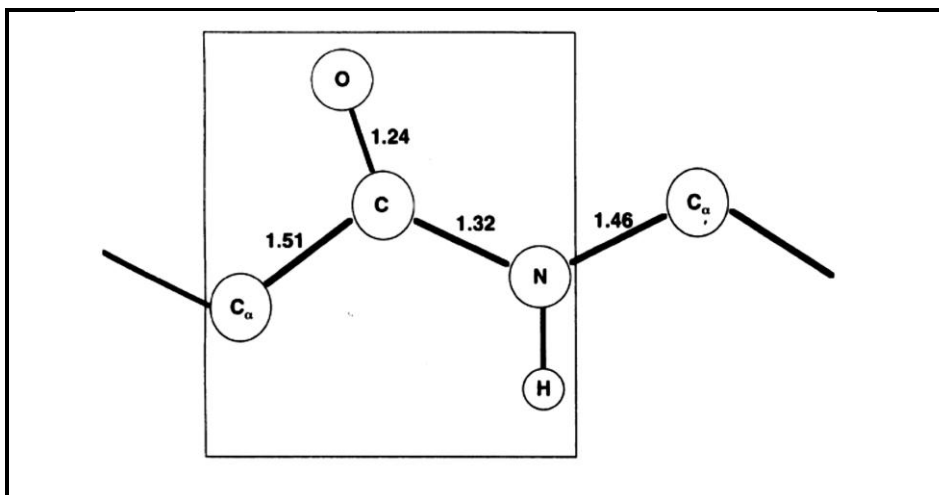
#### ٤-٢ الروابط الببتيدية

إثنين من الأحماض الأمينية يمكن أن يرتبطا مع بعضهما، حيث تتفاعل مجموعة الكربوكسيل في أحد الحمضين مع مجموعة الأمين في الحمض الثاني (بتفاعل تكثيف مع إزالة جزئ ماء) لتتكون رابطة ببتيدية Peptide bond بين الحمضين وناتج هذا التكثيف يشار إليه بببتيد ثنائي dipeptide لأنه يتألف من إثنين من الأحماض الأمينية.



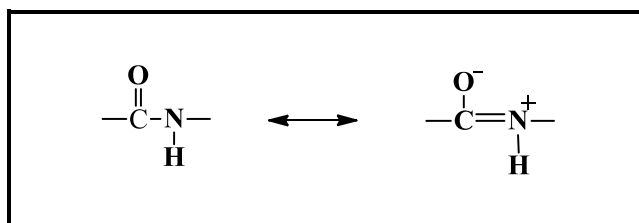
وحمض أميني ثالث يمكن أن يتكثف مع الببتيد الثنائي هذا وينتج ببتيد ثلاثي tripeptide وهكذا. وبهذه الطريقة فإن سلاسل من الأحماض الأمينية يمكن أن ترتبط مع بعضها لتكون عديد وحدات (بوليمر) خطي هو عديد الببتيد polypeptide. وجزيئات البروتين تتألف من واحد أو أكثر من سلاسل عديد الببتيد.

أوضحت الدراسات التي أجريت على الببتيدات الثنائية والثلاثية أن طول الرابطة بين الكربون والأكسجين كانت أطول (1.24Å) عن المتوقع للرابطة المزدوجة C = O (1.22Å) ورابطة الكربون النيتروجين كانت أقصر (1.32Å) عن المتوقع للرابطة الفردية C - N (1.45Å) في الرابطة الببتيدية (شكل ٤-٦). وهذه القيم هي وسط بين تلك المتوقعة للروابط المزدوجة والفردية.



شكل ٦-٤ أطوال الروابط النموذجية في وحدة الببتيد بوحدات الإنجستروم. في الرابطة الببتيدية بين إثنين من الأحماض الأمينية، فإن ستة ذرات ( $C_{\alpha}$ , H, N, O, C,  $C_{\alpha}$ ) تقع في مستوى واحد.

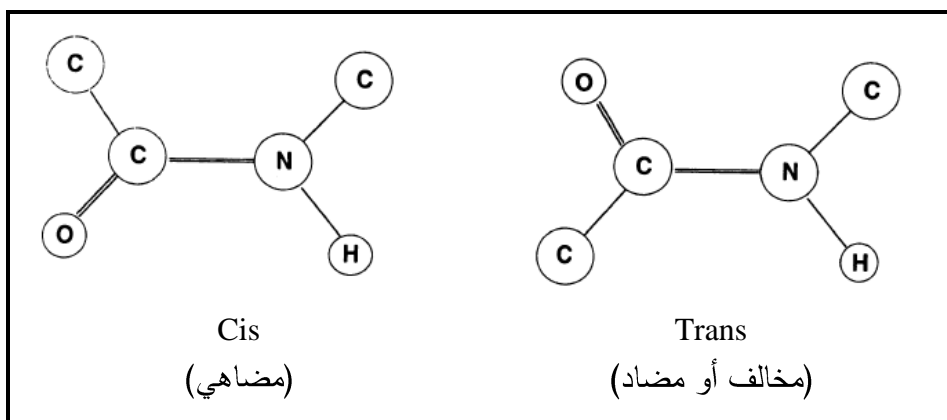
وهذه النتائج أودت بالكيميائي لينس بولنج باقتراح إثنين من التركيبات الرنينية للرابطة الببتيدية (شكل ٧-٤)، أحدهما تكون فيه الرابطة المزدوجة بين الكربون والأكسجين والأخرى تكون فيه الرابطة المزدوجة بين الكربون والنيتروجين وفيها يحمل الأكسجين شحنة سالبة والنيتروجين يحمل شحنة موجبة. ومن ثم فإن النظام باي ( $\pi$ ) يتوزع على الذرات الثلاث O - C - N. وإعتماداً على أطوال الروابط فقد استنتج أن الرابطة الببتيدية تحتوي على 60% من خصائص الرابطة C=O و 40% من خصائص الرابطة C=N:



شكل ٧-٤ التركيبات الرنينية للرابطة الببتيدية

إن الـ 40% لخصائص الرابطة المزدوجة خلال محور الرابطة  $C - N$  يؤدي إلى تثبيت بطاقة الرنين بما مقداره 20 kcal/mol للرابطة الببتيدية. وهذا أيضاً يقيد الدوران حول محور هذه الرابطة. ومن ثم فإن الذرات الستة في وحدة الببتيد: ذرة الكربون ألفا  $C_\alpha$  ومجموعة  $CO$  من الحمض الأميني الأول ومجموعة  $NH$  وذرة الكربون ألفا  $C_\alpha$  من الحمض الأميني الثاني تقع في نفس المستوى، أى أن الرابطة الببتيدية تكون مستوية (شكل ٤-٦). إن إستواء الوحدة الببتيدية يقيد البنية الفراغية لسلسلة عديد الببتيد التي يمكن أن تأخذها. أيضاً فإن الاستواء يسمح بتكوين إثنين من المتشكلات الفراغية الهندسية للرابطة الببتيدية: المتشكل المخالف (المضاد)  $trans$  تكون فيه ذرتي الكربون ألفا في جانبيين متضادين بالنسبة للرابطة  $C - N$ . وفي المتشكل المضاهاي  $cis$  تكون هاتين الذرتين على نفس الجانب بالنسبة لمحور الرابطة  $C-N$  (شكل ٤-٨).

ومعظم الروابط الببتيدية في البروتينات تكون دائماً في حالة المخالف. وهذا التفضيل للمخالف مقابل المضاهاي يرجع إلى إصطدام المجموعات الجانبية للأحماض الأمينية التي ترتبط بالذرات ألفا الذي يمنع تكوين المضاهاي ولكنه لا يحدث في المتشكل الفراغي المضاد.



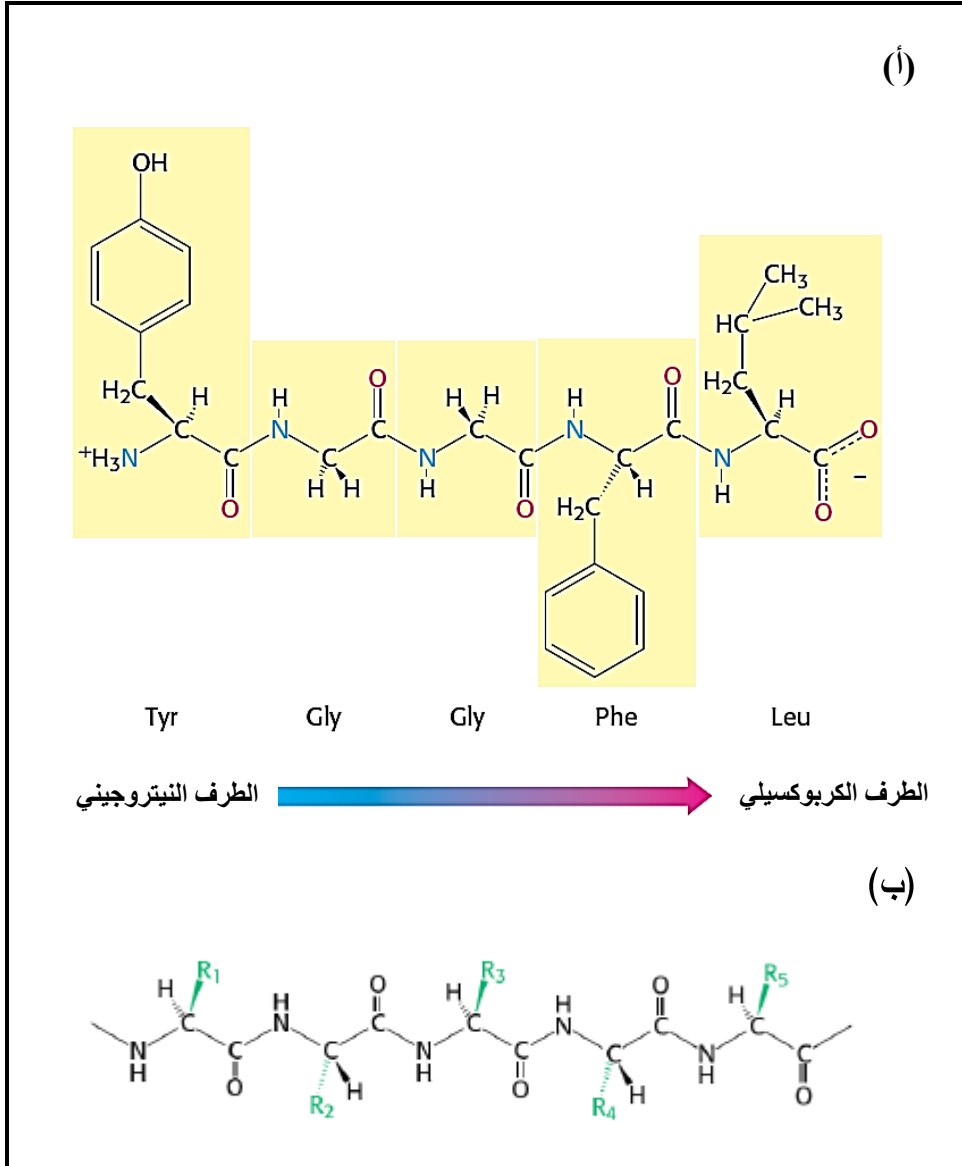
شكل ٤-٨ التشكيلات الفراغية المضاهاي والمضاد في الرابطة الببتيدية

إستثناءً من هذه القاعدة العامة وجدت في الروابط الببتيدية للبرولين. وهنا فإن الفرق في الطاقة بين المتشكلين المضاهي والمضاد تكون صغيرة جداً ( $\approx 2 \text{ kcal/mol}$ )، وبذلك فإن المتشكل المضاهي يمكن أن يوجد بدون تغير محسوس في ثبات البروتين. مع ذلك، فإن عدداً محدوداً جداً من الروابط المضاهي للبرولين وجدت في الطبيعة.

#### ٣-٤ التركيب الأولي للبروتين: تتابع الأحماض الأمينية

إن تركيب ونشاط بروتين ما يحدد بهوية الأحماض الأمينية التي تشيد منها سلسلة عديد الببتيد وبالترتيب الذي تنظم به في السلسلة. وهوية وترتيب الأحماض الأمينية يشار إليه بتتابع (تعاقب أو تسلسل) الأحماض الأمينية amino acid sequence أو التركيب الأولي primary structure للبروتين. تذكر أنه يمكن ربط الأحماض الأمينية خلال تفاعلات التكثيف لتكوين سلاسل عديد الببتيد. ولمعظم الأحماض الأمينية في السلسلة فإن التكثيف يؤدي إلى فقد مجموعات الأمينو والكربوكسيلات. ومهما يكون عدد تفاعلات التكثيف وطول السلسلة، فإن عديد الببتيد النهائي سوف يحتفظ بمجموعة أمينو مشحونة عند أحد النهايات ومجموعة كربوكسيلات مشحونة عند النهاية الأخرى. وعادة ما يشار إلى هاتين النهايتين بالطرف (النهاية). الأميني amino terminus (أو الطرف النيتروجيني N-terminus) والطرف الكربوكسيلي carboxy terminus (أو الطرف الكربوني C-terminus) على التوالي.

والأحماض الأمينية الفردية في البروتين تميز عددياً بترتيب متعاقب، ولقد اتفق على أن يتم ترقيم تتابع الأحماض الأمينية في سلسلة عديد الببتيد بداية من الطرف الأميني الذي يأخذ الرقم واحد، ويستمر الترقيم تصاعدياً حتى ينتهي عند الحمض الأميني في الطرف الكربوكسيلي (شكل ٤-٩). ومن ثم فإننا عندما نقرأ في الأدبيات المنشورة الحمض الأميني هستيدين 64 (His 64)، فإنها تعني أن الحمض الأميني رقم 64 من الطرف الأميني في سلسلة عديد الببتيد لهذا البروتين هو الهستيدين. تتألف سلسلة عديد الببتيد من أجزاء منتظمة مكررة يطلق عليها السلسلة الأساسية main chain أو العمود



شكل ٩-٤ (أ) ببتيد خماسي يتألف من ٥ أحماض أمينية Tyr – Gly – Gly – Phe – Leu يوضح التسلسل من الطرف الأميني إلى الطرف الكربوكسيلي. (ب) تتألف سلسلة عديد الببتيد من عمود فقري ثابت الذي يتألف من الذرات التي تشارك في الروابط الببتيدية. ومجموعات R متغيرة التي تعبّر عن بواقي الأحماض الأمينية.



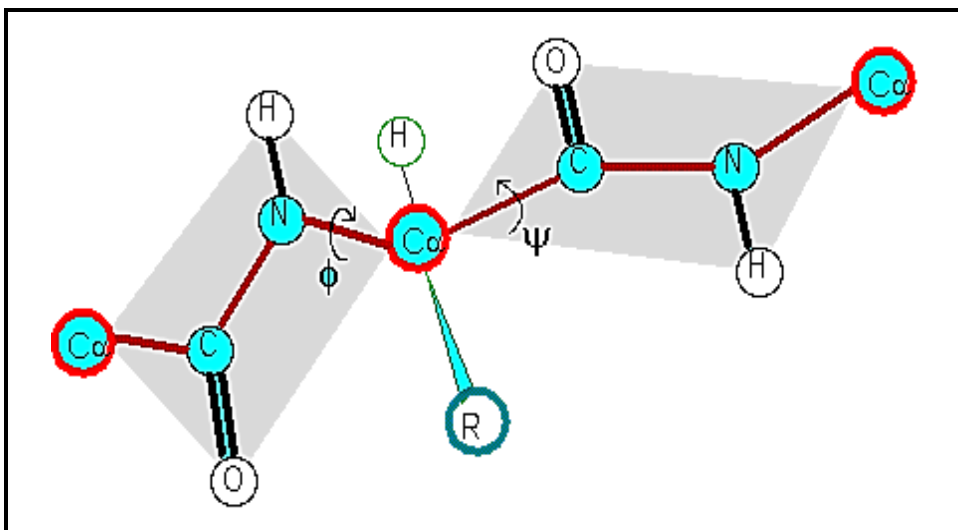
الفكري backbone وجزء متغير يتضمن السلاسل الجانبية المميزة للأحماض الأمينية (شكل ٤-٩). والعمود الفقري لعدد الببتيد غني بمجموعات  $C=O$  و  $NH$  اللذان يعملان كمستقبلات ومانحات للهيدروجين على التوالي في الارتباط الهيدروجيني. ومعظم سلاسل عديد الببتيد تحتوي ما بين 50, 2000 حمض أميني التي تعطي كتلة جزيئية بين 5500 و 220,000 دالتون، ومن الشائع الإشارة إليها بالبروتينات.

والحقيقة البازغة هو أن كل بروتين يحتوي على تسلسل فريد دقيق ومحدد من الأحماض الأمينية الذي يعين وراثياً. ومعرفة تسلسل الأحماض الأمينية في البروتينات المختلفة يكون مهماً للأسباب التالية:

- تتابع الأحماض الأمينية يحدد التركيب ثلاثي الأبعاد للبروتينات.
- يكون ضرورياً لفهم آلية عمل البروتين مثل آلية الحفز الإنزيمي.
- تعيين التتابع يعتبر جزءاً مهماً في علم الأمراض الجزيئي. فتغيير حمض أميني واحد يمكن أن يؤدي إلى وظيفة غير طبيعية أو مرض مثل أنيميا الخلايا المنجلية في الإنسان.
- يمكن بواسطة الطفرات موجه الموقع تغيير حمض أميني واحد في الإنزيم بحمض أميني آخر للتعرف على أهميته في الحفز الإنزيمي أو تغيير النشاط الإنزيمي.

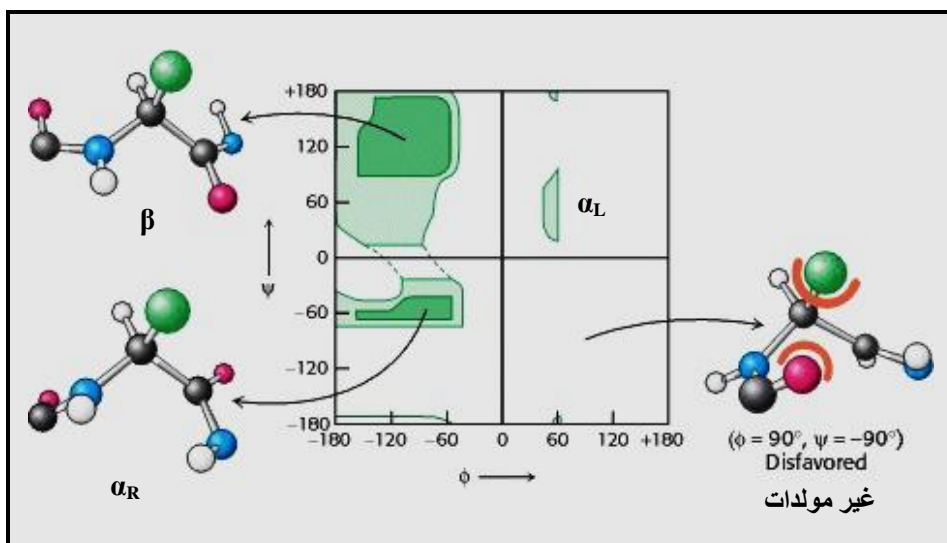
#### ٤-٤ التركيب الثانوي

بالمقارنة بالرابطة الببتيدية  $C - N$  التي ليس لها حرية دوران نتيجة لإحتوائها على خصائص الرابطة باي  $(\pi)$ ، فإن الدوران يكون ممكناً حول محور الرابطتين  $N - C_{\alpha}$  و  $C_{\alpha} - C'$  (حيث  $C'$  تعبر عن كربون مجموعة الكرونيل لباقي الحمض الأميني). وحرية الدوران حول هاتين الرابطتين لكل حمض أميني يسمح للبروتينات أن تطوي بطرق مختلفة. والزوايا ثنائية الأسطح dihedral angle للدوران حول الرابطة  $N - C_{\alpha}$  والرابطة  $C_{\alpha} - C'$  يرمز لها ب  $\phi$  (فاي phi) و  $\psi$  (بساي psi) على التوالي (شكل ٤-١٠).



شكل ١٠-٤ الدوران حول الروابط في عديد الببتيد: تركيب كل حمض أميني في عديد الببتيد يمكن أن ينظم بالدوران حول إثنين من الروابط الفردية: فاي ( $\phi$ ) هي زاوية الدوران بين النيتروجين وذرة الكربون ألفا ( $\alpha$ )، بينما بساي ( $\psi$ ) هي زاوية الدوران حول الرابطة بين ذرة الكربون ألفا وذرة كربون الكربونيل.

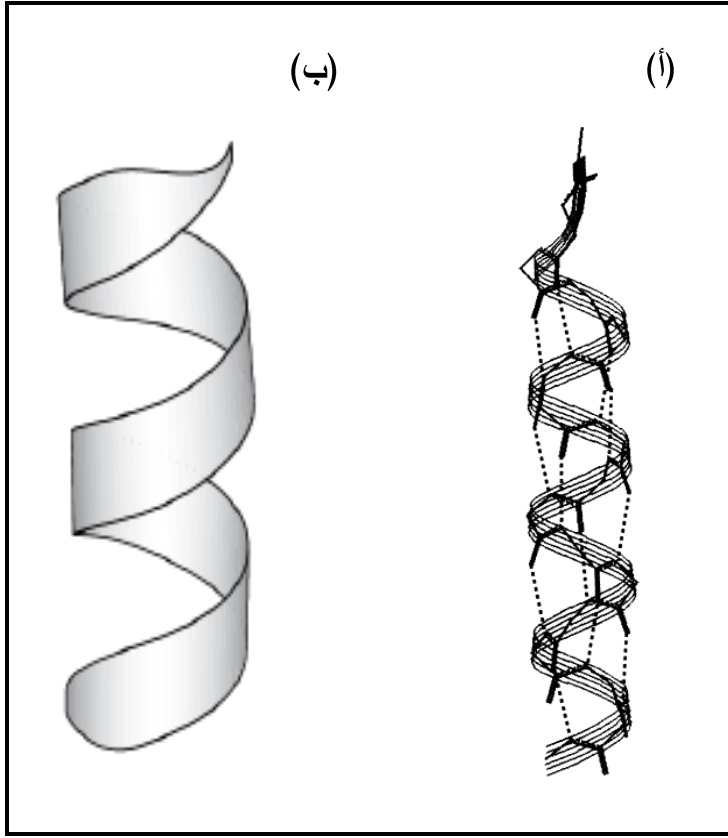
هل كل الإتحادات من  $\phi$  و  $\psi$  ممكنة ؟ الدراسات التي أجريت على التركيبات البلورية للبروتينات أوضحت وجود بعض الإتحادات من  $\phi$  و  $\psi$  التي تتكرر كثيراً. ولعديد من الأحماض الأمينية ما عدا جليسين فإن رسم الزوايا  $\phi$  و  $\psi$  المشاهدة يبدو كما في شكل ١١-٤. وهذا النوع يعرف بالرسم البياني ل راماشندران Ramachandran plot، وهو العالم الأول الذي قام بقياس هذه الزوايا ورسمها. والسمة الظاهرة في شكل ١١-٤ هو أن قيم  $\phi$  و  $\psi$  تميل للتجمع حول زوجين من الزوايا. والمناطق ذوات التردد العالي تقابل الزوايا المصاحبة للتركيبات المنتظمة المتكررة خلال البروتينات: الحلزون ألفا يميني الدوران  $\alpha$  helix right-handed والصفائح بيتا الممتدة  $\beta$ -plated sheet. وكلا التركيبين هما مثالين للتركيب الثانوي secondary structure للبروتين، وهي السمة العامة للبنية الفراغية conformation ككل لأي بروتين.



شكل ١١-٤ مخطط راما شندران يوضح قيم الزاوي  $\phi$  و  $\psi$ . ليست كل قيم  $\phi$  و  $\psi$  ممكنة نتيجة لتصادم الذرات. المناطق الأكثر مواتية هي المعلمة بالأخضر:  $\alpha_R$  تشير إلى الحلزون ألفا اليميني،  $\beta$  تشير إلى الصفائح بيتا المعتمدة، و  $\alpha_L$  تشير إلى الحلزون ألفا اليساري (وهو نادر) والتركيب على اليمين غير ممكن بسبب تصادم الذرات في الفضاء.

#### ٤-٤-١ الحلزون ألفا اليميني الدوران

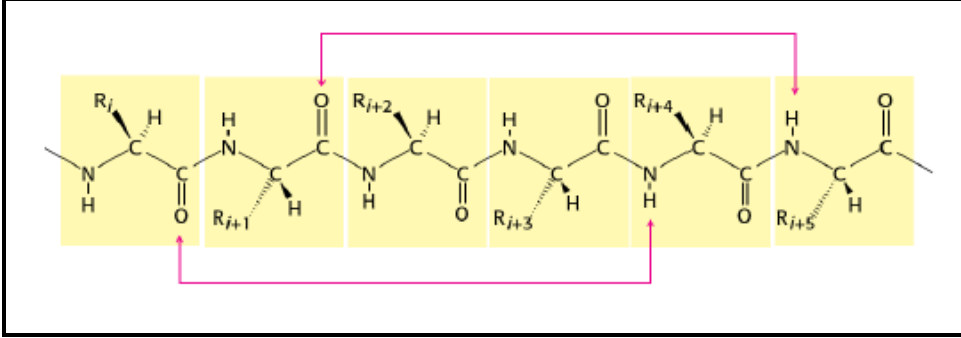
الحلزون ألفا ( $\alpha$ ) يميني الدوران ( $\alpha_R$ ) هو الأكثر شيوعاً في التركيب الثانوي للبروتين (شكل ٤-١٢). ولقد اقترح هذا التركيب أولاً بواسطة بولنج وكوري على أساس الخواص المجسمة (الفراغية) لعدد الببتيدات. والحلزون ألفا هو تركيب شبه عصوي حيث تلتف السلسلة حول محور الحلزون وتشكل سلسلة عديد الببتيد الرئيسية (العمود الفقري) الجزء الداخلي بينما تمتد المجموعات الجانبية لبواقي الأحماض الأمينية بعيداً عن محور الحلزون، ومن ثم تخفض إلى الحد الأدنى الاكتظاظ (التراحم) الجسم. وكل دورة في الحلزون ألفا تحتوي على 3.6 بواقي أحماض أمينية مع طول  $1.5 \text{ \AA}$  لكل باقي حمض أميني أو  $5.4 \text{ \AA}$  لكل دورة.



شكل ٤-١٢ (أ) الحلزون ألفا يميني الدوران ( $\alpha_R$ )، (ب) التصوير البياني للحلزون ألفا اليميني في البروتينات.

ويثبت تركيب الحلزون ألفا بواسطة شبكة من الروابط الهيدروجينية بين مجموعة الكربونيل CO في أحد بواقي الأحماض الأمينية (i) وبروتون NH في باقي الحمض الأميني (i+4). ومن ثم فإن مجموعات CO و NH في السلسلة الرئيسية (العمود الفقري) ترتبط بالروابط الهيدروجينية (شكل ٤-١٣). وشبكة الروابط الهيدروجينية هذه تكون ممكنة نظراً لتنظيم مجموعات CO, NH عبر محور الحلزون (شكل ٤-٩). والروابط الببتيدية الفردية تتراص خلال تركيب الحلزون ألفا الذي يؤدي إلى نشوء عزم ثنائي القطب إجمالي مصاحب للحلزون وهذا أيضاً يضيف بعض الثباتية للتركيب. وفي

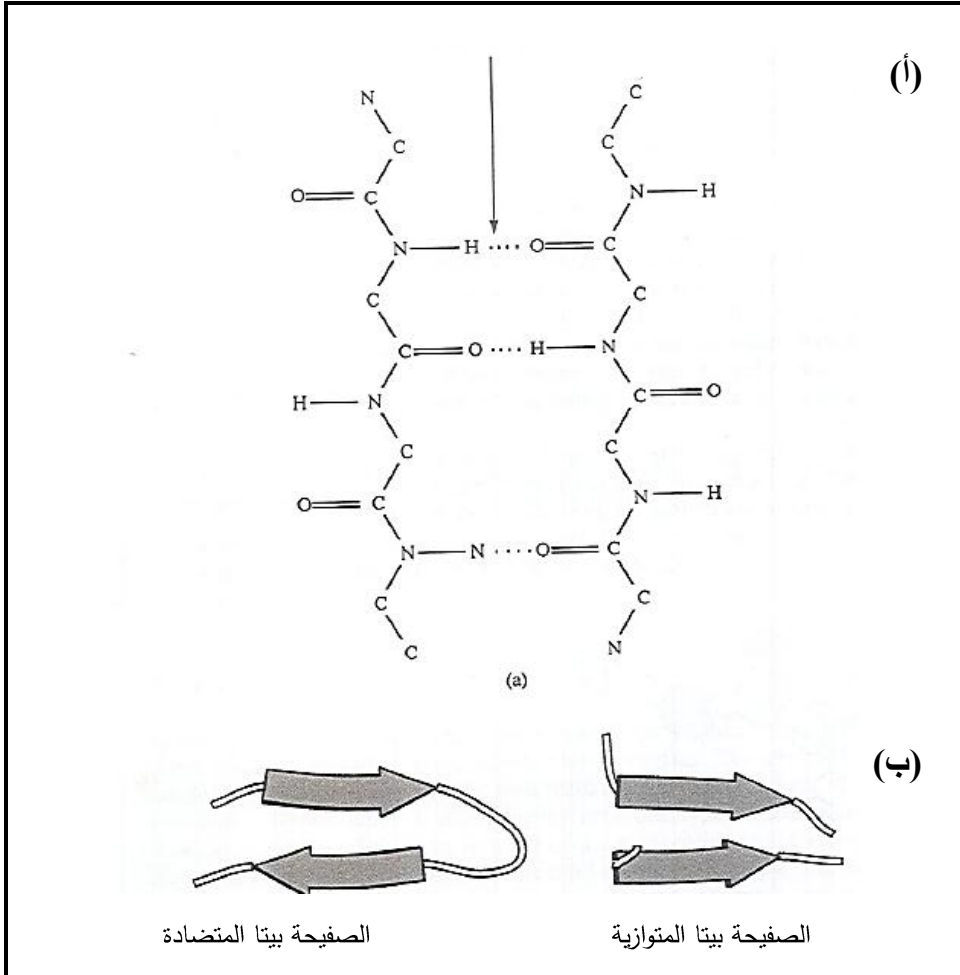
مخططات الرسوم البيانية فإن الحلزون ألفا اليميني ( $\alpha_R$ ) يتم التعبير عنه بشريط حلزون في اتجاه الطرق الكربوكسيلي للإشارة إلى اتجاه الحلزون.



شكل ٤-١٣ الروابط الهيدروجينية في الحلزون ألفا. في الحلزون ألفا فإن مجموعة CO في باقي الحمض الأميني (i) تكون رابطة هيدروجينية مع مجموعة NH لباقي الحمض الأميني (i+4).

#### ٤-٢ الصفائح بيتا الممتدة

الصفائح بيتا الممتدة (أو ببساطة الصفائح بيتا  $\beta$ -sheet) هي تركيب ثانوي شائع في البروتينات، وتتألف من سلاسل عديدة ببتيد ممتدة كلية التي ترتبط مع بعضها بواسطة روابط هيدروجينية بين السلاسل المتجاورة للصفحة. والصفحة بيتا يمكن أن تتكون من سلسلتين أو أكثر. دعنا نركز اهتمامنا على الصفحة بيتا التي تتألف من سلسلتين عديدة ببتيد (شكل ٤-١٤ أ): إن سلسلتي عديد الببتيد يمكن أن يأتيان من سلسلتين عديدة ببتيد مميزتين (الصفحة بيتا بين سلسلتين منفصلتين  $\beta$ -sheet interchain)، أو من منطقتين من نفس سلسلة عديد الببتيد (الصفحة بيتا خلال السلسلة  $\beta$ -sheet intrachain)، وكلا النوعين يوجدان في البروتينات الطبيعية.



شكل ٤-١٤ الصفائح بيتا الممتدة (أ) جزء من الصفحة بيتا الممتدة مضادة التوازي التي تتألف من سلسلتين عديد ببتيد اللذان يرتبطان مع بعضهما بواسطة روابط هيدروجينية بين السلسلتين (ب) مخطط يوضح اتجاه السلسلتين في الصفحة بيتا المتوازية والمتضادة (اتجاه السهم يتحرك في اتجاه النهاية الكربوكسيلية لسلسلة عديد الببتيد)

وسلسلتي عديد الببتيد المتجاورة في الصفحة بيتا يمكن أن يسيران في نفس الاتجاه ولنقل من النهاية الكربونية إلى النهاية النيتروجينية. والبديل عن ذلك أن السلسلتين يمكن أن يسيران في إتجاه معاكس بالنسبة لوضع النهاية النيتروجينية والنهاية الكربونية. وهاتين

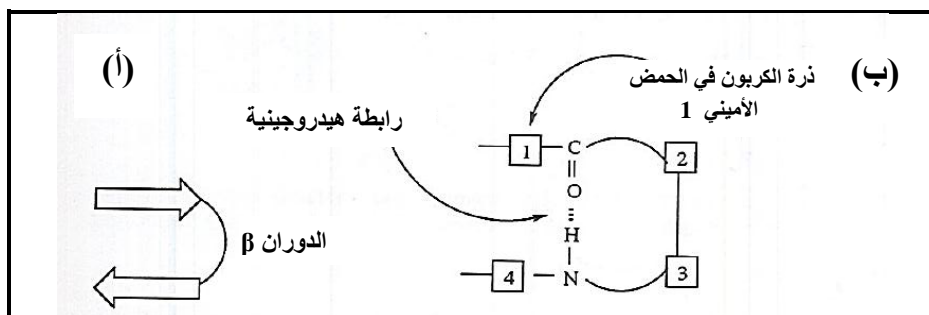
الصورتين يصفان تركيبين يشار إليهما بالصفائح بيتا المتوازية Parallel  $\beta$ -sheets والصفائح بيتا مضادة التوازي antiparallel  $\beta$ -sheet على التوالي. ومرة أخرى فإن كلا النوعين يوجدان في البروتينات الطبيعية. وفي مخططات الرسوم البيانية، فإن السلاسل بيتا عادة ما يتم تصويرها في صورة أسهم عريضة في اتجاه الطرف الكربوكسيلي للإشارة إلى نوع الشريحة بيتا المتكونة - متوازية أو مضادة التوازي. وشكل ٤-١٤ أ يعرض الارتباط الهيدروجيني في الشريحة بيتا مضادة التوازي، بينما شكل ٤-١٤ ب يعرض اتجاه سلاسل عديد الببتيد في شرائح بيتا المتوازية ومضادة التوازي.

#### ٤-٣ الدوران بيتا

النوع الثالث من التركيب الثانوي الشائع الذي يوجد في البروتينات الطبيعية هو الدوران بيتا  $\beta$ -turn (يعرف أيضاً بالدوران العكسي، دوران دبوس الشعر أو الانثناء بيتا). والدورانات بيتا هي أجزاء صغيرة في سلسلة عديد الببتيد التي تسمح بتغيير اتجاه السلسلة - بمعنى أنها تنتهي على نفسها. والدوران بيتا يتألف من أربع بواقي أحماض أمينية وبنية مدمجة التي فيها تتكون رابطة هيدروجينية بين الحمض الأول والرابع لتثبيت التركيب (شكل ٤-١٥).

وفي حالات أخرى، فإن تركيبات أكثر تعقيداً تكون مسئولة عن عكس اتجاه السلاسل. هذه التركيبات تعرف بالعقد loops، وفي بعض الأحيان بالعقد أوميغا Omega loops للتعبير عن شكلها العام. وبالرغم من أن الدورانات بيتا تمثل أجزاء صغيرة من سلسلة عديد الببتيد، فإنها توجد كثيراً في البروتين التي تحيز للجزئ أن يتكيف في تركيب ثلاثي الأبعاد مدمج. دعنا على سبيل المثال ننظر إلى صفحة بيتا مضادة التوازي خلال سلسلة عديد ببتيد فردية. فجلب خيطي الصفحة في اتساق مناسب لتكوين الروابط الهيدروجينية الصحيحة، فإن سلسلة عديد الببتيد يجب أن تغير الاتجاه بـ  $180^\circ$  وهذا يمكن إنجازه بوجود نوع الدوران بيتا في سلسلة عديد الببتيد بين الجزئين اللذان يؤلفان الصفحة بيتا. ومن ثم فإن الدورانات بيتا تلعب دوراً مهماً في تثبيت التركيب ثلاثي

الأبعاد الكلي للبروتين. إضافة إلى ذلك، فإن الدوران بيتا والعقد تقع على أسطح البروتينات، ومن ثم فإنها كثيراً ما تشارك في التأثيرات المتبادلة بين البروتينات والجزيئات الأخرى مثل التأثير المتبادل بين الإنزيمات والمواد الخاضعة والمثبطات.



شكل ٤-١٥ (أ) الدوران بيتا  $\beta$ -turn كثيراً ما يوجد بين اثنين من قطاعات (مدى) من السلاسل بيتا مضادة التوازي (ب) الدورانات بيتا تثبت جزئياً بواسطة رابطة هيدروجينية بين مجموعة  $C=O$  في باقي الحمض الأميني 1 ومجموعة  $NH$  في باقي الحمض الأميني 4.

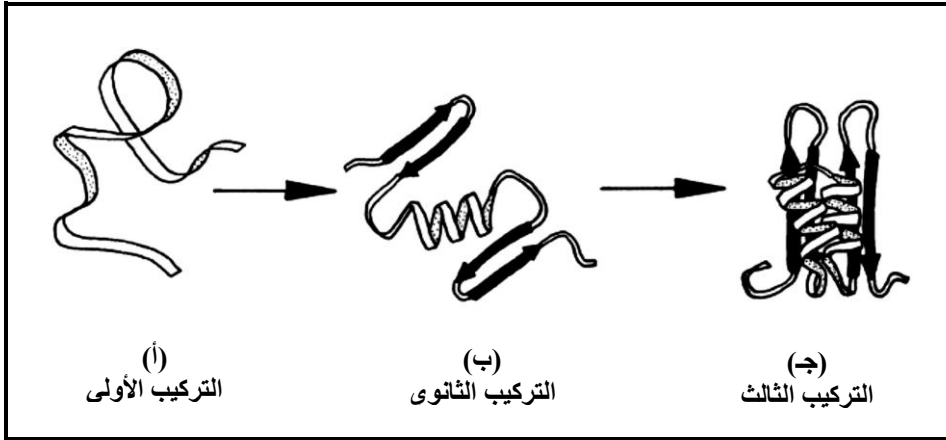
معظم البروتينات تحتوي على مناطق لها تركيبات ثانوية جيدة التحديد ينتشر خلالها تركيب غير منتظم غير مكرر في بنية فراغية من الشائع الإشارة إليها بتركيب السلسلة العشوائية random coil. هذه المناطق توفر مرونة فعالة للبروتين التي تسمح له بتغيير الشكل أو البنية الفراغية. وهذه التركيبات المترددة (المتقلبة) تلعب دوراً مهماً في تيسير النشاط البيولوجي للبروتينات بصورة عامة. وتكون هامة بصورة خاصة في دورة ارتباط المادة الخاضعة، التحول الحفزي وتحرير الناتج المطلوب لنشاط الإنزيمات.

#### ٤-٥ التركيب الثالث

إن مصطلح التركيب الثالث tertiary structure يشير إلى تنظيم عناصر التركيب الثانوي والتأثيرات المتبادلة بين السلاسل الجانبية لبقايا الأحماض الأمينية التي تعين التركيب ثلاثي الأبعاد للبروتين المطوي folded protein. تخيل بروتين مشيد حديثاً



يوجد في الطبيعة كسلسلة عديد ببتيد ممتدة كلية- ومن ثم يقال أنه غير مطوي unfolded (شكل ١٦-٤ أ). والآن افترض أن هذا البروتين وضع تحت مجموعة من الظروف التي تؤدي إلى تكوين عناصر التركيب الثانوي عند مواقع مناسبة عبر سلسلة عديد الببتيد (شكل ١٦-٤ ب) بعد ذلك، فإن العناصر الفردية للتركيبات الثانوية تنظم نفسها في الحيز ثلاثي الأبعاد بحيث يحدث تماس بين السلاسل الجانبية للأحماض الأمينية وبين مجموعات العمود الفقري (١٦-٤ ج). والتركيب المطوي الناتج للبروتين يشار إليه بالتركيب الثالث للبروتين.



شكل ١٦-٤ طى سلسلة عديد الببتيد يشرح مستويات (مرتبات) تركيب البروتين من التركيب الأولي (أ) أو تتابع الأحماض الأمينية خلال التركيب الثانوي (ب) والتركيب الثالث (ج)..

ما تم وصفه هو بالضبط عملية طي البروتين protein folding الذي يحدث طبيعياً في الخلايا عند تصنيع البروتينات الجديدة على الريبوسومات. وهذه العملية جديرة بالملاحظة لأنه تحت مجموعة من الظروف الصحيحة سوف تتجز هذه العملية خارج الخلية في أنبوبة الاختبار in vitro. فعلى سبيل المثال، فإنه عند التركيز العالي من الكيماويات مثل اليوريا سوف تجعل البروتين يأخذ البنية الفراغية غير المطوية. وفي كثير من الحالات، فإن الإزالة اللاحقة لهذه الكيماويات (بالفرز الغشائي dialysis أو

الفترة بالجيل أو التخفيف) تحدث إعادة طي البروتين تلقائياً إلى البنية الفراغية الطبيعية الصحيحة (أي الحالة المطوية التي تحدث طبيعياً في الخلايا التي تيسر النشاط البيولوجي للبروتين). إن القدرة على إجراء هذه التجارب في المعمل يشير إلى أن كل المعلومات المطلوبة لطي البروتين إلى تركيبة الثانوي وتركيبه الثالث تكون مشفرة خلال تتابع الأحماض الأمينية في ذلك البروتين. والدراسات التي أجريت على بروتينات عديدة أكدت عمومية هذه القاعدة التي تمثل أحد المبادئ الأساسية في البيولوجيا الجزيئية:

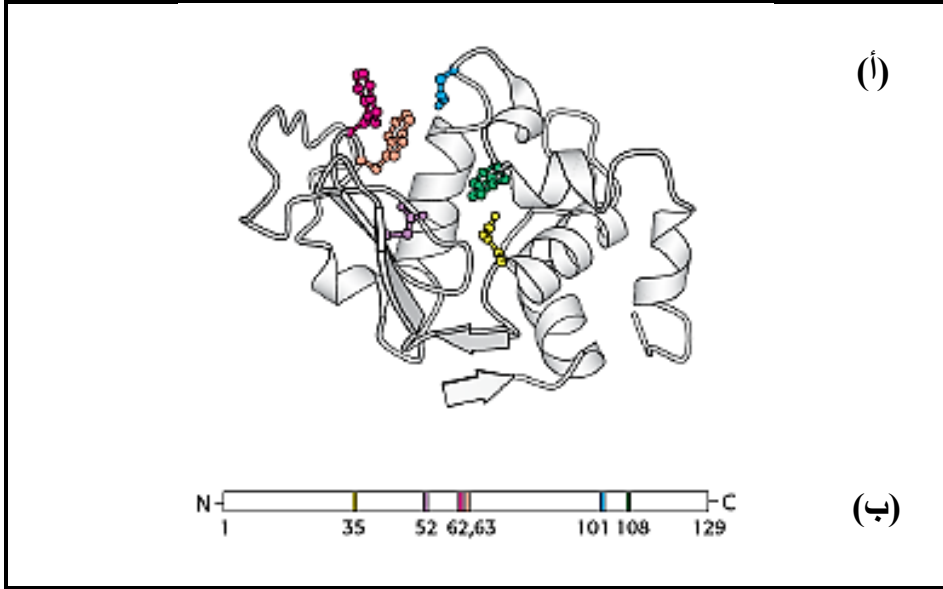
"تتابع الأحماض الأمينية في البروتين تحدد البنية الفراغية ثلاثية الأبعاد للبروتين"

لماذا يطوي البروتين إلى التركيبات الثلاثية؟ هناك عدة مميزات مهمة للطى الخاص المميز لكل بروتين:

- طى البروتين يوفر وسيلة لطمر (إخفاء) بواقي الأحماض الأمينية النافرة للماء hydrophobics بعيداً عن المذيب القطبي ويعرض (يكشف) بواقي الأحماض الأمينية القطبية (المحبة للماء hydrophilic) للمذيب المواتي للتأثيرات المتبادلة. ويعتقد عديد من الباحثين أن حجب بواقي الأحماض الأمينية النافرة للماء عن المذيب القطبي هي أهم قوى الحركة الحرارية التي تدفع طي البروتين. فالنظام يكون أكثر ثباتاً عندما تتجمع المجموعات النافرة للماء مع بعضها البعض على عكس إنتشارها في الوسط المائي.

- خلال طي البروتين يمكن جلب السلاسل الجانبية للأحماض الأمينية التي تكون بعيدة عن بعضها البعض عبر سلسلة عديد الببتيد. ويجلب هذه المجموعات بالقرب من بعضها البعض، فإن البروتين يمكن أن يكون مراكز نشطه كيميائياً مثل المواقع النشطة للإنزيم. فعلى سبيل المثال فإن إنزيم ليسوزيم lysozyme (وهو إنزيم يحلل جدر الخلايا لبعض البكتريا) له موقع نشط يشتمل على ستة من بواقي الأحماض

الأمينية أرقام 35، 52، 62، 63، 101 و 108 من سلسلة عديد الببتيد للإنزيم التي تتألف من ١٢٩ حمض أميني. وكما تشير الأرقام التي تعبّر عن مواقع هذه الأحماض الأمينية في سلسلة عديد الببتيد. فإن بواقي الأحماض الأمينية الستة تكون بعيدة عن بعضها البعض في سلسلة عديد الببتيد كاملة الإمتداد في الكيموتربسين (شكل ٤-١٧)

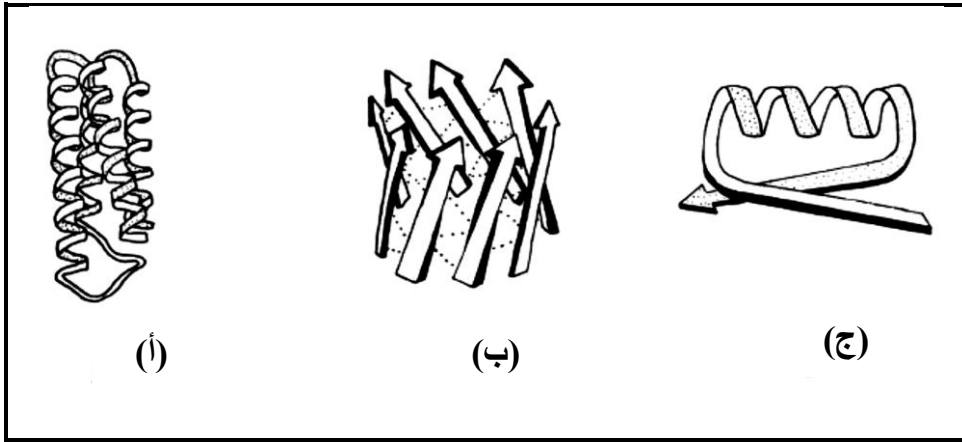


شكل ٤-١٧ المواقع النشطة في الإنزيمات يمكن أن تحتوي على بواقي أحماض أمينية متباعدة. (أ) مخطط الشريط لإنزيم ليسوزيم lysozyme يظهر عدة مكونات للموقع النشط (الملونة). (ب). رسم بياني يعبر عن التركيب الأولي للإنزيم الذي يوضح أن الموقع النشط يتألف من بواقي أحماض أمينية التي تأتي من أجزاء مختلفة في سلسلة عديد الببتيد.

● التركيب الثالث للبروتين كثيراً ما يطوى لينشئ جيب (شق) خلال تركيب البروتين الذي يؤوي جزيئات صغيرة. لقد ذكرنا سابقاً أن الموقع النشط يشير إلى المجموعات الكيميائية الفعالة للإنزيم التي تيسر عملية الحفز. إن الموقع النشط للإنزيم يأخذ شكل شق cleft أو جيب pocket أو فجوة (تجويف cavity) الذي يرتبط به جزئ المادة الخاضعة لبدء التفاعل الإنزيمي، وداخل جيب الارتباط تصطف المجموعات

الكيميائية من البروتين. وكما سنرى في فصل ٨ أنه توجد علاقة كيميائية فراغية دقيقة بين تركيب الجزيئات التي ترتبط بالإنزيم وجيب الموقع النشط. وبالرغم من أنه لا يوجد إثنين من البروتينات لهما تركيب ثلاثي متماثل بصورة كاملة، فإن الإنزيمات التي تقوم بنفس الوظيفة كثيراً ما تحتوي على تركيبات متماثلة للموقع النشطة، وفي بعض الحالات يكون لهما نمط طي كلي متماثل.

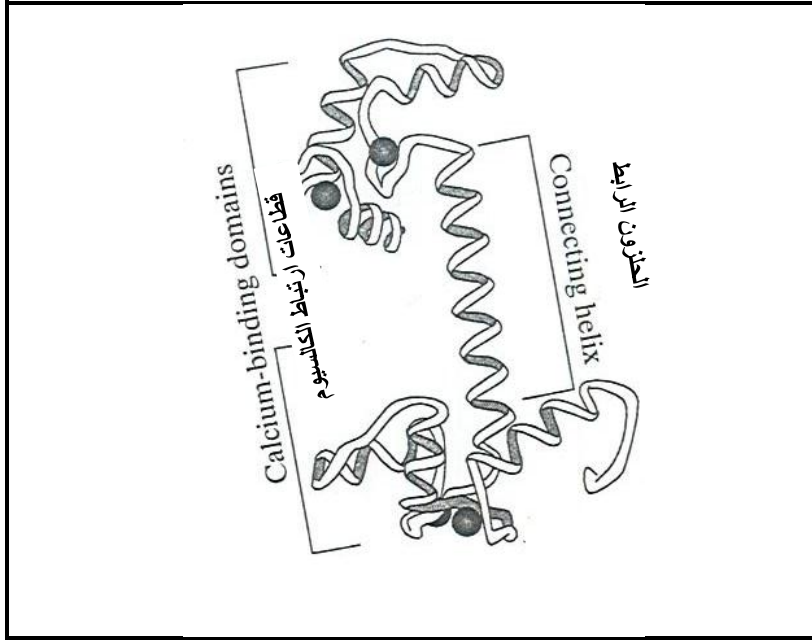
● بعض تنظيمات عناصر التركيب الثانوي الشائعة التي توجد في البروتينات المطوية يشار إليها بالتركيبات الثانوية العليا *superscondary structure* أو الباعثات *motifs*. وثلاثة من أمثلة التركيبات الثانوية العليا هي الحزمة الحلزونية *helical bundle*، البرميل بيتا *β barrel* والعقدة  $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$  كما هو موضح في شكل ٤-١٨.



شكل ٤-١٨ أمثلة للتركيبات الثانوية العليا (أ) الحزمة الحلزونية (ب) البرميل بيتا (ج) العقدة  $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ .

في بعض البروتينات نجد أن سلاسل عديد الببتيد تطوي إلى إثنين أو أكثر من مناطق منفصلة من تركيبات ثلاثية مدمجة التي تتصل ببعضها بواسطة جزء مرن من سلسلة عديد الببتيد. وهذه الوحدات المطوية المدمجة يطلق عليها قطاعات *domains* التي تختلف في حجمها من حوالي 30 إلى 400 باقي حمض أميني. وأحد الأمثلة المميزة للقطاعات توجد في بروتين كالمودالين *calmodulin* (شكل ٤-١٩). هذا

البروتين يحتوي على قطاعين للإرتباط بالكالسيوم التي تتصل ببعضها بواسطة حلزون ألفا فردي طويل. إن تنشيط البروتين بالكالسيوم يرافقه تغير في طول هذا الحلزون الذي يعمل كوصلة بين القطاعين والذي يجلب القطاعين قريباً من بعضهما. والقطاعات تتميز أكثر بوظيفتها عن تركيبها. كثير من الإنزيمات مثل tRNA synthetase تحتوي على قطاعات وظيفية منفصلة للإرتباط بالمواد الخاضعة، للإرتباط بالمؤثرات والتداخل مع البروتينات الأخرى.



شكل ٤-١٩ تركيب كالمودولين calmodulin. إن القطاعين الخاصين بارتباط الكالسيوم يتصلان ببعضهما عن طريق وصلة طويلة من الحلزون ألفا  $\alpha$ -helix

#### ٤-٦ الوحدات الفرعية والتركيب الرباعي

ليس كل بروتين يؤدي وظيفته كسلسلة عديد ببتيد فردية مطوية. في كثير من الحالات فإن النشاط البيولوجي للبروتين يتطلب إتحاد إثنين أو أكثر من سلاسل عديد الببتيد المطوية لتكوين جزئ فعال. وفي مثل هذه الحالات فإن سلاسل عديد الببتيد الفردية في الجزئ الفعال يشار إليها بالوحدات الفرعية subunits. والوحدات الفرعية يمكن أن تكون

نسخ متعددة من نفس سلسلة عديد الببتيد (متعدد الوحدات متجانس homomultimer) أو ربما تحتوي على عديد ببتيدي مختلفة (عديد الوحدات غير المتجانس hetetromultimer). وفي كلتا الحالتين تطوي الوحدات الفرعية كوحدات فردية وتكتسب تركيباتها الثانوية والثلاثية. والاتحاد بين الوحدات الفرعية المطوية يثبت خلال الروابط غير التساهمية مثل الإرتباط الهيدروجيني، تكوين الجسور الملحية والتأثيرات المتبادلة غير القطبية (النافرة للماء) وقوى فان دير فالس، وربما تشتمل إضافة إلى ذلك على الروابط ثنائية الكبريت S - S بين الأحماض الأمينية سستئين على الوحدات الفرعية المختلفة.

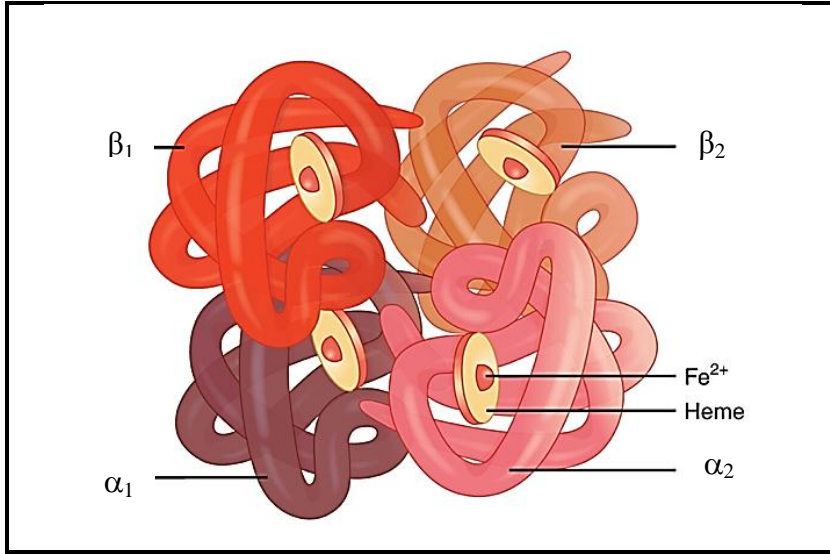
والجزء الأكبر من الإنزيمات في الأنظمة البيولوجية تكون متعددة الوحدات التي تحتوي على وحدتين فرعيتين أو أكثر، بعضهما مدون في جدول ٤-٣. في بعض الحالات فإن الوحدات الفرعية تعمل كوحدات حفزية شبه مستقلة. فعلى سبيل المثال فإن إنزيم إصطناع البروستاجلاندين Prostaglandin synthase يوجد في صورة ثنائي الوحدات متجانس homodimer، وكل وحدة فرعية تحتوي على موقع نشط مستقل الذي يحول جزيئات المادة الخاضعة إلى الناتج. في حالات أخرى فإن الموقع النشط يوجد خلال وحدة فرعية فردية، والوحدات الفرعية الأخرى تقوم بتثبيت التركيب أو تعديل نشاط الوحدة الفرعية النشطة. فعلى سبيل المثال أنه في إنزيمات سيتوكرومات الأكسدة cytochrome oxidases، فإن كل المواقع النشطة توجد في الوحدة الفرعية I، والوحدات

جدول ٤-٣ بعض الأمثلة للإنزيمات متعددة الوحدات الفرعية

| عدد الوحدات الفرعية | الإنزيم                         |
|---------------------|---------------------------------|
| 2                   | HIV protease                    |
| 2                   | Hexokinase                      |
| 3                   | Bacterial cytochrome oxidase    |
| 4                   | Lactate dehydrogenase           |
| 12                  | Aspartate carbamoyl transferase |
| 13                  | Human cytochrome oxidase        |

الفرعية الأخرى 12-3 (اعتماداً على النوع) تحور الثباتية والنشاط الخاص للوحدة الفرعية I. وما زالت توجد حالات أخرى التي فيها الموقع النشط للإنزيم يتكون من الوحدات الفرعية المتجمعة. والمثال الواضح لذلك إنزيم aspartyl protease لفيروس نقص المناعة في الإنسان HIV (المسبب لمرض الإيدز AIDS) الذي يتألف من وحدتين فرعيتين متماثلتين من عديد الببتيد. والموقع النشط في الإنزيم يتألف من زوج من بواقي حمض الأسبارتيك، أحدهما (Asp 25) يأتي من سلسلة عديد الببتيد الأولى، والثاني (Asp 25') يأتي من السلسلة الأخرى. وبدون اتحاد الوحدتين فإن الإنزيم لا يقوم بنشاطه.

والتركيب الرباعي quaternary structure للبروتين يشير إلى التنظيم المكاني (الحيزي) للوحدات الفرعية بالنسبة لبعضها البعض وطبيعة التأثيرات المتبادلة بينهما. أحد الأمثلة المهمة للتركيب الرباعي للبروتين أتت من فحص النشاط البيولوجي لهيموجلوبين hemoglobin الإنسان. والهيموجلوبين بروتين في الدم مسئول عن نقل الأكسجين من الرئة إلى الخلايا (وكذلك نقل ثاني أكسيد الكربون في الاتجاه العكسي). والوحدة الفعالة للهيموجلوبين تكون رباعية الوحدات الفرعية غير المتجانسة heterotetramer حيث يتألف من وحدتين فرعيتين ألفا ( $\alpha$ ) ووحدتين فرعيتين بيتا ( $\beta$ )، ومن ثم فإن جزئ الهيموجلوبين يوجد في صورة  $\alpha_2\beta_2$  (شكل ٤-٢٠). وكل من هذه الوحدات الفرعية الأربعة تحتوي على عامل مساعد من مجموعة الهيم التي لها القدرة على الارتباط بالأكسجين. وألفة الهيم للأكسجين تعتمد على التركيب الرباعي للبروتين وحالة الارتباط بالأكسجين لمجموعات الهيم الثلاثة الأخرى (وهي الخاصة التي تعرف بالتعاونية cooperativity). ونظراً لتعاونية الهيم للارتباط بالأكسجين، فإن جزيئات الهيموجلوبين دائماً ما يكون فيها مواقع الهيمات الأربعة مرتبطة بالأكسجين (الصورة الأكسجينية) أو كل مواقع الهيم الأربعة حرة من الأكسجين (الصورة منزوعة الأكسجين).



شكل ٤-١٩ الوحدات الفرعية الرباعية  $\alpha_2\beta_2$  في هيموجلوبين الإنسان وكل وحدة فرعية ترتبط بمجموعة الهيم Heme، وكل وحدة هيم ترتبط بـ  $Fe^{2+}$ .

#### ٧-٤ العوامل المساعدة في الإنزيمات

كما رأينا من دراسة الأحماض الأمينية (قسم ٤-١) فإن السلاسل الجانبية للأحماض الأمينية العشرين التي تتكون منها البروتينات الطبيعية يمكن أن تمنح الإنزيمات مجموعة واسعة من النشاط الكيميائي. فعلى سبيل المثال فإن إنزيمات التحلل المائي hydrolytic enzymes مثل الكيموتريسين chymotrypsin والريبونوكليز ribonuclease التي تحلل مائياً البروتينات و RNA على التوالي تستخدم المجموعات الفعالة في السلاسل الجانبية لبعض الأحماض الأمينية في سلاسل عديد الببتيد (Asp-102, His-57, Ser-195 في حالة الكيموتريسين) و (Lys-41, His-119, His-12 في حالة الريبونوكليز) لإتمام عملية الحفز المطلوبة. مع ذلك، فإنه كثيراً ما يحتاج التفاعل المحفز إنزيمياً إلى إدماج مجموعات إضافية تكون مطلوبة لتيسر التفاعل. ومن ثم فإنه لإنجاز النشاط الحفزي المطلوب الذي لا يمكن تحقيقه باستخدام الأحماض الأمينية في بروتين الإنزيم بمفردها، فإن عديد من الإنزيمات تدمج مجموعات كيميائية في تركيب المواقع النشطة. وهذه



المجموعات الكيميائية غير البروتينية يشار إليها جميعاً بالعوامل المساعدة الإنزيمية enzyme cofactors. في بعض الإنزيمات قد تشترك العوامل المساعدة بصورة مباشرة في عملية الحفز وفي البعض الآخر تتوسط تبادل مجموعات كيميائية منشطة بين المواد الخاضعة.

وفي الإنزيمات التي تحتاج إلى عامل مساعد لنشاطها، فإن الجزء البروتيني في المعقد النشط يشار إليه بالإنزيم غير الكامل apoenzyme والمعقد النشط من الإنزيم غير الكامل (الجزء البروتيني) والعامل المساعد يطلق عليه الإنزيم الكامل holoenzyme.



والعوامل المساعدة يمكن تقسيمها إلى مجموعتين: عناصر معدنية metals وجزئيات عضوية صغيرة (جدول ٤-٤). فعلى سبيل المثال، فإن إنزيم carbonic anhydrase يحتاج إلى  $\text{Zn}^{2+}$  لنشاطه، وإنزيم pyruvate dehydrogenase يحتاج إلى جزئ عضوي هو ثيامين بيروفوسفات thiamin pyrophosphate. والعوامل المساعدة التي تكون جزئيات عضوية صغيرة يشار إليها بالمرافقات الإنزيمية coenzymes، غالباً ما تشتق من الفيتامينات.

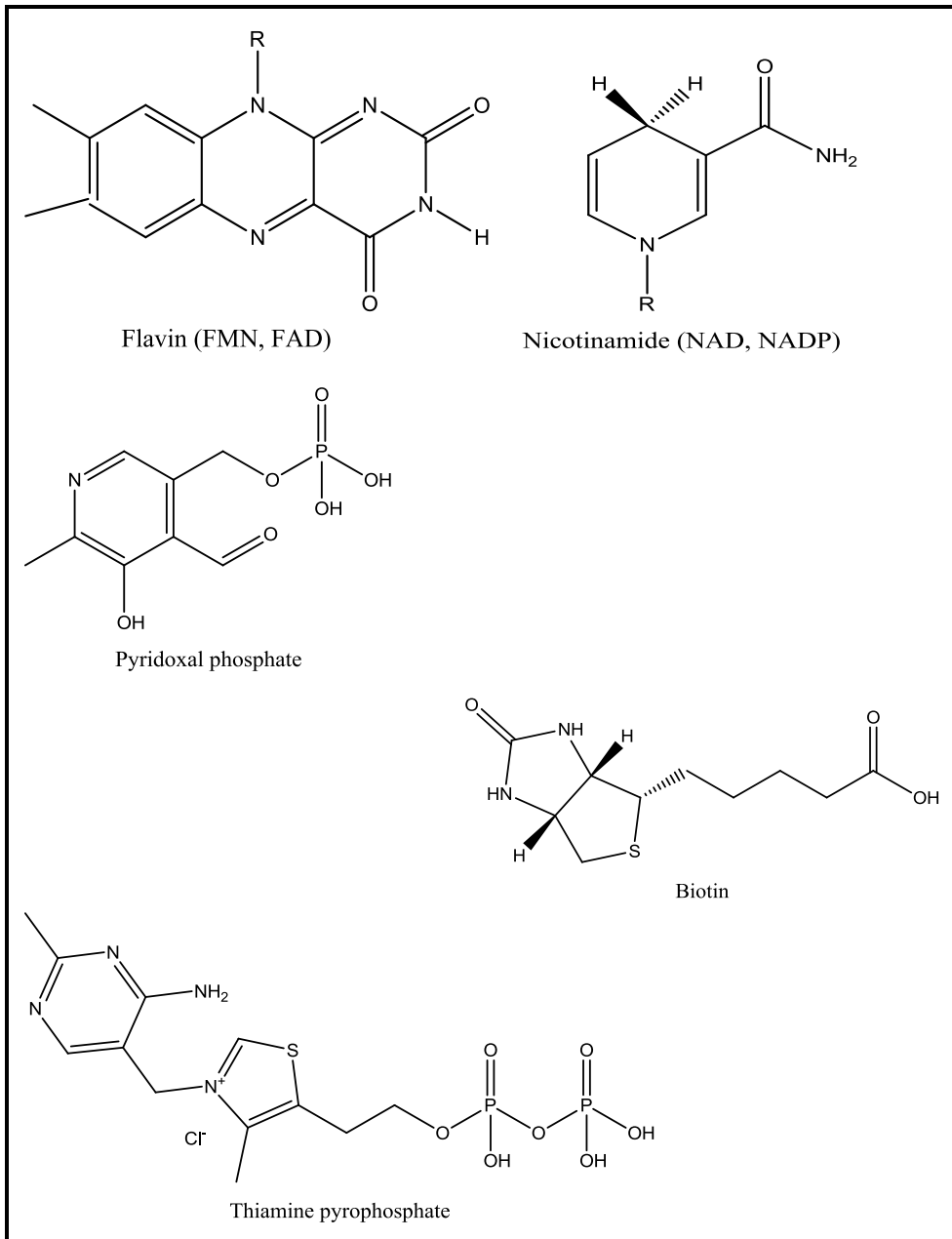
تؤدي العوامل المساعدة مدى واسع من التفاعلات الإنزيمية. أحد الأدوار المهمة للعوامل المساعدة هو أنها توفر مراكز لكيمياء الأكسدة/الاختزال عند الموقع النشط للإنزيم. أحد الأمثلة لذلك هي العوامل المساعدة من الفلافينات (FAD, FMN) النيكوتيناميد ( $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADP}^+$ ). كما تقوم العوامل المساعدة أيضاً بالمشاركة في حفز عديد من التفاعلات الأخرى التي تشمل نقل مجموعة الأمين من أحد الأحماض الأمينية

إلى حمض ألفا كيتونى (بايريدوكسال فوسفات) وغيرهم من التفاعلات (جدول ٤-٤).  
وشكل ٤-٢١ يعرض تركيب بعض العوامل المساعدة الشائعة للإنزيمات.

جدول ٤-٤ : بعض الأمثلة للعوامل المساعدة التي توجد في الإنزيمات

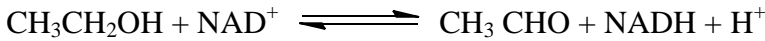
| نوع التفاعل                                     | أمثلة للإنزيم                  | العامل المساعد                |
|-------------------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| مركز محب للشحنة السالبة                         | Carboxypeptidase               | أيون الزنك $Zn^{2+}$          |
| مركز لتفاعلات الأكسدة والاختزال                 | Cytochrome                     | أيون الحديد $Fe^{2+}/Fe^{3+}$ |
| الارتباط بالفوسفات (المادة الخاضعة)             | ATP synthase                   | أيون المغنسيوم                |
| إزالة مجموعة الكربوكسيل من الأحماض ألفا كيتونية | Pyruvate dehydrogenase complex | ثيامين بيروفوسفات             |
| مركز لتفاعلات الأكسدة والاختزال                 | Glucose oxidase                | الفلافينات (FAD, FMN)         |
| نقل البروتون                                    | succinate dehydrogenase        |                               |
| مركز لتفاعلات الأكسدة والاختزال                 | Alcohol dehydrogenase          | النيكوتيناميد (NADP, NAD)     |
| نقل البروتون                                    | ornithine cyclase              |                               |
| نقل مجموعة الأمينو                              | Aspartate transaminase         | بايريدوكسال فوسفات            |
| نقل $CO_2$                                      | Pyruvate carboxylase           | بيوتين                        |
| نقل مجموعة الأسايل                              | Pyruvate dehydrogenase         | المرافق الإنزيمي A            |

إن قوة ارتباط العامل المساعد ببروتين الإنزيم تختلف كثيراً من نظام إنزيمي إلى آخر. فبعض التأثيرات المتبادلة بين العامل المساعد وبروتين الإنزيم قد تكون ضعيفة والبعض يكون قوياً، والبعض الآخر يكون بين ذلك. والعامل المساعد الذي يرتبط بقوة بحيث يصعب إزالته دون حدوث ضرر للإنزيم غالباً ما يطلق عليه بالمجموعة التعويضية Prosthetic group.



شكل ٢١-٤ تركيب بعض العوامل المساعدة التي توجد في الإنزيمات

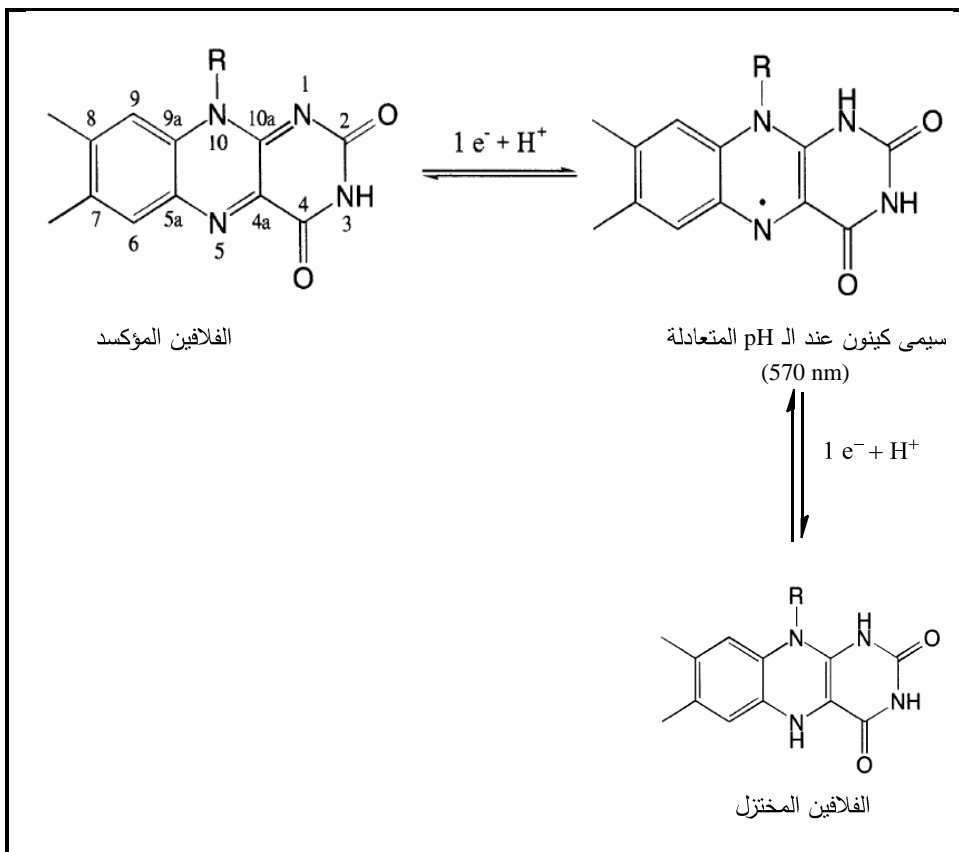
● في معظم الحالات يتحد العامل المساعد مع بروتين الإنزيم بصورة ضعيفة خلال التأثيرات المتبادلة غير التساهمية مثل تلك التي وصفت في فصل ٣ (مثل الارتباط الهيدروجيني والتأثيرات المتبادلة النافرة للماء). وفي هذه الحالة حيث يكون ارتباط العامل المساعد ضعيفاً من السهل تحرره من البروتين فإنه يميل إلى حد كبير أن يكون مرافق للمادة الخاضعة cosubstrate لأنه يتحد ويتحرر من الإنزيم مثل المواد الخاضعة والنواتج. مع ذلك، فإن استخدام نفس العامل المساعد بواسطة إنزيمات متنوعة، يجعل العامل المساعد مستقلاً عن المواد الخاضعة. والإنزيمات التي تستخدم نفس العامل المساعد عادة ما يكون لها آليات حفز متماثلة، والمثال الواضح للعامل المساعد ضعيف الارتباط هو نيكوتيناميد أدنين ثنائي النيوكليوتيد ( $NAD^+$ ) وهو أحد إثنين من المرافقات الإنزيمية للنيكوتيناميد (شكل ٤-٢١)، والمرافق الإنزيمي الآخر هو  $NADP^+$  الذي يحتوي على مجموعة فوسفات إضافية والذان يشاركان في مدى واسع من تفاعلات الأكسدة والاختزال. في بعض الحالات مثل إنزيم lactate dehydrogenase يحتاج الإنزيم إلى  $NAD^+$  ولا يحتاج إلى عامل آخر، ولكن مع بعض الإنزيمات الأخرى مثل إنزيم alcohol dehydrogenase فإنه يحتاج إلى أيون الزنك بالإضافة إلى  $NAD^+$ . والتفاعل الذي يحفز بواسطة إنزيم alcohol dehydrogenase مع الإيثانول كمادة خاضعة هو كالتالي:



$NAD^+$  يشار إليه بمرافق المادة الخاضعة للتفاعل و  $NADH$  يعتبر مرافق للناتج co-product. وبكلمات أخرى، فإن المرافق الإنزيمي قد تحول في النهاية إلى صورة أخرى غير التي بدأ بها. ونتيجة للارتباط الضعيف للمرافق الإنزيمي فإنه يتحرر من الإنزيم في صورة متغيرة. وهذا حقيقي لكل التفاعلات المشتملة على  $NAD^+$  كعامل مساعد، وكذلك تلك التفاعلات التي تشتمل على  $NADP^+$ . وتفاعلات أخرى تكون مطلوبة لإعادة توليد  $NAD^+$  و  $NADP^+$ .

● أحد الأمثلة للعوامل المساعدة التي ترتبط بقوة ببروتين الإنزيم هي الفلافينات flavins (من اللاتينية flavins التي تعني أصفر حيث تمتص الضوء عند  $\lambda=450$  nm)، وتشمل الفلافينات كل من فلافين أحادي النيوكلئوتيد (FMN) وفلافين أدنين ثنائي النيوكلئوتيد (FAD). وفي الواقع فإن العوامل المساعدة FMN وFAD توجد مرتبطة بثبات مع بروتين الإنزيم، ويظل هذا الارتباط أثناء عملية التنقية المختلفة للإنزيمات المحتوية على هذه العوامل المساعدة، لذلك فإن معقد البروتين- الفلافين يطلق عليه بالفلافوبروتين flavoprotein. وتشارك هذه العوامل المساعدة في تفاعلات الأكسدة والاختزال مع إنزيمات oxidoreductase, dehydrogenases والبروتينات الناقلة للإلكترونات.

الجزء النشط في العوامل المساعدة للفلافينات هو حلقة أيسوالوكسازين isoalloxazine التي تحتوي على نظام عالي من الروابط المزدوجة المتبادلة (شكل ٤-٢١) والفلافينات المؤكسدة يمكن أن تختزل عكسياً باستقبال إلكترونين من الإلكترونات وتتحول إلى الصورة المختزلة، ومن ثم فإنها يمكن أن تعمل كمصيدة للإلكترونات electron sinks أثناء تفاعلات الأكسدة والاختزال خلال الموقع النشط للإنزيمات. إضافة إلى ذلك، فإن العوامل المساعدة للفلافين يمكن أن تخضع لإختزال يشتمل على إلكترون- واحد مع تكوين الشق الحر سيمى كينون وهذا يمكن أن يختزل بتفاعل إختزال ثانى يشتمل على إلكترون فردي لينتج العامل المساعد المختزل كلية (شكل ٤-٢٢). وتظهر أهمية هذه العوامل المساعدة في أنها تمثل نقطة التحول بين العمليات التي تشتمل على نقل إلكترونين من الإلكترونات السائدة في السيوسول إلى العمليات التي تشتمل على إلكترون واحد السائدة في سلسلة نقل الإلكترونات في الغشاء الداخلي للميتوكوندريا.



شكل ٤-٢٢ تركيب العوامل المساعدة للفلافين في حالات الأكسدة المختلفة

## أسئلة

- ١- أى من السلاسل الجانبية للأحماض الأمينية في البروتين يمكن أن تحمل (أ) شحنة موجبة، أو (ب) شحنة سالبة عند pH4 و pH7 و pH10
- ٢- إرسم الرابطة الببتيدية المضاهي (cis) وميز المجموعات المتوقع أن تحدث تداخلات مجسمة.

- ٣- روابط الأמיד (الروابط الببتيدية) في عديد الببتيد جميعها تأخذ البنية المضادة *trans* التي تكون فيهما الرابطة  $N-H$  في مستوى واحدة مضاهي مع  $C=O$ ، لماذا؟
- ٤- في بعض الببتيدات التي تحتوي على البرولين وجد أنهما تحتوي على رابطة أמיד - مضاهي *cis* التي تشتمل على مجموعة أمينو من البرولين.
- ٥- البروتينات ثابتة تماماً. ففترة حياة الرابطة الببتيدية في المحلول المائي تكون تقريباً حوالي 1000 عام. مع ذلك فإن  $\Delta G^\circ$  للتحلل المائي للبروتين تكون سالبة وكبيرة لحد بعيد. كيف تفسر أسباب ثباتية الرابطة الببتيدية على ضوء أن التحلل يحرر كمية كبيرة من الطاقة؟
- ٦- عين المجموعات في البروتين التي يمكنها أن تكون روابط هيدروجينية أو روابط كهربية ساكنة مع السلسلة الجانبية للأرجنين.
- ٧- فسر لماذا تكون حرية البنيات الفراغية للروابط الببتيدية محدودة.
- ٨- صف نمط الارتباط الهيدروجيني في الحلزون ألفا.
- ٩- وضح لماذا تكون الشريحة بيتا ممتدة؟
- ١٠- كثيراً ما توجد الدورانات بيتا والعقد على سطح البروتين لماذا؟.
- ١١- ما هي السلاسل الجانبية للأحماض الأمينية التي من المعتاد أن توجد في داخل البروتين؟ وعلى السطح؟
- ١٢- Poly-L-leucine في مذيب عضوي مثل dioxane يكون  $\alpha$ -helix بينما poly-L-isoleucine ليس كذلك. لماذا هذين الحمضين الأميين الذي لهما نفس عدد ونوع الذرات لهما ميل مختلف لتكوين الحلزون *helix*؟
- ١٣- عدد مميزات وجود وحدات متعددة في البروتينات.
- ١٤- صف القوي التي تثبت التركيب الثانوي والثالث والرابع في البروتينات.
- ١٥- صف التغيرات في الطاقة والإنتروبي التي تحدث أثناء طي البروتينات.
- ١٦- افترض أنك أجريت طفرات موجه الموقع لإختبار المتوقع حول بواقي الأحماض الأمينية التي تكون أساسية لعمل الإنزيم. ما هي أزواج الأحماض الأمينية المستبدلة المسجلة أسفل تتوقع أن تحدث تشوه أكبر في تركيب البروتين؟ إشرح ذلك.
- أ- Val يستبدل ب Ala أو Phe

ب- Lys يستبدل بـ Asp أو Arg

ج- Gln يستبدل بـ Glu أو Asn

د- Pro يستبدل بـ His أو Gly

١٧- الطفرة التي تغير بواقي ألآئين في داخل البروتين إلى فالين وجدت أنهم تؤدي إلى فقد

النشاط. مع ذلك فإن النشاط قد استعاد (استرد) عندما أجريت طفرة ثانية في موضع آخر

بإستبدال أيسوليوسين بـ جليسين. كيف لهذه الطفرة الثانية أن تؤدي إلى إستعادة النشاط؟

١٨- كل الأحماض الأمينية لها تشكيل فراغي مطلق S، فيما عدا L-cysteine الذي له

تشكيل فراغي R. فسر لماذا L-cysteine قد صنف S تشكيل فراغي مطلق R.

١٩- ترجم تسلسل الأحماض الأمينية التالية إلى الرمز الأحادي

Leu – Glu – Ala – Arg – Arg – Asn – Ile – Asp – Gly – Ser – Cys – Thr.

٢٠- لماذا تحتاج بعض الإنزيمات إلى عوامل مساعدة Cofactors ؟





## فصل ٥ إتران الإرتباط بين البروتين- المتصلة Protein-Ligand Binding Equilibria

- |     |                                                                       |
|-----|-----------------------------------------------------------------------|
| ١-٥ | إرتباط المتصلة (L) بجزئ كبير (المستقبل R) يحتوي على موقع ارتباط فردي. |
| ٢-٥ | ارتباط المتصلة بمستقبل يحتوي على أكثر من موقع ارتباط.                 |
| ٣-٥ | تحليل الرسم البياني لبيانات ارتباط المتصلة عند الاتزان.               |
| ٤-٥ | الارتباط القوي بين المتصلة والمستقبل.                                 |
| ٥-٥ | التنافس بين المتصلات لموقع ارتباط مشترك.                              |
| ٦-٥ | الطرق التجريبية لقياس إرتباط المتصلة.                                 |

في التفاعلات المحفزة إنزيمياً فإن الإنزيم يحفز التحول الكيميائي لأحد الجزيئات (المادة الخاضعة) إلى جزئ آخر (ناتج التفاعل). ولكي يحدث التفاعل، فإن الإنزيم والمادة الخاضعة يجب أولاً أن يتلاقيا مع بعضهما البعض لتكوين معقد ثنائي خلال ارتباط المادة الخاضعة مع موقع خاص على الإنزيم ألا وهو الموقع النشط. وعملية الارتباط بذاتها تشارك في عملية الحفز بالإنزيم (فصل ٨). وبصورة عامة، فإن أحداث الإرتباط هذه تمثل نقطة البداية للتفاعلات الكيموحيوية والعمليات التنظيمية والفسيولوجية والدوائية داخل وخارج الخلايا. ومن أمثلة ذلك ارتباط المواد الخاضعة والمنشطات والمثبطات بالإنزيمات؛ ارتباط أيونات المعادن والعوامل المساعدة بالبروتينات؛ ارتباط المواد المعززة

agonists والعوامل المضادة antagonists بالمستقبلات؛ ومعقدات البروتين - البروتين والبروتين - الحمضي النووي. ومن الشائع الإشارة إلى الجزء الصغير بالمتصلة ligand (L) والجزء الكبير بالمستقبل (R) receptor، والمتصلة قد تكون أيضاً جزءاً كبيراً كما في حالة الجزيئات المنظمة مثل البروتين الكابح repressor protein الذي يرتبط بـ DNA. إن الارتباط بين المتصلة والمستقبل تشتمل على روابط غير تساهمية وتكون عكسية.

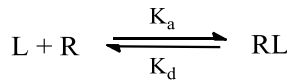
في هذا الفصل سوف نشق التعبير الرياضي الذي يصف الارتباط كميًا ثم نستخدم الرسوم البيانية للتعبير عن النتائج التجريبية التي تسمح بتقدير ثابت التفكك لهذه المعقدات. ثم نختم هذا الفصل بعرض بعض الطرق التجريبية المستخدمة لدراسة ارتباط البروتين - المتصلة.

## ٥-١ ارتباط المتصلة (L) بجزء كبير (المستقبل R) يحتوي على موقع ارتباط فردي.

دعنا نبدأ هذا الفصل بالحالة البسيطة التي يحتوي فيها المستقبل R على موقع فردي لإرتباط المتصلة L. وهنا سوف نقوم أولاً بتعريف ثابت التفكك  $K_d$  وعلاقته بالطاقة الحرة لإرتباط المتصلة بالمستقبل. وفي الجزء الثاني سنقوم بعرض المعادلة التجريبية التي يمكن استخدامها في القياس التجريبي لثابت التفكك عند الإلتزان.

### ٥-١-١ تعريف ثابت التفكك $K_d$ وعلاقته بالطاقة الحرة للإرتباط

ارتباط المتصلة (جزء صغير) L بالمستقبل (بروتين) R يحتوي على موقع ارتباط فردي للمتصلة يتم التعبير عنه بالتفاعل العكسي التالي:



حيث  $K_a$  هو ثابت الإلتحاد (الإرتباط) و  $K_d$  هو ثابت التفكك.

وعند الاتزان فإن أى جزئ من المستقبل إما أن يكون حراً أو مرتبطاً بالمستقبل. وبالمثل فإن جزئ المتصلة يجب أن يكون إما حراً أو مرتبطاً بالمستقبل. وهذا الافتراض يؤدي إلى زوج من معادلات حفظ الكتلة التاليتين:

$$[R] = [RL] + [R]_f \quad (١-٥)$$

$$[L] = [RL] + [L]_f \quad (٢-٥)$$

حيث  $[R]$  و  $[L]$  هما التركيزين الكليين للمستقبل والمتصلة على التوالي، و  $[R]_f$  و  $[L]_f$  هما التركيزين الحريين للجزيئين و  $[RL]$  هو تركيز المعقد الثنائي للمستقبل - المتصلة. وتحت مجموعة ظروف خاصة للمحلول، فإن حالة إتران سوف تنشأ بين الصورة الحرة والمرتبطة للمستقبل، ويكون ثابت الاتحاد  $K_a$  عند الاتزان للمعقد الثنائي هو:

$$K_a = \frac{[RL]}{[R]_f[L]_f} \quad (٣-٥)$$

ومن الشائع التعبير عن موضع الاتزان كميّاً بدلالة ثابت التفكك  $K_d$ . وفي هذه الحالة فإنه يمكن كتابة :

$$K_d = \frac{[R]_f[L]_f}{[RL]} \quad (٤-٥)$$

ومن المعادلتين ٣-٥ و ٤-٥ نجد أن العلاقة بين ثابت التفكك  $K_d$  وثابت الاتحاد  $K_a$  تكون:

$$K_d = \frac{1}{K_a} \quad (٥-٥)$$

إن الألفة النسبية (أى قوة الارتباط) للمعقدات المختلفة من المستقبل- المتصلة يتناسب عكسياً مع قيم  $K_d$  لها: كلما كان ارتباط المتصلة قوياً (أى كلما كان  $K_a$  كبيراً) كلما كانت قيمة ثابت التفكك منخفضة. ولذلك فإن ثوابت التفكك تستخدم لمقارنة ألفة المتصلات المختلفة لمستقبل فردي، وأيضاً مقارنة ألفة مستقبلات مختلفة لمتصلة عامة. ويمكن ربط ثابت التفكك بالطاقة الحرة لجس لارتباط معقد المستقبل- المتصلة كالتالي:

من معادلة ٥-٣ يكون لدينا:

$$\Delta G_{\text{binding}} = -RT \ln \left( \frac{[RL]}{[R]_f [L]_f} \right)$$

$$\Delta G_{\text{binding}} = -RT \ln (K_a) \quad (٦-٥)$$

ومن معادلة (٥-٥) نجد أن

$$\Delta G_{\text{binding}} = -RT \ln \left( \frac{1}{K_d} \right)$$

ومن ثم

$$\Delta G_{\text{binding}} = RT \ln (K_d) \quad (٧-٥)$$

ويمكن أن نشاهد هنا تغير الإشارة بالنسبة للطريقة النموذجية للتعبير عن الطاقة الحرة. وهذا يرجع إلى أنه في مجال الكيمياء يتم التعبير عن الطاقة الحرة بمدلول التفاعل الأمامي، أى بدلالة ثابت الارتباط.

وجداول ١-٥ يعرض العلاقة بين  $K_d$  و  $\Delta G_{\text{binding}}$  لقيم مختلفة من  $K_d$ . وهذا الجدول يشير إلى أنه كلما كانت قيمة ثابت التفكك  $K_d$  صغيرة. كلما كانت طاقة الارتباط  $\Delta G_{\text{binding}}$  كبيرة وسالبة.

جدول ١-٥ العلاقة بين  $K_d$ ,  $\Delta G_{\text{binding}}$  لمعقدات المستقبل- المتصلة عند  $25^\circ\text{C}$  محسوبة من معادلة ٧-٥

| $K_d$ (M)  | $\Delta G_{\text{binding}}$ (kcal/mol) |
|------------|----------------------------------------|
| 1.0        | 0.0                                    |
| $10^{-1}$  | -1.36                                  |
| $10^{-2}$  | -2.73                                  |
| $10^{-3}$  | -4.09                                  |
| $10^{-4}$  | -5.46                                  |
| $10^{-5}$  | -6.82                                  |
| $10^{-6}$  | -10.88                                 |
| $10^{-9}$  | -12.24                                 |
| $10^{-12}$ | -16.32                                 |

ولقد استخدم الكيميائيون الحيويون ثابت التفكك بدلاً من ثابت الاتحاد، لأن ثابت التفكك له وحدات التركيز المولاري ومن ثم يمكن موازنتها مع التركيز الخاص بالمتصلة الذي يؤدي إلى نصف - التشبع الأقصى لمواقع الارتباط المتاحة في المستقبل؛ وهذا ما سوف يتضح في قسم ١-٥-٣.

### ١-٥-٢ قياس ثابت التفكك $K_d$ من قياس الحركية

دعنا نأخذ في الاعتبار الحالة البسيطة للارتباط ثنائي الجزيئات دون أن تحدث خطوات تفاعل تالية. افترض أن جزيئان L, R يرتبطان عكسياً كل منهما مع الآخر في محلول ليكونا معقد ثنائي RL. إن الاتزان بين المكونات الحرة L, R والمعقد الثنائي RL سوف تحكم بواسطة معدل تكوين المعقد (أي اتحاد المعقد) وكذلك بواسطة معدل التفكك للمعقد المتكون. وهنا وسوف نعرّف ثابت المعدل rate constant من الرتبة الثانية لتكوين المعقد بـ  $k_{\text{on}}$  وثابت المعدل من الرتبة الأولى لتفكك المعقد بـ  $k_{\text{off}}$ .



إن ثابت التفكك  $K_d$  للمعقد  $RL$  يعطي بنسبة  $k_{\text{off}}$  إلى  $k_{\text{on}}$

$$K_d = \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}} \quad (٩-٥)$$

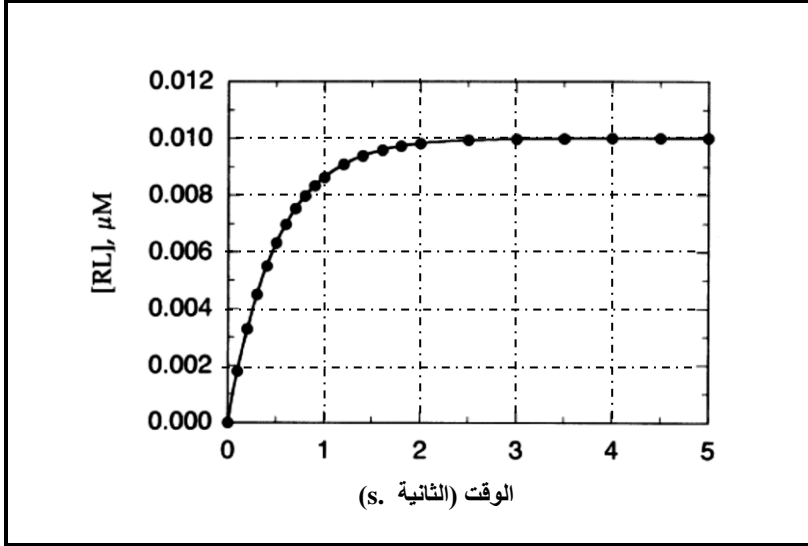
في الجزء الأكبر من الحالات فإن قوة الارتباط (الألفة) بين المستقبل والمتصلة يحدث عندما توجد زيادة كبيرة في تركيز المتصلة للحصول على ارتباط معنوي للمستقبل. ومن ثم فإنه تحت معظم الظروف التجريبية فإن الاتحاد لتكوين المعقد الثنائي ينجز مع انخفاض ضئيل في تركيز المتصلة الحرة (غير المرتبطة)، بناءً على ذلك فإن تفاعل الاتحاد يسير بحركات الرتبة الأولى الكاذب:

$$[RL]_t = [RL]_{\text{eq}} [1 - e^{(k_{\text{obs}}t)}] \quad (١٠-٥)$$

حيث  $[RL]_t$  هو تركيز المعقد الثنائي عند الزمن  $t$ ،  $[RL]_{\text{eq}}$  هو تركيز المعقد الثنائي عند الاتزان، و  $k_{\text{obs}}$  هو القيمة المقدرة تجريبياً لثابت معدل الرتبة الأولى الكاذب. وشكل ١-٥ يعرض منحنى التقدم الحركي النموذجي للزوج المستقبل - المتصلة الذي يدنو من ارتباط الاتزان. والخط المرسوم خلال البيانات في الشكل هو أفضل تطابق غير خطي لمعادلة ١-٥ التي يمكن الحصول على تقدير لقيمة  $k_{\text{obs}}$ . وللاارتباط العكسي، يمكن إثبات أن قيمة  $k_{\text{obs}}$  تتناسب مباشرة مع تركيز المتصلة الموجودة كالتالي:

$$k_{\text{obs}} = k_{\text{off}} + k_{\text{on}} [L]_f \quad (١١-٥)$$

ومن ثم فإننا يمكن تقدير قيمة  $k_{obs}$  لسلسلة من تركيزات المتصلة من التجارب كما هو موضح في شكل ٥-١.



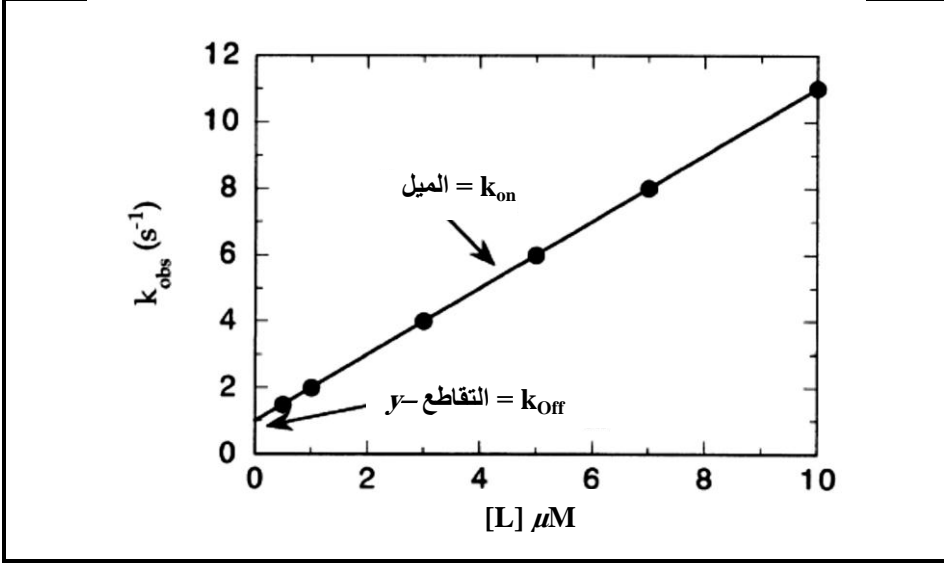
شكل ٥-١ التقدم الزمني للدنو (الوصول) إلى الاتزان بعد خط المستقبل والمتصلة. وتم تطابق البيانات بواسطة الانحدار غير الخطي لمعادلة ٥-١٠ التي يمكن تقدير ثابت معدل الرتبة الأولى الكاذب المشاهد ( $k_{obs}$ ).

وإعادة رسم قيم  $k_{obs}$  كدالة في تركيز المتصلة سوف ينتج تطابق خطي مع ميل يساوي  $k_{on}$  وتقاطع مع المحور  $y$  يساوي  $k_{off}$  (شكل ٥-٢). ومن هذه القيم يمكن تقدير ثابت تفكك الاتزان من معادلة ٥-٩.

### ٥-١-٣ قياس ثابت التفكك عند الاتزان

بينما يمكن من حيث المبدأ تقدير ثابت التفكك من الدراسات الحركية من ثوابت المعدل  $k_{on}$ ,  $k_{off}$ ، فإنه من الناحية العملية فإن هذه الحركات تحدث في وقت قصير (حوالي ميلي ثانية) مما يجعل استخدامها تجريبياً صعباً. ومن ثم فإنه من الشائع دراسة التأثيرات المتبادلة للمستقبل- المتصلة بعد الوصول إلى حالة الإتران.





شكل ٢-٥ رسم ثابت معدّل الرتبة الأولى الكاذب ( $k_{obs}$ ) للدنو من الاتزان كدالة في تركيز المتصلة. وكما يظهر فإن البيانات تتطابق مع الدالة الخطية التي منها يمكن تقدير قيمة كل من  $k_{off}$  و  $k_{on}$  من الميل والتقاطع مع المحور  $y$  على التوالي

عند الإتزان، فإن تركيز المعقد  $RL$  يكون ثابتاً لذلك فإن معدّلات تكوين وتفكك المعقد يجب أن يكونا متساويين. وبالرجوع إلى معادلة ٥-٤، فإننا نجد أن معدّلات الاتحاد والتفكك يعطيات بالمعادلتين ٥-١٢ و ٥-١٣ على التوالي:

$$\frac{d[RL]}{dt} = k_{on}[R]_f[L]_f \quad (٥-١٢)$$

$$\frac{-d[RL]}{dt} = k_{off}[RL] \quad (٥-١٣)$$

وعند الاتزان، فإن المعدلين يجب أن يكونا متساويين، لذلك:

$$k_{on}[R]_f[L]_f = k_{off}[RL] \quad (٥-١٤)$$

$$[RL] = \frac{k_{on}}{k_{off}} [R]_f [L]_f \quad (١٥-٥)$$

وباستخدام المتساوية أن  $k_{on}/k_{off}$  مكافئ لثابت الارتباط عند الاتزان  $K_a$ ، نحصل على:

$$[RL] = K_a [R]_f [L]_f \quad (١٦-٥)$$

ومن الناحية التجريبية فإنه لا تتوفر طريقة للقياس الجيد للتركيز الحقيقي لكل من المتصلة الحرة أو المستقبل (البروتين). وللتغلب على ذلك، فإنه يفضل وضع معادلة بدلالة التركيزات الكلية للبروتين المضاف و/ أو المتصلة، وهى الكميات التي يمكن التحكم فيها تجريبياً بواسطة الباحث. فإذا أخذنا معادلة حفظ الطاقة (معادلة ١-٥)  $[R] = [RL] + [R]_f$  وقمنا بقسمة طرفي المعادلة على  $1 + ([RL]/[R]_f)$ ، ثم إجراء بعض التحورات الجبرية، نحصل على:

$$[R]_f = \frac{[R]}{1 + \frac{[RL]}{[R]_f}} \quad (١٧-٥)$$

وباستخدام المتساوية  $K_a = [RL]/[R]_f [L]_f$  (من المعادلة ٣-٥)، ثم إجراء قليل من العمليات الجبرية، نحصل على:

$$[RL] = K_a [L]_f \frac{[R]}{1 + K_d [L]_f} \quad (١٨-٥)$$

وإعادة تنظيم معادلة ١٨-٥ واستخدام المتساوية  $K_d = 1/K_a$  (معادلة ٥-٥) نحصل على:

$$[RL] = \frac{[R][L]_f}{K_d + [L]_f} \quad (١٩-٥)$$

وتحت معظم الظروف فإن تركيز المستقبل يكون أقل كثيراً عن تركيز المتصلة. ومن ثم فإن تكوين المعقد الثنائي RL لا يقلل معنوياً تركيز المتصلة الحرة. وبذلك فإنه يمكن إجراء تقدير تقريبي أن تركيز المتصلة الحرة تكون تقريباً نفس التركيز الكلي للمتصلة المضافة:

$$[L]_f \cong [L] \quad (٢٠-٥)$$

ومع هذا التقريب، فإن معادلة ١٩-٤ يمكن إعادة كتابتها كالتالي:

$$[RL] = \frac{[R][L]}{K_d + [L]} = \frac{[R]}{1 + \frac{[K_d]}{[L]}} \quad (٢١-٥)$$

حيث  $[RL]$  = تركيز RL عند الاتزان

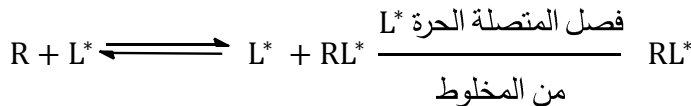
$[L]$  = التركيز الكلي للمتصلة المضافة

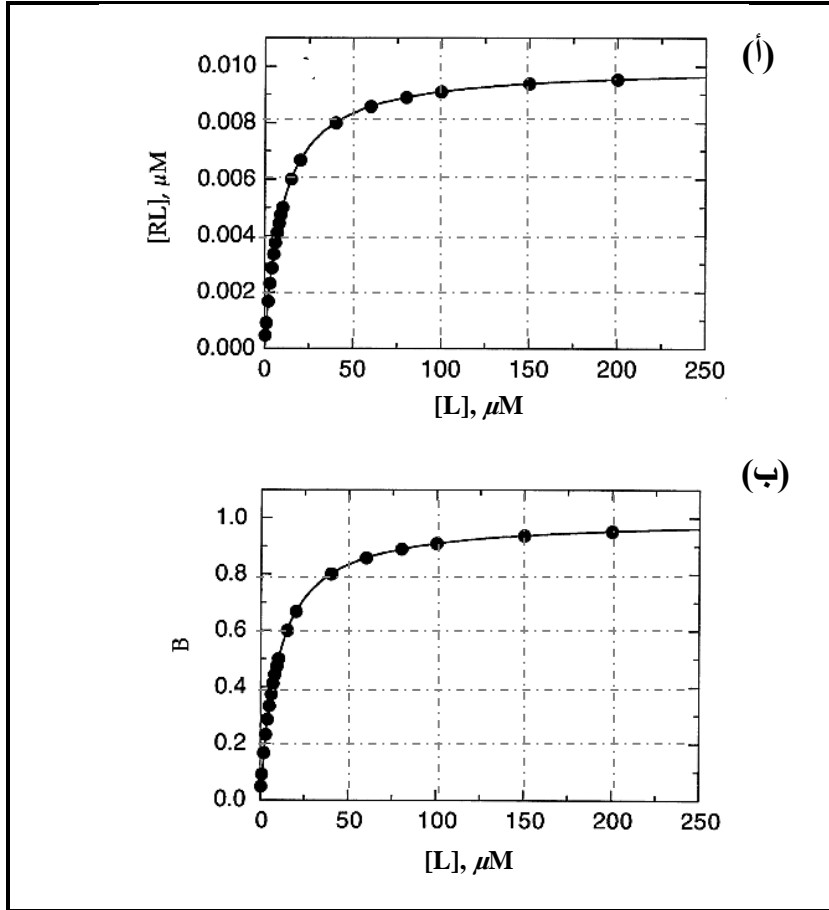
تجريبياً فإنه تركيز معين من المتصلة L يضافة إلى تركيز معروف من المستقبل R ثم يقدر تركيز RL عند الاتزان. ثم تكرر هذه التجربة عدة مرات حيث يستخدم في كل مرة تركيز مختلف من المتصلة إلى نفس تركيز المستقبل ويقدر تركيز RL عند الاتزان في كل مرة. ومن ثم يكون لدينا تركيزات RL عند الاتزان مقابل تركيز L المضافة (الكلية) في كل مرة، وهما المتغيرين في معادلة ٢١-٥، ومعادلة ٢١-٥ تصف قطع زائد قائم الزاوية (هذلولي) square hyperbola التي نموذجياً تعبر عن الارتباط الذي يصل إلى حالة التشبع التي تشاهد في كثير من الحالات الكيميائية والفيزيائية والكيموحيوية. ولقد

اشتقت هذه المعادلة أولاً بواسطة لانجمير Langmuir لوصف إدمصاص جزيئات الغاز على السطح الجامد (الصلب) كدالة في الضغط عند درجة حرارة ثابتة (أى تحت ظروف تساوي "ثبات" الحرارة isothermal conditions). ومن ثم فإن هذه المعادلة يطلق عليها المعادلة ثابتة الحرارة ل لانجمير Langmuir isotherm equation. ونظراً لأن البيانات توصف جيداً بهذه المعادلة، فإن رسم [RL] كدالة في التركيز الكلي للمتصلة [L] يشار إليه أحياناً بالارتباط ثابت الحرارة binding isotherms. وشكل ٥-٣ يوضح إثنين من الصياغات للارتباط ثابت الحرارة لإرتباط المستقبل- المتصلة عند الاتزان. والمنحنى المرسوم عبر البيانات في كل حالة يمثل أفضل تطابق غير خطي الذي يعطي أقل إنحراف عن البيانات لمعادلة (٥-٢١) التي يمكن للباحث الحصول على تقدير لكل من  $K_d$  والتركيز الكلي للمستقبل R.

● في شكل ٥-٣ (أ): تم تطبيق معادلة ٥-٢١ مباشرة على البيانات برسم العلاقة بين تركيز المعقد RL عند الاتزان مقابل تركيز المتصلة الكلي (المضاف) L حيث يمكن من منحنى التطابق تقدير  $K_d$  والتركيز الكلي للمستقبل. ومثل هذا الارتباط ثابت الحرارة يستخدم في أنواع من الدراسات الكيموحيوية؛ وسوف نرى أمثلة لإستخدام مثل هذه الرسومات البيانية في الفصول التالية عند مناقشة إرتباط الإنزيم- المادة الخاضعة والإنزيم - المثبط.

● شكل ٥-٣ (ب): ليس من الضروري، وكثيراً ما يكون غير متاح معرفة التركيز الكلي للمستقبل R في تجربة تتطلب إستخدام معادلة الإرتباط ثابت الحرارة (معادلة ٥-٢١). فإذا كان لدينا إشارة يمكن قياسها تجريبياً التي تعبر عن تركيز معقد المستقبل- المتصلة (RL) بصورة منفردة (مثال ذلك النشاط الإشعاعي المرتبط بالمستقبل بعد فصله من المتصلة الحرة النشطة إشعاعياً  $(L^*)$ ).





شكل ٣-٥ (أ) الارتباط ثابت الحرارة لتكوين المعقد الثنائي  $RL$  كدالة في تركيز المتصلة  $L$  (ب) البيانات من (أ) معبرا عنها بمعدل جزء المستقبل المشغول بالمتصلة  $B$ . والبيانات في الرسم (أ) و(ب) متطابقتين مع المعادلتين ٢١-٥ و ٢٣-٥.

فإننا يمكن أن نشيد ارتباط ثابت الحرارة. دعنا نفترض أن لدينا إشارة  $Y$  التي يمكن تتبعها كمقياس ل  $[RL]$ . وبلغة الإشارة، فإن معادلة الارتباط ثابت الحرارة (معادلة ٥-٢١) يمكن إعادة صياغتها كالتالي:

$$Y = \frac{Y_{\max}}{1 + \frac{[K_d]}{[L]}} \quad (٢٢-٥)$$

ومن ثم، فإن قيم  $Y_{\max}$  و  $K_d$  يمكن تقديرهما من منحنى التتابع لـ  $Y$  كدالة في تركيز المتصلة لمعادلة ٥-٢٢.

لاحظ أن النسبة  $Y/Y_{\max}$  تساوي  $[RL]/[R]$  لأى تركيز من المتصلة. إن النسبة  $[RL]/[R]$  يشار إليها بجزء المستقبل المشغول fractional occupancy بالمتصلة، وكثيراً ما يشار إليها بالرمز  $B$  (مشتقة من المستقبل المرتبط bound receptor). وكلا المعادلتين ٥-٢١ و ٥-٢٢ يمكن صياغتها بدلالة جزء المستقبل المشغول بقسمة كلا طرفي المعادلتين بـ  $[R]$  و  $Y_{\max}$  على التوالي:

$$\frac{[RL]}{[R]} = \frac{Y}{Y_{\max}} = B = \frac{1}{1 + \frac{K_d}{[L]}} \quad (٥-٢٣)$$

وهذه الصورة من معادلة الإرتباط ثابت الحرارة (شكل ٣-٥ ب) تكون مفيدة في تسوية normalizing البيانات من عينات المستقبل المختلفة، التي قد تكون مختلفة قليلاً في تركيزات المستقبل الكلية بغرض مقارنة قيم  $K_d$  والارتباطات ثابتة الحرارة ككل.

## ٥-٢ ارتباط المتصلة بمستقبل يحتوي على أكثر من موقع إرتباط

في الجزء السابق ناقشنا النموذج البسيط الذي أفترضنا فيه أن جزئ المستقبل يحتوي على موقع ارتباط فردي خاص للمتصلة. لذلك، فإن مولارية مواقع الارتباط الخاصة بالمتصلة تكون مماثلة لمولارية جزيئات المستقبل. مع ذلك فإن توجد أمثلة عديدة التي تكون فيها المستقبلات عديدة التكافؤ multivalent للمتصلة: بمعنى أن جزئ المستقبل يحتوي على أكثر من موقع ارتباط للمتصلة. بعض الحالات تكون مواقع الارتباط في جزئ المستقبل متكافئة ومستقلة، وفي حالات أخرى تكون غير متكافئة.

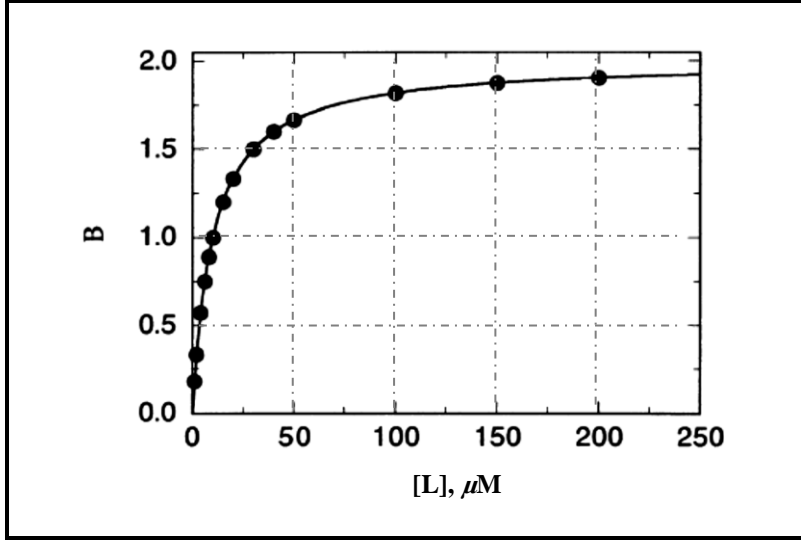
### ١-٢-٥ مواقع الارتباط المتعددة المتكافئة

سوف نبدأ هنا بالحالة البسيطة للتكافؤ المتعدد التي فيها كل موقع ارتباط للمتصلة يسلك سلوكاً مستقلاً ومتماثلاً بالنسبة لإرتباط المتصلة. بمعنى أن ألفة كل موقع للمتصلة تكون نفسها مثل كل مواقع الارتباط الأخرى (أى لهم نفس قيم  $K_d$ ). وارتباط المتصلة عند أحد المواقع ليس لها تأثير على ألفة مواقع الارتباط الأخرى على نفس جزئ المستقبل (إرتباط مستقل). في هذه الحالة فإن الارتباط ثابت الحرارة المشيد برسم تركيز المتصلة المرتبطة كدالة في المتصلة الكلية المضافة لا يمكن تمييزه عن ذلك المعروض في شكل ٣-٥ (أ)، ومعادلة الارتباط ثابت الحرارة ما زالت تصف هذه الحالة. ولكن الآن فإن مولارية مواقع الارتباط الخاصة المتاحة للمتصلة سوف تكون  $n[R]$  حيث  $n$  هي عدد مواقع الارتباط الخاصة لكل جزئ من المستقبل.

$$[RL] = \frac{n[R]}{1 + \frac{K_d}{[L]}} \quad (٢٤-٥)$$

ومرة أخرى فإن الرسم البياني للجزء المشغول كداله في تركيز المتصلة الكلي المضاف لا يمكن تمييزه كميّاً الآن عن شكل ٣-٥ (ب)، فيما عدا أن القيمة العظمى لـ  $B$  تصبح الآن  $n$  وليس 1.0 (شكل ٤-٥).

$$B = \frac{n}{1 + \frac{K_d}{[L]}} \quad (٢٥-٥)$$



شكل ٥-٤: الإرتباط ثابت الحرارة للمستقبل الذي يحتوي على موقعين (n) متكافئين لإرتباط المتصلة. البيانات في هذا المنحنى تتطابق مع معادلة ٥-٢٥.

### ٥-٢-٢ مواقع الارتباط المتعددة غير المتكافئة والمستقلة

من الممكن أيضاً لجزئ مستقبل فردي أن يحتوي على أكثر من نوع من مواقع الارتباط الخاصة المستقلة لنوع فردي من المتصلة، التي فيها كل نوع من مواقع الارتباط يكون له ثابت تفكك  $K_d$  مختلف. فعلى سبيل المثال فإنه في إرتباط البروتونات  $H^+$  بالبروتين، فإن مواقع الارتباط تكون مجموعات كيميائية مختلفة مثل مجموعات الأمينو والكربوكسيل والهيدروكسيل، وكل من هذه المجموعات (مواقع الارتباط) يكون لها ثابت تفكك مختلف. في هذه الحالة فإن الارتباط ثابت الحرارة للمستقبل سوف تؤلف من الارتباط ثابت الحرارة الفردي لكل نوع من الارتباط ثابت الحرارة:

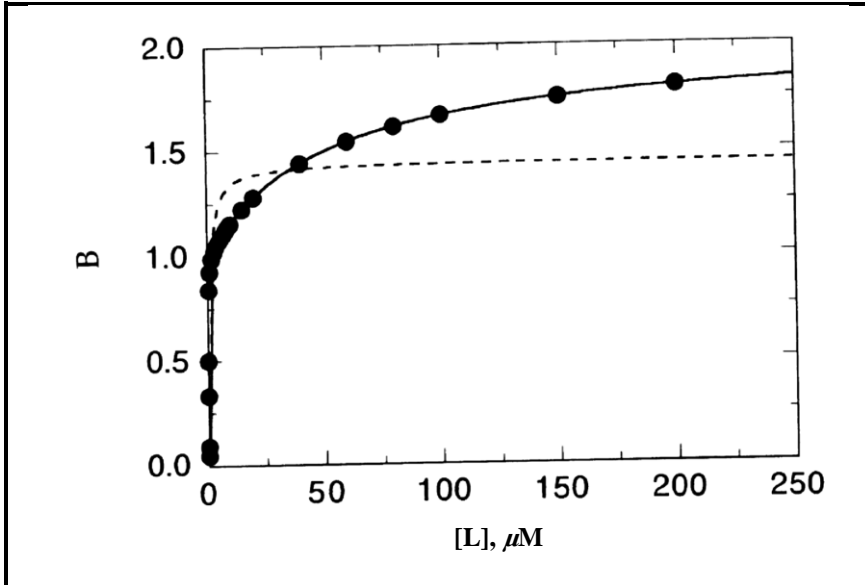
$$B = \sum_{i=1}^{i=j} \frac{n_i}{1 + \frac{K_d^i}{[L]}} \quad (٥-٢٦)$$



دعنا نأخذ أبسط هذه الحالات الذي يحتوي فيها جزئ المستقبل على نوعين مميزين من مواقع الارتباط. وسوف نشير إلى هذه المواقع لكل جزئ مستقبل بـ  $n_1$ ,  $n_2$ . وثابت التفكك الفردية لكل نوع من موقعي الارتباط تعرف بـ  $K_d^1$  و  $K_d^2$ . ومن ثم فإن الارتباط ثابت الحرارة الكلي يعطي بـ

$$B = \frac{n_1}{1 + \frac{K_d^1}{[L]}} + \frac{n_2}{1 + \frac{K_d^2}{[L]}} \quad (٢٧-٥)$$

وإذا كان  $K_d^1$  و  $K_d^2$  مختلفين جداً (بحوالي عامل يساوي 100)، فإنه من الممكن مشاهدة وجود موقعين ارتباط غير متكافئين في شكل الارتباط ثابت الحرارة. وهذا موضح في شكل ٥-٥ للمستقبل الذي يحتوي على نوعين إثنين الإرتباط مع ثابتين تفكك 0.1 و 50  $\mu M$  على التوالي.



شكل ٥-٥ منحنى الإرتباط ثابت الحرارة لمستقبل يحتوي على إثنين من مواقع الإرتباط غير المتكافئة للمتصلة. وموقعي الإرتباط للمتصلة أحدهما له  $K_d$  تساوي 0.1  $\mu M$  والثاني له  $K_d$  تساوي 50  $\mu M$ . والخط المصمت خلال البيانات يمثل أفضل تطابق لمعادلة ٢٧-٥. بينما الخط المنقطع يمثل أفضل تطابق لمعادلة ٢٣-٥.

### ٥-٢-٣ التأثيرات التعاونية بين مواقع الارتباط المتعددة

حتى الآن قد أفترضنا أن مواقع الارتباط المتعددة على جزئ المستقبل (سواءً كانت متكافئة أو غير متكافئة) تسلك سلوكاً مستقلاً عن بعضها بالنسبة لإرتباط المتصلة. مع ذلك، فإن هذا ليس هو الحال دائماً. ففي بعض الحالات فإن إرتباط المتصلة بأحد المواقع على المستقبل سوف يؤثر على ألفة المواقع الأخرى لنفس المتصلة على الجزئ. وعندما تتغير ألفة أحد المواقع على المستقبل بواسطة الموقع الآخر المشغول بالمتصلة، فيقال أن الموقعين يظهران ارتباطاً تعاونياً *cooperative binding*. وإذا كان ارتباط المتصلة عند أحد المواقع يزيد ألفة الموقع الآخر للمتصلة. فيقال أن المواقع تظهر تعاونية موجبة *positive cooperatively*، من ناحية أخرى إذا كان ارتباط المتصلة عند أحد المواقع يخفض ألفة الموقع الآخر للمتصلة فيقال أن المواقع تظهر تعاونية سالبة *negative cooperativity*. والتعاونية هي جزء من ظاهرة عامة يطلق عليها الألوسثيرية *allostery* (غير الوضعية) والتي تشير إلى الإتصال طويل المسافة (التأثير عن بعد) بين المواقع. وكل من صور التعاونية الموجبة والسالبة تشاهد في الطبيعة، وهذه تمثل آلية عامة للتحكم في العمليات الكيموحيوية مثال ذلك مسارات الأيض. وفي الفصل ١٤ سوف نناقش التعاونية والألوسثيرية وتطبيقاتها على الحفز الإنزيمي.

### ٥-٣ تحليل الرسم البياني لبيانات ارتباط المتصلة عند الاتزان

يعتبر الرسم البياني المباشر لبيانات ارتباط المستقبل- المتصلة بإستخدام التطابق غير الخطي هو أفضل قياس لمعاملات الارتباط  $K_d$  و  $n$  (و  $n$  هي العدد الكلي لمواقع الارتباط لكل جزئ مستقبل). ولكن قبل انتشار الحاسوب الشخصي، فإن طرق تطابق المنحنى غير الخطي لم تكن تطبق بصورة روتينية على البيانات التجريبية. ومن ثم فإن الباحثين في كل المجالات كانت تقوم بالتحويل الرياضي للبيانات التي تؤدي إلى رسوم بيانية خطية، ومن ثم يسهل رسم البيانات وتحليلها. وفي الأجزاء التالية سوف نعرض ثلاثة طرق للتحويل الخطي لبيانات ارتباط المتصلة. ويجب التنويه أن طرق التحويل لخطي لا يوصى باستخدامها، حيث أنه في الوقت الحاضر من السهل إستخدام التطابق غير

الخطي رقمياً مباشرة لبيانات ارتباط المتصلة. وهذه الطرق تعرض هنا من منظور تاريخي.

### ١-٣-٥ رسم المقلوب المزدوج

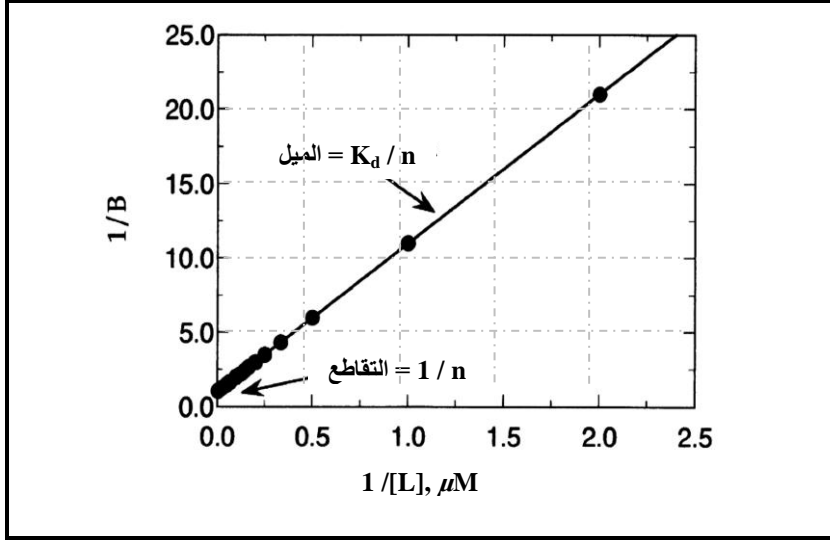
أحد الطرق للتحويل الخطي لبيانات ارتباط المتصلة هو إعادة تنظيم المعادلة في صورة مقلوب مزدوج reciprocal form. فأخذ مقلوب كلا من طرفي معادلة ٢٥-٥ يؤدي إلى التعبير التالي:

$$\frac{1}{B} = \left( \frac{K_d}{n} \right) \frac{1}{[L]} + \frac{1}{n} \quad (٢٨-٥)$$

ومقارنة معادلة ٢٨-٥ مع المعادلة القياسية للخط المستقيم التالية:

$$y = (ax) + b \quad (٢٩-٥)$$

حيث  $a =$  الميل و  $b =$  التقاطع مع المحور  $x$ . نجد أن معادلة ٢٨-٥ تشير أن رسم  $1/B$  كدالة في  $1/[L]$  سوف ينتج رسم بياني خطي مع ميل يساوي  $K_d/n$  وتقاطع مع المحور  $y$  يساوي  $1/n$  (شكل ٦-٥). والرسم البياني من هذا النوع يشار إليه بالمقلوب المزدوج double-reciprocal. وسوف نرى في فصل ٦ أن رسومات بيانية مماثلة تستخدم في التعبير عن بيانات الحالة الثابتة لحركية الإنزيم. وفي هذا السياق، فإن هذه الرسومات البيانية يشار إليها بالرسومات البيانية لـ لينويفر-بورك Lineweaver-Burk plots.



شكل ٥-٦ الرسم البياني المقلوب- المزدوج للبيانات في شكل ٥-٣. والبيانات في هذا النوع من الرسوم البيانية تتطابق مع الدالة الخطية التي منها يتم تقدير  $1/n$  و  $K_d/n$  من قيم التقاطع مع المحور y والميل على التوالي.

### ٥-٣-٢ رسم سكاتشارد

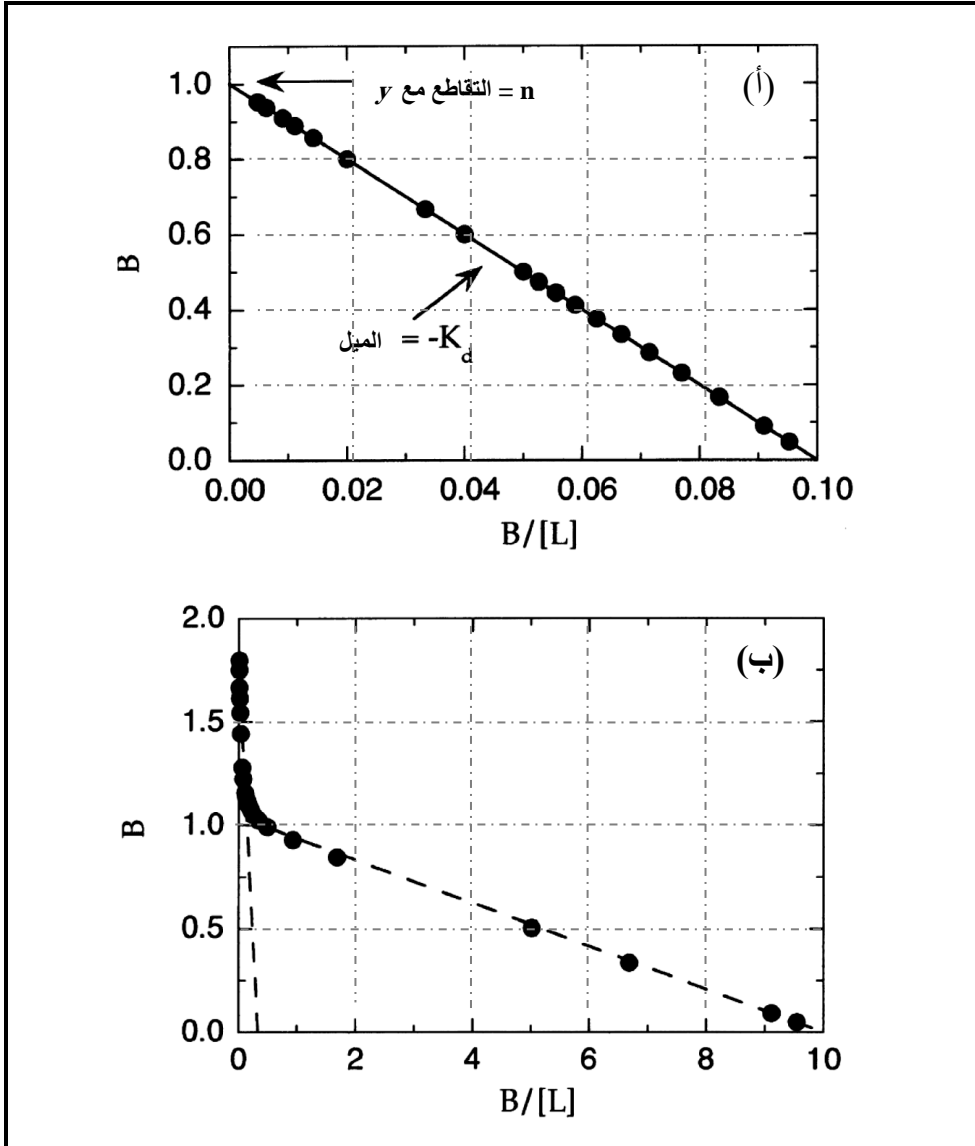
الطريقة الثانية للتحويل الخطي تشتمل على ضرب طرفي معادلة ٥-٢٥ في  $(1 + K_d/[L])$  لنحصل على:

$$B \left( 1 + \frac{K_d}{[L]} \right) = n \quad (٣٠-٥)$$

وهذه المعادلة يمكن إعادة ترتيبها لنتنتج:

$$B = -K_d \left( \frac{B}{[L]} \right) + n \quad (٣١-٥)$$

ومن معادلة ٥-٣١ نجد أن رسم B كدالة في  $B/[L]$  يعطي خط مستقيم له ميل يساوي  $-K_d$  وتقاطع مع المحور y يساوي n (شكل ٥-٧). والرسم البياني من النوع الموضح



شكل ٧-٥ (أ) رسم سكاتشر لبيانات ارتباط المتصلة المعروضة في شكل ٣-٥ للمعدن الثنائي RL (n=1). وفي هذا النوع من الرسوم البيانية، فإن البيانات تتطابق مع المعادلة الخطية (٣١-٥) التي منها يمكن تقدير كل من  $K_d$ ، n من قيم التقاطع مع المحور y والميل على التوالي. وفي حالة إحتواء المستقبل على مواقع ارتباط متعددة متكافئة، فإن رسم سكاتشر يظل خطي ولكن مع تقاطع  $n > 1$ . (ب) رسم سكاتشر للمستقبل الذي يحتوي على مواقع ارتباط للمتصلة غير متكافئة. البيانات مأخوذة من شكل ٥-٥. والخطوط المتقطعة هي محاولة لتطابق البيانات للمعادلتين الخطيتين المستقلتين. هذا النوع من التحليل لرسم سكاتشر غير الخطي لا يكون مناسباً لأنه يؤدي إلى خطأ معنوي في تقدير قيم  $K_d$  الفردية.

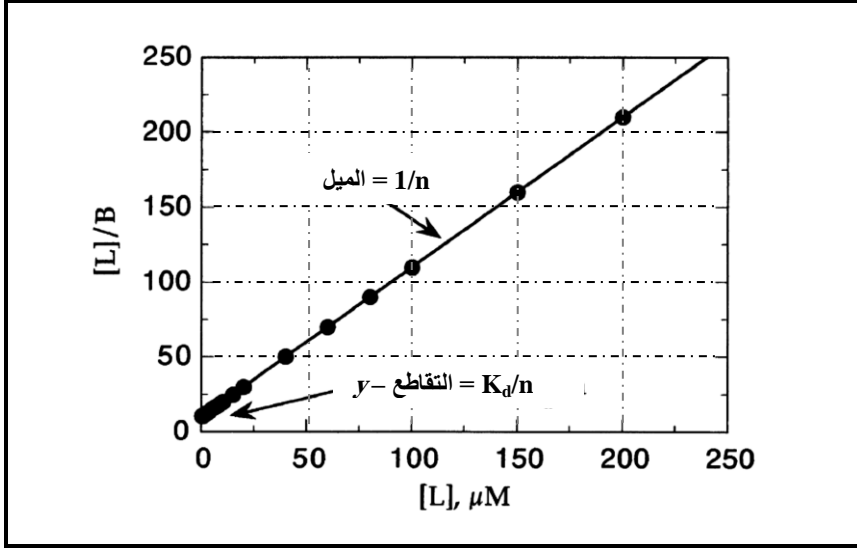
في شكل ٥-٧، يعرف برسوم سكاتشر Scatchard plots وهو أكثر التحولات الخطية التي تستخدم في بيانات ارتباط المتصلة. وسوف نقابل هذا النوع من الرسم في فصل ٦ لتحليل بيانات الحالة الثابتة لحركيات الإنزيم؛ وفي هذا السياق فإن هذه الرسومات البيانية أحياناً يشار إليها رسومات آدى-هوفستي Eadie-Hofstee plots. لاحظ أنه عندما يحتوي المستقبل على مواقع ارتباط متعددة متكافئة، فإن رسم سكاتشر يبقى خطي ولكن مع تقاطع  $n > 1$ . مع ذلك إذا احتوى المستقبل على مواقع ارتباط متعددة غير متكافئة، فإن رسم سكاتشر لن يصبح خطي وشكل ٥-٧ (ب) يوضح ذلك للمستقبل الذي يحتوي على إثنين من المواقع غير المتكافئة. وفي هذه الحالة فإنه من الصعب تقدير  $K_d$ ،  $n$  لكل نوع من المواقع.

### ٥-٣-٣ رسم هانس- وولف

الطريقة الثالثة للتحول الخطي شائعة الاستخدام يتم الحصول عليها بضرب طرفي معادلة ٥-٢٨ في  $[L]$  لنحصل على:

$$\frac{[L]}{B} = \frac{1}{n} [L] + K_d/n \quad (٥-٣٢)$$

التي منها نجد أن رسم  $[L]/B$  كدالة في  $[L]$  ينتج خط مستقيم مع ميل يساوي  $1/n$  وتقاطع  $K_d/n$  (شكل ٥-٨). ومرة أخرى فإن هذا الرسم البياني يستخدم في تحليل كل من بيانات ارتباط المتصلة وبيانات حركية الحالة الثابتة للإنزيم. وفي كلتا الحالتين يشار إلى هذه الرسومات البيانية برسوم هانس- وولف Hanes Wolff plots.



شكل ٥-٨ رسم هانس- وولف لبيانات ارتباط المتصلة المعروضة في شكل ٥-٣. في هذا النوع من الرسومات البيانية فإن البيانات تتطابق مع المعادلة الخطية التي منها يمكن الحصول على تقدير  $1/n$  و  $K_d/n$  من قيم الميل والتقاطع مع المحور y على التوالي.

ويجب التنويه إلى أن التحولات الخطية للبيانات يمكن أن تؤدي إلى أخطاء نتيجة للتحولات ذاتها. كما أن بعض طرق التحولات الخطية تعطي ثقل غير متوازن لبعض نقاط البيانات التجريبية. ولذلك فإنه في الوقت الحالي يستخدم العلماء تطابق المنحنى غير الخطي في تحليل البيانات التجريبية التي تعطي نتائج أكثر دقة لـ  $K_d$  و  $n$ .

#### ٥-٤ الارتباط القوي بين المتصلة والمستقبل

في كل المعادلات التي تم اشتقاقها حتى الآن فإننا افترضنا أن تركيز المستقبل R المستخدم في التقدير التجريبي لـ  $K_d$  يكون أقل كثيراً عن  $K_d$ . وهذا يسمح لنا باستخدام تقريب مبسط أن تركيز المتصلة الحر  $(L)_{free}$  يساوي التركيز الكلي للمتصلة المضافة لمخلوط الارتباط  $[L]$ . مع ذلك، إذا كانت ألفة المتصلة للمستقبل قوية جداً، بحيث أن  $K_d$  تماثل في قيمتها لتركيز المستقبل فإن هذا الافتراض لم يعد صحيحاً. في هذه الحالة فإن ارتباط المتصلة لتكوين المعقد RL يستنفذ بدرجة كبيرة (معنوياً) تركيز المتصلة

الحررة. ومن ثم فإن استخدام معادلة الارتباط ثابت الحرارة (معادلة لانجمير) للتطابق مع البيانات التجريبية سوف يؤدي إلى أخطاء في تقدير  $K_d$ . لذلك يجب أن نضع معادلة التي تأخذ في الاعتبار صراحة استنفاد تركيز المتصلة الحررة والمستقبل نتيجة لتكوين المعقد الثنائي  $RL$ . وهنا سوف نبدأ بمعادلتنا حفظ الكتلة ١-٥ و ٢-٥.

وباستخدام هاتين المعادلتين، فإن معادلة ٤-٥ يمكن إعادة صياغتهما بدلالة تركيز المستقبل الحر والمتصلة الحررة كالتالي:

$$K_d = \frac{([R] - [RL])([L] - [RL])}{[RL]} \quad (٣٣-٥)$$

وإذا ضربنا كلا الطرفين لمعادلة ٣٣-٥ في  $[RL]$  ثم طرحنا الحد  $K_d[RL]$  من كلا الطرفين نحصل على:

$$0 = ([R] - [RL])([L] - [RL]) - K_d[RL] \quad (٣٤-٥)$$

التي يمكن إعادة ترتيبها إلى:

$$0 = [RL]^2 - ([R] + [L] + K_d)[RL] + [R][L] \quad (٣٥-٥)$$

ومعادلة ٣٥-٥ هي معادلة من الدرجة الثانية لـ  $[RL]$ . ونحن نعلم من أوليات الجبر أن مثل هذه المعادلة لها حلين. مع ذلك فإنه في حالتنا هذه، فإن واحد فقط من هذه الحلول يكون له معنى فيزيائي:

$$[RL] = \frac{([R] + [L] + K_d) - \sqrt{([R] + [L] + K_d)^2 - 4[R][L]}}{2} \quad (٣٦-٥)$$



ومعادلة الدرجة الثانية السابقة تكون دائماً صحيحة جداً لأي تأثير متبادل لارتباط المستقبل- المتصلة. وعندما يكون استنفاد المتصلة أو المستقبل غير معنوياً تستخدم معادلة الارتباط ثابت الحرارة (معادلة ٥-٢١). ويجب على القارئ أن يكون حذراً بالنسبة للافتراضات المذكورة سابقاً. وكما سنرى في فصل ١٢، فإن المثبطات التي تحاكي الحالة الانتقالية للتفاعل الإنزيمي ترتبط بقوة بجزئ الإنزيم. في مثل هذه الحالة، فإن ثابت التفكك لمعقد الإنزيم - المثبط يمكن تقديره بدقة فقط باستخدام معادلة الدرجة الثانية مثل معادلة ٥-٣٦.

### ٥-٥ التنافس بين المتصلات لموقع ارتباط مشترك

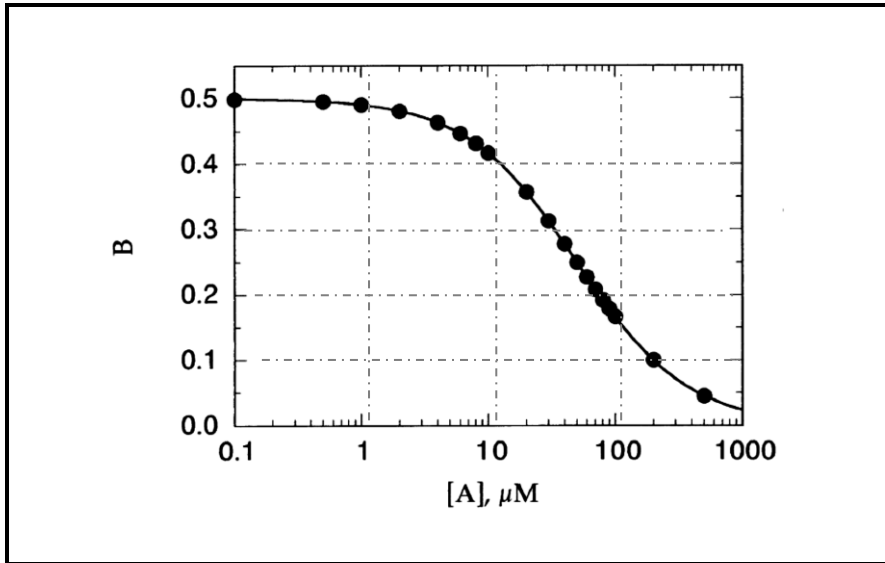
في كثير من الحالات يود الباحث أن يقارن ألفة عدد من المتصلات لمستقبل فردي. مثال ذلك مقارنة المتصلة الطبيعية (المادة الخاضعة لإنزيم ما) مع متصلة غير طبيعية (مثال ذلك مثبط لنفس الإنزيم). وهذه تمثل الخطة الشائعة لتصميم العقاقير التي تعمل بغلق نشاط إنزيمات أساسية التي تكون حاسمة في عملية مرض خاص.

إذا كان أحد المتصلات (أي المتصلة الطبيعية) لها أحد الخصائص الفيزيوكيميائية الخاصة التي تسمح بالكشف عنها والكشف عن المعقد RL، فإنه يمكن استخدام تجارب تنافسية لتقدير ألفة عدد آخر من المتصلات. فالمتصلة الأولى يمكن أن تكون نشطة إشعاعياً بإدماج نظير مشع radioisotope في تركيبها. البديل عن ذلك أنه يمكن أن تحتوي على إشارة ضوئية أو إشعاع ضوئي (فلوروسنسي)، أو تستحث نشاط بيولوجي للمستقبل بطريقة يمكن تتبعها بسهولة (أي نشاط إنزيمي يستحث بواسطة المادة الخاضعة). ولشرح ذلك دعنا نفترض أن المتصلة الطبيعية L تم تعليمها إشعاعياً وإننا يمكن الكشف عن تكوين المعقد RL بقياس النشاط الإشعاعي المرتبط بالبروتين بعد فصل البروتين من المتصلة الحرة باستخدام طريقة ما (قسم ٥-٦). وتحت هذه الظروف فإننا يمكن تقدير  $K_d$  للمستقبل بواسطة المعايرة مع المتصلة المعلمة إشعاعياً كما سبق شرحه. وبتقدير قيمة  $K_d^L$ ، فإننا نثبت تركيز المستقبل والمتصلة للحصول على تركيز محدد من معقد المستقبل- المتصلة [RL]. وإضافة متصلة ثانية غير معلمة (A) التي

ترتبط بنفس الموقع لإرتباط المتصلة المعلمة، حيث يحدث تنافس بين المتصلتين لنفس الموقع على المستقبل. ومن ثم فإنه بزيادة تركيز المتصلة A، فإن كمية أقل من المتصلة المعلمة L تتنافس بفاعلية لمواقع الارتباط، وسوف ينخفض بذلك تركيز [RL] المتكون. ورسم [RL] أو B كدالة في [A] سوف يظهر كمقلوب لمنحنى الارتباط ثابت الحرارة (شكل ٩-٥) الذي منه يمكن تقدير ثابت التفكك للمتصلة غير المعلمة ( $K_d^A$ ) من تطابق البيانات التجريبية للمعادلة التالية:

$$B = \frac{[RL]}{[R]} = \frac{n}{1 + \frac{K_d^L}{[L]} \left( 1 + \frac{[A]}{K_d^A} \right)} \quad (٣٧-٥)$$

وسوف نشاهد صورة من هذه المعادلة في فصل ١١ عندما نناقش التثبيط التنافسي للإنزيمات. وتطابق البيانات في شكل ٩-٥ مع معادلة ٣٧-٥ يعطينا تقدير جيد لـ  $K_d^A$  بافتراض أن الباحث يعرف مسبقاً قيم [L] و  $K_d^L$



شكل ٩-٥ الارتباط ثابت الحرارة لتنافس ارتباط المتصلة. B هي الجزء المشغول من المستقبل مع المتصلة المعلمة (L) ويقاس كدالة في تركيز المتصلة الثانية غير المعلمة (A). وفي هذه الحالة  $K_d^L = 10 \mu M$  و  $K_d^A = 25 \mu M$  والخط خلال البيانات يمثل أفضل تطابق لمعادلة ٣٥-٥.

## ٥-٦ الطرق التجريبية لقياس ارتباط المتصلة

إن موضوع هذا الكتاب يتعلق بالإنزيمات والتأثيرات المتبادلة بينهما وبين المتصلات مثل المواد الخاضعة والمثبطات. وأكثر الوسائل الشائعة في دراسة هذه التأثيرات المتبادلة يكون خلال قياسات حركات الحالة الثابتة steady state kinetic وهذه الطرق سوف يتم مناقشتها بالتفصيل في فصل ١٠. وتوجد فئتان أساسيتان لقياس ارتباط المستقبل-المتصلة.

● في الأولى، فإن المتصلة يكون لها خواص كيموفيزيائية فريدة مثل النشاط الإشعاعي، الإشعاع الضوئي (الفلوروسنس) أو إشارة ضوئية. ومن ثم فإن تركيز معقد المستقبل-المتصلة يتم تقديره بقياس هذه الإشارة الفريدة بعد فصل جزء المستقبل المرتبط بالمتصلة فيزيائياً من المتصلة الحرة. وهذا عادة ما يتم بواسطة اتزان الفرز الغشائي equilibrium dialysis وطرق ترشيح الغشاء membrane filtration وكروماتوجرافي الإقصاء الحجمي size exclusion chromatography والطرْد المركزي centrifugation.

● في الفئة الثانية، فإن معقد المستقبل - المتصلة ذاته يكون له إشارة طيفية مميزة مرتبطة بالمعقد بمفرده. وهذا النوع من الطرق لا يحتاج إلى فصل فيزيائي للمتصلة الحرة عن المتصلة المرتبطة، حيث أن المتصلة المرتبطة فقط هي التي تؤدي إلى الإشارة المميزة. ويستخدم في ذلك الطرق الطيفية spectroscopic methods. وهنا سوف نعرض طريقة اتزان الفرز الغشائي من الفئة الأولى والطريقة الطيفية من الفئة الثانية.

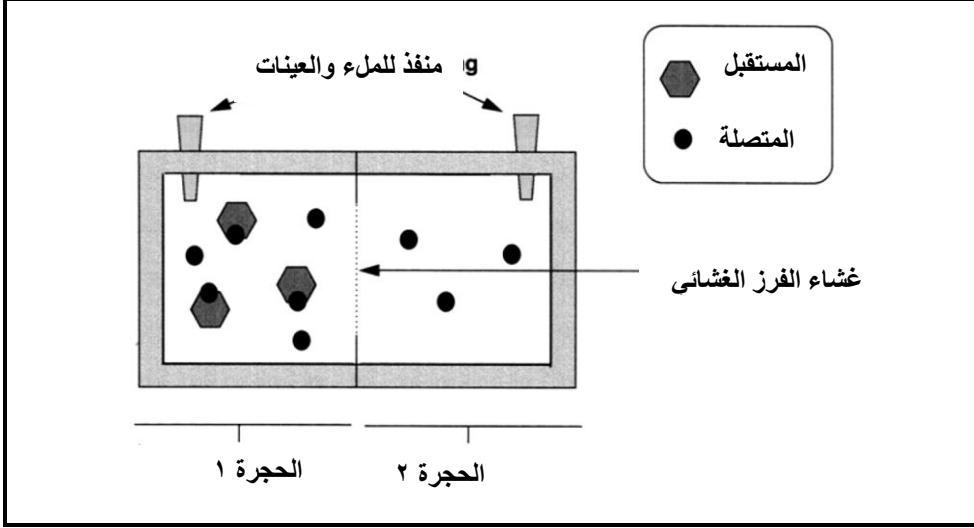
## ٥-٦-١ اتزان الفرز الغشائي

اتزان الفرز الغشائي equilibrium dialysis هو أكثر الطرق رسوخاً لفصل المتصلة الحرة (L) عن المتصلة المرتبطة بالمستقبل (RL) بعضهما عن بعض. واستخدام هذه الطريقة يعتمد على إشارة فيزيائية مميزة مزاملة للمتصلة؛ وهذه عادة ما تكون إشارة نشاط إشعاعي أو إشعاع ضوئي.

والجهاز النموذجي لإجراء قياسات إتران الفرز الغشائي موضح في شكل ٥-١٠. يتألف الجهاز من حجرتين متساويتين في الحجم واللذان يفصلان عن بعضهما بغشاء شبه منفذ (متوفر تجارياً). ويختار الغشاء بحيث يسمح بانتشار المتصلات (ذوات الوزن الجزيئي الصغير) عبر الغشاء تحت الضغط الإسموزي، بينما جزيئات المتصلة (البروتين) الكبيرة لا تستطيع المرور خلال الغشاء.

ويتم إجراء التجربة كالتالي:

- ١- عند بداية التجربة تملأ أحد الحجرات بحجم معلوم من محلول يحتوي على تركيز محدد من المستقبل (البروتين). والحجرة الأخرى تملأ بنفس الحجم من نفس المحلول يحتوي على المتصلة ولكن بدون البروتين، ثم تسد الحجرتين.
- ٢- ثم يوضع الجهاز على هزاز دوّار أو دوّار ميكانيكي في وعاء منظم للحرارة (مثل حمام مائي أو حضانة) للوصول إلى خلط جيد للمحلول في كل حجرة والمحافظة على الإتران الحراري.
- ٣- تترك المحاليل تحت هذه الظروف حتى الوصول إلى حالة الاتزان. وعند هذا الوقت تزال عينة معلومة الحجم من كل حجرة ويتم فيها تقدير المتصلة كميّاً من الإشارة المزاملة للمتصلة (مثل النشاط الإشعاعي).
- ٤- عند الاتزان فإن تركيز المتصلة في الحجرة الخالية من المستقبل (الحجرة ٢) يعبر عن تركيز المتصلة الحرة. وتركيز المتصلة في الحجرة المحتوية على المستقبل (الحجرة ١) يعبر عن مجموع تركيزات المتصلة الحرة والمتصلة المرتبطة بالمستقبل. ومن ثم فإنه من هذين القياسيين يمكن تقدير تركيز كل من المتصلة الحرة  $[L]_f$  والمتصلة المرتبطة  $[RL]$ ، وبالتالي تقدير ثابت التفكك  $K_d$  من معادلة ٥-٤.



شكل ٥-١٠ مخطط توضيحي لجهاز إيزان الفرز الغشائي. الحجرتين ١ و ٢ ينفصلان عن بعضهما بواسطة غشاء فرز شبه منفذ. عند بداية التجربة تملأ الحجرة ١ مع محلول يحتوي على جزيئات المستقبل والحجرة ٢ تملأ بحجم متساوي من نفس المحلول يحتوي على جزيئات المتصلة بدلا من جزيئات المستقبل. وبعد فترة مناسبة يحدث إيزان للمتصلة بين الحجرتين. وبعد الوصول لحالة الاتزان فإن تركيز المتصلة في الحجرة ١ سوف يعبر عن مجموع المتصلة الحرة والمتصلة المرتبطة بالمستقبل، بينما تركيز المتصلة في الحجرة ٢ يمثل تركيز المتصلة الحرة.

إن القياس الدقيق لثابت التفكك من إيزان الفرز الغشائي يعتمد على بلوغ حالة الاتزان خلال المحلولين في حجرتي الجهاز. لذلك، فإنه يجب تعيين الوقت اللازم للوصول إلى الاتزان لكل تجربة. والطريقة الشائعة لتعيين وقت الاتزان هو إجراء قياس إيزان فرز غشائي في غياب البروتين. فتضاف المتصلة إلى أحد المحلولين المتماثلين اللذان يوضعان في الحجرتين في جهاز الفرز الغشائي كما هو موضح سابقاً. وتزال عينات صغيرة من كل حجرة على فترات زمنية مختلفة ويقدر في كل منهما تركيز المتصلة. والوقت الذي يتساوى فيه تركيز المتصلة في الحجرتين يكون هو الوقت اللازم للوصول إلى إيزان الفرز الغشائي. ويجب الإشارة إلى أن وقت الوصول إلى الاتزان تختلف كثيراً بين المتصلات المختلفة، حتى لو كان للمتصلات وزن جزيئي متقارب. فمن المعروف أن جزيئ أدينوزين ثلاثي الفوسفات ATP يأخذ وقت طويل للوصول إلى حالة الاتزان عبر غشاء الفرز الغشائي مقارنة بالجزيئات الأخرى التي تماثله في الوزن الجزيئي،

ويرجع ذلك إلى أن جزئ ATP يكون مرتبط بجزيئات الماء (متميه hydrated)، وأن معقد ATP- الماء وليس ATP الحر هو الذي ينتشر خلال الغشاء.

وهناك بعض العوامل الأخرى التي يجب أخذها في الاعتبار عند تحليل البيانات من إتران الفرز الغشائي. مثال ذلك إرتباط البروتين والمتصلة بغشاء الفرز أو سطح الحبرات. وبالمثل، فإن وجود شحنات صافية على جزيئات البروتين و/أو المتصلة يمكن أن يؤثر على الاتزان الإسموزي بين الحبرتين (الذي يشار إليه بتأثير دونان Donnan effect) والذي يجب أن يؤخذ في الاعتبار. ويمكن الرجوع إلى موقع (<http://blowwww.chem.utoledo.edu/egDial/into>) الذي يكون نقطة البداية في تصميم مثل هذه التجارب.

#### ٥-٦-٢ الطرق الطيفية

إن معقد المستقبل- المتصلة (RL) أحياناً ما يظهر إشارة طيفية التي تكون مميزة عن المستقبل الحر (R) أو المتصلة (L). وفي هذه الحالة فإن الإشارة الطيفية يمكن أن تستخدم في تتبع تكوين معقد المستقبل- المتصلة، ومن ثم تقدير ثابت التفكك للمعقد. وتوجد أمثلة لذلك في الأبحاث المنشورة للتغيرات المميزة في طيف الامتصاص الضوئي، الإشعاع الضوئي، الامتصاص الإختياري الدائري وطيف الاهتزاز نتيجة لتكوين معقد المستقبل- المتصلة.

ونظراً لحساسية طيف الإشعاع الضوئي، فإنه كثيراً ما يستخدم في تتبع تكوين معقد المستقبل- المتصلة، وسوف نأخذ هذه الطريقة كمثال. كثيراً ما تحتوي المتصلة على إشعاع ضوئي التي تزيد معنوياً أو تكبت (نقل) نتيجة لإرتباطها بالمستقبل. مثال ذلك وارفارين warfarin هو جزئ له إشارة إشعاع ضوئي ومعروف أنه يرتبط بـ ألبومين السيرم. وإشارة الإشعاع الضوئي للوارفارين تزداد كثيراً عند تكوين المعقد. وهذا السلوك قد استخدم في قياس التأثير المتبادل بين هذه المتصلة والألبومين.

كثيراً ما تحتوي البروتينات على الأحماض الأمينية تربتوفان وتيروسين التي لها إشعاع ضوئي، وفي بعض الحالات فإن الإشعاع الضوئي الفعلي لهذه المجموعات يشوش

بارتباط المتصلة بالبروتين. وتوجد بعض الأبحاث المنشورة للبروتينات التي تحتوي على بواقي التريتوفان بالقرب من موقع ارتباط بعض المتصلات. وارتباط المتصلة في هذه الحالات ينتج عنه تغير في كثافة و/أو الطول الموجي الأقصى للتريتوفان المتأثر. وبالمثل أيضاً فإن البروتينات المحتوية على التيروسين تظهر تغيرات في كثافة الإشعاع الضوئي للتيروزين عند تكوين المعقد مع المتصلة. وعدد من البروتينات التي ترتبط بـ DNA، على سبيل المثال، تظهر كبت محسوس للإشعاع الضوئي للتيروزين عند ارتباط DNA بها.

وبصورة عامة فإن الإشارة الطيفية التي تظهر قيم مميزة للصورة المرتبطة والصورة الحرة للمكون النشط ضوئياً (إما المتصلة أو المستقبل) يمكن أن تستخدم في قياس معقد البروتين - المتصلة. افترض أن إشارة ما لها أحد القيم المميزة للصورة الحرة  $\delta_{\text{free}}$  وقيمة أخرى للصورة المرتبطة  $\delta_{\text{bound}}$ . فإذا كانت الصورة النشطة طيفياً هي المستقبل، آنذاك فإن تركيز المستقبل يمكن تثبيته والإشارة عند أي نقطة خلال المعايرة بالمتصلة سوف تعطي كالتالي:

$$\delta = ([RL]\delta_{\text{bound}} + [R]\delta_{\text{free}}) \quad (38-5)$$

وحيث أن  $[R]_{\text{free}}$  تساوي  $[R] - [RL]$ . فإننا يمكن إعادة تنظيم المعادلة السابقة إلى:

$$\delta = ([RL](\delta_{\text{bound}} - \delta_{\text{free}}) + [R](\delta_{\text{free}})) \quad (39-5)$$

ومعادلة 39-5 يمكن إعادة تنظيمها أيضاً لتعطي جزء المستقبل المرتبط عند أي نقطة في المعايرة بالمتصلة كالتالي:

$$\frac{[RL]}{[R]} = \frac{\delta - \delta_{\text{free}}}{\delta_{\text{bound}} - \delta_{\text{free}}} \quad (40-5)$$

وبالمثل، إذا كان النوع النشط طيفياً هو المتصلة، فإن تركيز مثبت من المتصلة يمكن معايرته مع المستقبل، والجزء من المتصلة المرتبطة يمكن تقديره كالتالي:

$$\frac{[RL]}{[R]} = \frac{\delta - \delta_{\text{free}}}{\delta_{\text{bound}} - \delta_{\text{free}}} \quad (٥-٤١)$$

ومن ثم يمكن تقدير ثابت التفكك لمعقد المستقبل- المتصلة من التحليل ثابت الحرارة من بيانات المعايرة الطيفية كما وصف آنفاً.

## أسئلة

١- كل التفاعلات التالية تمثل نماذج لإرتباط المتصلة بالمستقبل (إتران) ما عدا:

- أ- إرتباط المادة الخاضعة مع إنزيم.
- ب- إرتباط مثبت مع إنزيم منظم.
- ج- إرتباط جزيئات الليبيدات مع بعضها في الغشاء الخلوي.
- د- إرتباط الجلوكان بمستقبل على سطح خلية الكبد.
- هـ- إرتباط الحديد مع ترانس فيرين .

٢- ما هو التركيز بالمولر M لبروتين P الذي يحتوي على موقع إرتباط فردي للمتصلة L، إذا

أعطى التحليل بإتران الفرز الغشائي النتائج التالية:

$$10^{-5} M = (L) \text{ تركيز المتصلة الحرة}$$

$$5 \times 10^{-6} M = \text{تركيز المتصلة المرتبطة}$$

$$10^5 = K_a \text{ للفاعل : } P + L \rightleftharpoons PL$$



٣-  $Mg^{2+}$  و ADP يكونان معقد 1:1. وفي تجربة تُبَيِّن فيها تركيز ADP عند  $80 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ، أما تركيز  $Mg^{2+}$  كان متغيراً والنتائج التالية تم الحصول عليها:

|      |      |      |      |      |      |                                               |
|------|------|------|------|------|------|-----------------------------------------------|
| 400  | 200  | 150  | 100  | 50   | 20   | $Mg^{2+}$ الكلي ( $\mu\text{mol dm}^{-3}$ )   |
| 69.5 | 59.8 | 52.8 | 42.7 | 26.0 | 11.6 | $Mg^{2+}$ المرتبط ( $\mu\text{mol dm}^{-2}$ ) |

إحسب ثابت التفكك لـ  $MgADP$  تحت هذه الظروف.

٤- في أحد التجارب بفرض حفظ تركيز الإنزيم ثابتاً عند  $11 \mu\text{mol dm}^{-3}$  أما تركيز المثبط [I] فكان متغيراً، وقد تم الحصول على النتائج التالية:

|      |      |      |      |      |      |     |                                       |
|------|------|------|------|------|------|-----|---------------------------------------|
| 62.4 | 41.6 | 31.2 | 20.8 | 15.6 | 10.4 | 5.2 | [I] الكلي ( $\mu\text{mol dm}^{-3}$ ) |
| 45.8 | 27.4 | 18.9 | 11.3 | 7.95 | 4.8  | 2.3 | [I] الحر ( $\mu\text{mol dm}^{-2}$ )  |

إحسب عدد مواقع الارتباط على الإنزيم وثابت التفكك لمعقد الإنزيم - المثبط.

## الجزء الثالث

### حركات وتخصص وآليات التفاعلات الإنزيمية Kinetic, Specificity and Mechanisms of Enzyme Reactions

|                                              |        |
|----------------------------------------------|--------|
| حركات التفاعلات الإنزيمية لمادة خاضعة أحادية | فصل ٦  |
| تخصص الإنزيمات                               | فصل ٧  |
| الآليات الكيميائية في الحفز الإنزيمي         | فصل ٨  |
| التفاعلات الإنزيمية مع مادتين خاضعتين        | فصل ٩  |
| القياسات التجريبية لنشاط الإنزيم             | فصل ١٠ |

إن الدور الأساسي للإنزيمات في العمليات البيولوجية في الكائنات ينشأ من أربعة خصائص للحفز الإنزيمي ألا وهي:

١- قوة الحفز **catalytic power**، فالإنزيمات تزيد بدرجة كبيرة معدلات التفاعلات الكيميائية على النحو الذي يتسابق مع إحتياجات الكائن.

٢- التخصص **specificity**، فالإنزيمات لها درجة عالية من التخصص لكل من نوع التفاعلات التي تقوم بحفزها وانتقائها للمواد الخاضعة التي تقوم بتحولها.

٣- التنظيم **regulation**، فالخلايا لها القدرة على تنظيم نشاط إنزيمات رئيسية بعدة طرق، ومن ثم يمكن تنسيق عمليات الأيض العديدة اعتماداً على إحتياجاتها والتغير في البيئة ومراحل النمو والتميز بنمط منهجي.

٤- تحول صور الطاقة **transformation of energy forms**، ففي بعض التفاعلات فإن طاقة المتفاعلات تحفظ في صورة مختلفة من الطاقة بكفاءة عالية. ففي التخليق (الإصطناع) الضوئي تتحول طاقة الضوء إلى طاقة الروابط الكيميائية (طاقة كيميائية) وفي انقباض العضلات تتحول الطاقة الكيميائية إلى طاقة ميكانيكية في إنقباض العضلات.

وهذه الخصائص تحافظ على الحالة المنتظمة للكائنات بتكيف زمني بدون تبديد للموارد والمحافظة على الطاقة والاستجابة السريعة للتغيرات البيئية ومراحل النمو والمحافظة على الاتزان البدني **Homoeostasis** (أى المحافظة على بيئة داخلية ثابتة للخلية).

في هذا الجزء من الكتاب سوف نقوم بدراسة الخصائص الأساسية للإنزيمات التي تشمل:

● حركية التفاعلات المحفزة بالإنزيمات لمادة خاضعة فردية (فصل ٦) بطرق

- الحالة الثابتة التي عادة ما تستخدم في تعيين كفاءة الحفز وكذلك ألفة المواد الخاضعة للإنزيمات وتوضيح آلية الحفز من الثوابت الحركية  $k_{cat}$ ,  $K_m$ .
- في فصل ٧ سنناقش خاصية تخصص الإنزيمات بالنسبة لنوع التفاعل الذي تقوم بحفزه واختيارها للمواد الخاضعة.
- وفي فصل ٨ سنتعرف على الآليات الكيميائية في الحفز الإنزيمي التي تفسر قوة الحفز والتخصص للإنزيمات.
- وفي فصل ٩ سنناقش آليات وحركيات التفاعلات الإنزيمية مع مادتين خاضعتين.
- وفي فصل ١٠ والأخير في هذا الجزء سنعرض الطرق التجريبية المستخدمة في قياسات النشاط الإنزيمي وتقدير الثوابت الحركية.



---

## فصل ٦ حركيات التفاعلات الإنزيمية لمادة خاضعة أحادية

### Kinetics of Single Substrate Enzyme Reactions

---

|     |                                                                      |
|-----|----------------------------------------------------------------------|
| ١-٦ | السرعة الابتدائية                                                    |
| ٢-٦ | تأثير تركيز المادة الخاضعة على سرعة التفاعل                          |
| ٣-٦ | نموذج الاتزان السريع لحركيات الإنزيمات                               |
| ٤-٦ | نموذج الحالة الثابتة (المستقرة) لحركيات الإنزيمات                    |
| ٥-٦ | دلالات قيم $k_{cat}$ , $K_m$                                         |
| ٦-٦ | القياس التجريبي للثوابت الحركية $k_{cat}$ , $K_m$ من الرسوم البيانية |
| ٨-٦ | الانحراف عن حركيات القطع الزائد (حركيات ميكلس-منتين)                 |
| ٩-٦ | حركيات الطور العابر                                                  |

حركية الإنزيمات enzyme kinetics تتضمن دراسة معدلات rates (أى سرعات velocities) التفاعلات المحفزة بالإنزيمات والعوامل التي تؤثر على المعدلات دون الأخذ في الاعتبار الطبيعة الكيميائية لأى تغيرات تحدث نتيجة للتفاعلات. وتستخدم الحركية كوسيلة لتوضيح كفاءة الحفز وألفة المواد الخاضعة للإنزيمات. كما أن التحليل الحركي للتفاعلات المحفزة بالإنزيمات يستخدم أيضاً كوسيلة شائعة للتعرف على آليات mechanisms عمل الإنزيمات. وأكثر الطرق إستخداماً في دراسة حركية الإنزيمات هي

حركيات الحالة الثابتة (المستقرة) steady state kinetics. وكما سنرى فإن إصطلاح الحالة الثابتة يشير إلى الظروف التجريبية التي فيها معقد الإنزيم- المادة الخاضعة يمكن أن ينشأ تدريجياً إلى مستوى الحالة الثابتة الذي يمكن تقديره. وهذه الظروف يمكن الوصول إليها بسهولة في المعمل التي تسمح بتفسير وقت سير التفاعل الإنزيمي.

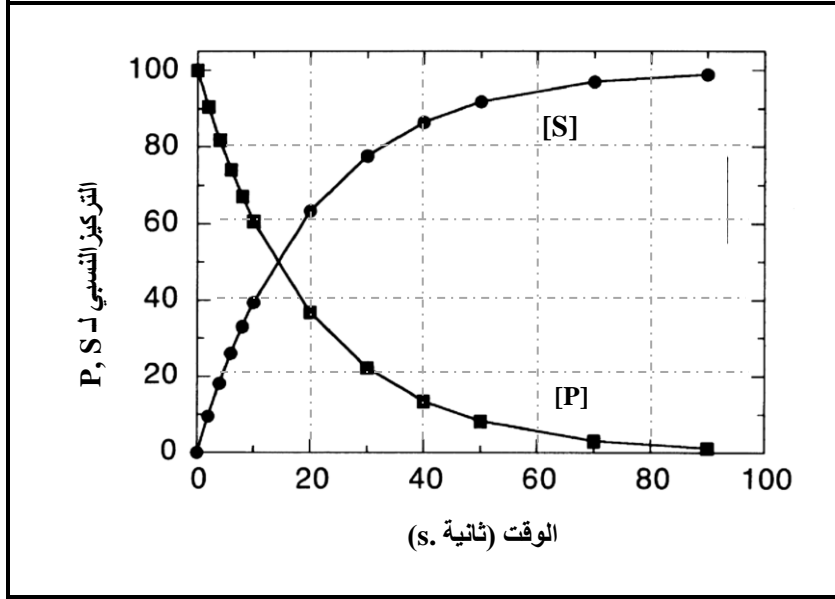
وهناك ثلاثة عوامل التي تعزز دراسة آلية عمل الإنزيمات باستخدام حركيات الحالة الثابتة: (١) إن إمكانية تشويش المعدل والآلية نتيجة إستبدال باقي حمض أميني خاص بواسطة الهندسة الوراثية قد عزز الإحتياج لدراسة حركية دقيقة للتعرف على هذه التغيرات. ومع متاحة الطفرات موجه الموقع، فإنه تتوفر معلومات تركيبية عن المكونات الجزيئية في الإنزيم وثيقة الصلة بالحفز الإنزيمي مع إمكانية مقارنة الإنزيمات ذوات الصلة (٢) الطرق التجريبية تكون قريبة من الظروف الفسيولوجية (٣) التجارب تحتاج إلى أدوات بسيطة (فصل ١٠).

وفي هذا الفصل سنقوم بدراسة حركيات التفاعلات الإنزيمية لمادة خاضعة فردية باستخدام الحالة الثابتة. وفي فصل ٩ سنعالج موضوع الحركية للتفاعلات الإنزيمية لمادتين خاضعتين. وتحليل البيانات التي سيتم وصفها في هذا الفصل تعتمد على تقدير السرعة الابتدائية initial velocity للتفاعل المحفز إنزيمياً تحت ظروف تجريبية مختلفة. وفي مناقشتنا هنا سوف نفترض أنه توجد بعض الطرق المناسبة لتقدير السرعة الابتدائية للتفاعل. وفي فصل ١٠ سوف نعرض بصورة خاصة كيف يتم قياس السرعات الابتدائية ونصف عدة أنواع من الطرق المستخدمة في مثل هذه القياسات

## ٦-١ السرعة الابتدائية

للتفاعل الإنزيمي  $(S \xrightarrow{E} P)$ ، عند خلط الإنزيم (E) مع المادة الخاضعة (S) في محلول، ثم (بإستخدام بعض الوسائل) المناسبة، يتم قياس المادة الخاضعة المتبقية (S) و/ أو كمية الناتج (P) عند فترات زمنية مختلفة، فإننا نشاهد منحنى مماثل لذلك الموضح في شكل (٦-١). لاحظ أن منحنى استنفاد المادة الخاضعة يكون صورة للمرآة لمنحنى ظهور الناتج. في الأوقات الأولى من التفاعل فإن استنفاد المادة الخاضعة

وظهور الناتج يتغير سريعاً مع الوقت، ولكن بزيادة وقت التفاعل، فإن هذه المعدلات تنقص وتصل إلى الصفر عندما تتحول كل المادة الخاضعة إلى ناتج التفاعل بواسطة الإنزيم.



شكل ٦-١ منحنيات تقدم التفاعل لإستهلاك المادة الخاضعة [S] وإنتاج ناتج التفاعل [P] أثناء التفاعل المحفز إنزيميا كدالة في الوقت t (بالثانية s).

ومثل هذه المنحنيات للتفاعل يمكن التعبير عنها بنموذج حركات الرتبة الأولى التي تم مناقشتها في فصل ٣ (معادلة ٣-١٩).

$$[S] = [S_0] e^{-kt} \quad (٦-١)$$

حيث: [S] هي تركيز المادة الخاضعة المتبقية عند الزمن t.  
 [S<sub>0</sub>] هي التركيز الابتدائي للمادة الخاضعة (عند الزمن صفر).  
 k هي ثابت المعدل للرتبة الأولى الكاذب للتفاعل.

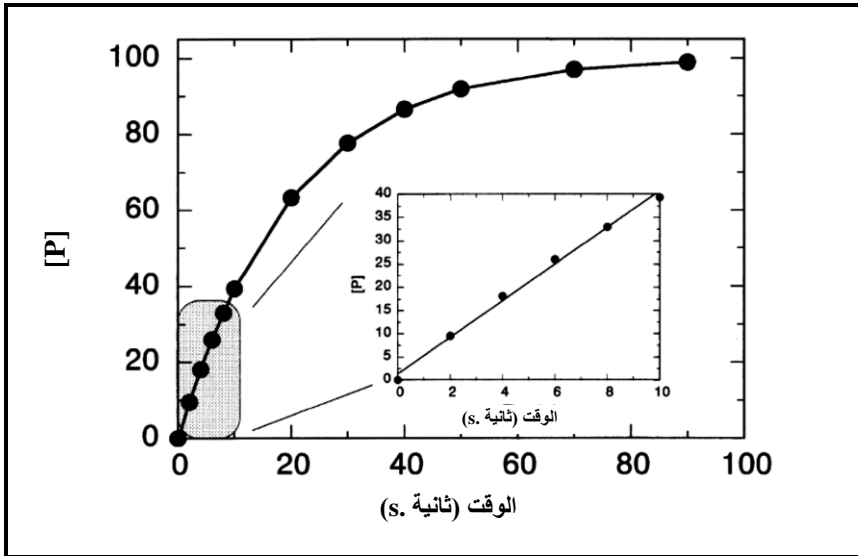


وسرعة مثل هذا التفاعل يعطي كالتالي:

$$v = -\frac{d[S]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} = k[S_0]e^{-kt} \quad (٢-٦)$$

دعنا ننظر بعناية إلى نمط ظهور المنتج للتفاعل المحفز إنزيمياً (شكل ٢-٦). إذا حصرنا انتباهنا فقط على الجزء المبكر جداً من هذا الرسم (المنطقة المظللة) فإننا نجد أن الزيادة في تكوين المنتج (وأيضاً استنفاد المادة الخاضعة) يكون تقريباً خطياً مع الوقت. وفي هذه الفترة المقيدة، فإن السرعة الابتدائية (initial velocity) ( $v_0$ ) يمكن قياسها تقريبياً بالميل (التغير في  $y$  على التغير في  $x$ ) للرسم الخطي لـ  $[S]$  أو  $[P]$  كدالة في الوقت:

$$v_0 = -\frac{\Delta[S]}{\Delta t} = \frac{\Delta[P]}{\Delta t} \quad (٣-٦)$$



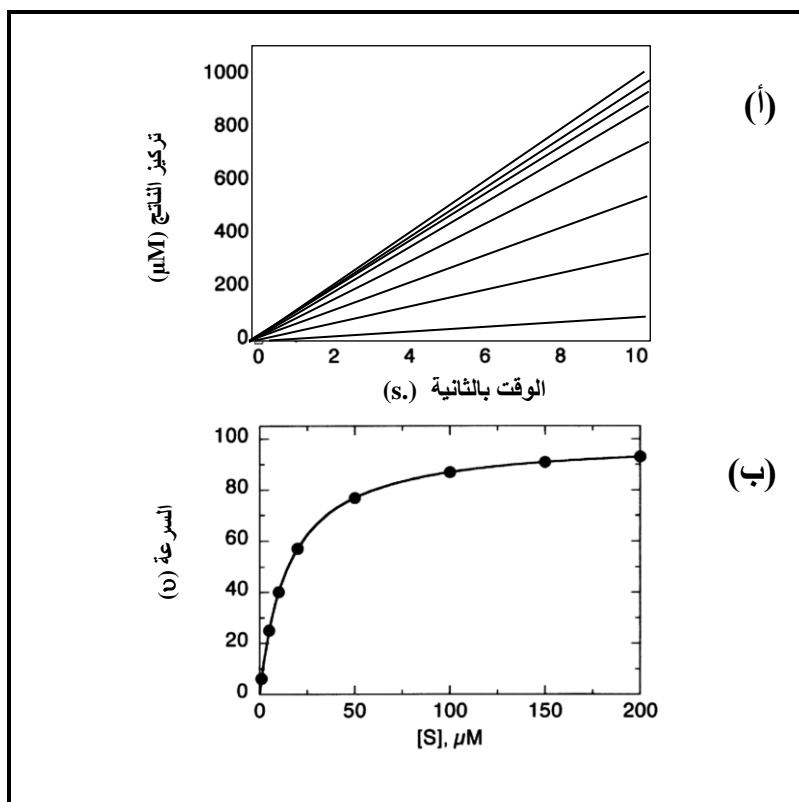
شكل ٢-٦ منحنى تقدم التفاعل لإنتاج ناتج التفاعل أثناء سير التفاعل المحفز إنزيمياً. وفي المنحنى أيضاً ركزنا الانتباه على المرحلة الأولى التي عندها يمكن تقدير السرعة الابتدائية من ميل الرسم الخطي  $[P]$  مقابل الوقت  $(t)$  بالثانية  $s$ .

وتجريبياً نجد أن ظهور الناتج واستنفاد المادة الخاضعة كدالة في الوقت يمكن التعبير عنها بدالة خطية حتى الوقت الذي يتحول فيه 10% من التركيز الابتدائي للمادة الخاضعة إلى ناتج التفاعل (فصل ٣). وسوف نرى في فصل ١٠ أنه بتغيير ظروف محلول التفاعل فإنه يمكن تغيير الفترة الزمنية التي يظهر فيها التفاعل المحفز إنزيمياً الحركات الخطية. وفي الجزء الباقي من هذا الفصل، فإننا سوف نفترض أن سرعة التفاعل تقاس عند هذا الطور المبكر الذي يعني أن  $v = v_0$  أى السرعة الابتدائية.

## ٢-٦ تأثير تركيز المادة الخاضعة على سرعة التفاعل

من معادلة ٢-٦ نتوقع أن تفاعل الرتبة الأولى الكاذب (الزائف) يعتمد على التركيز الابتدائي للمادة الخاضعة. مع ذلك، فإنه عند تعيين اعتماد السرعة مع تركيز المادة الخاضعة في وجود تركيز ثابت من الإنزيم، وجد العلماء أن سلوك التفاعل مع المادة الخاضعة يظهر كما هو موضح في شكل ٣-٦. وشكل ٣-٦ (أ) يشرح اعتماد ناتج التفاعل مع الوقت لتفاعل محفز إنزيمياً لسلسلة من التركيزات الابتدائية للمادة الخاضعة، ثم تم قياس السرعات الابتدائية لكل تجربة من رسم ميل  $[P]$  مقابل الوقت. وشكل ٣-٦ (ب) هو رسم هذه السرعات الابتدائية  $v$  كدالة في  $[S]$  وهى التركيز الابتدائي للمادة الخاضعة. وبدلاً من الحصول على العلاقة الخطية المتوقعة لحركات الرتبة الأولى، نرى أن السرعة تظهر تشعب (سرعة ثابتة) عند التركيز العالي للمادة الخاضعة. في هذا المنحنى يمكن تعيين ثلاثة مناطق مميزة:

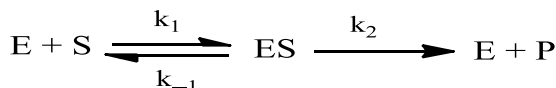
- عند التركيز المنخفض للمادة الخاضعة، فإن السرعة تظهر سلوك الرتبة الأولى، حيث ترتبط السرعة بعلاقة خطية مع تركيز المادة الخاضعة.
- عند التركيز العالي جداً للمادة الخاضعة، فإن السرعة تتحول إلى رتبة صفر، الذي يظهر عدم اعتماد السرعة على تركيز المادة الخاضعة.
- في المنطقة الوسطي، فإن اعتماد السرعة على تركيز المادة الخاضعة يكون خطأً منحنياً.



شكل ٦-٣ (أ) منحنيات تقدم التفاعل لمجموعة من التفاعلات المحفزة إنزيمياً مع تركيزات ابتدائية مختلفة من المادة  $[S]$  عند تركيز ثابت من الإنزيم. (ب) رسم سرعات التفاعل مقاسة كميول الخطوط في (أ) كدالة في  $[S]$ .

كيف لنا أن نفسر هذه المشاهدات التجريبية؟

في بداية القرن العشرين تم إجراء دراسات أولية على الخصائص الحركية للتفاعلات الإنزيمية وتجمعت الأدلة عن تكوين معقد بين الإنزيمات والمواد الخاضعة لها. ومن ثم أعطى براون Brown (1902) تفسيراً نوعياً لإعتماد سرعات التفاعلات المحفزة إنزيمياً على تركيز المادة الخاضعة. ولقد اقترح براون أن التفاعلات المحفزة إنزيمياً يمكن وصفها بمخطط التفاعل التالي:

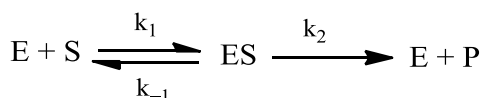


ففي التفاعلات النموذجية التي يشارك فيها الإنزيم كحفاز، فإن الخطوة الأولى تشتمل على اتحاد الإنزيم E مع المادة الخاضعة S لتكوين المعقد ES بثابت معدل k. إن المعقد ES له مسارين محتملين: إما أن يتفكك إلى E و S بثابت معدل  $k_{-1}$ . أو يستمر ليعطي ناتج التفاعل P والإنزيم الحر E بثابت معدل  $k_2$ . ومخطط التفاعل يشير إلى أن سرعة التفاعل تتناسب مع تركيز المعقد  $ES \leq k_2[ES]$ . افترض أننا قيدنا تركيز الإنزيم الكلي عند مستوى منخفض وغيرنا تركيز S. عند التركيز المنخفض لـ S، فإن تركيز ES يتناسب مباشرة مع [S]، ومن ثم فإن السرعة سوف تعتمد على [S] بنمط خطي يماثل الرتبة الأولى. من ناحية أخرى فإنه عند التركيز العالي لـ S، فإن الإنزيم عملياً يوجد في صورة المعقد ES. وتحت هذه الظروف فإن السرعة تعتمد على معدل التحول الكيميائي الذي يحول ES إلى EP الذي يليه تحرير الناتج وإعادة إنتاج الإنزيم الحر E. وإضافة مزيد من المادة الخاضعة تحت هذه الظروف لن يؤثر على سرعة التفاعل، ومن ثم فإن رسم السرعة مقابل [S] سوف يدنو من الصفر (شكل ٦-٣ب). وهذا النموذج يماثل معادلة الارتباط ثابت الحرارة (فصل ٥)، وهذا ليس غريباً لأن نموذج الحفز هنا يشتمل أولاً على تكوين المعقد الثنائي ES خلال اتزان الارتباط.

### ٦-٣ نموذج الإيزان السريع لحركات الإنزيمات

نموذج براون يعطي صورة وصفية للتفاعلات الإنزيمية، وحتى يمكن استخدامه تجريبياً فإنه يحتاج إلى وضعه في هيكل رياضي دقيق. وهذا تم تحقيقه بواسطة هنري Henri (1903)، ثم بعد ذلك بواسطة ميكليس ومنتين (Michaelis and Menten (1913). ومعادلة المعدل التي سوف تشتق في هذا القسم عادة ما يطلق عليها معادلة ميكلس-منتين، ولو أن بعض المراجع تشير إلى هذه المعادلة بمعادلة هنري-ميكليس-منتين للإشارة إلى إسهام هنري في هذا الإنجاز. وإفتراسات وإشتقاق معادلة ميكليس-منتين هي كالتالي:

- إن معادلة هنري-ميكليس-منتين تفترض حدوث إتزان سريع بين المتفاعلات (E + S) والمعقد ES متبوعاً بتحول بطيء للمعقد ES إلى الإنزيم الحر والنواتج (أو النواتج). بمعنى أن هذا النموذج يفترض أن  $k_2 \ll k_{-1}$  في المخطط المعروض في قسم ٦-٢.



- في هذا النموذج فإن الإنزيم الحر  $E_f$  يتحد أولاً من المادة الخاضعة S ليكون المعقد ES. وحيث أن المادة الخاضعة توجد بكمية أكبر كثيراً عن الإنزيم، فإننا يمكن إفتراض أن تركيز المادة الخاضعة الحرة  $[S]_f$  يمكن تقريبه بالتركيز الكلي للمادة الخاضعة التي تضاف إلى التفاعل  $[S]$ . ومن ثم فإن ثابت التفكك dissociation constant ( $K_s$ ) عند الاتزان يكون:

$$K_s = \frac{[E]_f[S]_f}{[ES]} = \frac{[E]_f[S]}{[ES]} \quad (٤-٦)$$

وتركيز الإنزيم الحر يعطي بالفرق بين التركيز الكلي للإنزيم  $[E]$  وتركيز المعقد الثنائي  $[ES]$ :

$$[E]_f = [E] - [ES] \quad (٥-٦)$$

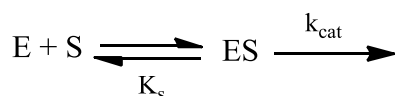
لذلك فإن:

$$K_s = \frac{([E] - [ES])[S]}{[ES]} \quad (٦-٦)$$

وهذه المعادلة يمكن إعادة ترتيبها لتعطي تعبير لـ  $[ES]$ :

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_s + [S]} \quad (٧-٦)$$

- يلي ذلك أن المعقد ES يتحول بواسطة خطوات كيميائية مختلفة لينتج ناتج التفاعل والإنزيم الحر. في الحالة البسيطة، فإن خطوة كيميائية فردية تعين بثابت معدل الرتبة الأولى  $k_2$  تؤدي إلى تكوين المنتج. مع ذلك فإن الأكثر احتمالاً أنه توجد سلسلة من الأحداث الكيميائية المتعاقبة السريعة تلي تكوين المعقد ES. وللتبسيط فإن المعدل الإجمالي لهذه الخطوات الكيميائية المجمع يمكن وصفها بواسطة ثابت رتبة أولى فردي  $k_{cat}$ . إذن:



ومن ثم فإن معدل تكوين الناتج يعطي بمعادلة الرتبة الأولى:

$$v = k_{cat} [ES] \quad (٨-٦)$$

وبإتحاد المعادلتين ٧-٦ و ٨-٦ ، نحصل على:

$$v = \frac{k_{cat}[E][S]}{K_s + [S]} \quad (٩-٦)$$

ومعادلة ٩-٦ تماثل معادلة الارتباط ثابت الحرارة (معادلة ٥-٢١). ومن ثم فإن هذه المعادلة تصف سرعة التفاعل كدالة قطع زائد في  $[S]$  مع قيمة عظمى  $k_{cat} [E]$  عند تركيز  $[S]$  اللامتناهى. وسوف نشير إلى هذه القيمة بالسرعة القصوى للتفاعل أو  $V_{max}$

$$V_{\max} = k_{\text{cat}} [E] \quad (١٠-٦)$$

وباتحاد هذا التعريف في معادلة ٩-٦، نحصل على:

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{K_s + [S]} = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{K_s}{[S]}} \quad (١١-٦)$$

ومعادلة ١١-٦ هي المعادلة النهائية التي اشتقت بصورة مستقلة بواسطة هنري وكل من ميكيلس ومنتين لوصف البيانات الحركية للإنزيم. لاحظ التماثل بين هذه المعادلة ومعادلة الارتباط ثابت الحرارة المعروضة في فصل ٥ (المعادلتين ٢١-٥ و ٢٢-٥). ومن ثم فإن كثير من حركيات الإنزيم يمكن تفسيرها بمذلول الإتران البسيط المشتمل على إتران سريع بين الإنزيم الحر والمادة الخاضعة لتكوين المعقد الثنائي ES، متبوعاً بخطوات تحول كيميائي لإنتاج وتحرير الناتج.

## ٦-٤ نموذج الحالة الثابتة (المستقرة) لحركيات الإنزيمات

إن الاشتقاق الأصلي لمعادلة ١١-٦ بواسطة هنري وميكيلس ومنتين اعتمدت على إفتراض الإتران السريع للتفاعلات الإنزيمية. وهذه المعالجة تكون مفيدة في قياس الحركيات السريعة مثل تفاعلات التحول الفردي single turnover reactions. مع ذلك فإن الجزء الأكبر من قياسات التفاعلات الإنزيمية تحدث عندما يوجد المعقد ES عند تركيز ثابت مستقر. فقد أدرك كل من برجز Briggs وهالدان Haldane (1925) أن طريقة إتران الارتباط لهنري وميكيلس ومنتين يمكن وصفها بصورة أكثر عمومية بطريقة الحالة الثابتة steady state التي لا تتطلب أن يكون  $k_2 \ll k_{-1}$ . والمناقشة التالية تعتمد على وصف برجز هالدان. وكما سنرى فإن المعادلة النهائية التي تنتج من هذه المعالجة مماثلة جداً لمعادلة ١١-٦، وبالرغم من اختلاف طريقة الإتران السريع والحالة الثابتة،

فإن معادل الحالة الثابتة النهائية من الشائع الإشارة إليها بمعادلة هنرى- ميكيلس - منتين التي كثيراً ما يشار إليها بمعادلة ميكيلس - منتين.

والحالة الثابتة (أو المستقرة) steady state تشير إلى الفترة الزمنية من التفاعل الإنزيمي التي خلالها يكون معدّل تكوين المعقد ES مساوياً لمعدّل تفككه إلى الإنزيم الحر ونواتج التفاعل. وهذا الطور الحركي يمكن تحقيقه عندما يكون تركيز جزيئات المادة الخاضعة أكبر كثيراً عن تركيز الإنزيم الحر. ولبلوع الحالة الثابتة فإنه يجب الإيفاء ببعض الظروف، وهذه الظروف تسمح بإتخاذ بعض الافتراضات المقبولة التي تبسط بدرجة كبيرة المعالجة الرياضية للحركية. وهذه الافتراضات كالتالي:

١- أثناء الطور الابتدائي لمنحنى تقدم التفاعل (أى الظروف التي تقاس فيها السرعة الابتدائية الخطية) لا ينشأ فيه أى مركبات وسيطة خلاف المعقد ES. ومن ثم فإن كل جزيئات الإنزيم إما أن تكون في صورة الإنزيم الحر  $[E]_f$  أو معقد الإنزيم- المادة الخاضعة  $[ES]$ . وبذلك فإن التركيز الكلي للإنزيم  $[E]$  يكون كالتالي:

$$[E] = [E]_f + [ES] \quad (٦-١٢)$$

٢- إن الإنزيم يعمل كحفاز، لذلك فإنه يوجد بتركيز منخفض جداً بالنسبة للمادة الخاضعة، أى أن  $[S] \gg [E]$ . لذلك، فإن تكوين المعقد ES لا يخفض بدرجة معنوية تركيز المادة الخاضعة الحرة. لذلك فإننا يمكن أن نجري التقريب التالي:

$$[S]_f \approx [S] \quad (٦-١٣)$$

حيث  $[S]_f$  هي تركيز المادة الخاضعة الحرة و  $[S]$  هي التركيز الكلي للمادة الخاضعة.

٣- أثناء الطور الإبتدائي لمنحنى تقدم التفاعل تتكون كمية صغيرة جداً من ناتج التفاعل بالنسبة للتركيز الكلي للمادة الخاضعة. ومن ثم فإنه أثناء هذا الطور المبكر تكون



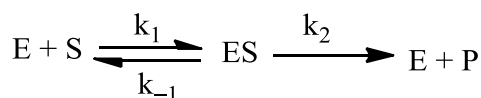
$P \approx 0$ ، وبذلك فإن استهلاك  $[S]$  يكون عند الحد الأدنى. وعند بدأ التفاعل يحدث تكوين مفاجئ وسريع للمعقد  $ES$  متبوعاً بطور حركي فيه معدل تكوين معقد  $ES$  جديد متوازناً مع معدل تفكيكه إلى الإنزيم الحر وناتج التفاعل. وبكلمات أخرى فإنه أثناء هذا الطور يكون تركيز  $ES$  ثابتاً. ويشار إلى هذا الطور من الحركية بالحالة الثابتة (المستقرة)  $steady\ state$  الذي يعرف كالتالي:

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 \quad (١٤-٦)$$

ويوضح شكل ٦-٤ نشوء وأمد الحالة الثابتة لتفاعل إنزيمي يتبع حركات الحالة الثابتة، حالما يخلط الإنزيم والمادة الخاضعة فإننا نرى ظهور طور ما قبل الحالة الثابتة  $pre-steady\ state$  سريعاً الذي ينشأ فيه  $ES$ ، يتبعه طور طويل الوقت لا يتغير فيه تركيز  $ES$  (طور الحالة الثابتة)، وكما ذكرنا في مقدمة هذا الفصل فإن الجزء الأكبر من دراسة حركات الإنزيمات تتم باستخدام حركات الحالة الثابتة.

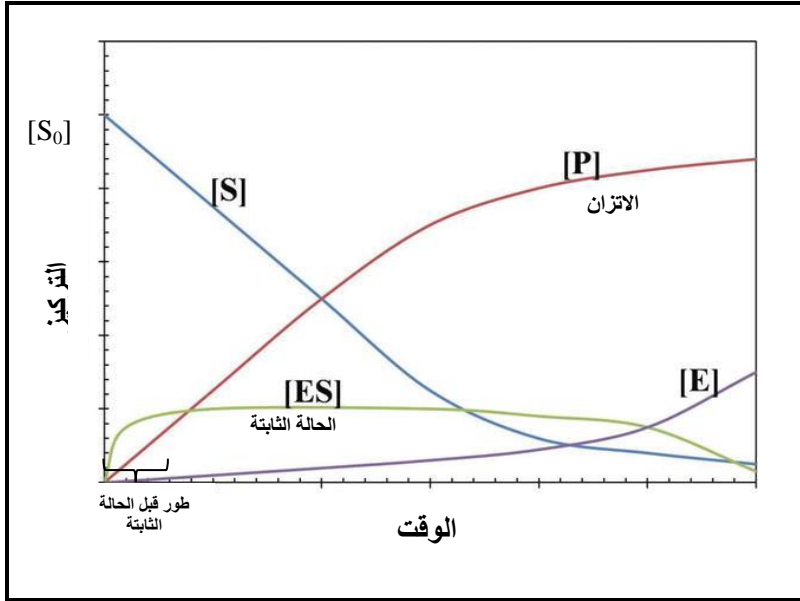
مع هذه الافتراضات، فإننا يمكن الآن البدء في اشتقاق معادلة سرعة الإنزيم تحت ظروف الحالة الثابتة:

● كما ذكرنا سابقاً، فإنه لمخطط التفاعلات الإنزيمية البسيطة التالية:



فإن منحني تقدم تفاعل الرتبة الأولى الكاذب لهذا التفاعل الإنزيمي يوصف كالتالي:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] \quad (١٥-٦)$$



شكل ٦-٤: تغير تركيز المواد المتضمنة في تفاعل محفز إنزيمياً كدالة في الوقت للتفاعل الإنزيمي الذي يتبع حركات الحالة الثابتة. باستثناء المرحلة الأولى من التفاعل التي تستمر عدة ميلي ثانية من خلط S, E (طور ما قبل الحالة الثابتة) فإن تركيز ES يظل تقريباً ثابتاً حتى تستنفد المادة الخاضعة.

- ونحتاج الآن التعبير عن [ES] بدلالة كميات يمكن قياسها تجريبياً. ولأن [ES] يعتمد على معدل تكوين المعقد (الذي يحكم بـ  $k_1$ ) ومعدل فقد المعقد (الذي يحكم بـ  $k_{-1}$  و  $k_2$ ). ومعادلة المعدل لهاتين العمليتين تعطيان كالتالي:

$$\frac{d[ES]}{dt} = (k_{-1} + k_2)[ES] \quad \text{و} \quad \frac{d[ES]}{dt} = k_1[E]_f[S]_f \quad (٦-١٦)$$

حيث  $[S]_f$ ,  $[E]_f$  هما تركيزي الإنزيم الحر والمادة الخاضعة الحرة على التوالي. وتحت ظروف الحالة الثابتة، فإن المعدلين يجب أن يكونا متساويين، إذن:

$$k_1[E]_f[S]_f = (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (٦-١٧)$$

وهذه المعادلة يمكن إعادة ترتيبها للحصول على تعبير لـ  $[ES]$ :

$$[ES] = \frac{[E]_f[S]_f}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1}} \quad (١٨-٦)$$

ويمكن تبسيط معادلة ١٨-٦ بتعريف ثابت جديد  $K_m$  الذي يطلق عليه ثابت ميكيلس  
:Michaelis constant

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (١٩-٦)$$

لاحظ أن  $K_m$  له وحدات التركيز. و  $K_m$  هو خصيصة مميزة للتأثير المتبادل بين  
الإنزيم - المادة الخاضعة ولا يعتمد على تركيز الإنزيم أو المادة الخاضعة وباستبدال  
معادلة ١٩-٦ في معادلة ١٨-٦ نحصل على:

$$[ES] = \frac{[E]_f[S]_f}{K_m} \quad (٢٠-٦)$$

● والآن، حيث أن استنفاد المادة الخاضعة لا يكون معنوياً عند طور الحالة الثابتة  
(على أساس أن تركيز الإنزيم أقل كثيراً عن تركيز المادة الخاضعة) فإننا يمكن أن  
نستبدل الحد  $[S]_f$  بالتركيز الكلي للمادة الخاضعة  $[S]$  (معادلة ٥-١٣). ويمكن  
أيضاً استخدام العلاقة في معادلة ١٢-٦ باستبدال  $[E]_f$  بـ  $([E] - [ES])$ . وبإجراء  
هذين الاستبدالين، فإن معادلة ٢٠-٦ يمكن إعادة صياغتها كالتالي:

$$[ES] = [E] \frac{[S]}{[S] + K_m} \quad (٢١-٦)$$

● ويمكن الآن إدماج تعبير [ES] مع تعبير السرعة في معادلة ٦-١٥ لنحصل على:

$$v = k_2[E] \frac{[S]}{[S] + K_m} \quad (٢٢-٦)$$

أو أننا يمكن أن نعمم معادلة ٢٢-٦ لمخطط التفاعل الأكثر تعقيداً بإحلال  $k_{cat}$  مكان  $k_2$ .

$$v = k_{cat}[E] \frac{[S]}{[S] + K_m} \quad (٢٣-٦)$$

وكما وصفنا سابقاً، أنه عندما يدنو تركيز المادة الخاضعة إلى ما لا نهاية، فإن السرعة تصل إلى القيمة الأقصى وتعرف بالسرعة القصوى maximum velocity  $(V_{max})$ . وتحت هذه الظروف فإن الحد  $K_m$  له مشاركة صغيرة جداً في معادلة ٦-٢٣. لذلك:

$$\lim_{[S] \rightarrow \infty} \frac{[S]}{[S] + K_m} \cong \frac{[S]}{[S]} = 1 \quad (٢٤-٦)$$

ومن ثم، فإننا نصل إلى معادلة ٦-١٠  $(V_{max} = k_{cat} [E])$ . وبإدماج هذا التعبير في معادلة ٢٣-٦ نصل إلى التعبير النهائي المماثل للمعادلة التي وصفت أولاً بواسطة هنري وميكيليس ومننتين (أى مماثلة لمعادلة ٦-١١)

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_m}{[S]}} \quad (٢٥-٦)$$

وهذه المعادلة هي التعبير المركزي لحركيات الحالة الثابتة للإنزيم. وبالرغم من أنها تختلف عن تعبير الاتزان الذي اشتق بواسطة هنري وميكليس ومنتين، فإنه يشار إليها عموماً بمعادلة ميكليس-منتين.

بالرغم من أن معادلة ميكليس-منتين قد أشتقت فقط للتفاعلات غير العكسية لمادة خاضعة فردية، فإنها تبقى فعالة (سارية) لآليات الأكثر تعقيداً مثل التثبيط والتفاعلات المشتملة على أكثر من مادة خاضعة، ما دام كل المركبات تبقى ثابتة إلا المادة الخاضعة المتغيرة. يمكن أيضاً معالجة التفاعلات العكسية بهذه المعادلة إذا أخذ في الاعتبار فقط المعدلات الابتدائية ويبقى تكوين الناتج بدرجة يمكن إهمالها.

ومعادلة ٢٥-٦ تفسر البيانات الحركية في شكل ٣-٦ ب

- عند التركيز المنخفض جداً من المادة الخاضعة عندما تكوين  $[S]$  أصغر بكثير عن  $K_m$ ، فإنه يمكن إهمال  $[S]$  في المقام في معادلة ٢٥-٦:

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{[S] + K_m} = \frac{V_{\max}[S]}{K_m} \quad ([S] \ll K_m) \quad (٢٦-٦)$$

أى أن المعدل يتناسب مباشرة مع  $[S]$ ، أى الطور الخطي (رتبة أولى)

- عند التركيز العالي جداً من المادة الخاضعة، أى  $[S] \gg K_m$ ، فإنه يمكن إهمال  $K_m$  من المقام في معادلة ٢٥-٦.

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{[S] + K_m} = \frac{V_{\max}[S]}{[S]} = V_{\max} \quad ([S] \gg K_m) \quad (٢٧-٦)$$

أى أن المعدل يكون أقصاه ومستقل عن تركيز المادة الخاضعة (رتبة صفر).

- إن معنى  $K_m$  يكون واضحاً من معادلة ٦-٢٥. فإذا وضعنا النظام التجريبي بحيث يكون تركيز المادة الخاضعة مساوياً لـ  $K_m$  (لاحظ أن  $K_m$  لها وحدات مولارية مثل  $[S]$ ، فإن معادلة ٦-٢٥ تختزل إلى:

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{[S] + [S]} = \frac{V_{\max}}{2} \quad (٦-٢٨)$$

هذا يعطينا التعريف العملي لـ  $K_m$  :  $K_m$  هو تركيز المادة الخاضعة الذي يعطي سرعة تفاعل تساوي نصف السرعة القصوى التي يتم الحصول عليها تحت ظروف التشبع للإنزيم بالمادة الخاضعة. وقيمة  $K_m$  غالباً ما يشار إليها في معظم المراجع بثابت ميكليس Michaelis constant.

- بمقارنة معادلة ٦-٢٥ لحركات الحالة الثابتة مع معادلة ٦-١١ لحركات الاتزان السريع، نجد أن المعادلتين متماثلتين باستثناء إحلال  $K_m$  مكان  $K_s$  في المعالجة بحركات الحالة الثابتة. والثابتين ليست متساويتين دائماً. فقد تم تعريف الثابتين كالتالي:

$$K_s = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad \text{و} \quad K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (٦-٢٩)$$

فقيمة  $K_s$  لا تماثل قيمة  $K_m$ . فقط تحت ظروف خاصة عند  $k_{-1} \ll k_2$  يكون  $K_m$  و  $K_s$  متكافئتين. ولمخططات التفاعلات المعقدة، فإننا نستبدل الحد  $k_2$  في معادلة ٦-٢٩ بـ  $k_{cat}$ . راجع أن  $k_{cat}$  تعكس جميع الخطوات الكيميائية المتعددة في الحفز. ولذلك فإنه اعتماداً على تفاصيل آلية التفاعل وقيم ثوابت المعدل الفردية قد تنشأ حالات التي يكون فيها قيمة  $K_m$  أصغر من أو أكبر من أو تساوي  $K_s$ . ومن ثم فإن  $K_m$  يجب إعتبارها كثابت حركي وليس ثابت حركي حراري مثل  $K_s$ .

## ٥-٦ دلالات قيم $K_m$ و $k_{cat}$

المعلومات الأساسية في حركيات الحالة الثابتة (معادلة ميكليس- منتين) هما الثابتين الحركيين  $K_m$  و  $k_{cat}$ . فما هو أهمية هذين الثابتين لفهمنا للإنزيم تحت الدراسة.

### ١-٥-٦ ثابت ميكليس ( $K_m$ )

تختلف قيم  $K_m$  اختلافاً كبيراً من إنزيم إلى آخر، كما تختلف للإنزيم ما مع المواد الخاضعة المختلفة (جدول ١-٦). ولمعظم الإنزيمات تتراوح قيم  $K_m$  بين  $10^{-7}M$  و  $10^{-1}M$  والثابت  $K_m$  له دلالتين:

- لقد عرفنا  $K_m$  بأنه تركيز المادة الخاضعة الذي ينتج نصف السرعة القصوى للتفاعل الإنزيمي. وبكلمات مكافئة يمكن القول أن  $K_m$  تعبر عن تركيز المادة الخاضعة التي يكون عندها نصف المواقع النشطة الإنزيمية في العينة مملوءة بجزيئات المادة الخاضعة في الحالة الثابتة. ولذلك فإن  $K_m$  تمدنا بمقياس لتركيز المادة الخاضعة المطلوبة لحدوث حفز معنوي. وفي الحقيقة فإنه لعديد من الإنزيمات أوضحت الدلائل التجريبية أن  $K_m$  تعطي تركيز تقريبي للمادة الخاضعة داخل الكائن. وعندما تكون  $K_m$  معلومة، فإنه يمكن حساب الجزء من المراكز المشغولة  $f_{ES}$  عند أي تركيز من المادة الخاضعة:

$$f_{ES} = \frac{v}{V_{max}} = \frac{[S]}{[S] + K_m} \quad (٣٠-٦)$$

- بالرغم من أن  $K_m$  ليست مساوية لـ  $K_s$  (ثابت التفكك للمعقد ES) تحت كثير من الظروف، إلا أنه يمكن استخدامها كمقياس نسبي لألفة ارتباط المادة الخاضعة مع الإنزيم. وكثيراً ما يلاحظ اختلاف  $K_m$  عند مقارنة الطفرات أو الصور المتناظرة isoforms للإنزيم أو المواد الخاضعة المختلفة لإنزيم ما. وفي بعض الحالات، فإن التغير في ظروف محلول التفاعل (مثل درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني pH)

وغيرهما يمكن أن يكون لها تأثيرات إنتقائية على قيمة  $K_m$ . وفي هذه الحالات يمكن بحصافة ربط هذه التأثيرات إلى الثباتية (أى الألفة) للمعقد ES. وكما سنرى في الجزء التالي فإن النسبة  $k_{cat}/K_m$  تكون أفضل بصورة عامة لقياس التأثيرات على ارتباط المادة الخاضعة بالإنزيم.

جدول ٦-١ قيم  $K_m$  لبعض الإنزيمات

| الإنزيم                | المادة الخاضعة            | $K_m$ ( $\mu M$ ) |
|------------------------|---------------------------|-------------------|
| Lysozyme               | Hexa-N-acetylglucoseamine | 6                 |
| Penicillinase          | Benzylpenicillin          | 50                |
| $\beta$ -Galactosidase | Lactose                   | 4000              |
| Threonine deaminase    | Threonine                 | 5000              |
| Carbonic anhydrase     | CO <sub>2</sub>           | 8000              |
| Pyruvate carboxylase   | Pyruvate                  | 400               |
|                        | HCO <sub>3</sub>          | 1000              |
|                        | ATP                       | 60                |
| Hexokinase             | Glucose, ATP              | 100               |
| Glucokinase            | Glucose, ATP              | 5000              |

## ٦-٥-٢ ثابت الحفز ( $k_{cat}$ )

بالنظر إلى المعادلتين ٦-٢٣ و ٦-٢٥، نرى أنه إذا علمنا تركيز الإنزيم  $[E]$  المستخدم تجريبياً، فإننا يمكن حساب  $k_{cat}$  مباشرة بقسمة قيمة  $V_{max}$  المقدرة تجريبياً على  $[E]$ . وقيمة  $k_{cat}$  أحياناً يشار إليها برقم التحول turnover number للإنزيم، وهو يعبر عن الميكرومولات  $\mu moles$  من المادة الخاضعة التي تتحول إلى الناتج لكل ميكرومول من الإنزيم في الثانية. ووحدات  $k_{cat}$  تكون مقلوب الوقت (أى  $s^{-1}$  و  $min^{-1}$ ). مع ذلك فإن رقم التحول نموذجياً ما يسجل كعدد جزيئات المادة الخاضعة التي تتحول إلى ناتج التفاعل بواسطة جزيئ إنزيم فردي عندما يكون الإنزيم مشبعاً بالمادة الخاضعة (أى عند  $[S] \gg K_m$ ) و جدول ٦-٢ مسجل فيه أرقام التحول (المقدرة معملياً) لبعض الإنزيمات.



جدول ٦-٢ أرقام التحول  $k_{cat}$  (المقدرة معملياً) لبعض الإنزيمات

| الإنزيم                 | رقم التحول (لكل ثانية) |
|-------------------------|------------------------|
| Carbonic anhydrase      | 600000                 |
| 3-ketosteroid isomerase | 280000                 |
| Acetylcholinestrace     | 2500                   |
| Lactate dehydrogenase   | 1000                   |
| Chymotrypsin            | 100                    |
| DNA polymerase I        | 15                     |
| Lysozyme                | 0.5                    |

في عينات الإنزيم الخام مثل الخلايا المتفككة أو عينات بروتين غير متجانسة، يكون من الصعب معرفة تركيز الإنزيم غير استخدام كتلة البروتين الكلية. في هذه الحالات فإن قيم النشاط الإنزيمي يتم التعبير عنها كعدد ميكروجرامات ناتج التفاعل التي تنتج في الدقيقة لكل جرام من البروتين في عينة الإنزيم. وبينما يكون استخدام هذه الواحدات مفيدة في مقارنة عينة من الإنزيم الخام مع عينة أخرى، فإنه من الصعب ربط هذه القيم بالثوابت الحركية مثل  $k_{cat}$ .

وثابت الحفز  $k_{cat}$  له دالتين:

- في المعمل فإننا يمكن بسهولة تقدير رقم التحول  $k_{cat}$  بقياس سرعة التفاعل تحت ظروف  $[S] \gg K_m$ ، ومن ثم فإن  $v$  تدنو من  $V_{max}$ . من ناحية أخرى فإن معدل التحول الإنزيمي في معظم الظروف الفسيولوجية في الكائنات يختلف كثيراً عن الظروف المعملية. ففي الكائنات فإن تركيز المادة الخاضعة تكون في حدود 0.1-1.0  $K_m$ . ورغم ذلك فإن قياس  $k_{cat}$  (أى السرعة تحت ظروف تركيز التشبع للمادة الخاضعة  $[S] \gg K_m$  في المعمل) يعطينا وسيلة محكمة لمقارنة معدلات التفاعلات الإنزيمية.

● إن أهمية  $k_{cat}$  أنها تحدد لنا السرعة القصوى التي يمكن عندها أن يسير التفاعل الإنزيمي عند تركيز ثابت من الإنزيم وتركيز غير محدد من المادة الخاضعة. ونظراً لأن  $k_{cat}$  ترتبط بالخطوات الكيميائية اللاحقة لتكوين المعقد ES، فإن التغيرات في  $k_{cat}$  التي تحدث في الإنزيم (مثل ذلك الطفرة في باقي حمض أميني خاص أو مقارنة إنزيمات مختلفة) أو التي تحدث في ظروف محلول التفاعل (مثل درجة الحرارة أو الـ pH أو القوة الأيونية)، أو هوية المادة الخاضعة (مثل المتناظرات التركيبية أو المواد الخاضعة المعلمة بالنظائر) تشير إلى اضطراب (تشوش) الذي يؤثر على خطوات الحفز الإنزيمي. وبكلمات أخرى فإن التغير في  $k_{cat}$  يعكس اضطراب في الخطوات الكيميائية التالية للارتباط الأولى للمادة الخاضعة. وحيث أن  $k_{cat}$  تعكس خطوات كيميائية متعددة فإنها لا تمدنا بمعلومات مفصلة عن معدلات أى من الخطوات الفردية التالية لارتباط المادة الخاضعة. بدلاً من ذلك، فإن  $k_{cat}$  تعطينا الحد الأدنى لثابت معدل الرتبة الأولى للخطوة الأبطأ (أى الخطوة المحددة للتفاعل) التي تلي ارتباط المادة الخاضعة التي تؤدي إلى تحرير ناتج التفاعل.

### ٦-٥-٣ $k_{cat}/K_m$

عند  $[S] \gg K_m$  وهى الظروف التي يمكن الوصول إليها في المعمل، فإن معدل الحفز يساوي  $k_{cat}$  وهو رقم التحول كما أوضحنا في قسم ٦-٥-٢. من ناحية أخرى فإنه تحت الظروف الفسيولوجية فإن  $[S] \ll K_m$ ، وبذلك فإن معدل الحفز يكون أقل من  $k_{cat}$  لأن معظم المراكز النشطة في الإنزيم تكون غير مرتبطة بالمادة الخاضعة. فما هى المعلمة (المعيار) الذي يصف حركية الإنزيم تحت هذه الظروف الخلوية؟ بدمج معادلة ٦-١٥ مع معادلة ٦-٢٠ نحصل على تعبير سرعة الإنزيم كالتالي:

$$v = \frac{k_{cat}}{K_m} [E]_f [S]_f \quad (٦-٣١)$$


وعندما يكون  $[S] \ll K_m$ ، فإن تركيز الإنزيم الحر  $[E]$  يكون مساوياً تقريباً للتركيز الكلي للإنزيم  $[E]$ ، لذلك:

$$v = \frac{k_{cat}}{K_m} [E] [S]_f \quad (٦-٣٢)$$

ومن ثم فإنه عند  $[S] \ll K_m$ ، فإن كفاءة الحفز لإنزيم ما تعين بنسبة الثوابت الحركية  $k_{cat}/K_m$ . وهذه النسبة لها وحدات ثابت معدل الرتبة الثانية ( $M^{-1}s^{-1}$ ). وتستخدم هذه النسبة في:

- مقارنة كفاءة الإنزيمات المختلفة بعضها ببعض.
- قيم  $k_{cat}/K_m$  تستخدم أيضاً في مقارنة استخدام مواد خاضعة مختلفة بواسطة إنزيم مفرد. وجدول ٦-٣ يعرض قيم  $K_{cat}/K_m$  لإنزيم كيموتريسين chymotrypsin مع مواد خاضعة مختلفة. ومن الواضح أن كيموتريسين يفضل فك الرابطة التالية للسلاسل الجانبية الكارهة للماء (غير القطبية) hydrophobic. ومن ثم فإن هذه النسبة تعتبر أفضل مقياس للتخصص للمادة الخاضعة. وكما سنرى في فصل ٨ أنه عند مقارنة المواد الخاضعة المختلفة لإنزيم ما، فإن الاختلاف يظهر في قيم  $k_{cat}$  وليس  $K_m$ . وهذا يرجع إلى أن التخصص للمادة الخاضعة ينتج من الاختلاف في الحالة الانتقالية وليس التأثيرات المتبادلة لإرتباط المادة الخاضعة.
- أيضاً فإن النسبة  $k_{cat}/K_m$  تستخدم في مقارنة الكفاءة التي يحفز بها تفاعل مفرد في الاتجاه الأمامي والاتجاه العكسي. فالتفاعلات الإنزيمية هي في الأساس تفاعلات عكسية، مع أن التفاعل العكسي لعدد من الإنزيمات لا يكون موات من ناحية الحركة الحرارية.

جدول ٦-٣ أفضلية المواد الخاضعة لإنزيم كيموتريسين

|               | السلسلة الجانبية للحمض الأميني                                                                       | الحمض الأميني في الأستر | $k_{cat} / K_m (s^{-1} M^{-1})$ |
|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|---------------------------------|
| Glycin        | - H                                                                                                  |                         | $1.3 \times 10^{-1}$            |
| Valine        | $\begin{array}{c} CH_3 \\   \\ -CH \\   \\ CH_3 \end{array}$                                         |                         | 2.0                             |
| Norvaline     | - CH <sub>2</sub> - CH <sub>2</sub> - CH <sub>3</sub>                                                |                         | $3.6 \times 10^2$               |
| Phenylalanine | -CH <sub>2</sub> -  |                         | $1.0 \times 10^5$               |

إن وجود الإنزيم في المحلول لا يغير ثابت الاتزان  $K_{eq}$  بين تركيز المادة الخاضعة الحرة وتركيز الناتج. لذلك فإن  $K_{eq}$  يكون ثابتاً تحت ظروف خاصة للمحلول، وهذا يضع قيود على قيم  $k_{cat}/K_m$  التي يتم الوصول إليها في الاتجاه الأمامي (f) والاتجاه العكسي (r). وعند الاتزان فإن التفاعل الأمامي والتفاعل العكسي يحدثان بتردد متساوي، بحيث أن:

$$\left(\frac{k_{cat}}{K_m}\right)_f [E][S] = \left(\frac{k_{cat}}{K_m}\right)_r [E][P] \quad (٦-٣٣)$$

لذلك:

$$K_{eq} = \frac{(k_{cat}/K_m)_f}{(k_{cat}/K_m)_r} \quad (٦-٣٤)$$

ومعادلة ٦-٣٤ تعرف بعلاقة هالدان Haldan relationship التي تعطينا مقياس لاتجاه التفاعل الإنزيمي تحت مجموعة محددة من ظروف المحلول.

● أيضا في أى من الاتجاهين فإن النسبة  $k_{cat}/K_m$  يمكن أن ترتبط بالفرق في الطاقة الحرة بين المتفاعلات الحرة (S, E) في الاتجاه الأمامي) ومعقد الحالة الانتقالية ( $ES^\ddagger$ ). وإذا سوينا الطاقة الحرة لحالة المتفاعلات إلى الصفر، فإن الفرق في الطاقة الحرة يعين بواسطة:

$$\Delta G_{ES^\ddagger} = -RT \ln \left( \frac{k_{cat}}{K_m} \right) + RT \ln \left( \frac{K_B T}{h} \right) \quad (٦-٣٥)$$

حيث:

$K_B$ : هي ثابت بولتزمان

$T$ : هي درجة الحرارة بالكلفن

$h$ : هي ثابت بلانك

وتحت درجة حرارة مثبتة، فإن الحد  $RT \ln (K_B T/h)$  يكون ثابتاً. لذلك إذا رغبتنا في مقارنة مواد خاضعة مختلفة لإنزيم فردي أو إنزيمات مختلفة أو طفرات إنزيمية مقابل مادة خاضعة عامة، فإننا يمكن حساب الاختلاف في طاقات الحالات الانتقالية ( $\Delta \Delta G_{ES^\ddagger}$ ) من قيم  $k_{cat}/K_m$  المقاسة تجريبياً عند درجة حرارة ثابتة:

$$\Delta \Delta G_{ES^\ddagger} = -RT \ln \left[ \frac{(k_{cat}/K_m)^1}{(k_{cat}/K_m)^2} \right] \quad (٦-٣٦)$$

حيث الأرقام العلوية 1 و2 تشير إلى مواد خاضعة مختلفة أو إنزيمات مختلفة التي يتم مقارنتها. وبواسطة هذا النوع من التحليل، فإننا يمكن قياس مقدار مشاركة الحركة

الحرارية thermodynamic لمكونات تركيبية خاصة في الحفز. فعلى سبيل، إفتراض أن أحد الباحثين يظن أن باقي التيروزين في الموقع النشط لإنزيم يكون رابطة هيدروجينية حاسمة مع المادة الخاضعة في الحالة الانتقالية في التفاعل الإنزيمي. فإنه من خلال الطفرات موجّه الموقع، يمكن أن يستبدل التيروزين بالفينيل آلانين (الذي ليس له القدرة على تكوين رابطة هيدروجينية). وقياس  $k_{cat}/K_m$  لكل من الإنزيم الطبيعي والإنزيم المحور وراثياً (تيروزين- فينيل آلانين). افترض أن القيم المتحصل عليها كانت  $88 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  للإنزيم الطبيعي  $0.1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  للإنزيم المحور، فإن نسبة  $k_{cat}/K_m$  تساوي 880 التي تكافئ  $4 \text{ kcal/mol}$  من معادلة ٦-٣٦. والنتائج تشير إلى أهمية مجموعة OH لبواقي التيروزين في عملية الحفز.

#### ٦-٥-٤ التفاعلات المحكومة بالانتشار والكمال الحركي

إلى أى مدى تكون كفاءة الإنزيم؟ يمكن الإجابة على هذا السؤال بتحديد ما إذا كانت توجد أى قيود فيزيائية على قيمة  $k_{cat}/K_m$  وبمراجعة تعريف  $K_m$  من معادلة ٦-١٩ مع إستبدال  $k_2$  بـ  $k_{cat}$  للتفاعلات الأكثر تعقيداً، نلاحظ التالي:

$$\frac{k_{cat}}{K_m} = \frac{k_{cat}}{(k_{-1} + k_{cat})/k_1} = \frac{k_{cat}k_1}{k_{cat} + k_{-1}} \quad (٦-٣٧)$$

وللإنزيم ما في المحلول، فإن الخطوة المحددة إما تكون  $k_1$  وهى معدل تكوين المعقد ES أو أى من الخطوات المتعددة التي تشارك في  $k_{cat}$ .

● إذا كانت  $k_{cat}$  هى المحددة للمعدل، فإن الأحداث الحفزية التي تحدث بعد ارتباط المادة الخاضعة تكون أبطأ من تكوين المعقد ES.

● أما إذا كان  $k_1$  هى الخطوة المحددة للمعدل، فإن الإنزيم يكون ناتج التفاعل مباشرة بمجرد تكوين المعقد ES.

وفي أى من الحالتين فإننا نرى أن أسرع معدل للحفز لأى إنزيم في المحلول يكون مقيد بمعدل الانتشار للجزيئات في المحلول. بعض الإنزيمات مثل superoxide و dismutase و carbonic anhydrase و acetylcholinesterase لها قيم  $k_{cat}/K_m$  بين  $10^8$  و  $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  التي تكون عند حدود الانتشار. مثل هذه الإنزيمات يقال أنها وصلت للكمال الحركي kinetic perfection لأنها تحول المادة الخاضعة إلى الناتج بالسرعة التي تجلب بها إلى الموقع النشط للإنزيم في المحلول. تذكر أن الموقع النشط للإنزيم يشكل جزءاً صغيراً من تركيب الإنزيم الكلي. مع ذلك، فإنه للإنزيمات التي تظهر الكمال الحركي، فإن كل تلافي (تصادم) بين الإنزيم والمادة الخاضعة يكون منتج (مثمر). في هذه الحالات ربما توجد قوى تجاذب كهربية ساكنة على الإنزيم التي تجذب المادة الخاضعة إلى الموقع النشط على الإنزيم.

إن قيد الانتشار يبدو أنه يضع قيد على الحد الأعلى لقيمة  $k_{cat}/K_m$  التي يمكن أن يصل إليها أى إنزيم. وهذا حقيقي لمعظم الإنزيمات في المحلول. مع ذلك، فإن بعض الأنظمة الإنزيمية في الخلايا تتغلب على هذا الحد الأعلى بوضع الإنزيمات والمواد الخاضعة قريبة من بعضها في حجم محدود خلال مواضع تحت خلوية حيث لم يعد للانتشار ثلاثي الأبعاد دور في هذه العملية. وهذا يمكن إنجازه بتجمع الإنزيمات والمواد الخاضعة في أنظمة منتظمة كما في الأغشية الخلوية ومعقدات الإنزيمات المتعددة والإنزيمات متعددة الوظائف. وهنا سوف نذكر مثال لكل من هذه الحالات الثلاثة:

- المثال الأول هو نظام نقل الإلكترونات في سلسلة التنفس في الغشاء الداخلي للميتوكوندريا، في هذا النظام فإن الإنزيمات (ناقلات الإلكترونات) تنظم في سلسلة التي توجد متقاربة من بعضها البعض خلال الطبقة المزدوجة للغشاء. إن ناتج التفاعل لأحد الإنزيمات يصبح المادة الخاضعة للإنزيم التالي في السلسلة. ونظراً لتقارب الإنزيمات في الغشاء، فإن الناتج الذي يغادر الموقع النشط لأحد الإنزيمات يصوب إلى الموقع النشط للإنزيم التالي بدون الإحتياج إلى الانتشار خلال المحلول.

- المثال الثاني يأتي من مسار تخليق الأحماض الدهنية (حمض البالميتيك) بدورات إستطالة تشتمل كل دورة إضافة وحدات ثنائية الكربون وهذه الخطوات تتم في البكتريا بواسطة معقد من سبع إنزيمات والبروتين الحامل للآساييل التي ترتبط مع بعضها إرتباطاً غير تساهمياً وهذا المعقد الإنزيمي يشار إليه بـ fatty acid synthase. ونظراً لأن الستة إنزيمات والبروتين الحامل للآساييل تتجمع في صورة معقد. فإن ناتج الإنزيم الأول يكون قريباً من الموقع النشط للإنزيم الثاني، وهكذا وبهذه الطريقة فإن المعقد الإنزيمي، يتغلب على حاجز الانتشار لإسراع الحفز.
- المثال الثالث يأتي أيضاً من مسار تخليق الأحماض الدهنية في الثدييات. إن نظام الـ fatty acid synthase في هذه الكائنات عبارة عن إنزيم متعدد الوظائف multifunction enzyme الذي يتألف من وحدتين من عديد الببتيد المتماثلة، كل منها عبارة عن عديد ببتيدي عديد الوظائف الذي يحتوي على كل النشاط الحفزي. وسلسلة الحمض الدهني النامي تبقى مرتبطة بالبروتين متعدد الوظائف. وبهذه الطريقة فإن الإنزيم متعدد الوظائف يتغلب على حاجز الانتشار لإسراع الحفز.

## ٦-٦ القياس التجريبي للثوابت الحركية $K_m$ , $k_{cat}$ من الرسوم البيانية

في قسم ٦-٤ عالجنا اشتقاق معادلة ميكليس. منتين (معادلة ٦-٢٥) وهذه المعادلة تصف كيف تتغير  $v$  مع تغير  $[S]$  عند تركيز ثابت من الإنزيم. والثابتين الحركيين  $K_m$ ,  $V_{max}$  في هذه المعادلة يمكن تقديرهما لإنزيم ما من قياس معدل الحفز ( $v$ ) عند تركيزات مختلفة من المادة الخاضعة ( $S$ ) تحت ظروف الحالة الثابتة. وتوجد عدة طرق بيانية لمعالجة البيانات التجريبية لتقدير هذين الثابتين. وفي هذه الطرق البيانية التالية يوضع كل من  $K_m$  و  $V_{max}$  كمجهولين ويتم حل المعادلة المناسبة التي تعطي أقل خطأ بين قيم السرعة التجريبية  $v_{exp}$  وقيم السرعة المحسوبة  $v_{cal}$  باستخدام دالة مربعات أقل خطأ  $(s^2)$  least-square functions والتي تؤدي إلى أفضل تطابق بين البيانات التجريبية والمحسوبة.



$$s^2 = \sum (v_{\text{exp}} - v_{\text{cal}})^2 \quad (٣٨-٦)$$

والطرق البيانية يمكن وصفها بصورة أفضل بالعمل مع مثال لبعض البيانات العددية. دعنا نفترض أننا نقوم بدراسة تفاعل إنزيمي بسيط الذي تكون قيم  $K_m$ ,  $V_{\text{max}}$  الحقيقية له  $100 \mu\text{M/s}$  و  $12 \mu\text{M}$  على التوالي. وجدول ٦-٤ يعرض القيم التجريبية للسرعة الابتدائية  $v$  عند كل من تراكيزات المادة الخاضعة. وجودة تقدير  $K_m$ ,  $V_{\text{max}}$  من البيانات التجريبية يعتمد على:

- استخدام تراكيزات من المادة الخاضعة في مدى يغطي جزءاً كبيراً من المنحنى. ولقد أوضحت التجارب العديدة أنه لتقدير الثوابت الحركية للحالة الثابتة لنظام إنزيمي فإنه من المفضل أن يغطي تركيز المادة الخاضعة المدى الذي يعطي 20-80% من السرعة القصوى، وهذا يقابل  $[S]$  في المدى  $0.025-5.0 K_m$ .

جدول ٦-٤ السرعة الابتدائية المقدرة تجريبياً كدالة في تركيز المادة الخاضعة لنموذج تفاعل إنزيمي يتبع حركات الحالة الثابتة (معادلة ميكليس-منتين ٦-٢٥).

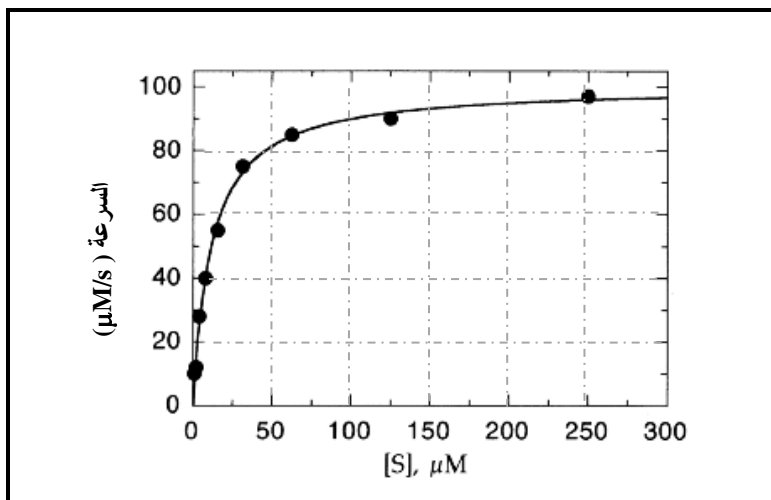
| $[S] (\mu\text{M})$ | $v (\mu\text{M product formed s}^{-1})$ | $1/v (\mu\text{M}^{-1}\text{s})$ | $1/[S] (\mu\text{M}^{-1})$ |
|---------------------|-----------------------------------------|----------------------------------|----------------------------|
| 0.98                | 10                                      | 0.100                            | 1.024                      |
| 1.95                | 12                                      | 0.083                            | 0.512                      |
| 3.91                | 28                                      | 0.036                            | 0.256                      |
| 7.81                | 40                                      | 0.025                            | 0.128                      |
| 15.63               | 55                                      | 0.018                            | 0.064                      |
| 31.25               | 75                                      | 0.013                            | 0.032                      |
| 62.50               | 85                                      | 0.012                            | 0.016                      |
| 125.00              | 90                                      | 0.011                            | 0.008                      |
| 250.00              | 97                                      | 0.010                            | 0.004                      |

- وحيث أن الثوابت الحركية تكون غير معلومة قبل التجربة، فإنه يجب إجراء تجربة استكشافية لعدد محدود من البيانات التي تعطي مدى واسع من المادة الخاضعة

للحصول على قيمة تقريبية لكل من  $V_{max}$  و  $K_m$ ، ثم بعد ذلك إجراء التجربة الأصلية باستخدام تراكيزات للمادة الخاضعة في المدى  $0.25-5.0 K_m$ ، واستخدام عدد أكبر في هذا المدى.

### ٦-٦-١ تقدير $V_{max}$ و $K_m$ من البيانات غير المحولة

الطريقة المباشرة لتقدير  $V_{max}$  و  $K_m$  تتضمن رسم السرعة ( $v$ ) كدالة في تركيز المادة الخاضعة  $[S]$ ، وسوف نشير إلى هذا الرسم برسم ميكليس-منتين Michaelis-Menten Plot. وشكل ٦-٥ هو رسم ميكليس-منتين لبيانات  $v$  و  $[S]$  المدونة في جدول ٦-٤. والمنحنى المرسوم خلال البيانات تم توليده خلال البيانات بالتطابق غير الخطي لمربعات أقل خطأ nonlinear least-squares fit للبيانات مع معادلة ٦-٢٥ (والملقب بـ مسجل فيه بعض برامج الحاسوب المستخدمة في مجال الإنزيمات)، وتقدير  $V_{max}$  و  $K_m$  بهذه الطريقة كانت  $100.26 \mu M/s$  و  $11.63 \mu M$  على التوالي التي تتفق جيداً مع القيم الحقيقية لهذه الثوابت: ومثل هذا التطابق المباشر للبيانات غير المحولة يعطي أفضل تقدير لكل الثابتين الحركيين  $V_{max}$  و  $K_m$ . ويجب ملاحظة أن دقة التقدير سوف تعتمد على مدى تركيز المادة الخاضعة التي يتم عندها تقدير السرعة الابتدائية. فإذا أجرى القياس عند تركيز منخفض من المادة الخاضعة بين  $0.98$  و  $3.91 \mu M$  ( $[S] \leq 0.33 K_m$ )، فإن البيانات تظهر كما لو أنها رتبة أولى، (أي علاقة خطية مع  $[S]$ ) كما يبدو في الجزء الابتدائي من المنحنى في شكل ٦-٥. من ناحية أخرى إذا أجرى القياس عند تركيز أعلى من  $60 \mu M$  (أي  $[S] \geq 5 K_m$ ) فإن المنحنى يظهر كما لو أن السرعة لا تعتمد على تركيز المادة الخاضعة كما يظهر في الجزء الأخير من المنحنى في شكل ٦-٥. وفي كلتا الحالتين، فإن تقدير الثابتين الحركيين  $K_m$  و  $V_{max}$  لا يكون دقيقاً. لذلك يجب إجراء القياس عند تركيز من المادة الخاضعة في المدى من  $0.25-5.0 K_m$ .



شكل ٥-٦ رسم ميكليس - منتين لبيانات السرعة  $v$  وتركيز المادة الخاضعة  $[S]$  في جدول ٤-٦. الخط المصمت خلال البيانات.

### ٢-٦-٦ تقدير $V_{max}$ و $K_m$ من التحولات الخطية لبيانات حركية الإنزيمات

إن متاحة برامج تطابق المنحنى غير الخطي تعتبر حديثة نسبياً. ومن ثم فإنه في الماضي لجأ العلماء لتحويل البيانات للحصول على رسوم خطية التي منها يمكن تقدير الثوابت الحركية ببساطة باستخدام ورق رسم ومسطرة عدلة، ثم استخدام برامج التطابق الخطي. وبينما يستخدم عديد من العلماء في الوقت الحالي برامج تطابق - المنحنى غير الخطي (وهي الوسيلة المفضلة لتقدير قيم  $K_m$ ,  $V_{max}$ ) فإنه ما زال ينشر عديد من قيم الثوابت الحركية المشتقة من الرسوم الخطية. وكما سنرى في الفصول التالية، فإن هذه الرسومات الخطية تكون مفيدة في تشخيص تفاصيل آلية الإنزيمات متعددة المواد الخاضعة multisubstrate enzymes وتحديد أسلوب التأثير المتبادل بين الإنزيم والمثبط.

وفي كل طرق التحولات الخطية التالية تحوّل البيانات غير الخطية (معادلة ميكليس منتين، معادلة (٦-٢٥) إلى علاقة خطية وذلك بتحويل قيم  $v$  (أي قيم  $y$ ) و  $[S]$  (أي قيم  $x$ ) باستخدام التحويل الأسّي أو الجذري أو اللوغاريتمي أو مقلوب القيم لتتطابق مع المعادلة الخطية التالية:

$$y = m x + b$$

حيث  $b$  هو التقاطع مع المحور  $y$  و  $m$  هو ميل الخط

#### ٦-٢-١ رسم لينويفر-بورك (المقلوب المزدوج) لحركات الإنزيمات

أكثر الطرق إستخداماً لتحويل البيانات الحركية إلى صورة خطية هي طريقة لينويفر-بورك (1974) Lineweaver-Bork (طريقة المقلوب المزدوج double-reciprocal). بإجراء بعض التحورات الجبرية، فإننا يمكن إعادة صياغة معادلة ٦-٢٥ في الصورة التالية:

$$v = V_{\max} \left( \frac{1}{1 + \frac{K_m}{[S]}} \right) \quad (٦-٣٩)$$

وبأخذ مقلوب هذه المعادلة وإعادة الترتيب نحصل على:

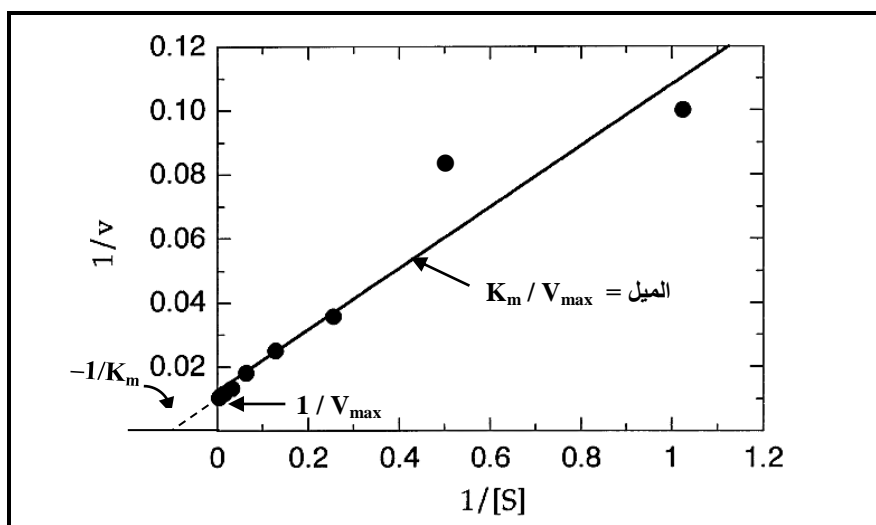
$$\frac{1}{v} = \left( \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} \right) + \frac{1}{V_{\max}} \quad (٦-٤٠)$$

ومقارنة معادلة ٦-٤٠ مع المعادلة القياسية للخط المستقيم، يكون لدينا:

$$y = m x + b \quad (٦-٤١)$$

حيث  $m$  تكون الميل و  $b$  تكون التقاطع مع المحور  $y$ . ونحن نرى أن معادلة ٦-٤٠ هي معادلة خط مستقيم مع ميل  $K_m/V_{\max}$  والتقاطع مع المحور  $y$  يكون  $1/V_{\max}$ . ومن ثم

إذا رسم مقلوب السرعة الابتدائية  $1/v$  كدالة في مقلوب تركيز المادة الخاضعة ( $1/[S]$ ) للبيانات من جدول ٦-٤ فإننا نتوقع من معادلة ٦-٤٠ الحصول على خط مستقيم. ولنفس الأسباب التي ذكرت سابقاً للبيانات غير المحولة، فإن الرسم الخطي يعمل بصورة جيدة عندما يغطي تركيز المادة الخاضعة في المدى  $0.25-5.0 K_m$ . فخلال هذا المدى تشاهد خطية جيدة كما هو موضح في شكل ٦-٧. والرسم مثل ذلك المعروض في شكل ٦-٦ يعرف برسم لينويفر-بوروك Lineweaver-Burk Plot، أو رسم المقلوب المزدوج.



شكل ٦-٦ رسم لينويفر-بوروك (المقلوب-المزدوج) للبيانات من جدول ٦-٤. لاحظ التأثير القوي لنقط البيانات عند  $[S]$  المنخفضة (قيم  $1/[S]$  العالية) على التطابق الخطي

يمكن تقدير الثوابت الحركية  $K_m$ ,  $V_{max}$  من قيم التقاطع والميل من التطابق الخطي للبيانات في رسم لينويفر-بوروك:

- ١- تقدير قيمة  $V_{max}$ : حيث أن المحور  $x$  يقابل التركيز، فإنه عند  $x=0$  (أي  $1/[S]=0$ ) (التي تقابل  $[S]=\infty$  ما لا نهاية) يكون  $1/v = 0 + 1/V_{max}$  أي التقاطع مع المحور  $1/v$  (المحور  $y$ ) يقابل مقلوب السرعة القصوى  $1/V_{max}$ .

٢- تقدير قيمة  $K_m$ : يمكن تقدير قيمة  $K_m$  من رسم لينوفير-بورك بطريقتين. الأولى: نحن نلاحظ من معادلة ٦-٤٠ أن الميل يساوي  $K_m/V_{max}$ ، لذلك إذا قسمنا ميل أفضل خط تطابق على التقاطع  $y$  (أى على  $1/V_{max}$ ) فإن الناتج يساوي  $K_m$ . الثانية: الطريقة البديلة أننا يمكن أن نمد خط التطابق إلى أن يتقاطع مع المحور  $x$  (المحور  $1/[S]$ ). والتقاطع مع المحور  $x$  يساوي  $1/K_m$  - ومن ثم فإننا يمكن تقدير  $K_m$  من القيمة المطلقة لمقلوب التقاطع مع المحور  $x$  من رسم لينوفير-بورك. وقيم كل من  $K_m$ ,  $V_{max}$  مسجلة في جدول ٦-٥.

لقد ذكرنا من قبل أن الطريقة الأفضل لتقدير قيم  $K_m$ ,  $V_{max}$  هي التطابق غير الخطي للبيانات غير المحولة لمعادلة ميكليس-منتين. وشكل ٦-٦ يوضح ذلك. ففي البيانات التجريبية الحقيقية نجد أن الأخطاء الصغيرة في القيم المقدرة لـ  $v$  تتضخم بالتحول الرياضي إلى  $1/v$ . والنسبة الأكبر للخطأ تكون مرتبطة بقيم  $v$  عند التركيز المنخفض للمادة الخاضعة. ولتوضيح ذلك فإن جدول ٦-٥ يعرض مقارنة بين قيم  $K_m$ ,  $V_{max}$  المقدرة بطرق الرسومات البيانية المختلفة للبيانات الافتراضية المسجلة في جدول ٦-٤. فالقيم الحقيقية لـ  $K_m$  و  $V_{max}$  المقدرة بطرق الرسومات البيانية المختلفة للبيانات المسجلة في جدول ٦-٤ هي  $100 \mu M/s$  و  $12 \mu M$  على التوالي. والتقدير باستخدام تطابق المنحنى للبيانات غير المحولة لمعادلة ميكليس-منتين أعطى  $11.63 \mu M$  و  $100.36 \mu M/s$  للثابتين بانحراف عن القيم الحقيقية بمقدار  $0.36\%$  و  $3.08\%$  على التوالي، بينما التطابق الخطي (ميكليس-منتين) للبيانات في شكل ٦-٦ أنتج تقدير لـ  $K_m$  و  $V_{max}$  بـ  $79.28$  و  $7.57$  بانحراف عن القيم الحقيقية بمقدار  $20.72\%$  و  $36.92\%$  على التوالي. والمثال السابق يوضح للقارئ قصور استخدام التحولات الخطية مثل المقلوب المزدوج (لينوفير - بورك) للبيانات الأولية في تقدير قيم الثوابت الحركية  $V_{max}$  و  $K_m$  مع ذلك فإن رسم لينوفير-بورك يكون مفيد في دراسة تثبيط الإنزيمات والإنزيمات متعددة المواد الخاضعة.

جدول ٦-٥ تقدير الثوابت الحركية  $K_m$ ,  $V_{max}$  من الرسوم البيانية المختلفة للبيانات

| طريقة الرسم             | $K_m(\mu M)$ | الانحراف عن $K_m$ الحقيقية (%) | $V_{max} (\mu M/s)$ | الانحراف عن $V_{max}$ الحقيقية (%) |
|-------------------------|--------------|--------------------------------|---------------------|------------------------------------|
| القيم الحقيقية          | 12.00        |                                | 100                 |                                    |
| ميكليس- منتين           | 11.63        | 3.08                           | 100.36              | 0.36                               |
| لينوفير- بورك           | 7.56         | 36.92                          | 79.28               | 20.72                              |
| أدى- هوفستي             | 9.66         | 19.50                          | 94.45               | 5.55                               |
| هانس- وولف              | 11.84        | 1.33                           | 100.97              | 0.97                               |
| إيسنتال- كورنيش- باودين | 11.53        | 3.92                           | 100.64              | 0.64                               |

بالرغم من الأخطاء المصاحبة لرسم المقلوب المزدوج (الينوفير-بورك) إلا أنها أصبحت أكثر الوسائل شيوعاً للتعبير بالرسم البياني للبيانات الحركية للإنزيمات. مع ذلك، فإنه توجد بعض التحولات الخطية الأخرى. ومرة أخرى، فإن استخدام طرق التحولات الخطية ليست ضرورية لأن معظم الباحثين الآن لهم القدرة على استخدام الطرق المعتمدة على التطابق غير الخطي باستخدام الحاسوب. ومن طرق الرسوم البيانية الخطية المشهورة المستخدمة في عرض البيانات الحركية للإنزيمات هي طريقة إدى-هوفستي Eadi-Hofstee وطريقة هانس- وولف Hanes-Wolff وطريقة إيسنتال- كورنيش- باودين Eisenthal-Cornish-Bowden.

#### ٦-٢-٢-٦ الرسوم لـ إدى- هوفستي

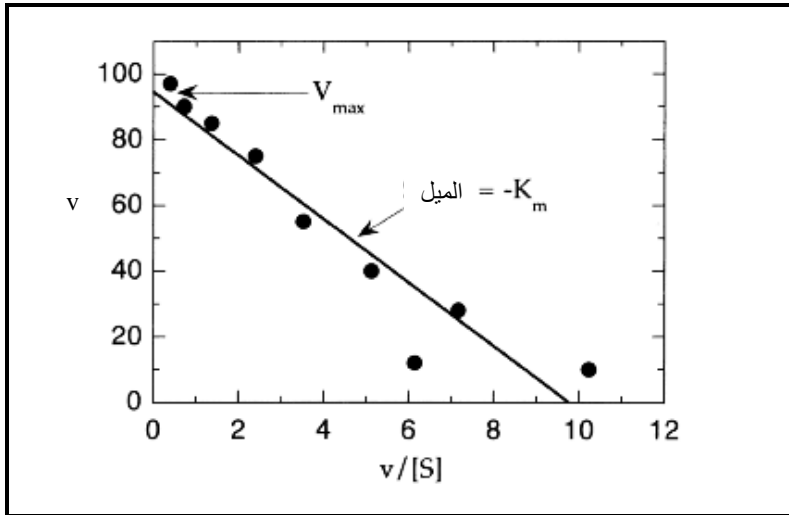
يمكن الحصول على معادلة إدى-هوفستي بضرب طرفي معادلة ٦-٢٥ في  $(K_m + [S])$  لنحصل على:

$$v(K_m + [S]) = V_{max} [S] \quad (٦-٤٢)$$

ثم بقسمة المعادلة السابقة على  $[S]$  وإعادة التنظيم، نحصل على:

$$v = V_{\max} - K_m \left( \frac{v}{[S]} \right) \quad (٤٣-٦)$$

ومن ثم، إذا رسمنا  $v$  كدالة في  $v/[S]$  فإن معادلة ٤٣-٦ تشير إلى علاقة خط مستقيم له ميل  $-K_m$  وتقاطع مع المحور  $y$  يساوي  $V_{\max}$ . ومثل هذا الرسم البياني يشار إليه بالرسم البياني لـ إدي-هوفستي كما هو موضح في شكل ٧-٦.



شكل ٧-٦ الرسم البياني لـ إدي-هوفستي لحركيات الإنزيم (البيانات مأخوذة من جدول ٤-٦).

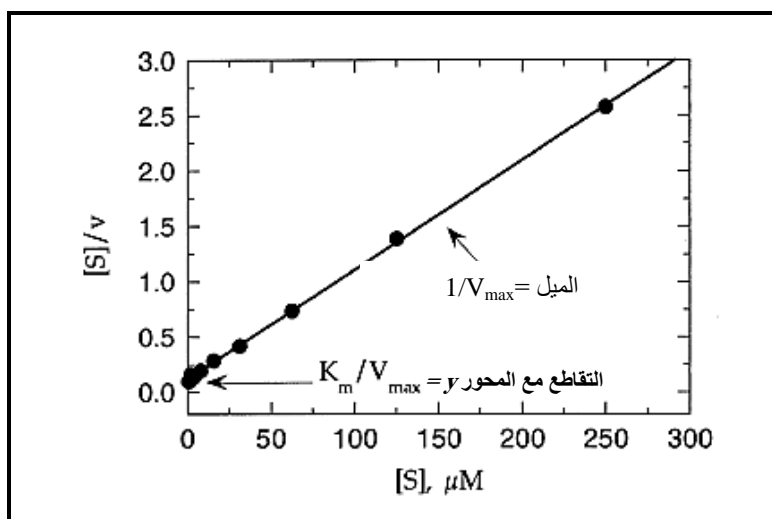
#### ٣-٢-٦-٦ الرسوم البيانية لـ هانس-وولف

إذا قمنا بضرب معادلة لينويفر - بورك (معادلة ٣٩-٦ في  $[S]$  نحصل على:

$$\frac{[S]}{v} = [S] \left( \frac{1}{V_{\max}} \right) + \frac{K_m}{V_{\max}} \quad (٤٤-٦)$$



وهذه المعادلة تؤدي أيضا إلى رسم بياني خطي عند رسم  $[S]/v$  كدالة في  $[S]$ . وشكل ٨-٦ يعرض مثل هذا الرسم الذي يطلق عليه الرسم البياني لـ هانس-وولف. وفي هذا الرسم البياني فإن الميل يكون  $1/V_{\max}$ ، والتقاطع مع المحور  $y$  (المحور  $[S]/v$ ) يكون  $K_m/V_{\max}$  والتقاطع مع المحور  $x$  (المحور  $[S]$ ) يكون  $K_m$ .

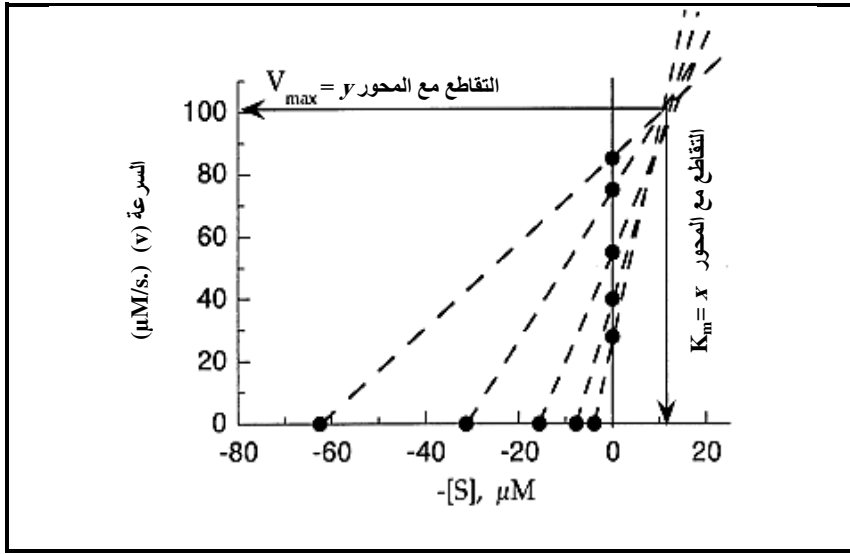


شكل ٨-٦ الرسم البياني لـ هانس-وولف لبيانات حركية الإنزيم. البيانات مأخوذة من جدول ٤-٦

#### ٤-٢-٦-٦ الرسوم البيانية لـ إيسنثيال-كورنيس-باودين

في هذه الطريقة الأخيرة، فإن أزواج البيانات  $v$  و  $[S]$  (كما في جدول ٤-٦) ترسم بيانياً كالتالي: قيم  $v$  توقع على المحور  $y$  والقيم السالبة لـ  $[S]$  توقع على المحور  $x$ . ولكل زوج من البيانات يرسم خط مستقيم الذي يربط النقطتين على المحورين ثم تمتد هذه الخطوط بعد نقط تقاطعها (شكل ٩-٦). وعندما يرسم خط من نقطة تقاطع هذه الخطوط إلى المحور  $y$ ، فإن القيمة التي يتقاطع عندها الخط الأفقي مع المحور  $y$  تساوي  $V_{\max}$ . وبالمثل عند إسقاط خط من نقطة التقاطع إلى المحور  $x$ ، فإن القيمة التي يتقاطع عندها هذا الخط الرأسي مع المحور  $x$  تعين قيمة  $K_m$ . ومثل هذا المنحنى في شكل ٩-٦ يشار

إليه بالرسم البياني المباشر لـ إيسنثال- كورنيش- باودين الذي يعطي أفضل تقدير لـ  $K_m$ ,  $V_{max}$  عن أى من طرق التحول الخطي الأخرى. لذلك يوصى باستخدام هذه الطريقة لتقدير الثوابت الحركية إذا كانت طريقة التطابق غير الخطي غير متاحة.



شكل ٦-٩ الرسم البياني المباشر لـ إيسنثال-كورنيش- باودين لبيانات حركات الإنزيم. البيانات المختارة مأخوذة من جدول ٦-٤

## ٦-٧ الانحراف عن حركات القطع الزائد (حركات ميكليس- منتن)

في معظم الحالات، فإن قياس حركية الإنزيم تتطابق جيداً مع سلوك ميكليس- منتن (حركات القطع الزائد) الذي تم مناقشته في هذا الفصل. مع ذلك فإنه أحياناً ما يشاهد إنحراف عن القطع الزائد لإعتماد السرعة على تركيز المادة الخاضعة (شكل ٦-٣ب). وهذا الشذوذ يحدث لعدة أسباب:

١. أحد الأسباب للانحراف عن حركات القطع الزائد هو أن بعض الإنزيمات تظهر تعاونية cooperatively. فقد رأينا في فصل ٤ وفصل ٥، أن بعض الإنزيمات توجد في صورة تجمع متعدد الواحدات الفرعية. بعض الإنزيمات توجد في صورة

متعدد الوحدات المتماثلة، وكل وحدة فرعية تحتوي على موقع نشط منفصل. ويكون من الممكن أن ارتباط جزئ المادة الخاضعة بأحد هذه المواقع النشطة أن يؤثر على المواقع النشطة الأخرى. وهذا التأثير يعرف بالتعاونية وسوف نناقشه في فصل ١٣.

٢. الانحراف عن سلوك القطع الزائد يمكن أن يحدث أيضاً بوجود بعض أنواع المثبطات. والحالات الأكثر مشاهدة هو تثبيط المادة الخاضعة. فعند زيادة تركيز المادة الخاضعة، فإن جزئ ثاني من المادة الخاضعة يرتبط بالمعقد ES ويكون معقد ثلاثي SES غير نشط.

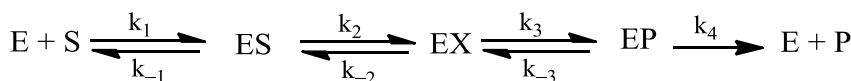
٣. السبب الثالث للانحراف عن حركات القطع الزائد هو وجود أكثر من إنزيم يعمل على نفس المادة الخاضعة. فعدد من الإنزيمات يتم دراستها مع الإنزيم المنقى جزئياً. فعدد من اختبارات التشخيص السريري التي تعتمد على قياس الأنشطة الإنزيمية تجرى على العينات الخام (الدم، متجانس خلوي وغيرهما). فإذا كانت المادة الخاضعة للتفاعل وحيدة للإنزيم تحت الدراسة، فإنه يمكن استخدام العينات الخام مع الحصول على نتائج جيدة. أما إذا أحتوت العينة على أكثر من إنزيم يمكن أن يعمل على المادة الخاضعة، فإنه يحدث إنحراف في النتائج الحركية المتوقعة. ويجب أخذ ذلك في الاعتبار.

٤. والسبب الأخير للانحراف عن حركات القطع الزائد هو أن بعض الطرق الفيزيائية لقياس السرعة مثل التحليل الطيفي يمكن أن تؤدي إلى إصطناع تجريبي الذي يؤدي إلى هذا الانحراف عن السلوك المتوقع.

## ٦-٨ حركات الطور العابر (حركات ما قبل الحالة الثابتة)

كثير من الأبحاث المنشورة عن الإنزيمات تضمنت حركات الحالة الثابتة للتفاعلات الإنزيمية التي منها أمكن الاستدلال على مقدار كبير من المعلومات الكيموحيوية. مع ذلك، فإن حركات الحالة الثابتة لها بعض القصور التي تشمل:

- الثابتين الحركيين للحالة الثابتة  $k_{cat}$  و  $K_m$  هما دالتين معقدتين يضمّان ثوابت معدّل للخطوات المتعددة في التفاعل الإنزيمي ككل. ومن ثم فإنهما لا يعطيان معلومات عن معدّلات الخطوات الفردية في مسار التفاعل. فعلى سبيل المثال دعنا ننظر إلى تفاعل إنزيمي لمادة خاضعة فردية، ولكن هذه المرة سوف نحدد ثوابت المعدّل الفردية:



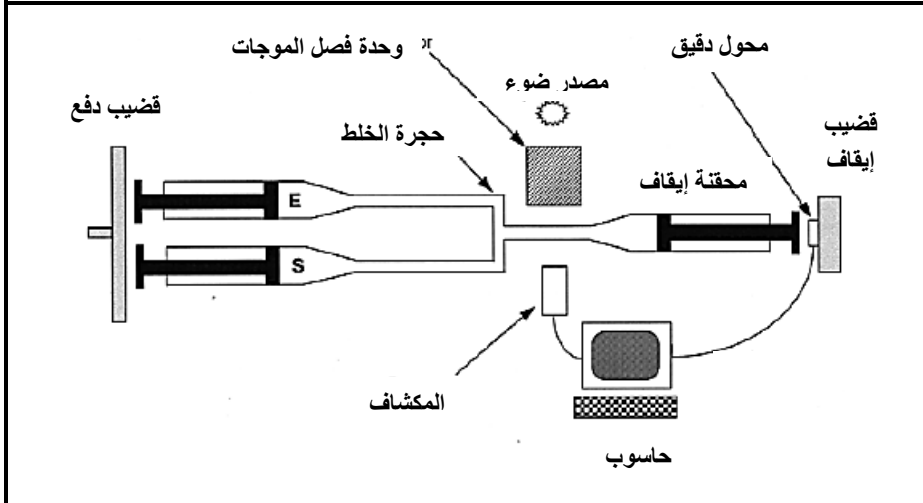
وهنا فإن  $EX$  يعبر عن مركب وسيط عابر (قصير الأمد) في التفاعل الإنزيمي الذي قد يكون أنواع كيميائية مميزة أو بنية فراغية التي تتكون بالتغير في المعقد  $ES$ . ودراسة التفاعل بحركات الحالة الثابتة سوف يعين التفاعل ككل بدلالة الثابتين  $K_m$  و  $k_{cat}$ ، ولكنها لا تعطي معلومات عن معدّلات وطبيعة الخطوات الفردية.

- أيضاً، فإن حركات الحالة الثابتة تكون محدودة في تعيين تفاصيل آلية التفاعل الإنزيمي وتعيين الخطوة المحددة للمعدّل.

وللتغلب على بعض هذه القيود، فإن الباحثين اتجهوا إلى طرق الحركات السريعة *rapid kinetic* (حركات ما قبل الحالة الثابتة) التي تسمح بإجراء القياسات خلال ميلي ثانية من بدأ التفاعل لقياس حركات المركبات الوسيطة العابرة (قصيرة الأمد) التي تظهر بعد الارتباط الأولى للمادة الخاضعة. وهذه الطرق يشار إليها إجمالاً بحركات الحالة (الطور) العابرة *transient state (phase) kinetics* وتطبيقها على الأنظمة الإنزيمية يعطي تفاصيل حركية وافرة عن قياسات الحالة الثابتة البسيطة.

يحتاج قياس الأحداث الحركية في مدى الملي ثانية إلى أدوات خاصة. وقد صممت عدة أجهزة لهذا الغرض. إلا أن أكثر الطرق شائعة الاستخدام لقياس الحركات العابرة هي (١) السريان المتوقف *stopped - flow* (٢) كبح التفاعل السريع *rapid reaction quenching*.

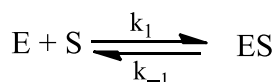
١- تجربة السريان المتوقف: في هذه التجربة يتم قياس الأنواع الوسيطة (العابرة) بالكشف عن إشارة ضوئية مفردة (نموذجياً الامتصاص الضوئي أو الاستشعار الضوئي fluorescence). وشكل ٦-١٠ يوضح التصميم النموذجي لجهاز السريان المتوقف. يتألف الجهاز من محقتين، إحداها تحتوي على محلول الإنزيم (E) والأخرى تحتوي على محلول المادة الخاضعة (S). وكلا المحقتين تتصلان بمزلاج (قضيب دفع) الذي يضغط على مكبس كل محقنة عند معدل ثابت مشترك والذي يدفع بالقوة المحاليل من كل محقنة للخلط في حجرة الخلط ثم يتدفق خلال أنبوب الكشف. وتوجد محقنة ثالثة عند نهاية أنبوب الكشف. ويتدفق السائل في هذه المحقنة، فإن مكبسها يدفع إلى الخلف حتى يقف بالتماس مع قضيب التوقيف. وقضيب التوقيف يتصل بمحول دقيق الذي يرسل إشارة إلى الحاسوب ليبدأ مشاهدة الإشارة الضوئية من المحلول المحصور في أنبوب الكشف. وقياسات الإشارة الضوئية تجري على طول الوقت أثناء فترة وجود المحلول في أنبوب الكشف.

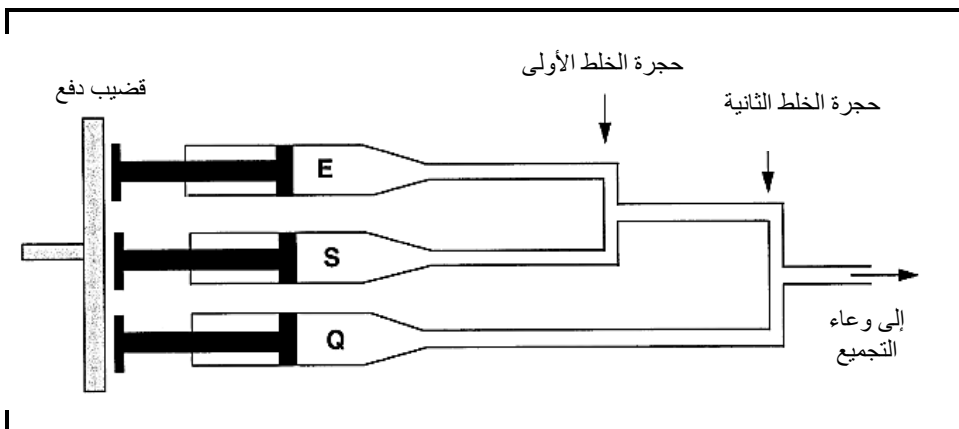


شكل ٦-١٠ مخطط بياني لجهاز السريان المتوقف النموذجي لقياس الحركات السريعة. E هو محلول الإنزيم و S هي محلول المادة الخاضعة

٢- طريقة الكبح السريع للتفاعل: في هذه الطريقة (شكل ٦-١١) فإن ثلاثة محاقن تكبس بقضيب دفع مشترك. والمحقنتين الأولى والثانية يحتويان على محلول الإنزيم (E) ومحلول المادة الخاضعة (S) على التوالي. وهذين المحلولين يدفعان إلى إلى حجرة الخلط الأولى، ثم إلى أنبوب طور التفاعل ثم إلى أنبوب الخلط الثانية. ومدى وقت التفاعل يتم التحكم فيه بواسطة طول أنبوب التفاعل، وبواسطة معدل السريان خلال هذا الأنبوب. وخلال حجرة الخلط الثانية فإن مخلوط التفاعل يتحد مع المادة الكابحة (Q) التي توقف (أو تكبح) التفاعل سريعاً. والمحلول الكابح يجب أن يكون له القدرة على وقف التفاعل توتاً إما بتغيير طبيعة denature الإنزيم أو بعزل عامل مساعد حرج أو أى عناصر أخرى في مخلوط التفاعل. فعلى سبيل المثال، فإنه من الشائع إستخدام حمض قوي في كبح التفاعلات الإنزيمية بهذه الطريقة. أيضاً، فإن الإنزيمات التي تعتمد على أيونات المعادن ثنائية التكافؤ كعوامل مساعدة يمكن كبحها بخلطها مع EDTA (إيثيلين ثنائي الأمين رباعي حمض الخليك). وبمجرد كبح التفاعل، فإن المحلول المختلط يسير إلى وعاء التجميع حيث يمكن استرداده. ويتم الكشف عن المواد الخاضعة والنواتج في وعاء التجميع بأى وسيلة مناسبة مثل التحليل الطيفي أو الكروماتوجرافي للمركبات المعلمة بالنظائر أو استخدام الفصل الكهربائي electrophoresis لفصل المواد الخاضعة والنواتج.

ومع الأجهزة مثل تلك المستخدمة في السريان المتوقف والكبح السريع للتفاعل يمكن قياس تكوين النواتج أو المركبات الوسيطة كدالة في الوقت بالمقياس الزمني ميلي ثانية ms. وعدد من المخططات الحركية يمكن دراستها بتقنيات الحركات السريعة. وسوف نعرض هنا أبسط هذه المخططات. والمخطط الأبسط هو الارتباط العكسي للمادة الخاضعة مع الإنزيم لتكوين المعقد ES:





شكل ١١-٦ مخطط بياني لجهاز الكبح السريع النموذجي لقياسات الحركات السريعة. E هو محلول الإنزيم و S هي محلول المادة الخاضعة و Q هو محلول المادة الكابحة.

وإذا أجريت التجربة تحت ظروف  $[S] \gg [E]$ ، فإن تغير صغير سوف يحدث في تركيز المادة الخاضعة. ومن ثم فإن تكوين المعقد ES سوف يتبع حركات الرتبة الأولى الكاذب الذي يكافئ معالجة الاتزان لمعقد المستقبل- المتصلة الذي نوقش في فصل ٥:

$$[ES]_t = [ES]_{eq} [1 - e^{-k_{obs}t}] \quad (٤٥-٦)$$

حيث  $[ES]_t$  هو تركيز المعقد الثنائي عن الزمن  $t$  و  $[ES]_{eq}$  هو تركيز المعقد الثنائي عند الاتزان و  $k_{obs}$  هي القيمة المقدرة تجريبياً لثابت المعدل للرتبة الأولى الكاذب للوصول إلى الاتزان. ومن ثم فإن معدل التكوين المشاهد  $k_{obs}$  سوف يعتمد على تركيز المادة الخاضعة كالتالي:

$$k_{obs} = k_1 [S] + k_{-1} \quad (٤٦-٦)$$

ورسم  $k_{obs}$  كدالة في  $[S]$  سوف يكون خطي مع تقاطع  $y$  يساوي  $k_{-1}$  وميل يساوي  $k_1$ ، كما سبق شرحه سابقاً (شكل ٢-٥).

## أسئلة

- ١- أكتب معادلات المعدل لتفاعلات الرتبة الأولى والرتبة الثانية
- ٢- ما هو الفرق بين السرعة اللحظية والسرعة الابتدائية والسرعة القصوى للتفاعل الإنزيمي.
- ٣- اشتق معادلة ميكيلس - منتين لمادة خاضعة فردية.
- ٤- ماذا تشير قيم  $K_m$  و  $k_{cat} / K_m$  حول الإنزيم
- ٥- أكتب معادلة لينوفير - بورك (المقلوب المزدوج)، وأوصف سمات رسم لينوفير - بورك.
- ٦- اشرح لماذا يكون من الأسهل عادة قياس سرعة التفاعل الإنزيمي من معدل ظهور الناتج عن معدل اختفاء المادة الخاضعة.
- ٧- عند أى تركيز من المادة الخاضعة  $S$  (معبراً عنها بمضاعفات  $K_m$ ) تكون  $v = 0.95 V_{max}$  ؟
- ٨- أجب عن الأسئلة التالية بصح أو خطأ. وإذا كانت خطأ علل لماذا ؟
  - (أ) السرعة الابتدائية لتفاعل محفز إنزيمياً تكون مستقلة عن تركيز المادة الخاضعة.
  - (ب) عند مستوى التشبع للمادة الخاضعة، فإن معدل التفاعل المحفز إنزيمياً يتناسب مع تركيز الإنزيم.
  - (ج) إن ثابت ميكيلس  $K_m$  يساوي تركيز المادة الخاضعة التي عندها يكون  $v = \frac{1}{2} V_{max}$ .
  - (د)  $K_m$  للإنزيمات غير الوضعية يختلف باختلاف تركيز الإنزيم.
  - (هـ) معدل تفاعل محفز إنزيمياً في وجود تركيز محدد من المادة الخاضعة سوف ينخفض مع الوقت.
- ٩- تم دراسة تفاعل محفز إنزيمياً عند ظروف ثابتة من الـ pH ودرجة الحرارة. وتم الحصول على النتائج التالية:

| تركيز المنتج P عند الأزمنة t (دقيقة) |         |         |         |       | التركيز الابتدائي لـ S (mmol/L) |
|--------------------------------------|---------|---------|---------|-------|---------------------------------|
| t = 4.0                              | t = 3.0 | t = 2.0 | t = 1.0 | t = 0 |                                 |
| 600                                  | 450     | 300     | 150     | 0     | 5.0                             |
| 730                                  | 540     | 360     | 180     | 0     | 6.5                             |
| 940                                  | 705     | 470     | 235     | 0     | 10.0                            |
| 1300                                 | 975     | 650     | 325     | 0     | 20.0                            |
| 1640                                 | 1230    | 820     | 410     | 0     | 40.0                            |



أحسب  $K_m$  و  $V_{max}$ ، أولاً باستخدام رسم ميكليس - منتين  $V$  مقابل  $[S]$ ، ثم ثانياً باستخدام رسم لينويفر - بورك. قارن بين النتائج المتحصل عليها بواسطة الطريقتين.

١٠- البنسلين Penicillin (مضاد حيوي) يحلل مائياً، ومن ثم يصبح غير نشاط بواسطة إنزيم البنسليناز Penicillinase الذي يوجد في بعض البكتريا المقاومة. إن كتلة هذا الإنزيم في *Staphylococcus aureus* تكون 29.6 kdal. كمية البنسلين التي تحلل في الدقيقة في 10 mL محلول يحتوي على  $10^{-9}$  g من إنزيم البنسليناز المنقى قد قيست كدالة في تركيز البنسلين. افترض أن تركيز البنسلين لا يتغير بدرجة لا يمكن تقديرها أثناء التفاعل

| الكمية المتحللة<br>(nonomoles) | تركيز البنسلين<br>( $\mu M$ ) |
|--------------------------------|-------------------------------|
| 0.11                           | 1                             |
| 0.25                           | 3                             |
| 0.34                           | 5                             |
| 0.45                           | 10                            |
| 0.58                           | 30                            |
| 0.61                           | 50                            |

(أ) إرسم  $v$  مقابل  $[S]$  و  $1/V$  مقابل  $1/[S]$  لهذه البيانات. هل إنزيم البنسليناز يظهر أنه يتوافق مع حركيات ميكليس منتين؟ وإذا كان كذلك، ما هي قيمة  $K_m$ ؟

(ب) ما هي قيمة  $V_{max}$ ؟

(ج) ما هو رقم التحول للإنزيم تحت هذه الظروف التجريبية؟ افترض أن الإنزيم يحتوي على موقع نشط واحد لكل جزئ

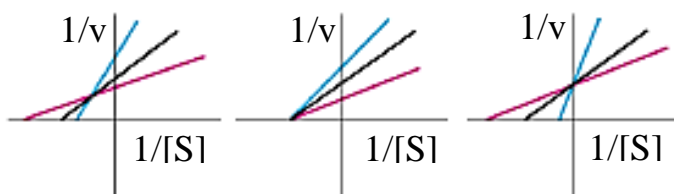
١١- إن رسم  $1/v$  مقابل  $1/[S]$  يعرف برسم لينويفر - بورك. وأحد الطرق الأخرى للتعبير عن البيانات الحركية هو رسم  $v$  مقابل  $v/[S]$  الذي يعرف برسم أدى - هوفستي - Edie Hofstee Plot

(أ) أعد ترتيب معادلة ميكليس - منتين لتعطي  $v$  مقابل  $v/[S]$ .

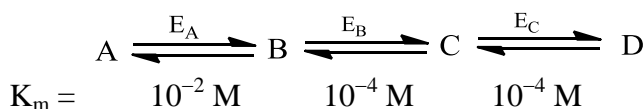
(ب) ما هي معنى (دلالة) كل من التقاطع الرأسي، والتقاطع الأفقي والميل في رسم  $v$  مقابل  $v/[S]$ ؟

١٢- افترض أن مادتين A و B يتنافسان على إنزيم. اشتق تعبير يربط نسبة استخدام A و B إلى تركيزات هاتين المادتين الخاضعتين وقيمهما  $k_2$  و  $K_m$  (إلماعه: عبر عن  $v_A$  كدالة في  $k_2/K_m$  للمادة A، وافعل ذلك بالنسبة لـ  $v_B$ ) هل التخصص يتحدد بـ  $K_m$  بمفردها؟

١٣- لتفاعل إنزيمي لمادة خاضعة واحدة، فإنه تم رسم المقلوب المزدوج وتم تقديره لثلاثة تركيزات مختلفة من الإنزيم. أى من المنحنيات الثلاثة تتوقع الحصول عليها؟ أشرح ذلك.



١٤- في تحول A إلى D في المسار البيوكيميائي التالي، فإن الإنزيمات  $E_A$ ،  $E_B$  و  $E_C$  لها قيم  $K_m$  كما هو موضح تحت كل إنزيم. وإذا كان تركيز المواد الخاضعة والنواتج توجد عند تركيز  $10^{-4}$  أى خطوة تكون هى المحددة للمعدل لماذا؟

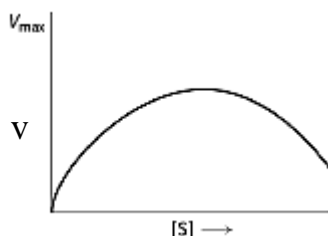


١٥- إنزيم A يحفز التفاعل  $S \rightarrow P$  وله  $K_m = 50 \mu M$  و  $V_{max} = 100 \text{ nM.s}^{-1}$ . وإنزيم B يحفز التفاعل  $S \rightarrow Q$  وله  $K_m = 5 \text{ mM}$  و  $V_{max} = 120 \text{ nM.s}^{-1}$ . وعندما يضاف  $100 \mu M$  من S لمخلوط يحتوي على كميات متساوية من الإنزيمين A و B، وبعد دقيقة واحدة من بداية التفاعل، أى من النواتج P أو Q سوف يوجد بكمية كبيرة؟

١٦-  $K_m$  لتفاعل الكيموتريسين مع N-acetylvaline ester تكون  $8.9 \times 10^{-2} M$ ، و  $K_m$  لتفاعل الكيموتريسين مع N-acetytyrosine ethylester تساوي  $10^{-4} M$  (أ) أى من المادتين لها ألفة ظاهرية للإنزيم (ب) أى من المادتين على الأرجح يكون لها قيمة أعلى لـ  $V_{max}$

١٧- للإنزيم يتبع حركات ميكليس- منتين، ما هي قيمة  $V_{max}$  إذا كانت  $v$  تساوي  $1\mu M$  في الدقيقة عند  $1/10 K_m$ .

١٨- إنزيم يتبع حركات ميكليس-منتين البسيطة في غياب أى مثبط أظهر السلوك الحركي التالي. إن قيمة  $V_{max}$  المتوقعة موضحة على المحور  $v$ .



(أ) إرسم المقلوب المزدوج المقابل لمنحنى السرعة- ضد المادة الخاضعة.

(ب) أعطي تفسير للنتائج الحركية

١٩- افترض أن تفاعل إنزيمي له  $k_1 = 4 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$  و  $k_{-1} = 6 \times 10^4 s^{-1}$  و  $k_2 = 2.0 \times 10^3 s^{-1}$ . حدد ما إذا كان ارتباط الإنزيم - المادة الخاضعة يتبع نموذج الاتزان السريع أم لا؟

٢٠- هل يكون من المفضل استخدام مخطط الاتزان السريع كنموذج للحركية لتفاعل محفز إنزيمياً مع ثوابت المعدل التالية؟

$$k_1 = 7 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$$

$$k_{-1} = 8 \times 10^5 s^{-1}$$

$$k_2 = 5 \times 10^4 s^{-1}$$

٢١-  $RuBisCO_2$  هو إنزيم في دورة كالفن الذي يثبت  $CO_2$  الجوي وله رقم تحول  $3.3 s^{-1}$ .

ما هو الوقت الذي يأخذه الإنزيم ليثبت جزيء واحد من  $CO_2$ ؟

---

## فصل ٧ تخصص الإنزيمات

### Enzyme Specificity

---

|     |                                              |
|-----|----------------------------------------------|
| ١-٧ | تخصص الإنزيمات للمادة الخاضعة                |
| ٢-٧ | ثابت التخصص للمادة الخاضعة                   |
| ٣-٧ | تخصص الإنزيمات لنوع التفاعل وتسمية الإنزيمات |

في فصل ٦ ناقشنا الخاصية الأولى للحفز الإنزيمي ألا وهي قوة الحفز، فالإنزيمات تزيد معدلات التفاعلات بعامل لا يقل عن مليون مقارنة بالتفاعلات غير المحفزة. وفي هذا الفصل سوف نناقش الخاصية الثانية للإنزيمات وهي التخصص. فالإنزيمات لها درجة عالية من التخصص specificity لكل من نوع التفاعل الذي تقوم بحفزه وفي إنتقائها (إختيارها) للمادة الخاضعة التي تقوم بتحويلها. والتخصص والانتقاء وهما من الظواهر البيولوجية الهامة يعتبران ذوات أهمية عالية لتفاعلات الأيض حيث توجّه الإنزيمات المواد الخاضعة إلى مسارات الأيض المختلفة اعتماداً على إحتياجات الخلايا الذي يؤدي إلى حفظ الطاقة والمحافظة على الاتزان الجسدي Homeostatis. نموذجياً يكون الإنزيم متخصص لنوع واحد من التفاعل ويعمل على مادة خاضعة واحدة أو عدد من المواد الخاضعة التي لها سمات تركيبية مشتركة، وينتج ناتج أو نواتج خاصة، ونادراً ما ينتج

عن التفاعلات الإنزيمية نواتج جانبية. إضافة إلى ذلك، فإن الإنزيمات لها القدرة على التمييز بين الاختلافات الدقيقة في المواد الخاضعة ومن ثم التمييز بين المتناظرات التركيبية (المنطقية) regioisomers وبين المتناظرات المجسمة (الفراغية) stereoisomers وبين المتناظرات الهندسية geometrical isomers. كذلك فإن الإنزيمات يمكن أن تحول المواد الخاضعة المتماثلة nonchiral إلى نواتج غير متماثلة chiral. وعملية التخصص (الانتقاء) للمادة الخاضعة تتحدد في الخطوة الأولى للحفز وهي ارتباط المادة الخاضعة بالموقع النشط للإنزيم الذي يتطلب نوع ما من التطابق المجسم بين المادة الخاضعة والموقع النشط للإنزيم. ويشارك في عملية التخصص أيضاً القوى غير التساهمية بين الإنزيم والمادة الخاضعة. في هذا الفصل سنعرض الأنواع المختلفة من التخصص (الانتقاء) للمادة الخاضعة والتخصص لنوع التفاعل. وفي فصل ٨ سنشرح الآليات الكيميائية المشتملة في تعجيل المعدل والتخصص للإنزيمات.

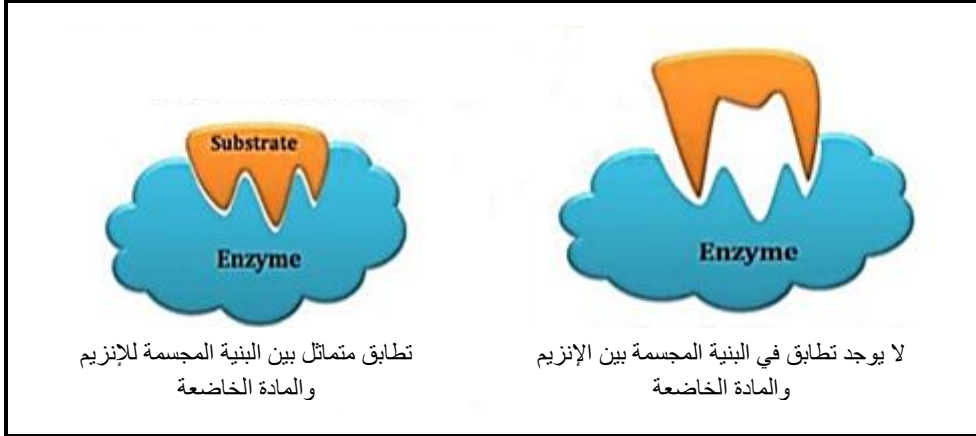
## ٧-١ تخصص الإنزيمات للمادة الخاضعة

لكي يعمل الإنزيم كحفاز، فإنه يجب أولاً أن يرتبط بالمادة (أو المواد) الخاضعة ثم يجرى عليها التحولات الكيميائية بمعدل سريع لينتج ناتج (أو نواتج) التفاعل. ويبدو من ذلك أن عملية تخصص الإنزيمات للمواد الخاضعة تحدث في خطوة الارتباط في الحفز الإنزيمي. وتخصص الإنزيمات enzymes specificity للمادة الخاضعة أو إنتقاء المادة الخاضعة substrate selectivity هو قدرة إنزيم ما على إختيار المادة (أو المواد) الخاضعة الصحيحة من بين مجموعة من الجزيئات الكيميائية المتشابهة. والتخصص للمادة الخاضعة هو في الحقيقة آلية تعرّف (تمييز) جزيئية molecular recognition mechanism التي تعمل خلال:

- التطابق التركيبي والمجسم (البنية الفراغية) structural and conformational complementarity بين الموقع النشط للإنزيم والمادة الخاضعة (شكل ٧-١).

● التطابق الإلكتروني electronic complementarity بين موقع الارتباط في الإنزيم والمادة الخاضعة. وهنا فإن بواقي الأحماض الأمينية التي تكوّن موقع الارتباط في الإنزيم تنظم بطريقة خاصة لتجذب المادة الخاضعة خلال القوى غير التساهمية (مثل قوى فان ديرفالس، القوى الكهربائية الساكنة، الروابط الهيدروجينية، والتأثيرات الكارهة للماء).

وفي فصل ٨ سوف نناقش النماذج المختلفة التي تفسّر عملية تخصص الإنزيم للمادة الخاضعة.



شكل ٧-١ التطابق المجسم بين الإنزيم والمادة الخاضعة (أ) في حالة المادة الخاضعة الصحيحة يوجد تطابق مجسم (فراغي) بين الموقع النشط للإنزيم والمادة الخاضعة ويحدث التفاعل الإنزيمي (ب) في حالة المادة الخاضعة غير الصحيحة لا يوجد تطابق مجسم بين الموقع النشط للإنزيم والمادة الخاضعة ولا يحدث تفاعل.

وتظهر الإنزيمات مستويات مختلفة من التخصص تجاه المواد الخاضعة التي تشمل:

١. التخصص للمادة الخاضعة (التخصص المطلق).
٢. التخصص للرابطة (التخصص النسبي).
٣. تخصص المجموعة (التخصص المتوسط أو المعتدل).
٤. التخصص للمنطقة.

٥. التخصص الضوئي (التخصص المجسم الفراغي).
٦. التخصص الهندسي.
٧. التخصص الموجّه بالقلب.
٨. التخصص بالتماثل (التناسق) المكافئ بين الإنزيم والمادة الخاضعة.
٩. التخصص الثنائي (المزدوج).
١٠. التخصص للعامل المساعد.

وفي الأجزاء التالية سنناقش هذه الأنواع المختلفة من التخصص.

#### ١-١-٧ التخصص للمادة الخاضعة (التخصص المطلق)

التخصص للمادة الخاضعة substrate specificity يطلق عليه أيضا التخصص المطلق absolute specificity هو أعلى درجات التخصص. فالإنزيمات التي تظهر تخصص للمادة الخاضعة تكون متخصصة لمادة خاضعة واحدة وتفاعل واحد، ومن أمثلة ذلك:

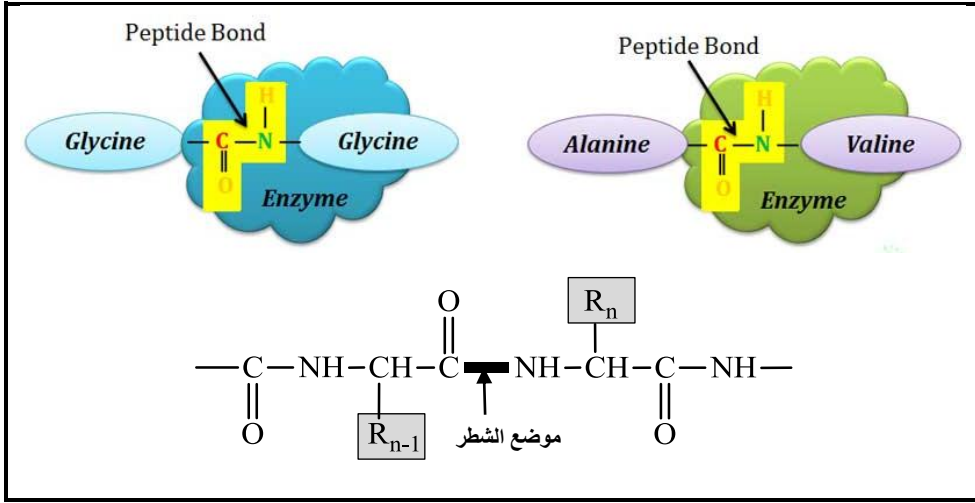
- إنزيم لاكتيز lactase يمكن أن يحلل فقط الرابطة  $\beta$ -1-4 الجلايكوسيدية في سكر اللاكتوز ليعطي سكر الجالاكتوز وسكر الجلوكوز.
- إنزيم مالتيز maltase يعمل فقط على الرابطة  $\alpha$ -1-4 الجلايكوسيدية في سكر المالتوز ليعطي جزيئات من الجلوكوز.
- إنزيم يوريز urease يعمل فقط على اليوريا ويقوم بتفكيكها إلى الأمونيا وثاني أكسيد الكربون

#### ٢-١-٧ التخصص للرابطة (التخصص النسبي)

التخصص للرابطة bond specificity يطلق عليه أيضاً التخصص النسبي relative specificity. والإنزيمات التي تظهر التخصص للرابطة تكون متخصصة للمواد

الخاضعة التي تحتوي على روابط متماثلة وتركيب متماثل. وهذا يعني أن هذه الإنزيمات تكون متخصصة فقط لأنواع معينة من الروابط مثل الروابط الببتيدية، الروابط الجلايكوسيدية، روابط الأستر وغيرهم من الروابط ومن أمثلة ذلك:

- إنزيم ألفا  $\alpha$ -amylase يمكن أن يحلل مائياً الرابطة  $\alpha$ -1-4 الجلايكوسيدية في كل من النشا والجلايكوجين، بمعنى أن الإنزيم يكون متخصص للرابطة  $\alpha$ -1-4 الجلايكوسيدية وليس للمادة الخاضعة
- إنزيمات تفكك البروتين proteinases هي قسم آخر من الإنزيمات. التي تظهر التخصص للرابطة، فهذه الإنزيمات يمكن أن تحلل مائياً الروابط الببتيدية التي تتكون بواسطة أى من الأحماض الأمينية في البروتين (شكل ٧-٢)



شكل ٧-٢ إنزيم الببتيداز peptidase يكون متخصص للرابطة الببتيدية التي تتكون بين أى أحماض أمينية. فالأحماض الأمينية المعلمة بـ  $n-1, n$  يمكن أن تكون أى من الأحماض الأمينية العشرين

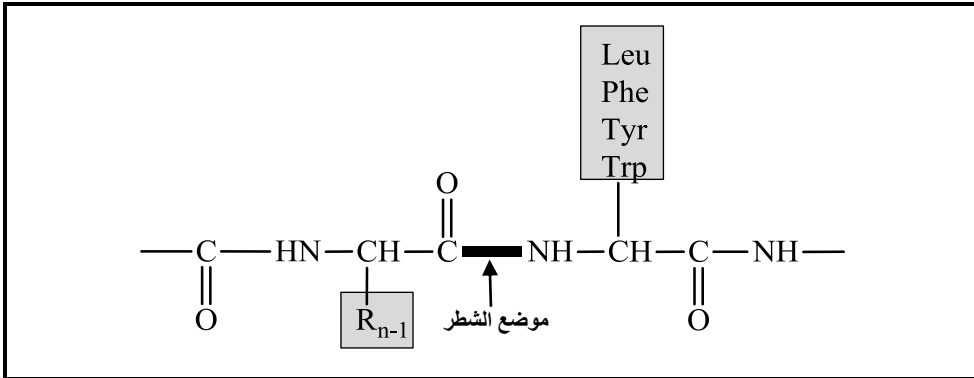
### ٧-١-٣ تخصص المجموعة (التخصص المتوسط أو المعتدل)

تخصص المجموعة group specificity يطلق عليه أيضاً التخصص المتوسط أو المعتدل moderate specificity. وهنا فإن الإنزيم يكون متخصص لكل من الرابطة



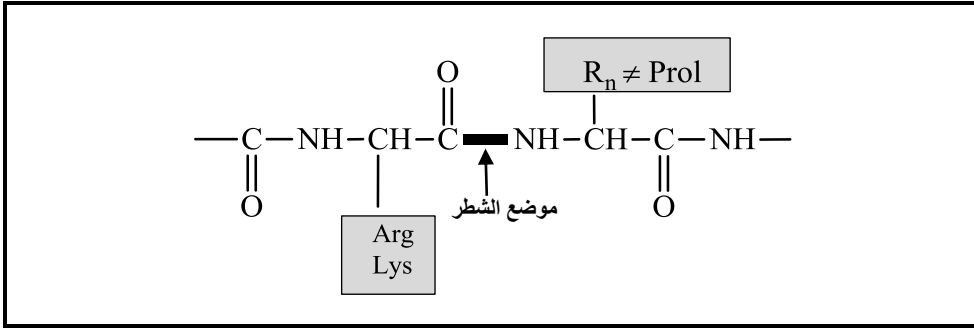
والمجموعات التي تحيط بالرابطة. وتخصص المجموعة يكون أعلى درجة من تخصص الرابطة. وإنزيمات التحلل الببتيدي الداخلية endopeptidase والتحلل الببتيدي الخارجية exopeptidases (وهما صنفين عامين من إنزيمات التحلل البروتيني proteinases) يمثلان أمثلة تقليدية لتخصص المجموعة. ومن أمثلة إنزيمات التحلل الببتيدي الداخلية:

- إنزيم ببسين pepsin وهو إنزيم هضم في المعدة ينتج بواسطة الخلايا الرئيسية في المعدة ويحلل الرابطة الببتيدية في جانب مجموعة الأمين التي تشتق من الأحماض الأمينية ليوسين (Leu)، فينيل آلانين (Phe) والتيروزين (Tyr) والترتوفان (Trp) شكل ٣-٧.



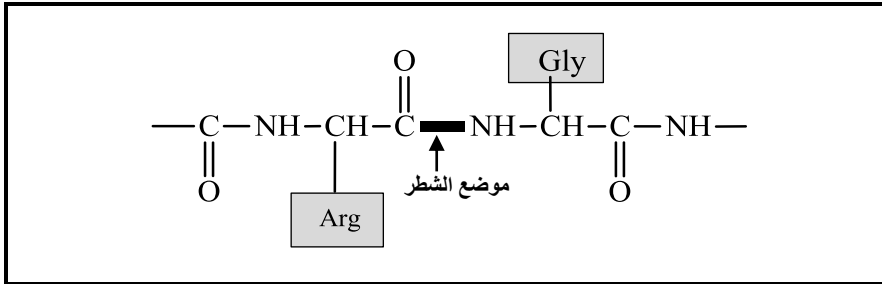
شكل ٣-٧ إنزيم ببسين (متخصص للمجموعة) حيث يكون متخصصاً لنوع الرابطة (الرابطة الببتيدية) التي يكون فيها مجموعة الأمينو المساهمة في الرابطة أتية من أى من الأحماض الأمينية ليوسين (Leu)، فينيل آلانين (Phe)، تيروزين (Tyr)، وترتوفان (Trp)

- إنزيم تربسين Trypsin هو أحد إنزيمات الجهاز الهضمي يمكن أن يحلل مائياً الرابطة الببتيدية التي يكون فيها مجموعة الكربوكسيل مشتقة من أى من الأحماض الأمينية القاعدية التالية: لايسين (Lys.)، أرجنين (Arg) و  $\text{R}_n \neq \text{Pro}$ .



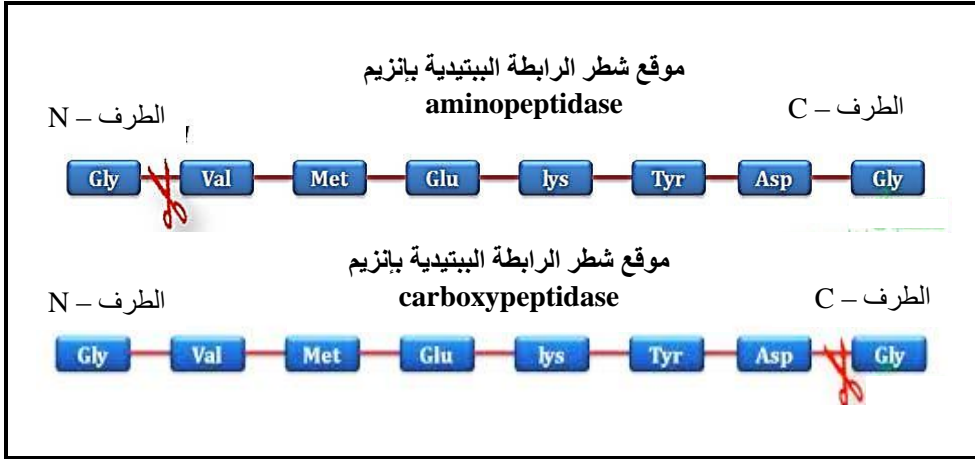
شكل ٧-٤: إنزيم تريسين (متخصص للمجموعة) حيث يكون متخصص للرابطة الببتيدية التي فيها تكون مجموعة الكربوكسيل المساهمة في الرابطة آتية من الأحماض الأمينية المحتوية على شحنة موجبة (قاعدية) أرجنين Arg ولايسين (Lys) و  $R_n \neq \text{pro}$  برولين (pro).

- إنزيم ثرومبين Thrombin وهو أحد الإنزيمات التي تشارك في تجلط الدم يكون أكثر تخصصاً عن إنزيم التريسين. فالمجموعة الجانبية للجانب الكربوكسيلي للرابطة الببتيدية المعرضة للتفكك يجب أن تكون أرجنين Arg، بينما المجموعة الجانبية للجانب الأميني للرابطة يجب أن تكون جليسين (Gly) (شكل ٧-٥).



شكل ٧-٥: تخصص ثرومبين وهو أحد عوامل التجلط

- إضافة إلى ذلك، فإن إنزيم aminopeptidase وإنزيم carboxypeptidase يمكن لهما من تفكيك أي رابطة ببتيدية للبروتين من الطرف النيتروجيني N-terminal والطرف الكربوكسيلي C-terminal على التوالي (شكل ٧-٦).

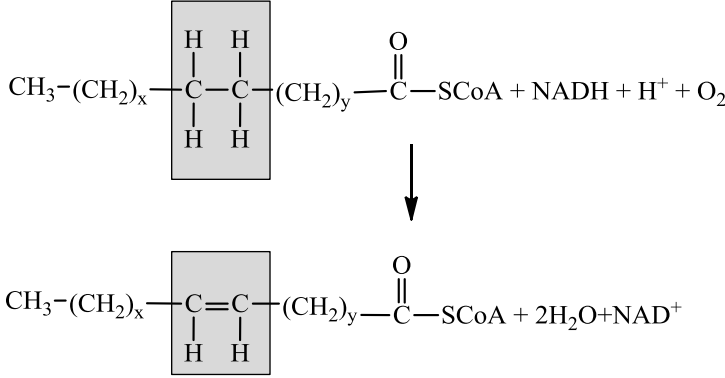


شكل ٦-٧ (أ) تخصص إنزيم amino-peptidase: يفكك الرابطة الببتيدية من الطرف النيتروجيني في سلسلة عديد الببتيد بين أى من الأحماض الأمينية (ب) تخصص إنزيم carboxypeptidase: يفكك الرابطة الببتيدية من الطرف الكربوكسيلي في سلسلة عديد الببتيد. بين أى من الأحماض الأمينية

#### ٦-١-٤ التخصص للمنطقة

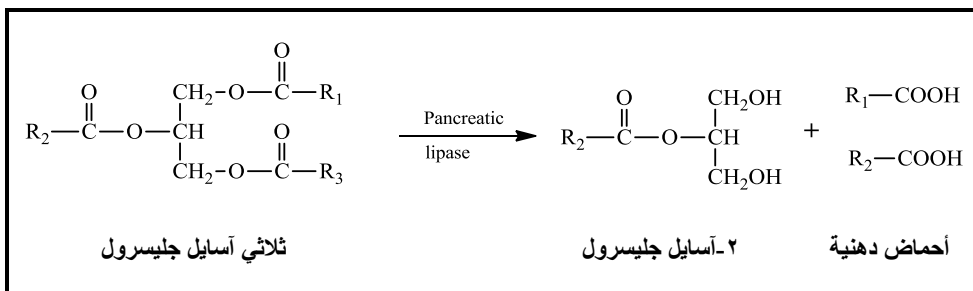
التخصص للمنطقة regiospecificity يشير إلى التخصص لنوع واحد من ناتج التفاعل ولكن ليس متناظرات موضعية أخرى. مثال ذلك:

- إنزيمات Fatty acids desaturases، التي تظهر تخصص للمنطقة في إدخال رابطة مزدوجة. فأنظمة التدييات تحتوى على أربعة إنزيمات نازعة للتشبع desaturases (أى تكوين رابطة مزدوجة من رابطة مشبعة في الأحماض الدهنية)، هذه الإنزيمات يرمز لها ب  $\Delta^4$ ،  $\Delta^5$ ،  $\Delta^6$ ،  $\Delta^9$  fatty acyl-CoA desaturases (حيث الحرف  $\Delta$  "دلّتا" يشير إلى موضع الرابطة المزدوجة، والرقم يشير إلى ذرة الكربون التي تبدأ عندها الرابطة المزدوجة. مثال ذلك  $\Delta^9$  يشير إلى موضع الرابطة المزدوجة والرقم يشير إلى تكوين رابطة مزدوجة بين ذرتي الكربون 9، 10. هذه الأنزيمات تحفز التفاعل العام التالي:



حيث  $x$  تكون خمسة على الأقل وحيث تحتوي  $(\text{CH}_2)_x$  على واحد أو أكثر من الروابط المزدوجة. والجزء  $(\text{CH}_2)_y$  من المادة الخاضعة دائماً يكون مشبع. والرابطة المزدوجة تدخل بين الرابطة المزدوجة الموجودة أصلاً في  $(\text{CH}_2)_x$  في المادة الخاضعة ومجموعة CoA بحيث تكون الرابطة المزدوجة الجديدة غير متبادلة مع الرابطة المزدوجة الموجودة أصلاً. وفي الحيوانات لا تتكون في موضع فيما بعد ذرة الكربون التاسعة (C9).

- أيضاً فإن هذا النوع من التخصص قد يشير إلى التخصص الموضعي positional specificity مثل بعض إنزيمات Lipases التي تظهر تخصصها تجاه روابط الأستر في المواضع sn-1,3 في ثلاثي أسايل الجليسرول triglycerol الذي ينتج من عدم قدرة هذه الإنزيمات العمل على الموقع sn-2 في ثلاثي أسايل الجليسرول الناشئ عن الإعاقة المجسمة (الفراغية) Steric hindrance فعلى سبيل المثال، فإن إنزيم ليبيز البنكرياس Pancreatic lipase في المعى يحفز التحلل المائي لثلاثي أسايل الجليسرول عند الموضعين 3,1 لينتج 2- أسايل جليسرول 2-acylglycerol (شكل ٧-٧).



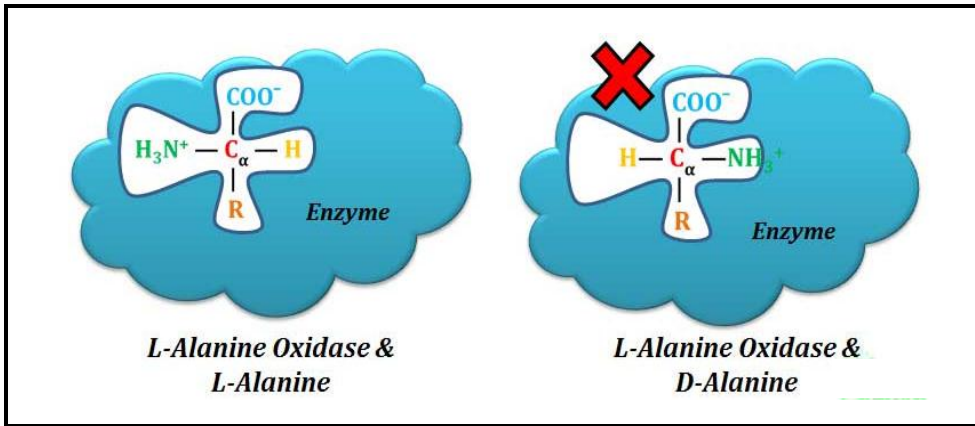
شكل ٧-٧ إنزيم ليباز البنكرياس يحلل ثلاثي أسايل جليسرول عند الموضعين 1 و 3 (تخصص موضع) ولا يعمل على الموقع 2.

## ٧-١-٥ التخصص الضوئي (التخصص المجسم "الفراغي")

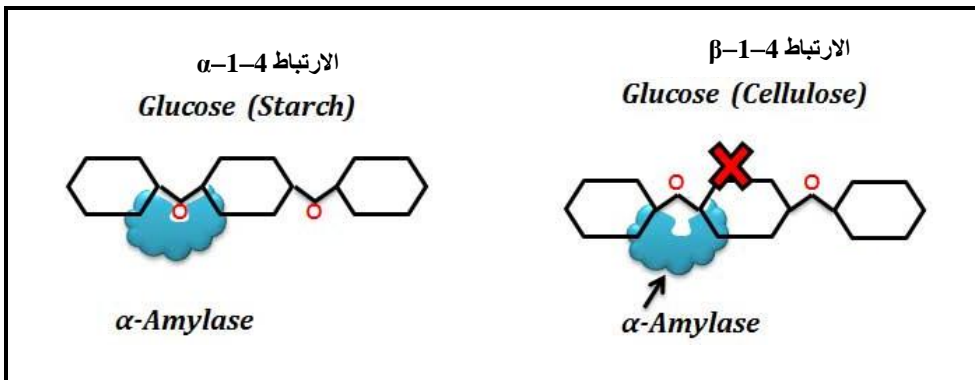
في التخصص الضوئي optical specificity أو التخصص المجسم stereospecificity فإن الإنزيم يكون متخصص ليس فقط للمادة الخاضعة، ولكن أيضاً تجاه البنية المجسمة الضوئية. فبعض المواد تحتوي على مركز غير متماثل asymmetric center (أى مركز كيرالي Chiral) عادة ذرة كربون ترتبط بأربعة مجموعات كيميائية مختلفة، حينئذ يكون للمادة صورتين كيميائيتين مجسمين (فراغياً) التي تتماثل كيميائياً (ترتبط الذرات بعضها ببعض بنفس النظام) ولكن تختلف في الطريقة التي توجه بها الذرات في الفضاء ويطلق على هذين الصورتين إنانتيومرز enantiomers. والعلاقة بين هذين الإنانتيومرز تكون كعلاقة الشيء وصورة في المرآة أو علاقة اليد اليمنى باليد اليسرى. وهاتين الصورتين يطلق عليهما المتشكل - (L-isomer) والمتشكل D - (D-isomer)، وأحدهما يدور الضوء المستقطب في اتجاه اليمين (+) والآخر في اتجاه اليسار (-) بنفس الدرجة، لذلك يطلق عليها المتشكلات النشطة ضوئياً "مثال ذلك السكريات-D والسكريات L وكذلك الأحماض الأمينية-D والأحماض الأمينية L- (أنظر قسم ٣-٤-٣ و شكل ٣-١١). والإنزيمات تكون متخصصة لنوع واحد من الإنانتيومرز دون الآخر مثال ذلك:

- إنزيم L-amino acid oxidase يعمل فقط على الأحماض الأمينية L- ولكن لا يعمل على الأحماض الأمينية D- (شكل ٧-٨ (أ)).

- إنزيم  $\alpha$ -glycosidase ( $\alpha$ -Amylase) يعمل فقط على الروابط الجلوكونيدية ألفا  $\alpha$ -glucosidic bonds ( $\alpha$ -1-4) التي توجد في النشا والجلايكوجين ولكنه لا يستطيع تفكيك الروابط الجلوكونيدية بيتا ( $\beta$ -1,4) التي توجد في السليلوز (شكل ٧-٨ ب).

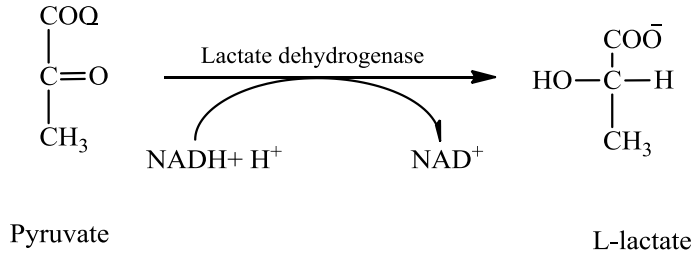


شكل ٧-٨ أ. إنزيم L-alanine oxidase يعمل فقط على الحمض الأميني L-alanine ولا يستطيع العمل على الحمض الأميني D-alanine.



شكل ٧-٨ ب. إنزيم  $\alpha$ -amylase يفك الارتباط الجلوكونيدي  $\alpha$ -1-4 في النشا والجلايكوجين ولا يستطيع تفكيك الارتباط الجلوكونيدي  $\beta$ -1-4 في السليلوز.

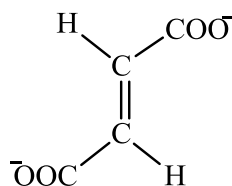
- إضافة إلى ذلك، فإن الإنزيمات أحياناً ما يكون لها تخصص مجسم تجاه ناتج التفاعل. فيمكن للإنزيمات أن تولّد واحد أو أكثر من المراكز غير المتماثلة من مواد خاضعة لا تحتوي على مراكز غير متماثلة. مثال ذلك أن إنزيم lactate dehydrogenase يحفز تحول البيروفات (لا تحتوي على مركز غير متماثل) إلى - L لا كتات بدلاً من تكوين مخلوط راسيمي (من D + L).



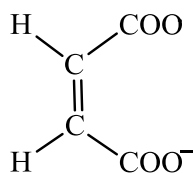
### ٦-١-٧ التخصص الهندسي

إذا احتوى الجزيء على رابطة مزدوجة بين ذرتين كربون كل منهما ترتبط بمجموعتين كيميائيتين مختلفتين، فإنه ينشأ متشكلين هندسيين للجزيء، أحدهما تكون فيه المجموعتين المتماثلتين على الذرتين في نفس الجانب ويطلق عليهما المضاهي (cis من اللاتينية التي تعني على نفس الجانب)، والآخر تكون فيه المجموعتين المتماثلتين على جانبيين مختلفين ويطلق عليه مخالف (trans من اللاتينية التي تعني متصالب). والإنزيمات تكون متخصصة لأحد المتشكلين الهندسيين دو الآخر. مثال ذلك:

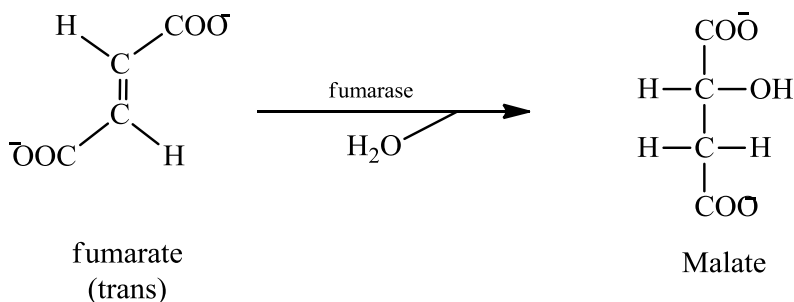
- إنزيم الفيوماريز (fumarate hydratase) fumarase يضيف  $\text{H}_2\text{O}$  إلى المتشكل الهندسي المخالف (فيومارات fumarate) ليعطى المالات malate ولكنه غير نشط بصورة كاملة تجاه المتشكل المضاهي maleate



fumarate  
(trans)



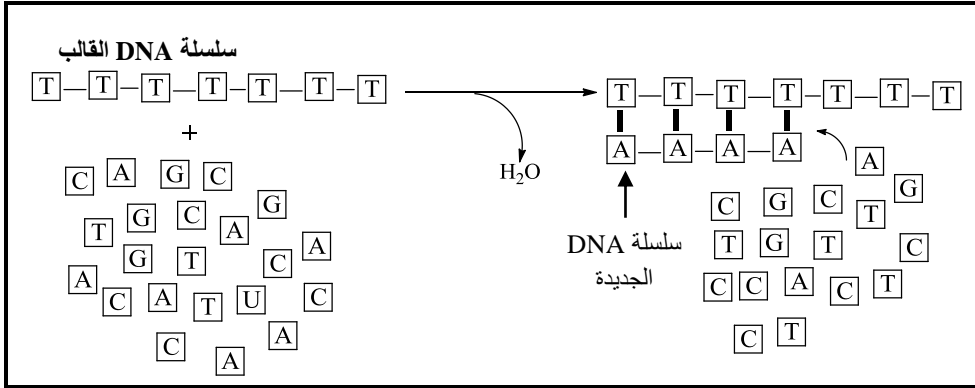
Maleate  
(cis)



### ٧-١-٧ التخصص الموجه بالقالب (بالمصيغ)

أحد الأمثلة للدرجة العالية من التخصص للإنزيمات هو إنزيم بلمرة DNA الأول DNA polymerase I. هذا الإنزيم يقوم باصطناع DNA بربط أربع أنواع من النيوكليوتيدات التي تعمل كوحداث بنائية. إن تسلسل النيوكليوتيدات في خيط DNA الذي يتم تكوينه يتحدد بواسطة تسلسل النيوكليوتيدات في خيط DNA آخر الذي يعمل كقالب أو مصيغ template. إن إنزيم DNA polymerase I على درجة عالية من الدقة اللافتة للنظر في تنفيذ التعليمات المعطاه من القالب. فاحتمال إدماج نيوكليوتيدة خطأ في خيط DNA الجديد يكون واحد في المليون (شكل ٧-١٠).





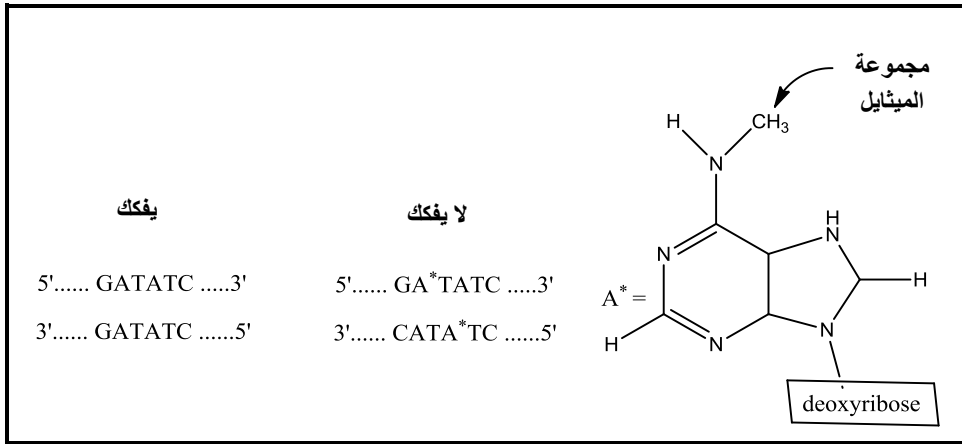
شكل ٧-١٠ إنزيم DNA polymerase I يبني سلسلة DNA جديدة على سلسلة DNA قديمة التي تعمل كقالب (مصنغ) لتوجيه الإنزيم لإضافة القاعدة المناسبة لسلسلة DNA الجديدة. وهذا التخصص يرجع إلى الارتباط التفضيلي لإزدواج النيوكليوتيدات (A مع T و C مع G)

#### ٧-١-٨ التخصص بالتمائل (التناسق) المتكافئ بين الإنزيم والمادة الخاضعة

الإنزيمات المقيدة restriction enzymes تظهر درجة عالية من التخصص في تفكيك جزئ DNA. فالبكتريا وبعض الكائنات الأولية الأخرى قد أنشأت آليات لتحمي نفسها من العدوى الفيروسية. فعدد من الفيروسات تدخل DNA الجينومي لها في الخلايا، وما أن يصبح الفيروس في الداخل، فإن الفيروس يسيطر على الخلية لتوجيهها لإنتاج البروتينات الفيروسية ومن ثم ذرية الفيروس. وكثيراً ما تؤدي الإصابة إلى موت العائل. والخطوة الرئيسية لحماية العائل هو الإنزيمات المقيدة أو إنزيمات الهضم الداخلية المقيدة restriction endonucleases التي تقوم بتفكيك DNA الفيروسي عند دخوله إلى الخلية، بينما لا تعمل على DNA للعائل. وهذه الإنزيمات تتعرف على تسلسلات خاصة من أربع إلى ثمانية أزواج قواعد يطلق عليها مواقع التعرف recognize sites في DNA المستهدف وتقوم بتفكيكها عند هذا الموقع.

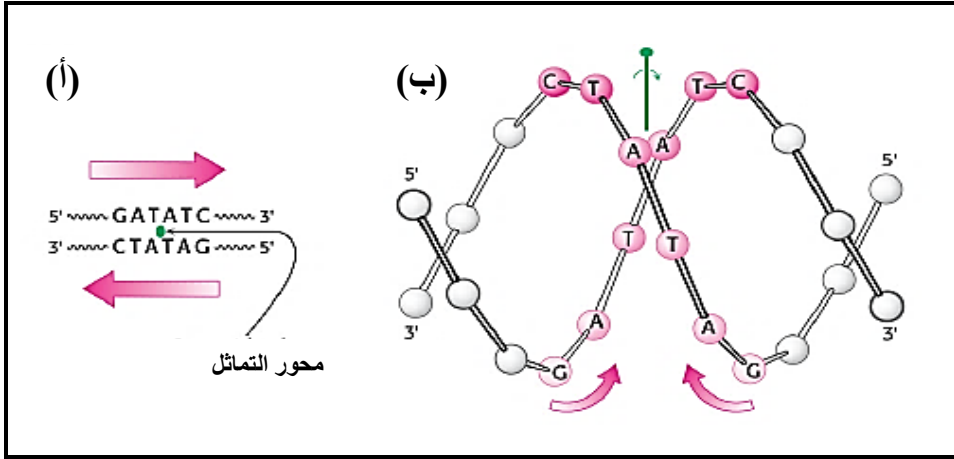
والإنزيمات المقيدة تظهر تخصص عالي عند مستويين. أولاً أنها يجب أن تفكك فقط جزيئات DNA التي تحتوي على مواقع التعرف (بعدئذٍ أشير إليه بـ DNA المشابه Cognate DNA)، وثانياً أن الإنزيمات المقيدة يجب ألا تفكك DNA للعائل. كيف يتم

ذلك؟ لنأخذ مثال لذلك. فالإنزيم المقيد EcoRV (من بكتريا القولون *E. coli*) يفكك جزيئات DNA ثنائية الخيط الفيروسي التي تحتوى على التسلسل 5'-GATATC-3'، ولكنه يترك DNA للعائل (البكتيري) دون تفكك رغم أنه يحتوي على مئات من هذه التتابعات. إن DNA للعائل يحمي بواسطة إنزيمات أخرى يطلق عليها methylases التي تقوم بإدخال مجموعة ميثايل على قاعدة أدنين الذي يوجد خلال تسلسلات التعرف (شكل ٧-١١). ولكل إنزيم مقيد، فإن خلية العائل تنتج إنزيم methylase مقابل الذي يعلم (يسم) DNA للعائل ويمنع تفككه. وهذه الأزواج من الإنزيمات يشار إليها بأنظمة التحوير المقيد restriction – modification systems.



شكل ٧-١١ حماية DNA للعائل من التحلل بالإنزيمات المقيدة بإدخال مجموعات الميثايل على قواعد الأدنين (A) التي توجد في مواقع التحلل. تسلسل التعرف لإنزيم EcoRV المقيد (الشمال) ومواقع إدخال مجموعة الميثايل (اليمن) في DNA تحميه من التأثير الحفزي للإنزيم

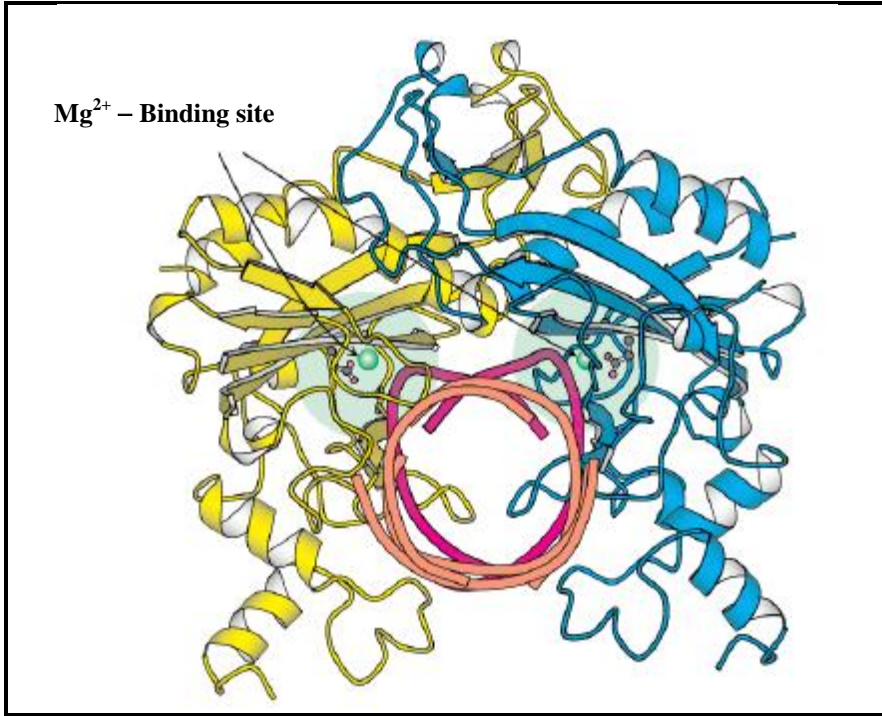
الدراسات التالية أوضحت أن تسلسلات التعرف لمعظم الإنزيمات المقيدة تكون متكررة عكسياً *inverted repeats*، وهذا التنظيم يعطي التركيب الثلاثي الأبعاد لموقع التعرف في DNA تماثل ثنائي المحور (شكل ٧-١٢).



شكل ٧-١٢ تركيب موقع التعرف للإنزيم المقيد EcoRV (أ) تسلسل موقع التعرف الذي يكون متماثل حول محور الدوران (ب) التكرار العكسي خلال تسلسل التعرف لإنزيم EcoRV (ولمعظم الإنزيمات المقيدة الأخرى)، فإن موقع التعرف في DNA يحتوي على محور تماثل ثنائي الدوران.

والإنزيمات المقيدة تظهر تماثل مقابل الذي يسهل التعرف: فهي ثنائية الوحدات، والوحدات الفرعية تتصل ببعضها أيضاً خلال تماثل ثنائي المحور. وهذا التماثل المتكافئ بين تسلسل التعارف (موضع فك DNA) والإنزيم هو الذي يحدد التخصص العالي للإنزيم (شكل ٧-١٣).

وأحد السمات الظاهرة لمعقد الإنزيم DNA هو تسوية البنية الفراغية لـ DNA الذي يؤدي إلى تماس إضافي بين الإنزيم و DNA الذي يؤدي إلى تحلل DNA. من ناحية أخرى فإن إدخال مجموعات الميثايل على قاعدة الأدينين في تسلسل موقع التعرف يؤدي إلى منع التشوه المطلوب في DNA وبذلك يمنع تحلل DNA.

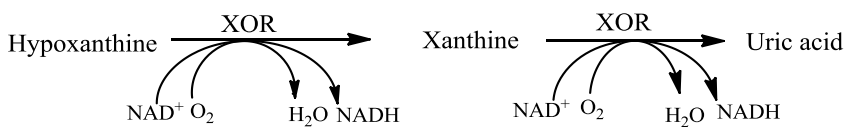


شكل ٧-١٣ تركيب معقد إنزيم EcoRV - وموقع الارتباط في DNA. إن محوري التماثل الثنائية في الإنزيم الثنائي الوحدات و DNA يكونين مترافقين aligned

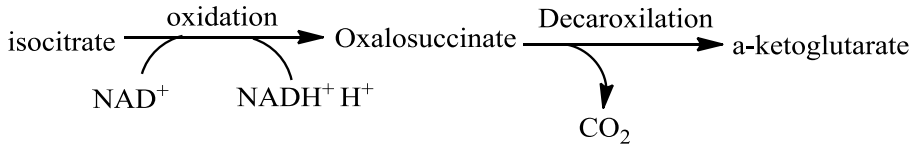
### ٧-١-٩ التخصص الثنائي (المزدوج)

يوجد نوعين من التخصص المزدوج dual specificity:

- الإنزيم الذي يعمل على إثنين من المواد الخاضعة بنفس نوع التفاعل مثال ذلك إنزيم xanthin oxidoreductase (XOR) الذي يقوم بأكسدة اثنين من المواد الخاضعة هما الهيبوزانثين hypoxanthine والزانثين xanthine على التوالي ويتكون في النهاية حمض اليوريك Uric acid



- الإنزيم الذي يقوم بنوعين مختلفين من التفاعلات على نفس المادة الخاضعة. مثال ذلك إنزيم isocitrate decarboxylase الذي يعمل على المادة الخاضعة الفردية isocitrate ويحولها بواسطة تفاعل أكسدة لمجموعة الكحول في isocitrate إلى مجموعة كيتون ويتكون oxalosuccinate الذي تزال منه مجموعة كربوكسيل ويتحول إلى  $\alpha$ -ketoglutarate



#### ٧-١-١٠ التخصص للعامل المساعد

كما ذكرنا سابقاً فإن العوامل المساعدة co-factors هي جزء غير بروتيني للإنزيم وتكون مطلوبة لعملية الحفز لبعض الإنزيمات. فالجزء البروتيني لبعض الإنزيمات لا يحتوي على المجموعات الفعالة المطلوبة لعملية الحفز، لذلك تستخدم العوامل المساعدة في إجراء عملية الحفز. مثال ذلك، فإن الأحماض الأمينية في بروتين الإنزيم لا تحتوي على مجموعات وظيفية التي يمكن أن تشارك في استقبال أو منح الإلكترونات في تفاعلات الأكسدة والاختزال، لذلك تستعين هذه الإنزيمات بعامل مساعد عضوي مثل  $\text{NAD}^+$  أو  $\text{FAD}$  أو أيون معدني مثل الحديد لإجراء التفاعل. والإنزيمات التي تحتاج إلى العوامل المساعدة لنشاطها تظهر تخصص للعامل المساعد co-factor specificity. فقط الاتحاد الصحيح من المادة الخاضعة والعامل المساعد يسمح بالتفاعل الإنزيمي. أما في غياب العامل المساعد، فإن الإنزيم سوف يكون غير نشط حتى لو وجدت المادة الخاضعة بكميات كبيرة.

بعض العوامل المساعدة تكون مرتبطة بقوة بالإنزيم والبعض الآخر يكون ارتباطه ضعيفاً بالإنزيم. وفي هذه الحالة فإن التخصص يتم أثناء عملية الارتباط، ومن ناحية أخرى فإن بعض العوامل المساعدة تتحد فقط بصورة عابرة مع جزئ الإنزيم عند بدأ

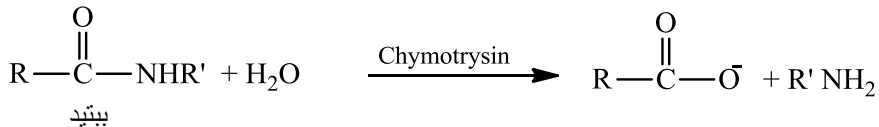
التفاعل ومن ثم تعمل كمرافقات للمادة الخاضعة cosubstrate ويكون تخصص الإنزيم للعامل المساعد في هذه الحالة مشابه لتخصص الإنزيم للمادة الخاضعة.

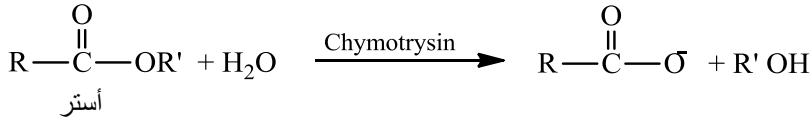
## ٧-٢ ثابت التخصص للمادة الخاضعة

ثابت التخصص specificity constant (أيضاً يشار إليه بالكفاءة الحركية  $k_{cat}/K_m$ ، فصل ٦) هو مقياس لكفاءة إنزيم ما لتحويل المواد الخاضعة إلى نواتج التفاعل. وكما أوضحنا في قسم ٥-٦ فإن مقارنة ثوابت التخصص يمكن أن تستخدم أيضاً في قياس تفضيل إنزيم ما للمواد الخاضعة المختلفة (أى التخصص للمادة الخاضعة substrate specificity). فكلما كان ثابت التخصص أعلى كان الإنزيم أكثر تفضيلاً لهذه المادة الخاضعة.

## ٧-٣ تخصص الإنزيمات لنوع التفاعل وتسمية الإنزيمات

بالإضافة إلى تخصص الإنزيمات تجاه اختيار المادة الخاضعة، فإنها أيضاً تكون متخصصة بالنسبة لنوع التفاعل الذي تقوم بحفزه. والإنزيم عادة ما يحفز نوع واحد من أنواع التفاعلات. ومع ذلك، فإن بعض الإنزيمات لا تكون متخصصة بصورة مطلقة لنوع التفاعل الذي تقوم بحفزه. فعلى سبيل المثال، فإن إنزيم الكيموتريسين chemotrypsin (ومعظم إنزيمات التحلل المائي للبروتين) تقوم بحفز التحلل المائي للرابطة الببتيدية. مع ذلك، فإن هذا الإنزيم يقوم أيضاً بحفز تفاعل مختلف ولكن قريب الصلة وهو التحلل المائي لروابط الأستر. وهذا المثال هو تقريباً استثناء من القاعدة العامة أن الإنزيم يحفز نوع واحد من التفاعلات.





والتخصص لنوع التفاعل يعتمد على نوع المجموعات الفعالة وتنظيمها في الموقع النشط في الإنزيم (أو العامل المساعد) التي تشارك في تكوين وتفكيك الروابط أو عمليات الأكسدة والاختزال. وعملية التخصص لا تعتمد فقط على المجموعات الوظيفية للأحماض الأمينية (أو العوامل المساعدة) في الموقع النشط ولكن أيضاً بالمجموعات الوظيفية في المادة الخاضعة.

والدراسات المبكرة عن الإنزيمات قد حاولت تسمية الإنزيمات بأسماء شائعة تعطي قليلاً من المعلومات حول التفاعلات التي تحفزها. مثال ذلك فإن الإنزيم المحلل للبروتين الذي يفرز من البنكرياس أطلق عليه ترسين trypsin. ومعظم الإنزيمات الأخرى سميت اعتماداً على المواد الخاضعة لها ونوع التفاعلات التي تقوم بحفزها، مع إضافة اللاحقة "ase". ومن ثم فإنزيم ATPase هو الإنزيم الذي يفكك ATP، بينما إنزيم ATP synthase هو الإنزيم الذي يقوم باصطناع ATP.

الأسماء الشائعة لمعظم الإنزيمات تعطي أسماء المادة الخاضعة الرئيسية، ولكن هذا لا يمثل الواقع دائماً. فعلى سبيل المثال، فإن إسم إنزيم catalase لا يعطي معلومات عن طبيعة التفاعل المحفز. أيضاً، حتى لو تمكنا من تعيين المادة الخاضعة للإنزيم (مثال ذلك يمكن إستنتاج أن هيدروجين بيروكسيد hydrogen peroxidase هو المادة الخاضعة لإنزيم البيروكسيداز Peroxidase)، فإننا لا نعلم ماذا يحدث للمادة الخاضعة عندما يحدث التفاعل. فالهيدروجين بيروكسيد هو مادة خاضعة لكل من الكاتاليز والبيروكسيداز. فالكاتاليز يفكك هيدروجين بيروكسيد إلى الماء والأكسجين، بينما البيروكسيداز ينقل الأكسجين إلى جزء آخر (ومن ثم يؤكسد هذا الجزء) مع إنتاج الماء. والإنزيمات التي أكتشفت حديثاً نسبياً قد أعطيت أسماء مثل lactate dehydrogenase الذي يشير إلى نوع المادة الخاضعة ونوع التفاعل، مع ذلك بعض

إحتمالات الالتباس مازالت موجودة. ومن ثم، فإنه للسماح للمعلومات حول الإنزيمات المفردة من التداول بين الباحثين، يجب وضع نظام محكم لأسماء الإنزيمات. ولوضع بعض التساوق لتصنيف الإنزيمات، فإن الاتحاد العالمي للكيمياء البحتة والتطبيقية (IUPAC EC) قد أنشأ لجنة الإنزيمات (EC) enzyme commission لوضع نظام رقمي لتسمية الإنزيمات. وبينما معظم الباحثين يستخدمون الاسم الشائع للإنزيمات التي يعملون عليها، فإن أبحاثهم المنشورة يجب أن تتضمن أيضاً اسم IUPAC EC الذي قبل به عالمياً. تصنيف لجنة الإنزيمات EC classification يعتمد على نوع التفاعلات التي تحفز بالإنزيمات. ولقد وضعت الإنزيمات في ستة أصناف (فئات) كما هو ملخص في جدول ٧-١، وشكل ٧-١٤ يعطي مثال لتفاعل كيميائي لكل من هذه الأصناف الستة الرئيسية.

وخلال كل من هذه الفئات الستة فإن الإنزيمات تميز إلى مدى أبعد برقم ثاني يعين بصورة دقيقة أكثر المواد الخاضعة التي تعمل عليها. مثال ذلك فإنه يوجد ١١ نوع من إنزيمات التحلل المائي (الفئة الثانية) يمكن تمييزها، كما هو ملخص في جدول ٧-٢. اعتماداً على نوع الرابطة التي يتم تحليلها (أستر، جلوكوسيد، إيثير وغيرهم)

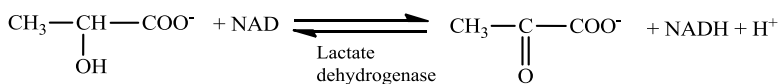
جدول ٧-١ التقسيم الدولي للإنزيمات إلى ستة فئات (أصناف) عامة اعتماداً على نوع التفاعلات التي تقوم بحفزها.

| الرقم | الاسم النظامي للقسم            | نوع التفاعل                                                                     |
|-------|--------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| ١     | إنزيمات الأكسدة والاختزال      | الأكسدة والاختزال (نقل الإلكترونات)                                             |
| ٢     | إنزيمات النقل                  | تحفز نقل مجموعة كيميائية من جزيء إلى آخر                                        |
| ٣     | إنزيمات التحلل المائي (التميه) | تحفز تفكك الروابط في الجزيئات بإضافة الماء                                      |
| ٤     | الإنزيمات النازعة              | تحفز إزالة مجموعة كيميائية أو إضافتها إلى رابطة مزدوجة                          |
| ٥     | إنزيمات التشكل                 | نقل مجموعات كيميائية داخل الجزيء لتكون المتشكلات isomerase                      |
| ٦     | إنزيمات الربط                  | تكوين روابط جديدة باستخدام طاقة رابطة الفوسفات في الأدينوزين ثلاثي الفوسفات ATP |



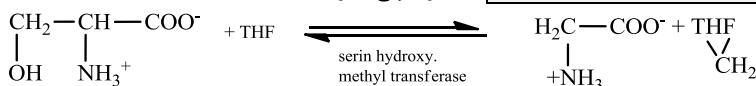
الجزء الثالث: حركات وتخصص وآليات التفاعلات الإنزيمية

|                                           |                                      |
|-------------------------------------------|--------------------------------------|
| ١- إنزيمات الأكسدة واختزال oxidoreductase | تتحفز تفاعلات الأكسدة والاختزال مثل: |
|-------------------------------------------|--------------------------------------|



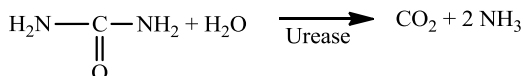
بیر وفات

|                              |                                                                |
|------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| ٢- إنزيمات النقل Transferase | تحتفز نقل المجموعات المحتوية على N, C أو P من جزيئ إلى آخر مثل |
|------------------------------|----------------------------------------------------------------|



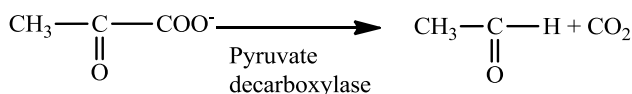
## جلیسین

|                                        |                                     |
|----------------------------------------|-------------------------------------|
| تحفز شطر (فك) الروابط بإضافة الماء مثل | ٣- إنزيمات التحلل المائي Hydrolases |
|----------------------------------------|-------------------------------------|



تحفز شطر الروابط  $C-C$  و  $C-S$  وبعض الروابط  $C-N$  دون إضافة الماء مثل:

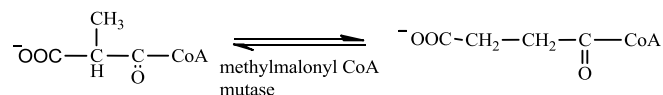
|                                                                                                                                               |  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| <p>٤- إنزيمات النزع Lyases</p> <p>تخفز شطر الروابط <math>C-C</math> و <math>C-S</math> وبعض الروابط <math>C-N</math> دون إضافة الماء مثل:</p> |  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|



أستأذنه

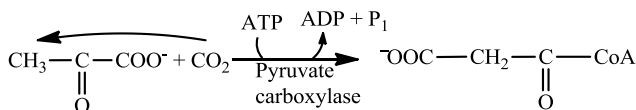
|           |                   |
|-----------|-------------------|
| Isomerase | 5- إنزيمات التشكل |
|-----------|-------------------|

تخفز تحول المتشكلات الضوئية أو الهندسية مثل:



Succinyl CoA

|                                                                           |                                 |
|---------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| <p>تخفز تكوين رابطة بين الكربون و N, S, O باستخدام طاقة تحلل ATP مثل:</p> | <p>٦- إنزيمات الربط Ligases</p> |
|---------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|



Oxaloacetate

شكل ٧-١٢ مثال لتفاعل كيميائي للفئات الستة الرئيسية في التصنيف الدولي للإنزيمات (THF= إختصار لرباعي هيدروفولات)

جدول ٧-٢. التصنيف الفرعي JUPA EC لإنزيمات التحلل المائي (الفئة الثالثة)

| رقمي EC الأول والثاني | المواد الخاضعة                                                                                         |
|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 3.1                   | تعمل على روابط الاستر المختلفة مثل استرات الأحماض الكربوكسيلية<br>$R-O-C(O)-$ وأسترات النيول والفوسفات |
| 3.2                   | تعمل على الروابط $O$ - الجلوكوسيدية والروابط $S, N$ الجلوكوسيدية                                       |
| 3.3                   | تعمل على روابط الإثير $R-O \dots R$ أو الثيواثير $R-S \dots R$                                         |
| 3.4                   | تحلل الروابط الببتيدية $C \dots N$                                                                     |
| 3.5                   | تحلل الروابط $C \dots N$ غير الببتيدية                                                                 |
| 3.6                   | تحلل أنهيدرات الحمض $R-C(O)-O \dots C(O)-R$                                                            |
| 3.7                   | تعمل على الرابطة الكربون - الكربون $C \dots C$                                                         |
| 3.8                   | تعمل على رابطة الهاليد $(X), C \dots X$ أو $P \dots X$                                                 |
| 3.9                   | تعمل على رابطة الفوسفات - النيتروجين، $P \dots N$                                                      |
| 3.10                  | تعمل على رابطة الكبريت - النيتروجين، $S \dots N$                                                       |
| 3.11                  | تعمل على رابطة الكربون - الفوسفور $C \dots P$                                                          |

\* الروابط التي تحلل موضحة بخطوط متقطعة

والإنزيمات الفردية في كل نوع فرعي تميز أكثر بواسطة رقم ثالث ورقم رابع الذي يميزان بدقه هوية الإنزيم. وجدول ٧-٣ يعرض بعض الأمثلة.

جدول ٧-٣ بعض الأمثلة للأسماء الشائعة وتصنيف EC

| تصنيف EC   | الإسم الشائع           |
|------------|------------------------|
| EC 1.1.1.1 | Alcohol dehydrogenases |
| EC 2.6.1.2 | Alanine transaminase   |
| EC 3.1.1.3 | Lipase                 |
| EC 5.1.1.1 | Alanine racemase       |

وهذا النظام للتسمية يميز التفاعل المحفز لإنزيم ما بدقة بقدر الإمكان بإستخدام النظام رباعي الأرقام تحت العشرية. مع ذلك، فإنه ما زال يواجه بعض المشكلات، وهي:

١- أحد الالتباسات في هذا النظام هو وجود نظائر الإنزيمات isoenzyme، أى جزيئات إنزيم مختلفة تحفز تفاعلات متماثلة (أنظر فصل ١)، سوف يكون لها نفس التصنيف الرباعي. لذلك، فإنه في أى معلومات منشورة يجب تحديد مصدر الإنزيم النظير (مثال ذلك lactate dehydrogenase-5) بالإضافة إلى التصنيف الرقمي.

٢- المشكلة الأخرى هو أن التفاعلات التي تحفز بالإنزيمات تكون عكسية بدرجة صغيرة أو كبيرة. والتصنيف الذي يعطي للإنزيم يكون للتفاعل الأمامي الذي لا يكون نفسه للتفاعل الخلفي. فالمادة الخاضعة قد تعمل ك مانحة donor في أحد الاتجاهات بينما تعمل كمستقبل acceptor في الاتجاه الآخر. حتى نوع التفاعل يمكن أن يكون مختلفاً، فتخليق جزيء كبير في أحد الإتجاهات، يكون تفكك (نزع lysis) في الاتجاه العكسي. لذلك، فإنه لتفادي إعطاء كل إنزيم إثنين من التصنيفات المنفصلة، فإن لجنة الإنزيمات قد وضعت بعض القواعد. والتصنيف المستخدم هو الاتجاه الأكثر أهمية من الناحية الكيموحيوية، أو بعض القواعد المتفق عليها. مثال ذلك فإنه في تفاعلات الأكسدة والاختزال التمس تشمل على  $NADH$  و  $NAD^+$ . فإن القاعدة المستخدمة في التصنيف هو الاتجاه الذي فيه  $NAD^+$  هو مستقبل للإلكترونات وليس الاتجاه الذي يكون فيه  $NADH$  هو مانح الإلكترونات.

## أسئلة

- ١- ما هي العوامل التي تؤثر على تخصص الإنزيمات للمادة الخاضعة؟
- ٢- الإنزيمات تكون متخصصة لكل من التالي، فيما عدا:  
أ- هوية (كينونة) المادة الخاضعة  
ب- الكتلة الذرية للعنصر في المجموعة النشطة (أى  $^{12}C$  وليس  $^{14}C$ )

- ج- النشاط الضوئي للنواتج المتكون من مادة غير متماثلة.
- د- نوع التفاعل الذي يحفز .
- هـ- أى من زوج المتناظرات الضوئية سوف تتفاعل.
- ٣- ما هى المعلومات الحركية التي تستخدم في مقارنة استخدام مواد خاضعة مختلفة بواسطة إنزيم فردي؟
- ٤- ماذا يشير التخصص للرابطة ؟ أعطى أمثلة لذلك.
- ٥- إنزيم Hexokinase ينقل مجموعة الفوسفات من ATP لعدة سكريات سداسية مختلفة. ما نوع التخصص لهذا الإنزيم.
- ٦- أذكر أحد الأمثلة للدرجة العالية من التخصص.
- ٧- صف أساس التخصص في الإنزيمات المقيدة restriction enzymes
- ٨- اقترح تفسير لتخصص الإنزيمات لنوع التفاعل.
- ٩- حدد نوع التفاعل في التفاعلات التالية
- (أ)  $\text{Lactate} + \text{NAD} \rightleftharpoons \text{Pyruvate} + \text{NADH} + \text{H}^+$
- (ب)  $\text{Urea} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{CO}_2 + 2\text{NH}_3$
- (ج)  $\text{Pyruvate} \longrightarrow \text{Acetaldehyde} + \text{CO}_2$
- (د)  $\text{D - Amino acid} \rightleftharpoons \text{L - amino acid}$
- (هـ)  $\text{Pyruvate} + \text{CO}_2 \longrightarrow \text{Oxaloacetate}$
- (و)  $\alpha\text{-Amino acid} + \alpha\text{-ketoglutarate} \rightleftharpoons \alpha\text{-keto acid} + \text{glutamate}$

١٠- أى من أصناف (أنواع) الإنزيمات يحفز تفاعل يشتمل على ربط جزيئان تساهمياً؟

- (أ) Kinase
- (ب) Lyase
- (ج) Isomerase
- (د) Ligase



---

## فصل ٨ الآليات الكيميائية في الحفز الإنزيمي

### Chemical Mechanisms In Enzyme Catalysis

---

|     |                                                                                   |
|-----|-----------------------------------------------------------------------------------|
| ١-٨ | الموقع النشط والحفز الإنزيمي                                                      |
| ٢-٨ | تطابق المادة الخاضعة - الموقع النشط وتخصص الإنزيمات                               |
| ٣-٨ | الإنزيمات تزيد معدلات التفاعلات خلال تثبيت (إستقرار) الحالة الانتقالية            |
| ٤-٨ | الآليات الكيميائية المستخدمة في تثبيت (إستقرار) الحالة الانتقالية                 |
| ٥-٨ | إنزيمات تحلل البروتين المعتمدة على السيرين كمثال يوضح الآلية والتخصص في الإنزيمات |

إن دور الإنزيمات في معظم العمليات الفسيولوجية يرجع إلى ثلاثة من الخصائص المميزة للحفز الإنزيمي ألا وهي (١) تعجيل معدل التفاعلات الكيميائية بدرجة كبيرة (الذي نوقش في فصل ٦) (٢) تخصص الإنزيمات لكل من نوع التفاعل وإختيارها للمادة الخاضعة (الذي نوقش في فصل ٧) (٣) القدرة على تنظيم (التحكم) النشاط الإنزيمي (الذي سيتم مناقشته في الفصلين ١٤ و ١٥). وهذه الخصائص تمنح الإنزيمات القدرة على إنجاز التحولات الكيميائية بالكفاءة والدقة المطلوبة للحياة. ما هي مصادر قوة الحفز والتخصص للإنزيمات؟

في هذا الفصل سوف نرى أن كل من تعجيل المعدل والتخصص للمادة الخاضعة ونوع التفاعل ينتجان من التأثيرات المتبادلة بين المادة الخاضعة والموقع النشط active site للإنزيم. وحيث أن الإنزيمات هي بروتينات، فإن المجموعات الكيميائية الفعالة

(النشطة) التي تعمل على المادة الخاضعة تأتي أساساً من الأحماض الأمينية في بروتين الإنزيم. إن هوية (كينونة) وتنظيم هذه الأحماض الأمينية خلال الموقع النشط تعين التركيب البنوي topology للموقع النشط فيما يتعلق بالكيمياء المجسمة (الفراغية) والخواص الكهربائية الساكنة والبيئية النافرة للماء (غير القطبية) hydrophobicity. وهذه الخصائص للموقع النشط تحدد أي من الجزيئات يمكن أن ترتبط بالموقع النشط للإنزيم ويخضع لعملية الحفز (التخصص). أيضاً، فإن تركيب الموقع النشط قد صمم للإرتباط بالمادة الخاضعة بطريقة تحدث إجهاد (شد) strain واضطراب (تشويش) Perturbation الذي يحول المادة الخاضعة إلى تركيب الحالة الانتقالية. والحالة الانتقالية تثبت بدرجة كبيرة عندما تكون مرتبطة بالإنزيم، بينما تكون ثباتيتها أقل تحت ظروف المحلول الطبيعي. وحيث أن بلوغ تركيب الحالة الانتقالية يمثل حاجز الطاقة الأساسي لتقدم أي تفاعل كيميائي، فإننا سنجد أن تثبيت الحالة الانتقالية بواسطة الإنزيمات سوف ينتج عنه زيادة جوهرية في معدل التفاعل.

والطريقة التي ينجز بها كل من التخصص وتعجيل المعدل يمكن وصفها بعدد من النماذج المختلفة كل منها يفسر بعض السلوكيات التي تظهرها الإنزيمات. وعديد من الإنزيمات تستخدم كل من هذه الآليات للتخصص و/أو الحفز. وفي الواقع الحقيقي، فإن بعض أو كل من هذه النماذج تجعل إنزيم ما يعمل مع تخصص متقن وسرعة باهرة. ودراسة الآليات الكيميائية للحفز الإنزيمي تعتبر مهمة من الناحية النظرية والعملية في الجوانب التالية:

- تساعد في فهم كيفية عمل الإنزيمات كحفازات بيولوجية في بيئتها الطبيعية في الخلايا وكيف ينظم نشاطها الحفزي.
- توفر معلومات عن التركيب المجسم والمجموعات الفعالة في المواقع النشطة للإنزيمات.
- توفر معلومات عن آليات تثبيط الإنزيمات التي تساعد في تصميم المركبات الصيدلانية.

- تمكنا من إستخدام هندسة البروتين (التطهير - الموجه الموقع) في إنتاج الإنزيمات المحورة التي لها تخصص، ثابتية أو تنظيمية متغيرة التي تكون مفيدة في مجالات مختلفة.

## ٨-١ الموقع النشط والحفز الإنزيمي

لفهم زيادة المعدل والتخصص للتفاعلات الإنزيمية، فإننا يجب أن ننظر أولاً إلى تركيب مركز التفاعل reactive center في الإنزيمات وهو الموقع النشط active site وعلاقته بتركيب جزئ المادة الخاضعة الحرة ومعقدات المادة الخاضعة مع الموقع النشط أثناء سير التفاعل.

### ٨-١-١ الموقع النشط للإنزيم

الموقع النشط لإنزيم ما هو منطقة خاصة في بروتين الإنزيم الذي ترتبط به المواد الخاضعة (والعامل المساعد أيما وجد) ويحتوي أيضاً على الأحماض الأمينية التي تحمل المجموعات الفعالة التي تشارك مباشرة في عملية الحفز التي يطلق عليها مجموعات الحفز catalytic groups. ورغم أن الموقع النشط لكل إنزيم يكون فريد، فإن المواقع النشطة للإنزيمات لها بعض الخصائص العامة، ألا وهي:

- ١- الموقع النشط للإنزيم يكون صغيراً جداً بالنسبة للحجم الكلي للإنزيم.
- ٢- الموقع النشط للإنزيم يكون مجسم (ثلاثي الأبعاد) - بمعنى أن الأحماض الأمينية والعوامل المساعدة في الموقع النشط تقيد في تنظيم دقيق بالنسبة لبعضهما البعض وبالنسبة لتركيب جزئ المادة الخاضعة. والأحماض الأمينية في الموقع النشط تأتي من أجزاء مختلفة من سلسلة عديد الببتيد. فعلي سبيل المثال، في إنزيم ليسوزيم lysozyme - الذي يفكك جدر الخلايا البكتيرية - فإن المجموعات المهمة المشاركة في الموقع النشط تكون الأحماض الأمينية نوات الأرقام 101, 63, 62, 52, 35 و 108 في سلسلة عديد الببتيد للإنزيم التي تحتوي على 129 حمض أميني. لذلك،



فإن التركيب ثلاثي الأبعاد (المجسم) للموقع النشط ينشأ كنتيجة للتركيب الثالث للبروتين.

٣- في معظم الحالات فإن التأثير المتبادل الأولى بين الإنزيم والمادة الخاضعة (أى أحداث الارتباط) تكون غير تساهمية التي تشمل الارتباط الهيدروجيني والتأثيرات الكهربية الساكنة والتأثيرات النافرة للماء وقوى فان ديرفالس. وقوى فان دير فالس تصبح مهمة في الارتباط فقط عندما يكون عدد كبير من ذرات المادة الخاضعة قريبة جداً من عديد من ذرات الإنزيم.

٤- المواقع النشطة للإنزيمات عادة ما توجد في شقوق clefts أو أفلاج crevices في البروتين. وهذا التصميم له تأثير في إستبعاد الماء (وهو المذيب الشائع في الخلايا) الذي قد يؤدي إلى خفض النشاط الحفزي للإنزيم. وبكلمات أخرى، فإن جزيئات المادة الخاضعة يزال منها المذيب عند الارتباط وتحجب عن المذيب الشائع في الموقع النشط للإنزيم.

٥- تخصص إستخدام المادة الخاضعة يعتمد على التنظيم (النسق) جيد التحديد للذرات في الموقع النشط للإنزيم التي تكون متتامه بطريقة ما مع تركيب جزئ المادة الخاضعة.

#### ٨-١-٢ تكوين معقد الإنزيم - المادة الخاضعة هو الخطوة الأولى في الحفز الإنزيمي

الخطوة الأولى في الحفز الإنزيمي هي تكوين معقد الإنزيم- المادة الخاضعة ES أو معقد ميكليس (راجع فصل ٦). وتكوين المعقد يجب أن يؤدي إلى تثبيت صافي للمعقد بالنسبة إلى الإنزيم الحر والمادة الخاضعة الحرة، وإلا فإن الارتباط لا يكون موات من ناحية الحركة الحرارية. ولقد ناقشنا في فصل ٥ القوى التي تشارك في التأثير المتبادل بين البروتين - المتصلة: الارتباط الهيدروجيني، القوى الكارهة للماء hydrophobic، وتأثيرات فان ديرفالس والتأثيرات الكهربية الساكنة. وكل من هذه التأثيرات المتبادلة تشارك في طاقة الارتباط الكلية للمعقد ويجب أن تعادل وأكثر الفقد في الإنتروبي

(إنزيمى الدوران وانتروبى الانتقال) الذى يصاحب تكوين المعقد الثنائى. ونفس القوى تستخدم أيضاً فى ارتباط الإنزيمات مع المواد الخاضعة لها.

### الطاقة الحرة لتكوين المعقد ES

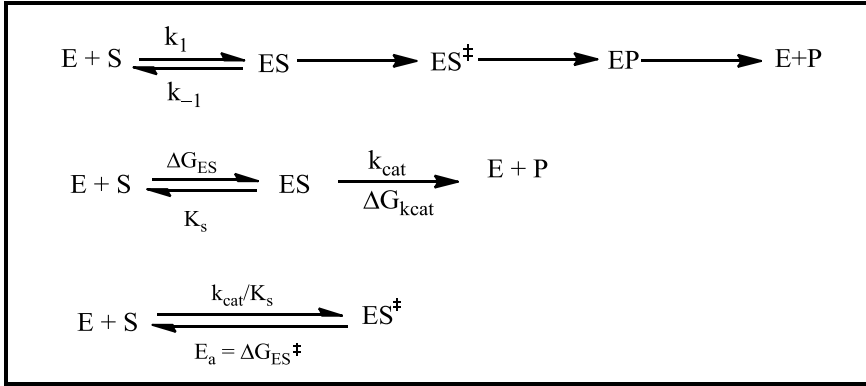
التعبير فى الطاقة الحرة لعملية ارتباط المادة الخاضعة بالإنزيم  $E + S \rightleftharpoons ES$  هى:

$$\Delta G_{ES} = \Delta H - T \Delta S$$

$\Delta H$  = التغير فى الإنتالبي الناشئ عن تكوين الروابط غير التساهمية بين S و E التى تكون سالبة.

$\Delta S$  = التغير فى الانتروبى (العشوائية) الذى يكون سالباً نتيجة لتكوين المعقد مما يجعل الحد  $(-T\Delta S)$  موجباً ولكى تتم عملية الارتباط فإن  $\Delta H$  يجب أن تكون سالبة وكبيرة أكبر من الحد الموجب  $-T\Delta S$ . ومقدار عملية الارتباط (تكوين المعقد ES) ترتبط بمقدار  $\Delta G_{ES}$  السالب التى تعتمد بدورها على الفرق بين الحدين  $\Delta H$  و  $-T\Delta S$ . ويمكن تقدير  $\Delta G_{ES}$  من ثابت التفكك (معادلة ٨-٧).

تكوين معقد الإنزيم- المادة الخاضعة ES يكون متبوعاً بخطوات متعاقبة لتثبيت الإنزيم- الحالة الانتقالية ( $ES^\ddagger$ ) ومعقد الإنزيم- الناتج (EP)، وأخيراً تفككه لإعادة الإنزيم الحر وتحرير نواتج التفاعل. إن التكوين الأولى للمعقد ES يعين بواسطة ثابت التفكك  $K_s$  الذى يكون حاصل قسمة  $k_1$  و  $k_{-1}$  (انظر فصل ٥ و ٦). وكما ناقشنا فى فصل ٥. فإن معدلات الخطوات التالية لتكوين المعقد ES غالباً ما توصف جميعاً بثابت حركى واحد  $k_{cat}$ . وكما سنرى، فإن  $k_{cat}$  تكون تقريباً فى أحوال كثيرة محددة لمعدل الوصول إلى الحالة الانتقالية  $ES^\ddagger$ ، ومن ثم فإن النظرة الأدنى للحفز يمكن توضيحه فى المخطط المعروض فى شكل ٨-١.



شكل ٨-١ المخطط العام للتفاعل المحفز إنزيمياً موضعاً عناصر حدود الطاقة التي تشارك في طاقة التنشيط الكلية للتفاعل.

الأدلة التجريبية لوجود المعقد الثنائي ES قد تجمعت سريعاً خلال أواخر القرن التاسع عشر وأوائل القرن العشرين. وهذه الأدلة اعتمدت على حركيات الحالة الثابتة وثباتية وتنشيط الإنزيم، وفيما يلي بعض هذه الأدلة:

١- الدليل الأول مشاهدة- لتركيز ثابت من الإنزيم- أن معدل التفاعل يزيد مع زيادة تركيز المادة الخاضعة حتى تصل سرعة التفاعل إلى سرعة قصوى ثابتة (شكل ٦-٣). بالمقارنة فإن التفاعلات غير المحفزة لا تظهر هذا النوع من تأثير التشبع. وفي عام ١٩١٣ فسر ميكيلس وجود السرعة القصوى للتفاعلات التي تشارك فيها الإنزيمات دليل على تكوين المعقد الثنائي ES. فعند التركيزات العالية من المادة الخاضعة تنتشعب مراكز الحفز في الإنزيم وتصل السرعة إلى أقصاها. وهذه هي أقدم إثبات لوجود المعقد ES.

٢- استخدام التحليل البلوري بأشعة إكس x-ray crystallography تحت درجات حرارة منخفضة (لخفض سرعة التفاعل) أوضح ارتباط المواد الخاضعة ومناظرات المواد الخاضعة substrate analog بالمواقع النشطة لعدد من الإنزيمات.

٣- الصفات الطيفية لعديد من الإنزيمات والمواد الخاضعة الحرة تتغير بتكوين المعقد الثنائي ES. وهذه التغيرات تكون واضحة جداً إذا احتوى الإنزيم على مجموعة تعويضية لها امتصاص مميز.

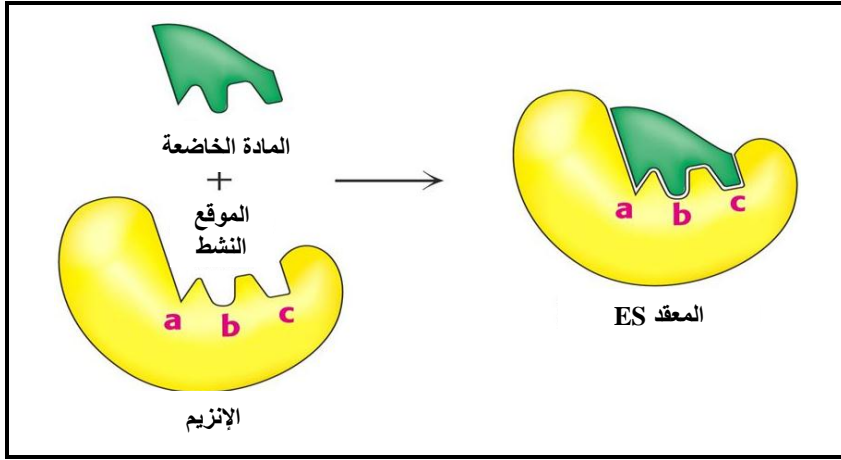
## ٨-٢ تطابق المادة الخاضعة – الموقع النشط وتخصص الإنزيمات

أيضاً خلال أواخر القرن التاسع عشر وأوائل القرن العشرين بدأ العلماء إدراك الاستخدام المتخصص لمواد خاضعة خاصة التي تميز التفاعلات المحفزة بالإنزيمات. وهذه المشاهدات أدت إلى الفكرة العامة أن تخصص المادة الخاضعة تنشأ من الارتباط الانتقائي لجزيئات المادة الخاضعة بواسطة الإنزيم عند موقعه النشط. ولقد ظهرت فكرتين لتفسير تخصص الإنزيم للمادة الخاضعة:

### ١- نموذج القفل والمفتاح

في عام ١٨٩٠ صاغ إميل فيشر Emil Fisher نموذج القفل والمفتاح lock and key model لتفسير تخصص الإنزيمات كما هو موضح في شكل ٨-٢. في هذا النموذج اعتبر الموقع النشط للإنزيم وجزئ المادة الخاضعة كتركيبات ساكنة (غير متغيرة) static structure اللذان يكونان متطابقين (متتامتين) من ناحية الكيمياء المجسمة. فإدخال المادة الخاضعة في الموقع النشط الساكن للإنزيم يكون مماثل لتطابق المفتاح في القفل. والتطابق (التتمة) complementary الأفضل يحدث مع المواد الخاضعة التي تعطي أفضل تطابق مع تركيب الموقع النشط؛ ومن ثم فإن هذه الجزيئات ترتبط بقوة.

التطابق بين الموقع النشط- المادة الخاضعة ينتج إلى حد أبعد من مجرد التطابق الكيميائي المجسم للمادة الخاضعة في الموقع النشط. فالتركيبين يجب أيضاً أن يتطابقين من ناحية الكهرباء الساكنة، لضمان توازن الشحنات لتجنب تأثيرات التنافر. وبالمثل، فإن التركيبين يجب أن يكونا متطابقين بالنسبة لبعضهما البعض في تنظيم التأثيرات المتبادلة النافرة للماء والارتباط الهيدروجيني.

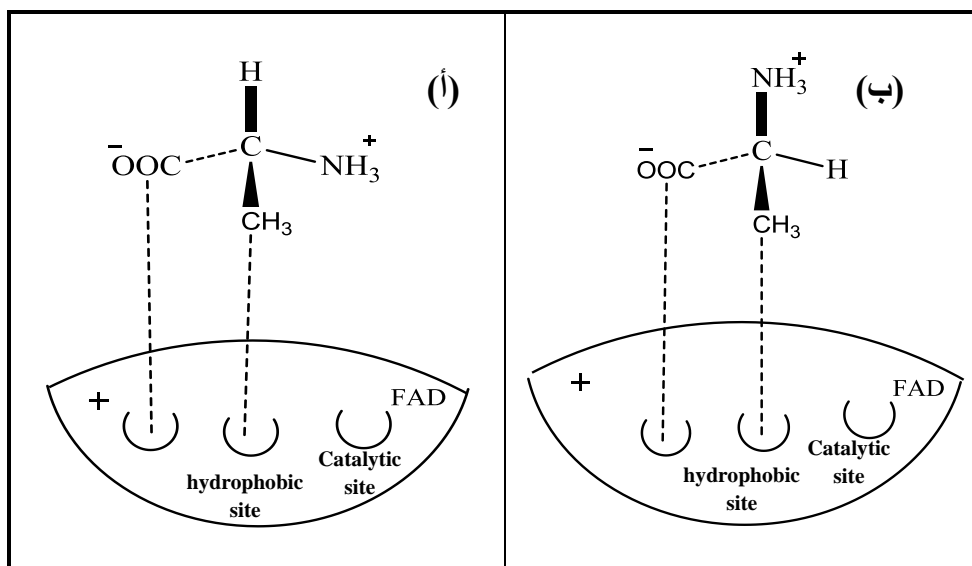


شكل ٨-٢ مخطط توضيحي لنموذج القفل والمفتاح للتأثير المتبادل للإنزيم-المادة الخاضعة.

## ٢- قاعدة الارتباط ثلاثي المواقع (النقاط)

الحفز الإنزيمي عادة ما يكون متخصصاً في الانتقاء الفراغي (المجسم) والانتقاء للمنطقة (فصل ٧). ومن ثم فإن تمييز (التعرف) المادة الخاضعة يجب أن يتضمن على الأقل على ثلاثة مواقع (نقاط) تماس للارتباط بين الإنزيم وجزئ المادة الخاضعة. هذه القاعدة قد وضعت بواسطة أجستون Ogston (1948) ، ثم تبعه آخرون بنفس الفكرة. دعنا نأخذ مثال لتوضيح هذه القاعدة: فإينزيم أكسدة الأحماض الأمينية اليمينية D-amino acid oxidase يقوم بتحويل مجموعة  $-C-NH_3^+$  في الأحماض الأمينية (D) شكل (٨-٣) إلى مجموعة  $C=O$  . من ناحية أخرى، فإن الأحماض الأمينية اليسارية (L) لا تستخدم بواسطة هذا الإنزيم. وهذا التخصص المجسم (الفراغي) يتطلب أن يرتبط الحمض الأميني بالإنزيم خلال ثلاثة مواقع: مجموعة  $COO^-$  - ربما ترتبط بمجموعة موجبة الشحنة على الإنزيم، بينما مجموعة الألكيل الجانبية (R) ترتبط بموقع نافر للماء على الإنزيم، وهذا يجلب مجموعة  $NH_3^+$  للحمض الأميني اليميني (D) بالقرب من المجموعة الحفزية (العامل المساعد الفلافين). وفي حالة الحمض الأميني اليساري (L)

فإن مجموعة  $\text{COO}^-$  والمجموعة R يمكن أن يرتبطا بنفس مواقع الارتباط، ولكن هذا الارتباط لن يجلب مجموعة  $\text{NH}_3^+$  بالقرب من موقع الحفز (شكل ٨-٣).



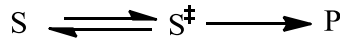
شكل ٨-٣ مخطط توضيحي لقاعدة الارتباط ثلاثي النقاط (المواقع) للتأثيرات المتبادلة بين الإنزيم-المادة الخاضعة (الإنزيم D-amino acid oxidase) (أ) قاعدة الارتباط الثلاثي مع المادة الخاضعة D-alanine الذي يؤدي إلى تفاعل (ب) مع L-alanine الذي لا يؤدي إلى تفاعل.

إن نموذج القفل والمفتاح ونموذج الارتباط الثلاثي - المواقع قد ساعدتا في تفسير انتقاء (اختيار) المادة الخاضعة في الحفز الإنزيمي بواسطة التطابق التركيبي بين الموقع النشط للإنزيم وجزئ المادة الخاضعة. وصياغة هذين النموذجين قد ظهرت قبل نشوء نظرية الحالة الانتقالية transition state theory (التي وضعها بولنج Pauling عام 1948). حيث افترضنا تركيبات صلبة (غير مرنة) للمواقع النشطة للإنزيمات التي تتطابق مع الحالة الأرضية للمواد الخاضعة. مع ذلك، فإنه في الوقت الحاضر توجد أدلة واضحة أن المواقع النشطة للإنزيمات تكون مرنة flexible وتكون متطابقة (متمة) مع تركيب الحالة الانتقالية للمادة الخاضعة. ومن هذه الأدلة:

- ١- جزيئات المثبطات التي صممت لتحاكي تركيب الحالة الانتقالية للتفاعل ترتبط بإحكام أكثر بالإنزيم المستهدف عن جزيء المادة الخاضعة أو جزيء الناتج.
- ٢- يوجد عديد من الدراسات على تخصص الأنظمة الإنزيمية خلال قياس حركيات الحالة الثابتة (المستقرة) التي قدر فيها التخصص كمياً بدلالة القيم النسبية لـ  $k_{cat}/K_m$  لمواد خاضعة مختلفة. وفي عديد من هذه الدراسات وجد أن قيم  $K_m$  تختلف قليلاً جداً بين المواد الخاضعة المختلفة بعامل مقداره 10- أضعاف أو أقل. وفي هذه الدراسات، فإن المادة الخاضعة الجيدة ميزت عن المادة الخاضعة الرديئة أساساً بواسطة تأثير  $k_{cat}$ . ومن ثم فإن التخصص للمادة الخاضعة يكمن إلى حد بعيد في التأثير المتبادل بين الحالة الانتقالية والموقع النشط للإنزيم.
- مع ذلك، فإنه توجد بعض الآراء التي ترى أن ألفة (تطابق) المادة الخاضعة مع الموقع النشط للإنزيم تكون مطلوبة لحد ما لبدء تكوين المعقد ES، واستخدام طاقة الربط المصاحبة لتكوين المعقد لدفع تكوين الحالة الانتقالية  $ES^\ddagger$ .

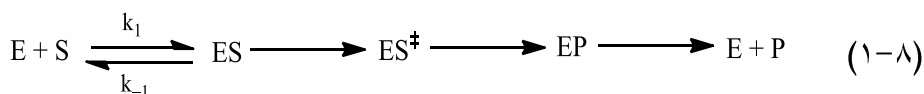
### ٨-٣ الإنزيمات تزيد معدلات التفاعلات خلال تثبيت (استقرار) الحالة الانتقالية

في فصل ٣ أوضحنا أن التفاعل الكيميائي مثل تحول الجزيء S (المادة الخاضعة) إلى جزيء P (الناتج) سوف يسير خلال تكوين حالة قصيرة البقاء (نموذجياً لها فترة عمر "بقاء" حوالي  $10^{-13}$  ثانية)، يطلق عليها الحالة الانتقالية  $(S^\ddagger)$ :



دعنا نراجع الخطوات الأدنى المشتملة في الحفز الإنزيمي لهذا التفاعل كما هو معروض في شكل ٨-١. فالخطوة الأولى في عملية الحفز الإنزيمي تشمل تلاقي الإنزيم E بالمادة الخاضعة S (خلال التصادمات الجزيئية في المحلول) الذي يؤدي إلى التكوين العكسي لمعقد ميكليس ES. وتحت الظروف العملية النموذجية، فإن هذا الاتزان يكون في اتجاه تكوين المعقد الذي يكون له  $\Delta G$  للارتباط في حدود 3- إلى 12- كيلو كالوري/مول ( $-3$  to  $-12$  kcal/mol). والتكوين الابتدائي للمعقد ES يعين بواسطة ثابت التفكك  $K_s$

الذي يكون حاصل قسمة  $k_{-1}$  على  $k_2$ . وتكوين المعقد ES يؤدي إلى تكوين الحالة الانتقالية  $ES^\ddagger$ . ومثل التفاعل غير المحفز، فإن تكوين أصناف الحالة الانتقالية هي حاجز الطاقة الرئيسي لتكوين ناتج التفاعل. وبمجرد التغلب على حاجز طاقة الحالة الانتقالية، فإن التفاعل يتجه إلى تكوين ناتج التفاعل. وفي حالة التفاعل المحفز إنزيمياً، فإن هذه العملية تشتمل على تكوين المعقد المرتبط EP وفي النهاية تفكيك المعقد كالتالي:



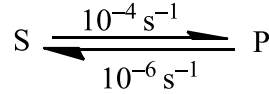
وحيث أن الإنزيم يظهر في جانب كل من المتفاعلات والنواتج للمعادلة فإنه لا يتغير بالنسبة للحركة الحرارية للتفاعل الكلي ويمكن إهماله. ومن ثم فإن الطاقة الحرة للتفاعل في وجود الإنزيم سوف تعتمد فقط على التركيز النسبي لـ S و P :

$$\Delta G = -RT \ln \left( \frac{[P]}{[S]} \right) \quad (٢-٨)$$

وهذه المعادلة هي نفس معادلة  $\Delta G$  لنفس التفاعل غير المحفز  $S \rightarrow P$  ، التي تعكس عدم اعتماد الدالة  $\Delta G$  على مسار التفاعل. ويكلمات أخرى، فإن  $\Delta G$  تعتمد فقط على الحالة الابتدائية والحالة النهائية للتفاعل ولا تعتمد على الحالات الوسيطة (أي ES و  $ES^\ddagger$  و EP) التي تتكون أثناء التفاعل (من ثم فإن  $\Delta G$  يقال عنها دالة حالة state function). وهذا يؤدي إلى حقيقة أن الإنزيمات لا يمكن أن تغير موضع الاتزان بين النواتج والمواد الخاضعة.



فعلى سبيل المثال، إفتراض أنه في تحول S إلى P في غياب الإنزيم أن ثابت معدل التحول الأمامي  $k_1$  يكون  $10^{-4} s^{-1}$ ، وثابت معدل التحول الخلفي  $k_{-1}$  يكون  $10^{-6} s^{-1}$ . فإن ثابت الاتزان يعطي بنسبة هذين الثابتين:



$$K = \frac{P}{S} = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{10^{-4}}{10^{-6}} = 100$$

فتركيز الاتزان لـ P يكون 100 مرة أكبر من S ، سواء في غياب أو وجود الإنزيم.

ما هي إذن قيمة استخدام الإنزيمات في حفز التفاعلات الكيميائية؟

الإجابة هي أن الإنزيمات (وفي الحقيقة كل الحفازات) تسرع من المعدل الذي يصل به التفاعل إلى حالة الاتزان في النظام الكيميائي: فالإنزيمات تزيد معدلات التفاعلات الكيميائية، ومن ثم فإنه في وجود إمداد وافر من المادة الخاضعة فإنه يتم تكوين كمية كبيرة من الناتج لكل وحدة زمن في وجود الإنزيم مقارنة بعدم وجوده في التفاعل. وزيادة المعدل هي خاصية مهمة لإستخدام الإنزيمات في مسارات الأيض. ففي غياب السرعة التي تمنح بالحفز الإنزيمي، فإن عديد من تفاعلات الأيض في الكائنات سوف تسير ببطئ الذي لا يدعم الحياة. وبالمثل فإنه في خارج الخلايا، فإن استخدام الإنزيمات في العمليات الكيميائية يعتمد على زيادتها للمعدل وكذلك تخصصها للمادة الخاضعة. ومن ثم فإن قيمة الإنزيمات في كل من الأنظمة البيولوجية والإستخدام التجاري هو أنها تمثل وسيلة لإنتاج كمية كبيرة من الناتج عند معدل عالي أكثر من الذي يمكن الوصول إليه بدون الحفز.

كيف تقوم الإنزيمات بزيادة معدلات التفاعلات المحفزة بالإنزيمات مقارنة بالتفاعلات غير المحفزة؟

"الإجابة على هذا السؤال تكمن في أن الإنزيمات تقوم بخفض حاجز الطاقة بثنيت (استقرار) الحالة الانتقالية الذي يؤدي إلى زيادة المعدل. وبكلمات أخرى، فإن الإنزيمات تزيد المعدل بتسهيل تكوين الحالة الانتقالية".

راجع من فصل ٣ (معادلة ٣-٧) أن سرعة تحول المادة الخاضعة (v) ترتبط بطاقة التنشيط ( $E_a$ ) (أو  $\Delta G_{ES}^\ddagger$ ) للتفاعل بالعلاقة التالية:

$$v = \frac{-d[S]}{dt} = \left( \frac{K_B T}{h} \right) [S] e^{-E_a/RT} \quad (٣-٨)$$

لتبسيط المعالجة أفترض أن درجة حرارة التفاعل تثبت عند  $25^\circ\text{C}$  وتثبت قيمة  $[S]$  عند ١ مولر (1M). عند  $25^\circ\text{C}$  فإن  $RT = 0.59$  و  $K_B T/h = 6.2 \times 10^{-18} \text{ s}^{-1}$ . افترض أيضاً أن طاقة التنشيط للتفاعل ( $E_a$ ) عند  $25^\circ\text{C}$  تكون  $10 \text{ kcal/mol}$ . ومن ثم فإنه من معادلة ٣-٨ تكون سرعة التفاعل كالتالي:

$$v = 2.7 \times 10^5 \text{ Ms}^{-1} \quad (٤-٨)$$

افترض الآن أننا خفضنا طاقة التنشيط بوسيلة ما إلى  $5 \text{ kcal/mol}$  فإن السرعة تصبح الآن:

$$v = 1.3 \times 10^9 \text{ Ms}^{-1} \quad (٥-٨)$$

ومن ثم فإن خفض طاقة التنشيط بمقدار  $5 \text{ kcal/mol}$  تزيد سرعة التفاعل بحوالي 5000 مرة. وبصورة عامة فإن الانخفاض الخطي في طاقة التنشيط يؤدي إلى زيادة أسية في معدل التفاعل. وهذا بالضبط يوضح كيف تعمل الإنزيمات. "فالإنزيمات تُعجل سرعة

التفاعلات الكيميائية بتثبيت الحالة الانتقالية للتفاعل، وبذلك تتغلب على حاجز الطاقة "فاتحاد المادة الخاضعة مع الإنزيم ينشأ مسار تفاعل التي تكون فيه طاقة الحالة الانتقالية  $\Delta G^\ddagger (E_a)$  أقل من ذلك التفاعل في غياب الإنزيم (الأشكال ١-٢ و ٣-٨ و ٤-٨). وانخفاض طاقة التنشيط يعني أن جزيئات أكثر قد اكتسبت الطاقة المطلوبة للوصول إلى الحالة الانتقالية.

دعنا ننظر إلى طاقات التفاعل الكيميائي في وجود وغياب الإنزيم. للتفاعل المحفز إنزيمياً (شكل ٨-١) فإننا يمكن تقدير الطاقات الحرة المصاحبة للحالات المختلفة من إتحاد قياسات الإتزان مع القياسات الحركية.

● فإذا سوينا الطاقة الحرة للإنزيم الحر والمادة الخاضعة الحرة  $E + S$  إلى الصفر كنقطة البداية، فإننا يمكن حساب التغيرات في الطاقة الحرة المصاحبة لتكوين  $ES^\ddagger$  (تحت الظروف التجريبية لتسبع المادة الخاضعة) كالتالي:

$$E_a = \Delta G_{ES^\ddagger} = -RT \ln \left( \frac{k_{cat}}{K_s} \right) + RT \ln \left( \frac{K_B T}{h} \right) \quad (٦-٨)$$

● والتغير في الطاقة الحرة المصاحب لتكوين المعقد  $ES$  يمكن تقديره من قياس  $K_s$  بطرق الإتزان (فصل ٥) أو القياسات الحركية (فصل ٦).

$$\Delta G_{ES} = -RT \ln \left( \frac{1}{K_s} \right) \quad (٧-٨)$$

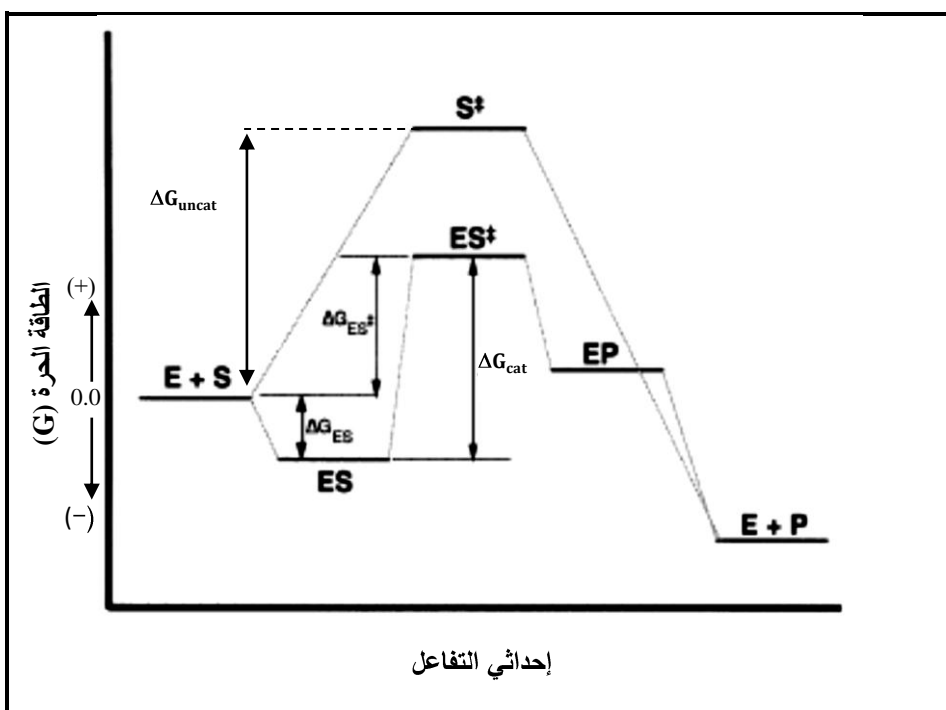
أيضاً، فإننا نجد أن طاقة التنشيط الكلية ( $\Delta G_{ES^\ddagger}$ ) تتألف من الحدين  $\Delta G_{ES}$  و  $\Delta G_{kcat}$ . والحد  $\Delta G_{kcat}$  هو كمية الطاقة التي تستنفذ في الوصول إلى الحالة الانتقالية، بينما الحد  $\Delta G_{ES}$  هو مقدار الطاقة الصافي الذي يكتسب من طاقة إرتباط الإنزيم بالمادة الخاضعة.

● إن التغير في الطاقة الحرة المرتبط بالمعقد  $EP$  يمكن أيضاً تقديرها من قياسات الإتزان أو من التأثيرات التنشيطية للنواتج على حركيات الحالة الثابتة للتفاعل.

- ولكل من التفاعلات المحفزة أو غير المحفزة، فإنه يمكن تقدير طاقة التنشيط من اعتماد سرعة التفاعل على درجة الحرارة بإستخدام معادلة أرهينوس (فصل ٩).

$$k_{cat} = A e^{(-E_a/RT)} \quad (٨-٨)$$

لاحظ أنه للتفاعل غير المحفز فإن  $k_{cat}$  تستبدل في معادلة ٨-٨ بثابت معدل الرتبة الأولى  $k$  ( $k_{uncat}$ ) للتفاعل.



شكل ٨-٤ مخطط مستويات الطاقة للتفاعل المحفز بالإنزيم والتفاعل الكيميائي المقابل غير المحفز، الرموز  $E$ ,  $S$ ,  $E S^\ddagger$ ,  $ES$ ,  $ES^\ddagger$ ,  $EP$  و  $P$  تعبّر عن الإنزيم الحر، المادة الخاضعة الحرة، الحالة الانتقالية الحرة، معقد الإنزيم - المادة الخاضعة، معقد الإنزيم- الحالة الانتقالية، معقد الإنزيم- الناتج وناتج التفاعل على التوالي  $\Delta G_{ES}$  و  $\Delta G_{ES^\ddagger}$  و  $\Delta G_{cat}$  و  $\Delta G_{uncat}$  وصفت في المتن.

من هذه القياسات يمكن تشييد مخطط لمستويات الطاقة كما هو موضح في شكل ٨-٤. في غياب الإنزيم فإن التفاعل يسير من المادة الخاضعة إلى الناتج الذي يتطلب

التغلب على حاجز طاقة كبير للوصول إلى الحالة الانتقالية  $S^\ddagger$ . من ناحية أخرى فإنه في وجود الإنزيم، فإن التفاعل يسير أولاً خلال تكوين المعقد ES. والمعقد ES يمثل مركب وسيط خلال مسار التفاعل الذي لا يكون متاحاً في التفاعل غير المحفز. إن طاقة الربط المصاحبة لتكوين المعقد ES يمكن أن تستخدم جزئياً لدفع تكوين الحالة الانتقالية. وبمجرد حدوث الارتباط، فإن القوى الجزيئية في الجزئ مجتمعة وفي نفس الوقت تعمل على عدم استقرار البنية الفراغية الطبيعية (الحالة الأرضية) لجزئ المادة الخاضعة المرتبطة بالإنزيم، التي تفضل الحالة الانتقالية. ومن ثم فإن المعقد  $ES^\ddagger$  يوجد عند طاقة منخفضة مقارنة بالحالة  $S^\ddagger$  الفردية (شكل ٨-٤)

والتفاعل التالي يسير خلال تكوين حالة وسيطة وهي معقد الإنزيم-الناتج (EP) قبل تحرير الناتج والإنزيم الحر: ومرة ثانية فإن الحالتين الابتدائية والنهائية تكون طاقتهم متماثلتين في التفاعل المحفز والتفاعل غير المحفز. مع ذلك فإن حاجز الطاقة الكلي ينخفض كثيراً في حالة التفاعل المحفز بالإنزيم. وهذا الانخفاض في حاجز طاقة التنشيط ينتج عنه تعجيل في سرعة التفاعل في وجود الإنزيم. وهذه هي الخطة العامة لزيادة المعدل المستخدمة بواسطة كل الإنزيمات.

الإنزيمات تعجل (تسرع) معدلات التفاعلات الكيميائية بتثبيت (استقرار) الحالة الانتقالية للتفاعل. ومن ثم تخفض حاجز طاقة التنشيط لإنتاج المنتج.

## ٨-٤ الآليات الكيميائية المستخدمة في تثبيت (استقرار) الحالة الانتقالية

ما هي الآليات التي تستخدمها الإنزيمات أثناء الحفز الإنزيمي في تثبيت الحالة الانتقالية للتفاعل الكيميائي ومن ثم خفض حاجز طاقة التنشيط لتكوين ناتج التفاعل؟ إن تثبيت الحالة الانتقالية المصاحبة للحفز الإنزيمي تنتج من تركيب ونشاطية الموقع النشط للإنزيم، وكيف لهذه السمات التركيبية أن تتفاعل مع جزئ المادة الخاضعة المرتبطة بالإنزيم. وتستخدم الإنزيمات عديد من الآليات الكيميائية chemical mechanisms

لتنشيط الحالة الانتقالية transition state الذي ينتج عنها تعجيل معدل التفاعل. وهذه الآليات يمكن وضعها في خمسة فئات:

١. التقريب Approximation (أى التقارب proximity والتوجيه orientation)
٢. الحفز بالحمض - القاعدة العام General acid-base catalysis
٣. الحفز التساهمي Covalent catalysis
٤. تغيير (تشويه) البنية الفراغية Conformational distortion
٥. إعادة تنظيم الموقع النشط للتطابق مع تركيب الحالة الانتقالية Preorganization of the active site for transition state complementary

وسوف نناقش كل من هذه الآليات بصورة منفصلة. ولكن يجب أن ندرك أنه في أى نظام حفزي، فإن عدة أو كل هذه الآليات يمكن أن تستخدم معاً للوصول إلى زيادة المعدل الإجمالي. ومن ثم فإنها كثيراً ما تعتمد بعضها على بعض، بحيث أن الخط الفاصل بين آلية وأخرى يكون غير واضحاً.

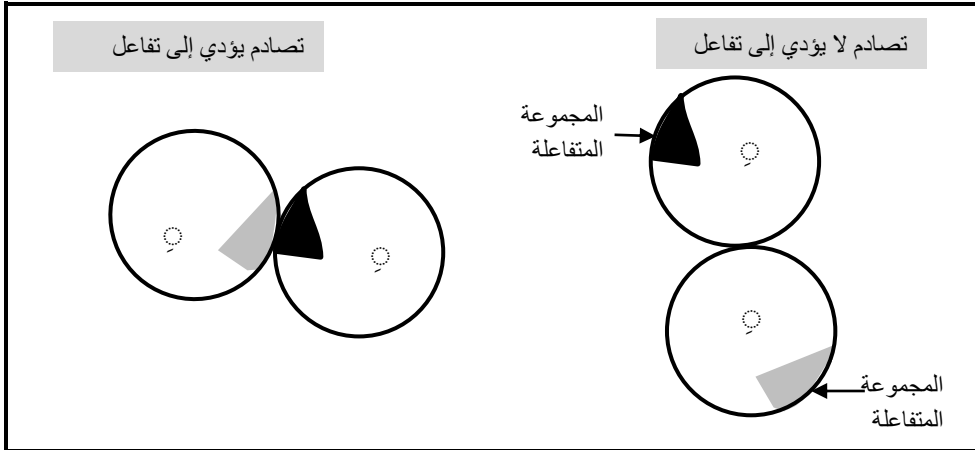
#### ٨-٤-١ التقريب (التقارب والتوجيه)

توجد عدة عوامل التي تصاحب ارتباط جزئ المادة الخاضعة بالموقع النشط للإنزيم التي تشارك في زيادة المعدل وهما التقارب والتوجيه بالإضافة إلى التغير في التذبذب (أى الارتباط بالمذيب).

- **التقارب Proximity:** أحد المشاركات الواضحة هو أن الارتباط يجعل جزيئات المادة (أو المواد) الخاضعة والمجموعات النشطة في الموقع النشط في الإنزيم في حالة تقارب proximity (ومنها اشتق التقريب approximation). دعنا ننظر إلى التفاعل ثنائي الجزيئات الذي يشتمل على متفاعلين A و B لتكوين الجزيء A - B. في المحلول فإنه لكي تتفاعل المادتين A و B فإنه يجب أن: (١) يتلاقى الجزيئان B, A خلال التصادم المحكوم بالانتشار في التوجيه المناسب لحدوث التفاعل (٢) يحدث لهما تغير في حالة غلاف المذيب الذي يسمح بالتأثير المتبادل للمدارات

الجزئية (٣) يحدث تغير في المدارات الإلكترونية للوصول إلى التشكيل الفراغي للحالة الانتقالية. في المحلول، فإن معدل التفاعل يتحدد بمعدل التلاقي بين المادتين المتفاعلتين. ومعدل التلاقي بالتصادم يمكن زيادته في المحلول برفع درجة الحرارة لنظام التفاعل أو بزيادة تركيز المادتين المتفاعلتين. أما في التفاعلات المحفزة بالإنزيمات، فإن المادتين المتفاعلتين يرتبطان بالموقع النشط للإنزيم كمتطلب لحدوث التفاعل. وعندما تحجز المادتين خلال الموقع النشط للإنزيم، فإن تركيزهما الفعال يزيد كثيراً مقارنة بتركيزهما في المحلول.

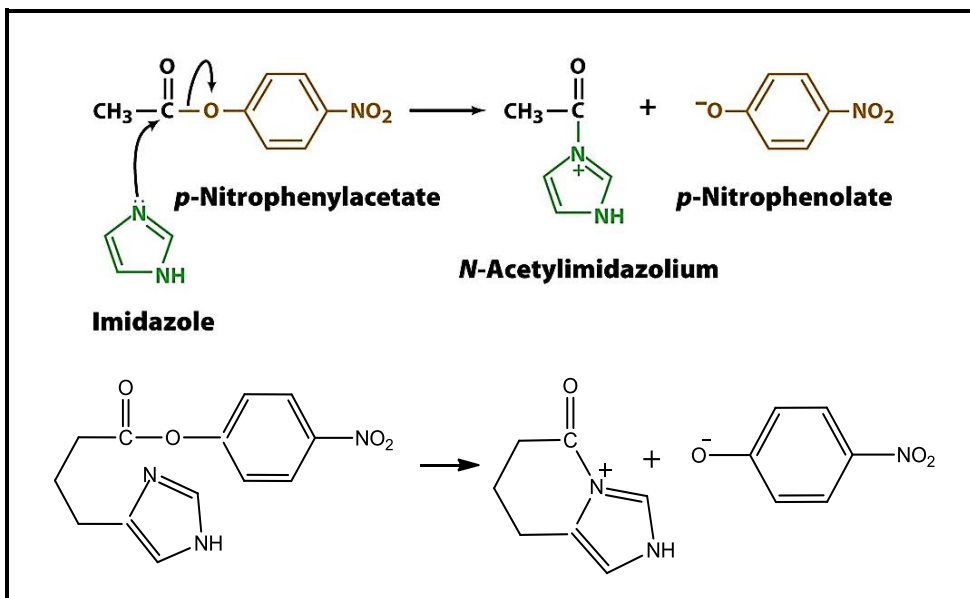
- **التوجيه Orientation:** السمة الثانية لتأثير التقريب أن الموقع النشط للإنزيم قد صمم للإرتباط بالمواد الخاضعة في توجيه خاص الذي يكون أمثل للتفاعل. في معظم التفاعلات ثنائية الجزيئات، فإن المادتين الخاضعتين يجب أن يبلغا تنظيم متبادل (توجيه المجموعات المتفاعلة في تنظيم مناسب لإحداث التفاعل) لكي يتقدما إلى الحالة الإنتقالية. في المحلول ليست كل التصادمان تكون في التوجيه المطلوب الذي يشبط معدل التفاعل (شكل ٨-٥)



**شكل ٨-٥** في المحلول ليس كل التصادمات بين الجزيئين A, B تكون في التوجيه المناسب لحدوث التفاعل الذي يؤدي إلى إنخفاض المعدل

أما الإنزيمات فتتغلب على هذا العائق للوصول إلى الحالة الانتقالية بتنظيم المادتين الخاضعتين في التوجيه المتبادل الخاص في الموقع النشط. وبالطبع فإن هذا القيد الناتج عن التنظيم والتوجيه يصاحبه إنخفاض في الإنتروبي للتفاعل. مع ذلك، فإن هذا التنظيم المتبادل يحدث أيضاً في المحلول، ولكن في حالة التفاعلات المحفزة بالإنزيمات فإن كلفة الطاقة الناتجة عن الإنخفاض في الإنتروبي يعوّض بحد طاقة الارتباط للمعدن  $(\Delta G_{ES})$ .

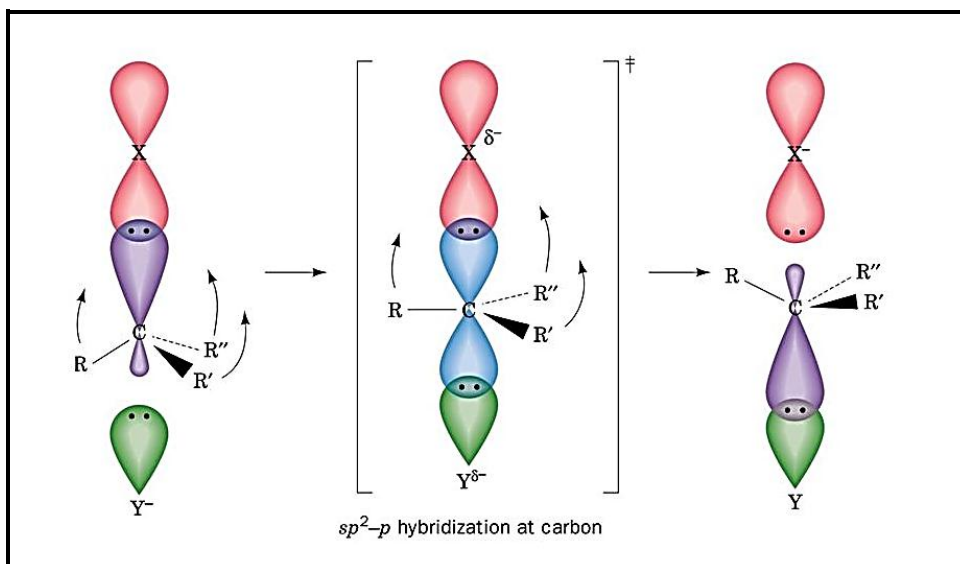
ولتوضيح تأثير التقارب على معدّل التفاعل دعنا نقارن معدّل التفاعل للتفاعلات خلال الجزئ intramolecular reaction مع التفاعل بين الجزيئات intermolecular reaction. فعند مقارنة تفاعل الإيميدازول مع بارانيترفيناييل أسيتات مع التفاعل المقابل خلال الجزئي (شكل ٨-٥) نجد أن معدّل التفاعل الأخير يكون أسرع بحوالي ٢٤ مرة عن التفاعل بين الجزيئات. ومن ثم فإنه عند ارتباط الإيميدازول تساهمياً بالمادة المتفاعلة الثانية يكون فعال بمقدار ٢٤ مرة عما يكونين حريين في المحلول.



شكل ٨-٦ تأثير التقارب ومقارنة بين تفاعل بين الجزيئات ونفس التفاعل خلال الجزئ. معدّل التفاعل خلال الجزئ يكون أكبر ٢٤ مرة عن التفاعل بين الجزيئات



● توجيه المدارات **Orbital steering**: إن فرضية توجيه المدارات تقترح أن وضع المجموعات النشطة بين المواد الخاضعة والمجموعات النشطة في الموقع النشط للإنزيم مجاورة لبعضها ليس كافياً لعملية الحفز. فبالإضافة إلى هذا التنظيم، فإن الإنزيم يحتاج إلى توجيه المدارات الذرية للمادة الخاضعة بدقة في التوجيه المناسب. ووفقاً لهذه الفرضية فإن مجموعات الموقع النشط للإنزيم قد طورت للتوجيه الأمثل لإرتباط المادة الخاضعة. ففي تفاعل الاستبدال ثنائي الجزيئية المحب للشحنة الموجبة  $\text{bimolecular nucleophilic substitution (S}_N2\text{)}$ ، فإن المجموعة القادمة المحبة للشحنة الموجبة تهاجم الجزئ المستهدف عبر إتجاه مضاد لتلك الرابطة للمجموعة المتحررة (شكل ٧-٨).



شكل ٧-٨ هندسة تفاعل  $S_N2$ . المجموعة المهاجمة للشحنة الموجبة  $Y^-$ ، يجب أن تدنو من المدار  $sp^3$  في ذرة الكربون (C) عبر اتجاه مضاد لتلك الرابطة في المجموعة المغادرة  $X$ ، وهى العملية التي يطلق عليها المهاجمة من الجانب الخلفي. في الحالة الانتقالية، فإن ذرة C يصبح فيها التهجين  $sp^2 - p$  الذي فيها المدار  $p$  يُكوّن روابط جزئية مع  $Y$ ،  $X$ ، والثلاثة مدارات  $sp^2$  على  $R$  و  $R'$  و  $R''$  تغير مواقعها على سطح عمودي على المحور  $X - C - Y$ . وأى إنحراف عن هذا الشكل الهندسي يؤدي إلى زيادة الطاقة الحرة للتنشيط  $\Delta G^\ddagger$ .

● **التذائب Solvation** : التغير في التذائب يكون أيضاً مطلوباً لحدوث التفاعل بين مادتين خاضعتين. في المحلول فإن طاقة إزالة المذيب desolvation energy يمكن أن تكون حاجز كبير للتفاعل. في التفاعلات الإنزيمية فإن إزالة المذيب من المتفاعلات يحدث أثناء ارتباط المواد الخاضعة بالموقع النافر للماء (غير القطبي) حيث تحجب بفاعلية عن المذيب الشائع في نظام التفاعل. ومن ثم فإن تكلفة إزالة المذيب يعوض بواسطة طاقة ارتباط المعقد ES ولا تشارك في حاجز طاقة التنشيط في التفاعل الإنزيمي.

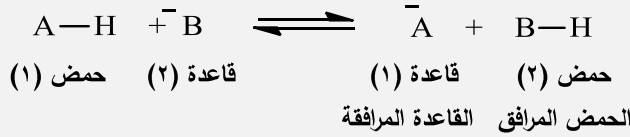
هذه الخصائص المختلفة للتفاعلات الإنزيمية مقارنة بالتفاعلات غير المحفزة في المحلول تؤدي إلى التأثير الإجمالي للتقريب الذي ينتج من ارتباط المواد الخاضعة بالموقع النشط للإنزيم. إن تأثيرات التقريب تشارك في تسريع (تعجيل) المعدل الإجمالي الذي يشاهد في الحفز الإنزيمي، حيث توفر قوى الارتباط بين الإنزيم والمادة الخاضعة كثيراً من قوى الدفع لهذه التأثيرات.

#### ٨-٤-٢ الحفز بالحمض / القاعدة العام

تشتمل معظم التفاعلات الإنزيمية إلى حد ما على نوع من نقل البروتون الذي يتطلب مشاركة مجموعة حمض و/ أو قاعدة. في الحفز بالجزيئات الصغيرة وفي بعض الإنزيمات فإن البروتونات (من أيون الهيدرونيوم  $H_3O^+$  وأيون الهيدروكسيل  $OH^-$ ) تعمل مباشرة كمجموعات حمض وقاعدة في نشاط يطلق عليه الحفز بالحمض الخاص specific acid catalysis والحفز بالقاعدة الخاصة specific base catalysis. مع ذلك، ففي معظم التفاعلات الإنزيمية فإن المادة الخاضعة العضوية والعوامل المساعدة والمجموعات الجانبية للأحماض الأمينية من الإنزيم تقوم بهذا الدور كأحماض وقواعد برونستد Bronsted acid and base الذي يشار إليه الحفز بالحمض / القاعدة العام general acid/base catalysis. بعض التفاعلات الإنزيمية يمكن أن تتضمن الحفز بالحمض العام والحفز بالقاعدة العامة معاً بالتزامن الذي يطلق الحفز المتناغم بالحمض - القاعدة concentrated acid base catalysis.

## إطار ٨-١ الأحماض والقواعد

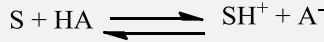
- **تعريف برونستد Bronsted للحمض والقاعدة:** الحمض يعرف بأنه مانح للبروتون والقاعدة كمستقبل للبروتون (والقاعدة يجب أن يكون متاح بها زوج من الإلكترونات للمشاركة مع البروتون، وهذه عادة تكون زوج غير مشارك في الرّبط. ولكن أحياناً تكون في المدار  $(\pi)$ ، وتفاعل الحمض-القاعدة هو ببساطة نقل للبروتون من الحمض إلى القاعدة



- **تعريف لويس Lewis للحمض والقاعدة:** القاعدة في تعريف لويس تكون مثل تعريف برونستد. أما تعريف لويس للحمض هو أنه أي نوع يحتوي على مدار شاغر (مثل  $\text{H}^+$ ،  $\text{BF}_3$ ،  $\text{Mg}^{2+}$  و  $\text{Mn}^{2+}$ ). وفي تفاعل لويس، فإن زوج الإلكترونات في القاعدة تكون رابطة تساهمية مع المدار الشاغر في الحمض



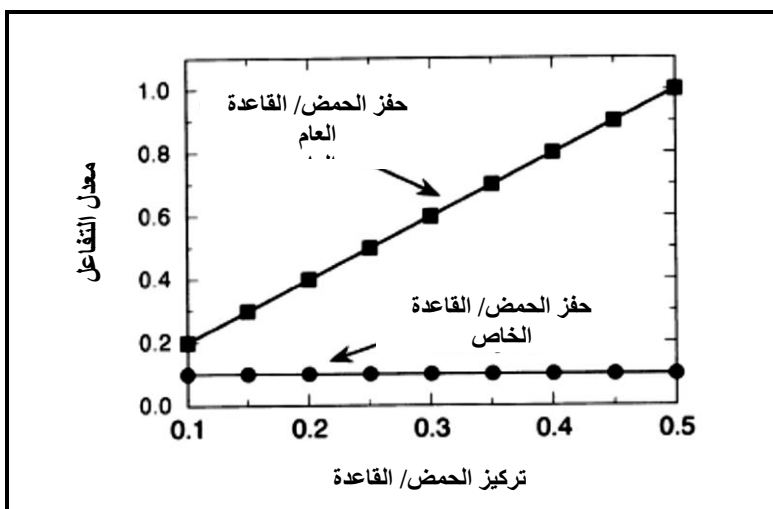
- **الحفز بالحمض - القاعدة العام والخاص:** في التفاعل التالي



حيث  $\text{S}$  = المذيب و  $\text{HA}$  = الحمض. فإذا كان الحفز بالحمض يتناسب مع  $[\text{SH}^+]$ ، فإن التفاعل يكون حفز الحمض الخاص  $\text{specific acid catalysis}$ .  $\text{HA}$  ربما يكون أقوى أو أضعف عن  $\text{SH}^+$ . في حفز الحمض العام  $\text{general acid catalysis}$ ، فإن المعدل يزيد ليس فقط بالزيادة في  $[\text{SH}^+]$ ، ولكن أيضاً بالزيادة في تركيز أحماض أخرى (مثال ذلك في المحلول المائي، يزداد المعدل بوجود الفينولات أو الأحماض الكربوكسيلية). وهذه الأحماض الأخرى تزيد المعدل حتى لو أن  $[\text{SH}^+]$  ظل ثابتاً.

للحفز بالجزيئات الصغيرة (تفاعلات غير إنزيمية) فإنه يمكن التمييز بين حفز الحمض/ القاعدة العام وحفز الحمض/ القاعدة الخاص على أساس تأثير تركيزات

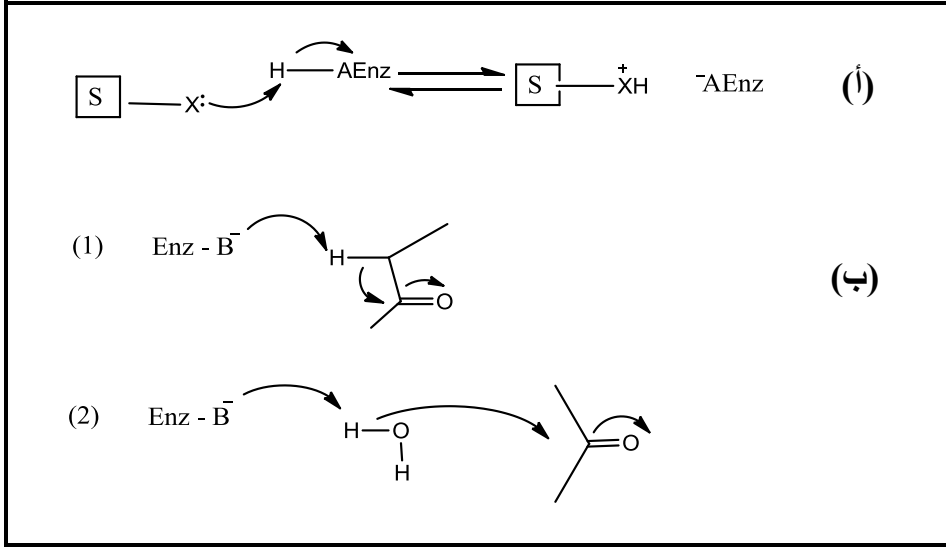
الحمض أو القاعدة على معدّل التفاعل. ففي حفز الحمض/ القاعدة العام يعتمد معدّل التفاعل على تركيز الحمض/ القاعدة العام الحفزي. بالمقارنة فإن الحفز بالحمض/ القاعدة الخاص لا يعتمد على تركيز هذه الأنواع (شكل ٨-٨). وبالرغم من أن معظم التفاعلات الإنزيمية تعتمد على حفز الحمض/ القاعدة العام، فإنه من الصعب تعيين هذا الإعتداد بتغيير تركيز مجموعات الحمض/ القاعدة مثل ما هو معروض في شكل ٨-٨ حيث أن المجموعات الحمضية والقاعدية تكون خلال الإنزيم ذاتها. وتمييز المجموعة (أو المجموعات) التي تشارك في حفز الحمض/ القاعدة العام في الإنزيمات أتت من دراسات مظهر منحنى معدّل التفاعل مقابل الـ pH، التحويل الكيميائي الخاص للأحماض الأمينية والطفرة موجه الموقع وأشعة أكس.



شكل ٨-٨ تأثير تركيز الحمض أو القاعدة العام على معدّل التفاعل للتفاعلات المحفزة بالحمض أو القاعدة العام أو الخاصة للحفز بالجزيئات الصغيرة (تفاعلات غير إنزيمية)

الحفز بالحمض العام يحدث عندما ينتقل بروتون من المجموعات النشطة في الموقع النشط للإنزيم إلى المادة الخاضعة (شكل ٨-٩ أ). ومن ثم فإن المجموعات الحمضية في الموقع النشط يجب أن تكون مرتبطة بالبروتون عند الـ pH الفسيولوجي. وحفز

القاعدة العام يحدث عند إزالة بروتون من المادة الخاضعة بواسطة المجموعات القاعدية النشطة في الموقع النشط للإنزيم أو إزالة البروتون من الماء قبل أن يهاجم المادة الخاضعة (شكل ٨-٩ ب).

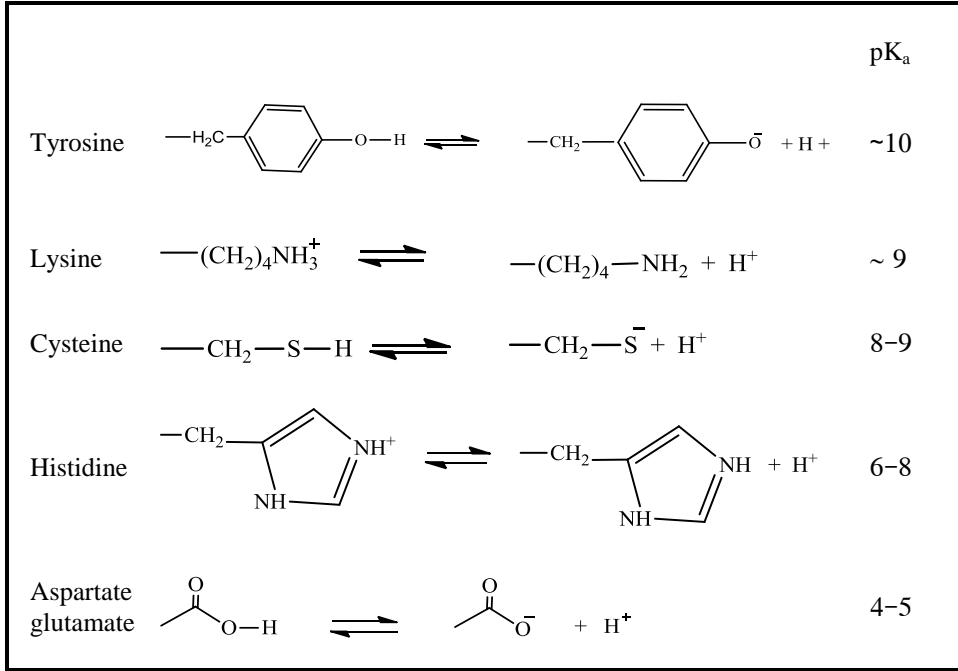


شكل ٨-٩ (أ) الحفز بالحمض العام يحدث عند انتقال بروتون من المجموعات النشطة في الموقع النشط للإنزيم إلى المادة الحامضة (ب) الحفز بالقاعدة العامة في الحفز الإنزيمي يحدث عند إزالة بروتون من المادة الخاضعة بواسطة المجموعات القاعدية النشطة B في الموقع النشط للإنزيم أو إزالة البروتون من الماء قبل أن يهاجم المادة الخاضعة.

إن كفاءة حفز الحمض/ القاعدة العام يعتمد على التركيز المؤثر لأنواع الحمض أو القاعدة الموجودة. وتركيز هذه الأنواع يعتمد على  $pK_a$  للحفاز وعلاقته بـ pH المحلول الذي يجرى فيه التفاعل. إن معدل التفاعل في حفز الحمض القاعدة يكون عند القيمة العظمى عندما يكون pH المحلول قريب من  $pK_a$  للمجموعة الفعالة. فعلى سبيل المثال فإننا يمكن القول أن الحمض الذي له  $pK_a 5$  يكون أفضل كحمض عام عن الحمض الذي له  $pK_a 7$ . مع ذلك إذا أجرى التفاعل بالقرب من pH 7، فإن معادلة هندرسون - هالسبالخ (فصل ٣) تستنتج أن حوالي 1% فقط من الحمض القوي تكون ( $pK_a 5$ ) في

صورة الحمض بينما 99% توجد في صورة القاعدة المرافقة. من ناحية أخرى فإنه عند نفس الـ pH، فإن 50% من الحمض الضعيف ( $pK_a$  7) تكون في صورة الحمض. ومن ثم فإنه نظراً للتركيزات المؤثرة للصورة الحفزية للنوعين المشار إليهما فإن الحفز الضعيف يكون أكثر فاعلية عند pH 7. لذلك، فإنه في التفاعلات الإنزيمية فإن فاعلية حفز الحمض/ القاعدة العام تستخدم تلك المجموعات التي يكون لها قيم  $pK_a$  قريبة من الـ pH الفسيولوجية (7.4). وهذا يعني أن الإنزيمات تكون مفيدة في استخدام السلاسل الجانبية للأحماض الأمينية التي لها قيم  $pK_a$  بين 4، 10. ويحصر قيم الـ  $pK_a$  لسلاسل الأحماض الأمينية فإننا نجد أن السلاسل الجانبية للأسبارتات والجلوتامات والسستئين والتيروزين واللايسين بالإضافة إلى الطرف النيتروجيني والطرف الكربوكسيلي للبروتين هي المرشحة للعمل كحفازات حمض/ قاعدة عام (شكل ٨-١٠). وبالرغم من أن قيم  $pK_a$  المعروضة في شكل ٨-١٠ هي قيم نموذجية التي توجد في البروتين، فإنه في بعض الحالات تتغير قيم  $pK_a$  للمجموعات الحمضية والقاعدية في الموقع النشط للإنزيم نتيجة للبيئة الخاصة الدقيقة microenvironment للموقع النشط. فعلى سبيل المثال فإن هستيدين 159 في الباباي Papain تنخفض فيه الـ  $pK_a$  للسلسلة الجانبية إلى 3.4 (بدلاً من 6.5) وحمض الجلوتاميك في الليسوزيم ترتفع فيه الـ  $pK_a$  للسلسلة الجانبية إلى 6.5 (بدلاً من 4.5).

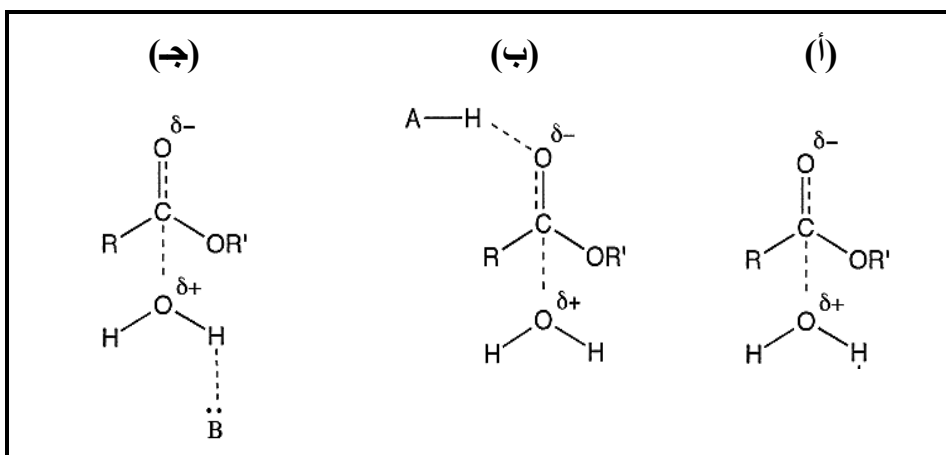
الحفز الحامضي / القاعدي العام يسرع معدل التفاعل الإنزيمي بثبتت الحالة الانتقالية الميزة الأساسية لحفز الحمض/ القاعدة العام هو أن مجموعات الحفز التي تشارك في نقل البروتون تثبت الحالة الانتقالية للتفاعل الكيميائي. والمثال الجيد لذلك يمكن توضيحه بالتحلل المائي لروابط الإستر في الماء، وهو التفاعل الذي ينفذ بواسطة عديد من إنزيمات التحلل المائي hydrolytic enzymes.



شكل ٨-١٠ السلاسل الجانبية للأحماض الأمينية في الإنزيمات التي يمكن أن تستخدم في حفز الحمض/ القاعدة العام.

إن آلية التحلل المائي للإستر تتطلب تكوين حالة انتقالية التي تشتمل على نقل جزئي للشحنة بين الإستر وجزئ الماء كما هو موضح في شكل ٨-١١ أ. هذه الحالة الانتقالية تحتوي على شحنة موجبة وشحنة سالبة قريبين من بعضهما التي تكون غير ثابتة وتكوينها يحتاج إلى طاقة تنشيط ( $\Delta G_{ES}^\ddagger$ ) عالية. ونتيجة لذلك فإن معدل هذه الخطوة ومن ثم كل الخطوات التالية سوف يكون منخفضاً جداً ولا يحدث التفاعل ما لم يحفز. هذه الحالة الانتقالية يمكن تثبيتها بواسطة مجموعة حمضية ( $A - H$ ) التي تعمل كمناح جزئي للبروتون لأكسجين الكربونيل في الإستر (شكل ٨-١١ ب). أيضاً فإن الحالة الانتقالية يمكن تثبيتها بواسطة مجموعة قاعدية التي تعمل كمستقبل جزئي للبروتون من جزئ الماء، ومن ثم تثبيت الشحنة الموجبة على جزئ الماء (شكل ٨-١١ ج). وهذا النوع من تثبيت الحالة الانتقالية بواسطة مجموعات الحمض/ القاعدة العام يكون شائعاً

في الحفز الإنزيمي. فبواقي الهستيدين في الموقع النشط في مجموعة إنزيمات سيرين للتحلل المائي للبروتين serine proteases كمثال تقوم بتثبيت الحالة الانتقالية للتحلل المائي للبيبتيدات.



شكل ٨-١١ تثبيت الحالة الانتقالية (أ) بواسطة الحمض العام (ب) أو القاعدة العامة (ج) في التحلل المائي لرابطة الإستر بواسطة الماء

### ٨-٤-٣ الحفز التساهمي

الحفز التساهمي covalent catalysis هو نوع من الحفز الذي نادراً ما يشاهد في التفاعلات العضوية، ولكن كثيراً ما يستخدم بواسطة الإنزيمات. في الحفز التساهمي يحدث تسريع لمعدل التفاعل عن طريق تكوين مركب وسيط تساهمي بين الإنزيم والمادة الخاضعة الذي يثبت الحالة الانتقالية. وعائلات عديدة من الإنزيمات تظهر تكوين المركبات الوسيطة التساهمية بين الإنزيم- المادة الخاضعة التي تشمل إنزيمات السيرين للتحلل المائي للبروتين (المركب الوسيط: أسايل- سيرين) وإنزيمات سستئين للتحلل المائي للبروتين (المركب الوسيط: أسايل- سستئين) وإنزيمات بروتين كينيز والفوسفاتيز (المركب الوسيط: فوسفو- الحمض الأميني) والإنزيمات المستخدمة لفوسفات البيرويكسال كمعامل مساعد (المركب الوسيط: البيرويدوكسال- قواعد شف للأحماض



الأمينية). والأدلة التجريبية لوجود المركبات الوسيطة التساهمية أتت من القياسات الحركية، ومن فصل والتعرف على المركبات الوسيطة الثابتة، وحديثاً التعرف على التركيب البلوري للمركبات الوسيطة باستخدام أشعة إكس.

وفي الحفز التساهمي، فإن توليد المركب الوسيط التساهمي بين الإنزيم والمادة الخاضعة يجلب النظام عبر مسار التفاعل في اتجاه الحالة الإنتقالية، ومن ثم يساعد في التغلب على حاجز طاقة التنشيط. والتفاعل الإنزيمي الذي يعمل بآلية الحفز التساهمي يشتمل على خطوتين - تكوين وتفكيك المركب الوسيط - بدلاً من الحفز للتفاعل الفردي مباشرة. والخطوة المحددة للمعدل إما تكون خطوة تكوين المركب الوسيط التساهمي أو خطوة تفكيك المركب التساهمي.

الحفز التساهمي في الإنزيمات يتم أساساً بالحفز المحب للشحنة الموجبة nucleophilic catalysis أو الحفز المحب للشحنة السالبة electrophilic catalysis، وفي حالات خاصة بحفز الأكسدة والإختزال redox catalysis.

#### ٨-٤-٣-١ الحفز المحب للشحنة الموجبة

في الحفز المحب للشحنة الموجبة، فإن مجموعة محبة للشحنة الموجبة، nucleophilic group على الإنزيم (E-Nuc:) تهاجم مجموعة محبة للشحنة السالبة electrophilic group على المادة الخاضعة (sub) الذي يؤدي إلى تكوين رابطة تساهمية بين الإنزيم والمادة الخاضعة، وبذلك يتكون مركب وسيط تساهمي عابر:



إن معدل التفاعل في الحفز المحب للشحنة الموجبة يعتمد على كل من قوة المجموعة المحبة للشحنة الموجبة nucleophile في الإنزيم وعلى حساسية المجموعة المحبة للشحنة السالبة electrophile في المادة الخاضعة التي تهاجم (بمعني إلى أى مدى تكون المجموعة المهاجمة مجموعة مغادرة جيدة).

● قوة المجموعة المحبة للشحنة الموجبة في الإنزيم: إن مقدرة منح الإلكترونات nucleophilicity للمجموعة المحبة للشحنة الموجبة يعتمد على عدد من العوامل. وأحد أهم هذه العوامل هي قاعدية basicity المجموعة. والقاعدية كما ناقشناها في فصل ٣ هي مقياس لميل المجموعات لمنح زوج الإلكترونات للبروتونات. وبصورة عامة، فإن ثابت معدّل التفاعل العضوي في الحفز المحب للشحنة الموجبة يعتمد تقريباً بعلاقة قوية مع  $pK_a$  للمجموعة المحبة للشحنة الموجبة. والعوامل الأخرى التي تؤثر على قوة المجموعة المحبة للشحنة الموجبة تشمل جهد التأكسد، جهد التأين و طاقة الجهد والاستقطابية وحجم المجموعة. وفي الحفز الإنزيمي المحب للشحنة الموجبة، فإن المجموعات المحبة للشحنة الموجبة غالباً ما تكون السلاسل الجانبية للأحماض الأمينية خلال الإنزيم. ومن المناقشة السابقة، فإننا نتوقع أن تكون الأحماض الأمينية القاعدية هي أفضل المجموعات المحبة للشحنة الموجبة في الإنزيمات. مع ذلك، فإن الإنزيمات تعمل خلال مدى ضيق من الـ pH (حوالي pH 7.4) وهذا يقيد العلاقة بين  $pK_a$  وقوة المجموعات المحبة للشحنة الموجبة. فعلي سبيل المثال، فإنه بالرجوع إلى جدول ٤-١، نجد أن مجموعة الجوانيدينو  $\left( \begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{C}- \\ \parallel \\ \text{NH} \end{array} \right)$  guanidino في السلسلة الجانبية لباقي حمض الأرجنين في البروتين يفترض أن تكون مجموعة محبة للشحنة الموجبة جيدة ( $pK_a$  12.5)، مع ذلك، فإنه بالرجوع إلى معادلة هندرسون- هالسالخ (معادلة ٣-١٤) نجد أنه عند الـ pH الفسيولوجية (7.4~) فإن هذه المجموعة توجد في صورة مرتبطة بالبروتون (الصورة الحمضية). ومن ثم فإن السلسلة الجانبية للأرجنين لا تعمل كمجموعة محبة للشحنة الموجبة في الحفز الإنزيمي. والأحماض الأمينية التي لها القدرة على العمل كمجموعات محبة للشحنة الموجبة معروضة في جدول ٨-١.

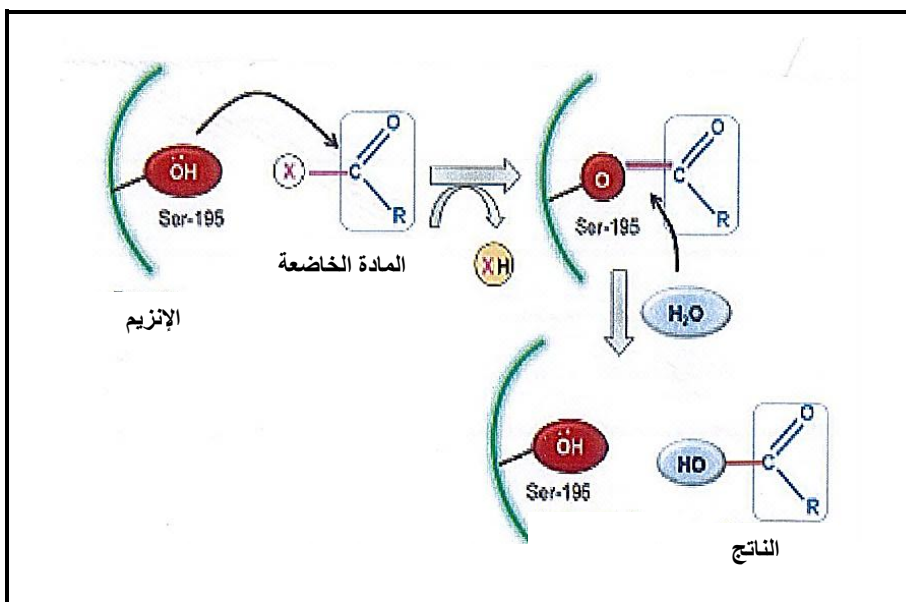
جدول ٨-١ المجموعات في الأحماض الأمينية التي تعمل كمجموعات محبة للشحنة الموجبة في الإنزيمات والمركبات الوسيطة التساهمية التي تتكون بتفاعلها مع المادة الخاضعة

| الحمض الأميني | المجموعات المحبة للشحنة الموجبة | أمثلة للإنزيمات              | المركب الوسيط التساهمي |
|---------------|---------------------------------|------------------------------|------------------------|
| سيرين         | (-OH)                           | Serine proteases             | Acyl enzyme            |
| سستئين        | (-SH)                           | Thiol proteases              | Acyl enzyme            |
| أسبارتات      | (-COO <sup>-</sup> )            | ATPases                      | Phosphoryl enzyme      |
| لايسين        | (-NH <sub>2</sub> )             | Pyridoxal-containing enzymes | Schiff base            |
| هستيدين       | (-NH) (إيميدازول)               | Phosphoglycerate mutase      | Phosphoryl enzyme      |
| تيروزين       | (OH - عطري)                     | Glutamate synthase           | Adenyl enzyme          |

● حساسية المجموعة المحبة للشحنة السالبة: إن معدل الحفز التساهمي يعتمد أيضاً على حساسية المجموعة المحبة للشحنة السالبة في المادة الخاضعة (بمعنى بأى درجة يسهل تحرير المجموعة المغادرة في الخطوة التالية للتفاعل). إن حساسية المجموعة المحبة للشحنة السالبة يتأثر بالمثل بعدة عوامل. ومرة ثانية فإن  $pK_a$  للمجموعة المغادرة (أى حالة ارتباطها بالبروتون) يعتبر هو العامل السائد. والدراسات التي أجريت على معدّل الحفز باستخدام مجموعة محبة للشحنة الموجبة عامة (مشتركة) على سلسلة من أنواع المجموعات المغادرة أوضحت وجود ارتباط بين المعدّل و  $pK_a$  للمجموعة المغادرة. وبصورة عامة، فإن الخواص القاعدية الضعيفة تشير إلى مجموعات مغادرة جيدة. أيضاً فإن الطبيعة الكيميائية للمجموعة المغادرة وليس  $pK_a$  فقط تؤثر أيضاً على معدّل الحفز.

● مثال لإنزيمات الحفز التساهمي المحبة للشحنة الموجبة: إنزيمات السيرين المحللة للبروتين. أحد الأمثلة للحفز التساهمي المحب للشحنة الموجبة هي إنزيمات السيرين المحللة للبروتين. والمجموعة المحبة للشحنة الموجبة nucleophile في هذه الإنزيمات هي

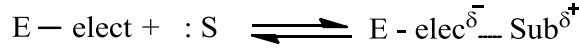
مجموعة الهيدروكسيل النشطة في الحمض الأميني سيرين. هذه الإنزيمات تحلل الروابط الببتيدية في البروتينات. وتحتوي هذه الإنزيمات أيضاً على هستيدين وأسبارتات في الموقع النشط للإنزيمات التي تساعد في تنشيط مجموعة الهيدروكسيل في السيرين وتثبت الحالة الانتقالية أثناء التفاعل. وتختلف أفراد هذه المجموعة من الإنزيمات في تخصصها تجاه الروابط الببتيدية ولكنها تستخدم نفس الآلية في عملية الحفز. فعلى سبيل المثال، فإن إنزيم الكيموتريسين يحفز تفكك الروابط الببتيدية المجاورة لبواقي الأحماض الأمينية النافرة للماء. وشكل ٨-١٢ يوضح بصورة مختصرة تحليل الرابطة الببتيدية بواسطة إنزيم الكيموتريسين. وفي قسم ٨-٥ سوف نعرض بالتفصيل آلية الحفز والتخصص لإنزيم الكيموتريسين بصورة خاصة وإنزيمات السيرين بصورة عامة.



شكل ٨-١٢ مخطط مختصر لتحلل الروابط الببتيدية بواسطة إنزيم الكيموتريسين. Ser-195 هو الحمض الأميني سيرين رقم 195 في سلسلة عديد الببتيد للإنزيم و (X) هي ذرة النيتروجين. مجموعة -OH المحبة للشحنة الموجبة في الإنزيم تهاجم ذرة كربون الكربونيل التي تحتوي على شحنة موجبة جزئية في المادة الخاضعة.

#### ٨-٤-٣-٢ الحفز المحب للشحنة السالبة

في الحفز المحب للشحنة السالبة electrophilic catalysis يتكون أيضاً مركب وسيط عابر بين مجموعة كاتيونية محبة للشحنة السالبة في الإنزيم وجزء غني بالإلكترونات في جزئ المادة الخاضعة:



السلاسل الجانبية للأحماض الأمينية في الإنزيمات لا تحتوي على مجموعات محبة للشحنة السالبة مؤثرة. ومن ثم فإن الحفز الإنزيمي المحب للشحنة السالبة يعتمد على العوامل المساعدة العضوية ناقصة الإلكترونات أو الأيونات المعدنية. وجدول ٨-٢ يعرض بعض التفاعلات الإنزيمية المشتملة على الحفز المحب للشحنة السالبة.

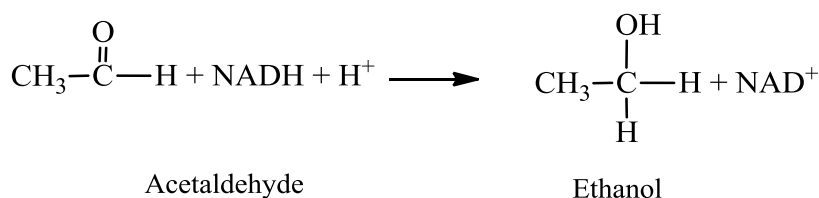
جدول ٨-٢ بعض الأمثلة للحفز المحب للشحنة السالبة في التفاعلات الإنزيمية

| الإنزيم                    | المجموعة المحبة للشحنة السالبة |
|----------------------------|--------------------------------|
| Carbonic anhydrases        | Zn <sup>2+</sup>               |
| L-Malic enzyme             | Mn <sup>2+</sup>               |
| Acetoacetate decarboxylase | Lysine – substrate Schiff base |
| Aldolase                   | Lysine – substrate Schiff base |
| Aspartate aminotransferase | Pyridoxal phosphate            |
| Pyruvate decarboxylase     | Thiamine pyrophosphate         |

١- أيونات المعادن: يوجد عدد ضخم من أمثلة التفاعلات الإنزيمية التي تشتمل على أيونات معدنية التي تشارك في الحفز بعدة طرق (قسم ٤-١-٤):

- يمكن أن يقوم الأيون المعدني بتوليد مجموعة محبة للشحنة الموجبة nucleophile بزيادة حموضة جزئ مجاور مثل الماء كما في حالة هيدرة CO<sub>2</sub> بواسطة إنزيم carbonic anhydrase الذي نوقش في قسم ٤-١-٤.

- الأيون المعدني يمكن أن يعمل كاحفاز محب للشحنة السالبة electrophilic catalyst، بتثبيت الشحنة السالبة على المركبات الوسيطة في التفاعل. مثال ذلك تفاعل اختزال الأسيتالدهيد إلى الإيثانول بواسطة إنزيم Alcohol dehydrogenase (ADH) في وجود NADH:

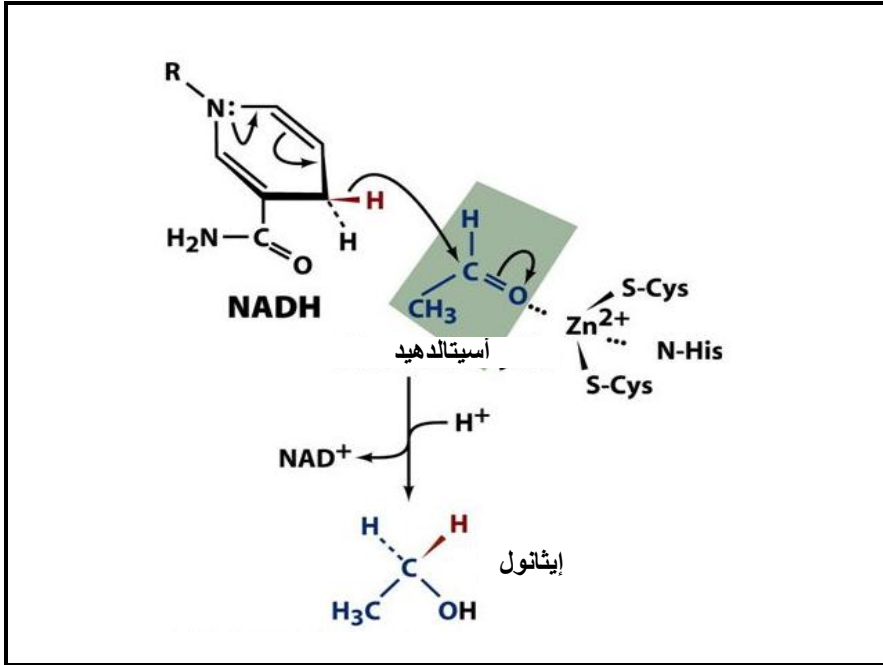


الدراسات التي أجريت على إنزيم ADH من الخميرة (YADH) أوضحت أن الإنزيم يتألف من أربع وحدات فرعية كل منها يرتبط بأيون زنك  $\text{Zn}^{2+}$  فردي في الموقع النشط. وأيون  $\text{Zn}^{2+}$  يقوم بإستقطاب مجموعة الكربونيل ( $\text{C} = \text{O}$ ) في الأسيتالدهيد ليثبت الشحنة الناشئة في الحالة الانتقالية للتفاعل (شكل ٨-١٣).

- الأيونات المعدنية التي ترتبط بالمواد الخاضعة يمكن أيضاً أن تحدث تغير في التركيب الهندسي لجزيء المادة الخاضعة بطريقة تيسر النشاط الحفزي.
- إنزيمات (NMP kinase) Nucleoside monophosphate kinase تقوم بحفز نقل مجموعة الفوسفات الطرفية من النيوكليوسيد ثلاثي الفوسفات (NTP) عادة ATP إلى النيوكليوسيد أحادي الفوسفات (NMP) فينتج نيوكليوسيد ثنائي الفوسفات (NDP)



في هذا التفاعل فإن المادة الخاضعة للإنزيم ليست ATP بذاته ولكن المعقد  $\text{ATP} - \text{Mg}^{2+}$ . والدراسات الحركية على أنزيم NMP Kinase مع ATP أوضحت أن الإنزيم يكون غير نشط في غياب  $\text{Mg}^{2+}$ ، ولكن النشاط الحفزي يحتاج أيون  $\text{Mg}^{2+}$  (أو  $\text{Mn}^{2+}$ ). ومن ثم فإن  $\text{ATP} - \text{Mg}^{2+}$  هو المادة الخاضعة لهذا الإنزيم.



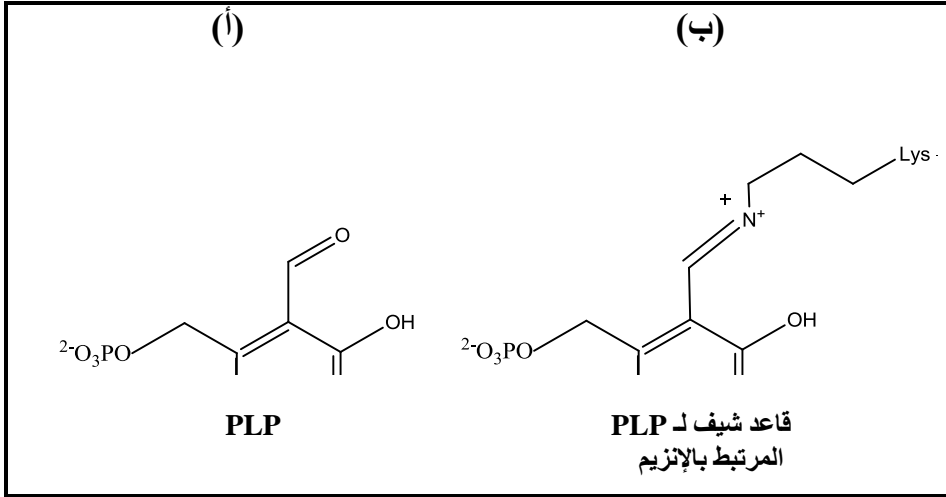
شكل ٨-١٣ آلية الحفز لإنزيم YADH.  $\text{Zn}^{2+}$  يرتبط بإثنين من السستينين عن طريق الكبريت S-Cys ورابطة مع نيتروجين الهستيدين N-His. والمرافق الإنزيمي NADH يوجد في جيب قريباً من أيون الزنك. أيون  $\text{Zn}^{2+}$  يستقطب مجموعة  $\text{C}=\text{O}$  في الأسيتالدهيد ليثبت الشحنة الناشئة في الحالة الانتقالية للتفاعل.

كيف لإرتباط المغنسيوم مع النيوكليوتيد أن يؤثر على الحفز. الدراسات التي أجريت على الإنزيم الحر والإنزيم مع المواد الخاضعة ومناظرات المواد الخاضعة باستخدام التصوير بأشعة أكس أوضح التالي:

- أيون المغنسيوم يعادل بعض الشحنات في سلسلة عديد الببتيد في الإنزيم.
- إن التأثير المتبادل بين أيون المغنسيوم وذرات الأكسجين في مجموعة الفوسفوريل يقيد النيوكليوتيد في بنية فراغية جيدة التحديد التي يمكن أن ترتبط بصورة متخصصة بالإنزيم.

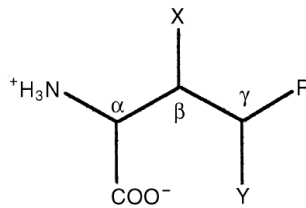
- ارتباط المادة الخاضعة تحدث تغيرات تركيبية كبيرة في الإنزيم التي تعطي مثال تقليدي لإستخدام التطابق المستحث.
  - الإنزيم يضع المادتين الخاضعتين بالقرب من بعضهما في الموقع المناسب لتثبيت الحالة الإنتقالية التي تؤدي إلى نقل مجموعة الفوسفوريل من ATP إلى NMP، وهذا يعطي مثال للحفز بواسطة التقريب.
- ٢- العوامل المساعدة العضوية: عديد من العوامل المساعدة العضوية (المرافقات الإنزيمية والمجموعات التعويضية، جدول ٤-٤) تعمل كمراكز محبة للشحنة السالبة. وأكثر الآليات الشائعة في الحفز المحب للشحنة السالبة في التفاعلات الإنزيمية هي تلك التي تتحد فيها المادة الخاضعة مع المجموعة الحفزية في المرافق الإنزيمي لنتج، في مواقعهما، مجموعة محبة للشحنة السالبة تحتوي على ذرة نيتروجين كاتيونية. والنيتروجين بذاته ليس محب للشحنة السالبة قوى، ولكنه يعمل كمحدر (مصبدة) sink فعالة للإلكترونات في مثل هذه التفاعلات نظراً لسهولة ارتباطه بالبروتون وقدرته على تكوين اتحادات كاتيونية غير مشبعة بسهولة (فالحفز التساهمي المحب للشحنة السالبة يعمل خلال سحب الإلكترونات من مركز التفاعل في المركب الوسيط التساهمي- بين العامل المساعد في الإنزيم والمادة الخاضعة- الذي يمكن تعريفه بالمصبدة الإلكترونية electron sink). والمثال الجيد لهذه الفصيلة من التفاعلات المحبة للشحنة السالبة تشتمل على العامل المساعد فوسفات البيريدوكسال (pyridoxal 5'-phosphate (PLP الذي يشترك في فيتامين ب<sub>٦</sub> (بيريدوكسين Pyridoxin) الذي يؤكسد ويفسفر في الجسم ليعطي الصورة النشطة للمرافق الإنزيمي). والإنزيمات التي تستخدم PLP ترتبط بالعامل المساعد خلال ارتباط إيميني imine linkage (قاعدة شيف) بين مجموعة الألدهيد في PLP ومجموعة الأمينو إيسلون ε-amino group بباقي حمض لايسين في الموقع النشط للإنزيم (شكل ٨-١٤).



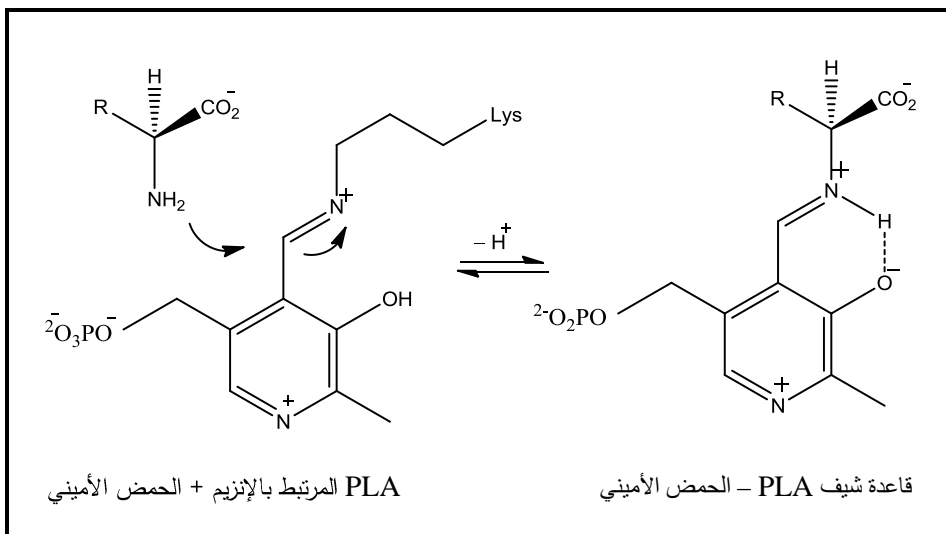


شكل ٨-١٤ (أ) المرافق الإنزيمي PLP (ب) قاعدة شيف لـ PLP المرتبط بالإنزيم عن طريق لايسين (Lys) في الإنزيم.

فوسفات البيريديوكسال (PLP) يعمل كمرافق إنزيمي للجزء الأكبر من الإنزيمات التي تحفز التفاعلات الكيميائية عند ذرة الكربون ألفا ( $\alpha$ ) وبيتا ( $\beta$ ) وجاما ( $\gamma$ ) في الأحماض الأمينية.



الخطوة الأولى في التفاعل بين الأحماض الأمينية والمرافق الإنزيمي المرتبط بالإنزيم هو مهاجمة مجموعة الأمينو في الحمض الأميني أيون الأمينيوم ( $=\text{NH}^+$ ) والإحلال مكان باقي اللايسين وتكوين الإيمين الكاتيوني cationic imine (قاعدة شيف Schiff base) التي تلعب الدور الأساسي في خفض طاقة التنشيط (شكل ٨-١٥).



شكل ٨-١٥ تكوين الإيمين الكاتيوني (قاعدة شيف Schiff base) بارتباط الحمض الأميني مع PLP في الإنزيم

إن دور فوسفات البيريدوكسال هنا أنه يعمل كمحدر (مصيدة) للإلكترونات الذي يثبت الكاربانيون carbanion (الشحنة السالبة على ذرة الكربون ألفا في الحمض الأميني) وهو المركب الوسيط الذي يتكون أثناء عملية الحفز. فسحب الإلكترونات من ذرة الكربون ألفا في الحمض الأميني المتصل تجاه النيتروجين الكاتيوني ينشط البدائل الثلاثة (الفا، بيتا وجاما) للتفاعل، ومن ثم فإن أى من أحدهما يمكن أن تشطر لتكون مركز أنيوني. ونظراً لأن الإيمين الكاتيوني (قاعدة شيف) يزدوج مع حلقة البيريدين، فإنه يوفر عدم تمرکز (انتشار) للشحنة، الذي يجعل فوسفات البيريدوكسال حفاز عالي الكفاءة للتفاعلات المحبة للشحنة السالبة.

كل الإنزيمات المحتوية على فوسفات البيريدوكسال تسير خلال ثلاثة خطوات أساسية:

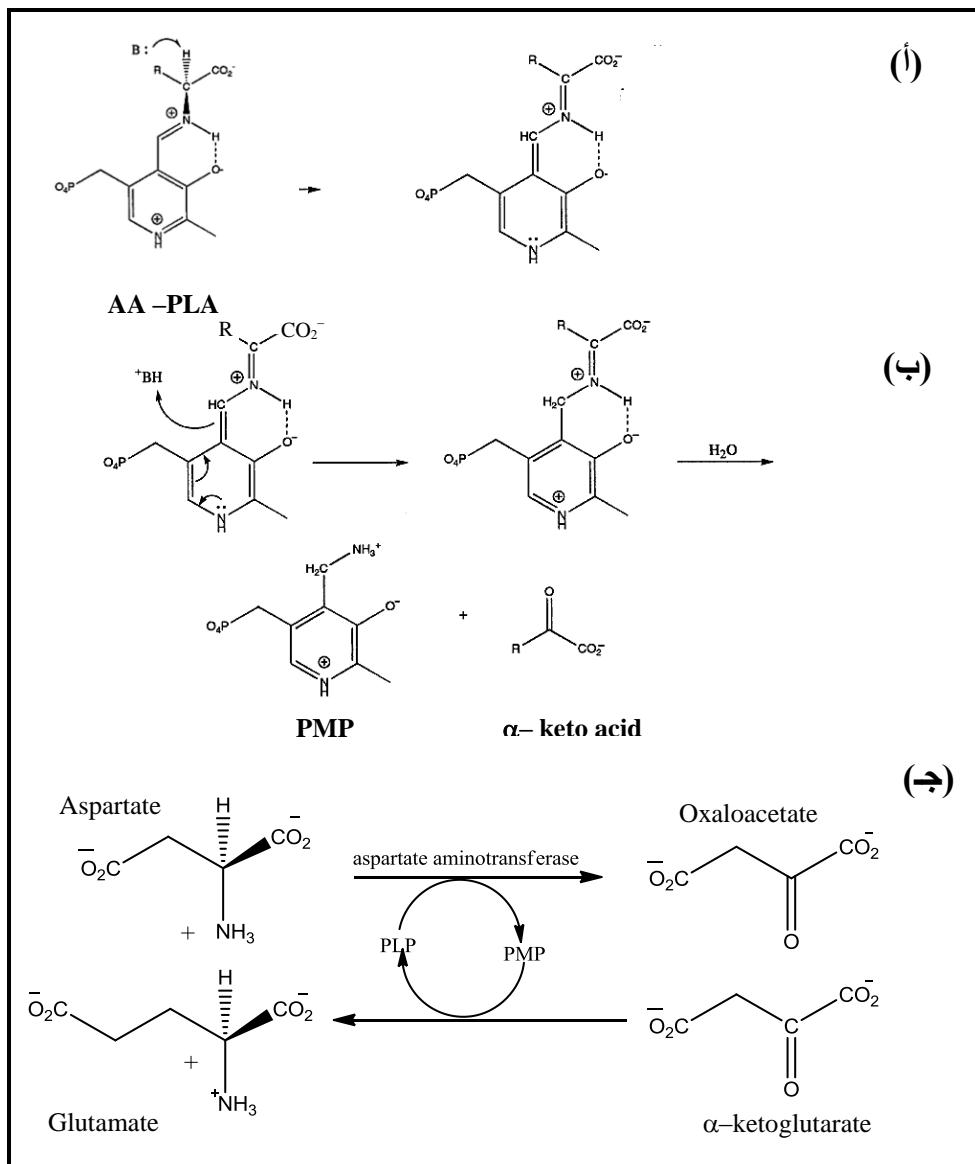
- ١- تكوين الإيمين الكاتيوني (قاعدة شيف)
- ٢- تغيرات كيميائية خلال الكاربانيون الوسيط
- ٣- تحليل ناتج الإيمين

والتفاعل الشائع لفوسفات البيريديوكسال مع الأحماض الأمينية ألفا ( $\alpha$ ) هو إزالة الهيدروجين ألفا ( $\alpha$ ) (شكل ٨-١٦) لتعطي مركب وسيط رئيسي في تفاعلات متعددة للأحماض الأمينية التي تشمل نقل مجموعة أمين. تكوين متشكل راسيمي، إزالة مجموعة الكربوكسيل والتحول البيني للسلسلة الجانبية. ففي نقل مجموعة الأمين (مثل نقل مجموعة الأمين من الأسبارتات إلى ألفا كيتوجلوتارات مع تكوين أكسالوأسيتات والجلوتامات بواسطة إنزيم aspartate amino transferase (شكل ٨-١٦)، فإن إزالة الهيدروجين ألفا يتبعه منح بروتون للكربون الكربونيلي لفوسفات البيريديوكسال الذي يؤدي إلى تكوين ألفا- حمض كيتوني- قاعد شيف بيريديوكسامين PMP. والتحلل المائي التالي لهذا المركب ينتج عنه الحمض ألفا كيتوني الحر ومجموعة البيريديوكسامين (PMP). ثم يتكون إيمين بين الحمض ألفا كيتوني والبيريديوكسامين ثم يحدث نقل عكسي للبروتون لإنتاج حمض أميني جديد وإعادة توليد فوسفات البيريديوكسال حيث تكتمل دورة الحفز (شكل ٨-١٦ ج)

#### ٨-٤-٤-٨ تغير (تشويه) البنية الفراغية (البنية المجسمة)

بعض الشواهد التجريبية أدت إلى فرضية أن تكيف (تغير) البنية الفراغية (المجسمة) conformation distortion للإنزيم، المادة الخاضعة أو كلاهما هو أحد الأوجه المهمة في الحفز الإنزيمي. ومن هذه الشواهد:

- أولاً: الدراسات الكمية للتفاعلات الإنزيمية قد أدت إلى استنتاج أن زيادة المعدل المشاهد لا يمكن تفسيره بصورة كاملة على أساس آليات التقريب وحفز الحمض/ القاعدة والحفز التساهمي بمفردهم. ومن ثم فإنه يجب البحث عن آلية إضافية لتفسير زيادة المعدل. لقد ثبت جيداً أن عديد من البروتينات التي تشمل الإنزيمات لها القدرة على تغيير بنيتها الفراغية. لذلك ظهرت أحد الفرضيات المبكرة التي افترضت أن تغير البنية الفراغية يستخدم في تشويه المادة الخاضعة أو الإنزيم أو كلاهما لجلب النظام في اتجاه تركيب الحالة الانتقالية.



شكل ٨-١٦ مثال لتفاعل الأحماض الأمينية (نقل مجموعة الأمين) بواسطة الحفز محب للشحنة السالبة بواسطة فوسفات البيريدوكسال (أ) إزالة الهيدروجين ألفا من الحمض الأميني المرتبط (ب) إزالة التالية لمجموعة الأمين من الحمض الأميني وتكوين الحمض الفاكيتوني المقابل مع تكوين البيريدوكسامين PMP (ج) التفاعلات النصفية التي تحفز نقل مجموعة الأمين من حمض أميني إلى حمض الفاكيتوني التي تحفز بأحد إنزيمات نقل مجموعة الأمين الذي يحول الاسبارتات إلى أكسالو- أسيتات وفي نفس الوقت يحول ألفا كيتوجلوتارات إلى جلوتامات

المشاهدة التجريبية الثانية التي اقترحت الاحتياج الاستشهاد بالتشوه في البنية الفراغية هي أن التخصص للمادة الخاضعة هو ثابت معدل الرتبة الثانية الذي يتم الحصول عليه بقسمة  $k_{cat}$  على  $K_m$ . فإذا كان التخصص للمادة الخاضعة يرجع فقط للتمييز بين الارتباط للمواد الخاضعة في حالاتها الأرضية (الطبيعية)، فإننا نتوقع أن الاختلافات في  $K_m$  يكون هو العامل المهيمن (الغالب) في التمييز بين المادة الخاضعة الجيدة والمادة الخاضعة الرديئة. مع ذلك فإنه تجريبياً وجد في معظم الحالات أن التخصص (أي كفاءة الحفز الذي يقاس كـ  $k_{cat}/K_m$ ) يرجع إلى الاختلاف في  $k_{cat}$  وليس للاختلاف في  $K_m$ . ففي أحد الدراسات التي أجريت على التحلل المائي لعدد 7 من الببتيدات المختلفة بواسطة إنزيم الببسين pepsin، وجد أن كفاءة الحفز (التي تقاس كـ  $k_{cat}/K_m$ ) للببسين تختلف في مدى 1000 مرة. وبالنظر إلى الثوابت الحركية الفردية نجد أن  $K_{cat}$  تختلف أيضاً حوالي 1000 مرة. بالمقارنة فإن  $K_m$  تكون تقريباً متماثلة للمواد الخاضعة المختلفة وتختلف فقط في حدود 4-مرات على الأكثر. وفي الحقيقة فإن  $K_m$  للمادة الخاضعة الأردأ تكون أقل عن تلك الخاصة بالمادة الخاضعة الأفضل والذي يشير إلى أن الارتباط للمادة الخاضعة في الحالة الأرضية (الطبيعية) ليس هو العامل المحدد الرئيسي في تخصص المادة الخاضعة لهذا الإنزيم. إن البيانات التجريبية للببسين وعدد كبير من الإنزيمات الأخرى تقترح أن التخصص للمادة الخاضعة يعين أساساً بواسطة تركيب الحالات الانتقالية وليس تركيب الحالة الأرضية للمادة الخاضعة.

● ونفس الإستنتاج كثيراً ما تم الوصول إليه من تأثير الطفرات موجّه الموقع site-directed mutagenesis (SDM) خلال الموقع النشط للإنزيم. في هذه الطريقة يتم إستبدال حمض أميني خاص في الموقع النشط للإنزيم بحمض أميني آخر ثم النظر إلى تأثير هذا الإستبدال على النشاط الحفزي للإنزيم.

في أحد هذه الدراسات تم دراسة إنزيم tyrosyl-tRNA synthetase وهو الإنزيم الذي يربط التيروسين تساهمياً مع tRNA الخاص به. يحتاج الإنزيم إلى ATP

لعملية الحفز ويتقدم التفاعل خلال تكوين الحالة الإنتقالية Enzyme-bound tyrosyl- ATP. ولقد تم إستخدام أشعة إكس للتعرف على المركب الوسيط التساهمي enzyme-tyrosyl-AMP الذي استخدم كنموذج (مخطط) لمعقد الحالة الإنتقالية. ومن هذا النموذج قد تم تعيين إثنين من بواقي الأحماض الأمينية خلال الموقع النشط للإنزيم اللذان يكونان حاسمين (أساسيين) في عملية الحفز: وهما Thr 40 و His 45 ولقد تم تجهيز ثلاثة طفرات للإنزيم:

١- الطفرة Thr 40-Ala (إستبدال ثريونين 40 بـ آلانين Ala)

٢- الطفرة His 45-Gly (إستبدال هستيدين 45 بـ جليسين Gly).

٣- طفرة مزدوجة Thr 40-Ala/His 45-Gly (إستبدال ثريونين 40 بـ آلانين

وإستبدال هستيدين 45 بـ جليسين Gly).

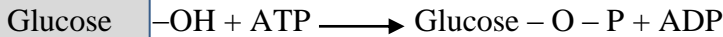
وعند مقارنة المعلمات (البارامترات) الحركية لهذه الطفرات الثلاثة مع الإنزيم الطبيعي، وجد أن قيم  $K_s$  لكل من التبروزين أو ATP تتغير قليلاً؛ فالتغير الأكبر في  $K_s$  كان حوالي أربع أضعاف الإنزيم الطبيعي. بالمقابل فإن قيم  $k_{cat}$  قد تغيرت بدرجة مثيرة. فقيمة  $k_{cat}$  قد تغيرت من  $38 \text{ s}^{-1}$  للإنزيم الطبيعي إلى  $0.16 \text{ s}^{-1}$  لطفرة His 45-Gly وإلى  $0.0055 \text{ s}^{-1}$  لطفرة Thr 40-Ala وإلى  $0.00012 \text{ s}^{-1}$  للطفرة المزدوجة. ومن ثم فقد استنتج أن الوظيفة الرئيسية لبواقي هذه الأحماض الأمينية هو توفير تأثيرات ارتباطات مواتية (إيجابية) مع تركيب الحالة الإنتقالية tyrosyl- ATP، بالمقابل فإنها لا تمنح أى تأثيرات ارتباط مع المادة الخاضعة الطبيعية.

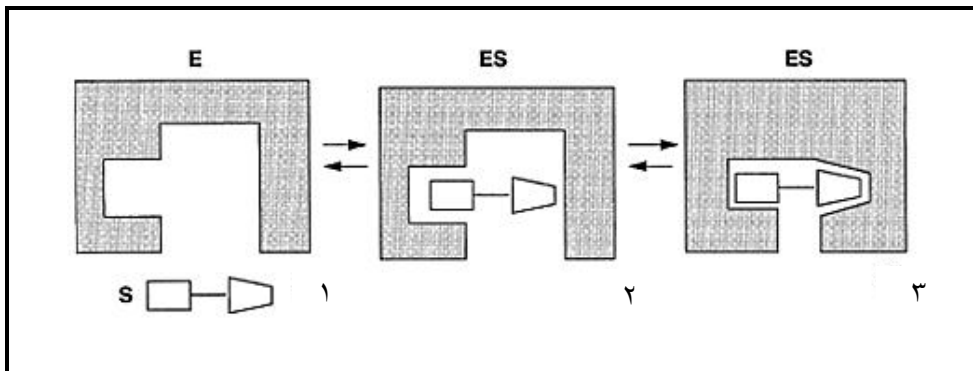
إن المناقشة السابقة والبيانات التجريبية لا تفسّر بصورة جيدة النماذج التي تفترض أن الحالة الطبيعية للمادة الخاضعة والموقع النشط في الإنزيم يكونا صارمين (غير مرنين) للتغير في البنية الفراغية مثل نموذج القفل والمفتاح التي أفترضت في البداية. ومن ثم فإنه يكون مطلوباً نماذج التي تأخذ في الإعتبار مرونة التغير في البنية الفراغية والتطابق الفعّال (الكمالي) بين الموقع النشط- الحالة الإنتقالية. وفي الوقت الحالي توجد ثلاثة نماذج التي تتعلق بهذا التصور وهي:

- (١) نموذج التطابق المستحث induced fit model  
 (٢) نموذج الارتباط غير المنتج nonproductive binding model  
 (٣) نموذج الإجهاد (التوتر) المستحث induced-strain model

١- نموذج التطابق المستحث **Induced fit model**. اقترح بواسطة دانييل كوشلاند (1958) Danil Koshland. في هذا النموذج افترض أن الموقع النشط للإنزيم يكون مرناً من ناحية البنية الفراغية. ففي غياب المادة الخاضعة فإن الموقع النشط لا يكون في بنية فراغية التي تدعم الحفز وعندما ترتبط المادة الخاضعة الجيدة (الصحيحة) بالموقع النشط، فإن قوى الربط بين الإنزيم والمادة الخاضعة تستخدم في دفع بنية فراغية نشطة حفزياً. وهذا التغير في البنية الفراغية يحول الإنزيم إلى تركيب جديد الذي تكون فيه مجموعات الحفز على الإنزيم والمجموعات المتفاعلة في المادة الخاضعة منتظمة (في حالة تماس وبالتوجيه المناسب) لإحداث التفاعل. وشكل ٨-١٧ يمثل أحد الصور التوضيحية لنموذج التطابق المستحث. في هذا النموذج فإن المادة الخاضعة الرديئة (الزائفة) تفتقر إلى السمات التركيبية الضرورية التي تحدث تغير البنية الفراغية المطلوبة للنشاط الحفزي، ومن ثم لا تخضع للتفاعل. والنتيجة المتوقعة من نموذج التطابق المستحث هو أن  $V_{max}$  تكون مثلي لمواد خاضعة خاصة التي يمكن أن تستخدم تأثيرات الارتباط أفضل لإحداث تنشيط، للبنية الفراغية لجزئ الإنزيم.

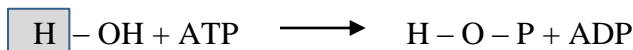
أحد الأمثلة التي يمكن أن تستخدم في توضيح نموذج التطابق المستحث هو إنزيم هكسوكيناز hexokinase الذي يحفز نقل مجموعة الفوسفات من ATP إلى مجموعة الهيدروكسيل على ذرة الكربون السادسة في الجلوكوز:





شكل ٨-١٧ نموذج التطابق المستحث للتأثير المتبادل للإنزيم- المادة الخاضعة والحفز. (١) الإنزيم الحر والمادة الخاضعة في المحلول (٢) ارتباط أولى يشمل تكوين المعقد ES بدون تشوه في المادة الخاضعة (٣) يدخل الإنزيم في تغير البنية الفراغية لإحداث ارتباط أفضل مع المادة الخاضعة (تطابق مستحث).

من الناحية الكيميائية فإن مجموعة الهيدروكسيل في الماء (H-OH) تماثل في نشاطها مجموعة الهيدروكسيل في الجلوكوز، والاختلاف بينهما أن الجلوكوز يحتوي على أجزاء تركيبية مرتبطة ب-OH- أكثر تعقيداً عن الماء.



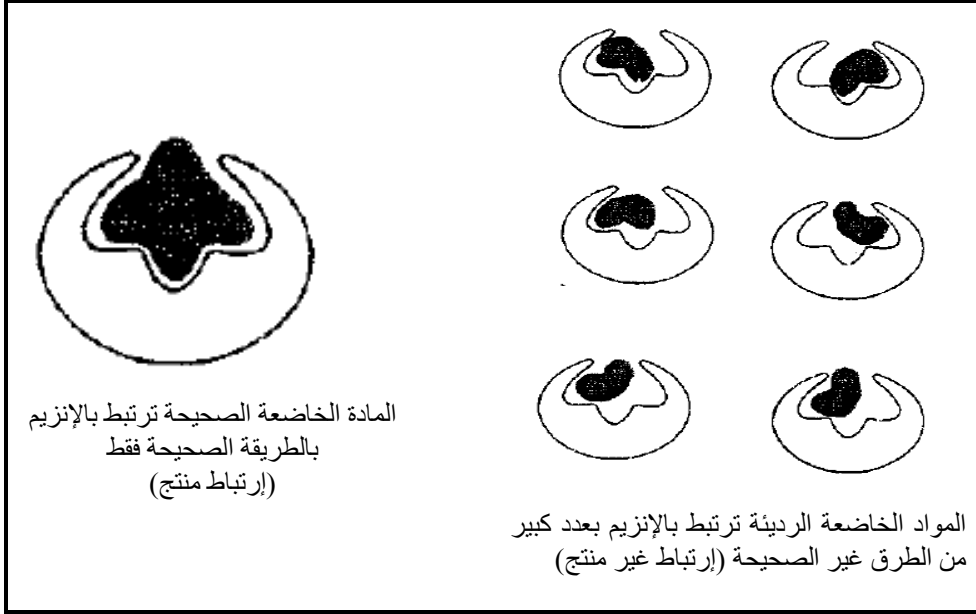
وبالرغم من أن المجموعات المتفاعلة في الماء والجلوكوز (OH-) متماثلة كيميائياً، فإن هكسوكينيز يحفز نقل مجموعة الفوسفات من ATP إلى الجلوكوز أسرع بحوالي  $10^5$  مرة عن نقل الفوسفات إلى الماء\*. إن نموذج التطابق المستحث يبرهن هنا أن باقي جزئ الجلوكوز المرتبط ب-OH- يكون ضرورياً لإستحداث تغير البنية الفراغية للإنزيم ليصبح حفاز كفؤ. وبالرغم من أن جزئ الجلوكوز بدون المجموعة المتفاعلة OH- (الذي يشار إليه باللاحقة أو الجزء الثانوي) لا يشتمل مباشرة في التفاعل الكيميائي، فإنه يشارك في التفاعل المحفز بالإنزيم بإحداث التغير المطلوب للحفز في البنية الفراغية للإنزيم. وحيث أن الماء لا يحتوي على هذه اللاحقة الإضافية، فإنه يكون غير قادر على إحداث التغير

\* لحسن الحظ أن الماء ليس مادة خاضعة جيدة لإنزيم هكسوكينيز، وإلا فإن التحلل المائي سوف يبدد ATP في الخلايا.



في البنية الفراغية للإنزيم، ولذلك يكون مادة خاضعة زائفة لهذا الإنزيم. إن نموذج التطابق المستحث يريد أن يقول أن البنية الفراغية غير النشطة للإنزيم تكون أقل نشاطاً بـ  $10^5$  مرة لـ ATP عن الإنزيم في البنية الفراغية النشطة.

٢- نموذج الارتباط غير المنتج **non-productive binding model**: في هذا النموذج يفترض أن الموقع النشط للإنزيم يكون صارم (غير مرن) rigid والمادة الخاضعة الجيدة (الصحيحة) هي تلك التي تحتوي على عدة سمات (مجموعات) تركيبية كل منها يكون متتام (متكم) complementary مع موقع فرعي subsite خلال تركيب الموقع النشط. ونظراً لوجود مواقع فرعية متعددة متتامة للتأثير المتبادل، فإنه يوجد فقط بنية فراغية نشطة واحدة وتوجيه واحد للمادة الخاضعة في الموقع النشط للإنزيم؛ والتركيبات والتوجيهات (الإتجاهات) قد تؤدي إلى ارتباط أنواع أخرى من المواد غير النشطة (الزائفة) التي لا تؤدي إلى إعطاء ناتج التفاعل بعملية الحفز. والمادة الخاضعة الرديئة (الزائفة) في هذا النموذج ربما تفتقد واحد أو أكثر من المجموعات الوظيفية (الفعالة) الأساسية المطلوبة للارتباط الصحيح، أو أن المجموعة الوظيفية ربما توجد في المادة الرديئة ولا كنها تنظم بنمط لا يكون مناسباً للارتباط الصحيح في الموقع النشط للإنزيم كما هو موضح في شكل ٨-١٨. والنتيجة المتوقعة من هذا النموذج أن  $V_{max}$  للمادة الخاضعة الزائفة تنخفض بدرجة كبيرة لأن جزءاً صغيراً من المادة الخاضعة الزائفة التي قد ترتبط بالمصادفة في النسق المنتج- قد تؤدي إلى نشاط حفزي. إن نموذج الارتباط غير المنتج كثيراً ما يستشهد به لتفسير ظاهرة التثبيط بالمادة الخاضعة عند التركيز العالي من المادة الخاضعة (فصل ٦).

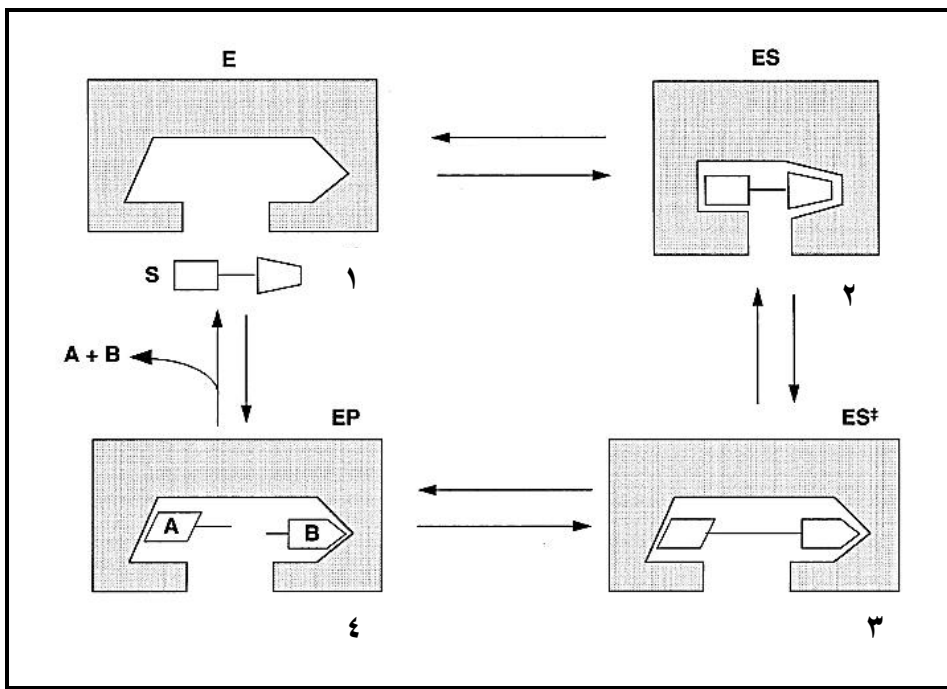


شكل ٨-١٨ مخطط توضيحي لنموذج الارتباط غير المنتج. في هذا النموذج فإن المادة الخاضعة الجيدة (الصحيحة) تحتوي على مجموعات خاصة التي تشغل المواقع الفرعية في الموقع النشط للإنزيم التي ينتج عنها توجيه ارتباط منتج فردي الذي يُيسر الحفز. المادة الخاضعة الرديئة (الزائفة) هي التي تفقد المجموعات الوظيفية (الفعالة) التي تساعد في التوجيه المناسب للمادة الخاضعة في الموقع النشط للإنزيم. ومن ثم فإن المادة الخاضعة الرديئة يمكن أن ترتبط بعدد من التوجيهات، جزء صغير منها يؤدي إلى الحفز. وتوجيهات الارتباط غير المنتج الأخرى تكون مثبطات للحفز.

٣- نموذج الإجهاد (التوتر) المستحث **induced-strain model**: في هذا النموذج فإن قوى الارتباط بين الإنزيم والمادة الخاضعة تستخدم مباشرة في إحداث إجهاد (توتر) strain في جزئ المادة الخاضعة وتشويهه في اتجاه تركيب الحالة الانتقالية الذي تيسر التفاعل. في هذا النموذج يفترض أن يكون الموقع النشط للإنزيم مرناً. إن البنية الفراغية الأكثر ثباتاً (الأقل طاقة) للموقع النشط هي تلك التي لا تتطابق مثاليًا مع البنية الفراغية للحالة الأرضية (الطبيعية أو الدركية) للمادة الخاضعة، ولكن بدلاً من ذلك، فإنها تنتمي (التطابق) complementary مع الحالة الانتقالية للتفاعل. ولكي ترتبط الحالة الأرضية ground state (الطبيعية) للمادة الخاضعة، فإن الإنزيم يجب أن يحدث له تشوه في البنية الفراغية التي تكون غير مواتية من ناحية الطاقة. ومن ثم فإنه في المعقد ES توجد

قوة دفع لجزئ الإنزيم أن يعود إلى البنية الفراغية الأصلية الأقل في الطاقة، وهذا سوف يصاحبه تشوه في جزئ المادة الخاضعة الذي يجلبه إلى تركيب الحالة الانتقالية التي تكون متتامة مع البنية الفراغية الأقل في الطاقة للموقع النشط (شكل ٨-١٩). والنظرة العاجلة توحي أن هذا النموذج يماثل نموذج التطابق- المستحث، الذي فيه تستخدم طاقة الربط لجلب المجموعات النشطة خلال الموقع النشط إلى الاتساق (الإنظام) المناسب بالنسبة للمادة الخاضعة الجيدة الذي يوفر التخصص للمادة الخاضعة. بالمقارنة، فإن نموذج الإجهاد المستحث تستخدم طاقة الربط مباشرة لخفض الطاقة الحرة للتنشيط للتفاعل بإزدواج تشوه المادة الخاضعة مع استرخاء البنية الفراغية المواتية لجزئ الإنزيم.

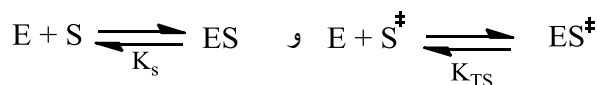
التأثيرات الفراغية (المجسمة) steric effect (أى التأثيرات الناتجة عن التغير في البنية الفراغية) ليست هى الآلية الوحيدة لإحداث الإجهاد. فالتأثيرات الكهربائية الساكنة electrostatic effects يمكن أيضاً أن تحدث إجهاد للروابط في الحالة الأرضية لجزئ المادة الخاضعة الذي يزال في اتجاه تركيب الحالة الانتقالية. ولتوضيح هذه الفكرة دعنا نأخذ مثال. فالسلسلة الجانبية لحمض أميني التي تحمل شحنة سالبة التي توجد في موقع نشط للإنزيم نافرة للماء يكون لها تأثير إستقطابي قوى الذي لا يكون مواتي للإرتباط بالحالة الأرضية لمادة خاضعة غير مشحونة. ولكن إذا كانت الحالة الانتقالية تشتمل على تكوين مركز كاتيوني (أى يحمل شحنة موجبة)، فإن الأيون المقابل السالب يمكن الآن أن يوفر تأثيرات متبادلة. وهذا التحرر للحالة الأرضية غير المستقرة يمكن أن يستخدم بفاعلية كقوة دفع في اتجاه تكوين الحالة الانتقالية. وبالمثل فإن الإرتباط الهيدروجيني والتأثيرات النافرة للماء Hydrophobic interaction والتأثيرات غير التساهمية الأخرى يمكن أن تحدث إجهاد في البنية الفراغية للمادة الخاضعة في حالتها الأرضية.



شكل ٨-١٩ مخطط إيضاحي لنموذج الإجهاد- المستحث: الإنزيم الحر في المحلول (١) في حالة البنية الفراغية الأقل في الطاقة الذي يكون أكثر تنمة لتكوين الحالة الانتقالية للمادة الخاضعة. عند ارتباط المادة الخاضعة (٢) فإن الإنزيم يخضع لإنتقال في البنية الفراغية ليتعشق مع المادة الخاضعة. والإجهاد المستحث في البنية الفراغية في (٢) يُحرر بتكوين الحالة الانتقالية المرتبطة في (٣). والحفز بعدئذ يؤدي إلى تكوين معقد الإنزيم- المنتج (٤). قبل تحرير المنتج وإعادة إنتاج الإنزيم الحر.

#### ٨-٤-٥ إعادة تنظيم الموقع النشط للتطابق مع تركيب الحالة الانتقالية

الآلية البديلة لنموذج تشوه البنية الفراغية هي تلك التي تفترض أن البنية الفراغية للموقع النشط تكون غير مرنة لحد ما ويعاد تنظيمها لتتطابق مثالياً مع البنية الفراغية للحالة الانتقالية للمادة الخاضعة. وهذا قد يذكرنا لحد ما بنموذج القفل والمفتاح لفischer، ولكن هنا فإن التطابق يكون مع الحالة الانتقالية وليس مع الحالة الأرضية. ومن المناقشة السابقة فقد اتضح أن الإنزيمات ترتبط بالحالة الانتقالية أفضل من الارتباط بالحالة الأرضية:

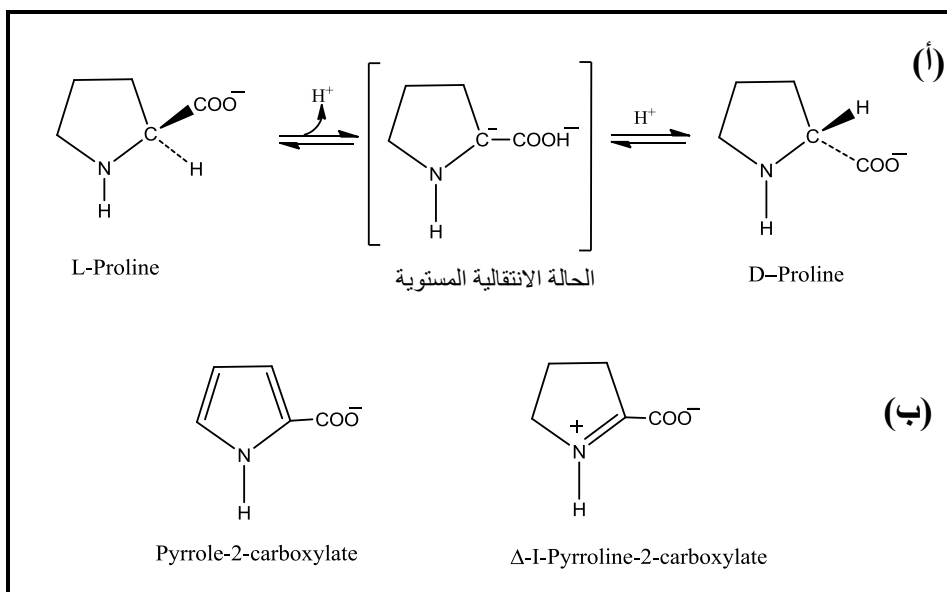


ومن الواضح أن  $K_{Ts}$  (ثابت التفكك للمعقد  $ES^\ddagger$ ) يكون نموذجياً أصغر كثيراً عن  $K_s$  (ثابت التفكك للمعقد  $ES$ ). وتوجد طريقتين لتفسير الاختلاف بين طاقة الارتباط بين كل من  $S$ ,  $S^\ddagger$  بالإنزيم.

● الأولى: ربما يوجد تأثير متبادل قوى بين الإنزيم والبنية الفراغية للحالة الانتقالية للمادة الخاضعة، الذي يشير أن الإنزيمات ترتبط بالحالة الانتقالية أفضل من ارتباطها بالمادة الخاضعة. والإنزيمات التي ترتبط بأفضلية بتركيب الحالة الانتقالية تزيد من تركيزها ومن ثم تزيد تناسباً معدل التفاعل. وتوجد أدلة تجريبية من بعض الإنزيمات التي تشير إلى ارتباط قوى بين الإنزيم ومناظرات الحالة الانتقالية. فعلى سبيل المثال فإن التفاعل الذي يحفز بإنزيم Prolin racemase يعتقد أنه يحدث خلال حالة انتقالية مستوية planer (شكل ٨-٢٠). ولقد وجد أن الإنزيم يثبط بواسطة مناظرات مستوية للبرولين وهما pyrrole-2-carboxylate و  $\Delta$ -1-pyrroline-2-carboxylate (شكل ٨-٢٠ ب). ووجد أن كلا المركبين يرتبطان بالإنزيم بألفة أكبر 160 مرة عن المادة الخاضعة L-proline. وقد تم وصف مئات من مناظرات الحالة الانتقالية لإنزيمات مختلفة، بعضها مضادات حيوية توجد طبيعياً، والبعض الآخر قد صمم لدراسة آليات عمل إنزيمات خاصة أو العمل كمثبطات لإنزيمات خاصة للاستخدام في الأغراض العلاجية أو الزراعية.

● الثانية: الاحتمال الثاني لتفسير الاختلاف في الطاقة الحرة للربط بين  $S$ ,  $S^\ddagger$  والإنزيم هو أن طاقة التأثير المتبادل بين المذيب والحالة الانتقالية  $S^\ddagger$  يكون أقل موالية كثيراً عن تلك الخاصة بالمذيب والحالة الأرضية للمادة الخاضعة  $S$ . ومن ثم فإنه في المحلول يتطلب بلوغ الحالة الانتقالية التغلب على حاجز طاقة حرة كبير نتيجة لتأثيرات الذوبانية للمادة الخاضعة في الحالة الأرضية. وبكلمات أخرى فإنه في هذه الحالة تكون التأثيرات المتبادلة بين الإنزيم و  $S^\ddagger$  بالنسبة لـ  $S$  ليست هي القوة الدافعة الرئيسية لتثبيت (استقرار) الحالة الانتقالية، بدلاً من ذلك فإن إزالة  $S$  من المحلول، يقوم الإنزيم بتفادي جزءاً كبيراً من الحاجز المرتبط بالذوبانية لتكوين  $S^\ddagger$ . وفي هذا

النموذج، فإن الإنزيم لا يقوم بتثبيت الحالة الانتقالية إلى حد بعيد مثلما يفادي تأثير عدم الاستقرار بالمذيب خلال عزل المادة الخاضعة، ويقترح أن كلا الاحتمالين (١) زيادة المعدل نتيجة لتثبيت  $S^{\ddagger}$  بالتأثيرات المتبادلة بين الإنزيم و  $S^{\ddagger}$  (٢) زيادة المعدل نتيجة لعزل المادة الخاضعة عن المحلول يحدثان في الحفز الإنزيمي، ولكن يبدو أن العامل الثاني له تأثير أكبر.



شكل ٨-٢٠ (أ) تفاعل إنزيم Proline racemase الذي يشمل على حالة انتقالية مستوية (ب) مناظرات الحالة الانتقالية

في هذا الفصل ناقشنا عدة خطط متنوعة التي يمكن أن يقوم بها الإنزيم لتثبيت الحالة الانتقالية ومن ثم زيادة المعدل. فأى من هذه الخطط تلعب دوراً حاسماً في الحفز الإنزيمي. والإجابة الأكثر احتمالية هو أن كل هذه الخطط (الآليات) تستخدم بدرجات مختلفة بواسطة الإنزيمات المختلفة للوصول إلى تثبيت الحالة الانتقالية. والنقطة المهمة التي يمكن إستخلاصها من هذه المناقشة هو أن المواقع النشطة في الإنزيمات قد صممت لترتبط بأفضلية وتثبيت الحالة الانتقالية. وخلال الارتباط الإنتقائي وتثبيت الحالة

الانتقالية، فإن الإنزيم يوفر مسار تفاعل الذي يكون أكثر مواتية من ناحية الطاقة عن أى مسار آخر الذي يمكن الوصول إليه في غياب الإنزيم.

### ٨-٥ إنزيمات السيرين لتحلل البروتين: مثال يوضح الآلية والتخصص في الإنزيمات

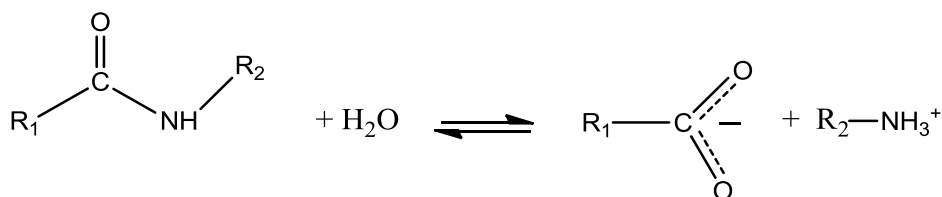
إنزيمات تحلل البروتين المعتمدة على السيرين (أو إنزيمات السيرين لتحلل البروتيني Serine proteases) هي عائلة من الإنزيمات- مع عائلات أخرى- التي تحفز شطر (تفكك) روابط ببتيدية خاصة في البروتينات والببتيدات. وإنزيمات السيرين لتحلل البروتين لها آلية عامة للحفز التي تحتاج إلى مجموعة من ثلاثة أحماض أمينية في الموقع النشط للإنزيم تشمل بواقي السيرين، ومن ثم أعطي الاسم لهذه العائلة. وهذه المجموعة من الإنزيمات رغم أن لها آلية حفز عامة، فإنها تختلف في تخصصها بالنسبة لنوع الأحماض الأمينية في الجانب الكربوكسيلي والجانب الأميني للرابطة الببتيدية التي تشطر. وهذه الإنزيمات تعتبر مهمة في الكائنات الحية، فالبروتينات التي أدت أغراضها يجب تفكيكها حيث يمكن إعادة استخدام مكوناتها من الأحماض الأمينية لاصطناع بروتينات جديدة. والبروتينات المتناولة في الطعام يجب تفكيكها إلى ببتيدات صغيرة وأحماض أمينية حتى يمكن امتصاصها في القناة الهضمية. ورغم أن أفراد هذه العائلة كانت في البداية إنزيمات هضم. فإننا نعرف الآن أن أنزيمات تحلل البروتين المعتمدة على السيرين تقوم بأنواع واسعة من الوظائف الحفزية في معظم الكائنات من البكتريا إلى الثدييات العليا. فعلي سبيل المثال، فإن هذه الإنزيمات لها دور ليس فقط في عمليات الهضم ولكن أيضاً في سلسلة تجلط الدم، الإلتهاب، التئام الجروح، الاستجابة المناعية وغيرهم من الأحداث الفسيولوجية المهمة.

ونظراً لسهولة عزل هذه الإنزيمات والحصول على كميات كبيرة من العصارة المعدية من الحيوانات الكبيرة، فإن إنزيمات تحلل البروتين المعتمدة على السيرين هي من بين الإنزيمات الأولى التي تم دراستها. ومن دراستها باستخدام التصوير البللوري، والكيمياء الحيوية التقليدية ودراسة الآليات الحفزية والتطهير الموجه الموقع توفر عن هذه الإنزيمات

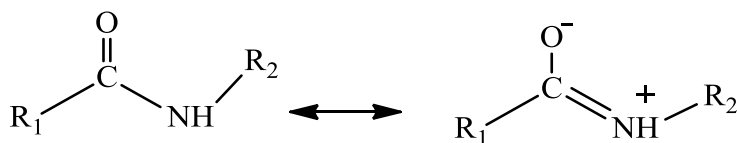
معلومات غزيرة عن تركيبها وآلية عملها. ونظراً للمعلومات الوفيرة، فإن إنزيمات تحلل البروتين المعتمدة على السيرين تمثل نموذج لمناقشة مفاهيم الارتباط المتخصص للمادة الخاضعة وتثبيت الحالة الانتقالية.

### ٨-٥-١ إنزيمات تحلل البروتين تيسر تفكك الروابط الببتيدية

إنزيمات تحلل البروتين المعتمدة على السيرين (مثل الكيموتريسين chymotrypsin وتريسين trypsin وإلاستيز elastase) وإنزيمات تحلل البروتين Proteases الأخرى تفكك البروتينات بتفاعل تحلل مائي - أى إضافة جزئ ماء للرابطة الببتيدية:



وبالرغم من أن التحلل المائي للروابط الببتيدية يعتبر موات من ناحية الحركة الحرارية ( $\Delta G$  سالبة)، فإن تفاعلات التحلل هذه تكون بطيئة جداً. ففي غياب الإنزيم فإن فترة نصف العمر ( $t_{1/2}$ ) لتحلل الرابطة الببتيدية النموذجية عند الـ pH المتعادلة قدرت ما بين 10 و 1000 عام. ويرجع الثبات الحركي للرابطة الببتيدية إلى التركيب الرنيني الذي يضيف على الرابطة الببتيدية خواص جزئية للرابطة المزدوجة (قسم ٤-٢).



إن الرابطة C - N تقوى بخواصها الجزئية للرابطة المزدوجة، وذرة الكربون الكربونيلية تكون أقل في الشحنة الموجبة وتكون أقل تأثراً بالمهاجمة بالمجموعات المحبة للشحنة



الموجبة. ولذلك فإنه لتعزيز شطر الرابطة الببتيدية، فإن إنزيم التحلل البروتيني يجب أن يسهل المهاجمة بالمجموعة المحبة الشحنة الموجبة عند مجموعة الكربونيل غير النشطة طبيعياً.

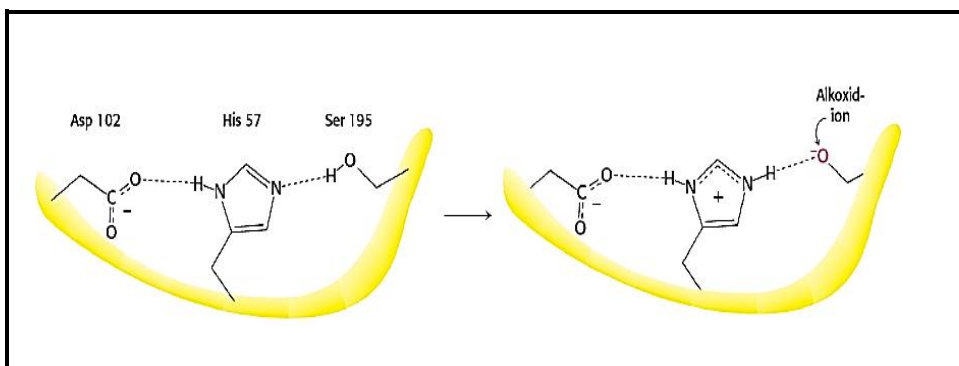
### ٨-٥-٢ آلية حفز تفكك الرابطة الببتيدية بإنزيم الكيموتريسين

كل إنزيمات السيرين المحللة للبروتين لها آلية عامة في الحفز التي تتطلب مجموعة من ثلاثة أحماض أمينية في المواقع النشطة لهذه الإنزيمات؛ باقي حمض السيرين (الذي اشتق منه اسم هذه العائلة من الإنزيمات) الذي يعمل كمجموعة أولية محبة للشحنة الموجبة التي تهاجم الرابطة الببتيدية، والكفاءة المحبة للشحنة الموجبة لهذه المجموعة تعزز (تزيد) بالتفاعل مع السلسلة الجانبية للهستيدين (حفز عام حمض/ قاعدة)، الذي بدوره يتفاعل مع السلسلة الجانبية للأسبارتات. برغم اختلافات إنزيمات السيرين في التركيب الثانوي والتركيب الثالث للبروتين بدرجة كبيرة، فإن الموقع النشط لهذه الإنزيمات يحتفظ بالسيرين والهستيدين والأسبارتات في الموقع النشط وتستخدم آلية حفز عامة.

أحد إنزيمات تحلل البروتين المعتمد على السيرين هو إنزيم كيموتريسين Chymotrypsin الذي يفكك الروابط الببتيدية إنتقائياً على جانب الطرف الكربوكسيلي للأحماض الأمينية الكبيرة النافرة للماء مثل تربتوفان، تيروزين، فينيل آلانين والمثيونين. والكيموتريسين هو مثال جيد لإستخدام التحوير التساهمي كآلية للحفز الإنزيمي. فالإنزيم يستخدم مجموعة محبة للشحنة الموجبة nucleophile قوية لمهاجمة مجموعة الكربونيل غير النشطة في الرابطة الببتيدية. وهذه المجموعة المحبة للشحنة الموجبة في الإنزيم ترتبط تساهماً مع المادة الخاضعة لفترة قصيرة أثناء تقدم الحفز.

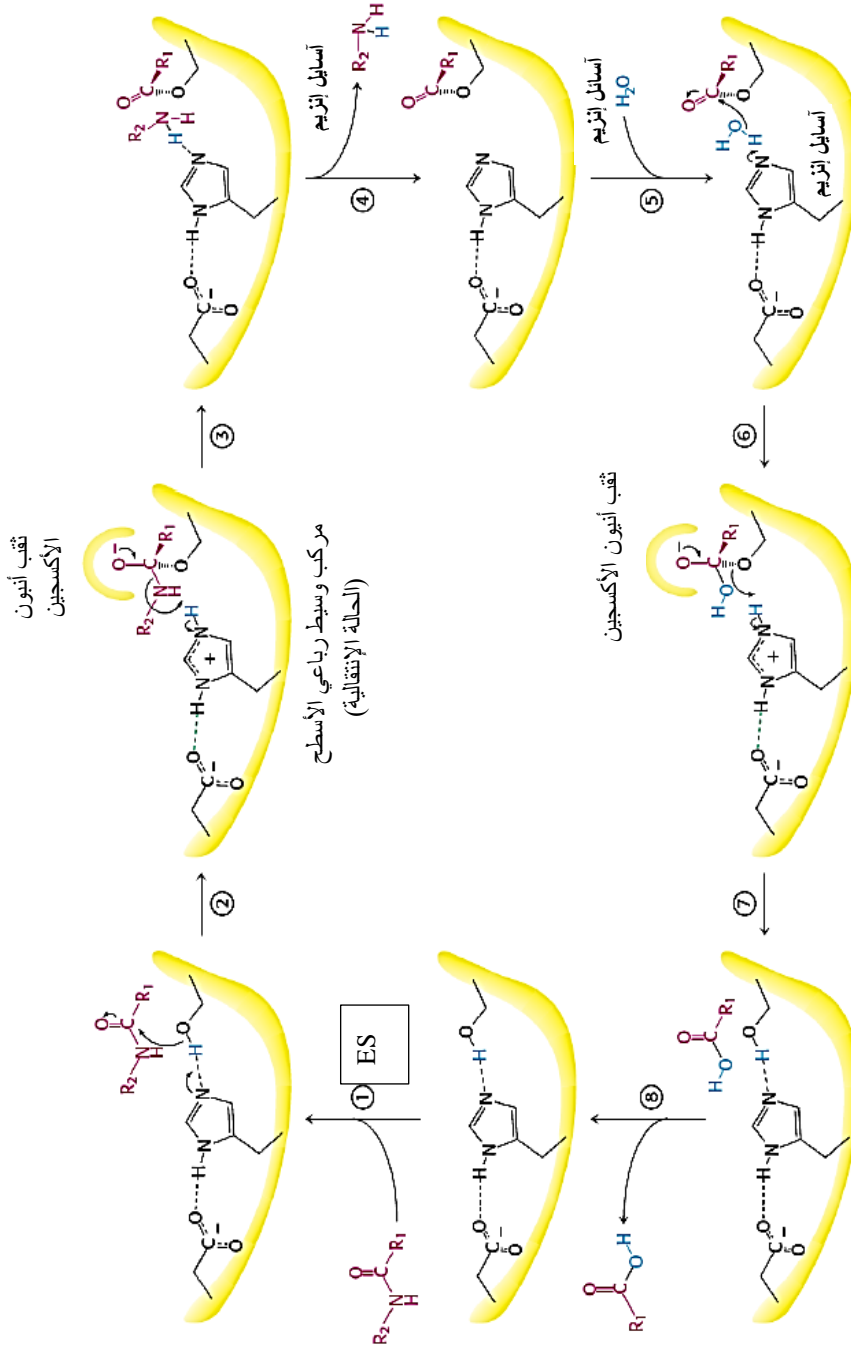
التحليل التركيبي للكيموتريسين chymotrypsin (أحد إنزيمات السيرين للتحلل البروتيني) أظهر الأساسي الكيميائي للسيرين 195 (Ser 195) في الموقع النشط (شكل ٨-٢١). فالسلسلة الجانبية للسيرين 195 ترتبط برابطة هيدروجينية مع حلقة الإيميدازول للهستيدين 57 (His 57). ومجموعة -NH في حلقة الإيميدازول هذه بدورها تكون رابطة هيدروجينية مع مجموعة الكربوكسيلات في الأسبارتات (Asp 102). وهذه المجموعة

المؤلفة من بواقي الأحماض الأمينية يطلق عليها الحفز الثلاثي catalytic triad. كيف لهذا التنظيم لبواقي الأحماض الأمينية أن يؤدي إلى تفاعلية عالية لـ Ser 195. فسحب البروتون من His 57 بواسطة Asp 102 يجعل من السهل لـ His 57 من إزالة البروتون من Ser 195 الذي يؤدي إلى أيون ألكوكسيد alkoxide ion الذي يكون محب للشحنة الموجبة قوى عن الكحول.



شكل ٨-٢١ الحفز الثلاثي catalytic triad. مجموعة الحفز الثلاثي على الشمال تحول Ser 195 إلى مجموعة محبة للشحنة الموجبة فعالة (قوية) وهو أيون ألكوكسيد alkoxide ion كما هو موضح على اليمين.

وهذه المشاهدات تقترح الآلية التي يتم بها التحلل المائي للرابطة الببتيدية (شكل ٨-٢٢) فبعد تكون المعقد ES (الخطوة 1)، يبدأ التفاعل بمهاجمة مجموعة الهيدروكسيل النشطة في السيرين 195 ذرة الكربون الكربونيلية في المادة الخاضعة ويكون مركب وسيط رباعي السطوح (الخطوة 2) مع الشحنة السالبة الأساسية توجد على ذرة الأكسجين المشتقة من مجموعة الكربونيل الذي يماثل الحالة الانتقالية للتفاعل. وهذه الشحنة تثبت بواسطة مجموعات NH من بروتين الإنزيم في مكان في الموقع النشط يعرف بثقب أنيون الأكسجين oxyanion hole. والمركب الوسيط رباعي السطوح (الحالة الانتقالية) ينحل ليعطي إنزيم - أسايل (الخطوة 3).



شكل ٢٢-٨ التحلل المائي لرابطة الببتيد بواسطة إنزيم الكيموترينسين. آلية التحلل المائي للببتيد توضح أساس الحفز التساهمي والحفز الحامضي/القاعدي. الخطوط المتقطعة تشير إلى التأثيرات المتبادلة بين الأسبارات سالب الشحنة والمهثديين موجب الشحنة الذي يجعل المهثديين قاعدة قوية.

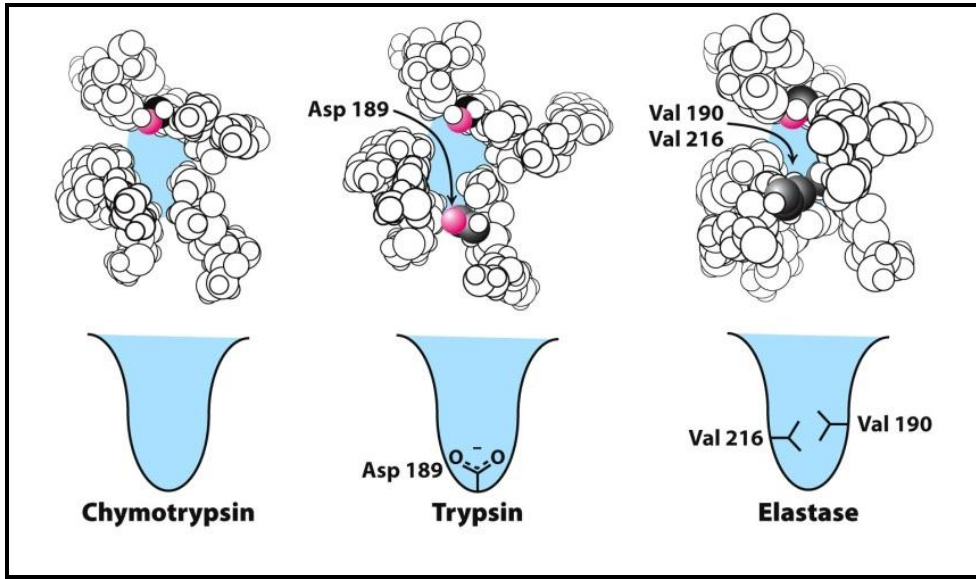
وهذه الخطوة تيسر بنقل بروتون من الهستيدين إلى مجموعة الأمينو المتكونة من شطر الرابطة الببتيدية. والعنصر الأميني يكون الآن حر ليغادر الإنزيم (الخطوة 4) ويستبدل بجزئ الماء (الخطوة 5). ومجموعة الأستر في الإنزيم- أسايل تتحلل مائياً بعملية التي تكون أساساً إعادة للخطوات من 2 إلى 4. إن جزئ الماء يهاجم مجموعة الكربونيل بينما يصاحب ذلك إزالة بروتون بواسطة باقي الهستيدين، الذي يعمل الآن كحفاز حامضي عام، مكوناً مركب وسيط رباعي السطوح (الخطوة 6). وهذا المركب يتفكك ليعطي حمض كربوكسيلي (الخطوة 7). وأخيراً فإن تحرر الحمض الكربوكسيلي (خطوة 8) يجهز الإنزيم لدورة ثانية من الحفز.

### ٨-٥-٣ تخصص إنزيم الكيموتريسين

إن آلية الحفز التي نوقشت تصف كل خصائص فاعلية إنزيم الكيموتريسين فيما عدا الأفضلية المشاهدة لشطر الروابط الببتيدية على جانب الطرف الكربوكسيلي للأحماض الأمينية التي لها سلاسل جانبية نافرة للماء hydrophobic. إن فحص التركيب ثلاثي الأبعاد للكيموتريسين مع مناظرات المادة الخاضعة substrate analogs ومثبطات الإنزيم أوضحت وجود جيب نافر للماء نسبياً يطلق عليه الجيب  $S_1$  ( $S_1$  pocket)، الذي يمكن أن تنطبق فيه السلاسل الجانبية غير المشحونة لبواقي الأحماض الأمينية مثل فينيل آلانين والتريبتوفان. وارتباط السلاسل الجانبية لسلاسل عديد الببتيد في هذا الجيب يضع الرابطة الببتيدية المجاورة في الموقع النشط للإنزيم لشطرها (شكل ٨-٢٣). وتخصص الكيموتريسين يعتمد كلية تقريباً على أى من الأحماض الأمينية يكون مباشرة على جانب الطرف الأميني للرابطة الببتيدية التي تشطر.

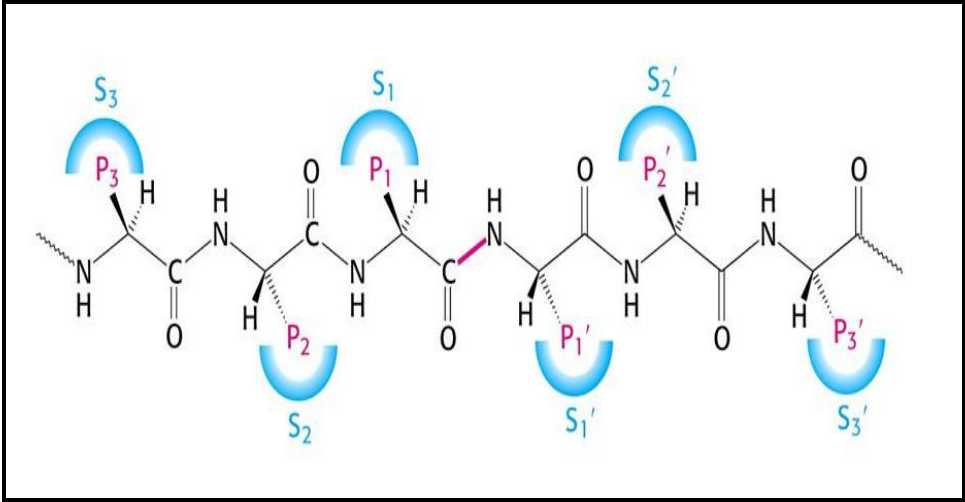
عديد من إنزيمات تحلل البروتين المعتمدة على السيرين وجدت أنها تحتوي على الحفز الثلاثي مثل الكيموتريسين. البعض مثل تريسين trypsin وإلاستيز elastase هما متناظرات للكيموتريسين. وتسلسل هذه البروتينات يماثل بحوالي ٤٠% للكيموتريسين وتركيبها الإجمالي تقريباً متماثل ولها نفس آلية الحفز مثل الكيموتريسين. مع ذلك، لهما تخصص مختلف للمواد الخاضعة. فالتريسين يشطر عند الرابطة الببتيدية بعد بواقي

سلاسل جانبية طويلة موجبة الشحنة - مثل أرجنين Arg ولايسين Lys- بينما إلاستيز بشطر عند الرابطة الببتيدية بعد أحماض أمينية لها سلاسل جانبية قصيرة- مثل- ألانين وسيرين (شكل ٨-٢٣). ومقارنة الجيب  $S_1$  لهذه الإنزيمات يظهر أساس التخصص. ففي تريسين يوجد باقي أسبارتات (Asp 189) في قاع الجيب  $S_1$  بدلاً من باقي سيرين Ser في كيموترسين. فباقي الأسبارتات يجذب ويثبت الأرجنين موجب الشحنة أو باقي اللايسين موجب الشحنة في المادة الخاضعة. وفي إلاستيز، فإن إثنين من البواقي عند قمة الجيب في الكيموترسين والتريسين يستبدلان بفالين (Val 190 و Val 216) وهذين الباقيين يغلقا فوهة الجيب بحيث يمكن فقط دخول السلاسل الجانبية الصغيرة.



شكل (٨-٢٣) جيوب التخصص ( $S_1$  pockets) في ثلاثة من إنزيمات التحلل البروتيني المعتمدة على السيرين، كيموترسين، تريسين وإلاستيز. بعض بواقي الأحماض الأمينية في الجيوب تلعب الدور الأساسي في تخصص هذه الإنزيمات

بعض إنزيمات تحلل البروتين الأخرى لها أنماط تخصص معقدة. ومثل هذه الإنزيمات تحتوي على جيوب إضافية على السطح للتعرف على بواقي أخرى في المادة الخاضعة. فالبواقي على جانب مجموعة الأمينو الطرفية من الرابطة القابلة للإنشطار (الرابطة التي سوف تفكك) تميز بـ  $P_1$ ,  $P_2$ ,  $P_3$  وهكذا، الذي يشير إلى مواقعها بالنسبة للرابطة القابلة للشطر. وبالمثل فإن البواقي على الجانب الكربوكسيلي للرابطة القابلة للشطر تميز بـ  $P_1'$ ,  $P_2'$ ,  $P_3'$  وهكذا. والمواقع المقابلة على الإنزيم يشار إليها بـ  $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_3$  و  $S_1'$ ,  $S_2'$ ,  $S_3'$  وهكذا (شكل ٨-٢٤).

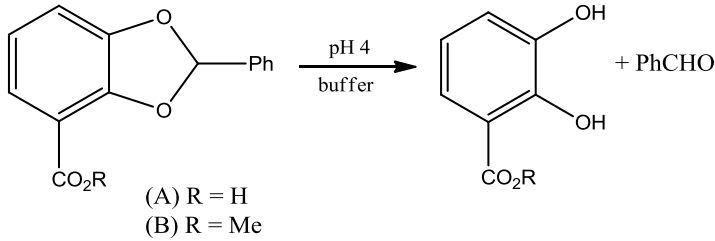


شكل ٨-٢٤ مصطلحات التخصص للتأثيرات المتبادلة بين إنزيمات تحلل البروتين- المادة الخاضعة. المواقع الممكنة (المحتملة) للتأثيرات المتبادلة للمادة الخاضعة مع الإنزيم يرمز لها بـ  $P$ ، ومواقع الارتباط المقابلة على الإنزيم يرمز لها بـ  $S$ . الرابطة القابلة للإنشطار  $P_1-P_1'$  هي النقطة المرجعية.

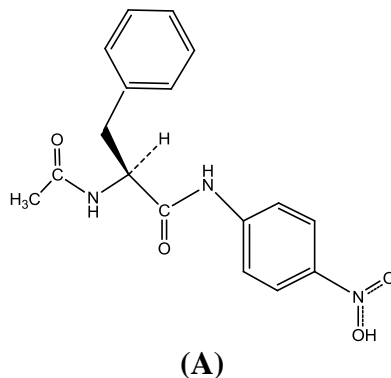
## أسئلة

- ١- ما هي الخصائص التي تميز الإنزيمات عن الحفازات الأخرى؟
- ٢- صف خصائص الموقع النشط في الإنزيم ودوره في عملية التخصص والحفز.

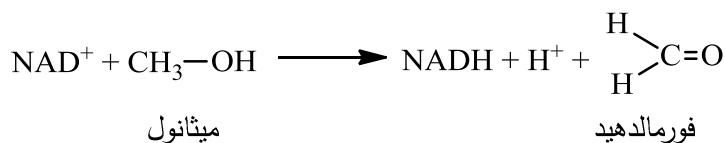
- ٣- إرسم مخطط بياني (أ) تفاعل  $S \rightarrow P$  غير محفز والتفاعل المقابل المحفز إنزيمياً الذي فيه (ب)  $S$  ترتبط بدون إحكام بالإنزيم (ج)  $S$  ترتبط بإحكام بالإنزيم. قارن  $\Delta G^\ddagger$  لكل حالة. لماذا لا يكون الارتباط المحكم لـ  $S$  ليس له ميزة للتفاعل الإنزيمي؟
- ٤- افترض أن طفرة إنزيم ترتبط بالمادة الخاضعة ١٠٠- ضعف بإحكام مقارنة بالإنزيم الطبيعي. ما هو تأثير هذه الطفرة على معدل الحفز إذا لم يتغير ارتباط الحالة الانتقالية؟
- ٥- توجد نظريتين لتفسير تخصص الإنزيمات للمواد الخاضعة. ناقش باختصار هاتين النظريتين على ضوء النظريات الحديثة.
- ٦- فسر لماذا أن التحليل المائي لمستبدلات حمض البنزويك (A) عند pH يكون ١٠٠٠- ضعف أسرع عن استر الميثايل المقابل (B) تحت نفس الظروف.



- ٧- اقترح مناظر للحالة الانتقالية لإنزيم Proline racemase الذي يختلف من تلك التي تم مناقشتها في هذا الفصل.
- ٨- آلية الحفز التساهمي لأحد الإنزيمات تعتمد على باقي Cys فردي في الموقع النشط الذي له  $pK_a$  8 ويعمل طفرة قريبة من باقي Cys، أدت إلى تغيير في البيئة الدقيقة بحيث أن  $pK_a$  زادت إلى 10. هل الطفرة تؤدي إلى زيادة أو انخفاض معدل التفاعل؟ فسر ذلك.
- ٩- الدراسات التي أجريت عند pH مختلفة أظهر أن أحد الإنزيمات يحتوي على اثنين من بواقي الأحماض الأمينية لهما  $pK_a \sim 4$  و  $pK_a \sim 10$ ، وتجارب التحويرات الكيميائية أوضحت أو بواقي Glu و Lys يكونين مهمين للنشاط. ضاهي بين هذين الباقيين و  $pK_a$ 's لهما و اشرح ما إذا كان من المرجح أن يعمل كحفز حامضي أو قاعدي.
- ١٠- فحص شطر المادة الخاضعة صبغة الأميد (A) بواسطة chemotrypsin باستخدام طريقة حركيات السريان المتوقف أظهرت عدم وجود طور متسارع، لماذا؟



- ١١- في إنزيم كيموتريسين شيدت طفرة التي فيها Ser 189 الذي يوجد في قاع تخصص المادة الخاضعة إستبدل ب Asp. ما هو التأثير المتوقع لهذا الطفرة Ser 189 → Asp؟
- ١٢- في إنزيم subtilisin أجريت طفرة بإستبدال Ser 221 ب Ala، أدى إلى انخفاض في النشاط بمقدار  $10^6$  - ضعف. وطفرة استبدال His 64 ب Ala أدت أيضاً إلى انخفاض مماثل  $10^6$  - ضعف. ومن ثم فإن الطفرة المزدوجة المتزامنة لـ Ser 221 إلى Ala و His 64 إلى Ala يجب أن تؤدي إلى  $10^6 \times 10^6 = 10^{12}$  - ضعف انخفاض في النشاط. هل هذا صحيح؟ لماذا ولماذا لا؟
- ١٣- الميثانول يعتبر سام جداً ويؤدي إلى الموت إذا تناول الشخص كمية صغيرة تصل إلى 30 mL. والسمية الحادة لا ترجع إلى الميثانول بذاته، ولكن ترجع إلى الفورمالدهيد الذي ينتج من الميثانول بواسطة إنزيم alcohol dehydrogenase في الكبد



وجزاء من معالجة سمية الميثانول هو إعطاء المصاب كمية مناسبة من الإيثانول عن طريق الفم أو الحقن. إشرح لماذا تكون هذه المعاملة فعالة.





---

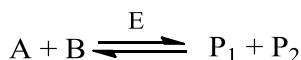
## فصل ٩ التفاعلات الإنزيمية مع مادتين خاضعتين

### Enzyme Reactions with Two Substrates

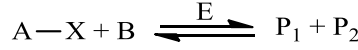
---

|     |                                                                    |
|-----|--------------------------------------------------------------------|
| ١-٩ | تسمية التفاعلات                                                    |
| ٢-٩ | الآليات وحركات الحالة الثابتة للتفاعلات الإنزيمية ثنائي ثنائي      |
| ٣-٩ | التمييز بين آليات التفاعلات الإنزيمية المتعاقبة العشوائية والمنظمة |

حتى الآن قمنا فقط بمناقشة التفاعلات الإنزيمية البسيطة التي تتضمن تحول مادة خاضعة فردية إلى ناتج تفاعل فردي. مع ذلك فإن الجزء الأكبر من التفاعلات الإنزيمية في الأنظمة البيولوجية تشتمل على مادتين خاضعتين على الأقل التي ينتج عنها تكوين أكثر من ناتج. وفي الحقيقة فإن حوالي 60% من التفاعلات الإنزيمية في الأنظمة البيولوجية تشتمل على إثنتين من المواد الخاضعة (A و B) التي ينتج عنها إثنتين من نواتج التفاعل ( $P_1$  و  $P_2$ ).



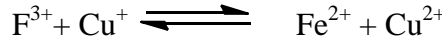
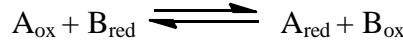
معظم هذه التفاعلات التي يشار إليها بالتفاعلات ثنائية المادة الخاضعة bisubstrate reactions تشتمل على نقل مجموعة وظيفية X (مثل الفوسفوريل أو الأمينو) من أحد المواد الخاضعة إلى مادة خاضعة أخرى:



مثال ذلك نقل مجموعة الفوسفوريل من ATP إلى الجلوكوز بواسطة إنزيم كينيز:



وكذلك فسفرة البروتين بواسطة إنزيمات الكينيز أو تفاعلات الأكسدة والإختزال التي تشتمل على نقل مكافئ إختزالي من أحد المواد الخاضعة إلى مادة خاضعة ثانية مع إنتاج إثنين من النواتج:



مثال ذلك

وهذا الفصل سوف يتعلق بإستخدام حركيات الحالة الثابتة في دراسة هذا النوع من التفاعلات.

## ٩-١ تسمية التفاعل

تم استنباط تسمية عامة لوصف عدد المواد الخاضعة والنواتج المتضمنة في التفاعل الإنزيمي بإستخدام البادئات Prefixes اللاتينية uni (أحادي أو مفرد)؛ bi (ثنائي أو مزدوج) و ter (ثلاثي) وهذا للإشارة إلى عدد الكينونات الكيميائية (المواد الخاضعة والنواتج) في التفاعل الإنزيمي. فعلي سبيل المثال فإن التفاعل الذي يستخدم مادتين خاضعتين وينتج إثنين من النواتج يشار إليه تفاعل ثنائي ثنائي (bi bi reaction)، والتفاعل الذي يستخدم ثلاثة مواد خاضعة لينتج إثنين من النواتج هو تفاعل ثلاثي ثنائي (ter bi reaction) وهكذا (جدول ٩-١).

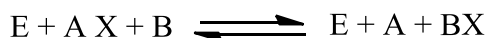
وكل هذه الأنواع تحدث في الأنظمة البيولوجية، إلا أن التفاعلات من النوع ثنائي ثنائي (bi bi) هي الأكثر شيوعاً. ومن ثم فإنه في هذا الفصل سوف تقتصر المناقشة على هذا النوع من التفاعلات (ثنائي ثنائي)، مع ذلك فإن نفس القواعد يمكن أن تطبق على التفاعلات التي تتضمن على أكثر من مادتين خاضعتين ونواتج التفاعل.

جدول ٩-١ التسمية العامة للتفاعلات الإنزيمية

| التفاعل                               | الاسم                 |
|---------------------------------------|-----------------------|
| $A \longrightarrow P$                 | أحادي أحادي (Uni uni) |
| $A + B \longrightarrow P$             | ثنائي أحادي (Bi uni)  |
| $A + B \longrightarrow P_1 + P_2$     | ثنائي ثنائي (Bi bi)   |
| $A + B + C \longrightarrow P_1 + P_2$ | ثلاثي ثنائي (Ter bi)  |

## ٩-٢ الآليات وحركيات الحالة الثابتة للتفاعلات الإنزيمية ثنائي ثنائي

في حالة التفاعلات الإنزيمية لمادة تفاعل واحدة فإنه توجد طريقة واحدة لإلتقاء المادة الخاضعة مع الإنزيم لتكوين المعقد الثنائي ES. من ناحية أخرى فإنه في حالة التفاعل الإنزيمي ثنائي ثنائي توجد عدة احتمالات لإلتقاء المادتين الخاضعتين مع الإنزيم وخروج ناتج التفاعل. ولتوضيح ذلك دعنا ننظر إلى تفاعل نقل مجموعة X من مادة خاضعة إلى مادة خاضعة أخرى الذي يسير كتفاعل ثنائي ثنائي:



ومخطط التفاعل كما هو مكتوب يطرح بعض الأسئلة التي يجب الإجابة عليها:

- هل أحد المواد الخاضعة ترتبط وتحرر من الإنزيم قبل ارتباط المادة الخاضعة الثانية؟

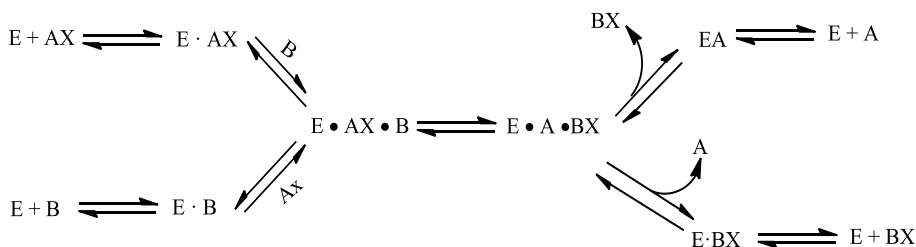
- هل ترتيب ارتباط المادتين الخاضعتين للإنزيم يكون عشوائياً random، أو أن الارتباط يجب أن يكون بتسلسل خاص؟
  - هل المجموعة المنقولة X تنقل مباشرة من A إلى B عندما يكون كلاهما مرتبط بالإنزيم، أو أن التفاعل يسير بنقل المجموعة X من الجزئ المانح A إلى موقع ما على الإنزيم، ومن ثم يوجد نقل تالي للمجموعة من موقع الإنزيم إلى الجزئ المستقبل B (بمعنى أن التفاعل يسير خلال مركب وسيط E-X)؟.
- وهذه الأسئلة تطرح ثلاثة آليات محتملة على الأقل لهذا المخطط العام للتفاعل الإنزيمي ثنائي ثنائي. والشواهد التجريبية أوضحت أنه توجد ثلاثة آليات مميزة لهذه التفاعلات وهي:

- ١- التفاعل ثنائي ثنائي المتعاقب العشوائي Random-sequential Bi Bi reaction
  - ٢- التفاعل ثنائي ثنائي المتعاقب المنتظم الإجباري Compulsary Ordered-sequential Bi Bi reaction
  - ٣- تفاعل الإزاحة المزدوج (أو بنج-بونج) Double displacement (or ping-pong) reaction
- إن الهدف الأساسي من قياسات حركيات الحالة الثابتة هو التفرقة بين هذه الآليات المختلفة. ومن ثم فإننا سوف نعرض وصف لكل من هذه الآليات واستخدام طرق الرسوم البيانية للتفرقة بينهم. وفي المعالجة الحركية لهذه الآليات سوف نستخدم معادلات الحالة الثابتة العامة التي وضعها ألبرتي Alberty (1953) التي تعالج التفاعلات الإنزيمية متعددة المواد الخاضعة بدلالة ثوابت الاتزان المألوفة لنا من مناقشة معادلة ميكلس-منتين. وهذه الطريقة تكون جيدة للإنزيمات التي تستخدم مادة خاضعة واحدة أو إثنين وتعطي واحد أو إثنين من النواتج.

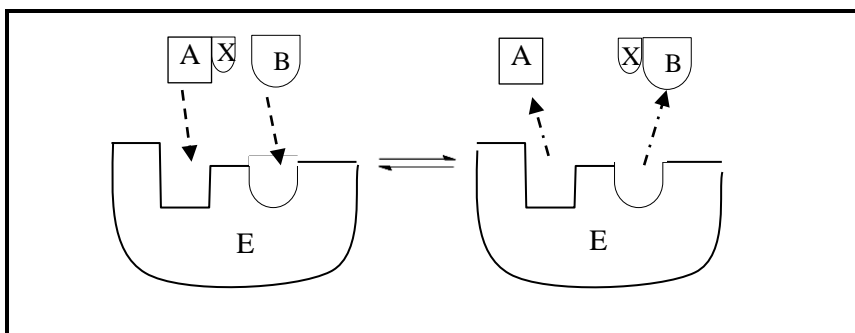
## ٩-٢-١ التفاعلات ثنائي ثنائي المتعاقبة العشوائية

في آلية التفاعلات ثنائي ثنائي المتعاقبة العشوائية فإن أى من المادتين الخاضعتين يمكن أن ترتبط أولاً بالإنزيم، وأى من الناتجين يمكن أن يترك الإنزيم أولاً. وبصرف النظر عن

أى من المادتين ترتبط أولاً بالإنزيم. فإن التفاعل يسير خلال تكوين معقد ثلاثي وسيط (E.AX.B) كما هو موضح كالتالي:



وفي هذه الآلية يجب أن يوجد موقعين إرتباط للمادتين الخاضعتين أحدهما يرتبط بالمادة الخاضعة AX والآخر للإرتباط بالمادة الخاضعة الثانية B. وموقعي الإرتباط يجب أن يكونين قريبين من بعضهما بدرجة كافية التي تسمح بانتقال المجموعة X من المادة الخاضعة A إلى المادة الخاضعة B (شكل ٩-١).



شكل ٩-١ مخطط بياني يعبر عن تكوين المعقد الثلاثي في آلية التفاعلات ثنائي ثنائي المتعاقبة العشوائية، الذي يوضح أن AX و B يرتبطان مع موقعين مختلفين قريبين على الإنزيم.

وفي هذه الآلية فإن إرتباط Ax بالإنزيم الحر يوصف بثابت التفكك  $K^{AX}$ ، وبالمثل فإن ارتباط B بـ E يوصف بثابت التفكك  $K^B$ . لاحظ أن إرتباط أحد المواد الخاضعة ربما يؤثر على ألفة الإنزيم للمادة الخاضعة الثانية. ومن ثم فإننا قد نجد أن ارتباط AX

بالمعقد E.B سابق التكوين يوصف بالثابت  $\alpha K^{AX}$ . وبالمثل حيث أن الإتزان الكلي بين E.AX.B و E يجب أن يكون غير معتمداً على المسار، فإن ارتباط B بالمعقد E.AX سابق التكوين يوصف بـ  $\alpha K^B$ . وعندما تكون B مشبعة فإن قيمة  $\alpha K^{AX}$  تساوي ثابت ميكليس لـ AX (أى  $K_m^{AX}$ )، وبالمثل عندما يكون AX مشبعة فإن  $\alpha K^B = K_m^S$ . وسرعة هذا التفاعل الإنزيمي يعطي بالمعادلة ١-٩:

$$v = k_{cat} [E.AX.B] = \frac{k_{cat}[E_t][E.AX.B]}{[E] + [E.AX] + [E.B] + [E.AX.B]} \quad (١-٩)$$

وإذا عبّرنا عن تركيزات الأنواع المختلفة بدلالة تركيز الإنزيم الحر [E] نحصل على:

$$v = \frac{V_{max}[AX][B]}{\alpha K^{AX}K^B + \alpha K^B[AX] + \alpha K^{AX}[B] + [AX][B]} \quad (٢-٩)$$

وإذا ثبتنا تركيز أحد المواد الخاضعة، فإنه يمكن إعادة ترتيب وتبسيط معادلة ٢-٩. فعلى سبيل المثال عند تثبيت [B] وتغيير [AX] نحصل على:

$$v = \frac{V_{max}[AX]}{\alpha K^{AX} \left(1 + \frac{K^B}{[B]}\right) + [AX] \left(1 + \frac{\alpha K^B}{[B]}\right)} \quad (٣-٩)$$

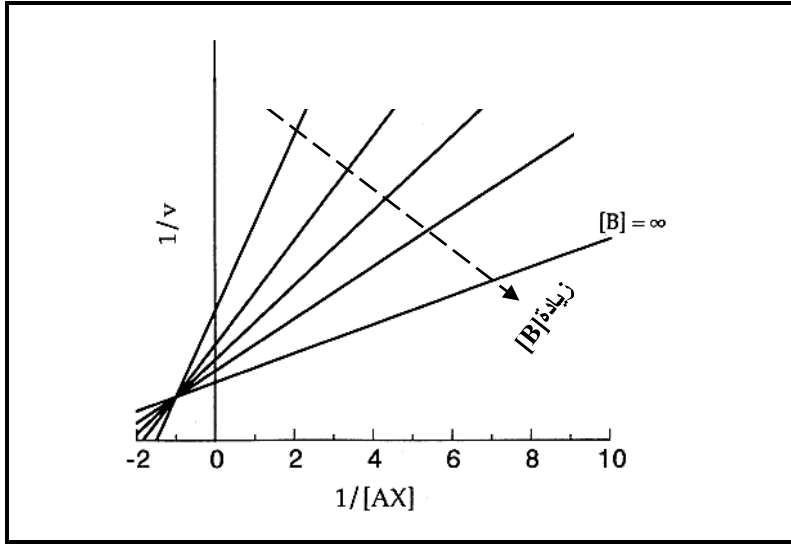
وعند تركيزات عالية ومثبتة من B، فإن الحدين  $K^B/B$  و  $\alpha K^B/[B]$  يؤولان إلى الصفر. ومن ثم فإنه عند تركيز التشبع لـ B نجد أن:

$$v = \frac{V_{max}^{app}[AX]}{K_m^{AX.app} + [AX]} \quad (٤-٩)$$

وبالمثل أيضاً، فإنه عند تركيز مشبع ومثبت لـ  $[AX]$ ، فإن

$$v = \frac{V_{\max}^{\text{app}}[B]}{K_m^{\text{B.app}} + [B]} \quad (٥-٩)$$

وإذا قمنا بقياس سرعة التفاعل لمدى من تركيزات  $AX$  عند عدة تركيزات مثبتة من  $B$ . فإن رسم المقلوب المزدوج سوف يعطي مجموعة من الخطوط التي تتقاطع عند نقطة واحدة شمال المحور  $y$ ، كما هو موضح في شكل ٩-٢.



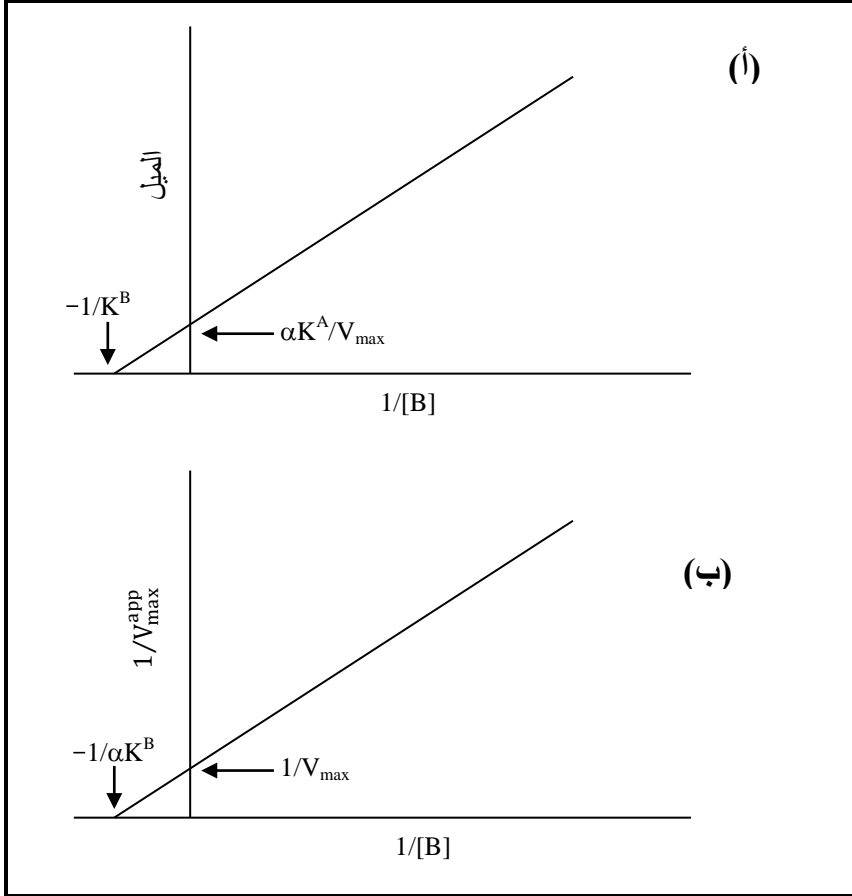
شكل ٩-٢ رسم المقلوب المزدوج للتفاعل الإنزيمي ثنائي ثنائي المتعاقب العشوائي.

معادلة المقلوب المزدوج (عند تركيز مشبع ثابت لـ  $B$ )  $\frac{1}{v} = \left( \frac{K_m^{\text{AX.app}}}{V_{\max}^{\text{app}}} \right) \frac{1}{[AX]} + \frac{1}{V_{\max}^{\text{app}}}$  (شكل ٩-٣)، إن التقاطع  $y$  للميل  $\frac{K_m^{\text{AX.app}}}{V_{\max}^{\text{app}}}$ ، والتقاطع مع المحور  $1/V_{\max}^{\text{app}}$ .

والبيانات من شكل ٩-٢ يمكن رسمها كما ميول للخطوط كدالة في  $1/[B]$ ، وكذلك يمكن منها رسم التقاطعات مع المحور  $y$  كدالة في  $1/[B]$  (شكل ٩-٣)، إن التقاطع  $y$  للميل مقابل  $1/[B]$  يعطي تقدير لـ  $\alpha K_m^{\text{AX}}/V_{\max}$  والتقاطع مع المحور  $x$  لهذا الرسم يعطي تقدير لـ  $1/K^{\text{B}}$  والتقاطعان مع المحور  $y$  والمحور  $x$  لرسم  $1/V_{\max}^{\text{app}}$  مقابل  $1/[B]$  يعطيان



تقدير  $1/V_{max}$  و  $-1/\alpha K^B$  على التوالي. ومن ثم فإنه من البيانات في الرسمين يمكن لنا حساب قيم  $V_{max}$ ,  $K^B$ ,  $K^{Ax}$  في نفس الوقت.

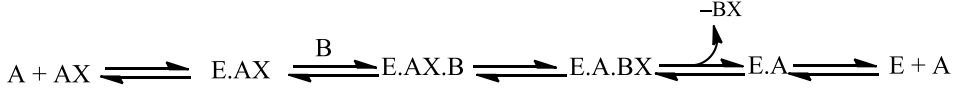


شكل ٩-٣ إعادة رسم الميل (أ) والتقاطع مع المحور y مقابل  $1/[B]$  للبيانات من شكل ٩-٢، توضح التقدير البياني لكل من  $K^{Ax}$  و  $K^B$  و  $V_{max}$  للتفاعل الإنزيمي ثنائي ثنائي المتعاقب العشوائي.

## ٩-٢-٢ التفاعلات الإنزيمية ثنائي ثنائي المتعاقبة المنتظمة (الإجبارية)

في التفاعلات الإنزيمية ثنائي ثنائي المتعاقبة المنتظمة، فإن أحد المواد الخاضعة ولنقل AX يجب أن ترتبط بالإنزيم قبل ارتباط المادة الخاضعة الأخرى (B). ومثل التفاعلات

المتعاقبة العشوائية، فإن آلية التفاعل تسير خلال تكوين المعقد الثلاثي الوسيط. في هذه الحالة فإن مخطط التفاعل يكون كالتالي:



وهذا أيضاً فإن تكوين المعقد الثلاثي يتطلب وجود موقعين لإرتباط المادتين الخاضعتين كما في آلية التفاعلات ثنائي ثنائي المتعاقبة العشوائية (شكل ٩-١). وإذا كان تحول المعقد  $E \cdot AX \cdot B$  إلى  $E \cdot A \cdot BX$  هو الخطوة المحددة لمعدل التفاعل في الحفز، فإن  $AX$  و  $E$  و  $E \cdot AX \cdot B$  تكون جميعها في حالة اتزان، وسرعة التفاعل تعطي بالمعادلة التالية:

$$v = \frac{V_{\max}[AX][B]}{K^{AX}K^B + K^B[AX] + [AX][B]} \quad (٦-٩)$$

مع ذلك، إذا كان تحول  $E \cdot AX \cdot B$  إلى  $E \cdot A \cdot BX$  سريعاً مثل الخطوات الأخرى في الحفز، فإنه يجب استخدام فرضية الحالة الثابتة في اشتقاق معادلة السرعة. وفي حالة التفاعلات المتعاقبة المنتظمة.

$$v = \frac{V_{\max}[AX][B]}{K^{AX}K_m^B + K_m^B[AX] + K_m^{AX}[B] + [AX][B]} \quad (٧-٩)$$

وكما أوضحنا سابقاً، فإن الحد  $K^{AX}$  في معادلة ٧-٩ هو ثابت التفكك للمعقد  $E \cdot AX$  و  $K_m^{AX}$  هو تركيز  $AX$  الذي ينتج سرعة تساوي نصف السرعة القصوى  $V_{\max}$  عند تركيز التشبع المثبت  $[B]$ .

إن نمط رسومات المقلوب المزدوج المشاهد لتركيزات مختلفة من  $AX$  عند تركيزات مثبتة مختلفة من  $[B]$  يكون مماثلاً لذلك المشاهد في شكل ٩-٢ لآلية التفاعلات المتعاقبة العشوائية (لاحظ التشابه بين المعادلتين ٩-٢ و ٩-٧). وبالرغم من أنه يمكن

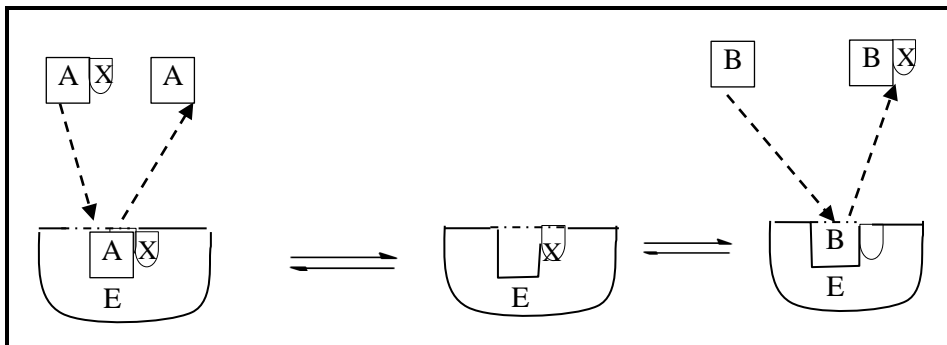
الحصول على المعلومات (البارامترات) الحركية لهذه الآلية المنتظمة بطريقة مماثلة للآلية العشوائية، فإن لا يمكن التمييز بين آلية التفاعلات الإنزيمية المتعاقبة الثنائية الثنائية المنتظمة والعشوائية على أساس رسومات المقلوب المزدوج بمفردها. في هذه الحالة يمكن استخدام المواد الخاضعة المعلمة بالنظائر المشعة أو استخدام المثبطات المعتمدة على الناتج للفرقة بين هاتين الآليتين.

### ٩-٢-٣ تفاعلات الإزاحة المزدوجة الثنائية أو البنج-بونج

تشتمل تفاعلات الإزاحة المزدوجة أو بنج-بونج على ارتباط المادة الخاضعة الأولى AX بالإنزيم حيث تنقل المجموعة X لموقع ما على الإنزيم ويخرج ناتج التفاعل الأول A. ثم ترتبط المادة الخاضعة الثانية B بالصورة E - X للإنزيم (في هذه الآلية فإن B لا يمكن أن ترتبط بالإنزيم الحر). ثم تنقل المجموعة X (تفاعل الإزاحة الثاني) إلى المادة الخاضعة المرتبطة B قبل تحررها من الإنزيم إلى الناتج النهائي BX. ومخطط هذه الآلية هو التالي:



وفي هذه الآلية حيث توجد مادة خاضعة واحدة مرتبطة بالإنزيم (معقد ثنائي من الإنزيم وأحد المواد الخاضعة) في نفس الوقت، فإن كلا المادتين يمكن أن يستخدمان موقع ارتباط فردي، والذي يشير إلى وجود بعض التماثل بين تركيب المادتين الخاضعتين B, Ax (شكل ٩-٤).



شكل ٩-٤ مخطط بياني لإرتباط المواد الخاضعة AX و B في تفاعلات الإزاحة المزدوجة (بنج-بونج) الذي يشير أن AX, B يرتبطان بنفس الموقع في الإنزيم.

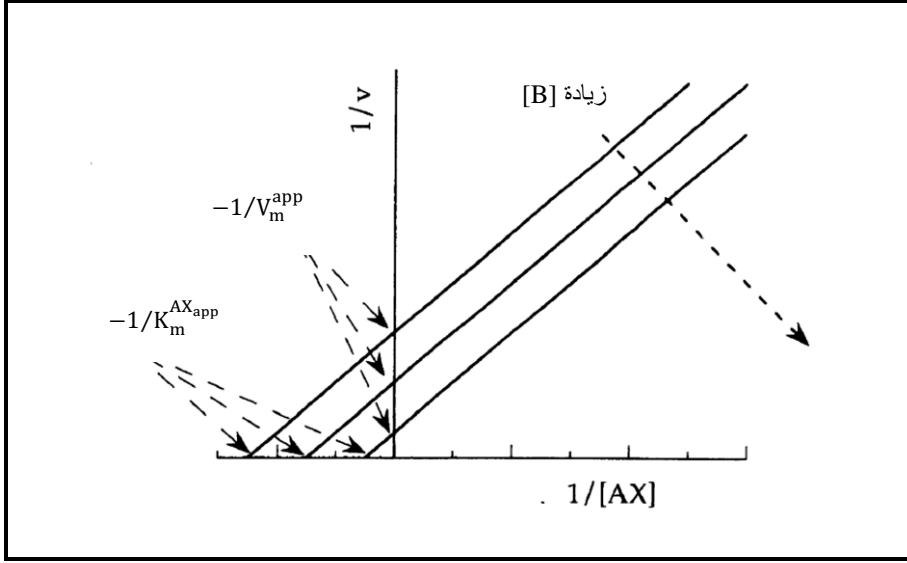
وباستخدام إفتراضات الحالة الثابتة، فإن يمكن الحصول على معادلة السرعة لتفاعل الإزاحة المزدوجة كالتالي:

$$v = \frac{V_{\max}[AX][B]}{K_m^B[EX] + K_m^{AX}[B] + [AX][B]} \quad (٩-٨)$$

وإذا ثبتنا قيمة [B]، فإن معادلة ٩-٨ للمتغير [AX] تصبح:

$$v = \frac{V_{\max}[AX]}{K_m^{AX} + [AX] \left( 1 + \frac{K_m^B}{[B]} \right)} \quad (٩-٩)$$

ورسومات المقلوب المزدوج الذي يعمل وفقاً لآلية الإزاحة المزدوجة لتركيزات مختلفة من AX عند عدة تركيزات مثبتة من B سوف يعطي مجموعة من الخطوة المتوازية كما يظهر في شكل ٩-٥. ولكل تركيز من المادة الخاضعة [B] فإن قيم كل من  $1/V_{\max}^{\text{app}}$  و  $1/K_m^{\text{AXapp}}$  يمكن تقديرهما من التقاطع y و x على التوالي لرسم المقلوب المزدوج.

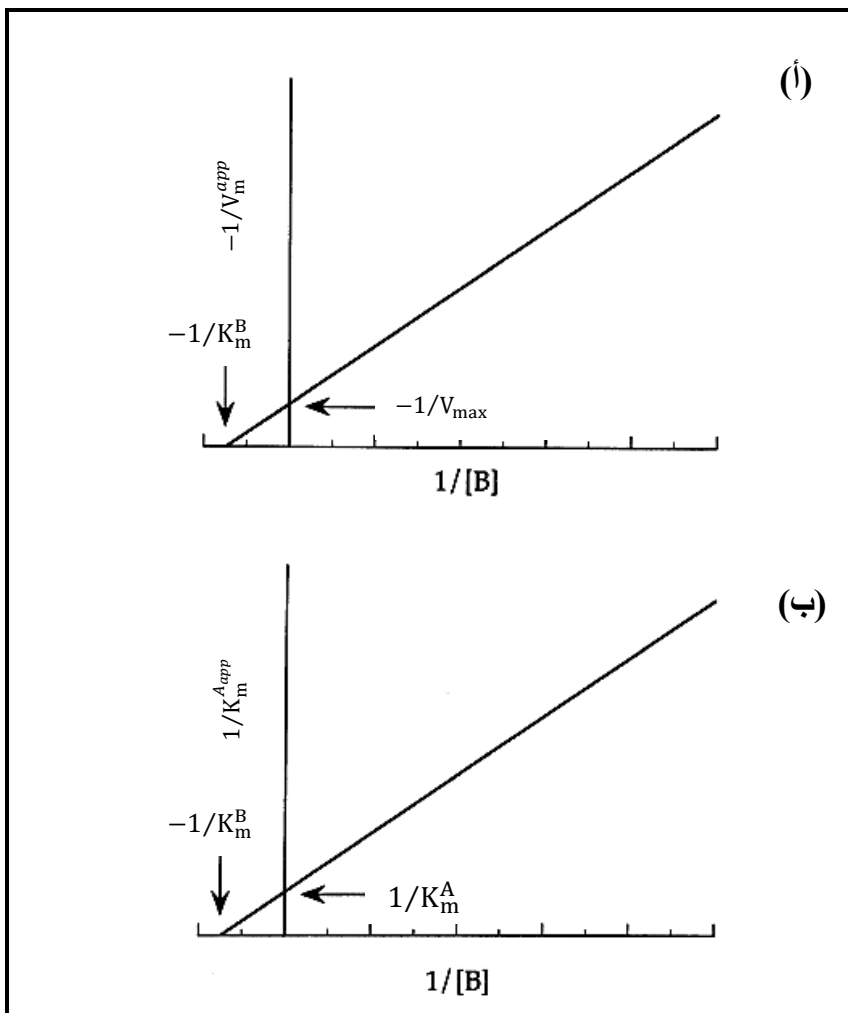


شكل ٩-٥ رسم المقلوب المزدوج للتفاعل الإنزيمي ثنائي ثنائي بآلية الإزاحة المزدوجة (بنج-بونج)

البيانات المتضمنة في شكل ٩-٥ يمكن إعادة رسمها بدلالة  $1/V_{max}^{app}$  كدالة في  $1/[B]$  كما هو موضح في شكل ٩-٦. إن قيمة  $-1/K_m^B$  يمكن تقديرها من التقاطعات  $x$  في  $1/K_m^{AXapp}$  أى من الرسمين أ وب في شكل ٩-٦. والتقاطعات مع المحور  $y$  في كل الرسمين يعطيان تقدير  $1/V_{max}$  (من رسم  $1/V_{max}^{app}$  مقابل  $1/[B]$ ) و  $1/K_m^{AX}$  (من رسم  $1/K_m^{AXapp}$  مقابل  $1/[B]$ ) للتفاعل كما هو موضح في شكل ٩-٦.

### ٩-٣ التمييز بين آليات التفاعلات الإنزيمية المتعاقبة العشوائية والمنتظمة

من المناقشة السابقة يتضح أنه من السهل التمييز بين آلية تفاعلات الإزاحة المزدوجة (التي تتضمن تكوين معقد ثنائي) وآلية التفاعلات المتعاقبة (التي تتضمن تكوين معقد ثلاثي) من الهيئة الوصفية لرسومات المقلوب المزدوج (شكل ٩-٢ وشكل ٩-٥). من ناحية أخرى فإنه ليس من الممكن التمييز بين آلية التفاعلات المتعاقبة العشوائية والتفاعلات المتعاقبة المنتظمة الإجبارية على أساس رسومات المقلوب المزدوج بمفردها.



شكل ٩-٦ إعادة رسم البيانات من شكل ٩-٥ كما (أ)  $1/V_{max}^{app}$  مقابل  $1/[B]$  (ب)  $1/K_m^{AX,app}$  مقابل  $1/[B]$  الذي يشرح التقدير البياني لـ  $K_m^{AX}$  و  $K_m^B$  و  $V_{max}$  للتفاعل الإنزيمي ثنائي ثنائي بالية الإزاحة المزدوجة (بنج بونج).

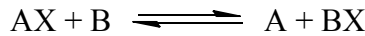
لذلك تستخدم طرق أخرى للتمييز بين هاتين الآليتين للتفاعلات المتعاقبة. والطرق المستخدمة في هذا الغرض تشمل استخدام النظائر المشعة وإستخدام المثبطات. وسوف نعرض هنا طريقة إستخدام النظائر المشعة.

### ٩-٣-١ استخدام تبادل النظائر المشعة للتمييز بين آليات التفاعلات

أحد الطرق المستخدمة في التمييز بين آليات التفاعلات هو دراسة معدل التبادل بين المادة الخاضعة للمعلمة إشعاعياً وجزئ ناتج التفاعل عند حالات الإتزان. إن إختبار الآلية الأولى والبسيط لإستخدام تبادل النظائر هو السؤال ما إذا كان التبادل يحدث بين المادة الخاضعة وناتج التفاعل في وجود الإنزيم ولكن في غياب المادة الخاضعة الثانية. وبالنظر إلى مخططات التفاعلات المختلفة التي سبق مناقشتها في هذا الفصل فإنه من الواضح أن هذا التبادل يحدث فقط لتفاعل الإزاحة المزدوجة:



في التفاعلات المتعاقبة العشوائية أو المنتظمة الإجبارية، فإن ضرورة أن يسير التفاعل خلال المعقد الثلاثي قبل تحرير الناتج الأولى سوف يمنع إندماج النظير المشع في أحد النواتج في غياب المادة الخاضعة الثانية. في الخطوة التالية، دعنا نرى ماذا يحدث عند قياس معدل تبادل النظير تحت ظروف الاتزان. وللتفاعل العام لنقل المجموعة:



وتحت هذه الظروف، فإن معدلات التفاعل الأمامي والتفاعل العكسي تكون متساوية، وثابت الإتزان يعطي بالعلاقة التالية:

$$K_{eq} = \frac{[A][BX]}{[AX][B]} \quad (٩-١)$$

وتحت هذه الظروف إذا أدخلت المادة الخاضعة B المعلمة إشعاعياً ( $B^*$ ) بكميات صغيرة جداً بحيث لا تحدث تشويش للإتزان بدرجة محسوسة، فإن معدل تكوين BX

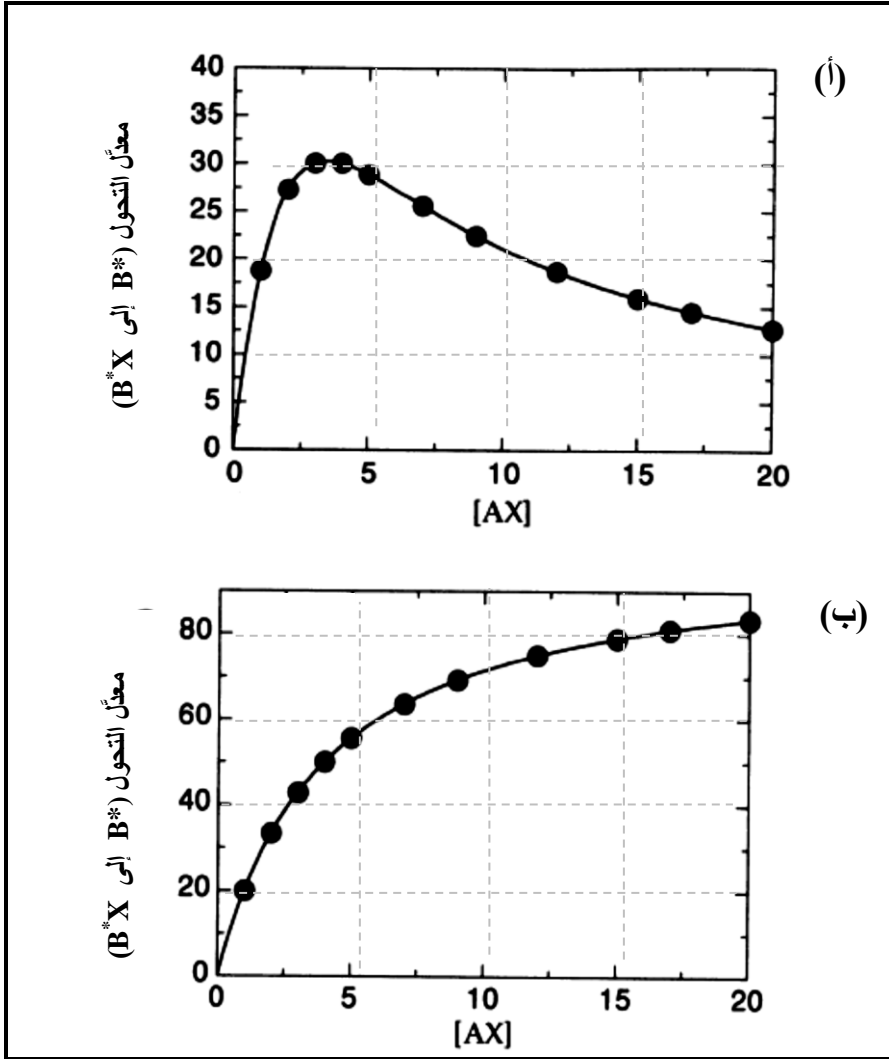
المعلمة ( $B \cdot X$ ) يمكن قياسها. ويعاد القياس عند زيادة  $A$  و  $AX$  للمحافظة على النسبة  $[A]/[AX]$  ثابتة (بمعنى تجنب تغيير موضع الاتزان). ويتغير كميات  $AX$ ,  $A$  فإن معدل إدماج النظير المشع في  $BX$  سوف يتأثر.

افترض أن التفاعل يسير خلال آلية التعاقب المنتظم الإجباري الذي يكون فيه المادة الخاضعة  $B$  ترتبط أولاً بالإنزيم وأن  $BX$  هو ناتج التفاعل الأخير المتحرر. وإذا كان هذا هو الحال، فإن معدل إدماج النظير المشع في  $BX$  سوف يزيد أولاً بزيادة تركيز  $A$  و  $AX$ . وبزيادة تركيز  $A$ ,  $AX$  إلى حد أبعد فإن تكوين المعقد الثلاثي  $E \cdot AX \cdot B$  و  $E \cdot A \cdot BX$  سوف يكون مواتياً، بينما تفكك المعقدين  $E \cdot B$  و  $E \cdot BX$  سيكون غير مواتياً. وهذا سوف يكون له تأثير على خفض معدل تبادل النظير بين  $B$  و  $BX$ . ومن ثم فإنه برسم العلاقة بين معدل تبادل النظير كدالة في  $[AX]$  سوف يظهر تثبيط المادة الخاضعة عند التركيز العالي من  $AX$  كما هو موضح في شكل ٩-٧ (أ).

إن تأثير زيادة  $[AX]$  و  $[A]$  على معدل تبادل النظائر المعلمة بين  $B$  و  $Bx$  سوف يكون مختلف في التفاعل المتعاقب المنتظم إجبارياً الذي يتطلب ارتباط  $AX$  أولاً بالإنزيم. في هذه الحالة فإن زيادة تركيز  $A$ ,  $AX$  سيكون غير مواتي للإرتباط بالإنزيم الحر مقابل تفضيله للصور  $E \cdot AX$  و  $E \cdot A$ . إن الصورة  $E \cdot AX$  سوف تتفاعل مع  $B$  الذي يؤدي إلى تكوين  $BX$ ، بينما الصورة  $EA$  لا تكون كذلك. ومن ثم فإن معدل إدماج النظير المعلم في  $BX$  سوف يزيد مع زيادة  $[AX]$  كدالة قطع زائد hyperbolic (شكل ٩-٧ ب). ونفس علاقة القطع الزائد سوف تشاهد أيضاً في التفاعل الذي يسير بالآلية المتعاقبة العشوائية. مع ذلك فإنه في الحالة الأخيرة فإن علاقة القطع الزائد تشاهد أيضاً في التجربة التي تجري مع  $AX$  المعلمة مع تغيير  $[B]$

ومن ثم فإن تبادل النظير في غياب المادة الخاضعة الثانية يستخدم لتشخيص تفاعل الإزاحة المزدوجة، بينما يمكن التمييز بين التفاعلات المتعاقبة العشوائية والمنظمة إجبارياً على أساس علاقة معدل تبادل النظير بين المادة الخاضعة والناتج للتفاعل تحت ظروف الاتزان.

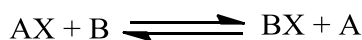




شكل ٧-٩ رسم العلاقة بين تباديل النظير عند الاتزان بين B, BX كدالة في [AX] لـ (أ) التفاعل الثنائي الثنائي المتعاقب المنتظم إجبارياً عندما تكون B هي المادة الخاضعة الأولى التي ترتبط بالإنزيم و BX هو الناتج المتحرر الأخير (ب) إما يكون التفاعل ثنائي ثنائي منتظم إجبارياً الذي فيه ترتبط AX أولاً بالإنزيم أو تفاعل ثنائي ثنائي متعاقب عشوائي.

## أسئلة

- ١- أذكر بعض بعض التفاعلات في الأنظمة الحية التي تشتمل على تفاعلات أثنين من المواد الخاضعة.
- ٢- صف بالرسوم التخطيطية التفاعلات المتعاقبة العشوائية والمنتظمة. وتفاعلات البنج-بونج.
- ٣- تفاعل إنزيمي في صورة:



اختبر عند درجة حرارة و pH وتركيز إنزيم ثابتة عند سلسلة مثبتة من تركيز B وتركيز متغير من AX. وتم الحصول على النتائج التالية:

| السرعة الابتدائية ( $\mu\text{mol/L.min}$ ) حيث: |            |            | التركيز الابتدائي لـ AX |
|--------------------------------------------------|------------|------------|-------------------------|
| [B0] = 2.0 mmol/L                                | 4.0 mmol/L | 6.0 mmol/L |                         |
| 250                                              | 286        | 300        | 2.0                     |
| 272                                              | 323        | 341        | 2.5                     |
| 313                                              | 371        | 395        | 3.3                     |
| 357                                              | 435        | 469        | 5.0                     |
| 417                                              | 526        | 577        | 10.0                    |

ماذا تستنتج عن آلية التفاعل؟

- ٤- في تفاعل ثنائي المواد الخاضعة، فإن كمية صغيرة من الناتج الأول للتفاعل P تكون معلمة بالنظير ( $P^*$ ) وأضيفت للإنزيم والمادة الخاضعة الأولى A. لا يوجد B أو Q. هل  $A(=P - X)$  تصبح معلمة بالنظير ( $A^*$ ) إذا كان التفاعل يتبع (أ) آلية البنج-بونج (ب) الآلية المتعاقبة.



# فصل ١. القياسات التجريبية لنشاط الإنزيم

## Experimental Measures of Enzyme Activity

□

|      |                                                  |
|------|--------------------------------------------------|
| ١-١٠ | تحليل منحنيات التفاعل                            |
| ٢-١٠ | قياس السرعة الابتدائية: توليد البيانات التجريبية |
| ٣-١٠ | العوامل التي تؤثر على سرعة التفاعلات الإنزيمية   |
| ٤-١٠ | طرق الكشف                                        |
| ٥-١٠ | ثباتية الإنزيم                                   |

البيانات التي يتم الحصول عليها من حركات الحالة الثابتة للإنزيمات تعطي معلومات وفيرة عن آليات الحفز الإنزيمي والتأثيرات المتبادلة بين الإنزيمات والمواد الخاضعة. في فصل ٦ وفصل ٩ عرضنا الأسس العامة لتقدير الثوابت الحركية  $K_m$ ,  $k_{cat}$  و  $V_{max}$  من قياسات السرعة الابتدائية عند تركيزات مختلفة من المادة الخاضعة أثناء حفز الحالة الثابتة. إن تقدير هذه الثوابت الحركية يستند على إمكانية قياس السرعة الابتدائية للتفاعل الإنزيمي بدقة تحت ظروف محكمة عند تركيزات مختلفة من المادة الخاضعة. والخطوة الأولى في دراسة حركية الإنزيم هو تحديد مصدر الإنزيم (نبات، أنسجة حيوان ما أو كائن دقيق) والقيام بتتقيته، ثم تحديد الطريقة المناسبة لقياس تحول المادة الخاضعة إلى الناتج.

في هذا الفصل سوف نصف بعض الطرق التجريبية التي تستخدم في تقدير السرعة الابتدائية للتفاعلات الإنزيمية. وسوف نرى أنه تم إنشاء عدة خطط لتتبع فقد المادة الخاضعة أو ظهور النواتج كدالة في الوقت أثناء الحفز الإنزيمي. وسرعة تفاعل إنزيمي ما تكون حساسة لظروف محلول التفاعل المختلفة مثل الـ pH ودرجة الحرارة وغيرهما. وهذه العوامل يجب أن تحكم للحصول على بيانات دقيقة. والتغيرات المحكومة في ظروف محلول التفاعل (مثل تغير الـ pH أو إضافة أحد المثبطات) وقياس تأثيرها على سرعة التفاعل يمكن أن تعطي معلومات مفيدة عن آلية الحفز. ومثل كل البروتينات، فإن كل الإنزيمات تكون حساسة لظروف التخزين ويمكن أن يحدث لها تغير في البنية الفراغية نتيجة لسوء المعاملة. ومن ثم فإننا سوف نناقش بعض العوامل التي قد تؤثر على ثبات الإنزيم.

إن الهدف من هذا الفصل هو إعطاء القارئ صورة للمفاهيم الأساسية لطبيعة الدراسة وليس إمداده بوصف كامل لكل طريقة. إضافة إلى ذلك فقد حاولت وصف الإجراءات المفيدة التي تحسن دقة البيانات وتقلل الجهد اليدوي.

حتى الآن تم وصف أكثر من 3000 إنزيم مختلف التي سجلت في الأدبيات العلمية (International Union of Biochemistry Handbook of Enzyme Nomenclature). ولكن عشر هذا العدد متاح تجارياً من شركات الكيماويات الحيوية بكميات تمتد من الميكروجرامات إلى كيلوجرامات. مع ذلك فإن حوالي 40 إلى 50 إنزيم ينتج على المستوى الصناعي من عدة كيلوجرامات إلى أطنان كل عام.

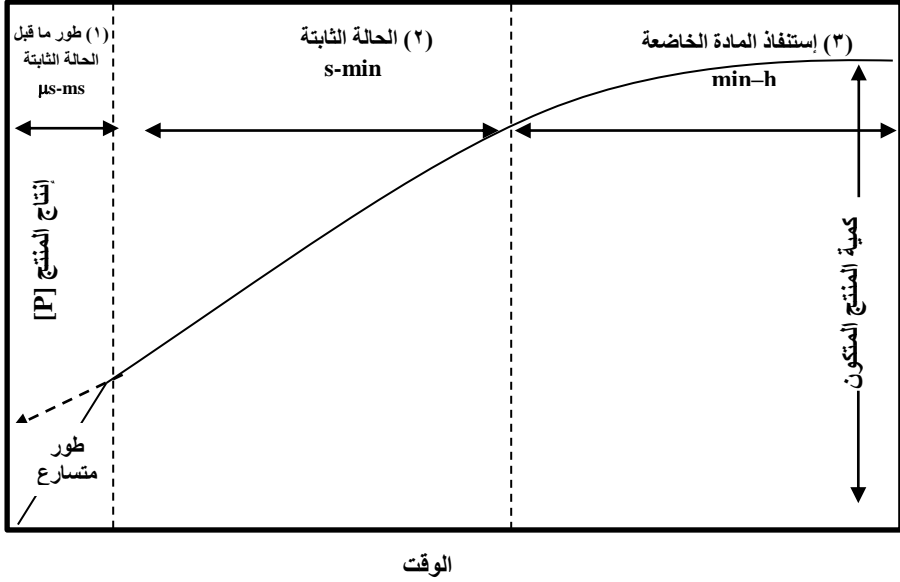
## ١-١٠ تحليل منحنيات التفاعل

عرضنا في فصل ٦ منحنيات سير (تقدم) التفاعل لفقد المادة الخاضعة وتكوين المنتج أثناء الحفز الإنزيمي (الشكلين ٦-١ و ٦-٢). ولقد أوضحنا أن فقد المادة الخاضعة وتكوين المنتج يتبع حركيات الرتبة الأولى الكاذب. كما أوضحنا في فصل ٦ أنه في المرحلة المبكرة من منحنى سير التفاعل فإن تكوين ناتج التفاعل وفقد المادة الخاضعة

يكون خطياً مع الوقت. ومن ثم فإنه يمكن تقدير السرعة الابتدائية من ميل slope التطابق الخطي في هذه المرحلة الأولى. وقد يكون أكثر دقة في قياس السرعة الابتدائية قياس التغير في تركيز ناتج التفاعل عن قياس التغير في تركيز المادة الخاضعة، حيث أنه في الحالة الأولى سيكون تغير صغيرة بالنسبة لتركيز صغير الذي يكون أكثر دقة عن تغير صغيرة في التركيز بالنسبة لتركيز كبير في الحالة الثانية.

إن منحنى سير التفاعل الإنزيمي النموذجي لإنتاج ناتج التفاعل عند بدأ التفاعل بإضافة الإنزيم أو المادة الخاضعة عند الزمن صفر معروض في شكل ١٠-١. وهذا المنحنى يمكن تجزئته إلى ثلاث أجزاء (أطوار) على الأقل. تحت الظروف التجريبية، فإن السرعة الابتدائية هي حقيقة الطور الثاني من منحنى سير التفاعل. وبناءً على نظرية الحالة الثابتة ومعادلة ميكليس-منتين فإن إنتاج المنتج يجب أن يكون خطياً مع الوقت خلال فترة زمنية مناسبة حتى يمكن الحصول على السرعة من ميل الخط. ويتقدم التفاعل فإننا نشاهد إنحناء وفي النهاية مرحلة إستواء عند استنفاد المادة الخاضعة (الطور ٣).

أيضاً، فإن التفاعلات تبدأ بطور سريع قبل الحالة الثابتة Pre-steady state، ولكن هذا لا يسبب مشاكل تجريبية لأن دوامه (أمدّه) يكون قصيراً جداً (ميكروثواني)، وكثافته تكون صغيرة جداً ولا يمكن كشفها تحت الظروف الطبيعية، لأنها تتناسب مع كمية الإنزيم الذي تكون كميته صغيرة في إختبارات الإنزيمات، وفي معظم الحالات لا يتداخل مع تقدير السرعة الابتدائية. مع ذلك، فقد تظهر المشاكل في طور السرعة الابتدائية (طور الحالة الثابتة).



شكل ١٠-١ منحنى سير التفاعل الإنزيمي النموذجي الذي يظهر ثلاث أطوار للتفاعل: (١) طور ما قبل الحالة الثابتة (٢) طور الحالة الثابتة (٣) طور استنفاد المادة الخاضعة

- في بعض الحالات قد يظهر طور تباطؤ lag phase قبل طور السرعة الابتدائية الخطي لمنحنى سير التفاعل. وهذا يحدث في حالة الإختبارات المزدوجة للإنزيمات الذي سنوضحه في قسم ١٠-٢ وشكل ١٠-٣. ولكن طور التباطؤ يمكن أن يشاهد لعدد من الأسباب الأخرى. مثال ذلك، فإن قسم خاص من الإنزيمات يطلق عليها الإنزيمات التخلفية hysterotic enzymes يفترض أنها توجد في حالة غير نشطة في غياب المادة الخاضعة، ولكنها تنشط ببطء في وجود المادة الخاضعة. وأطوار التباطؤ يمكن أن تحدث أيضاً لأسباب إصطناعية. مثال ذلك إذا خزن الإنزيم عند تركيز يؤدي إلى إتحاد وحدات الإنزيم oligomerization، ولكن صورة الإنزيم الأحادي هي النشطة. ومن ثم سوف يشاهد طور تباطؤ في منحنى سير التفاعل الذي يعكس معادل تفكك عديد الوحدات من الإنزيم إلى الإنزيم أحادي الوحدة. وطور التباطؤ يمكن أن يشاهد أيضاً عند عدم التحكم جيداً في درجة حرارة محلول

التفاعل الذي سيناقش في قسم ١٠-٣. ويجب تفادي مثل هذه الأسباب الإصطناعية.

● إن طور الحالة الثابتة الخطي يمكن أيضاً أن يسبقه طور تسارع burst phase أولى الذي يشير إلى تفاعل سريع. والطور المتسارع الابتدائي الذي يشاهد مع بعض الإنزيمات يرجع إلى عدة أسباب: أولاً، يمكن أن يحدث تثبيط حاد بنتائج التفاعل، فبعد عدة تحولات إنزيمية يكون تركيز الناتج المتكون عالي بدرجة كافية لتكوين المعقد الثلاثي ESP الذي يخضع للحفز عند معدل أقل من المعقد الثنائي ES. ومن ثم فإنه عند الفترة الزمنية المبكرة جداً فإن معدل تكوين المنتج يقابل السرعة غير المثبطة للتفاعل الإنزيمي، ولكن بعد فترة صغيرة فإن السرعة تتحول التي تعكس المعقد ESP. ثانياً، التغير في البنية الفراغية (المجسمة) لتركيب الإنزيم المعتمدة على الوقت التي تحدث بإرتباط المادة الخاضعة. وهنا فإن الإنزيم يوجد في الصورة العالية النشاط ولكن يتحول إلى بنية مجسمة أقل نشاط عند تكوين المعقد ES. ثالثاً، فإن المعدل الإجمالي للتفاعل ربما يكون مقيداً بالتححر البطئ للناتج من المعقد EP والعامل الرابع والأخير وهو الأكثر شيوعاً الذي يسبب طور التسارع هو التفاعل السريع للإنزيمات مع المادة الخاضعة ليكون مركب وسيط تساهمي الذي يدخل في تفكك بطئ للحالة الثابتة إلى النواتج.

● وإذا كان طور السكون أو طور التسارع قصيراً، فإنه يمكن إهماله والمعدل التالي يؤخذ بأنه تقريب للسرعة الابتدائية، أما إذا كان كبيراً أو يوجد شك في المعدل التالي، فإننا يمكن أن نمد الرسم إلى الوقت صفر، وفي القسم التالي (قسم ١٠-٢) سوف نعرض الطرق التجريبية التي يمكن أن تستخدم في تقدير السرعة الابتدائية من الجزء الابتدائي الخطي لمنحنى سير التفاعل في شكل ١٠-١ بتتبع معدل الزيادة في ناتج التفاعل بالنسبة للوقت. أو تتبع الإنخفاض في المادة الخاضعة بالنسبة للوقت (شكل ١٠-٢).



## ٢-١٠ قياس السرعة الابتدائية: توليد البيانات التجريبية

الهدف من هذا الجزء هو قياس معدل التفاعل الإنزيمي من السرعة الابتدائية الخطية  $v$  عندما تقاس تحت الظروف القياسية مع وجود كل المواد الخاضعة بكميات مناسبة. وقياس السرعة الابتدائية يتطلب قياس تركيز ناتج التفاعل (أو تركيز المادة الخاضعة) كدالة في الوقت المنقضي التالي لبدء التفاعل وتقدير ميل الجزء الابتدائي الخطي الذي يمثل السرعة الابتدائية للتفاعل (شكل ٢-٦ وشكل ١٠-١). وحتى يمكن تقدير التغير في التركيز أثناء التفاعل الإنزيمي، فإنه من الضروري تتبع إشارة التي تصف تكوين المنتج أو إستهلاك المادة الخاضعة كدالة في الوقت أثناء سير التفاعل. ونوع الإشارة التي يتم مراقبتها تختلف من إختبار لآخر، لكنها عادة ما تعتمد على خاصية فيزيوكيميائية للمادة الخاضعة أو الناتج أو المرافق الإنزيمي (مثل الإمتصاص الضوئي أو الإشعاع الضوئي) أو متاحة فصل المادة الخاضعة أو الناتج من مخلوط التفاعل وتقديرها عند إستخدام المواد الخاضعة المعلمة بالنظائر المشعة. وكثيراً ما يقوم الباحث بقياس السرعة الابتدائية عند تركيزات مختلفة من المادة الخاضعة حتى يستطيع تشييد منحنى السرعات الابتدائية للتفاعل مقابل تركيز المادة الخاضعة (شكل ٦-٣ أ و ب) لتقدير المعلمات الإنزيمية  $K_m$ ،  $k_{cat}$  و  $V_{max}$ . وفي بعض الحالات قد يرغب الباحث في دراسة تأثير أحد العوامل الأخرى على السرعة الابتدائية خلاف تركيز المادة الخاضعة مثل الـ pH، درجة الحرارة أو تأثير مثبط.

في حالة ما لم يظهر الجزء الابتدائي من منحنى السرعة بالصورة الخطية، فإنه يجب تغيير ظروف التفاعل لجعلها أقرب ما يكون إلى الكمال حتى تصبح المنطقة الخطية مرئية.

في هذا القسم سنناقش:

- أنواع الإختبارات المستخدمة في توليد البيانات التجريبية المطلوبة لقياس السرعة الابتدائية من الجزء الخطي لمنحنى سير التفاعل المعروض في شكل ١٠-١.
- كيف يتم بدأ وإيقاف التفاعل الإنزيمي.

- ### ١٠-٢-١ أنواع الاختبارات لقياس السرعة الابتدائية

(أ) الإختبار المباشر

(ج) الاختبار المزدوج

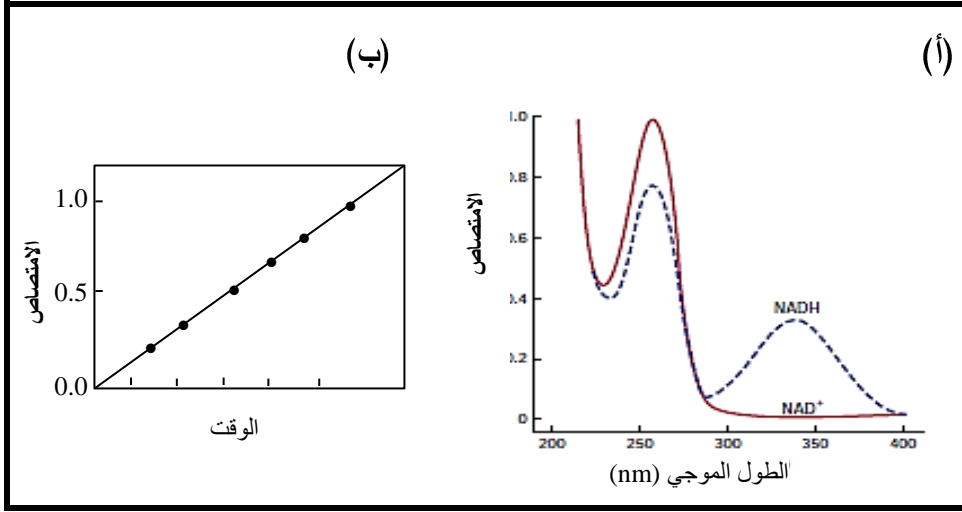
(د) الإختبار غير المستمر (إختبار النقطة النهائية)

**Direct Assay الإختبار المباشر (أ)**

$$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{NAD}^+ \rightleftharpoons \text{CH}_3\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{H} + \text{NADH} + \text{H}^+$$

إيثانول                      أستالدهيد

وهذه الخاصية إستخدمت بنجاح في قياس السرعة الابتدائية لعدد من إنزيمات الـ dehydrogenase. وتوليد البيانات المستمرة بالتسجيل بالقياس أو توليد عدد من نقاط البيانات بالتسجيل الرقمي يسمح بالقياس السريع للسرعة الابتدائية.



شكل ١٠-٢ (أ) طيف الإمتصاص لـ  $NAD^+$  و  $NADH$ .  $NADH$  له امتصاص منفرد غير متداخل مع طيف  $NAD^+$  عند 340 nm، وبذلك يمكن استخدامه في تتبع سير التفاعل (ب) رسم الامتصاص عند 340 nm من الطيف كدالة في الوقت لـ  $NADH$ . لاحظ أنه في هذه المرحلة المبكرة من التفاعل (حتى استهلاك 10% من المادة الخاضعة). فإن المنحنى يظهر علاقة خطية

### (ب) الاختيار غير المباشر Indirect Assay

في بعض الحالات فإن المادة الخاضعة والناتج للتفاعل الإنزيمي لا يعطى أى منهما إشارة مميزة يمكن منها قياس التركيز. مع ذلك فإنه كثيراً يمكن ازدواج ناتج التفاعل مع تفاعل - غير إنزيمي - آخر الذي ينتج إشارة ملائمة يمكن منها تتبع تركيز الناتج، ومثل هذه الطريقة يشار إليها بالاختبار غير المباشر. أحد الأمثلة لإستخدام هذه الطريقة هو إنزيم dihydroorotate dehydrogenase (DHODase). هذا الإنزيم يحفز تحول dihydroorotate إلى حمض orotic بإستخدام المرافق الإنزيمي ubiquinone الذي يختزل إلى ubiquinol. وأثناء التحول الإنزيمي فإن الإلكترونات التي تتولد

تتحول dihydroorotate إلى حمض orotic تنتقل بواسطة الإنزيم إلى ubiquinone لتكوين ubiquinol.

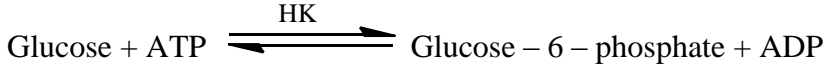


ومن الصعب قياس هذا التفاعل بصورة مباشرة، ولكن يمكن إزدواج إختزال ubiquinone مع تفاعل غير إنزيمي آخر.

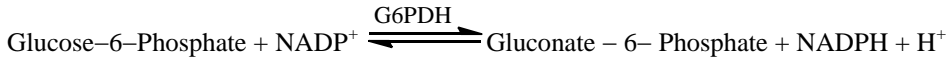
عدد من الصبغات يمكن أن يتغير لونها (إمتصاصها) بالأكسدة أو الاختزال. من بين هذه الصبغات (DCIP) 2, 6-dihydrochlorophenol indophenol، والتي يمكن استخدامها في تتبع سير تفاعل إنزيم DHODase. ففي صورتها المؤكسدة فإن DCIP يكون لونها أزرق ساطع وتمتص الضوء بقوة عند 610nm. ولكن عند إختزالها، فإن نطاق هذا الامتصاص يفقد كلية. DCIP تختزل تكافئياً بواسطة ubiquinol الذي يتكون أثناء التحول الإنزيمي لـ DHODase. ومن ثم فإنه يمكن قياس السرعة الابتدائية بوجود زيادة من DCIP مع محلول المادة الخاضعة dihydroorotate والمرافق الإنزيمي (ubiquinone) ثم تتبع الفقد في الامتصاص عند 610 nm كدالة في الوقت بعد إضافة الإنزيم لبدء التفاعل.

### (ج) الإختبار المزدوج Coupled Assay

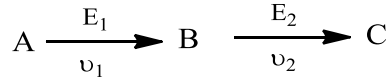
كما ذكرنا سابقاً فإنه لإختبار التفاعلات الإنزيمية، فإنه يجب متابعة ظهور الناتج أو إختفاء المادة الخاضعة بأحد الطرق المتاحة، فإذا كان ذلك غير ممكناً، فإننا نستخدم الإختبار المزدوج. في هذا النوع من الإختبارات فإن التفاعل المستهدف يقرن (بإزدوج) مع تفاعل إنزيمي آخر الذي يمكن قياسه بصورة ملائمة. وفي الإختبار المزدوج النموذجي فإن ناتج التفاعل الإنزيمي المستهدف دراسته يمثل المادة الخاضعة للتفاعل الإنزيمي الثاني (المزدوج). أحد الأمثلة لإستخدام هذه الطريقة هو قياس نشاط إنزيم hexokinase (HK) الذي يحفز التفاعل التالي:



لا أحد من المواد المتفاعلة أو نواتج التفاعل لهذا الإنزيم تحتوي على إشارة يمكن تتبعها لقياس النشاط الإنزيمي. مع ذلك فإن ناتج التفاعل glucose-6-phosphate يعتبر مادة خاضعة لإنزيم glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) الذي يحفز التفاعل التالي:



وخلال سير التفاعل فإن  $\text{NADP}^+$  يتحول إلى  $\text{NADPH}$  الذي يمكن تتبعه بسهولة بامتصاص الضوء عند 340 nm. ومن ثم إذا وضع الإنزيمين في مخلوط التفاعل فإنه يتكون  $\text{NADPH}$  و  $\text{Gluconate-6-Phosphate}$  من الجلوكوز و  $\text{ATP}$  و  $(\text{NADP}^+)$ . وهذا النموذج للتفاعل المزدوج (الأختبار المزدوج) يمكن وضعه في المخطط التالي:



حيث A هي المادة الخاضعة للتفاعل الإنزيمي المستهدف دراسته ( $E_1$ ) و  $\nu_1$  هي سرعة هذا التفاعل و B هي ناتج التفاعل المستهدف وهي أيضاً المادة الخاضعة للتفاعل المزدوج ( $E_2$ ) و  $\nu_2$  هي سرعة التفاعل المزدوج و C هي ناتج التفاعل المزدوج الذي يتم قياسه. وهناك بعض السمات التي يجب الإشارة إليها للتفاعل المزدوج:

- يجب المحافظة على الظروف القياسية لكلا الإنزيمين في نفس الوقت. وهذه سوف تكون مشكلة من الصعب حلها إذا اختلف الإنزيمين في الخصائص الأساسية مثل الـ pH المثلى أو السلوك الحراري.

- بالرغم من أننا نقوم بقياس C في هذا المخطط، فإن سرعة الحالة الثابتة  $v_1$  هي التي نرغب في دراستها (قياسها). ولتحقيق ذلك فإننا يجب أن نصل إلى وضع الذي تكون فيه  $v_1$  هي الخطوة المحددة للمعدل (أي  $v_1 \ll v_2$ ) الذي يتطلب عدم تراكم B ووصولها إلى تركيز الحالة الثابتة. وتحت هذه الظروف فإن B تتحول إلى C تواتراً (فوراً)، ومعدل تكوين C يعبر بذلك عن  $v_1$ . وهذا يتحقق عندما يكون تركيز  $E_2$  (ومن ثم  $V_{\max}^B$ ) كبيرة بكفاية بحيث يكون:

$$\frac{V_{\max}^B}{K_m^B} \gg \frac{V_{\max}^A}{K_m^A}$$

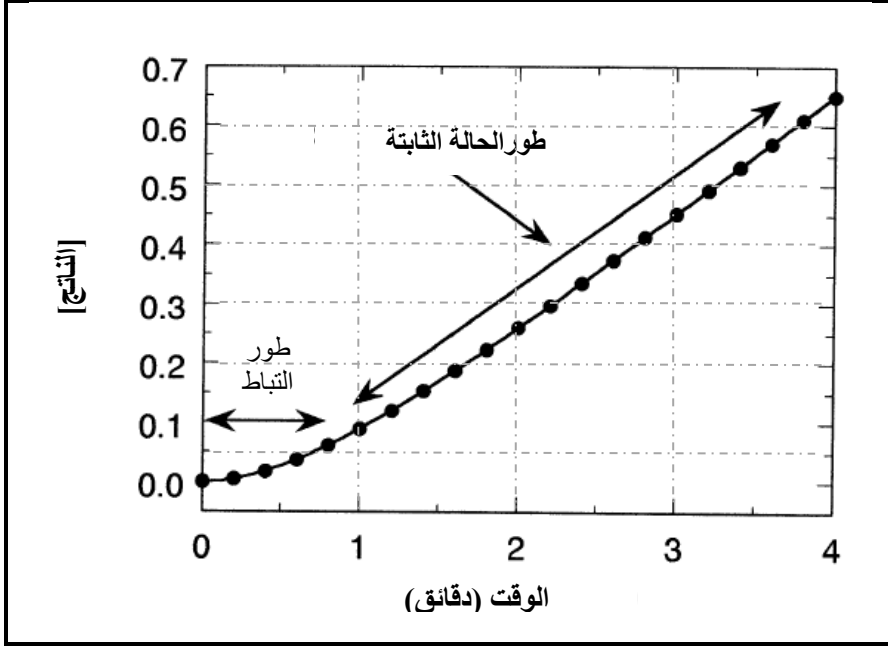
وهذه النسبة للحد الشمال إلى الحد اليمين عادة ما تعين في حدود 1: 100

- في أي إختيار مزدوج سوف يوجد دائماً طور تباطؤ lag phase قبل الوصول إلى الحالة الثابتة لتكوين C (شكل ١٠-٣)، الذي قد يتداخل مع قياس السرعة الابتدائية. ولذلك فإنه لقياس السرعة الابتدائية الحقيقية للتفاعل المستهدف فإنه يجب البحث عن الظروف التي تخفض طور التباطؤ الذي يسبق الحالة الثابتة لتكوين المنتج، ويجب التأكد أن القياس يتم أثناء الحالة الثابتة.

وضع كل من استيريبي Easterby (1973) وكيلان Cleland (1969) طريقة لتقدير دوام (بقاء) طور التباطؤ للتفاعل المزدوج. وفي هذه المعالجة نجد أنه طالما يعمل الإنزيم المزدوج تحت ظروف الرتبة الأولى (بمعنى أن  $[B]_{ss} \ll K_m^2$ ) حيث  $[B]_{ss}$  هي تركيز ناتج التفاعل الأول [B] عند مستوى الحالة الثابتة، فإن

$$[B]_{ss} = v_1 \left( \frac{K_m^2}{V_2} \right) \quad (١٠-١)$$

$$t = \frac{K_m^2}{V_2} \quad \text{و (١٠-٢)}$$



شكل ١٠-٣ البيانات النموذجية للتفاعل الإنزيمي المزدوج الذي يوضح طور التباطؤ الذي يسبق طور الحالة الثابتة أثناء التقدم الزمني للتفاعل.

حيث  $K_m^2$  تشير إلى ثابت ميكليس للإنزيم  $E_2$  و  $V_2$  السرعة القصوى لنفس الإنزيم و  $[B]_{ss}$  هي تركيز الحالة الثابتة و  $t$  هو وقت التباطؤ. والوقت المطلوب للوصول  $[B]$  إلى  $[B]_{ss}$  يرتبط أسياً ب  $t$  بحيث أن  $[B]$  تكون  $92\% [B]_{ss}$  عند  $t = 2.5$  و  $95\% [S]_{ss}$  عند  $t = 3$  و  $99\% [S]_{ss}$  عند  $t = 4.6$ . ولشرح استخدام معادلة ١٠-٢ دعنا نأخذ المثال التالي. افترض أن الإنزيم المزدوج ( $E_2$ ) له  $K_m^2$  للمادة B تساوي  $10\mu M$  و  $k_{cat}$  تساوي  $100s^{-1}$ . دعنا نفترض أننا نرغب في أن نشيد إختبارنا بحيث نصل إلى  $99\%$  من  $[B]_{ss}$  خلال الـ 20 ثانية الأولى من تقدم التفاعل. إن الوصول إلى  $0.99 [B]_{ss}$  يحتاج إلى  $t = 4.6$ . ومن ثم فإن  $t = 20s / 4.6 = 4.3s$ . وإعادة تنظيم معادلة ١٠-٢ فإننا يمكن أن نحسب  $V_2$  المطلوبة للوصول إلى وقت التباطؤ المطلوب الذي يساوي  $2.30\mu M$ ، وبقسمة هذه القيمة على  $k_{cat}$  ( $100s^{-1}$ )، فإننا نجد أن تركيز الإنزيم المزدوج المطلوب يكون  $0.023\mu M$  أو  $23nM$ .

#### (د) الإختبار غير المستمر (إختبار النقطة النهائية)

##### Discontinuous (end point) assay

الطرق الثلاثة السابقة هي طرق مستمرة حيث يمكن تتبع الإشارة التي تعبر عن تكوين المنتج أو إستهلاك المادة الخاضعة بطريقة مباشرة أو غير مباشرة أثناء سير التفاعل. والإختبار المستمر continuous assay يمثل الوسيلة الأكثر أماناً للقياس الدقيق لسرعة التفاعل من ميل الرسم البياني للإشارة مقابل الوقت.

لا يكون دائماً متاحاً إختبار العينات بالطريقة المستمرة، حيث لا يتوفر القياس الإنتقائي للمادة الخاضعة أو ناتج التفاعل تحت ظروف التفاعل. في هذه الحالة يجب إيقاف التفاعل وإجراء القياس تحت ظروف مختلفة. والقياس عادة ما يحتاج إلى فصل كيميائي للمادة الخاضعة والناتج والتقدير الكمي لأحدهما. والمثال الشائع هو إستخدام مادة خاضعة نشطة إشعاعياً الذي يعقبه فصل المادة الخاضعة والناتج ثم تقدير النشاط الإشعاعي للناتج. وتوليد نقطة زمنية فردية مع كل عينة يطلق عليه إختبار النقطة النهائية end point أو الإختبار غير المستمر discontinuous assay.

وبإنشاء فترة زمنية للإختبار فإننا نقوم بقياس الإشارة عند نقطة زمنية خلال فترة الوقت الخطي (من المفضل أن تكون النقطة الزمنية بالقرب من منتصف الطور الخطي في شكل ١٠-١). وسرعة التفاعل تعيين من الفرق في الإشارة عند النقطة الزمنية وبداية التفاعل مقسومة على الوقت:

$$v = \frac{\Delta I}{\Delta t} = \frac{I_t - I_0}{t_{\text{reading}}} \quad (٣-١٠)$$

حيث  $I_t$  ,  $I_0$  هما قياسات الإشارة عند الزمن  $t$  والزمن صفر على التوالي. و  $t_{\text{reading}}$  هي الفترة الزمنية بين بداية التفاعل وقياس الإشارة.

بالرغم من أنه كثيراً ما يعطي التحليل بنقطة فردية زمنية قياس ملائم للسرعة الإبتدائية، فإنه في البداية يجب تحليل عدد من العينات عند أزمنة مختلفة للتأكد من أن الإشارة تأخذ مسار خطي مع الوقت خلال الفترة الزمنية المختارة تحت الظروف



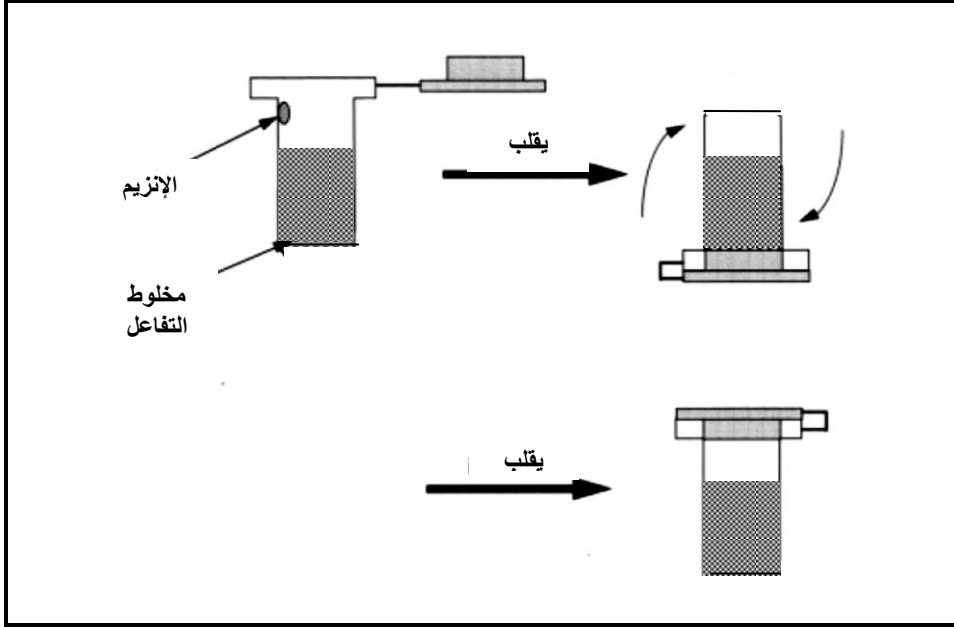
التجريبية. ويبدو من ذلك أن الطريقة غير المستمرة تأخذ مجهوداً كبيراً للتأكد من دقة القياس. ولهذا السبب ونظراً لإشتمالها على تقدير تقريبي، فإنه من المفضل استخدام الإختبارات المستمرة إذا أمكن ذلك.

#### ١٠-٢-٢ بدء وإيقاف التفاعل

في الإختبار النموذجي للإنزيم، فإن كل مكونات مخلوط التفاعل ما عدا إحداها تضاف إلى وعاء التفاعل، ويبدأ التفاعل عند الزمن صفر بإضافة المكون المفقود، الذي يمكن أن يكون الإنزيم أو المادة الخاضعة. وإختيار المكون الذي يبدأ به التفاعل سوف يعتمد على تفاصيل تصميم الإختبار وثباتية عينة الإنزيم لظروف الإختبار. وفي كلتا الحالتين فإن المكونات الأخرى يجب أن تخلط جيداً وتضبط من ناحية درجة الحرارة والـ pH والقوة الأيونية. ثم يبدأ التفاعل بإضافة حجم صغير من المحلول القياسي المركز للمكون المفقود (البادئ). واستخدام حجم صغير من المكون البادئ يضمن أن إضافة هذا المكون لا يغير بدرجة معنوية ظروف محلول التفاعل (درجة الحرارة والـ pH وغيرهما) لحجم التفاعل الكلي. وإذا لم يتحقق ذلك، فإن محلول التفاعل ومحلول المادة البادئة يجب أن يكونا متماثلين من ناحية محتوى المنظم ودرجة الحرارة والـ pH والعوامل الأخرى. والمحلول البادئ يجب ألا يزيد حجمه عن 5-10% من الحجم الكلي لمخلوط التفاعل.

والعينات يجب أن تخلط جيداً وبسرعة بعد إضافة محلول البدأ. وأحد الطرق المفيدة السريعة التي تؤدي إلى خلط كامل هو إضافة محلول البدأ على جانب وعاء التفاعل في صورة قطرة على الجدار أعلى باقي مخلوط التفاعل. وعند الزمن صفر يبدأ التفاعل بقلب الوعاء المغلق بلطف مرتين أو ثلاثة مرات لخلط المحلول. وشكل ١٠-٤ يوضح هذه الطريقة في أنبوب التحليل الطيفي. وعملية الخلط بهذه الطريقة قد تستغرق 10 ثواني أو أقل. وهذه الطريقة تكون مناسبة لقياسات التفاعلات التي تجري في فواصل زمنية 1 دقيقة أو أكثر. في بعض الحالات النادرة فإن معدل التفاعل الإنزيمي يكون سريعاً

بحيث لا يمكن قياسه بصورة ملائمة بهذه الطريقة. في هذه الحالة يجب اللجوء إلى طرق الخلط السريعة الخاصة مثل طرق السريان المتوقف (فصل ٦).



شكل ١٠-٤ الطريقة الشائعة لعمليات الخلط لبدء التفاعل الإنزيمي في أنبوب التحليل الطيفي

وطريقة قياس السرعة الابتدائية يعتمد على الطريقة المستخدمة، وهناك وسيلتين لذلك:

- في عدد من الإختبارات التي يستخدم فيها التحليل الطيفي، فإنه يمكن قياس التغير في الإمتصاص أو الإشعاع الضوئي للمادة الخاضعة أو ناتج التفاعل (للتعبير عن التغير في التركيز) كدالة في الوقت. ومن ثم فإنه لبدء الإختبار بعد عملية الخلط في أنبوب التحليل الطيفي يوضع الأنبوب المحتوي على محلول التفاعل مباشرة في الجهاز ويبدأ القياس بالضغط على المفتاح المناسب. والزمن الفاصل (التأخير بين الخلط وبدء القياس الحقيقي) يمكن أن يصل إلى ٢٠ ثانية. ومن ثم فإن النقطة الزمنية للتسجيل بجهاز التحليل الطيفي لن تكون نقطة الصفر الحقيقية (أي نقطة

الخط) للتفاعل. ولكن بالتجربة (الممارسة) يمكن خفض وقت التأخير إلى الحد الأدنى. وفي معظم الحالات يمكن إعتبار هذا الخطأ غير معنوي.

- في الإختبارات غير الطيفية (غير المستمرة) التي تزال فيها العينات من وعاء التفاعل عند أزمنة خاصة لإجراء القياس، فإننا نبدأ التوقيت (صفر) بإستخدام ساعة توقيت عند نقطة الخط ونقوم بالقياس عند فواصل زمنية محددة بعد نقطة البداية بإستخدام أحد طرق الفصل مثل HPLC. إفتراض على سبيل المثال أننا نريد قياس كمية الناتج المتكون كل 5 دقائق من بداية إلى نهاية التفاعل خلال سير التفاعل الذي يستغرق 30 دقيقة ونختبر الناتج بواسطة HPLC. إن القياس بـ HPLC بذاته يستغرق من 20 إلى 30 دقيقة لإتمامه. فإذا استمر التفاعل الإنزيمي أثناء فترة الفصل والقياس، فإن كمية الناتج التي تنتج خلال الفواصل الزمنية لا تعطي تقديرات دقيقة. وفي مثل هذه الحالات يجب خمد أو وقف التفاعل عند الوقت المحدد لمنع الإنتاج الإنزيمي الزائد للناتج أو الإستهلاك الزائد للمادة الخاضعة. والطرق المستخدمة في وقف التفاعل الإنزيمي تشمل تغيير طبيعة الإنزيم denaturation ببعض الطرق أو التجميد السريع لمحلول التفاعل. وبعض أمثلة وقف (خمد) التفاعل تشمل غمر المحلول في مخلوط من الثلج الجاف- الإيثانول لتجميد المحلول سريعاً ثم تغيير طبيعة الإنزيم بإضافة حمض قوي أو قاعدة قوية. بالإضافة إلى هذه الطرق يمكن أيضاً إضافة كاشف الذي يتداخل بطريقة خاصة مع الإنزيم. فعلى سبيل المثال فإنه يمكن وقف نشاط عديد من الإنزيمات المعدنية metalloenzymes بإضافة زيادة من عامل كلابي للمعدن مثل حمض إيثيلين ثنائي الأمين رباعي حمض الأسيتيك (EDTA) الذي يرتبط بالمعدن ويجعل الإنزيم غير نشط.

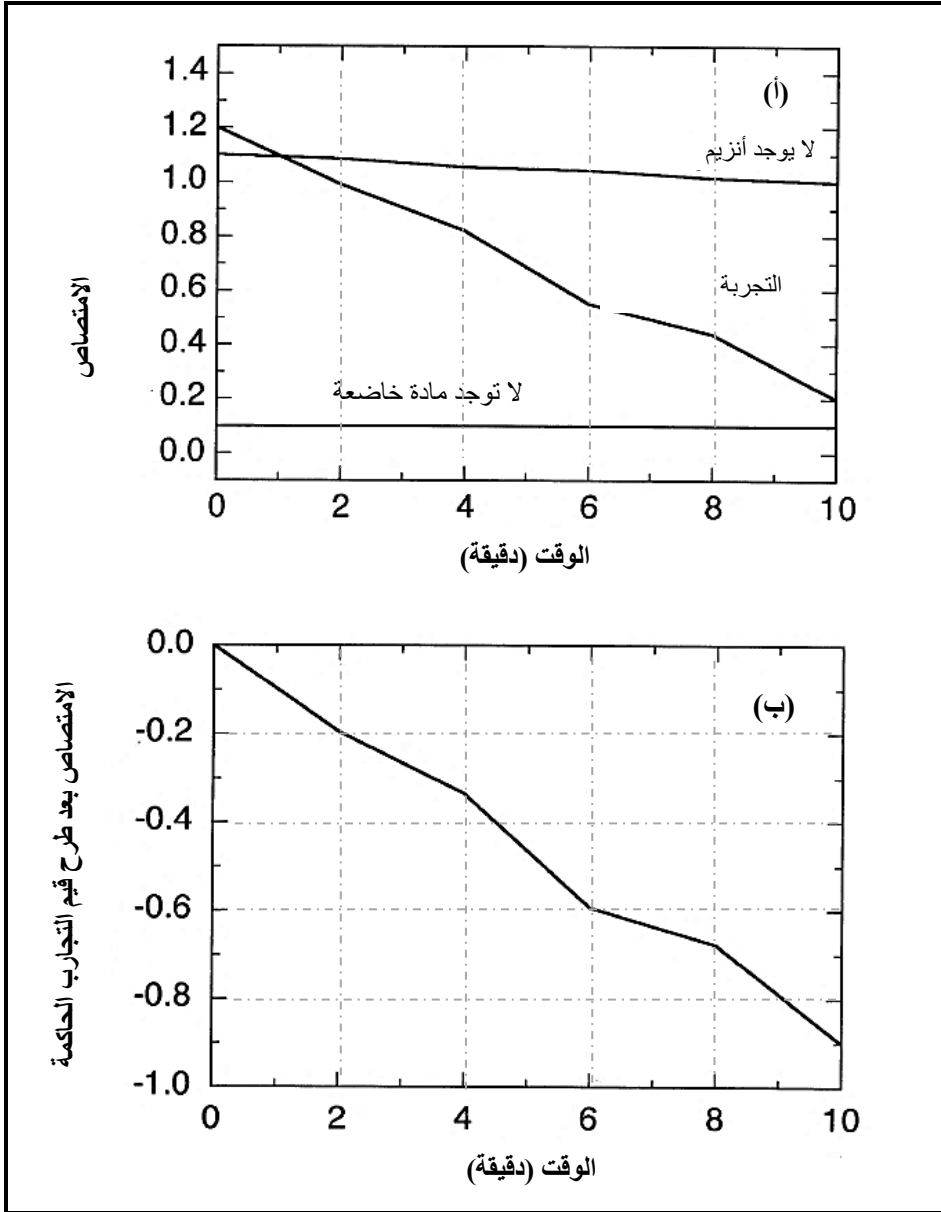
### ١٠-٢-٣ أهمية إجراء القياسات الحاكمة

بصرف النظر عن طريقة الكشف المستخدمة لتتبع التفاعل الإنزيمي يكون دائماً مهماً إجراء إثنين من القياسات الحاكمة control measurements: في إحداها توجد كل مكونات التفاعل ما عدا الإنزيم، وفي التجربة الأخرى المنفصلة يوجد كل مكونات التفاعل ما عدا المادة الخاضعة. وفي هاتين التجريبتين الحاكمتين يضاف المنظم buffer بحجم يقابل حجم محلول الإنزيم في التجربة الأولى وحجم يقابل محلول المادة الخاضعة في التجربة الثانية حتى يصبح حجم المحلولين مماثلاً للتجربة الأصلية. وجدول ١٠-١ هو نموذج لتحضير عينات التجربة والتجارب الحاكمة لتفاعل محفز إنزيمياً.

جدول ١٠-١ أحجام المحاليل المستخدمة في تحضير عينات التجربة والتجارب الحاكمة لنموذج تفاعل محفز إنزيمياً.

| الأحجام المضافة (μL) |                                 |         | مكونات التفاعل |
|----------------------|---------------------------------|---------|----------------|
| التجربة بدون الإنزيم | التجربة الحاكمة بدون مادة خاضعة | التجربة |                |
| 100                  | 0                               | 100     | المادة الخاضعة |
| 100                  | 100                             | 100     | المنظم         |
| 800                  | 890                             | 790     | ماء مقطر       |
| 0                    | 10                              | 10      | الإنزيم        |
| 1.0 mL               | 1.0 mL                          | 1.0 mL  | الحجم الكلي    |

وشكل ١٠-٥ أ يعرض السلوك الزمني الذي يمكن أن نراه للمحاليل الافتراضية في جدول ١٠-١. وفي هذه التجربة، فإن قراءة الامتصاص (الذي يعبر عن التغير في تركيز المادة الخاضعة) تزداد بمقدار 0.1 وحدة نتيجة لإمتصاص الإنزيم ذاته (لا توجد مادة خاضعة No substrate، شكل ١٠-٥ أ).



شكل ١٠-٥ أهمية إجراء القياسات الحاكمة (أ) السلوك الزمني للامتصاص لتفاعل إنزيمي إفتراضي (سير التجربة) مع إثنين من العينات الحاكمة: أحدهما تحتوي على كل مكونات مخلوط التفاعل ما عدا الإنزيم (لا يوجد إنزيم) والأخرى تحتوي على كل مكونات مخلوط التفاعل ما عدا المادة الخاضعة (لا توجد مادة خاضعة). في هذه التجربة فإن الإنزيم يمتص أساساً عند الطول الموجي للقياس التحليلي، بدرجة كافية لإزاحة قياس نقطة الصفر بحوالي 0.1 وحدة امتصاص. (ب) قراءة التجريبتين الحاكمتين عند كل وقت قراءة قد طرحت من القياسات التجريبية لتنتج السلوك الزمني الحقيقي للتفاعل.

ولعمل تصحيح لذلك، فإننا نطرح هذه القيمة الثابتة من كل نقاط البيانات التجريبية. وبالمثل يجب أيضاً أن نطرح مقدار التغير في الامتصاص التلقائي في التجربة الحاكمة "No enzymes" من كل نقاط البيانات التجريبية ليعطي منحني الفرق في الامتصاص في شكل ١٠-٥ ب. وقياس ميل منحني الاختلاف هذا يعطي سرعة التفاعل الحقيقية. وقد يبدو أن عدم التصحيح لهذا الاختلاف في الامتصاص التلقائي قد يكون صغيراً، إلا أنه في الحقيقة وجد أن السرعة المقاسة من البيانات غير المصححة تختلف بمقدار أكثر من 10% عن البيانات المصححة في هذا المثال.

#### ١٠-٢-٤ ظروف التفاعل

سرعة التفاعل الإنزيمي قد تظهر حساسية ملحوظة لعدد من ظروف محلول التفاعل (مثل درجة الحرارة والـ pH والقوة الأيونية). والفشل في التحكم في هذه العوامل يؤدي إلى أخطاء معنوية في قياس السرعة وعدم القدرة على إعادة إنتاج قياسات السرعة مرة أخرى. ومن ثم فإنه يجب تثبيت هذه العوامل أثناء القياس الفردي ومن قياس إلى قياس آخر. في هذا الجزء سوف نناقش باختصار هذه العوامل، وفي قسم ١٠-٣ سوف نناقش تأثير هذه العوامل على سرعة التفاعل الإنزيمي.

#### (أ) درجة الحرارة

حيث أن درجة حرارة مخلوط التفاعل يمكن أن يكون لها تأثيراً كبيراً على سرعة التفاعل فإنه من الضروري المحافظة على درجة حرارة ثابتة أثناء قياس السرعة الابتدائية باستخدام حمام مائي ثابت الحرارة أو حجرة ثابتة الحرارة.

● في التفاعلات التي تبدأ بإضافة المادة الخاضعة لمخلوط التفاعل فإن محلول المادة الخاضعة يجب أن تضبط درجة حرارته إلى نفس درجة حرارة محلول التفاعل قبل عملية الخلط.

- في التفاعلات التي تبدأ بإضافة الإنزيم فإنه كثيراً ما يحفظ بروتين الإنزيم الأصلي على درجة حرارة  $4^{\circ}\text{C}$  قبل الاختبار لضمان ثباته. في هذه الحالة فإنه من المفضل استخدام محلول إنزيم أصلي مركز بحيث يمكن إضافة حجم صغير إلى مخلوط التفاعل الذي سبق ضبط درجة حرارته إلى درجة حرارة الاختبار. وفي الاختبار النموذجي من هذا النوع، فإننا يمكن أن نضيف  $10-50\ \mu\text{L}$  من المحلول الأصلي (درجة حرارته  $4^{\circ}\text{C}$ ) إلى  $1.0\ \text{mL}$  من مخلوط التفاعل الذي ضبطت درجة حرارته إلى  $25^{\circ}\text{C}$  أو  $37^{\circ}\text{C}$ . والحجم الصغير من الإنزيم لن يحدث تغيير ملموس في درجة حرارة الحجم الكلي لمخلوط التفاعل. وإذا استخدم حجم كبير من المحلول الأصلي للإنزيم، يجب في هذه الحالة ضبط درجة حرارته إلى درجة حرارة مخلوط التفاعل.

#### (ب) التحكم في الـ pH

إن pH مخلوط التفاعل تكون بصورة عامة هي الـ pH المثلى للإنزيم أو الـ pH الفسيولوجية. مع ذلك، فإنها يمكن أن تختلف عن أي من هاتين القيمتين لأغراض خاصة. وتحت جميع الظروف فإنه يجب تثبيت الـ pH أثناء تقدم التفاعل، وهذا يتحقق باستخدام محلول منظم buffer. ويجب استخدام تركيز كافٍ من المحلولة المنظم عند الـ pH التي يعمل عندها المنظم بكفاءة. ويمكن التأكد من ذلك بقياس الـ pH لأحد مخاليط التفاعل قبل وبعد حدوث التفاعل للتأكد من عدم تغيير محسوس في الـ pH أثناء قياس التفاعل.

#### (ج) القوة الأيونية

القوة الأيونية لمعظم التفاعلات الفسيولوجية تتغير قليلاً أثناء التفاعل. بالرغم من ذلك فإن إضافة مواد أيونية إلى مخلوط التفاعل التالي، خاصة المثبطات يمكن أن تغير القوة الأيونية معنوياً. وعند احتمال حدوث هذا التغير، فإنه يكون من المفيد تقدير تأثير هذا التغير في القوة الأيونية بإضافة ملح بتركيز مساوٍ لمخلوط التفاعل.

**(د) تركيز المادة الخاضعة وتركيز الإنزيم**

في المنهج التجريبي العام من المفضل إستخدام خمسة تركيزات مختلفة في كل سلسلة تقديرات. وما لم توجد عوامل أخرى مثل الذوبانية أو التكلفة فإنه كقاعدة عامة من المفضل أن يغطي تركيز المادة الخاضعة المدى الذي يعطي %20-80 من السرعة القصوى وهذا يقابل تركيز للمادة الخاضعة في المدى من  $0.25 K_m$  إلى  $5.0 K_m$ . أيضاً فإنه كقاعدة عامة يجب أن يكون تركيز الإنزيم أقل كثيراً عن تركيز المادة الخاضعة.

**٣-١٠ العوامل التي تؤثر على سرعة التفاعلات الإنزيمية**

كما ذكرنا في قسم ١٠-٢-٤ أن سرعة التفاعلات الإنزيمية تظهر حساسية ملحوظة لبعض العوامل في ظروف التفاعل (مثل درجة الحرارة والـ pH وغيرهما) ومن ثم فإنه يجب التحكم في هذه العوامل أثناء سير التفاعل الإنزيمي حتى لا تكون قياسات السرعة غير دقيقة. من ناحية أخرى فإنه في بعض الحالات فإن التغيرات المحكومة في بعض هذه العوامل يمكن أن تعطي معلومات مفيدة عن سمات آليات الحفز الإنزيمي. لذلك فإنه في هذا الجزء سوف نناقش العوامل التي تؤثر على سرعة التفاعل الإنزيمي التي يمكن التحكم فيها للحصول على نتائج دقيقة مهمة عن سرعة التفاعل وبعض سمات الحفز الإنزيمي.

**١-٣-١٠ تركيز الإنزيم**

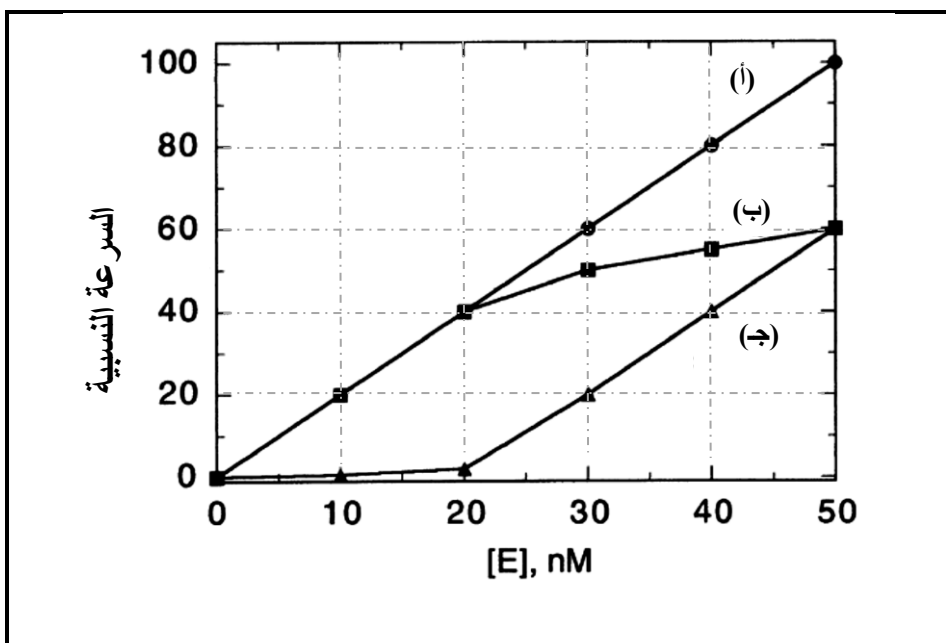
في فصل ٦ في مناقشتنا لمعادلة ميكليس- منتين أوضحنا أن تركيز المادة الخاضعة يؤثر على سرعة التفاعل الإنزيمي. وفي نهاية اشتقاق معادلة ميكليس- منتين أعدنا صياغة المعادلة بإحلال الحد  $V_{max}$  كناتج ضرب  $k_{cat}$  مع  $[E_t]$  وهو التركيز الكلي للإنزيم في العينة (معادلة ٦-٢٥). وهذه المعادلة تشير إلى أن سرعة التفاعل المحفز إنزيمياً يجب أن تتناسب خطياً مع تركيز الإنزيم الموجود عند تركيز ثابت من المادة الخاضعة. ولقد وجد أنه خلال مدى محدود من تركيز الإنزيم، فإن رسم السرعة كدالة



في تركيز الإنزيم (E) عند تركيز مثبت من المادة الخاضعة يعطي خط مستقيم كما هو موضح في شكل ٦-١٠ (أ) ولكن هذه العلاقة لا تتحقق تحت كل الظروف. والانحراف عن الخطية يرجع لعاملين:

● راجع من فصل ٦ أن قياسات السرعة الابتدائية تكون سارية (فعالة) في مدى استهلاك المادة الخاضعة بين 0 و 10% من التركيز الابتدائي للمادة الخاضعة. وبإضافة مزيد من الإنزيم، فإن السرعة يمكن أن تزيد إلى النقطة التي عندها يتم استهلاك كمية كبيرة من التركيز الكلي للمادة الخاضعة أثناء الاختبار. وعندما يصبح استهلاك المادة الخاضعة كبيراً (معنوياً)، فإن أى زيادة إضافية في تركيز الإنزيم لن يؤدي إلى استمرار الانحدار الخطي في سرعة التفاعل كدالة في (E). ونتيجة لذلك، فإننا يمكن أن نشاهد علاقة خطية بين السرعة كدالة في  $[E]$  عند التركيز المنخفض ولكن بعدها عند التركيزات العالية من (E) تختفي هذه العلاقة الخطية ويمكن أن تصل إلى ظاهرة التشبع كما هو موضح في المنحنى ب شكل ٦-١٠. وكقاعدة عامة فإن تركيز الإنزيم في التجربة يجب أن يكون أقل كثيراً عن تركيز المادة الخاضعة  $[S] \gg [E]$  وفي الاختبار النموذجي فإن تركيز المادة الخاضعة يكون بالميكرومولر إلى الميلي مولر بينما تركيز الإنزيم المستخدم يكون بالبيكومولر إلى نانومولر. ومن ثم فإنه في البداية يجب قياس السرعة الابتدائية لعدد من تركيزات الإنزيم لتعيين مدى  $[E]$  الذي عنده لا يحدث استفاد للمادة الخاضعة.

● إذا وجدت كمية صغيرة من مثبط غير عكسي (أنظر فصل ١١) في أحد عناصر مخلوط التفاعل، فإن وجود تركيز منخفض من الإنزيم سوف يؤدي إلى تثبيط كامل للإنزيم ولا يشاهد أى نشاط للإنزيم. والنشاط الإنزيمي سوف يشاهد فقط إذا كان تركيز الإنزيم أعلى من تركيز المثبط. ومن ثم فإنه عند التركيزات المنخفضة من الإنزيم تكون السرعة صفر أو صغيرة جداً، فقط عند تركيز حرج (كبير) للإنزيم، فإن السرعة سوف تكون خطية كما هو موضح في المنحنى (ج) في شكل ٦-١٠.



شكل ١٠-٦ السرعة النسبية لتفاعل إنزيمي تحت ظروف محكمة كدالة في التركيز الكلي للإنزيم  $[E]$ . منحنى العلاقة الخطية المتوقع (المنحنى أ). المنحنى (ب) يشرح نوع السلوك المشاهد عندما يكون استنفاد المادة الخاضعة كبيراً عند التركيز العالي للإنزيم، المنحنى (ج) يوضح السلوك الذي يشاهد لعينة الإنزيم التي تحتوي على مثبط غير عكسي.

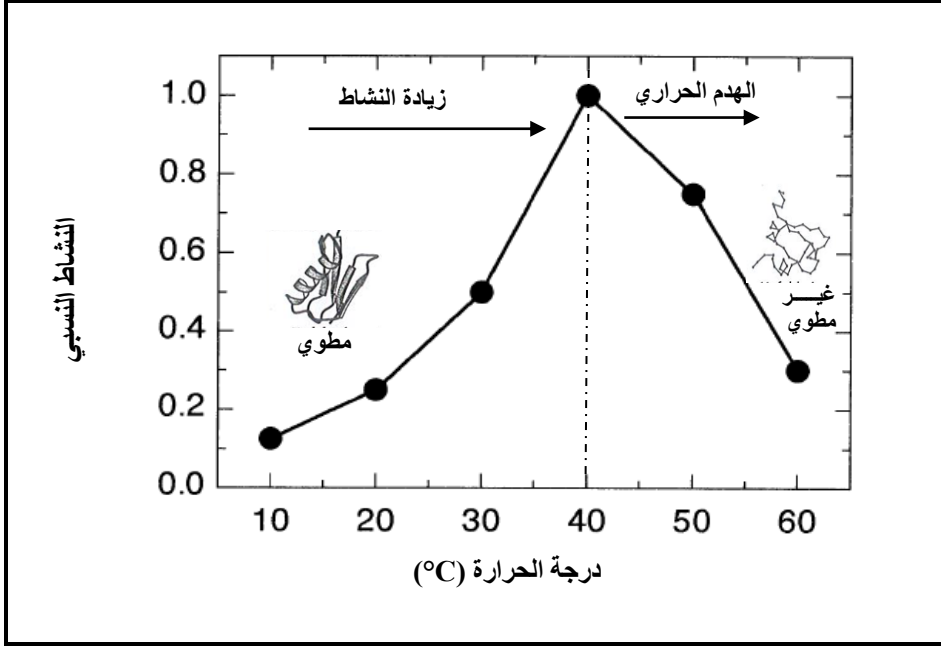
والسلوك في المنحنى (ج). يشاهد أيضاً في حالة الإنزيم الأصلي (المخزن) الذي يحتوي على العامل المساعد cofactor أو المنشط الإنزيمي coactivator الذي لا يوجد في بقية مكونات التفاعل، افترض أن الإنزيم تحت الدراسة  $E$  يحتاج إلى عامل مساعد  $C$  للذان يكونان في حالة اتزان. إن كمية الإنزيم النشط (أي  $EC$ ) لا ترتبط خطياً مع كمية الإنزيم المضافة لمخلوط التفاعل عند قيم  $[E]$  المنخفضة، ومن ثم حدوث ارتفاع في منحنى السرعة في شكل ١٠-٦ (ج). وللتغلب على ذلك، فإنه يمكن إضافة مزيد من العامل المساعد في مخلوط التفاعل.

### ١٠-٣-٢ تأثير درجة الحرارة

من المعروف أن ارتفاع درجة الحرارة يزيد معدل التفاعلات الكيميائية نتيجة لزيادة الطاقة الحركية ومعدل تصادم (أو تلاقي) الجزيئات المتفاعلة. ومعظم الحفازات الكيميائية تظهر مثل هذه الزيادة بارتفاع درجة الحرارة، والإنزيمات كحفازات بيولوجية ليست إستثناءً من ذلك. مع ذلك فإن الإنزيمات كونها جزيئات بروتينية، فإنها مثل البروتينات الأخرى تتعرض للهدم الحراري thermal denaturation عند درجات الحرارة المرتفعة. ومن ثم فإن تعزيز الكفاءة الحفزية برفع درجة الحرارة يتضمن تأثيرات منافسة من الهدم الحراري (تغيير التركيب الطبيعي للبروتين denaturation الذي يؤدي إلى فقد الإنزيم نشاطه) عند درجات الحرارة المرتفعة. ولهذا السبب فإن النشاط الإنزيمي النموذجي سوف يزيد خلال مدى معين من درجة الحرارة، ثم ينخفض أعلى من درجة حرارة التي تكون مميزة لتغيير التركيب الطبيعي للبروتين (شكل ١٠-٧).

ومنحنيات النشاط كدالة في درجة الحرارة مثل تلك المعروضة في شكل ١٠-٧ يكون لها أهمية عملية في إختيار درجة الحرارة في إختبارات الإنزيمات. فيكون مرغوب قياس النشاط الإنزيمي عند درجة حرارة التي تعطي نشاط إنزيمي عالي والتي لا تؤدي إلى تغير التركيب الطبيعي لبروتين الإنزيم. وبمراعاة هذين العاملين نجد أن الجزء الأكبر من إختبارات الإنزيمات قد أجريت عند  $25^{\circ}\text{C}$  أو  $37^{\circ}\text{C}$  (أي درجة الحرارة الفسيولوجية).

إذا ركزنا إهتمامنا على مدى درجة الحرارة قبل أن يحدث تغير في التركيب الطبيعي لبروتين الإنزيم نجد أن تغير درجة الحرارة في هذا المدى يؤدي إلى تغير في المعلمات (البارامترات) الحركية للإنزيم. راجع من فصل ٣ أن معدل التفاعل يمكن أن يرتبط بطاقة التنشيط  $E_a$  (أو  $\Delta G^{\ddagger}$ ) للوصول إلى الحالة الانتقالية بواسطة معادلة أرهنيوس (معادلة ٣-٨). هذه العلاقة تكون أيضاً صحيحة للحفز الإنزيمي ما دام لم يحدث تغير في التركيب الطبيعي لبروتين الإنزيم في مدى درجة الحرارة التي تجري عليها الدراسة. إننا يمكن أن نربط الثابت الحركي  $k_{cat}$  بطاقة التنشيط كالتالي:



شكل ١٠-٧ المظهر النموذجي لنشاط الإنزيم كدالة في درجة الحرارة. رفع درجة الحرارة يزيد النشاط الإنزيمي، وعند درجة حرارة حرجية يبدأ بعدها إنخفاض النشاط الإنزيمي نتيجة لتغيير التركيب الطبيعي (التركيب النشط) للإنزيم.

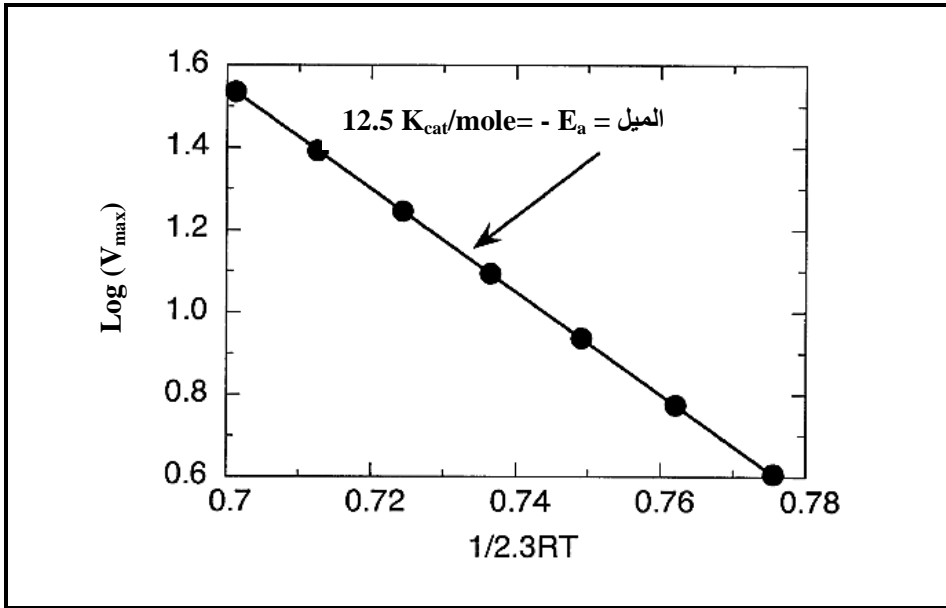
$$k_{cat} = Ae^{-E_a/RT} \quad (١٠-٤)$$

حيث R ثابت الغاز المثالي ( $1.98 \times 10^{-3}$  kcal/mol.degree) و T درجة الحرارة المطلقة بالكلفن. وسوف نعتبر معامل ما قبل الأس A هنا كثابت وبأخذ  $\log_{10}$  لكلا الطرفين لمعادلة ١٠-٤ نحصل على:

$$\log (k_{cat}) = -E_a \frac{1}{2.3 RT} + \log (A) \quad (١٠-٥)$$

ومن ثم إذا رسمنا  $\log (k_{cat})$  للتفاعل الإنزيمي كدالة في  $1/2.3 RT$ ، فإن معادلة ١٠-٥ تتنبأ بالحصول على علاقة خطية مع ميل يساوي  $-E_a$ ، وهى طاقة التنشيط بوحدة kcal/mol. لاحظ أن العلاقات الموصوفة بالمعادلتين ١٠-٤ و ١٠-٥ تبقى صحيحة لـ

$V_{max}$  تحت تركيز ثابت من الإنزيم ( $k_{cat} = V_{max} [E_t]$ ) مثل  $k_{cat}$ . وعندما لا يكون متاحاً تقدير دقيق لتركيز الإنزيم في المحلول الأصلي، فإننا يمكن أن نبقي كمية المحلول الأصلي المستخدم في الاختبار ثابتاً ونعين طاقة التنشيط للتفاعل باستخدام قيم  $V_{max}$  المقاسة بدلاً من  $k_{cat}$  في معادلة ١٠-٥. وشكل ١٠-٨ يعرض رسم أرهنيوس لإنزيم إفتراضى له طاقة تنشيط مقدارها 12.5 kcal/mol مقاس في مدى درجة حرارة 10-40°C. ومن ثم فإنه بدراسة تأثير درجة الحرارة على  $k_{cat}$  (إذا كان تركيز الإنزيم معلوماً) أو على  $V_{max}$  (إذا كان تركيز الإنزيم غير معلوماً مع تثبيت كمية المحلول المستخدم) للتفاعل الإنزيمي يمكن منها تقدير طاقة التنشيط  $E_a$  للتفاعل.



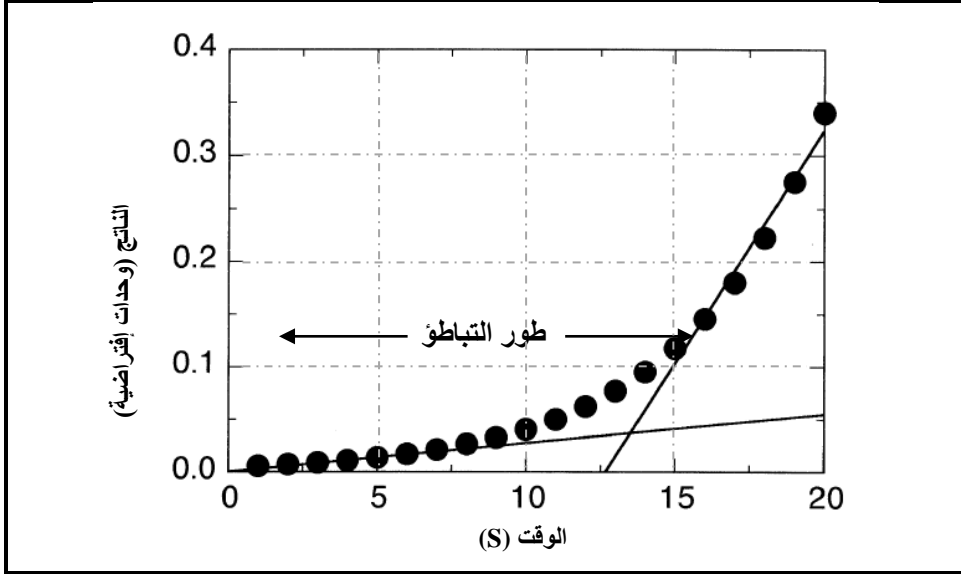
شكل ١٠-٨ رسم أرهنيوس للعلاقة بين  $\log (V_{max})$  للتفاعل الإنزيمي كدالة في  $1/(2.3RT)$ . وميل الخط في هذا الرسم يعطي تقدير للقيمة السالبة لـ  $E_a$ ، وهى طاقة التنشيط لهذا التفاعل.

ونظراً لأن درجة حرارة مخلوط التفاعل يمكن أن يكون لها تأثيراً كبيراً على المعلمات (البارامترات) الحركية ( $k_{cat}$ ,  $V_{max}$ ) للتفاعل المحفز إنزيمياً، يكون مهماً جداً ضبط درجة الحرارة أثناء قياس السرعة الابتدائية. وفي حالة التفاعلات التي تبدأ بإضافة المادة

الخاضعة، فإن مخلوط التفاعل ومحلول المادة الخاضعة يجب أن تتساوى في درجة الحرارة قبل خلطهما. وفي التفاعلات التي تبدأ بإضافة الإنزيم، فإنه يكون مرغوباً أحياناً المحافظة على ثبات البروتين بالمحافظة على محلول الإنزيم الأصلي (الخام) عند درجة حرارة  $4^{\circ}\text{C}$  (درجة حرارة الثلج) قبل إجراء الاختبار. وفي هذه الحالات، فإنه يكون من المفضل استخدام الإنزيم الأصلي بصورة مركزة جداً حتى يكون مطلوباً إضافة حجم صغير إلى مخلوط التفاعل الكلي الذي سبق ضبط درجة حرارته إلى درجة حرارة الاتزان. وفي الاختبار النموذجي من هذا النوع، فإننا يمكن أن نضيف  $10-15\ \mu\text{L}$  من محلول الإنزيم الأصلي (المخزن عند  $4^{\circ}\text{C}$ ) إلى  $1.0\ \text{mL}$  من مخلوط التفاعل الذي ضبطت درجة حرارته إلى  $25^{\circ}\text{C}$  أو  $37^{\circ}\text{C}$ . وهذا الحجم الصغير سوف لا يغير (يشوش) معنوياً درجة حرارة مخلوط التفاعل الكلي، والإنزيم سوف يصل إلى درجة حرارة الاختبار أثناء الخلط. وإذا استخدم حجم كبير من الإنزيم الأصلي في هذه الاختبارات، فإنه قد لا يتم الوصول إلى درجة حرارة التوازن أثناء فترة الخلط. وهذا سوف يظهر كطور تباطؤ lag phase في قياسات السرعة الابتدائية كما هو موضح في شكل ١٠-٩. وأطوار التباطؤ من هذا النوع يمكن أن تؤدي إلى خطأ معنوي في الاختبارات من نوع النقطة النهائية، حيث أنه يمكن الإخفاق في إدراك طور التباطؤ. لذلك فإنه يجب إجراء قياسات حاكمة عند أزمنة مختلفة في هذه الحالات، للتأكد أن مثل هذه التأثيرات لعدم الاتزان لدرجة الحرارة لا يؤثر على القياسات.

### ١٠-٣-٣ تأثيرات الرقم الهيدروجيني (pH)

معظم الإنزيمات تكون نشطة خلال مدى ضيق من الـ pH، نموذجياً من 5 pH إلى 9 pH والتغير في pH محلول الإنزيم عن مدى محدد يؤثر على النشاط الحفزي الكلي للإنزيم بعدة طرق:



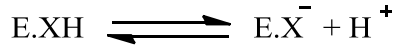
شكل ٩-١٠ مثال لتقدم سير التفاعل موضحاً طور تباطؤ طويل قبل الوصول إلى معدل الحالة الثابتة للتفاعل. ومثل هذا الطور المتباطئ يمكن أن يحدث بواسطة عدة عوامل التي تشمل توازن درجة الحرارة غير الكفؤ بين الإنزيم ومحلل مخلوط التفاعل.

- ١- التأثير على ارتباط المادة الخاضعة بالإنزيم
- ٢- التأثير على حالات التأين لبواقي الأحماض الأمينية المشتملة في النشاط الحفزي للإنزيم.
- ٣- التأثير على تأين المادة الخاضعة.
- ٤- تغيير البنية الفراغية لبروتين الإنزيم (عادة تكون هامة فقط عند القيم الحادة (الأقصى والأدنى لـ pH) الذي يؤدي إلى فقد النشاط الإنزيمي. ومدى الـ pH التي تكون عندها الحالة الطبيعية للإنزيم ثابتة تختلف من إنزيم إلى آخر. وبالرغم من أن معظم الإنزيمات تكون أكثر ثباتاً بالقرب من الـ pH الفسيولوجية (7.4~)، فإن بعضها يظهر نشاط أقصى عند pH أعلى أو أقل كثيراً عن الـ pH الفسيولوجية.

نموذجياً نجد أن البنية الفراغية للبروتين يمكن أن تبقى على صورتها الطبيعية على مدى واسع نسبياً من الـ pH، حوالي 4-5 وحدات pH. مع ذلك فإنه خلال

هذا المدى نجد أن سرعة التفاعل الإنزيمي تتغير مع تغير الـ pH نتيجة للعوامل الثلاثة الأولى المذكورة أعلى. وشكل ١٠-١٠ يظهر النمط النموذجي لسرعة تفاعل إنزيمي كدالة في الـ pH خلال مدى الـ pH التي لا يكون فيها تغير طبيعة البروتين هو العامل الرئيسي. والنقطة المهمة التي يمكن إستخلاصها من هذا الشكل هو أنه يوجد مدى ضيق من الـ pH الذي يكون عندها الحفز الإنزيمي أقصاه.

ولتوضيح ذلك، دعنا نأخذ مثال لإنزيم الذي يعتمد نشاطه الحفزي على السلسلة الجانبية لحمض أميني معين ( $X^-$ ) التي تكون قادرة على العمل كمستقبل للبروتون، إعتقاداً على المعادلة التالية:



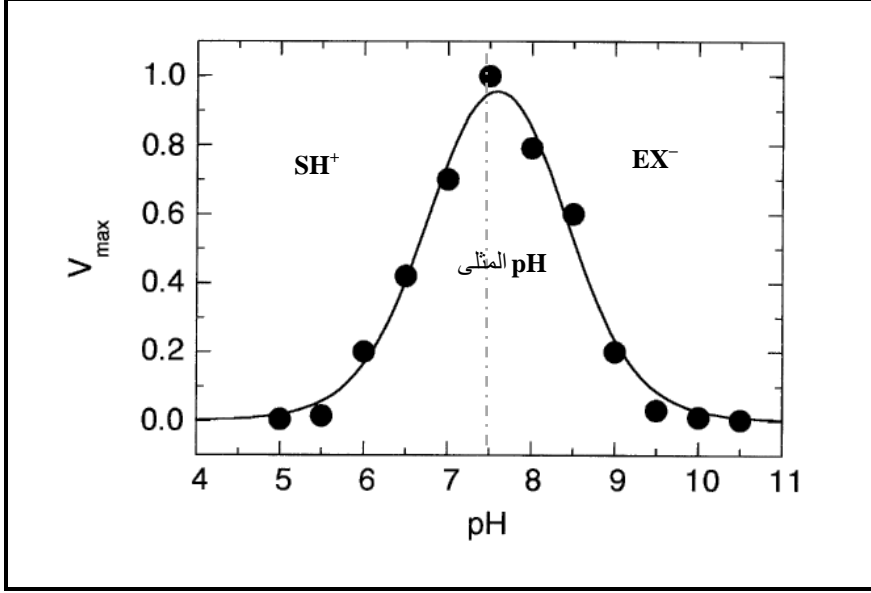
حيث  $E.XH$  هو الإنزيم الذي تكون فيه السلسلة الجانبية للحمض الأميني في الصورة المرتبطة و  $E.X^-$  هي الصورة التي تستقبل البروتون. عند قيم الـ pH المنخفضة، فإن الإنزيم سوف يوجد إلى حد بعيد في الصورة  $E.XH$ ، وتفكك  $E.XH$  مع زيادة الـ pH يوصف بمعادلة هندرسون-هالسبالخ في معادلة (٣-٤٤).

ولمعظم اختبارات النشاط الإنزيمي، فإننا يجب أن نحافظ على pH محلول التفاعل عند القيمة المثلى للحفز الإنزيمي. وللمحافظة على هذا المدى من الـ pH، فإنه يجب إضافة منظم buffer إلى مخلوط التفاعل الذي يكون له  $pK_a$  مماثلة أو قريبة من قيمة الـ pH المطلوبة لمحلول التفاعل.

والمنظم هو أنواع كيميائية الذي ينتج عن وجوده في المحلول مقاومة التغير في الـ pH لهذا المحلول نتيجة لإضافة حمض أو قاعدة. ومتاح تجارياً عدة منظمات مفيدة في الدراسات الإنزيمية، وبعض هذه المنظمات مسجل في جدول ١٠-٢. وكفاءة هذه



المنظمات وغيرها من المنظمات الأخرى تتخفض بالتحرك بعيداً عن قيمة  $pK_a$  لمادة المنظم.



شكل ١٠-١٠ تأثير الـ pH على سرعة تفاعل إنزيمي نموذجي. الإنزيم سالب الشحنة  $EX^-$  يرتبط بمادة خاضعة موجبة  $SH^+$ . فقط في المنطقة تحت المنحنى، فإن كل من الإنزيم والمادة الخاضعة يحملان الشحنة المناسبة للتفاعل. ويكون المعدل أقصاه عند الـ pH المثلى.

وبصورة عامة فإن المنظمات تعطي كفاءة تنظيم جيدة في المدى من وحدة pH أعلى ووحدة pH أدنى من قيم  $pK_a$  الخاصة بها. فعلى سبيل المثال، فإن المنظم إيميدازول يمكن أن يستخدم لتنشيط pH المحلول بين قيم pH من 6.0 إلى 8.0، ولكنه يكون منظم غير مناسب أدنى من 6.0 pH أو أعلى من 8.0 pH.

والمنظمات المسجلة في جدول ١٠-٢ تغطي مدى واسع من قيم الـ  $pK_a$  على افتراض استخدام منظم فردي للمحافظة على قيم pH خاصة لمحلول التفاعل. لاحظ أيضاً أن قيم  $pK_a$  المسجلة في جدول ١٠-٢ هي للمنظمات عند  $25^\circ C$  وعند التخفيف اللانهائي. إن درجة الحرارة، وتركيز المنظم والقوة الأيونية الكلية يمكن أن تؤثر على هذه

الـ  $pK_a$  ، ومن ثم تغيير pH المحلول النهائي. وفي معظم الدراسات الإنزيمية فإن المنظم يستخدم بتركيز نهائي لمحلول التفاعل 0.05–0.1 M والقوة الأيونية للمحلول تكون نموذجياً بين 0.1M و 0.2M (قريباً من الظروف الفسيولوجية).

جدول ١٠-٢ بعض المنظمات التي تستخدم في الدراسات الإنزيمية

| الاسم المختصر | الاسم الكامل                                             | $pK_a$ (25°C)* | $\Delta pK_a / \Delta^\circ C$ |
|---------------|----------------------------------------------------------|----------------|--------------------------------|
| MES           | 2-(N-morpholino) ethane sulfonic acid                    | 6.15           | -0.011                         |
| PIPES         | Piperazine-N,N'-bis (ethanes sulfonic acid) Imidazol     | 6.80           | -0.0085                        |
|               | Imidazol                                                 | 7.00           | -0.020                         |
| MOPS          | 3-(N-morpholino) 2-hydroxypropane sulphonic acid)        | 7.20           | -0.013                         |
| TES           | N-tris (hydroxymethyl) methyl-2-aminoethan-sulfonic acid | 7.50           | -0.020                         |
| HEPES         | N-(2-hydroxyl)piperazine-N' (ethane sulfonic acid)       | 7.55           | -0.014                         |
| HEPPS         | N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-propane-sulfonic acid      | 8.00           | -0.015                         |
| Tris          | Tris(hydroxymethyl) aminoethane                          | 8.30           | -0.031                         |
| CHES          | 2-(N-cyclohexylamino) ethanesulfonic acid                | 9.50           | -0.029                         |
| CAOS          | 2-(Cyclohexylanino)-1-propane sulfonic acid              | 10.40          | -0.032                         |

\* القيم المسجلة للمنظمات عند التخفيف النهائي

المشكلة الثانية لتغيير  $pK_a$  المنظم هي التي تحدث نتيجة لتغير درجة حرارة المحلول. في بعض الحالات فإن pH المحلول المضاف إليه المنظم يمكن أن تتغير كثيراً بالتغيرات الكبيرة في درجة الحرارة. و جدول ١٠-٢ مسجل فيه التغير في الـ  $pK_a$  لكل تغير في درجة الحرارة بوحدة كلايسس (المئوية) للمنظمات المسجلة. إذا رغب إجراء الاختبار عند درجة حرارة أعلى (مثال ذلك 37°C)، فإن مقياس الـ pH يجب أن

يعاير عند درجة حرارة الإختبار وتجري أيضاً كل قياسات الـ pH عند نفس درجة الحرارة. وهذا سوف يضمن أن كل قيم الـ pH المقاسة تعكس بالضبط قيم الـ pH الحقيقية تحت ظروف الاختبار. في بعض الحالات قد يرغب الباحث في قياس النشاط الإنزيمي في مدى من درجات الحرارة بينما يحافظ على الـ pH عند قيمة ثابتة. وفي مثل هذه الدراسات يكون من الأفضل استخدام منظم له قيمة  $\Delta pK_a / \Delta^\circ C$  منخفضة للحفاظ على حد أدنى من التغيرات في الـ pH على مدى درجة الحرارة المستخدم. مثال ذلك في فإنه من جدول ١٠-٢ نجد أن PIPES ( $\Delta pK_a / \Delta^\circ C = -0.0085$ ) و MES ( $\Delta pK_a / \Delta^\circ C = -0.011$ ) يكونا إختيار جيد لهذا الغرض.

من ناحية أخرى فإنه بدراسة تأثير الـ pH على الحفز الإنزيمي فإننا يمكن أن نحصل على معلومات مفيدة عن آلية الحفز فيما يتعلق بالمجموعات الحمضية - القاعدية المشاركة في عملية الحفز. وقياس السرعة كدالة في تركيز المادة الخاضعة عند قيم pH مختلفة، فإننا يمكن في نفس الوقت أن نعين تأثيرات الـ pH على قيم  $k_{cat}/K_m$ ,  $K_m$ ,  $k_{cat}$  ( $V_{max}$ ) للتفاعل المحفز إنزيمياً كالتالي:

- إعتدال  $K_m$  على الـ pH يعكس اشتغال التفاعل على مجموعات حمض - قاعدة التي تكون مهمة في الأحداث الأولى لإرتباط المادة الخاضعة بالإنزيم التي تسبق عملية الحفز.

- تأثيرات الـ pH على  $k_{cat}$  تعكس أساساً إشتغال التفاعل على مجموعة حمض قاعدة في خطوات حفز تحول المادة الخاضعة إلى ناتج التفاعل، بمعنى أن خطوات التأين تحدث في معقد الإنزيم - المادة الخاضعة.

- رسم  $k_{cat}/K_m$  كدالة في الـ pH يعكس المجموعات الأساسية المتأينة في الإنزيم الحر التي تلعب دوراً في كل من ارتباط المادة الخاضعة وعملية الحفز.

والرسوم البيانية للعلاقات المذكورة تستخدم في تعيين  $pK_a$  (من نقط الانقلاب المشاهدة في المنحنيات) ومن ثم التنبؤ بهوية الأحماض الأمينية المشاركة في عملية الحفز الحامضي - القاعدي. كمثال دعنا ننظر إلى منحنيات الـ pH لإنزيم كيموتريسين

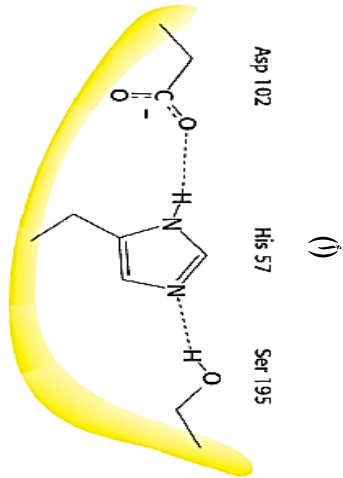
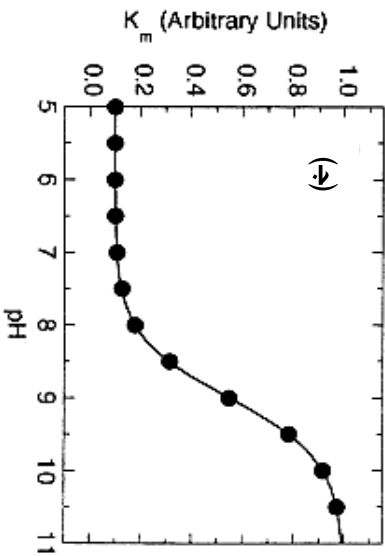
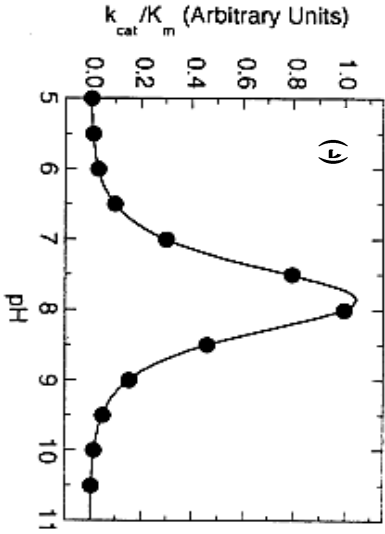
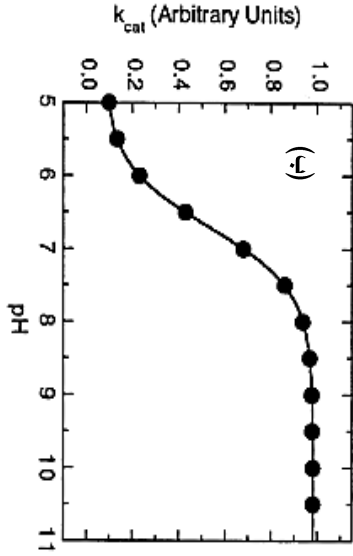
Chymotrypsin- وهو أحد أنزيمات السيرين المحللة للبروتينات. وكما أوضحنا في قسم ٨-٥، فإن الموقع النشط في هذا الإنزيم يشتمل على ثلاثة مجموعات حفزية تُولف من Ser-195 و Asp-102 و His-57 (شكل ١٠-١١أ). والحفز الإنزيمي يشتمل على أسئلة (إدخال مجموعة الأسيتايل على) السيرين Ser-195 لتكوين مركب تساهمي وسيط، وتحلل الرابطة الببتيدية تعتمد على الارتباط الهيدروجيني وخطوات نقل البروتون فيما بين المجموعات الحفزية في الموقع النشط الثلاثي.

رسم العلاقة بين  $K_m$  كدالة في الـ pH و  $k_{cat}$  كدالة في الـ pH لإنزيم كيموتريسين (شكل ١٠-١١ ب وج) يظهران منحنى الذي يتطابق جيداً مع معادلة هندرسون-هالسبالخ التي عرضت في فصل ٣ (معادلة ٣-١٤) ولكن بمظهر مختلف:

- في حالة منحنى  $K_m$  مقابل الـ pH، فإن ألفة ارتباط المادة الخاضعة تنخفض (أى ان  $K_m$  تزيد) بزيادة الـ pH مع قيمة ظاهرية لـ  $pK_a$  تساوي 9.0. وهذه الـ  $pK_a$  قد تبين أنها تعكس تأين باقي الحمض الأميني أسوليوسين isoleucine residue في الطرف الأميني لبروتين الإنزيم التي يجب أن تكون في الصورة المرتبطة بالبروتون حتى يتمكن الإنزيم من التكيف في البنية الفراغية التي لها القدرة على الارتباط بالمادة الخاضعة.

- من ناحية أخرى فإن قيمة  $k_{cat}$  لهذا الإنزيم تزداد مع زيادة الـ pH وتظهر  $pK_a$  بقيمة 6.8. وقيمة هذه الـ  $pK_a$  قد أعزيت إختيارياً لـ Asp-102 و His-57 في الموقع النشط الثلاثي. ويعتقد الآن أن هذه الـ  $pK_a$  تتزامن مع الحفز الثلاثي ككل وليس لباقي حمض أميني فردي.

- رسم العلاقة بين  $k_{cat}/K_m$  مقابل الـ pH لإنزيم كيموتريسين (شكل ١٠-١١د) لم يعطي شكل المنحنى السيني "S-shaped" المتوقع من معادلة هندرسون-هالسبالخ، بدلاً من ذلك فإنه أظهر منحنى الشكل الناقوسي bell-shaped. وهذا الرسم البياني يعبر عن التأثيرات التراكمية لمجموعتين قابليتين للمعايرة اللذان يؤثران



شكل ١١-١٠ (أ) الأحماس الأمينية التي تشكل الموقع النشط الثلاثي في إنزيم كيموتريسين (ب) المطهر الجاني  $k_{cat} / K_m$  ل كيموتريسين الذي يعطي منحنى نانوسي مع قيم الجاني لملاقة الـ  $pH$  مع  $K_m$  ل كيموتريسين الذي يعطي  $pK_a = 9.0$  (د) المطهر الجاني لملاقة الـ  $pH$  مع  $K_m$  ل كيموتريسين الذي يعطي  $pK_a = 6.8$  (ج) المطهر الجاني لملاقة الـ  $pH$  مع  $K_m$  ل كيموتريسين الذي يعطي  $pK_a = 9.0$ .

على كفاءة الحفز للإنزيم بطريقتين متضادتين (أى أن أحد المجموعات تيسر الحفز في صورة القاعدة المرافقة" غير المرتبطة بالبروتون"، بينما الأخرى تيسر الحفز في صورة الحمض "المرتبطة بالبروتون")

إن نوع البيانات المعروضة في شكل ١٠-١١ كثيراً ما تستخدم في التنبؤ بهوية الأحماض الأمينية الأساسية التي تشارك في كيمياء الحمض- القاعدة أثناء الحفز الإنزيمي. مع ذلك فإنه يجب الاحتراس في الاعتماد على هذه الاستنتاجات. فكلما رأينا في الكيموتريسين، أنه في بعض الحالات تكون قيمة  $pK_a$  المقاسة لا يمكن أن تتسب صحيحاً لحمض أميني مفرد ولكنها تعكس تأثيرات متبادلة بين مجموعة خاصة من بواقي الأحماض الأمينية خلال جزئ الإنزيم التي تنشئ في موقعها مركز حمض- قاعدة فريد. أيضاً، فإن البيئة الداخلية الكارهة للماء لجزئ الإنزيم يمكن أن تغير كثيراً قيم  $pK_a$  للسلاسل الجانبية للأحماض الأمينية بالنسبة إلى قيم  $pK_a$  النموذجية في المحلول المائي. وبعض الأمثلة لمثل هذه التغيرات في قيم  $pK_a$  لبواقي الأحماض الأمينية مدونة في جدول ١٠-٣.

جدول ١٠-٣ أمثلة للاختلافات في قيم  $pK_a$  لبواقي الأحماض الأمينية في الإنزيمات عن القيم النموذجية للأحماض الأمينية في المحلول

| الإنزيم         | $pK_a$ في |                    | السلسلة الجانبية |
|-----------------|-----------|--------------------|------------------|
|                 | الإنزيم   | الحمض الأميني الحر |                  |
| (Lysozyme)      | 6.5       | 3.9                | جلوتاميك         |
| (Papain)        | 3.4       | 6.8                | هستيدين          |
| (Ribonuclease)  | 5.2       | 6.8                | هستيدين          |
| (Papain)        | 4.0       | 8.3                | سستئين           |
| (Dehydrogenase) | 5.9       | 10.8               | لايسين           |

إن تأثيرات الـ pH على المعلمات الحركية  $K_m$ ,  $k_{cat}$  قد تم تحليلها أيضاً برسم قيمة الثابت الحركي بالمقياس اللوغاريتمي كدالة في الـ pH. فرسم العلاقة بين  $\log(k_{cat}/K_m)$  كدالة في الـ pH يمكن أن تستخدم في تعيين عدد المجموعات القابلة للمعايرة وقيمة الـ

$pK_a$  لها. فالإنزيم الذي يحتوي على مجموعة واحدة قابلة للمعايرة، فإن المنحنى يظهر كدالتين خطيتين متراكبتين أحدهما له ميل يساوي صفر والآخر له وحدة ميل (شكل ١٠-١١ أ وب). من ناحية أخرى، فإن المعلمات الحركية التي تشتمل على إثنين من المجموعات القابلة للمعايرة في مدى الـ pH تنتج رسم بياني الذي يشتمل على ثلاثة خطوط مستقيمة أحدهما له قيمة ميل موجبة، والثاني له ميل يساوي صفر والثالث له ميل سالب (شكل ١٠-١٢ ج).

وميزة هذه المنحنيات أنه يمكن تقدير قيم  $pK_a$  من الرسم من نقط تقاطع الخطين المستقيمين المرسومين خلال نقاط البيانات. والميزة الثانية أنه يمكن تعيين عدد مجموعات الحمض- القاعدة المشاركة في أحداث التأين: إن ميل الخط في منطقة الانتقال للرسم تعكس عدد المجموعات المتأينة التي تعابر في مدى هذا الـ pH. فالميل 1 يشير إلى مجموعة فردية التي تعابر، والميل 2 يشير إلى إشتمال صنفين متأينين وهكذا.

## ١٠-٤ طرق الكشف

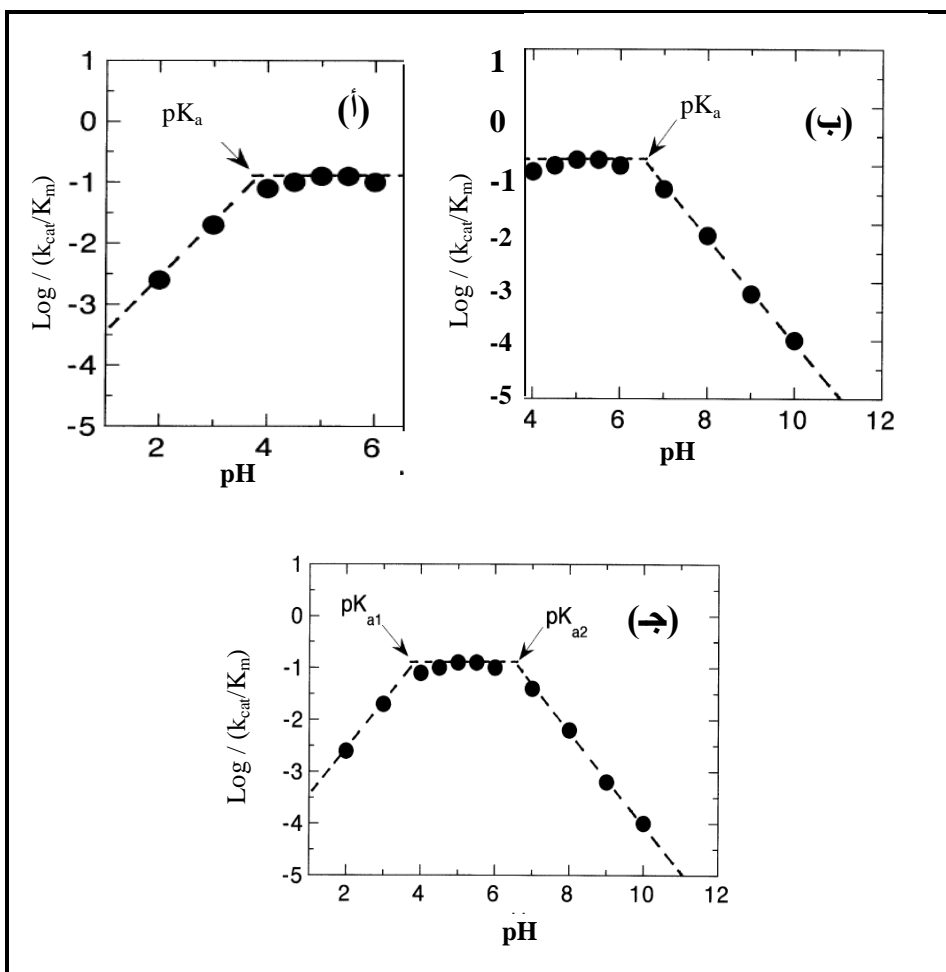
قياس السرعة الابتدائية للتفاعل الإنزيمي يتطلب تتبع إشارة التي تسجل مدى تكوين المنتج أو استنفاد المادة الخاضعة. ونوع الإشارة التي يمكن أن تستخدم تعتمد على الخواص الفيزيوكيميائية لأحد المواد المتفاعلة أو أحد نواتج التفاعل. وطرق الكشف في التفاعلات الإنزيمية تشمل التالي:

١- الامتصاص الضوئي للأشعة فوق البنفسجية والمرئية.

٢- الإشعاع الضوئي

٣- انحلال النظائر المشعة

وأى إشارة في طرق الكشف هذه يمكن أن تميز (تفرق) أحد المواد الخاضعة أو أحد النواتج عن المكونات الأخرى في مخلوط التفاعل، يمكن استخدامها بصورة مستمرة في متابعة الاختبار الإنزيمي.



شكل ١٠-١٢ الرسوم البيانية لـ  $\text{log}(k_{\text{cat}}/K_m)$  كدالة في الـ pH للتفاعلات الإنزيمية. قيم الـ  $\text{pK}_a$  يتم تقديرها من تقاطع الخطوط المستقيمة التي ترسم خلال البيانات في المناطق المختلفة في مدى الـ pH المستخدم. (أ) النشاط الإنزيمي يزداد أو يزداد ارتباط المادة الخاضعة بتأين مجموعة واحدة. (ب) يفقد النشاط الإنزيمي أو ينخفض ارتباط المادة الخاضعة بتأين مجموعة واحدة (ج) النشاط الإنزيمي أو ارتباط المادة الخاضعة يكون الأمثل عندما تكون أحد المجموعات مرتبطة بالبروتون والأخرى تكون غير مرتبطة بالبروتون.



في عديد من الإختبارات الإنزيمية، فإن طرق الكشف هذه يمكن تطبيقها فقط بعد فصل المادة الخاضعة أو ناتج التفاعل عن بقية مخلوط التفاعل الأخرى بعد إيقاف التفاعل، حيث أن طرق الكشف بذاتها لا تميز بين المادة التي يتم قياسها (المادة الخاضعة أو الناتج) والأنواع الأخرى الموجودة في المخلوط. مثال ذلك، إذا كانت الخواص الطيفية (الضوئية) للمادة الخاضعة والناتج لتفاعل إنزيمي متشابه، فإن قياس الطيف لمخلوط التفاعل بمفرده لا يوفر وسيلة مفيدة لمراقبة التغيرات في تركيز المكونات الفردية. في هذه الحالات تطبق طرق الفصل للمادة الخاضعة أو ناتج التفاعل عن باقي المكونات في الإختبارات الإنزيمية. وتقنيات الفصل المطبقة في الحركات الإنزيمية تشمل:

١- الفصل بالهجرة الكهربائية

٢- الفصل الكروماتوجرافي

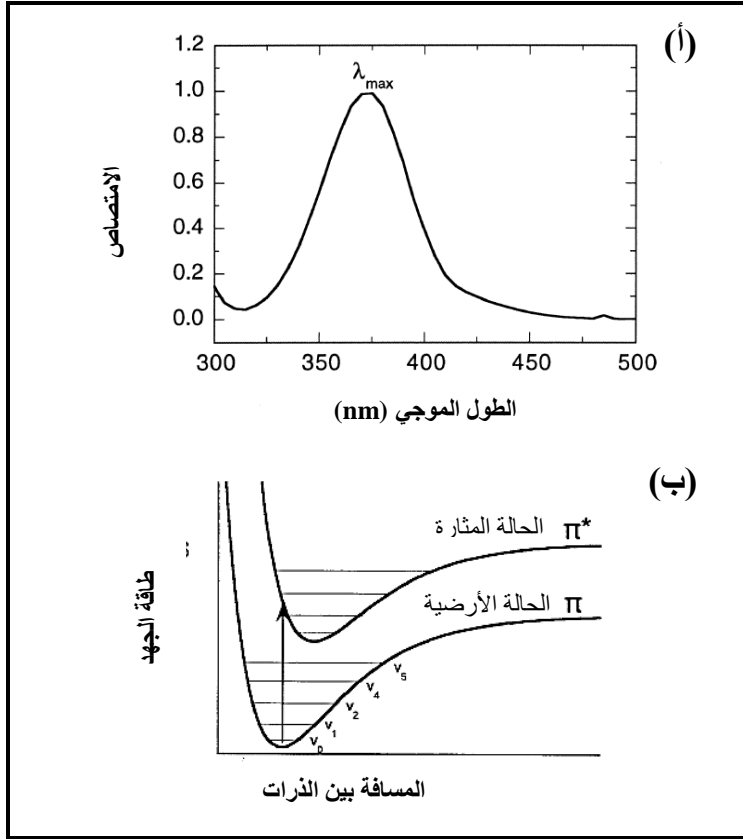
٣- النشاط المناعي

وفي هذا القسم سنناقش فقط طرق الكشف، ويمكن للقارئ الرجوع لأحد المراجع في نهاية الكتاب الخاصة بطرق الفصل في الحركات الإنزيمية.

#### ١٠-٤-١ الإختبارات المعتمدة على المطيافية الضوئية (الامتصاص الضوئي)

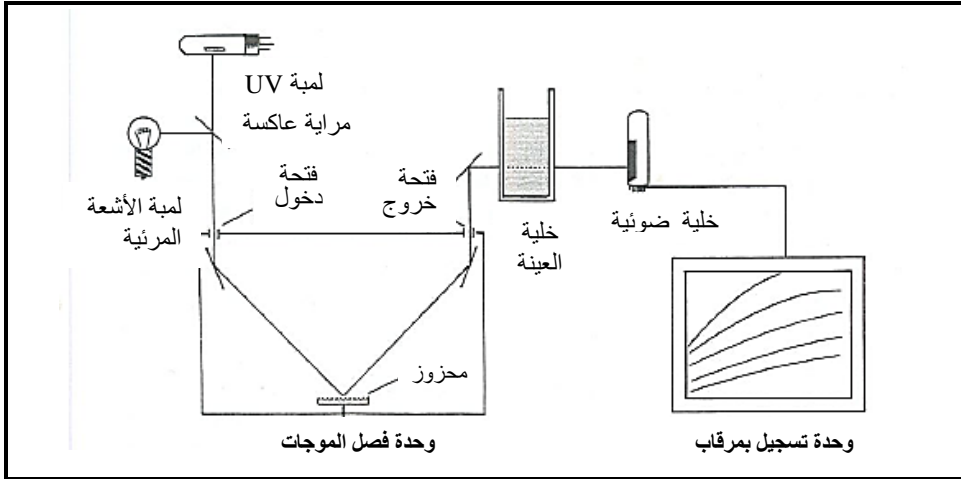
أكثر الطرق إستخداماً في الإختبارات الإنزيمية هي طرق القياس الضوئي في منطقة الأشعة فوق البنفسجية/ المرئية UV/Visible spectrophotometry، أساساً لدقة الطريقة وسهولة إجرائها. وتعتمد هذه الطريقة على أن الجزيئات يمكن أن تمتص الأشعة الكهرومغناطيسية في منطقة الأشعة فوق البنفسجية UV والمرئية Visible من الطيف الذي يؤدي إلى إنتقال إلكترون أو أكثر من مدار جزيئي في الحالة الأرضية ground state للجزئ إلى بعض المدارات العالية في الطاقة في الحالة المثارة exited state للجزئ. وعند استشعاع الجزئ بأطوال موجبة مختلفة من الضوء (ذوات كثافة متماثلة)، فإن ضوء بطول موجي خاص فقط سوف يمتص بقوة بواسطة العينة. وعند هذه الأطوال الموجبة، فإن طاقة الضوء تكافئ مقدار الطاقة بين الحالتين الإلكترونية للجزئ،

ويمتص الضوء ليحدث هذا الانتقال. وشكل ١٠-١٣ أ يمثل طيف امتصاص افتراضي لجزئي الذي فيه الطول الموجي للضوء  $\lambda_{\max}$  يحدث انتقال إلكتروني لجلب الجزئ من الحالة الأرضية  $\pi$  إلى الحالة المثارة  $\pi^*$ . وهذه العملية موضحة كمخطط طاقة الجهد في شكل ١٠-١٣ ب.



شكل ١٠-١٣ (أ) طيف امتصاص نموذجي لجزئ له امتصاص أقصى عند 375 nm (ب) مستويات الطاقة للانتقال المستحث بالضوء من الحالة الأرضية الإلكترونية  $\pi$  إلى الحالة المثارة  $\pi^*$  لجزئ  $V_0$  و  $V_1$  و ..... هي مستويات الطاقة الاهتزازية.

وشكل ١٠-١٤ يعرض الأجزاء الرئيسية لجهاز الامتصاص الضوئي في منطقة الأشعة فوق البنفسجية والمرئية UV/visible spectrophotometer. ويحتوي الجهاز على مصدر للأشعة (لمبة UV ولمبة للأشعة المرئية) ووحدة فصل الأطوال الموجية باستخدام المحزوز grating وخلية cuvette لوضع العينة المختبرة وخلية ضوئية photomultiplier لقياس طاقة الأشعة الخارجة من العينة ثم لوحة تسجيل بمراقب panel chart with monitor والأجهزة الأفضل عادة ما تحتوي على تنظيم لحزمة- مزدوجة double-beam. وأجهزة الحزمة المزدوجة تحتوي على مسارين متوازيين للضوء، أحدهما للعينة المرجع (الخالية من الإنزيم) والأخرى للعينة. والخلية الضوئية تكشف عن كلا الحزمتين منفصلتين، والمخرجات output وهي نسبة (امتصاص العينة/ إمتصاص العينة المرجع) يؤخذ كأنه الإشارة. وهذا الجهاز له ميزة أنه لا يحتاج إلى طرح قيمة العينة المرجع حسابياً من قيمة العينة، أو تصفير القراءة قبل البدء كما في حالة أجهزة الحزمة الفردية. أيضاً، فإن الانحرافات التلقائية المعتمدة على الوقت التي يمكن أن تحدث في العينة المرجع تطرح أيضاً، والتفاعل الذي يحدث في العينة فقط يتم مراقبته.



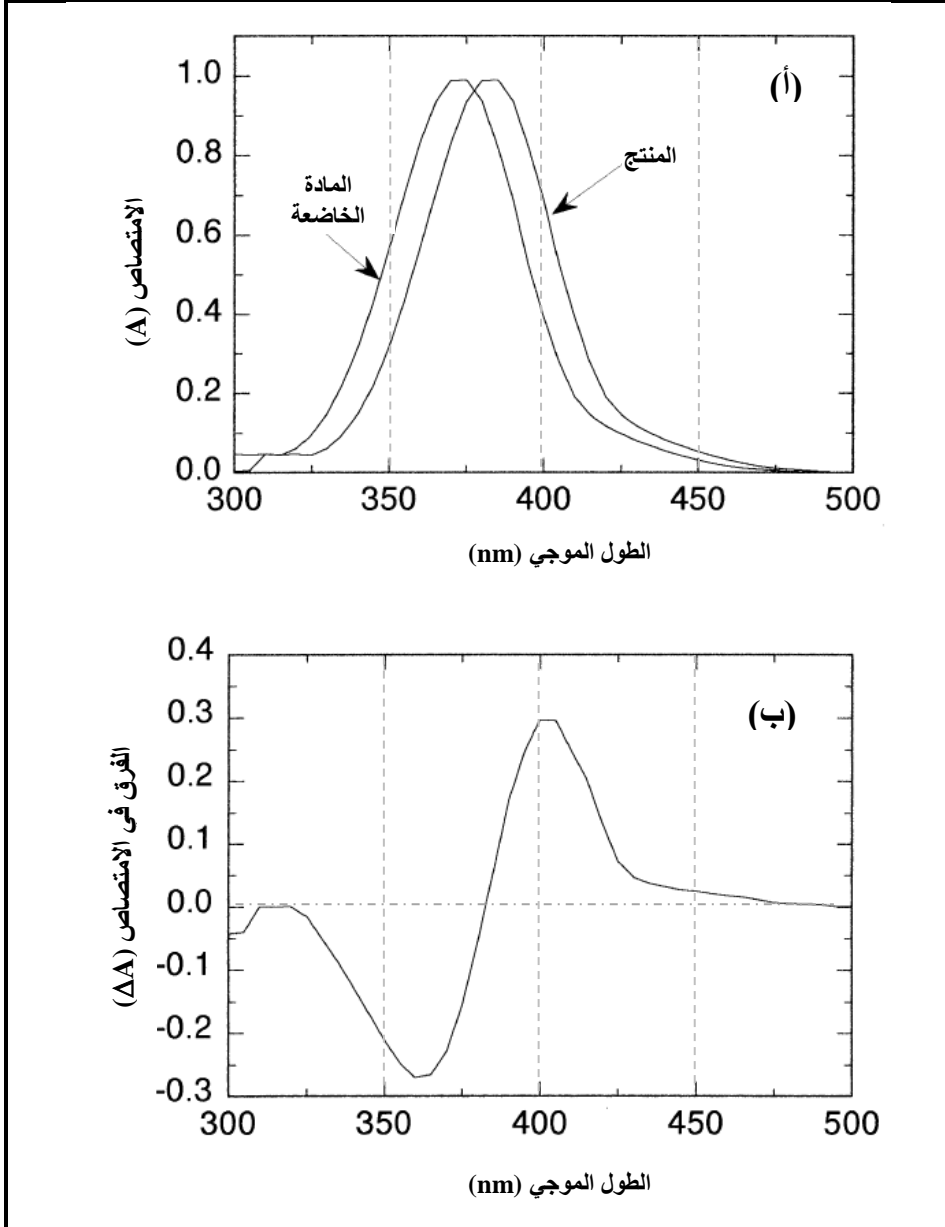
شكل ١٠-١٤ رسم تخطيطي لجهاز القياس الطيفي في منطقة UV/ المرئية ذو الحزمة الواحدة

وبالرغم من أن أجهزة الحزمة المزدوجة قد تبدو أنها المفضلة، إلا أنه يوصى باستخدامها في بعض التطبيقات الخاصة (مثل طيف الامتصاص)، على العكس من ذلك، فإن استخدامها في معادلة تأثيرات العينة المرجع قد يؤدي إلى مشاكل خطيرة في التقديرات الكمية مثل قياس السرعة الابتدائية، ومن أمثلة هذه الأخطاء:

- سبق أن ذكرنا أنه يجب تجنب قياس الامتصاص لأكثر من 1. في أجهزة الحزمة الفردية، فإن الامتصاص العالي للعينة المرجعية يمكن تمييزه مباشرة ومن ثم التغلب عليه (بالتخفيف مثلاً). أما في أجهزة الحزمة - المزدوجة، فإن هذه التأثيرات قد يغفل عنها لأنها تكبت (تطمس) أوتوماتيكياً (ذاتياً) لأن مخرجات الإشارة هي نسبة الإمتصاص بدلاً من الامتصاص المطلق.
- أيضاً فإن العينة المرجع قد تظهر بعض التشتت للضوء الذي ينتقل ذاتياً إلى قيمة العينة في أجهزة الحزمة - المزدوجة، ولكن في تنظيم الحزمة - الفردية، فإن العينة المرجع يمكن تقديرها بدقة بتكرار القياس ويطرح متوسط القيمة.
- إضافة إلى ذلك، فإنه في أجهزة الحزمة - المزدوجة، فإنه يمكن استخدام عينة مرجع فردية. بينما التقدير الدقيق للسرعة الابتدائية يحتاج إلى عيتين مرجع؛ أحدهما تحتوي على مكونات مخلوط التفاعل ما عدا المادة الخاضعة، والثانية تحتوي على كل مكونات المخلوط ما عدا الإنزيم (أنظر قسم ١٠-٢-٣) الذي يمكن أن يتحقق فقط بأجهزة الحزمة - الفردية.

#### ١٠-٤-١ اختيار الطول الموجي المستخدم في التحليل

إن الطول الموجي المستخدم في تتبع الحركات الإنزيمية عادة ما يكون الطول الموجي لأقصى امتصاص لجزيء المادة الخاضعة أو جزيء الناتج. مع ذلك، فإنه عندما يوجد تداخل طيفي محسوس بين شريطي الامتصاص للمادة الخاضعة والناتج، فإن أكثر طول موجي تحليلي حساس ربما لا يكون نفس الطول الموجي الأقصى. وهذه الفكرة موضحة في شكل ١٠-١٥. فعند فحص طيف امتصاص المادة الخاضعة والناتج لتفاعل إنزيمي



**شكل ١٠-١٥** مثال لإستخدام فرق (إختلاف) التحليل الطيفي (أ) الامتصاص الطيفي للمادة الخاضعة والنتائج لتفاعل إنزيمي. ونظراً لدرجة التداخل الطيفي العالي بين هذين الجزيئين، فإنه يكون من الصعب تقدير التغيرات لأحد مكونات في مخلوط النوعين من الجزيئات (المادة الخاضعة والنتائج) (ب) الفرق الرياضي للطيف  $\Delta A$  (النتائج - المادة الخاضعة) للطيفين في (أ). إن طيف الفرق هو الفرق بين الطيفين، الذي يجعل التغيرات الكمية أكثر دقة.

إفترض في شكل ١٠-١٥ أ، نجد أن الطول الموجي لأقصى امتصاص للمادة الخاضعة يتداخل من الامتصاص الأقصى لنتاج التفاعل. في هذه الحالة فإن أكثر طول موجي تحليلي حساس ربما لا يكون الطول الموجي لأقصى امتصاص. بدلاً من ذلك، فإنه يتم القياس عند الطول الموجي الذي يعطي أكبر فرق في الإشارة. إن الطول الموجي الذي عنده يشاهد الاختلاف الأكبر في الإشارة يمكن تقديره بحساب الفرق الطيفي بين هذين الطيفي. كما هو موضح في شكل ١٠-٥ ب. ومن ثم فإنه في هذا المثال الافتراضي، فإن الطول الموجي الأقصى للمادة الخاضعة والنتاج يكونا 374 nm, 385 nm على التوالي، بينما الطول الموجي الحساس لنتبع فقد المادة الخاضعة أو تكوين الناتج يكونا 362 nm, 402 nm على التوالي.

#### ١٠-٤-٢-١ الأوعية الضوئية للعينات

من الشائع إجراء قياسات الامتصاص الضوئي باستخدام أجهزة قياس الطيف spectrophotometer، حيث توضع العينات في أوعية (خلايا) خاصة يطلق عليها cuvettes، وهذه الأوعية الخاصة يمكن الحصول عليها في مدى من أطوال المسار، وتشيد من مواد ضوئية مختلفة. والـ cuvettes البلاستيكية الجاهزة للاستخدام التي يمكن التخلص منها التي تتسع لـ 1 mL أو 3 mL من العينات متوفرة تجارياً. وبالرغم من أن هذه الوحدات التي تستخدم مرة واحدة تكون مناسبة جداً وتخفض فرصة التلوث عند الانتقال من عينة إلى أخرى، إلا أن استخدامها يكون مقيد لمدى الطول الموجي المرئي (350-800 nm). وللقياسات عند أطوال موجية أقل من 350 nm، فإنه يجب استخدام أوعية من الكوارتز عالي الجودة. وبغض النظر عن نوع الوعاء المستخدم فإن طول المسار يجب أن يكون معلوماً.

في الوقت الحالي فإن عديد من الباحثين يجرى قياسات الامتصاص باستخدام قارئ شريحة تحتوي على 96- حبيرة نوات معيار حجمي دقيق 96-well microtiter plate readers. وهذا الجهاز له حساسية عالية (حيث يمكن قياس التغيرات في الامتصاص التي قد تصل إلى 0.001)، ويمكن زيادة الإنتاجية حيث يسمح باختبار 96 عينة في

نفس الوقت. ومعظم قارئات الشرائح تعتمد على المرشحات الضوئية وليس أنظمة توليد الأطوال الموجية الأحادية monochromators، ومن ثم فإنها تعطي فقط عدد محدود من الأطوال الموجية للقياس. ونظراً لأن معظم الشرائح المتاحة تجارياً تشيد من البلاستيك، فإن قياسات قارئ الشرائح تكون مقيدة طبيعياً للمنطقة المرئية من الطيف. مع ذلك، فإنه في الوقت الحالي متوفر قارئات الشرائح المعتمدة على أطوال موجية أحادية التي تسمح بالقياسات عند أى طول موجي بين 250 nm, 750 nm.

#### ١٠-٤-٣ قياسات الامتصاص

تستخدم أجهزة الامتصاص الضوئي في تقدير التغير في كثافة الأشعة نتيجة لامتصاصها بواسطة الجزيئات. وامتصاص الجزيء عند طول موجي خاص يمكن ربطه بتركيز هذا الجزيء في المحلول كما يوصف بقانون بير Beer's law:

$$A = \epsilon cl \quad (١٠-٦)$$

حيث  $A$  = امتصاص العينة عند بعض الأطوال الموجية  
 $c$  = تركيز العينة بوحدة المولاري (مولات/ لتر)  
 $l$  = طول مسار العينة التي تعبرها الحزمة (بالسنتيمتر)  
 $\epsilon$  = ثابت خاص للجزيء، يعرف بمعامل الامتصاص extinction coefficient  
 أو الامتصاص المولاري، ووحدها  $M^{-1} cm^{-1}$  أو  $mM^{-1} cm^{-1}$ .

ومن ثم إذا عرفنا قيمة  $\epsilon$  لجزيء معين، وطول المسار لحجيرة العينة، فإننا يمكن تقدير تركيز هذا الجزيء في المحلول بقياس امتصاص المحلول. ومن ثم، فإننا يمكن أن نستخدم سمات الامتصاص الفريدة للمادة الخاضعة أو ناتج التفاعل الإنزيمي في تتبع سير (تقدم) هذا التفاعل. وباستخدام قانون بير، فإننا يمكن أن نحول قيم  $\Delta A$  (قيم  $A$  مطروحة منهم قيم التجارب الحاكمة في غياب المادة الخاضعة وفي غياب الإنزيم، كما

هو موضح في شكل (١٠-٥) عند نقاط الوقت المختلفة إلى تركيز الجزئ الذي يتم متابعته، ومن ثم تسجيل سرعة التفاعل بلغة التغير في التركيز الجزئي كدالة في الوقت. فعلى سبيل المثال افترض أن المادة الخاضعة في شكل ١٠-٥ لها امتصاص مولارى  $2.5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  وأجرى الاختبار في حجرة عينة لها طول مسار  $1 \text{ cm}$ . إننا نجد من شكل ١٠-٥ ب بعد تصحيح البيانات أن امتصاص مخلوط التفاعل بتغير بمقدار  $0.89$  خلال  $10$  دقائق (أو  $0.089/\text{min}$ )، ومن ثم فإن سرعة التفاعل تكون كالتالي:

$$v = -\frac{d[S]}{dt} = -\frac{\Delta A}{\epsilon l \Delta t} = -\frac{0.89}{2.5 \times 1 \times 10} = -0.0356 \text{ mM/min} \quad (١٠-٧)$$

لاحظ أن الوحدات هنا هي المولاريتي لكل وحدة وقت (أى مولات لكل لتر لكل وحدة زمنية). كما يمكن التعبير عن السرعة أيضاً بوحدة المول لكل وحدة زمنية. ويجب أن نتذكر أنه رغم إطلاق إسم جهاز الامتصاص الضوئي على الجهاز المستخدم في القياس، فإنه حقيقة يقيس نقل (نفاذ) الضوء light transmission أى الانخفاض في كثافة الضوء الساقط  $I_0$  بواسطة محلول العينة إلى  $I$ ، الذي يعطي بالمعادلة التالية:

$$I/I_0 = e^{-\epsilon cl}$$

حيث  $I_0$  هي الكثافة الكلية للضوء الساقط (100%) تحت ظروف الجهاز. وحاصل القسمة  $I/I_0$  يجعل التقدير الكمي المطلق غير معتمداً على ظروف القياس أو نوع الجهاز. وتحويل المعادلة الأسية السابقة إلى صورة خطية، تعطي قانون بير في معادلة ١٠-٦.

$$A = \log (I/ I_0) = \epsilon cl \quad (١٠-٨)$$



ومعظم الأجهزة تسمح بقياس كل من نقل الضوء ( $I/I_0$ ) والامتصاص (A).

#### ١٠-٤-١: الأخطاء في قياسات الإمتصاص الطيفي

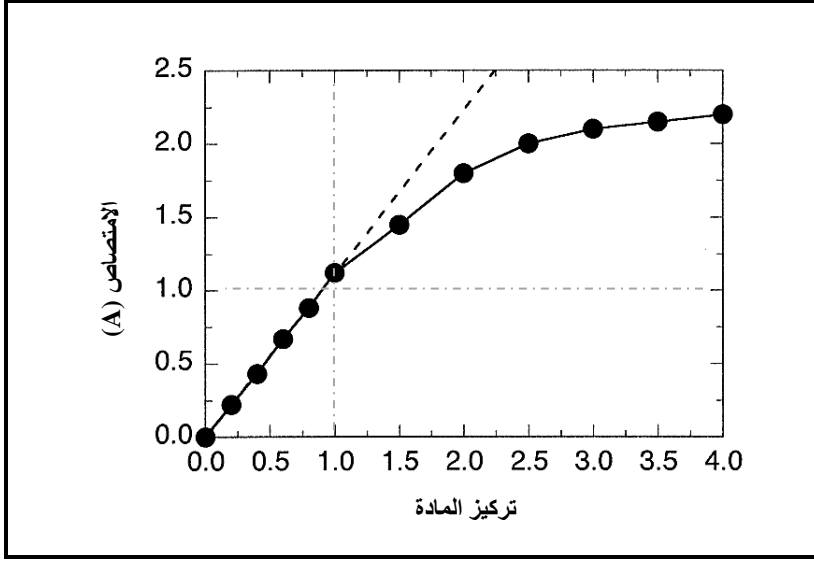
توجد ثلاثة أخطاء في قياسات الامتصاص الطيفي التي يجب التغلب عليها حتى يمكن الحصول على نتائج دقيقة في قياسات السرعة الابتدائية وهي:

١- الخطأ الشائع مع قياسات الامتصاص هو الانحراف عن قانون بير. إن صيغة قانون بير تفترض أن امتصاص العينة سوف يزداد خطياً مع تركيز الجزئ المراد تحليله (جزئ المادة الخاضعة أو جزئ الناتج)، وفي الحقيقة، فإن هذا هو الأساس في استخدام الامتصاص الطيفي كوسيلة تحليلية. مع ذلك فإنه تجريبياً نجد أن هذه العلاقة الخطية تكون مقيدة لمدى محدود من قيم الامتصاص. وكما هو موضح في شكل ١٠-١٦، فإن قراءات الامتصاص أعلى من 1.0 بصورة عامة لا تعكس بدقة تركيز المادة التي يتم تحليلها analyte في المحلول. لذلك فإن التجارب يمكن أن تصمم بحيث يكون الامتصاص الأقصى الذي يتم قياسه أقل من 1.0، الذي يمكن تحقيقه بإجراء تجارب إستكشافية أولية.

٢- إن اللمبات التي تستخدم في توليد UV والضوء المرئي في أجهزة الامتصاص الطيفي يجب أن تعطي وقت كاف للتسخين. فكتافة الضوء من هذه المصادر يختلف كثيراً بعد أن تشغل اللمبات مباشرة، ولكنه يستقر بعد حوالي 30-90 دقيقة. وحيث أن مقدار وقت التسخين المطلوب لاستقرار مخرجات اللامية سوف يختلف من جهاز إلى آخر ومن لمبة إلى أخرى خلال نفس الجهاز، فإنه من الأفضل تقدير وقت التسخين المطلوب للجهاز المستخدم. ومن السهل إجراء ذلك بقياس الإشارة من عينة ما لها امتصاص منخفض (ونقل 0.05-0.1) كدالة في الوقت بعد تشغيل اللامية، وملاحظة كم من الوقت يمر إلى أن تصل الإشارة إلى قراءة ثابتة مستقرة.

٣- المصدر الآخر للخطأ في قياسات الامتصاص هو العكارة turbidity. فالمادة الدقائقية في المحلول سوف تفرق (تبعثر) scatter الضوء الذي يكشف كزيادة في امتصاص العينة. وإذا ظهرت مثل هذه الجسيمات أثناء القياسات الحركية، فإنه

يمكن أن ينتج تشوش محسوس في النتائج. والطريقة الأفضل للتغلب على هذه التعقيدات هو التأكد من أن العينة تكون خالية من هذه الجسيمات بترشيح كل المحاليل خلال فلاتر  $0.2 \mu\text{m}$  أو الطرد المركزي.



شكل ١٠-١٦ الإنحراف عن قانون بير. في مدى التركيز الصغير، فإن الامتصاص عند بعض الأطوال الموجية يكون خطي مع التركيز كما هو متوقع من قانون بير (معادلة ١٠-٦). وعند زيادة التركيز عند النقطة التي عندها  $A = 1.0$ ، يحدث إنحراف عن قانون بير لسلوك العلاقة الخطية

#### ١٠-٤-٢ قياسات التفلور (الفلورسنس)

الطيف عند طول موجي مناسب يمكن أن يمتص بواسطة جزئ حيث يحدث إنتقال إلكتروني من الحالة الأرضية إلى أحد الحالات المثارة العالية في الطاقة كما سبق أن ناقشناه سابقاً. والجزئ المثار يكون غير ثابت نتيجة للطاقة المكتسبة، وله فترة بقاء صغيرة (فترة بقاء الحالة المثارة تكون نموذجياً أقل من 50 نانو ثانية ns)، والجزئ يجب أن يجد وسيلة لتحرير الطاقة المكتسبة حتى يعود إلى التشكيل الإلكتروني للحالة الأرضية. في معظم الحالات، فإن الطاقة الزائدة تتبدد في صورة حرارة في الوسط

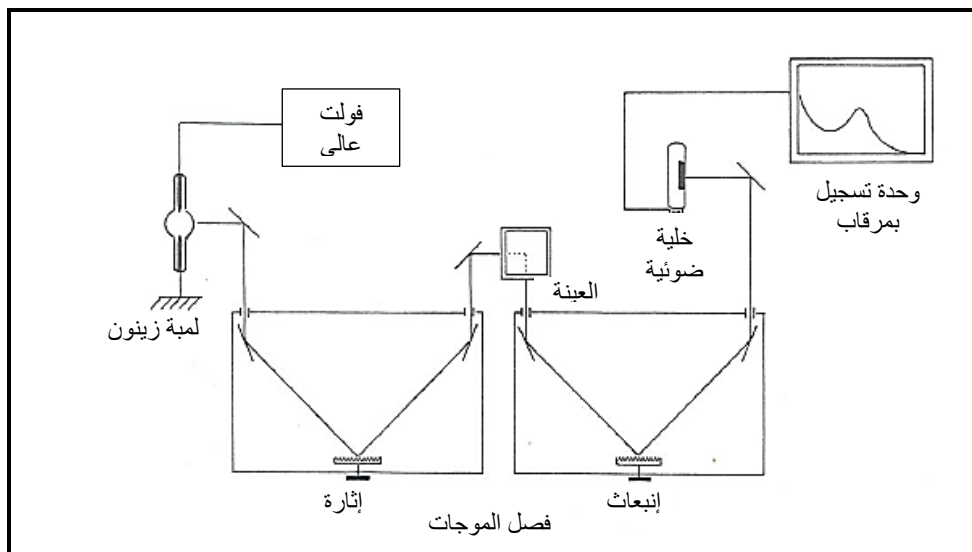
المحيط عن طريق الانتقال خلال مستويات الطاقة الاهتزازية. مع ذلك، فإن بعض الجزيئات يمكن أن تعود إلى الحالة الأرضية بإنبعاث الطاقة الزائدة في صورة ضوء. والفلورة (الفلورسنس) fluorescence هي أكثر الطرق الشائعة التي يمكن الكشف عنها بسهولة في عمليات الإنبعاث هذه، التي تتضمن الانتقال بين الحالات الفردية للحالة المثارة والحالة الأرضية. وعمليات الطاقة في شكل ١٠-١٧ تعبر عن الفلورة الجزيئية. أولاً يمتص الضوء عند طول موجي مناسب بواسطة الجزيء حيث يثار الجزيء إلى الحالة الإلكترونية الأعلى في الطاقة، ثم ينحل الجزيء خلال مستويات طاقة الاهتزاز للحالة المثارة إلكترونياً بواسطة التبديد الحراري، ثم يسترخي من مستوى الطاقة الاهتزازي الأدنى إلى الحالة الإلكترونية الأرضية بواسطة تحرير فوتون (إشعاع ضوئي).

**شكل ١٠-١٧** استرخاء الحالة المثارة للجزئ إلى الحالة الأرضية بانبعاث الفوتونات (الفلورة (Fluorescence).

طول موجي أطول (طاقة أقل) عن الامتصاص الأقصى. وهذا الاختلاف في الطول الموجي بين الامتصاص الأقصى والفلورة (الفلورسنس) الأقصى للجزئ يشار إليه بانتقال ستوكس Stokes shift. فعلى سبيل المثال، فإن الحمض الأميني تربتوفان له امتصاص أقصى عند 280 nm وينبعث إشعاع الفلورة بقوة بين 325 و 350 nm. وللاستفادة من هذا السلوك فإن أجهزة قياس التفلور تصمم لتثير العينة في حجرة العينة مع ضوء عند طول موجي للامتصاص الأقصى ويكشف عن الضوء عند طول موجي مختلف (أطول).

جهاز قياس الفلورة Fluorimeter يشيد أساساً مثل جهاز قياس امتصاص الضوء، بالرغم من وجود بعض الاختلافات المميزة (شكل ١٠-١٨). فالضوء المستخدم في عملية إثارة الجزئ يجب أن يكون أكثر كثافة عن ذلك المستخدم في قياسات الامتصاص، ولكن مدى (نطاق) الطيف للإثارة يكون ضيق، ويشمل منطقة الفوق بنفسجية والمنطقة القريبة من الضوء المرئي (حوالي 200-500 nm). لذلك يستخدم نوع واحد من اللمبات عادة لمبة الزينون القوسية Xenon arc lamp.

نظراً لأن إنبعاث ضوء التفلور يقتضي ضمناً إمتصاص (إثارة)، فإنه يوجد نوعين من الطيف. طيف الإثارة الذي يجب أن يكون مماثلاً لطيف الإمتصاص للمادة، وطيف الإنبعاث الذي يظهر خصائص التفلور المنبعث. لذلك يوجد إثنين من وحدات فصل الأطوال الموجية (مثل المنشور) أحدهما قبل العينة (طيف الإثارة) والآخر بعد العينة (طيف التفلور). وللحصول على التقدير الأفضل للضوء المنبعث الذي يكون عند المستوى الأدنى من التداخل مع حزمة ضوء الإثارة، فإن أجهزة قياس الفلورة تصمم لتجميع الضوء المنبعث عند درجة 90° من مسار حزمة الإثارة.



شكل ١٠-١٨ رسم تخطيطي لجهاز قياس التفلور Spectrofluorimeter

#### ١٠-٢-٤-١٠ الجزيئات التي تعطي إنبعاث التفلور (الفلورسنس)

في الحقيقة فإن عدد قليل من المركبات تعطي ظاهرة إنبعاث الضوء في صورة فلورة (فلورسنس) fluorescence. ومن بين المركبات الطبيعية والألبيضات التي تعطي انبعاث الفلورة هي الفلافينات والأحماض الأمينية العطرية خاصة التريبتوفان، ومن ثم فإن كل البروتينات (ومنها الإنزيمات) التي تحتوي على هذا الحمض الأميني تظهر فلورة كبيرة. إن خطة تتبع حركات الإنزيم بواسطة الفلورة تكون مماثلة لتلك التي وصفت لامتصاص الطيفي. فإذا كان زوج المواد الخاضعة- الناتج للتفاعل الإنزيمي تعطي إنبعاث فلورة فإن إشارة الفلورة يمكن أن تستخدم في تتبع الفقد في المادة الخاضعة أو زيادة ناتج التفاعل. وإذا كانت هذه الجزيئات بذاتها لا تعطي إنبعاث فلورة، فإنه في أحياناً كثيرة يمكن ربطها بمجموعة لها إنبعاث فلوري بدون إحداث تشويش محسوس للتأثير المتبادل مع الإنزيم تحت الدراسة. وقياسات الفلورة لها ميزتين عن قياسات الإمتصاص في تتبع الحركات الإنزيمية:

- ١- أجهزة الفلورة تكون حساسة جداً (بعامل أكثر من 100) الذي يسمح بالكشف عن التغير في التركيزات المنخفضة في المادة الخاضعة أو الناتج.
- ٢- حيث أن عديد من الجزيئات التي تعطي إنبعاث فلورة يكون لها انتقال ستوك كبير، فإن إشارة الفلورة تكون نموذجياً منطقة معزولة من الطيف حيث يكون التداخل من الإشارات الناشئة من تفاعل المكونات الأخرى في المخلوط عند حددها الأدنى.

#### ١٠-٢-٢ قياسات الفلورسنس (الفلورة)

قياسات الفلورة تعطي مسار خطي مع تركيز المادة المبتعثة للفلورة في المحلول في مدى محدود. من حيث المبدأ فإن إشارات الفلورة يجب أن تتغير مع تركيز المادة المبتعثة للفلورة بعلاقة مماثلة لقانون بير، حيث يستبدل معامل الامتصاص ( $\epsilon$ ) بناتج الكم المولاري ( $\phi$ ) molar quantum yield. مع ذلك، فإنه في التطبيق العملي يكون صعباً حساب تركيز العينة بتطبيق قيم  $\phi$  المجدولة على قياسات الفلورة التجريبية. ولذلك فإنه لتحويل قياسات كثافة الفلورة إلى وحدات تركيز، فإنه يكون ضروري تحضير منحني قياسي لإشارة الفلورة كدالة في تركيز المادة المبتعثة للفلور، بإستخدام مجموعة من المحاليل القياسية التي فيها يتم قياس المادة المبتعثة للفلور بصورة مفردة. وبيانات المنحنى القياسي يجب أن تجمع عند وقت القياسات التجريبية، وذلك لتغير كثافة اللبنة من يوم إلى يوم وبعض العوامل الأخرى في الجهاز التي قد تؤثر على قياسات الفلورة.

#### ١٠-٢-٣ الأخطاء في قياسات الفلورسنس (الفلورة)

معظم الأخطاء التي وصفت في التحليل الطيفي للامتصاص تحدث أيضاً في قياسات الفلورة التي يجب تجنبها. فالعينات يجب أن تكون خالية من المادة الدقائقية، حيث أن تفرق الضوء يمثل مشكلة خطيرة في قياسات الفلورة. ومعظم المواد الشائعة تبتعث ضوء في المنطقة المرئية من الطيف، ولكنها يجب أن تثار عند طول موجي أقرب من فوق بنفسجية، الذي يتطلب استخدام حجيرة عينة من الكوارتز لهذه القياسات. أيضاً فإن أى فلورة من مكونات المحلول المنظم وغيره يجب أن يقاس وعمل التصحيح المناسب للحصول على بيانات صحيحة.

وبالإضافة إلى تلك الاعتبارات العامة السابقة، فإنه توجد عدة مصادر للأخطاء التي تكون خاصة بقياسات الفلورة التي تشمل:

١- المصدر الأساسي للخطأ في قياسات الفلورة هو خمد الفلورة fluorescence quenching الذي يشير إلى انخفاض كثافة الفلورة الذي يصل إلى وحدة الكشف نتيجة للامتصاص من الجزيئات في العينة. وهذا الخمد قد يحدث للملوثات في المحلول أو من المكونات الأخرى حتى من المادة المبتعثة للفلور Fluorophoro ذاتها عندما توجد بتركيز عالي. فلكي يتم الكشف فإن الفوتونات المبتعثة يجب أن تتفد بقية العينة وتخرج من حجيرة العينة لتتصطم بسطح وحدة الكشف. مع ذلك، فإن أى فوتون يمكن أن يفقد قبل أن يصل إلى وحدة الكشف إذا تلاقى مع جزيء آخر له القدرة على امتصاص الضوء عند هذا الطول الموجي. وبزيادة تركيز العينة، فإن عملية التلاقي هذه تكون أكثر احتمالاً وتزداد إعادة الامتصاص أسياً. وهذه الظاهرة يشار إليها بتأثير الترشيح الداخلي inner filter effect، التي تنقص كثيراً إشارة الفلورة المشاهدة من العينة.

٢- عديد من الجزيئات المبتعثة للفلورة تكون عرضة للتحلل الضوئي photodecomposition عند التعرض لفترة طويلة للضوء. ومن ثم فإن المواد الخاضعة المبتعثة للفلور والكاشفات reagent يجب أن تخزن في زجاج كهرمائي (الأصفر الضارب للحمرة) اللون أو بلاستيك، والأوعية يجب أن تغطي برقاقة من الألومنيوم لحمايتها من الضوء الصادر من البيئة.

٣- إن ناتج الكم للفلورة لأى جزيء يعتمد بدرجة عالية على درجة حرارة العينة. ولقد رأينا أن درجة الحرارة تؤثر مباشرة على حركيات الإنزيم، ولكن ذلك يكون مميز عن التأثير العام لدرجة الحرارة على كثافة الفلورة. وبوجه عام فإن إشارة الفلورة تزداد بانخفاض درجة الحرارة بسبب التنافس مع آلية الانحلال غير الإشعاعي للرجوع إلى الحالة الأرضية الذي يصبح أقل كفاءة. ومن ثم فإنه يجب التحكم جيداً في درجة

حرارة العينة. ومعظم أجهزة قياس الفلورة تحتوي على نظام تحكم في درجة حرارة العينة أثناء القياس.

### ١٠-٤-٣ القياسات المعتمدة على النظائر المشعة

إن الخطة الأساسية لإستخدام النظائر المشعة في قياسات الحركية الإنزيمية هو إدماج نوع من النظائر المشعة في تركيب المادة الخاضعة التي تستبقي في جزئ الناتج بعد الحفز. وباستخدام الوسيلة المناسبة في فصل المادة الخاضعة عن الناتج (مثل كروماتوجرافي الطبقة الرقيقة (thin-layer chromatography (TLC، كروماتوجرافي الورق، والكروماتوجرافي السائل عالي الكفاءة HPLC، ولكن حيث أن بيئة الفصل في كروماتوجرافي الورق و TLC من السهل التخلص منها ما زال لهما الأفضلية في التجارب التي تستخدم فيها النظائر المشعة)، فإننا يمكن قياس النشاط الإشعاعي في أجزاء المادة الخاضعة والناتج، ومن ثم نتعرف على مقدار الفقد في المادة الخاضعة وإنتاج الناتج. في حالات التفاعلات الإنزيمية التي تكون فيها المادة الخاضعة بروتين معلم أو يشتمل التفاعل على تحرير جزء ببتيدي معلم من البروتين، يكون من الملائم في هذه الإختبارات فصل البروتين من المحلول الكلي قبل عملية الكشف باستخدام أحد طرق فصل البروتين.

معظم النظائر شائعة الإستخدام في قياسات الحركية الإنزيمية تتحلل خلال إنبعاث الجسيمات بيتا  $\beta$  particles (جدول ١٠-١٤). وعملية الانحلال تتبع حركات الرتبة الأولى، وفقد (أو تحلل disintegration) المادة البادئة تكون مميزة بفترة نصف العمر half-life للنظير الأصلي. الوحدة القياسية للنشاط الإشعاعي هي الكوري (Ci)، الذي عرف في الأصل بأنه المعدل الذي عنده ينحل ١ جرام راديوم-٢٢٦ (radium-226) كلياً. والتعريف العملي للكوري للنظائر الأخرى هو كمية أى مادة التي تتحلل عند معدّل  $2.22 \times 10^{12}$  انحلال لكل دقيقة disintegration per minute (dpm).



جدول ١٠-٤: خواص النظائر المشعة شائعة الاستخدام في إختبارات الحركية الإنزيمية.

| النظير        | عملية الانحلال                                                   | فترة نصف العمر |
|---------------|------------------------------------------------------------------|----------------|
| Carbon-14     | $^{14}_6\text{C} \rightarrow -1\beta^0 + ^{14}_7\text{N}$        | 5700 سنة       |
| Phosphorus-32 | $^{32}_{15}\text{P} \rightarrow -1\beta^0 + ^{32}_{16}\text{S}$  | 14.3 يوم       |
| Sulfur-35     | $^{35}_{16}\text{S} \rightarrow -1\beta^0 + ^{35}_{17}\text{Cl}$ | 87.1 يوم       |
| Tritium       | $^3_1\text{H} \rightarrow -1\beta^0 + ^3_2\text{He}$             | 12.3 سنة       |

#### ١٠-٤-٣-١ قياس النشاط الإشعاعي

توجد طريقتين لقياس النشاط الإشعاعي في الإختبارات الإنزيمية:

● طريقة عداد الإيماض **scintillation counter**. محلول p-terphenyl أو stilbene في الزيلين أو التولوين يبتعث ضوء عندما يتماس مع محلول النظير المشع. وكثافة الضوء تكون دالة في كمية النظير. وإنبعاث هذا الضوء يطلق عليه الإيماض scintillation الذي عادة ما يقاس مع عداد الإيماض وهو جهاز لقياس الضوء باستخدام وحدة مكشاف الضوء. ويمكن قياس النشاط الإشعاعي على الأسطح المستوية مثل شريحة كروماتوجرافي الطبقة الرقيقة TLC والجيل بواسطة عداد الإيماض بعد كشط أو قطع الجزء من السطح الذي يحتوي على العينة وغمره في سائل الإيماض.

● طريقة التصوير الإشعاعي الذاتي **autoradiography**. هي وسيلة للكشف عن النشاط الإشعاعي على الأسطح الذي يستلزم وضع السطح في حالة تماس مع فيلم تصوير ضوئي. إن النشاط الإشعاعي يؤدي إلى عتامة (دكنة) الفيلم الذي يسمح بالتسجيل الدائم لموضع الأنواع النشطة إشعاعياً على السطح. وفي الوقت الحالي فإن أجهزة تصوير الوميض الفوسفوري بالحاسوب البيني computer-interfaced phosphor imaging يستخدم في الكشف والتقدير الكمي للنشاط الإشعاعي على سطوح ثنائية الأسطح (الجيل الجاف، وشريحة TLC وغيرهما).

إن النشاط الإشعاعي في العينة يقدر كمياً بقياس dmp's للعينة باستخدام أحد الطرق السابق شرحها. مع ذلك، حيث أنه لا يوجد كاشف له كفاءة 100%، فإن القراءة المتحصل عليها تجريبياً سوف تختلف عن dmp الحقيقية للعينة. إن الوحدات التجريبية للنشاط الإشعاعي يشار إليها بالعد لكل دقيقة (cpm) counts per minute (cpm,s) هي النتائج التي يتم الكشف عنها أو التي يتم عدّها بواسطة الجهاز لكل دقيقة). فعلى سبيل المثال فإن عينة مقدارها 1  $\mu\text{Ci}$  ستعطي  $2.22 \times 10^6$  dpm. وإذا كان الجهاز المستخدم في قياس هذه العينة له كفاءة 50%، فإن القيمة التجريبية سوف تكون  $1.11 \times 10^6$  cpm. ولتحويل القراءة التجريبية إلى dpm's الحقيقية، فإنه يكون من الضروري قياس عينة قياسية للنظير المستخدم. وهذه المعلومات تسمح بمعايرة كفاءة الجهاز، وبذلك يمكن تحويل قيم cpm للعينة إلى وحدات dpm.

عند استخدام مادة خاضعة معلمة بالنظير في دراسات الحركية الإنزيمية، فإن المادة الخاضعة المعلقة عادة ما تخطط مع المادة الخاضعة غير المعلقة (يشار إليها بالمادة الخاضعة الباردة cold substrate) للوصول إلى تركيز كلي معين للمادة الخاضعة دون الإحتياج إلى استخدام كميات كبيرة من النشاط الإشعاعي. ويكون مهماً في هذه الحالة تقدير الجزء من الجزيئات المعلقة إشعاعياً في عينة المادة الخاضعة. والتقدير الكمي من الشائع التعبير عنه بلغة النشاط الإشعاعي النوعي specific radioactivity للعينة. والنشاط الإشعاعي النوعي يعطي بوحدات النشاط الإشعاعي لكل كتلة أو المولاريته للعينة. والوحدات الشائعة الاستخدام للنشاط الإشعاعي النوعي تشمل  $\mu\text{Ci}/\text{mg}$  و  $\text{dpm}/\mu\text{mol}$ . ومع تعريف النشاط الإشعاعي النوعي للعينة يمكن بسهولة تحويلها إلى وحدات السرعة من قياسات النشاط الإشعاعي النوعي الذي يؤخذ أثناء التفاعل الإنزيمي.

#### ١٠-٤ طرق الكشف الأخرى

الامتصاص الضوئي والإنبعاث الفلورسنسي والنشاط الإشعاعي هم إلى حد بعيد أكثر الوسائل الشائعة في تتبع الحركات الإنزيمية، ولكن تقنيات أخرى متنوعة قد استخدمت أيضاً. ومن هذه الطرق:

- جهاز قياس الأس الهيدروجيني pH meter. إلكترونيات الـ pH الحساسة يمكن أن تستخدم لتتبع إزالة أو تحرير البروتون في المحلول أثناء التفاعل الإنزيمي، التي منها يمكن تقدير السرعة.
- إلكترونيات الأكسجين oxygen electrodes. عديد من إنزيمات الأكسدة oxidases تستخدم الأكسجين الجزيئي أثناء عملية الحفز، ويصاحب ذلك استنفاد  $O_2$  الذائب من المحلول الذي يحدث فيه الحفز. ويمكن تتبع التغير في تركيز  $O_2$  الذائب باستخدام الكترود متخصص للأكسجين  $O_2$ -specific electrode.
- مقياس الجهد potentiometer. تفاعلات الأكسدة والاختزال redox reactions التي تشتمل على زوج أكسدة واختزال مثل  $NAD(P)^+/NAD(P)H$  أو  $FAD/FADH_2$  أو السيتوكروم  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  يمكن تتبعها بقياسات الجهد. إن نوع طرق الكشف التي طبقت على قياسات النشاط الإنزيمي واسعة جداً بحيث من الصعب أن تغطي بصورة كاملة في هذا الكتاب. ويمكن الرجوع إلى أحد المراجع المدونة في آخر الكتاب للتعرف على هذه الطرق بالتفصيل.

## ١٠-٥ ثباتية الإنزيم

أحد المشاكل العملية الأكثر شيوعاً التي تقابل الباحثين في مجال الدراسات الإنزيمية هي فقد النشاط الإنزيمي في العينة نتيجة لعدم ثباتية الإنزيم. فالإنزيمات مثل معظم البروتينات تكون عرضة للتغير في طبيعتها denaturation تحت العديد من الظروف العملية، ويجب إتخاذ بعض الإجراءات الخاصة لتثبيت هذه الجزيئات الكبيرة بقدر الإمكان. والتوصيات العامة التالية بخصوص تخزين ومعاملة الإنزيمات سوف تساعد على المحافظة على النشاط الحفزي لهذه البروتينات.

## ١٠-٥-١٠ المحافظة على ثباتية الإنزيمات أثناء التخزين

مثل كل البروتينات، فالإنزيمات في حالتها الطبيعية تثبت بواسطة ظروف خاصة للمحاليل من الـ pH والقوة الأيونية والتركيب الأنيوني / الكاتيوني وغيرهم. ولا يمكن وضع مبدأ عام بالنسبة لهذه الظروف، والظروف الأفضل لكل إنزيم فردي يجب أن تعين تجريبياً.

وللتخزين طويل المدى، فإن الإنزيم يجب أن يحفظ عند  $70^{\circ}\text{C}$  - في مجمد أو تحت النيتروجين السائل. إن المجمد التقليدي يعمل عند درجة حرارة إسمية  $20^{\circ}\text{C}$  -، ولكنه يعمل في دورات تشتمل على درجات حرارة أعلى للمحافظة عليها خالية من الصقيع (الندى أو البخار المتجمد). وهذا قد يؤدي إلى دورات تجميد-إذابة غير متعمدة لعينة الإنزيم التي تؤدي إلى تغيير طبيعته. وإذا خزن الإنزيم في مثل هذه المجمدات، فإنه يمكن زيادة ثباتية البروتين بإضافة حجم مساوٍ من الجليسرول للعينة وخطها جيداً. ومحلول 50% جليسرول سوف يحافظ على عينة الإنزيم في الطور السائل عند 20%- الذي يمنع دورات التجميد-الإذابة للإنزيم. وفي الحقيقة فإن معظم الإنزيمات تظهر ثباتية مثالية عند تخزينها عند  $20^{\circ}\text{C}$  - كمحلول 50% جليسرول.

إعادة دورات التجميد-الإذابة تؤدي إلى تغيير طبيعة البروتين ويجب تفاديها. لذلك فإنه لتجنب فقد مادة عينة الإنزيم، فإن العينات يجب أن تخزن في أحجام صغيرة مركزة. وبهذه الطريقة فإن حجم العينة المطلوب لكل تجربة يومية يمكن إذابته، بينما بقية العينات تبقى مجمدة. وبمجرد إذابة الإنزيم يجب أن يحفظ الإنزيم عند درجة حرارة الثلج ( $4^{\circ}\text{C}$ ) مدة كافية قبل ضبط حرارته إلى درجة حرارة الاختبار.

بعض المواد المضافة سوف تعزز ثباتية عديد من الإنزيمات للتخزين طويل المدى عند درجة حرارة التجمد وأحياناً أيضاً للتخزين قصير المدى للمحاليل. الجليسرول والسكرز والسيكلودكستران كثيراً ما تضاف لتثبيت عينات الإنزيم؛ والتركيزات الصحيحة لهذه المضافات التي تثبت إنزيم ما يجب أن تقدر تجريبياً.

أحد المشاكل الشائعة الأخرى في المعاملة مع محاليل الإنزيمات هو فقد النشاط الإنزيمي نتيجة للإدمصاص على أسطح الأوعية وقمة الماصات. فالبروتينات ترتبط بشدة بأسطح الزجاج والكوارتز وعديد الاستيارين، لذلك لا يجب استخدام الأوعية المشيدة من هذه المواد في عينات الإنزيمات. ومن ثم فإن الأوعية وأدوات النقل المستخدمة في تجارب الإنزيمات يجب أن تشيد من مواد منخفضة الارتباط بالبروتين مثل عديد البروبيلين وعديد الإيثيلين. حتى مع استخدام مواد منخفضة الارتباط بالبروتين، فإنه ما زال يوجد فقد لبروتين الإنزيم نتيجة الإدمصاص. ولخفض هذه التأثيرات إلى الحد الأدنى، فإنه كثيراً ما يكون من الممكن إضافة بروتين حامل carrier protein إلى عينات الإنزيم، طالما تأكد أن البروتين الحامل لا يتداخل مع إختبار الإنزيم بأى طريقة. والبروتين، الحامل هو بروتين خامل الذي يضاف إلى محلول الإنزيم عند تركيزات أعلى من الإنزيم. وبهذه الطريقة فإن الأسطح سوف تشبع بالبروتين الحامل ومن ثم لا تكون متاحة لإدمصاص الإنزيم. ألبومين سيرم البقر (Bovine serum albumin (BSA والجيلاتين gelatin والكازين casein هي البروتينات الشائعة المستخدمة لهذا الغرض. بعض الباحثين وجدوا أن جلايكول عديد الإيثيلين Polyethylene glycol ذو الوزن الجزيئي 8000 دالتون (PEG-8000 Da) يكون بديل مفيد للبروتينات الحاملة. وفي حالة استخدامه يجب أن يكون عالي الدرجة.

#### ١٠-٥-٢ فقد نشاطية الإنزيم أثناء إختبارات النشاطية

بعض الإنزيمات التي تكون ثابتة تحت الظروف المثلى للتخزين طويل المدى (كما وصفنا) سوف تصبح غير نشطة أثناء تقدم (سير) إختبار النشاطية. وهذا السلوك يكون مميز بظهور منحنى تقدم مستوى مبكراً قبل فقد كمية كبيرة من المادة الخاضعة. ويوجد سببين شائعين لهذا النوع من فقد النشاطية:

- أولاً، أن البنية الفراغية conformation للإنزيم قد لا تكون ثابتة تحت الظروف الخاصة لمحلول الإنزيم (مثل درجة الحرارة الـ pH، القوة الأيونية وتخفيف تركيز

الإنزيم) المستخدمة في الاختبار. فعلى سبيل المثال، إذا كانت الصورة النشطة للإنزيم هي ثنائية الوحدات dimer، فإن التخفيف إلى تركيز منخفض للإنزيم عند بداية اختبار النشاطية ربما يحدث تفكك متزامن للإنزيم ثنائي الوحدات إلى الوحدات الفردية. وإذا كان وقت تفكك الإنزيم ثنائي الوحدات بطيئاً ومماثلاً لوقت الاختبار الإنزيمي، فإن نقص النشاط ربما يشاهد خلال كل وقت تقدم التفاعل. وأحياناً ضبط التركيز النهائي للإنزيم يساعد في التغلب على هذه المشكلة. أيضاً فإن الضبط الصغير في ظروف المحلول الأخرى يمكن أن تساعد في فترة بقاء الأنواع النشطة للإنزيم أثناء إختبارات النشاط.

- ثانياً: السبب الآخر لفقد النشاط أثناء الاختبار هو التنشيط الذاتي للإنزيم الذي ينشأ مباشرة من التحول الحفزي. فعلى سبيل المثال فإن بعض إنزيمات الأكسدة والاختزال تنتج بعض أنواع الشقوق الحرة عالية الضرر كنواتج - جانبية للنشاط الحفزي. وعندما يحدث ذلك، فإن الشقوق التي تنشأ أثناء الحفز يمكن أن تهاجم الموقع النشط للإنزيم وتجعله غير نشط. وفي هذه الحالات فإن التنشيط (فقد النشاط) الناتج من الشقوق الحرة يمكن أحياناً خفضه بإضافة كاسحات الشقوق الحرة مثل الفينول إلى مخلوط التفاعل. وإضافة كمية صغيرة من إنزيم كatalase يمكن أحياناً أن يساعد في تثبيت الإنزيم تحت الاختبار.

## أسئلة

- ١- طور الحالة الثابتة هو الطور المستهدف لدراسة حركيات ميكليس- منتين. في بعض الحالات قد يظهر.  
(أ) طور تباطؤ قبل طور الحالة الثابتة الذي قد يتداخل مع طور الحالة الثابتة. ما أسباب ظهور هذا الطور، وكيف يمكن التغلب عليه؟

(ب) طور متسارع قبل طور الحالة الثابتة. ما هي أسباب ظهور هذا الطور، وكيف يمكن التغلب عليه.

٢- توجد عدة طرق لقياس السرعة الابتدائية للتفاعل الإنزيمي

(أ) أذكر هذه الطرق

(ب) ما أفضل هذه الطرق في قياس السرعة الابتدائية. ولماذا؟

(ج) أعطي مثال لتفاعل إنزيمي يمكن تقديره لكل من هذه الطرق.

(د) ما هي عيوب الطريقة غير المستمرة (اختبار النقطة النهائية) في قياس السرعة الابتدائية.

٣- أذكر أهمية إجراء القياسات الحاكمة.

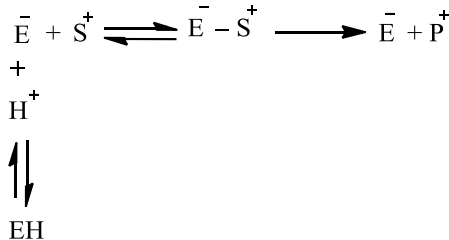
٤- علل لماذا في تجارب قياس السرعة الابتدائية يجب أن يكون تركيز الإنزيم أصغر كثيراً عن تركيز المادة الخاضعة  $[E] \ll [S]$ ؟

٥- ما هو تركيز المادة الخاضعة المناسب لتقدير الثوابت الحركية بمذلول قيم  $K_m$ .

٦- افترض أنك قمت بتجربة لقياس  $K_m$  من سرعة التفاعل عند تركيزات مختلفة من المادة الخاضعة، ولكنك لم تدرك أن المادة الخاضعة لها ميل للترسيب تحت الظروف التجريبية. ما تأثير ذلك على قياس  $K_m$ ؟

٧- افترض أنك قمت بتشديد منحنى للسرعة مقابل تركيز المادة الخاضعة (S) لإنزيم يعتقد أن  $K_m$  له تساوي  $2\mu M$ . وتركيز الإنزيم كان  $200\text{ nM}$ ، وتركيز المادة الخاضعة في المدى من  $0.1\mu M$  إلى  $10\mu M$ . ما هو الخطأ في هذا التركيب، وكيف تقوم بتصحيحه؟

٨- تأثير الـ pH على نشاط أحد الإنزيمات تم اختباره. عند الموقع النشط، فإن الإنزيم يحتوي على مجموعة متأينة التي يجب أن تكون سالبة الشحنة لإرتباط المادة الخاضعة وإجراء الحفز. إن المجموعة المتأينة لها،  $pK_a$  6. والمادة الخاضعة لها شحنة موجبة خلال مدى pH للتجربة.



(أ) إرسم منحنى  $v$  مقابل الـ  $pH$  عندما يكون تركيز المادة الخاضعة أكبر كثيراً عن  $K_m$  للإنزيم.

(ب) إرسم منحنى  $v$  مقابل الـ  $pH$  عندما يكون تركيز المادة الخاضعة أقل كثيراً من  $K_m$ .

(ج) عند أى  $pH$  تكون السرعة نصف السرعة القصوى التي يتم الوصول إليها تحت هذه الظروف؟

٩- وضح كيف يمكن قياس طاقة التنشيط ( $\Delta G^\ddagger$ )  $E_a$  لتفاعل إنزيمي. ما هو مدى درجة الحرارة التي عليها يمكن إجراء الاختبار ولماذا؟

١٠- معدلات عديد من التفاعلات الإنزيمية كدالة في الـ  $pH$  تظهر منحنى ناقوسي.

(أ) إرسم منحنى لإنزيم إفتراضي يظهر المعدل الأقصى عند  $pH7$ .

(ب) ماذا يعكس هذا المنحنى للخصائص الإنزيمية.

(ج) كيف يمكن تقدير  $pK_a$  لبواقي الأحماض الأمينية المشاركة في التفاعل.

١١- أجب عن التالي بصح أو خطأ، وإذا كانت خطأ ففسر لماذا.

(أ) يعتبر الامتصاص الضوئي هو أكثر الطرق استخداماً في الاختبارات الإنزيمية.

(ب) أجهزة الامتصاص ذوات الحزمة المزدوجة أفضل من أجهزة الحزمة الوحيدة في الاختبارات الإنزيمية.

(ج) لا توجد قيود على استخدام قانون بير عند أى تركيزات من الجزئ الممتص للإشارة الضوئية.

(د) قياسات الفلورسنس (الفلورة) تتميز عن طرق الامتصاص لحساسيتها بعامل 100- ضعف مقارنة بطرق الامتصاص.

(هـ) من مصادر الأخطاء في قياس الامتصاص هو العكارة

(و) المصدر الأساسي للخطأ في قياسات الفلورة هو خمد الفلورة.

(ز) معظم النظائر المستخدمة في دراسات الإنزيمات تتحلل بإنبعاث جسيمات بيتا وأشعة جاما.

١٢- أشرح باختصار أحد طرق قياس النشاط الإشعاعي؟

١٣- ما هي العوامل التي تؤدي إلى فقد الإنزيم لنشاط عند التخزين؟

١٤- كيف يمكن المحافظة على نشاط الإنزيم عند تخزينه في المجمد التقليدي؟





## الجزء الرابع

### مثبطات الإنزيمات Enzyme Inhibitors

|                                                   |        |
|---------------------------------------------------|--------|
| المثبطات العكسية                                  | فصل 11 |
| مثبطات الارتباط المحكم                            | فصل 12 |
| مثبطات الارتباط البطيء (النشيط المعتمد على الوقت) | فصل 13 |

عديد من المواد يمكن أن تثبط النشاط الإنزيمي بالارتباط بالإنزيم بطريقة تؤثر على ارتباط المادة الخاضعة و/أو رقم التحول للإنزيم. والمواد التي تثبط الإنزيم بهذه الطريقة يطلق عليها المثبطات inhibitors.

يمكن تصنيف المثبطات الإنزيمية إلى خمسة أقسام اعتماداً على درجة المعكوسة reversibility وسرعة الوصول لحالة الاتزان:

١- المثبطات العكسية السريعة Rapid, Reversible Inhibitors التي تعرف أيضاً بالمثبطات العكسية التقليدية Classical reversible inhibitors: هي جزيئات ترتبط عكسياً مع الإنزيم مع معدل ارتباط وتفكك سريع مقارنة بالمقياس الزمني المتضمن في قياس الحالة الثابتة والسرعة الابتدائية. وهذه المثبطات تحدث درجة محددة من التنشيط تعتمد على التركيز النسبي للإنزيم والمثبط والمادة الخاضعة، ولا يتغير هذا الجزء من التنشيط أثناء قياس السرعة الابتدائية. وسوف نناقش هذا النوع من التنشيط في فصل ١١.

٢- المثبطات العكسية بطيئة الارتباط Slow-Binding, Reversible Inhibitors: في هذا النوع من التنشيط فإن ارتباط المثبط بالإنزيم يكون تفاعل ثنائي الجزيئية مثل المثبطات العكسية السريعة. مع ذلك، فإن الوصول إلى حالة الاتزان يكون بطيئاً. ومن ثم فإن جزء التنشيط يصبح أكبر أثناء قياس السرعة الابتدائية. والبيانات من قياسات التنشيط المعتمد على الوقت تستخدم في تحليل البيانات من هذا النوع من التجارب. وفي فصل ١٣ سوف نناقش هذا النوع من التنشيط.

٣- مثبطات الارتباط المحكم السريعة Rapid, Tight-binding Inhibitors: مثبطات الارتباط المحكم السريعة هي أيضاً مثبطات عكسية ولكنها ترتبط بألفة عالية مع الإنزيم بحيث أن جزءاً كبيراً من جزيئات المثبط تستنفذ في الارتباط بالإنزيم لتكوين معقد الإنزيم- المثبط. ولمثل هذه المثبطات محكمة الارتباط لم يعد بالإمكان تطبيق تقريب الحالة الثابتة التي تفترض أن تركيز المثبط الحر يساوي تركيز المثبط الكلي التي تطبق في حالة المثبطات العكسية السريعة. وسوف نناقش مثبطات الارتباط المحكم السريعة في فصل ١٢.

٤- مثبطات الارتباط المحكم البطيئة Slow, Tight-Binding Inhibitors: مثل هذه المثبطات تشتمل على إثنين من التعقيدات ألا وهي الارتباط المحكم الذي عرض سابقاً وثانياً بطء الوصول إلى الاتزان. وهذا العائق الثاني يمكن التغلب عليه بالتحضير المسبق للمثبط بالإنزيم للوصول إلى حالة الاتزان ثم إضافة المادة الخاضعة كما سنوضحه في فصل ١٢.

٥- المثبطات غير العكسية Irreversible Inhibitors: المثبطات غير العكسية ترتبط بالإنزيم ارتباطاً غير عكسياً وتجعل الإنزيم غير نشطاً. وهذا النوع من التنشيط يحدث نموذجياً خلال تكوين رابطة تساهمية بين مجموعة ما على جزيء الإنزيم والمثبط. وتأثير المثبطات غير العكسية يكون تدريجياً (متصاعداً)، فدرجة التنشيط سوف تزيد مع الوقت إلى أن يستنفذ إما كل المثبط أو كل الإنزيم الموجود في تكوين معقد الإنزيم- المثبط. وفي فصل ١٣ سوف نناقش هذا النوع من التنشيط البطيء.

إن دراسة تثبيط الإنزيمات يعتبر مهماً من عدة أوجه:

- تثبيط النشاط الإنزيمي يستخدم كآلية تحكم رئيسية في نشاط الإنزيمات في الأنظمة البيولوجية. فالإنزيمات لها دور أوسع من كونها حفازات بيولوجية تسرع من معدلات التفاعلات الكيموحيوية، ولكن يتم التحكم في نشاط بعض الإنزيمات بواسطة المنشطات activators والمثبطات. إن تنظيم نشاط الإنزيمات غير الوضعية (الألوستيرية) allosteric enzymes يمثل هذا النوع من التنظيم. ومن ثم فإن أحد الوظائف المهمة للإنزيمات هي تنظيم أيض الخلية (الفصلين ١٤ و ١٥).
  - على مستوى الأبحاث الأساسية، فإن المثبطات يمكن أن تكون أدوات مفيدة للتمييز بين الآليات المختلفة للحفز الإنزيمي خاصة للإنزيمات التي تعمل على مادتين خاضعتين. أيضاً فإنه بدراسة ألفة الارتباط النسبي للمثبطات العكسية (التنافسية) المختلفة التركيب يمكن الحصول على معلومات عن تركيب الموقع النشط للإنزيم وطبيعة المجموعات الفعالة في الموقع النشط.
  - مثبطات الإنزيمات لها أيضاً بعض التطبيقات التجارية. فعلى سبيل المثال فإن المثبطات الإنزيمية تعتبر أساس لبعض المنتجات الزراعية مثل مبيدات الحشرات ومبيدات الحشائش. أيضاً فإن عديد من العقاقير التي تستخدم في مقاومة الأمراض تقوم بعملها عن طريق تثبيط إنزيمات خاصة مرتبطة بعملية المرض. ومن ثم فإن تثبيط الإنزيمات هو أحد مجالات الأبحاث الرئيسية في صناعة المستحضرات الصيدلانية.
- من أجل ذلك أصبحت دراسة التحليل الحركي للمثبطات في المعامل من المواضيع النشطة في مجالات متعددة تشمل العقاقير والسموم ومضادات السموم والمبيدات والبيولوجيا الجزيئية.

---

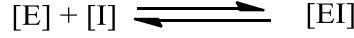
## فصل 11 المثبطات العكسية

### Reversible Inhibitors

---

|      |                                                                |
|------|----------------------------------------------------------------|
| ١-١١ | صيغ الاتزان في التثبيط العكسي                                  |
| ٢-١١ | التثبيط التنافسي                                               |
| ٣-١١ | التثبيط اللاتنافسي                                             |
| ٤-١١ | التثبيط غير التنافسي                                           |
| ٥-١١ | التطابق الشامل للبيانات غير المحولة                            |
| ٦-١١ | منحنيات الجرعة- الاستجابة لتثبيط الإنزيم                       |
| ٧-١١ | الارتباط المتبادل قصرياً لأثنين من المثبطات                    |
| ٨-١١ | العلاقة بين التركيب والنشاط للمثبطات وتصميم المثبطات الإنزيمية |

في هذا الفصل سوف نناقش عدد من الآليات البسيطة للتثبيط العكسي الكلاسيكي (الذي يرتبط فيه جزئ المثبط عكسياً بالإنزيم مع معدلات ارتباط وتفكك سريعة). وتأثيراتها على السلوك الحركي للإنزيمات التي تتبع نموذج ميكيليس- منتين. كما سوف يعتمد التحليل على التفاعلات الإنزيمية لمادة خاضعة واحدة. كثير من أسس وتطبيقات المثبطات العكسية يعتمد على قدرتها على الارتباط بصورة متخصصة وبألفة عالية مناسبة مع الإنزيم المستهدف. والقوة النسبية للمثبط العكسي تقاس بقدرة الارتباط بالإنزيم المستهدف، وهذه نموذجياً يحدد مقدارها بقياس ثابت التفكك dissociation constant لمعقد الإنزيم (E)- المثبط (I):



$$K_d(K_i) = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

وفي الحالة الخاصة للتأثير المتبادل بين الإنزيم- المثبط، فإن ثابت التفكك  $K_d$  غالباً ما يشار إليه بثابت المثبط inhibitor constant ويعطي رمز خاص  $K_i$ . وقيمة  $K_i$  للمثبط الإنزيمي العكسي يمكن تقديرها تجريبياً بعدة طرق، التي تشمل ائزان الفرز الغشائي (الدليزة) equilibrium dialysis والكروماتوجرافيا والتحليل الطيفي (فصل ٥). مع ذلك، فإن أكثر الطرق الشائعة المباشرة لتعيين ثابت المثبط  $K_i$  هو تقدير تأثير المثبط على النشاط الحفزي للإنزيم. فمقياس النقص في السرعة الابتدائية مع زيادة تركيز المثبط، فإننا يمكن إيجاد التركيز النسبي للإنزيم الحر ومن ثم قياس ثابت الاتزان المناسب.

في الأجزاء التالية سنقوم بمناقشة الأنواع المختلفة من المثبطات العكسية الذي يتضمن أساليب عملها وتأثيراتها على السلوك الحركي للإنزيمات. والمثبطات العكسية تشمل ثلاثة أنواع:

- ١- التثبيط التنافسي competitive inhibition
- ٢- التثبيط اللاتنافسي noncompetitive inhibition
- ٣- التثبيط غير التنافسي uncompetitive inhibition

وهنا سوف نناقش المثبطات العكسية السريعة rapid reversible inhibitors بحركيات الحالة الثابتة (معادلة ميكليس- منتين) التي تعتمد على إفتراضين أساسيين: الأول أن المثبطات العكسية السريعة ترتبط وتفكك من الإنزيم سريعاً مقارنة بمقياس زمني أسرع بالنسبة لمعدل التحول للتفاعل المحفز إنزيمياً، وبذلك فإنه يمكن قياس السرعة الابتدائية مباشرة بعد خلط الإنزيم والمثبط. والافتراض الثاني أن طاقة ارتباط المثبط عادة ما يكون تقريباً مساو لذلك الخاص بالمادة الخاضعة، ومدى التركيز التجريبي للمثبط يجب أن

يكون مقداره أكبر عدة مرات عن تركيز المادة الخاضعة، ومن ثم فإن تركيز المثبط الحر يكون تقريباً مساوي للمثبط الكلي.

وفي تجارب قياس التأثير الحركي للمثبطات العكسية السريعة تقاس السرعة الابتدائية كدالة في تركيز المادة الخاضعة في غياب المثبط، ثم تجري في وجود تركيز ثابت من المثبط، ثم تكرر التجربة في وجود تركيز ثاني من المثبط التي منها يمكن تقدير ثابت المثبط  $K_i$ .

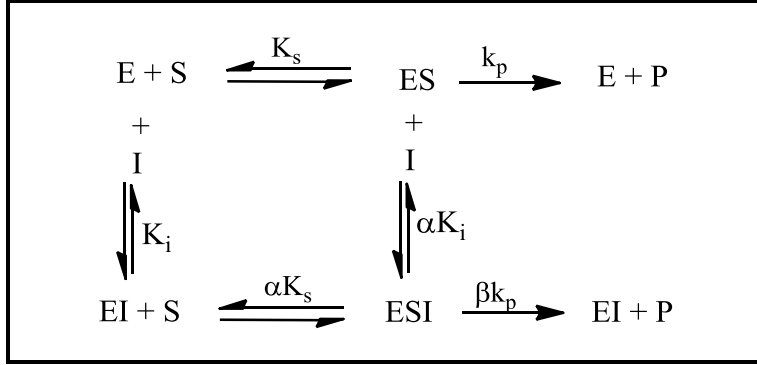
### ١١-١ صيغ الاتزان في التثبيط العكسي

في التثبيط العكسي توجد حالة اتزان بين الإنزيم (E) والمادة الخاضعة (S) والمثبط (I). ولفهم الأساس الجزيئي للتثبيط العكسي يكون من المفيد أن نبدأ بالنظر إلى الاتزان بين الإنزيم والمادة الخاضعة والمثبط التي يمكن أن تحدث في المحلول. وشكل ١١-١ يعرض المخطط العام للتأثيرات البينية المحتملة بين هذه الجزيئات. وفي هذا المخطط فإن:

- $K_s$  هي ثابت الاتزان لتفكك المعقد ES إلى الإنزيم الحر والمادة الخاضعة الحرة.
- $K_i$  هي ثابت الاتزان لتفكك المعقد EI إلى الإنزيم الحر والمثبط الحر.
- $k_p$  هي ثابت المعدل الأمامي لإنتاج الناتج من المعقد ES أو المعقد ESI.
- العامل  $\alpha$  يعكس تأثير المثبط على ألفة الإنزيم لمادته الخاضعة، وبالمثل يعكس تأثير المادة الخاضعة على ألفة الإنزيم للمثبط.
- العامل  $\beta$  يعكس التحوير في معدل تكوين المنتج بالإنزيم المتسبب عن المثبط.
- والمثبط الذي يوقف النشاط الإنزيمي كلية تكون فيه  $\beta$  تساوي صفر. والمثبط الذي يوقف جزئياً تكوين المنتج تكون فيه قيمة  $\beta$  بين صفر وواحد. من ناحية أخرى فإن منشط الإنزيم enzyme activator سوف تكون له قيمة  $\beta$  أكبر من واحد.



- قيمة  $\alpha$ ,  $\beta$  يوفران معلومات عن درجة التحويل التي تحدثها المتصلة (أى المادة الخاضعة والمثبط) على ارتباط المتصلة الأخرى، ويعرفان أسلوب (طريقة عمل) المثبط مع الإنزيم.

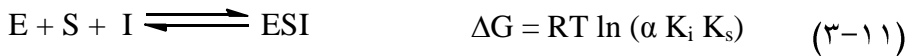


شكل ١-١١ مخطط الاتزان للتحويل الإنزيمي في وجود وغياب مثبط I

والسؤال الذي كثيراً ما يطرح: لماذا يكون الثابت  $\alpha$  نفسه لتحويل  $K_s$  و  $K_i$  ؟ والإجابة هو أن الثابت يجب أن يكون نفسه لكلاهما على خلفية الحركة الحرارية. ولتفسير ذلك، دعنا ننظر إلى مجموعة التفاعلات المزدوجة التالية:



والتفاعل الصافي لهذين التفاعلين يكون:



والآن دعنا ننظر إلى التفاعل المزدوج الآخر:



والتفاعل الصافي لهذين التفاعلين يكون:



وكلا المجموعتين من التفاعلات المزدوجة تنتج نفس التفاعل الإجمالي الصافي. وحيث أن  $\Delta G$  لا تعتمد على المسار (دالة حالة)، فإن المعادلتين ٣-١١ و ٦-١١ لهما نفس قيمة  $\Delta G$ ، لذلك:

$$RT \ln (\alpha K_i K_s) = RT \ln (\alpha K_s K_i) \quad (٧-١١)$$

$$\therefore \alpha (K_i K_s) = \alpha (K_i K_s) \quad (٨-١١)$$

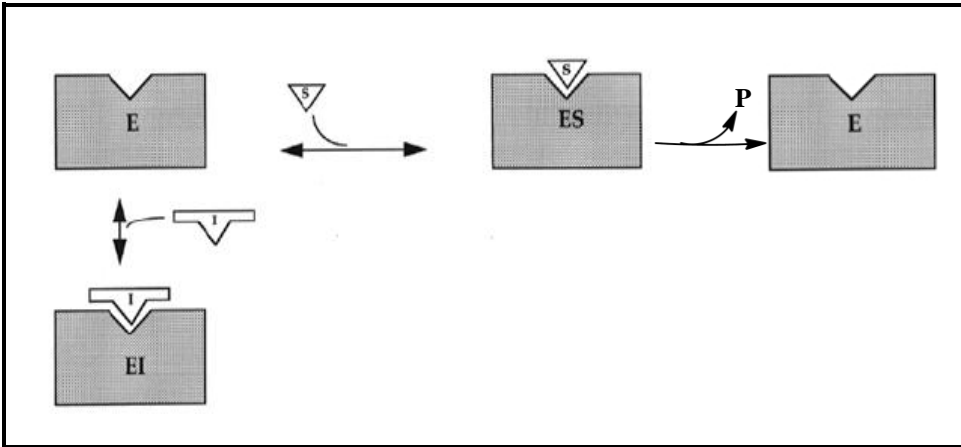
$$\therefore \alpha = \alpha \quad (٩-١١)$$

ومن ثم فإن قيمة  $\alpha$  تكون بالفعل هي نفسها لتغيير  $K_s$  بواسطة المثبط وتغيير  $K_i$  بواسطة المادة الخاضعة.

## ٢-١١ التثبيط التنافسي

### ١-٢-١١ طريقة عمل المثبط التنافسي

التثبيط التنافسي يشير إلى الحالة التي يرتبط فيها المثبط فقط بالإنزيم الحر ولا يرتبط مطلقاً بالمعقد الثنائي ES، لذلك فإنه بالرجوع إلى شكل ١-١١، نجد أن التثبيط التنافسي الكامل يميز بقيمة  $\alpha = \infty$  (أى لا يتكون المعقد ESI) و  $\beta = 0$ . وفي التثبيط التنافسي يتنافس كل من المثبط والمادة الخاضعة على نفس صورة الإنزيم. وبصورة عامة فإنهما يرتبطان بنمط تبادلي، بمعنى أن الإنزيم الحر يرتبط إما مع جزئ المثبط أو جزئ المادة الخاضعة، ولكن لا يرتبط بكلاهما في نفس الوقت. وفي معظم الحالات فإن المثبطات التنافسية تعمل عن طريق الإرتباط بالموقع النشط للإنزيم ومن ثم تتنافس مباشرة مع المادة الخاضعة على نفس الموقع على الإنزيم الحر كما هو موضح في المخطط البياني في شكل ٢-١١. في هذه الحالات فإن المثبط يشارك المادة الخاضعة أو الحالة الإنتقالية في بعض التركيبات المتماثلة. فعلى سبيل المثال فإن المألونات ( $\text{OOC}^-$ ) ( $\text{CH}_2 - \text{COO}^-$ ) تعمل كمثبط تنافسي لإنزيم succinate dehydrogenase الذي يحول المادة الخاضعة سكسينات ( $\text{OOC}^- - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{COO}^-$ ) إلى فيومارات حيث يوجد تماثل تركيبى بين المثبط التنافسي (مألونات) مع المادة الخاضعة (سكسينات)



شكل ٢-١١ تعبير إيجازي للتأثير المتبادل بين المثبط التنافسي والإنزيم

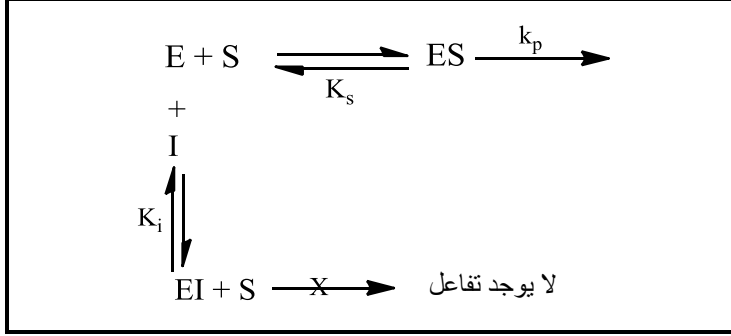
مع ذلك فإن ارتباط المثبط التنافسي بالموقع النشط ليست هي الطريقة الوحيدة التي يقوم بها المثبط بإعاقة ارتباط المادة الخاضعة للإنزيم. فمن الممكن (ولكن بالطبع أقل احتمالاً) أن يرتبط المثبط بموضع مميز على مسافة من موقع ارتباط المادة الخاضعة ويحدث بعض أنواع التغير في البنية الفراغية للإنزيم الذي يحور الموقع النشط بحيث تصبح المادة الخاضعة غير قادرة على الارتباط. وإعتماداً على ذلك فالذي يمكن أن يقال من القياسات الحركية بمفردها أن كل من المثبط والمادة الخاضعة يتنافسان على نفس صورة الإنزيم - الإنزيم الحر.

عندما يكون تركيز الإنزيم المرتبط بالمثبط أقل من 100% من تركيز الإنزيم الكلي، فإن جزيئات الإنزيم الحرة سوف تحول المادة الخاضعة عند نفس المعدل مثل كما في غياب المثبط وتظهر نفس السرعة القصوى. مع ذلك فإن التنافس بين المثبط والمادة الخاضعة للإنزيم الحر سوف يكون له تأثير على تركيز المادة الخاضعة المطلوبة للوصول إلى نصف السرعة القصوى. لذلك فإن وجود المثبط التنافسي في عينة الإنزيم له تأثير حركي برفع  $K_m$  الظاهرية (المشاهدة) للإنزيم لمادته الخاضعة دون أن يؤثر على قيمة  $V_{max}$ ، وهذا هو السلوك الحركي لتشخيص المثبط التنافسي. ونظراً للتنافس بين المثبط والمادة الخاضعة، فإن السمة المميزة للتنشيط التنافسي أنه يمكن التغلب عليه بزيادة تركيز المادة الخاضعة، أي أن  $K_i$  (ثابت التفكك أو ثابت المثبط) الظاهرية للمثبط تزيد مع تركيز المادة الخاضعة.

#### ٢-٢-١١ حركيات الحالة الثابتة في وجود المثبط التنافسي (التمييز الحركي للمثبط التنافسي)

عدد من طرق الرسوم البيانية قد استخدمت لتعيين نوع المثبط لجزيء ما. ومن هذه الطرق فإن رسم المقلوب المزدوج (رسم لينويفر - بورك) هو الوسيلة المباشرة لتشخيص نوع المثبط.

دعنا نبحث حركيات الحالة الثابتة لتفاعل إنزيمي لمادة خاضعة واحدة في وجود مثبط تنافسي I. والمخطط الكيميائي التالي يعبر عن النموذج العام للتنشيط التنافسي:



وهنا افترضنا أن المثبط التنافسي I يرتبط عكسياً مع الإنزيم ويكون في حالة إتزان سريع مع ثابت تفكك (ثابت المثبط)  $K_i$  الذي يعرف كالتالي:

$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]} \quad (١٠-١١)$$

ومعقد الإنزيم- المثبط (EI) لا يكون نشطاً حفيزياً. ومن ثم فإن المثبط التنافسي يخفض تركيز الإنزيم الحر المتاح للإرتباط بالمادة الخاضعة.

إن معادلة ميكليس- منتين للتفاعل المثبط تنافسياً يتم اشتقاقهما كما سبق عرضه (قسم ٦-٤)، ولكن بإضافة حد إضافي ليأخذ في الاعتبار جزء [E] الذي يرتبط بالمثبط I ليكون (EI) حيث يصبح:

$$[E] = [E]_f + [ES] + [EI] \quad (١١-١١)$$

والمعادلة الناتجة التي توضح تأثير المثبط التنافسي على السرعة الابتدائية في وجود تركيز ثابت من المثبط تكون كالتالي:

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{[S] + K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} = \frac{V_{\max}[S]}{[S] + K_m^{\text{app}}} \quad (١٢-١١)$$

وبأخذ المقلوب المزدوج لهذه المعادلة نحصل على معادلة لينويفر-بورك التالية:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} + \left(\frac{1}{[S]} \frac{K_m}{V_{\max}}\right) \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) = \frac{1}{V_{\max}} + \left(\frac{1}{[S]} \frac{K_m^{\text{app}}}{V_{\max}}\right) \quad (١٣-١١)$$

ومعادلة ١٢-١١ هي صورة محورة لمعادلة ميكليس-منتين (معادلة ٦-٢٥) مع  $K_m$  مضروب في العامل  $(1 + [I]/K_i)$  الذي يكون ثابت عند تركيز مثبت من المثبط I:

$$K_m^{\text{app}} = K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \quad (١٤-١١)$$

حيث  $K_m^{\text{app}}$  هي  $K_m$  الظاهرية في وجود تركيز ابتدائي [I] من المثبط التنافسي. ولتشخيص التثبيط التنافسي، فإنه يتم رسم  $1/v$  مقابل  $1/[S]$  في معادلة ميكليس-منتين الخطية (رسم لينويفر-بورك، معادلة ١١-١٣) مباشرة. إلا أن بعض علماء الإنزيمات (Rober A. Copeland, 2000) يرى أنه للتغلب على أخطاء الوزن في عملية تحول القيم  $v$  و  $S$  إلى  $1/v$  و  $1/[S]$ ، فإنه يقترح إجراء الخطوات التالية:

- قياس السرعة الابتدائية كدالة في تركيز المادة الخاضعة في غياب المثبط ( $[I]=0$ ) ومنها يحسب  $K_m$  و  $V_{\max}$ .

- لإختيار تركيزات المثبط في هذا النوع من التجارب يقاس تأثير مدى واسع من تركيز المثبط مع [S] مثبتة عند قيمة  $K_m$  (أى عند  $[S] = K_m$ )

- من هذه النتائج يختار تركيز المثبط الذي يعطي تثبيط بين 30% و 75% تحت هذه الظروف.
  - ومع إختيار التركيزات المثبتة للمثبط، فإننا نرسم البيانات بلغة السرعة كدالة في تركيز المادة الخاضعة لكل تركيز من المثبط تم تطابق هذه البيانات في معادلة ميكيلس- منتين (معادلة ٦-٢٥).
  - ومن التطابق غير الخطي الأفضل للبيانات غير المحولة (أى حركيات ميكيلس- منتين) يمكن تقدير قيم  $K_m^{app}$  (أى قيمة  $K_m$  عند التركيزات المختلفة من المثبط) و  $V_{max}^{app}$  (السرعة القصوى  $V_{max}$  عند التركيزات المختلفة من المثبط) مباشرة من التطابق غير الخطي.
  - وأخيراً فإننا ندخل هذه القيم من  $K_m^{app}$  و  $V_{max}^{app}$  في معادلة المقلوب المزدوج (معادلة ٦-٣٩) للحصول على المعادلة الخطية ونرسم هذه الدالة الخطية لكل تركيز من المثبط على نفس رسم المقلوب المزدوج. وبهذه الطريقة يمكن أن تستخدم رسومات المقلوب المزدوج في تحديد نوع المثبط من نمط الخطوط التي تنتج من التركيزات المختلفة من المثبط. والفكرة في إستخدام قيم  $K_m^{app}$  و  $V_{max}^{app}$  المقدرة من التطابق غير الخطي للتغلب على الأخطاء النظامية التي تنشأ من إستخدام البيانات المحولة الخطية.
- دعنا نفترض أننا قد قمنا بقياس السرعة الابتدائية لتفاعل إنزيمي إفتراضي كدالة في تركيز المادة الخاضعة من  $1 \mu M$  إلى  $50 \mu M$  في وجود تركيزات  $10 \mu M$ ,  $25 \mu M$ ,  $0 \mu M$  من مثبط ما وحصلنا على النتائج المعروضة في جدول ١١-١.

جدول ١١-١ السرعة الافتراضية كدالة في تركيز المادة الخاضعة عند ثلاثة تركيزات مثبتة من المثبت التنافسي.

| السرعة (وحدات إختيارية) |             |         | [S] (μM) |
|-------------------------|-------------|---------|----------|
| [I] = 25 μM             | [I] = 10 μM | [I] = 0 |          |
| 1.69                    | 3.23        | 9.09    | 1        |
| 3.23                    | 6.25        | 18.67   | 2        |
| 6.25                    | 11.77       | 28.57   | 4        |
| 9.09                    | 16.67       | 37.50   | 6        |
| 11.77                   | 21.05       | 44.44   | 8        |
| 14.29                   | 25.00       | 50.00   | 10       |
| 25.00                   | 40.00       | 66.67   | 20       |
| 33.33                   | 50.00       | 75.00   | 30       |
| 40.00                   | 57.14       | 80.00   | 40       |
| 45.46                   | 62.50       | 3.33    | 50       |

وإذا قمنا برسم بيانات السرعة كدالة في تركيز المادة الخاضعة [S] للتطابق مع معادلة ٢٥-٦ (للتطابق غير الخطي). فإننا نحصل على رسم مثل ذلك المعروض في شكل ٣-١١ أ. ومن هذا التطابق نحصل على القيم الظاهرية التالية للثوابت الحركية:

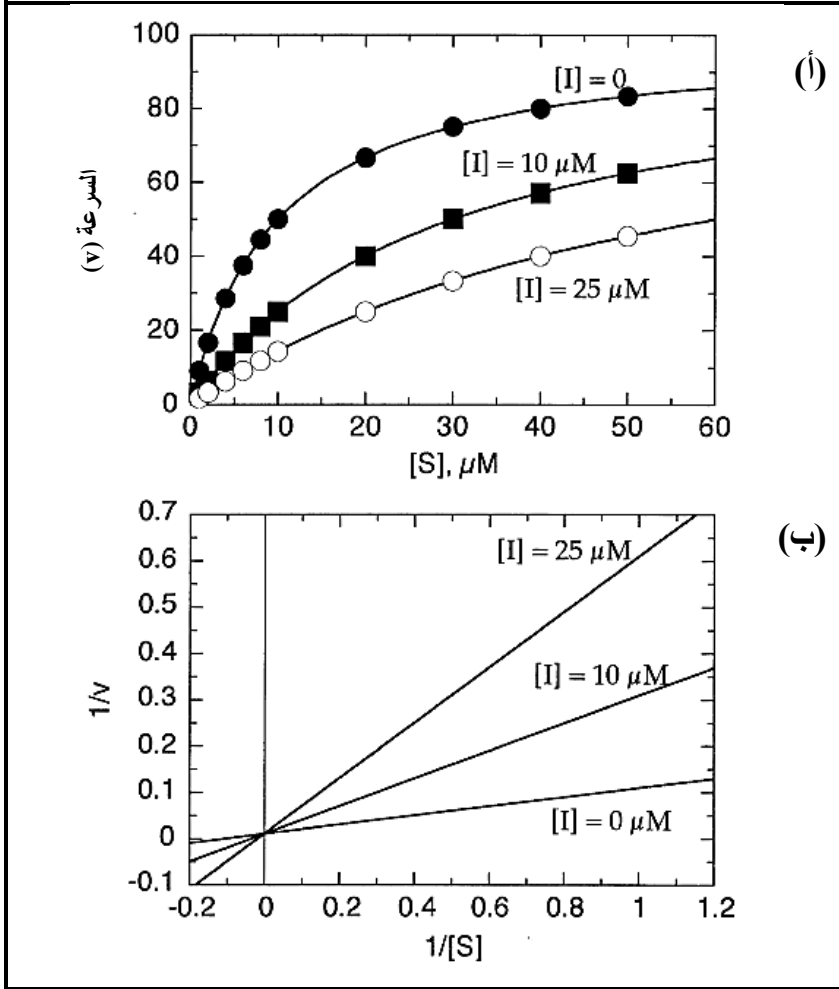
|             |                       |                          |
|-------------|-----------------------|--------------------------|
| [I] = 0 μM  | $V_{max} = 100$       | $K_m = 10.0 \mu M$       |
| [I] = 10 μM | $V_{max}^{app} = 100$ | $K_m^{app} = 30.0 \mu M$ |
| [I] = 25 μM | $V_{max}^{app} = 100$ | $K_m^{app} = 60.0 \mu M$ |

وإدماج قيم  $V_{max}^{app}$  و  $K_m^{app}$  في معادلة ٣٩-٦ ورسم الدوال الخطية الناتجة نحصل على الرسم المعروض في شكل ٣-١١ ب.

ونمط الخطوط المستقيمة في شكل ٣-١١ ب يوضح خصائص المثبط التنافسي. لاحظ أن التقاطع مع المحور y لا يتغير الذي يشير إلى أن  $V_{max}$  لا تتغير، بينما ميل الخطوط الذي يعطي  $K_m^{app} / V_{max}^{app}$  يختلف بين الخطوط نتيجة للتأثير الذي يفرض



على  $K_m$  بواسطة المثبط التنافس. ودرجة التغير في  $K_m$  تعتمد على تركيز المثبط  $[I]$  وسوف يعتمد أيضاً على  $K_i$  للمثبط. وتأثير هذه العوامل على السرعة الابتدائية يعطي بمعادلة ١١-١٢ ومعادلة المقلوب المزدوج ١١-١٣.



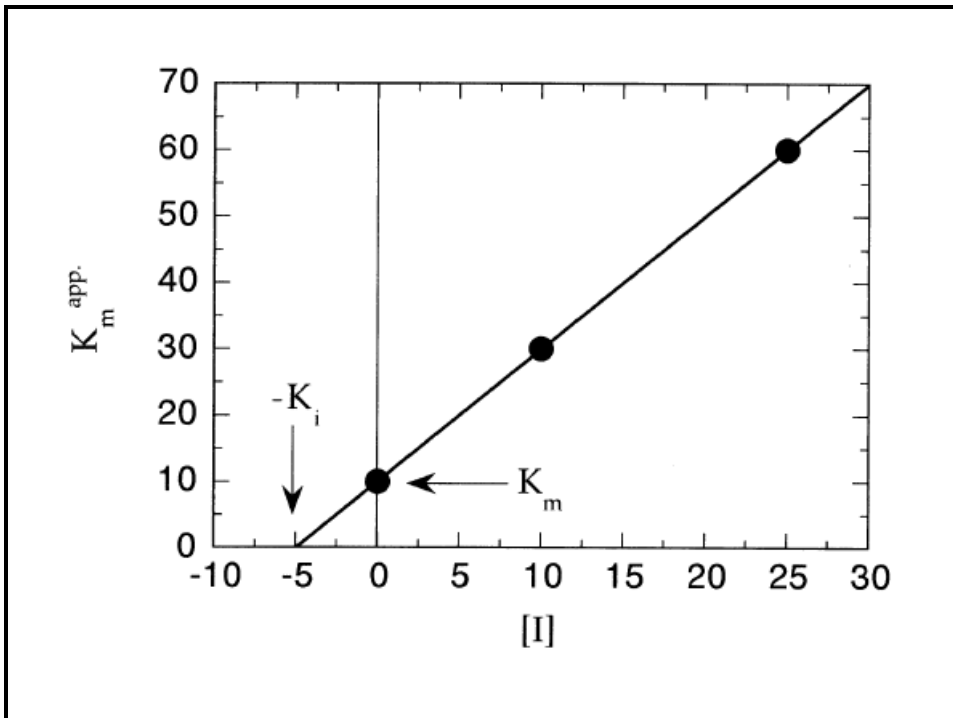
شكل ٣-١١ رسم معادلة ميكليس - منتين (أ) والمقلوب المزدوج (ب) لتأثير المثبط التنافسي على سرعة التفاعل المحفز إنزيميا. المنحنيات المرسومة في (أ) تم الحصول عليها بتطبيق معادلة ٦-٢٥ بإستخدام التطابق غير الخطي، والخطوط في (ب) تم الحصول عليها من البيانات في (أ) مع إستخدام القيم الظاهرية للثوابت الحركية  $V_{max}^{app}$  و  $K_m^{app}$  مع الاقتران مع معادلة ١١-١٣

توجد طريقتين لتقدير ثابت المثبط  $K_i$  للمثبط التنافسي:

● الأولى: إعادة ترتيب معادلة ١١-١٤ بعض التعبير التالي:

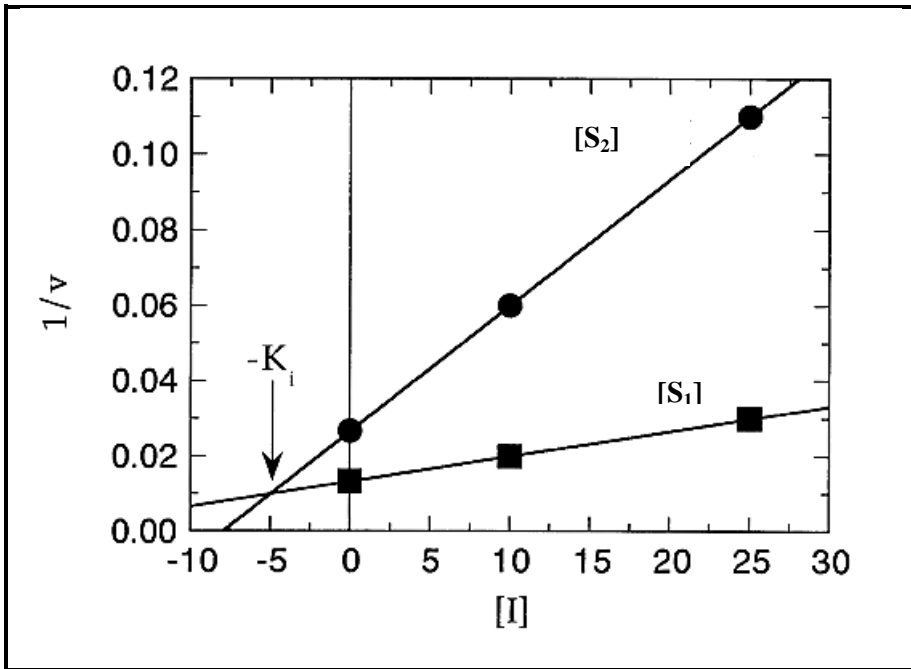
$$K_m^{app} = K_m + \frac{K_m}{K_i} [I] \quad (11-15)$$

ومن ثم فإنه بإستخدام البيانات من شكل ١١-٣ ب لرسم  $K_m^{app}$  مقابل تركيز المثبط [I] (الرسم الثانوي) نحصل على خط مستقيم الذي يتقاطع مع المحور [I] عند  $-K_i$  - شكل (١١-٤).



شكل ١١-٤ الرسم الثانوي لـ  $K_m^{app}$  كدالة في تركيز المثبط التنافسي [I]. إن قيمة ثابت المثبط  $K_i$  تقدر من القيمة السالبة للتقاطع مع المحور x (المحور (I))

- الطريقة الثانية التي اقترحت بواسطة ديكسون (1953) Dixon يتم فيها قياس السرعة الابتدائية للتفاعل كدالة في تركيز المثبط عند إثنين أو أكثر من تركيز ثابت للمادة الخاضعة، والبيانات الناتجة يتم رسمها كـ  $1/v$  كدالة في تركيز المثبط  $[I]$  لكل تركيز من المادة الخاضعة، وقيمة  $-K_i$  يتم تقديرها من قيمة المحور  $x$  التي يتقاطع عندها الخطوط كما هو موضح في شكل ١١-٥.



شكل ١١-٥ رسم ديكسون ( $1/v$  كدالة في  $[I]$ ) للمثبط التنافسي عند تركيزين مختلفين من المادة الخاضعة  $[S_1]$ ,  $[S_2]$ ، حيث  $[S_1] > [S_2]$ ، قيمة  $K_i$  لهذا النوع من التثبيط تقدر من القيمة السالبة للمحور  $x$  لتقاطع الخطين.

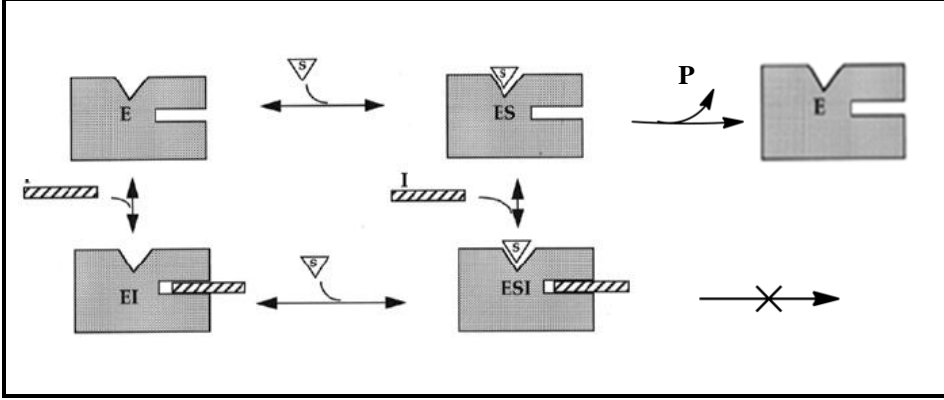
مقارنة قيم  $K_i$  لتركيبات مختلفة من المثبطات التنافسية يمكن أن تعطي معلومات عن خواص الارتباط للموقع النشط للإنزيم وم ثـ آلية الحفز. مثال ذلك فإنه في الإنزيمات التي تتطلب ATP، فإننا يمكن تقدير  $K_i$  لأجزاء من ATP مثل ADP و AMP، ريبوز

وثلاثي الفوسفات. ونظراً لأن عديد من مكونات ATP لا تكون نشطة، فإن دراسات التنشيط تكون طريقة مناسبة لتتبع ارتباطها بالإنزيم. دراسات التنشيط التنافسي تستخدم أيضاً في تقدير ألفة مناضرات الحالة الانتقالية لمواقع الحفز في الإنزيمات. فعلى سبيل المثال، فإنه قد صممت مثبطات لإنزيم بروتيناز Protease الذي يشارك في عملية المرض لفيروس نقص لمناعة في الإنسان HIV التي تحاكي الحالة الانتقالية في الحفز الإنزيمي، ومن ثم يرتبط بالإنزيم بألفة عالية ويقوم بتنشيطه.

### ١١-٣ التنشيط اللاتنافسي

#### ١١-٣-١ طريقة عمل المثبط اللاتنافسي

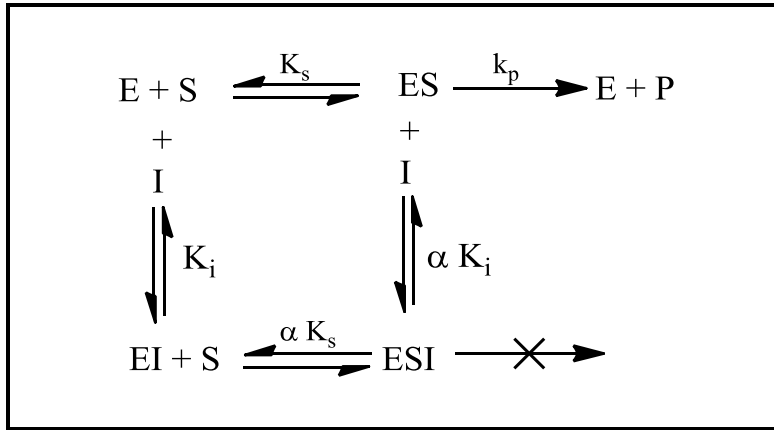
يشير التنشيط اللاتنافسي noncompetitive inhibition إلى الحالة التي يظهر فيها المثبط ألفة للارتباط بكل من الإنزيم الحر والمعقد الثنائي للإنزيم-المادة الخاضعة. لذلك فإن التنشيط اللاتنافسي الكامل يميز بقيمة محدودة  $\alpha$  و  $\beta = 0$ . وهذه الصورة من التنشيط هي الحالة الأكثر عمومية التي يمكن تصورها في المخطط في شكل ١١-١. وفي الحقيقة فإن التنشيط التنافسي والتنشيط غير التنافسي (أنظر قسم ١١-٤) يمكن تصورها على أنهما حالات مقيدة التي فيها تكون قيمة  $\alpha$  غير محدودة أو صفر على التوالي. المثبطات اللاتنافسية لا تتنافس مع المادة الخاضعة للارتباط بالإنزيم الحر، ومن ثم فإنها ترتبط بالإنزيم عند موقع مميز خلاف الموقع النشط. ويسبب ذلك، فإنه لا يمكن التغلب على تأثير المثبط اللاتنافسي بزيادة تركيز المادة الخاضعة. ومن ثم فإن التأثير الظاهري للمثبط اللاتنافسي هو خفض قيمة  $V_{max}$  دون التأثير على  $K_m$  الظاهرية للمادة الخاضعة. وشكل ١١-٦ يوضح التأثيرات المتبادلة بين المثبط اللاتنافسي والإنزيم المستهدف.



شكل ١١-٦ تعبير إيجازي للتأثير المتبادل بين المثبط اللاتنافسي والإنزيم

### ١١-٣-٢ التمييز الحركي للمثبطات اللاتنافسية

إن مخطط الإيزان للتنشيط اللاتنافسي هو كالتالي:



حيث العامل  $\alpha$  يعكس تأثير المثبط لألفة الإنزيم لمادته الخاضعة، وبالمثل فإنه يعكس تأثير المادة الخاضعة على ألفة الإنزيم للمثبط.

إن المثبط اللاتنافسي له ألفة لكل من الإنزيم الحر  $E$  والمعقد  $ES$ ، لذلك فإنه يجب الأخذ في الاعتبار كل من ثابتي التفكك لهذين الصورتين في الإنزيم عند التحليل

الحركي لمثل هذه المثبطات. والمعادلة العامة لسرعة الإنزيم في وجود مثبط لا تنافسي يمكن اشتقاقها كما في قسم ٦-٤، والنتيجة هي:

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{[S] \left(1 + \frac{[I]}{\alpha K_i}\right) + K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad (١٦-١١)$$

وهذه هي المعادلة الملائمة لتقييم المثبطات اللاتنافسية. ومقارنة معادلة ١٦-١١ مع معادلة ١٢-١١ يظهر أن المعادلتين يكونين متكافئتين عندما تكون  $\alpha$  لا متناهية. وتحت هذه الظروف فإن الحد  $(1 + [I] / \alpha K_i)$  يختزل إلى  $[S]$ ، ومن ثم فإن معادلة ١٦-١١ تختزل إلى معادلة ١٢-١١. لذلك، كما أسلفنا سابقاً فإن المثبط التنافسي يمكن النظر إليه على أنه حالة خاصة من الحالة العامة للمثبط اللاتنافسي.

وفي الحالات الاستثنائية التي يكون فيها  $\alpha K_i$  يساوي بالضبط  $K_i$  (حيث  $\alpha$  تساوى 1، أي أن ألفة المثبط للإنزيم الحر والمعقد ES تكون متساوية)، فإننا يمكن أن نستبدل الحد  $\alpha K_i$  بالحد  $K_i$ ، ومن ثم تختزل معادلة ١٦-١١ إلى الصورة البسيطة التالية:

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{([S] + K_m) \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad (١٧-١١)$$

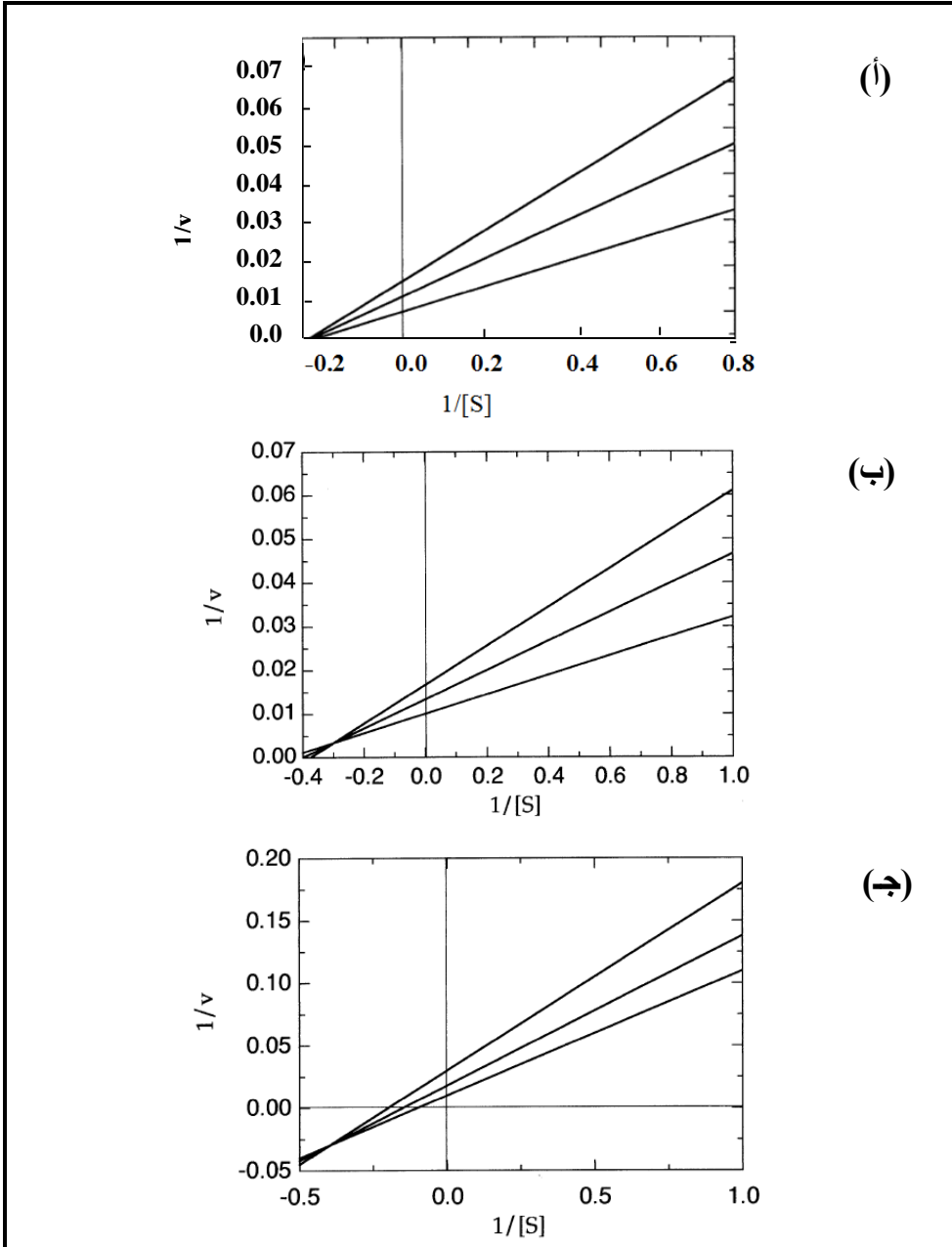
ومعادلة ١٧-١١ أحياناً ما تُورد في أدبيات الإنزيمات على أنها المعادلة المناسبة لتقييم تأثير المثبط اللاتنافسي. مع ذلك، فإن هذه المعادلة تشير إلى الحالات الخاصة المقيدة التي يكون فيها  $\alpha K_i = K_i$ .

إن صورة المقلوب المزدوج لمعادلة ١٦-١١ (بعد حذف بعض الحدود) تأخذ الصورة التالية:

$$\frac{1}{v} = \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \left(\frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]}\right) + \frac{1 + \frac{[I]}{\alpha K_i}}{V_{\max}} \quad (١٨-١١)$$

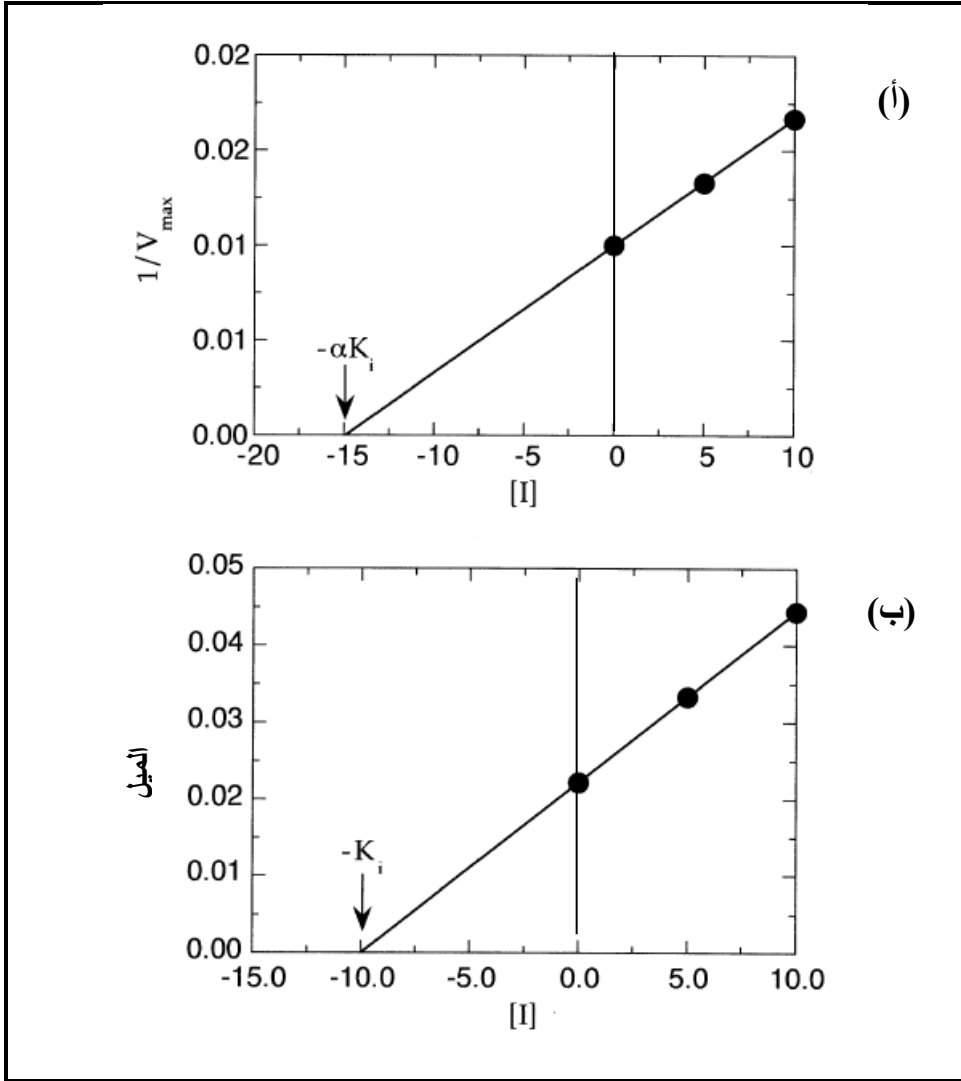
وكما يتضح من معادلة ١٨-١١، فإن كل من الميل والتقاطع مع المحور  $y$  لرسم المقلوب المزدوج سوف تتأثر بوجود المثبط اللاتنافسي. إن نمط الخطوط المشاهدة لكل تركيز مختلف سوف يعتمد على قيمة  $\alpha$ . فإذا كانت  $\alpha = 1$  فإن الخطوط تلتقي عند نقطة واحدة عند  $1/[S]$  أقل من الصفر على المحور  $x$  (وعند  $1/[v] = 0$ ) (شكل ٧-١١ أ). وعندما تكون  $\alpha$  أكبر من 1، فإن الخطوط سوف تتقاطع عند  $1/[S]$  أقل من الصفر وقيمة  $[1/v]$  أكبر من صفر (شكل ٧-١١ ب). من ناحية أخرى فإنه لـ  $\alpha < 1$ ، فإن الخطوط سوف تتقاطع أسفل المحورين  $x$  و  $y$  عند قيم سالبة لكل من  $1/[S]$  و  $1/v$  (شكل ٧-١١ ج).

للحصول على قيم  $K_i$  و  $\alpha K_i$  يجب تشييد إثنين من الرسوم البيانية الثانوية. الأول رسم ديكسون  $1/V_{\max}$  (أي السرعة عند تركيز التشبع للمادة الخاضعة) كدالة في  $[I]$  التي منها يمكن تقدير  $\alpha K_i$  - من التقاطع مع المحور  $x$  (شكل ٨-١١ أ). وفي الرسم الثاني فإن ميول خطوط المقلوب المزدوج (من رسم لينويفر - بورك) يرسم كدالة في  $[I]$ . في هذا الرسم فإن التقاطع مع المحور  $x$  سوف يساوي  $K_i$  - (شكل ٨-١١ ب). وبذلك فإنه يمكن تقدير الثابتين من مجموعة فردية من البيانات التجريبية.



شكل ١١-٧ نمط الخطوط في رسوم المقلوب- المزدوج للمثبطات اللاتنافسية (أ)  $\alpha=1$  (ب)  $\alpha>1$  ،  
(ج)  $\alpha<1$ .



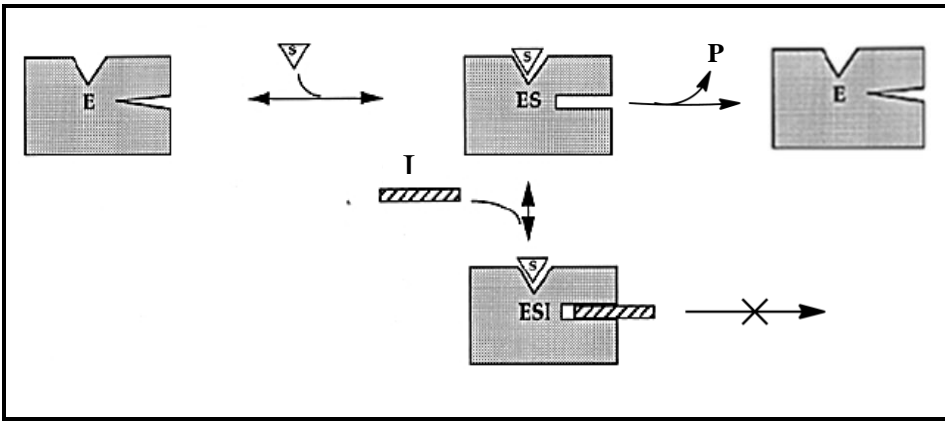


شكل ١١-٨ الرسوم الثانوية لتقدير ثوابت المثبط للمثبط اللاتنافسي. (أ) يرسم  $1/V_{\max}$  كدالة في  $[I]$  وقيمة  $-\alpha K_i$  - تعين من تقاطع الخط مع المحور  $x$ . (ب) قيمة  $-K_i$  - تعين من التقاطع مع المحور  $x$  لرسم ميول الخطوط من رسم المقلوب المزدوج (رسم لينويفر- بورك) كدالة في  $[I]$

### ١١-٤: التثبيط غير التنافسي

#### ١١-٤-١ طريقة عمل المثبط غير التنافسي

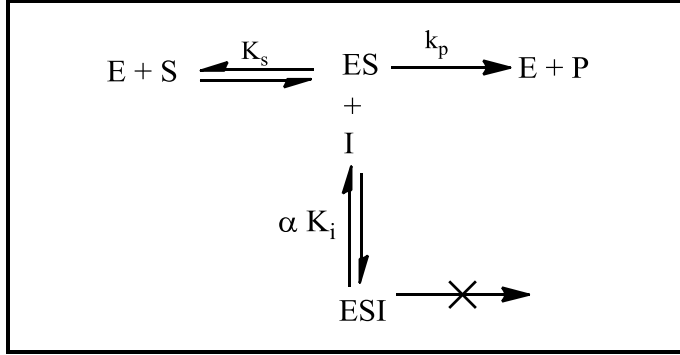
المثبطات غير التنافسية Uncompetitive inhibitors ترتبط قصريا مع المعقد ES ولا ترتبط بصورة الإنزيم الحر. والتأثير الظاهر للمثبط غير التنافسي هو خفض  $V_{max}$  وخفض  $K_m$  (أى زيادة ألفة الإنزيم لمادته الخاضعة). ومن ثم فإن المثبطات غير التنافسية الكاملة تتميز بـ  $\alpha < 1$ ,  $\beta = 0$ , و  $K_i$  تكون لا متناهية، ولا يتحول المعقد ESI إلى ناتج التفاعل. ومن المحتمل أن ارتباط المادة الخاضعة تحدث تغير في البنية الفراغية للإنزيم الذي يكشف موضع الارتباط بالمثبط. وفي هذه الحالة، فإن المثبط غير التنافسي لا يتنافس مع المادة الخاضعة على الارتباط بالإنزيم، ولذلك فإن تأثير المثبط غير التنافسي لا يمكن التغلب عليه بزيادة تركيز المادة الخاضعة. وشكل ١١-٩ يوضح نمط التأثيرات المتبادلة بين المثبط غير التنافسي والإنزيم.



شكل ١١-٩ تعبير إيجازي للتأثير المتبادل بين المثبط غير التنافسي والإنزيم

#### ١١-٤-٢ التمييز الحركي للمثبطات غير التنافسية

دعنا نبحث في حركات الحالة الثابتة لتفاعل إنزيمي لمادة خاضعة واحدة في وجود مثبط غير تنافسي I. ومخطط الإيزان التالي يعبر عن النموذج العام للتثبيط غير التنافسي، حيث يكون المعقد ESI نهائية مينة:



وهنا فإن المثبط غير التنافسي يرتبط فقط بالمعقد ES ويكون ثابت التفكك  $\alpha K_i$  للمعقد ESI كالتالي:

$$\alpha K_i = \frac{[ES][I]}{[ESI]} \quad (١١-١٩)$$

إن معادلة ميكليس-منتين للتفاعل في وجود المثبط غير التنافس يتم اشتقاقها كما سبق توضيحه في قسم ٦-٤، ولكن بإضافة حد إضافي ليأخذ في الاعتبار جزء [E] الذي يرتبط بالمادة الخاضعة والمثبط ESI، حيث يصبح التركيز الكلي للإنزيم كالتالي:

$$[E] = [E]_f + [ES] + [ESI]$$

وصورة معادلة السرعة (معادلة ميكليس - منتين المعدلة لوجود المثبط غير التنافس تصبح:

$$v = \frac{\left( \frac{V_{\max}}{1 + [I]/\alpha K_i} \right) [S]}{\frac{K_m}{1 + [I]/\alpha K_i} + [S]} = \frac{V_{\max}^{app} [S]}{K_m^{app} + [S]} \quad (١١-٢٠)$$

وبذلك فإن كل من  $V_{\max}$ ,  $K_m$  يتأثران بنفس العامل في وجود المثبط غير التنافس حيث تصبح قيم كل من  $V_{\max}$  الظاهرية ( $V_{\max}^{\text{app}}$ ) و  $K_m$  الظاهرية  $K_m^{\text{app}}$  كالتالي:

$$V_{\max}^{\text{app}} = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{[I]}{\alpha K_i}}, \quad K_m^{\text{app}} = \frac{K_m}{1 + \frac{[I]}{\alpha K_i}} \quad (٢١-١١)$$

وإذا ضرب البسط والمقام لمعادلة ١١-٢٠ في  $(1 + [I]/\alpha K_i)$  فإننا نحصل على الصورة الأبسط التالية:

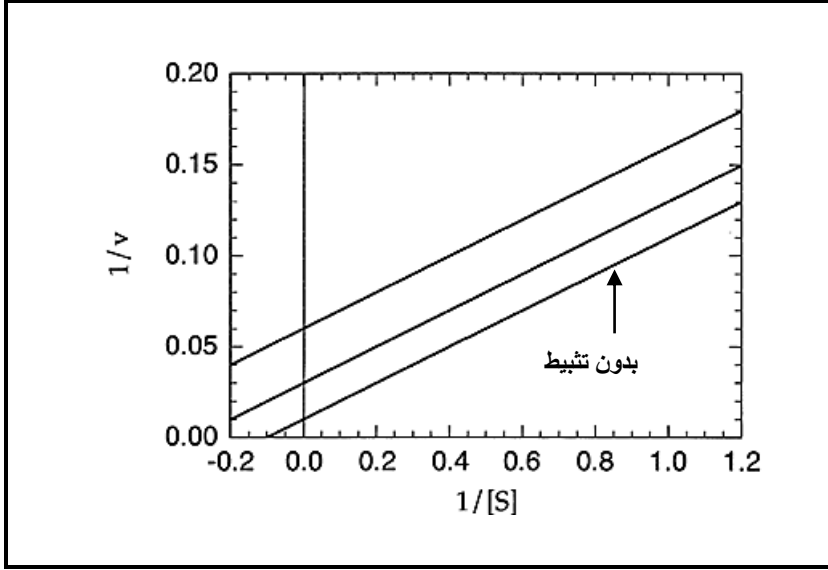
$$v = \frac{V_{\max}[S]}{[S](1 + [I]/\alpha K_i) + K_m} \quad (٢٢-١١)$$

وسوف نرى أن المعادلة ١٠-٢٢ هي حالة خاصة من المعادلة العامة المعطاة بمعادلة ١١-١٢.

وبإجراء بعض التحورات الجبرية يمكن توضيح أن صورة المقلوب المزدوج لمعادلة ١١-٢٠ تكون كالتالي:

$$\frac{1}{v} = \frac{[K_m]}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{\frac{V_{\max}}{1 + [I]/\alpha K_i}} \quad (٢٣-١١)$$

ونحن نرى من معادلة ١١-٢٣ أن ميل رسم المقلوب المزدوج لا يعتمد على تركيز المثبط وأن التقاطع مع المحور  $y$  يزيد باطراد مع زيادة تركيز المثبط- ومن ثم فإن رسم المقلوب المزدوج لمثبط غير تنافسي عند تركيزات مختلفة يظهر كسلسلة من الخطوط المتوازية التي تتقاطع مع المحور  $y$  عند قيم مختلفة كما يظهر في شكل ١١-١٠.



شكل ١١-١٠ نمط خطوط رسم المقلوب المزدوج لمثبط غير تنافسي

يمكن تقدير قيمة ثابت النفك  $\alpha K_i$  من التقاطع للمحور  $x$  للرسم الثانوي لديكسون ( $1/V_{max}$  مقابل  $[I]$ ) الذي يساوي  $(1 + K_m/[S]) - \alpha K_i$ . وحيث أننا نعمل عند تركيز التشبع حيث يكون  $[S] \gg K_m$ ، فإن قيمة  $K_m/[S]$  تصبح صغيرة جداً بحيث يمكن افتراض أنها تساوي صفراً. وتحت هذه الظروف، فإن التقاطع مع المحور  $x$  لرسم ديكسون سوف يساوي  $-\alpha K_i$ . ومن ثم فإنه تحت ظروف التشبع يمكن تقدير  $\alpha K_i$  من تقاطع رسم ديكسون كما سبق توضيحه في حالة المثبط اللاتنافسي.

### ١١-٥ التطابق الشامل للبيانات غير المحولة

إن الطريقة الأفضل لتقدير طريقة عمل المثبط وقيم ثابت (أو ثوابت) المثبط هو التطابق المباشر للسرعة  $v$  مقابل تركيز المادة الخاضعة  $[S]$  عند عدة تركيزات مثبتة للمثبط في المعادلات غير المحولة للتثبيط التنافسي (معادلة ١١-١٢) والتثبيط اللاتنافسي (معادلة ١١-١٦) والتثبيط غير التنافسي (معادلة ١١-٢٢). ومن تحليل المعلمات الإحصائية لجودة التطابق  $\text{goodness of fit}$  (نموذجياً  $s^2$ ) يمكن تقدير أي من أنواع التثبيط تصف

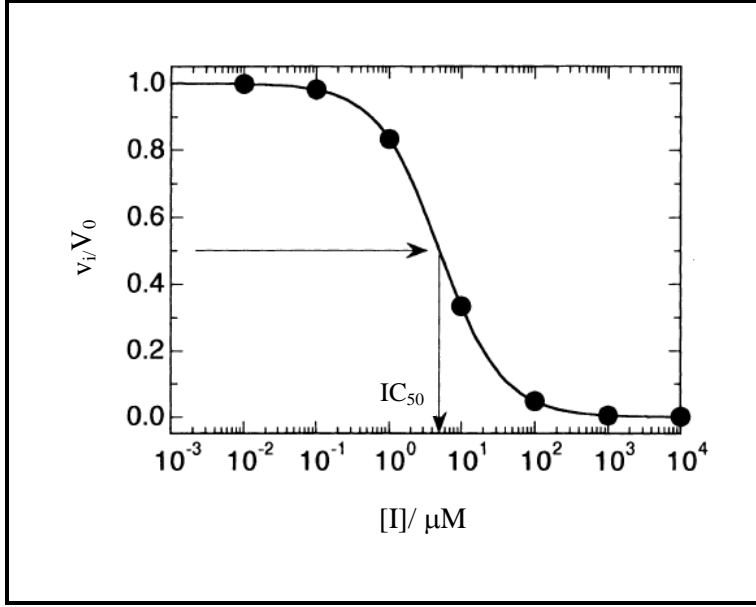
جيداً البيانات التجريبية وفي نفس الوقت تعيين قيمة ثابت (أو ثوابت) المثبط. وهذا النوع من التطابق الشامل للبيانات غير المحولة قد أصبح متاحاً حديثاً. والبرامج التجارية Graph fit و Sigma plot كمثالين تسمح بهذا النوع من التطابق الشامل (أى تطابق المنحنيات المتعددة الذي يعمل وفقاً لصورة الدالة  $y = f(x, z)$ ، حيث  $x$  هي تركيز المادة الخاضعة و  $z$  هي تركيز المثبط.

### ١١-٦-١١ منحنيات الجرعة- الاستجابة لتثبيط الإنزيم

في كثير من الإختبارات البيولوجية يمكن قياس إشارة خاصة كدالة في تركيز بعض المواد التي تضاف من الخارج للنظام البيولوجي. والمواد الخارجية التي تضاف للنظام البيولوجي قد تكون مثبط لإنزيم مستهدف أو عقار أو هورمون أو مبيد حشري أو غيرهم. والإشارة التي تقاس عادة ما تعبر عن التأثير النهائي للمادة الخارجية المضافة إلى النظام البيولوجي. إن الرسم البياني للعلاقة بين الإشارة المتحصل عليها كدالة في تركيز المادة الخارجية المضافة للنظام البيولوجي يشار إليه الرسم البياني للجرعة- الإستجابة dose-response plot. والدالة التي تصف تغير تركيز المادة يعرف بمنحنى الجرعة- الإستجابة dose-response curve (شكل ١١-١١). وهذه الرسومات تستخدم في تتبع الأحداث في بعض البيئات البيولوجية مثل تأثير المواد على نمو وتكاثر الخلية.

والرسوم البيانية للجرعة- الاستجابة يمكن أن تستخدم في تتبع تأثير المثبط على السرعة الابتدائية لتفاعل إنزيمي عند تركيز مثبت من المادة الخاضعة. وتركيز المثبط المطلوب للوصول إلى نصف الدرجة القصوى من التثبيط يشار إليه بالقيمة  $IC_{50}$  (أى تركيز المثبط Inhibitor concentration الذي يعطي 50% تثبيط). والمعادلة التي تصف تأثير المثبت على سرعة التفاعل تكون كالتالي:

$$\frac{v_i}{v_0} = \frac{1}{1 + \frac{[I]}{IC_{50}}} \quad (١١-٢٤)$$



شكل ١١-١١ الرسم البياني للجرعة- الاستجابة لجزء النشاط الإنزيمي كدالة في تركيز المثبط. لاحظ أن تركيز المثبط قد رسم بالمقياس اللوغاريتمي. إن قيمة  $IC_{50}$  للمثبط يمكن تقديرها من الرسم البياني.

حيث  $v_i$  هي السرعة الابتدائية للإنزيم في وجود المثبط عند تركيز  $[I]$  و  $v_0$  هي السرعة الابتدائية للإنزيم في غياب المثبط. إن النسبة  $v_i/v_0$  في معادلة ١١-٢٤ يشار إليها بالجزء المتبقي من النشاط الإنزيمي عند تركيز معين من المثبط. وهذا الحد يعكس جزء الإنزيم الحر وليس جزء الإنزيم المرتبط بالمثبط. وبالأخذ في الاعتبار قاعدة حفظ الكتلة mass conservation، فإن جزء المثبط المرتبط بالإنزيم يرتبط بجزء النشاط بالعلاقة  $1 - (v_i/v_0)$ . ومن ثم فإنه يمكن إعادة صياغة معادلة ١١-٢٤ للحصول على الصورة التقليدية للجزء المرتبط (كما في حالة ارتباط المتصلة بالمستقبل (معادلة ٥-٢١) بالصورة التالية:

$$\text{الجزء المرتبط} = \left(1 - \frac{v_i}{v_0}\right) = \frac{1}{1 + \frac{IC_{50}}{[I]}} \quad (١١-٢٥)$$

والرسومات البيانية للجرعة- الإستجابة تستخدم في مدى واسع من المجالات:

● فتستخدم الرسوم البيانية الجرعة- الإستجابة في مقارنة القوة النسبية للتثبيط لمركبات متعددة لنفس الإنزيم تحت ظروف محكمة جيداً. وهذه الطريقة شائعة الاستخدام لأنها تسمح للباحث أن يقدر  $IC_{50}$  بعمل القياسات على مدى واسعة من تركيزات المثبط عند تركيز مثبت من المادة الخاضعة. وهذه الطريقة تكون مناسبة عند الرغبة في تمييز القوة التثبيطية لعدد من المركبات المجهولة. ففي صناعة العقاقير، على سبيل المثال، قد يكون مطلوباً إختبار عدة مئات من المركبات بالنسبة لفاعليتها التثبيطية لتمييز تلك المركبات التي تظهر بعض الفاعلية تجاه إنزيم مستهدف. هذه المركبات من المحتمل أن يكون لها مدى واسع من  $IC_{50}$ . في هذه الحالة توضع خطة عمل التي تقاس فيها السرعة الابتدائية للتفاعل الإنزيمي لخمسة أو أكثر من تركيزات المثبط. في هذه الحالة فإن قيم  $IC_{50}$  لعدد من المركبات يمكن تقديرها بدون معرفة مسبقة لمدى التركيزات المطلوبة لإحداث تثبيط فعال للإنزيم.

● إن قيمة  $IC_{50}$  هي القيمة العملية المقترنة بالتأثيرات النسبية للمواد المختلفة على النشاط الإنزيمي تحت مجموعة خاصة من ظروف محلول التفاعل. مع ذلك فإنه في بعض التجارب البيولوجية، فإن التأثير الصافي (النهائي) للمثبط على الإنزيم وليس ثابت التفكك الحقيقي  $K_i$  للإنزيم هو المعيار الأساسي للحكم على تأثير المثبط. في هذه الحالات فإن المقياس الوحيد لقياس الفاعلية النسبية للمثبط هي قيمة  $IC_{50}$ . فعلى سبيل المثال، دعنا نأخذ في الاعتبار تقدير التأثيرات النسبية لسلسلة من المثبطات لإنزيم مستهدف في إختبار خلوي. في هذه الحالات فإن المثبط يضاف إلى بيئة الخلية وتقاس تأثيرات المثبط بصورة غير مباشرة بواسطة قياس النشاط البيولوجي المقرن الذي يعتمد على نشاط الإنزيم المستهدف. وفي الحالات الخلوية مثل هذه، فإننا لا نعرف تركيز المادة الخاضعة في الخلية ولا الكميات النسبية للإنزيم والمادة الخاضعة (راجع أنه في المعمل قد وضعنا ظروف الحالة الثابتة بحيث أن  $[E] \gg [S]$ ، ولكن قد لا يوجد ذلك في الخلية). أيضاً فإنه في مثل



هذه الحالات فإننا لا نعرف التركيز المؤثر خلال الخلايا الذي يحدث درجة التثبيط المقاسة. ويرجع ذلك أن غشاء الخلية يمكن أن يعوق نقل المثبط المضاف إلى الخلية. إضافة إلى ذلك، فإن الأيض الخلوي يخفض التركيز المؤثر للمثبط الذي يصل إلى الإنزيم المستهدف.

- أيضاً فإنه في مجال مكافحة الآفات الزراعية والأمراض الفطرية والبكتيرية للمحاصيل الزراعية قد يكون مطلوباً إختبار فاعلية عدة مركبات بالنسبة لفاعليتها المميته لتمييز تلك المركبات التي تظهر فاعلية عالية في إماتة هذه الكائنات. في هذه الحالات تستخدم  $LC_{50}$  (أى التركيز المميت Lethal concentration الذي يعطي 50% إماتة) و  $LD_{50}$  (أى الجرعة المميته lethal dose التي تعطي 50% إماتة).

وبالرغم من فائدة وشيوع قياسات قيمة  $IC_{50}$ ، فإنها قد تكون مضللة إذا لم تستخدم بطريقة صحيحة. فقيمة  $IC_{50}$  لمثبط ما يمكن أن تتغير بتغير ظروف محلول التفاعل، ومن ثم فإنه يكون مهماً تسجيل تفاصيل ظروف الاختبار المستخدمة في قياس قيمة  $IC_{50}$ . فعلى سبيل المثال فإنه في حالة المثبط التنافسي، فإن قيمة  $IC_{50}$  المشاهدة لمثبط تنافسي ما سوف تعتمد على تركيز المادة الخاضعة التي تستخدم في الإختبار بالنسبة لـ  $K_m$  لهذه المادة.

إذا تم قياس  $IC_{50}$  تحت ظروف تجريبية محكمة، فإنه يمكن تسجيل قوة التثبيط بلغة  $K_i$  إذا كان معلوماً لدينا طريقة عمل المثبط إضافة إلى قيم  $[S]$  و  $K_m$ . إن العلاقة بين قيم  $K_i$  و  $K_m$  و  $IC_{50}$  يمكن اشتقاقها من معادلات السرعة. وهنا لن نعرض كيفية اشتقاق هذه المعادلات، ولكن سنكتفي فقط بعرض الصور النهائية لهذه العلاقات للأنواع الثلاثة من المثبطات العكسية.

## ١- المثبطات التنافسية

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[S]}{K_m}} \quad (١١-٢٦)$$

## ٢- المثبطات اللاتنافسية

$$IC_{50} = \frac{\frac{[S] + K_m}{K_m} + \frac{[S]}{\alpha K_i}}{\frac{[S]}{\alpha K_i}} \quad (١١-٢٧)$$

(إذا كانت  $\alpha=1$  فإن  $K_i = IC_{50}$ )

## ٢- المثبطات غير التنافسية

$$\alpha K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{K_m}{[S]}} \quad (١١-٢٨)$$

(إذا كان  $[S] \gg K_m$  فإن  $\alpha K_i = IC_{50}$ )

والمعادلات الثلاثة السابقة يطلق عليها علاقات شينج-بروسوف Cheng-Prusoff، ويمكن أن تستخدم في تحويل قيم  $IC_{50}$  إلى قيم  $K_i$ . مع ذلك، فإنه حتى يمكن تطبيق العلاقة الصحيحة، فإننا يجب أن نعرف نوع التثبيط للمركبات التي تختير. وقد يبدو من ذلك أنه لا توجد ميزة لإستخدام علاقات شينج وبروسوف إذ يجب تقدير نوع التثبيط لكل مركب بواسطة تحليل لينويفر- بورك. مع ذلك، فإنه في كثير من الحالات يكون المستهدف هو قياس القوة التثبيطية النسبية لمركبات قريبة تركيبياً. وإذا كانت هذه

المركبات تعبر عن تغيرات تركيبية صغيرة عن المركب الأصلي، فإنه كثيراً ما يفترض بأمان أن كل الجزيئات المشتقة من الجزء الأصلي تتشارك في نفس نوع التنشيط مثل الجزء الأصلي. في هذه الحالات فإنه يكون مطلوباً فقط تقدير نوع التنشيط للجزء الأصلي. آنذاك تطبق علاقة شينج وبيروسوف المناسبة على بقية جزيئات السلسلة.

### ١١-٧ الارتباط المتبادل قصرياً لإنئين من المثبطات

إذا وجد أن إنئين من المثبطات المميزة I و J كلاهما يعملان على نفس الإنزيم، فمن الممكن لهما أن يرتبطا معاً (في نفس الوقت) ليكونا معقد معقد EIJ (أو المعقد ESIJ إذا كان لكلا المثبطين القدرة للارتباط بالمعقد ES). البديل عن ذلك، فإن المثبطان يمكن أن يرتبطا بنمط متبادل قصرياً (بمعنى أنهما يتنافسان مع بعضهما البعض) ومن ثم فإنه يمكن أن يوجد فقط EJ أو EI. وتوجد عدة إختبارات التي يمكن بها تقدير ما إذا كان المثبطان يتنافسان للارتباط مع الإنزيم.

أكثر الطرق المباشرة لقياس الارتباط المتبادل قصرياً للمثبطات هي استخدام نسخ معلمة بنظير مشع أو فلورنس لأحد المثبطين. وإذا أستخدمت مثل هذه النسخ المعلمة لتتبع الارتباط المباشر للمثبط بالإنزيم، فإن مقدرة المثبط الثاني في التداخل مع هذا الارتباط يمكن قياسه مباشرة كما وصف في فصل ٥ (قسم ٥-٥).

أيضاً فإن عدد من القياسات الحركية قد وضعت لإختبار الارتباط المتبادل القصري لإنئين من المثبطات. وكل هذه الطرق تشتمل على قياس السرعة الابتدائية للإنزيم عند إتحادات مختلفة من المثبطين. وتأثيرات المثبطان على سرعة تفاعل إنزيمي ما يمكن وصفها عموماً بالعلاقة التبادلية التالية:

$$\frac{1}{v_{ij}} = \frac{1}{v_0} \left( 1 + \frac{[I]}{K_i} + \frac{[J]}{K_j} + \frac{[I][J]}{\alpha K_i K_j} \right) \quad (11-29)$$

حيث:  $v_{ij}$  = السرعة الابتدائية في وجود كلا المثبطان

$K_i, K_j$  = ثوابت التفكك للمثبط I والمثبط J على التوالي.

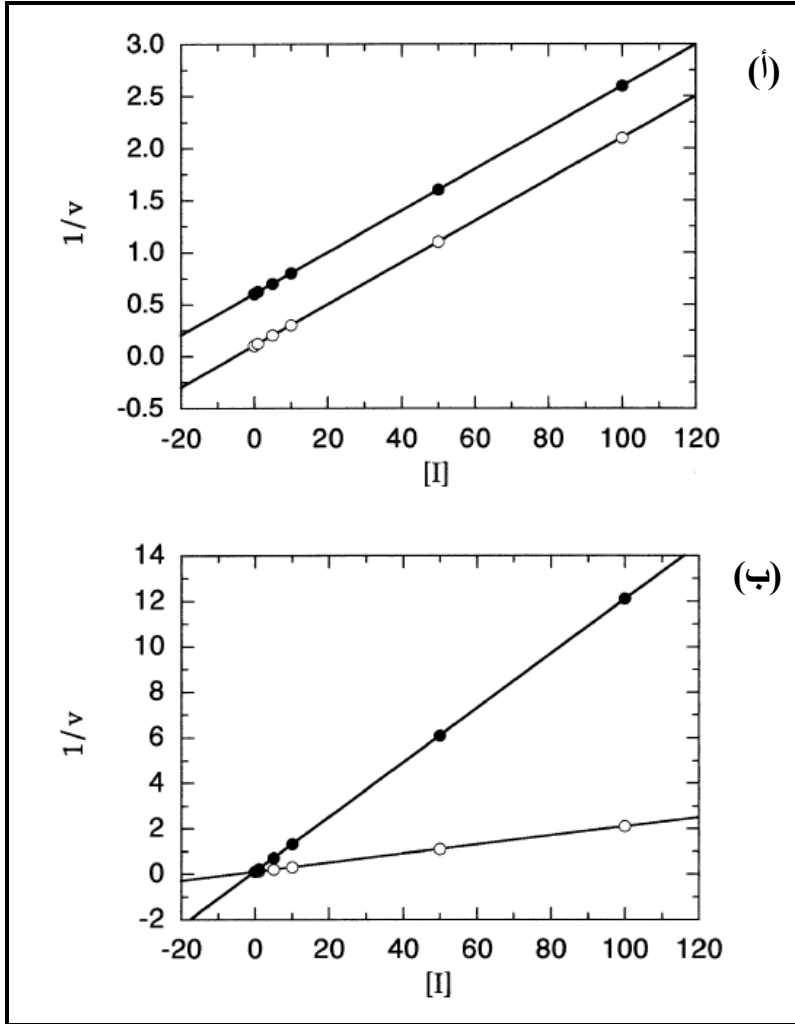
$\alpha =$  حد التأثير المتبادل الذي يحدد تأثير ارتباط أحد المثبطين على ألفة المثبط الثاني.

$v_0 =$  السرعة الابتدائية في غياب المثبطين.

وإذا كان المثبطان يرتبطان بنمط تبادلي قصري فإن  $\alpha = \infty$ ، وإذا كان المثبطان يرتبطان بنمط مستقل تماماً، فإن  $\alpha = 1$ . وإذا كان المثبطان يرتبطان بنمط غير قصري ولكن يؤثر كل منهما على ألفة الآخر للإنزيم، فإن  $\alpha$  سوف يكون لها قيمة محدودة ولكن أصغر أو أكبر من واحد. وعندما تكون  $\alpha$  أصغر من واحد، فإن ارتباط أحد المثبطان يزيد ألفة الإنزيم للمثبط الثاني، حينئذ يقال أن المثبطان متدائنين synergistic (أى يظهران تعاونية موجبة). وعندما تكون  $\alpha$  أكبر من واحد. فإن ارتباط أحد المثبطان يخفض ألفة الإنزيم للمثبط الثاني، وفي هذه الحالة يقال عن الارتباط أنه مضاد antagonistic (أى يظهران تعاونية سالبة).

إن الدافع لإجراء مثل هذه التحاليل هو تحديد ما إذا كان إثنين من المثبطات المميزة تركيبياً يتشاركان في موقع ارتباط عام على جزئ الإنزيم. وإذا وجد أن المثبطان يرتبطان بنمط تبادلي قصري خلال قياسات الارتباط المباشر أو التحليل الحركي فإنه يمكن الاستنتاج أن المثبطان يرتبطان مع نفس الموقع على الإنزيم. مع ذلك، فإنه يجب الاحتراس في تفسير النتائج حيث يمكن لإثنين من المثبطات أن يرتبطا على موقعين مستقلين ولكن يؤثر كل منهما بقوة على الآخر خلال اتصال البنية الفراغية.

توجد عدة طرق بيانية لوصف هذا النوع من التحليل. ومن بين هذه الطرق الأكثر شيوعاً هي طريقة يونيتاني-ثورين (Yonetani – Theoren (1964). في هذه الطريقة، فإن البيانات تنظم كرسومات ديكسون حيث  $1/v_{ij}$  ترسم كدالة في [II] عند تركيزات مثبته متغيرة من J. ومعادلة ١١-٢٩ تشير أنه عندما تكون  $\alpha$  لها قيمة لا متناهية فإن نقط البيانات سوف تكون سلسلة من الخطوط المتوازية (شكل ١١-١٢ أ).



شكل ١١-١٢ (أ) الرسم البياني لـ يونيتاني-ثوريل لإثنين من المثبطان I و J اللذان يرتبطان بنمط متبادل قصريا ( $\alpha = \infty$ ) لإنزيم عام (مشتترك). (ب) الرسم البياني لـ يونيتاني-ثوريل لإثنين من المثبطان اللذان لا يرتبطان تبادليا قصريا التي يكون فيها  $\alpha = 1$ . الدوائر غير المصمتة (o) هي البيانات لـ  $J = 0$ ، والدوائر المصمتة (●) هي للبيانات لـ  $(J) = K_j$

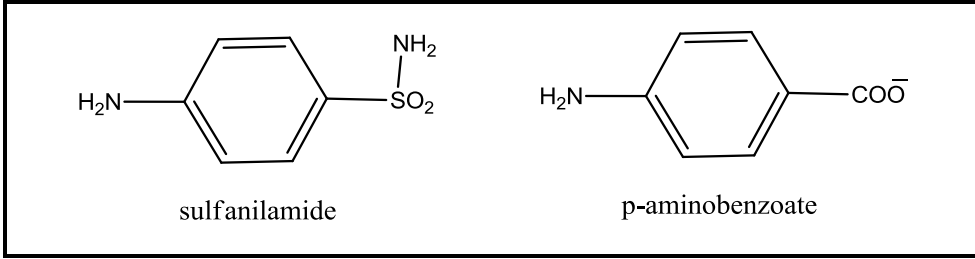
وهذا يشير إلى أن المثبطان يرتبطان تبادلياً قصرياً، حيث يتنافسان على نفس الموقع للإنزيم. وإذا كانت  $\alpha = 1$ ، فإن المثبطان يرتبطان بصورة مستقلة، والخطوط في رسم يونيتاني-ثوريل يتقاطعان على المحور  $x$  (شكل ١١-١٢ ب). وإذا تجاوزت  $\alpha$  الواحد، فإن المثبطان يصاد كل منهما إرتباط الآخر، والخطان في الرسم يتقاطعان أسفل المحور  $x$ . من ناحية أخرى إذا كان المثبطان متدائنين بعضهما البعض، فإن  $\alpha$  تكون أقل من واحد ويتقاطع الخطان أعلى المحور  $x$ . وفي أى رسم بياني لـ يونيتاني-ثوريل الذي يتقاطع الخطان (أى  $\alpha \neq \infty$ )، فإن قيمة المحور  $x$  عند نقطة التقاطع تعطي تقدير لـ  $-\alpha K_i$ ، عندما ترسم [I] على المحور  $x$  أو  $-\alpha K_j$  عندما يكون [J] هى تركيز المثبط المتغير. وإذا كانت قيم  $K_i$  و  $K_j$  معلومة من قياسات منفصله، فإنه يمكن بسهولة تقدير قيمة  $\alpha$ .

## ١١-٨ العلاقة بين التركيب والنشاط للمثبطات وتصميم المثبطات الإنزيمية

مثبطات الإنزيمات لها عديد من الإستخدامات المهمة في مجال العلوم البيولوجية والصناعة والعقاقير.

- ففي مجال العلوم البيولوجية نجد أن كثيراً من معلوماتنا الأساسية عن مسارات الأيض قد تم تحديدها بإستخدام مثبطات الإنزيمات خاصة في مسارات الأيض.
- مثبطات الإنزيمات تستخدم في العمليات الصناعية بطرق متنوعة. مثال ذلك، فإن ثنائي أكسيد الكبريت sulphur dioxide يستخدم بكميات صغيرة لمنع السمرة (البنية) browning في الفواكه بتنشيط إنزيم Polyphenol oxidase.
- عدد كبير من العقاقير التي تستخدم في معالجة الأمراض المعدية infection diseases تعمل كمثبطات لبعض الإنزيمات الخاصة في الكائنات الدقيقة المعدية. فعلى سبيل المثال فالمضادات الحيوية لآكتام lactam antibiotics مثل penicillin و amoxicillin تعمل عن طريق تثبيط إنزيم أو أكثر في مسار تخليق الجدار الخلوي للبكتيريا. ويصمم العقار ليثبط إنزيمات تكون فريدة للكائن الدقيق ويكون لها

تأثيرات جانبية قليلة في المرضى. ومثال ذلك عقارات السلفا (مثل sulfanilamide) الذي يعمل كمثبط تنافسي للإنزيم الذي يحول p-aminobenzoat إلى حمض الفوليك، بينما الإنسان لا يحتوي على الإنزيم الذي يحفز هذا التفاعل (شكل ١١-١٣).



شكل ١١-١٣ تركيب p-aminobenzoate و sulfanilamide وهو مثبط تنافسي لإنزيم البكتريا المشتمل في تخليق حمض الفوليك

● أيضاً، فإن بعض مثبطات الإنزيمات تستخدم في معالجة بعض الأمراض المزمنة chronic diseases. مثال ذلك مثبطات الإنزيم المحول للأنجيوتنسين angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors التي تخفض ضغط الدم بواسطة تثبيط الإنزيم الذي يشطر angiotensin I إلى angiotensin II القابض للأوعية الدموية. هذه المثبطات التي تشمل captopril و enalapril و lisinopril تحدث توسيع في الأوعية الدموية ومن ثم خفض ضغط الدم. في الوقت الحالي، فإن الجزء الأكبر من العقاقير تعمل عن طريق تحويل نشاط المستقبلات البروتينية receptor protein، يليها مثبطات الإنزيمات التي تشكل القسم الثاني الأكبر من العقاقير. وفي الحقيقة فإن تطبيقات حركية الإنزيمات تعد مفيدة في هذا المجال. إضافة إلى ذلك، فإن توفر معلومات عن تركيب الإنزيمات بواسطة التصوير البللوري بأشعة أكس والرنين النووي المغناطيسي قد ساهمت في تطور هذا المجال.

والدراسات الحديثة التي تهدف إلى تعيين هوية المثبطات لإنزيمات خاصة قد ارتكزت على توضيح السمات الكيميائية المجسمة stereochemical والسمات الكيموفيزيائية physicochemical لجزيئات المثبط التي تسمح لها بالارتباط الجيد بالإنزيم.

١- السمات الكيموفيزيائية. مقاييس فعالية المثبط مثل  $IC_{50}$ ,  $K_i$  تعكس التغير في الطاقة الحرة التي تصاحب نقل المثبط من الحالة المائية المذابة إلى الحالة المرتبطة مع جيب الارتباط بالإنزيم (أى  $\Delta G$  للارتباط). ولقد سبق لنا مناقشة القوى الكيموفيزيائية المهمة في ارتباط المتصلة (مثل المادة الخاضعة) بالبروتين: التأثيرات الكارهة للماء، الارتباط الهيدروجيني، التأثيرات الكهربائية الساكنة وقوى فان ديرفالس. ونفس هذه القوى أيضاً تحدد قوة التأثير المتبادل بين مثبط ما وإنزيم.

٢- السمات الكيميائية المجسمة. لقد رأينا أيضاً أن شكل أو التركيب البنوي topology للمادة الخاضعة يحدد قدرتها للتطابق الجيد مع جيب الارتباط لإنزيم ما اعتماداً على التتمة التركيبية بين جيب الارتباط للإنزيم وجزئ المادة الخاضعة. ومن ثم، فإنه اعتماداً على هذه القاعدة يمكن القول أن التتمة التركيبية أيضاً يجب أن تكون مهمة في ارتباط المثبط بالإنزيم، وهذا ما تم مشاهدته تجريبياً.

لذلك، إذا تم بطريقة ما تمييز مثبط فعال لإنزيم ما، فإننا نبدأ بتشديد متناظرات لهذا الجزئ لها تركيبات وخواص كيموفيزيائية متنوعة (معدلة) لتحديد تأثير هذه التغيرات التركيبية على فاعلية المثبط. ومحاولات ربط هذه التغيرات التركيبية مع فاعلية (قوة) المثبط يشار إليها بدراسة علاقة التركيب- النشاط Structure-activity relationship (SAR).

في الوقت الحالي فإن دراسات علاقة التركيب- النشاط (SAR) يمكن تقسيمها إلى فئتين: (1) SAR في غياب المعلومات التركيبية عن الإنزيم المستهدف. و(2) SAR التي تستخدم المعلومات التركيبية للإنزيم المستهدف التي تم الحصول عليها من دراسات التصوير البلوري لأشعة إكس X-ray crystallography أو الرنين النووي المغناطيسي



متعدد الاتجاهات (MD-multidimensional nuclear magnetic resonance (NMR). والفئة الأخيرة يشار إليها أيضاً بتصميم المثبط المعتمد على التركيب structure-based inhibitor design. وفي القسمين التاليين سنعرض بعض التقنيات المستخدمة في كلا الفئتين.

### ١١-٨-١ علاقة التركيب- النشاط (SAR) وتصميم المثبطات في غياب المعلومات التركيبية عن الإنزيم المستهدف

أى دراسة لـ SAR تبدأ بتعيين مركب طليعة (مرشد) lead compound الذي يظهر بعض الفاعلية في تثبيط الإنزيم المستهدف. وهذا المركب الطليعة يمكن تحديده بواسطة الغرلة العشوائية لمكتبة المركبات compound library مثل مكتبة (أرشف) المنتجات الطبيعية natural products library، أو يمكن أن يكون تحديده إعتياداً على معرفة تركيب المادة الخاضعة أو الناتج للتفاعل الإنزيمي. ومع وجود المركب الطليعة في المتناول، فإن الباحث يخضع المادة لتغيرات تركيبية صغيرة ويختبر هذه المتناظرات في فعاليتها التثبيطية. وهذه هي الصورة الأساسية الشائعة لدراسة SAR التي تجري بصورة أو أخرى منذ القرن التاسع عشر. والغاية من هذه الدراسات هو تحديد أى من التغيرات التركيبية سوف تؤدي إلى تحسين فاعلية المثبط وتعيين الجزء الحامل للعقار pharmacophore، وهو التركيب الأدنى المطلوب للتثبيط. وبمجرد تعيينه، فإن الجزء الحامل للعقار يستخدم كقالب لتصميم مثبطات إضافية.

دعنا نأخذ إنزيم dihydrofolate reductase (DHFR) الذي يحفز خطوة أساسية في التخليق الحيوي لـ دى أوكسي ثيميدين deoxythymidine. وتثبيط هذا الإنزيم يغلق تكرار DNA ومن ثم يثبط نمو وتكاثر الخلية. لذلك، فإن مثبطات DHFR تكون مفيدة كعوامل علاجية في التحكم في النمو الشاذ للخلايا في السرطان، وكمضادات حيوية للتحكم في نمو البكتيريا. والمحاولات الأولية لتحديد مثبطات هذا الإنزيم اعتمدت على تخليق متناظرات للمادة الخاضعة ثنائي هيدروفولات dihydrofolate. وشكل ١١-١٣ يعرض التركيبات الكيميائية لـ ثنائي هيدروفولات ونوعين من مثبطات DHFR هما:

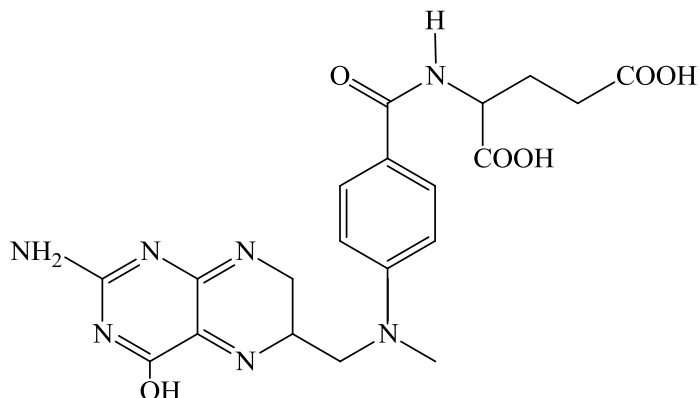
بتريدينات Petridines ممثل بمركب ميثوتريكسات methotrexate والنوع الآخر هو المستبدلات- على الموقع 5 ل 2-4 ثنائي الأمينو بيريميدينات 5-substituted 2,4-diaminopyrimidines. ولقد ثبت أن methotrexate مثبط قوي (فعال) ل DHFR نتيجة لتمائل تركيبه مع المادة الخاضعة dihydrofolate.

والسؤال التالي هو ما هي أجزاء جزئ methotrexate التي تكون حاسمة في تثبيط DHFR. ويتم الوصول إلى ذلك بتخليق متناظرات تركيبية مختلفة ل methotrexate. ومن هذه الدراسات قد تم الوصول إلى أن الجزء الحامل للعقار (أى المكون التركيبي الأدنى المطلوب للتثبيط) هو نظام 2,4-diaminopyrimidine الحلقي. وهذا الاكتشاف قد أدى إلى نشوء نوع ثاني من المثبطات المعروضة في شكل ١١-١٣ وهى المستبدلات على الموقع 5 ل 2, 4 ثنائي الأمينو بيريميدينات، والمثال المعروف منها جيداً هو ترائي ميثوبريم trimethoprim. و methotrexate يستخدم الآن كدواء لمعالجة سرطانات الإنسان وبعض الأمراض المبنية على المناعة. من ناحية أخرى فإن trimethoprim يوصف كدواء للتحكم في الإصابات البكتيرية.

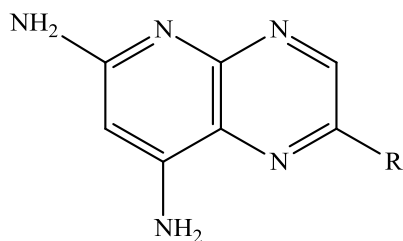
والنتيجة غير المتوقعة من الدراسات على هذه المثبطات هو اكتشاف أن البتريدينات مثل ميثوتريكسات تعتبر مثبطات قوية لكل من DHFR البكتيري والثديي، بينما ترائي ميثوبريم ومناظراته هى مثبطات أفضل للإنزيمات البكتيرية. فقيم  $K_i$  ل ترائي ميثوبريم لإنزيم DHFR من بكتريا القولون *E. coli* والخلايا الليمفاوية للإنسان هى 1.35 nM و 170000 nM على التوالي، الذي يشير إلى إنتقائية للإنزيم البكتيري بمقدار 126000 ضعف. والسبب في هذه الإنتقائية المثيرة لنوع الإنزيم لم تتضح إلا بعد التعرف على تركيب هذين الإنزيمي باستخدام التصوير البللوري بأشعة إكس.

وفي الوقت الحاضر فإن علماء الإنزيمات يحاولون إنشاء مثبطات لها فاعلية أعلى ليس بالإستبدال العشوائي لأجزاء تركيبية أساسية على الجزئ، ولكن على العكس بواسطة إحداث تغيرات نظامية ومنطقية في الخواص الكيميائية المجسمة والخواص الكيموفيزيائية في الأجزاء المستبدلة على المثبط الطليعة.

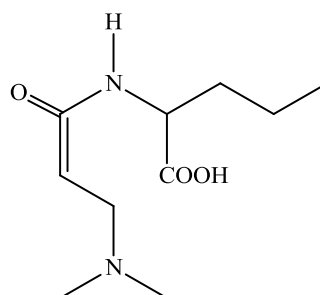
### Dihydrofolate



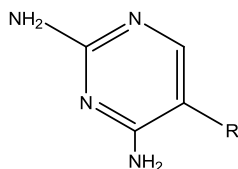
### Pteridines



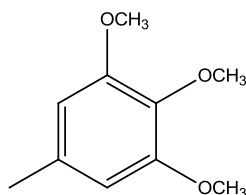
Methotrexate, R =



### 5-R-2,4-Diaminopyrimidines



Trimethoprim, R =



شكل ١١-١٣ التركيبات الكيميائية للمادة الخاضعة (dihydrofolate) ونوعين من مثبطات إنزيم dihydrofolate reductase (DHFR)

ومن بين الخواص العامة ذات الصلة بالمستبدلات الكيميائية هي الحجم المجسم (الحجم الجزيئي)، التناظرية مع الماء، المحبة للإلكترونات/ التناظرية للإلكترونات وهي العوامل المهمة، التي استطاع الكيميائيين من إنشاء قياسات كمية لهذه المعلمات.

### ١١-٨-٢ تصميم المثبط اعتماداً على تركيب الإنزيم

إن معرفة التركيب ثلاثي الأبعاد لموقع ارتباط المثبط على الإنزيم يوفر المرشد (الدليل) الأساسي لتصميم مثبطات جديدة. إن تركيب المواقع النشطة للإنزيمات يمكن الحصول عليها على المستوى الذري من التصوير البلوري بأشعة إكس والتحليل الطيفي للرنين النووي المغناطيسي متعدد الاتجاهات. وهنا لن نناقش هذه الطرق، ولكن سوف نركز فقط على استخدام التفاصيل التركيبية المتحصل عليها من هذه الطرق في تصميم مثبطات كفؤ.

- إن تركيب إنزيم ما المرتبط بالمثبط باستخدام طرق الرنين المغناطيسي والتصوير البلوري توفر تفاصيل تركيبية على المستوى الذري عن التأثيرات المتبادلة بين المثبط والإنزيم التي تعزز (تنشئ) الارتباط. فيمكن الاستدلال على وجود الارتباط الهيدروجيني، تكوين الجسور الملحية والتأثيرات الكهربية الساكنة الأخرى والتأثيرات المتنافرة مع الماء بين الإنزيم والمثبط من هذه الدراسات.

- لذلك، فإن الخطوة الأولى في تصميم المثبط المعتمد على التركيب هو الحصول على على تركيب الإنزيم المستهدف بدون أو مع المثبط الطليعة المرتبط بالإنزيم باستخدام الرنين المغناطيسي أو التصوير البلوري. في بعض الحالات فإن تعيين تركيب الإنزيم المستهدف بواسطة الرنين المغناطيسي أو التصوير البلوري يكون غير متاح نتيجة الصعوبات التقنية المرتبطة بهذه الطرق. مع ذلك إذا كان تركيب إنزيم ذات صلة بالإنزيم المستهدف (المتناظر) معروفاً، فإنه يمكن محاولة نمذجة التركيب ثلاثي الأبعاد للإنزيم المستهدف بواسطة الصياغة على غرار المتناظر. وفي الصياغة على غرار المتناظر homology modeling، فإننا نحاول تشييد

نموذج للإنزيم المستهدف بواسطة تركيب (فوق بعض) بواقي الأحماض الأمينية في الإنزيم المستهدف على التركيب ثلاثي الأبعاد للإنزيم المتناظر المعروف تركيبية. ولكي تكون هذه الطريقة فعالة، فإن الإنزيم المستهدف والمناظر له يجب أن يتشاطران في 30% على الأقل في هوية تسلسل الأحماض الأمينية.

● وعندما يكون لدينا تركيب الموقع النشط للإنزيم الحقيقي أو النموذج المستخلص من المتناظر، فإن الخطوة التالية هي تعيين تركيب الموقع النشط بطريقة مفيدة التي تسمح باستخدام المعلومات للتنبؤ بخواص ارتباط المثبط. والفحص المرئي البسيط لمثل هذه التركيبات. يمكن أن يعزز ببرامج الحاسوب التي تسمح للباحث من أن يرسم بالتفصيل المظهر السطحي للجهد الكهربائي الساكن للموقع النشط وهوية وموقع أنواع خاصة من المجموعات الفعالة خلال الموقع النشط (مجموعات الحمض-القاعدة، مستقبلات ومانحات الارتباط الهيدروجيني وغيرهم). وعندما يتم وصف الموقع النشط جيداً، فإنه يمكن محاولة تصميم المثبطات التي تكون متتامة من ناحية الكيمياء المجسمة والمجموعات الفعالة مع تركيب الموقع النشط.

● ومتوفر الآن برامج جديدة التي تسمح بحسابات تغيرات في الطاقة الحرة للارتباط التي فيها المثبط المرتبط يغير ببطء حيث يتم حساب التغير في الطاقة الحرة للارتباط بين تركيبات الحالة الابتدائية والحالة النهائية. وبهذه الطريقة، فإنه يمكن البحث عن التغيرات التركيبية التي تؤدي إلى زيادة ألفة مثبط ما للموقع النشط للإنزيم. مثال ذلك فإن برنامج الحاسوب GRID (Goodford, 1985) يمكن أن يستخدم في البحث عن تركيب الموقع النشط لمناطق التي تكون أكثر احتمالاً للتفاعل بقوة مع مجموعة وظيفية فعالة في المثبط المختبر.

## أسئلة

- ١- ما الذي يميز مثبط ما inhibitor عن الخامد inactivator
- ٢- ميز نوع المثبط من التأثيرات التالية على التفاعل الإنزيمي:
  - (أ) ينخفض كل من  $V_{max}$  و  $K_m$
  - (ب) ارتفاع  $K_m$  و  $V_{max}$  لا تتغير.
  - (ج) انخفاض  $V_{max}$  و  $K_m$  لا تتغير.
- ٣- تم قياس حركية إنزيم كدالة في تركيز المادة الخاضعة في وجود وغياب 2mM من مثبط (I).

| السرعة ( $\mu\text{mol/minute}$ ) |              | S ( $\mu\text{M}$ ) |
|-----------------------------------|--------------|---------------------|
| وجد مثبط                          | لا يوجد مثبط |                     |
| 4.1                               | 10.4         | 3                   |
| 6.4                               | 14.5         | 5                   |
| 11.3                              | 22.5         | 10                  |
| 22.6                              | 33.8         | 30                  |
| 33.8                              | 40.5         | 90                  |

- (أ) ما هي قيم  $V_{max}$  و  $K_m$  في وجود المثبط وفي غيابه؟
- (ب) ما هو نوع المثبط؟
- (ج) ما هو ثابت الارتباط لهذا المثبط؟
- (د) إذا كانت  $[S] = 10 \mu\text{M}$  و  $[I] = 2 \text{ mM}$ ، ما هو الجزء من جزيئات الإنزيم المرتبط بالمادة الخاضعة؟ والمرتبط بالمثبط؟
- (هـ) إذا كانت  $[S] = 30 \mu\text{M}$ ، ما هو الجزء من جزيئات الإنزيم المرتبط بالمادة الخاضعة في وجود وغياب 2mM من المثبط؟ قارن هذه النسبة مع نسبة سرعات التفاعل تحت نفس الظروف.
- ٤- إن حركيات الإنزيم المذكور في سؤال ٣ قد تم قياسها في وجود مثبط مختلف. وتركيز هذا المثبط  $100 \mu\text{M}$ .

| السرعة ( $\mu\text{mol/minute}$ ) |              | S ( $\mu\text{M}$ ) |
|-----------------------------------|--------------|---------------------|
| وجود مثبط                         | لا يوجد مثبط |                     |
| 2.1                               | 10.4         | 3                   |
| 2.9                               | 14.5         | 5                   |
| 4.5                               | 22.5         | 10                  |
| 6.8                               | 33.8         | 30                  |
| 8.1                               | 40.5         | 90                  |

(أ) ما هي قيم  $V_{\max}$  و  $K_m$  في وجود هذا المثبط؟ قارن هذه القيم مع التي تحصل عليها في مسألة ٣.

(ب) ما هو نوع المثبط؟

(ج) ما هو ثابت التفكك لهذا المثبط؟

(د) إذا كانت  $[S] = 30\mu\text{M}$ ، ما هو الجزء من جزيئات الإنزيم المرتبط بالمادة الخاضعة في وجود وغياب  $100\mu\text{M}$  من المثبط.

٥- لتفاعل إنزيمي في وجود  $5\text{nM}$  لمثبط عكسي أعطى قيمة  $V_{\max}$  تعادل 80% من القيمة المقدرة في غياب المثبط. و  $K_m$  لم تتغير.

(أ) ما هو نوع المثبط المتوقع؟

(ب) ما هو الجزء من جزيئات الإنزيم ارتبطت بالمثبط؟

(ج) احسب ثابت المثبط؟

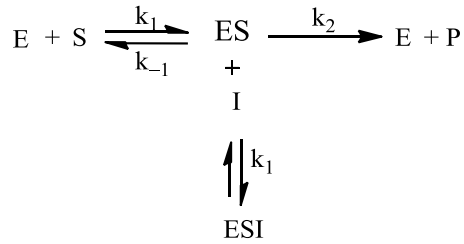
٦- أحد التحولات الخطية لمعادلة ميكليس-منتين هو رسم  $v$  مقابل  $v/[S]$ ، الذي يعرف برسم أدى-هوفستي

(أ) أعد ترتيب معادلة ميكليس-منتين لتعطي  $v$  مقابل  $v/[S]$

(ب) ما هي دلالة الميل، التقاطع الرأسي (العمودي)، التقاطع الأفقي في رسم  $v$  مقابل  $v/[S]$ ؟

(ج) ارسم مخطط بياني لـ  $v$  مقابل  $v/[S]$  في وجود مثبط تنافسي وفي وجود مثبط غير تنافسي.

٧- التفاعل التالي يعبر عن آلية تأثير مثبط لا تنافسي:



- (أ) إرسم منحنى ميكيلس - منتين القياسي في غياب ووجود كميات متزايدة من المثبط . أعد الرسم في صورة المقلوب المزدوج.
- (ب) فسر النتائج المتحصل عليها في (أ)





---

## فصل ١٢ مثبطات الارتباط المحكم Tight Binding Inhibitors

---

|      |                                                                 |
|------|-----------------------------------------------------------------|
| ١-١٢ | تمييز التشيط محكم الارتباط                                      |
| ٢-١٢ | تمييز نوع المشيط للمثبطات محكمة الارتباط                        |
| ٣-١٢ | تقدير $K_i$ لمثبطات الارتباط المحكم                             |
| ٤-١٢ | إستخدام مثبطات الارتباط المحكم في تقدير التركيز الفعّال للإنزيم |

في فصل ١١ ناقشنا المثبطات العكسية السريعة. وهذه المعالجة اعتمدت على افتراضين. الأول أن المثبط يرتبط بالإنزيم ويقوم بتنشيطه سريعاً مقارنة بالوقت الذي أثنائه يكون تقريب الحالة الثابتة فعّال. والثاني أن تركيز المثبط الحر يكون تقريباً مساوياً للتركيز الكلي للمثبط المضاف. بمعنى أن  $[E]$  يكون أصغر كثيراً عن ثابت التفكك  $K_i$ ، حينئذ فإن تركيز المعقد  $EI$  يكون صغير جداً مقارنة بـ  $[I]$ . لذلك فإنه يمكن تحليل التأثير المتبادل بين هذه المثبطات والإنزيمات المستهدفة بواسطة حركيات الحالة الثابتة (معادلة ميكليس-منتين) التي عرضت في الفصلين ٦ و ١١. مع ذلك، فإن بعض المثبطات قد لا ينطبق عليها أحد هذين الافتراضين أو كلاهما.

● فبعض المثبطات ترتبط ببطئ بالإنزيم بحيث أن درجة التنشيط تزيد أثناء قياسات السرعة الابتدائية. وهذا النوع من التنشيط المعتمد على الوقت سوف نناقشه في فصل ١٣.

● بعض المثبطات ترتبط بالإنزيم المستهدف عكسياً ولكن بألفة عالية بحيث أن جزءاً كبيراً من جزيئات المثبط تستنفذ في الارتباط بالإنزيم لتكوين معقد الإنزيم- المثبط EI. ومن ثم، فإن تركيز المثبط الحر لا يساوي التركيز الكلي للمثبط. ولمثل هذه المثبطات محكمة الارتباط tight binding inhibitors، لم يعد في الإمكان تطبيق تقريب الحالة الثابتة التي استخدمت في فصل ١١ (الذي افترض فيه أن تركيز المثبط الحر يكون تقريباً مساوياً للتركيز الكلي للمثبط المضاف). فمثبطات الارتباط المحكم ترتبط بالإنزيم بإحكام، وبالرغم من أنها مثبطات عكسية، إلا أن تركيز المثبط المطلوب لملاحظة درجة متوسطة من التنشيط (أى 50% تنشيط) تكون مقارنة لتركيز الإنزيم الذي يحفز معدّل يمكن قياسه. فعلى سبيل المثال إذا كان تركيز الإنزيم الذي يحفز معدّل يمكن قياسه للتفاعل هو  $10^{-9}$  مولر، وإذا كان ثابت التفكك  $K_i$  للمثبط هو أيضاً  $10^{-9}$  مولر، فإن التركيز الكلي للمثبط الذي عنده يحدث 50% تنشيط سوف يكون  $1.5 \times 10^{-9}$  مولر. في هذه الحالة فإن ثلثي المثبط سوف تكون حرة وثلث المثبط سوف تكون مرتبطة بالإنزيم. إن تعريف الارتباط المحكم للمثبط يعتمد أيضاً على تركيز الإنزيم المطلوب لقياس السرعة الابتدائية. فعلى سبيل المثال، إذا أمكن مشاهدة معدّل التفاعل في وجود  $10^{-11}$  مولر من الإنزيم، فإن المثبط السابق لم يعد مثبط محكم الارتباط، لأنه في الحالة الأخيرة، فإن حوالي 5% فقط من المثبط الكلي سوف ترتبط بالإنزيم عند 50% تنشيط. مع ذلك، فإن تعريف المثبط المحكم الارتباط الذي تم قبوله يشمل تلك المثبطات التي لها ثوابت تفكك  $K_i$  حوالي  $10^{-9}$ ، أو عندما يكون  $K_i$  للمثبط أقل من 1000 ضعف أكبر من التركيز الكلي للإنزيم.

بالرغم من أن أمثلة مشبطات الارتباط المحكم تعتبر لحد ما محدودة، فإن عديد من هذه المشبطات هي جزيئات فسيولوجية التي تقوم بوظائف تنظيمية داخل الخلايا أو على المستوى الخلوي والنسيجي، وتلعب دوراً في الاتزان الجسدي للأيض. إضافة إلى ذلك فإن كثير من مشبطات الإنزيمات العلاجية تعمل كمثبطات محكمة الارتباط. ومن الأمثلة الحديثة هي مشبطات إنزيم dihydrofolate reductase (عقار مضاد للسرطان) ومثبطات إنزيم aspartyl protease لفيروس نقص المناعة في الإنسان HIV (عقار مضاد لـ AIDS).

في هذا الفصل سوف نشرح طرق بديلة لتحليل البيانات في حالة المشبطات محكمة الارتباط التي تسمح لنا من تمييز نوع آلية الحفز والتقدير الكمي لثوابت التفكك لمعقد الإنزيم-المثبط.

## ١٢-١ تمييز التثبيط محكم الارتباط

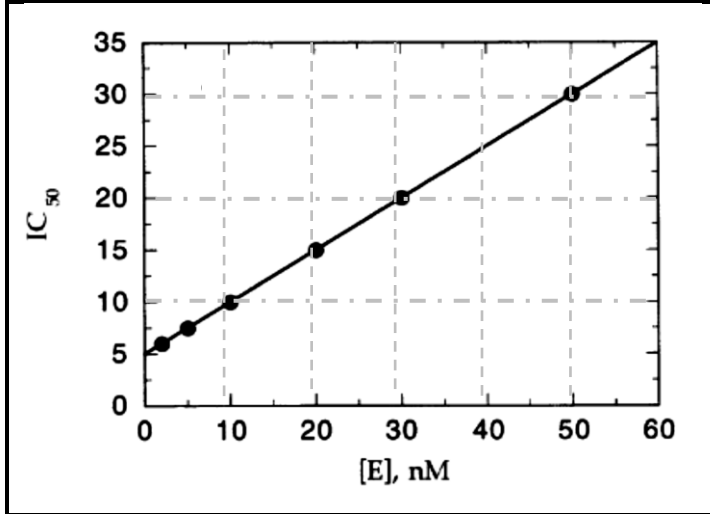
الخطوة الأولى في دراسة التثبيط محكم الارتباط هي تمييز ما إذا كان المثبط تحت الدراسة هو مثبط محكم الارتباط. وفي الخطوات التالية يتم تحديد آلية التثبيط (تنافسي، لا تنافسي أو غير تنافسي) ثم تقدير ثابت المثبط  $K_i$ . في هذا الفصل سوف نستخدم طريقة الحالة الثابتة في دراسة مشبطات الارتباط المحكم. وهذه المعالجة تتطلب ظروف اختبار التي تسمح للمثبط والمادة الخاضعة والإنزيم للوصول إلى الاتزان سريعاً بالنسبة لقياس سرعات الحالة الثابتة. مع ذلك، فإن عديد من مشبطات الارتباط المحكم ترتبط بالإنزيم ببطئ، بمعنى أن درجة التثبيط تعتمد على الوقت. وسوف نناقش التثبيط البطئ (المعتمد على الوقت) في فصل ١٣. أما في مناقشتنا هنا، سوف نفترض إما أن الوصول إلى الاتزان يكون سريعاً، أو تحضير المثبط مع الإنزيم مدة كافية قبل بدأ التفاعل بإضافة المادة الخاضعة.

التقدير البسيط لوجود تثبيط محكم الارتباط أتي من قياس منحنى الجرعة - الإستجابة للتثبيط (أنظر فصل ١١). والسمة الأكثر تحديداً لمثبطات الارتباط المحكم هو اختلاف قيمة  $IC_{50}$

المشاهدة لهذه المثبطات مع التركيز الكلي للإنزيم عند تركيز مثبت من المادة الخاضعة. وهذا يكون حقيقي لأن المثبط محكم الارتباط يتفاعل بنمط معايرة. ومن ثم فإنه كلما زاد تركيز الإنزيم الموحود كلما زاد تركيز المثبط المطلوب للوصول إلى نصف التشبع الأقصى لمواقع ارتباط المثبط. وعدد من الباحثين قد اشتق معادلات مماثلة لمعادلة ١-١٢ التي تعطي علاقة خطية بين قيمة  $IC_{50}$  مع تركيز الإنزيم للمثبط محكم الإلتباط.

$$IC_{50} = \frac{1}{2} [E] + K_i^{app} \quad (١-١٢)$$

ومن ثم فإن رسم  $IC_{50}$  كدالة في  $[E]$  (عند تركيز فردي مثبت من المادة الخاضعة) يتوقع أن ينتج خط مستقيم له ميل يساوي 0.5 وتقاطع المحور  $y$  يساوي  $K_i^{app}$  (شكل ١-١٢). إن قيمة  $K_i^{app}$  ترتبط بـ  $K_i$  الحقيقة بعوامل التي تشمل تركيز المادة الخاضعة و  $K_m$  وتعتمد على طريقة التأثير المتبادل بين المثبط والإنزيم.



شكل ١-١٢ الرسم البياني لقيم  $IC_{50}$  كدالة في تركيز الإنزيم  $[E]$

## ٢-١٢ تمييز نوع المثبط للمثبطات محكمة الارتباط

أجريت معالجات رياضية مكثفة عن تأثير مثبطات الارتباط المحكم على السرعات الابتدائية للتفاعلات الإنزيمية. وهذه الدراسات أوضحت أن الرسوم البيانية التقليدية للمقلوب المزدوج التي تستخدم في تمييز المثبطات الإنزيمية العكسية البسيطة (تنافسي، لا تنافسي وغير تنافسي) قد فشلت في التمييز بين مثبطات الارتباط المحكم.

كيف يمكن لنا إذن من تعيين نمط التأثير المتبادل بين إنزيم ما ومثبط محكم الارتباط. لقد اقترحت عدة رسوم بيانية لذلك، وأحد الطرق المباشرة لتعيين نمط عمل المثبطات محكمة الارتباط هو تعيين قيم  $IC_{50}$  للمثبط عند تركيز مثبت من الإنزيم، ولكن عند عدة تركيزات من المادة الخاضعة. وكما في حالة المثبطات العكسية البسيطة (السريعة) فإن  $IC_{50}$  للمثبط محكم الارتباط تعتمد على  $K_i$  للمثبط وتركيز المادة الخاضعة  $K_m$  للمادة الخاضعة بطرق مختلفة اعتماداً على نمط عمل المثبط. ولمثبطات الارتباط المحكم فإننا يجب أن نأخذ في الاعتبار أيضاً تركيز الإنزيم في العينة، حيث أن ذلك سوف يؤثر على  $IC_{50}$  المقاسة كما سبق توضيحه. إن العلاقات الملائمة بين هذه العوامل و  $IC_{50}$  للأنواع المختلفة من المثبطات محكمة الارتباط قد تم اشتقاقها بواسطة عديد من العلماء. وهنا سوف نعرض فقط الصورة النهائية لهذه العلاقات.

● لمثبطات الارتباط المحكم التنافسية:

$$IC_{50} = K_i \left( 1 + \frac{[S]}{K_m} \right) + \frac{[E]}{2} \quad (٢-١٢)$$

● لمثبطات الارتباط المحكم اللاتنافسية:

$$IC_{50} = \frac{[S] + K_m}{\frac{K_m}{K_i} + \frac{[S]}{\alpha K_i}} + \frac{E}{2} \quad (٣-١٢)$$

وعندما يكون  $\alpha = 1$ :

$$IC_{50} = K_i + \frac{[E]}{2} \quad (١٢-٤)$$

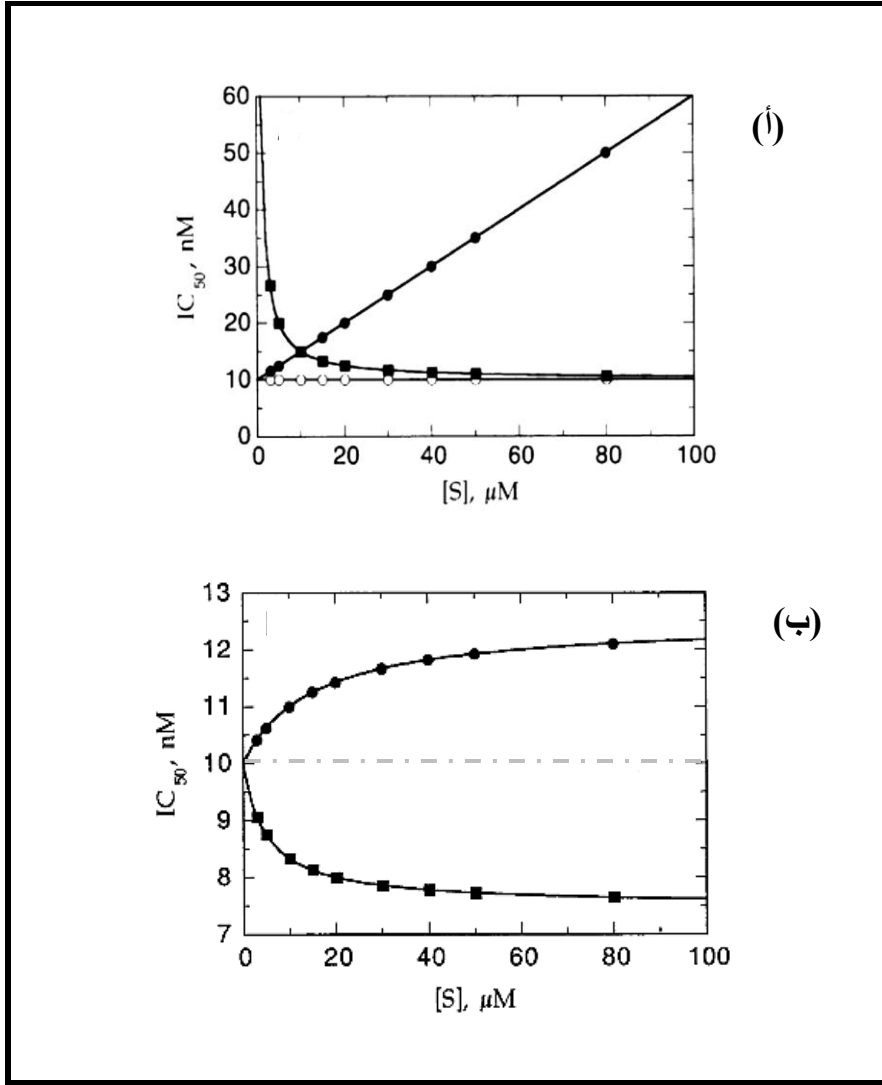
● لمبطات الارتباط المحكم غير التنافسية :

$$IC_{50} = \alpha K_i + \left(1 + \frac{K_m}{[S]}\right) + \frac{[E]}{2} \quad (١٢-٥)$$

ومن صور هذه المعادلات نجد أن رسم قيم  $IC_{50}$  كدالة في تركيز المادة الخاضعة سوف ينتج أنماط مختلفة اعتماداً على نوع المثبط. ففي حالة مثبط الارتباط المحكم التنافسي، فإن قيمة  $IC_{50}$  سوف تزيد خطياً مع زيادة تركيز المادة الخاضعة (شكل ١٢-٢ أ). وللمثبط اللاتنافسي، فإن رسم قيم  $IC_{50}$  كدالة في تركيز المادة الخاضعة سوف ينحني إلى الأسفل بحدّه (شكل ١٢-٢ ب) وللمثبط غير التنافسي فإن رسم قيم  $IC_{50}$  كدالة في تركيز المادة الخاضعة سوف يكون منحنى إلى الأعلى أو إلى أسفل، أو يكون مستقلاً عن  $[S]$  اعتماداً ما إذا كانت  $\alpha$  أكبر من أو أقل من أو تساوي 1.0 (شكل ١٢-٢ ب و).

### ١٢-٣ تقدير $K_i$ لمبطات الارتباط المحكم

توجد عدة طرق لتقدير قيمة  $K_i$  لمبطات الارتباط المحكم. أحد هذه الطرق قام بها موريسون (Morrison 1969) الذي قام بمعالجة رياضية لمبطات الارتباط المحكم التي أدت إلى وضع معادلة عامة لوصف السرعة الجزئية  $(v_i/v_0)$  لتفاعل إنزيمي كدالة في تركيز المثبط عند تركيز مثبت لكل من الإنزيم والمادة الخاضعة. وهذه المعادلة من الشائع الإشارة إليها بمعادلة موريسون. ولقد أشتقت هذه المعادلة بنمط مماثل لمعادلة ٥-٣٤، فيما عدا أن صياغة المعادلة هنا تكون بدلالة النشاط الإنزيمي الجزئي في وجود المثبط (أى بدلالة جزء الإنزيم الحر بدلاً من جزء الإنزيم المرتبط بالمثبط)



شكل ١٢-٢ (أ) تأثيرات تركيز المادة الخاضعة على قيم  $IC_{50}$  للمثبط التنافسي (الدوائر المصمتة)، المثبط اللاتنافسي عندما تكون  $\alpha=1$  (الدوائر غير المصمتة) المثبط غير التنافسي (المربعات المصمتة) للمثبطات محكمة الارتباط (ب) تأثيرات تركيز المادة الخاضعة على قيم  $IC_{50}$  للمثبطات اللاتنافسية محكمة الارتباط عندما تكون  $\alpha<1$  (المربعات) وعندما تكون  $\alpha>1$  (الدوائر).



$$\frac{v_i}{v_0} = 1 - \frac{([E] + [I] + K_i^{app}) - \sqrt{([E] + [I] + K_i^{app})^2 - 4[E][I]}}{2[E]} \quad (٦-١٢)$$

إن صيغة  $K_i^{app}$  في معادلة ٦-١٢ تختلف اعتماداً على نوع المثبط. إن الصيغ المحددة للأنواع المختلفة للمثبطات تكون مماثلة لتلك المعروضة في المعادلات ٢-١٢ إلى ١٢-٥ لقيم  $IC_{50}$ :

● المثبط التنافسي:

$$K_i^{app} = K_i \left( 1 + \frac{[S]}{K_m} \right) \quad (٧-١٢)$$

● المثبط اللاتنافسي:

$$K_i^{app} = \frac{[S] + K_m}{\frac{K_m}{K_i} + \frac{[S]}{\alpha K_i}} \quad (٨-١٢)$$

عندما تكون  $\alpha = 1$ :

$$K_i^{app} = K_i \quad (٩-١٢)$$

● للمثبط غير التنافسي

$$K_i^{app} = K_i \left( 1 + \frac{K_m}{[S]} \right) \quad (١٠-١٢)$$

قبل إنتشار برامج التطابق غير الخطي، فإن إستخدام معادلة موريسون لم تكن مناسبة لتعيين ثوابت المثبط من البيانات التجريبية. وللتغلب على هذا القصور، فإن هندرسون (1972) Henderson أشق صورة خطية لمعادلة موريسون التي تسمح بتقدير  $K_i$  و  $[E]$  من قياسات السرعة الجزئية كدالة في تركيز المثبط عند تركيز مثبت من المادة الخاضعة. والصيغة العامة لمعادلة هندرسون هي كالتالي:

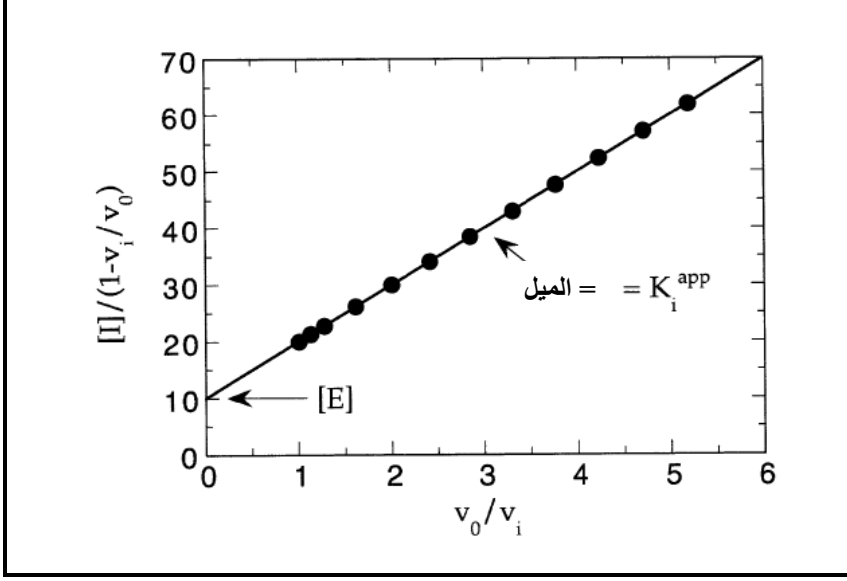
$$\frac{[I]}{1 - \frac{v_i}{v_0}} = K_i^{app} \left( \frac{v_0}{v_i} \right) + [E] \quad (١١-١٢)$$

حيث  $K_i^{app}$  له نفس الصيغ المعروضة في المعادلات ١٢-٧ إلى ١٢-١٠ لأنواع المثبطات المختلفة.

والفحص يشير إلى أن معادلة ١٢-١١ تكون معادلة خطية. فإذا رسمنا  $[I]/(1 - v_i/v_0)$  كدالة في  $v_i/v_0$  (أي مقلوب السرعة الجزئية)، فإن البيانات يمكن أن تتطابق مع خط مستقيم مع ميل يساوي  $K_i^{app}$  والتقاطع مع المحور  $y$  يساوي  $[E]$  كما هو موضح في شكل ١٢-٣. لاحظ أن طريقة هندرسون تنتج رسم خط مستقيم بصرف النظر عن نوع المثبط. مع ذلك فإن ميل الخط في مثل هذه الرسوم يتغير مع تركيز المادة الخاضعة بطرق مختلفة اعتماداً على نوع المثبط. والاختلاف المشاهد يكون مماثل لذلك المعروض في شكل ١٢-٢ للتغير في قيمة  $IC_{50}$  لمثبطات الإرتباط المحكم المختلفة كدالة في تركيز المادة الخاضعة. ومن ثم فإن الرسوم البيانية لهندرسون يمكن أن تستخدم للتمييز بين الآليات المختلفة لإرتباط المثبط.

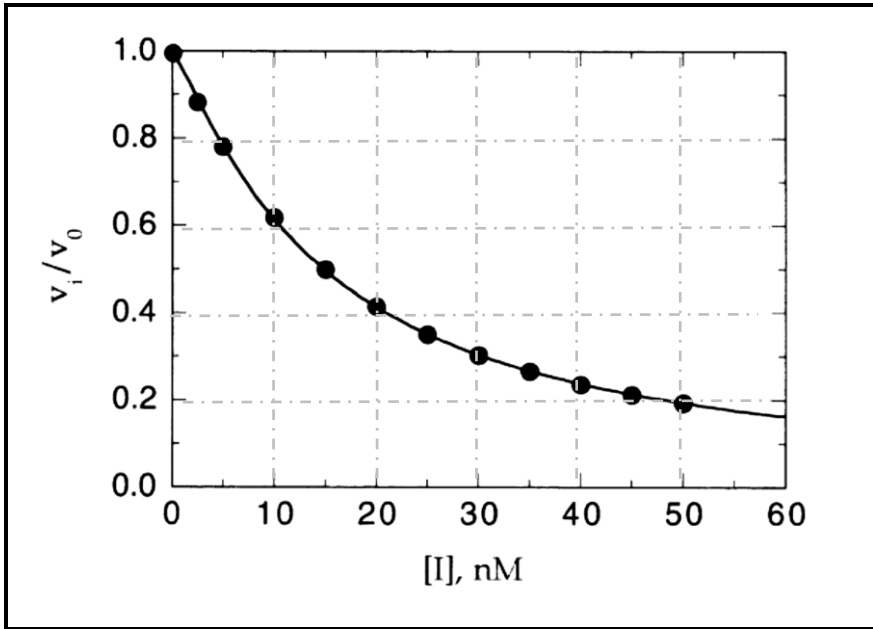
بالرغم من أن الرسوم البيانية الخطية لهندرسون تكون مناسبة في غياب برامج الحاسب الآلي للتطابق غير الخطي، فإن معالجة البيانات يؤدي إلى بعض الأخطاء المنتظمة systematic error. وفي الوقت الحالي ومع متاحة برامج التطابق غير الخطي، فإنه لم يعد من الضروري اللجوء إلى المعالجة الخطية للبيانات مثل الرسوم

البيانية لهندرسون. إن التطابق المباشر للسرعة الجزئية مقابل تركيز المثبط للبيانات في معادلة موريسون (معادلة ١٢-٦) يكون هو المفضل.



شكل ١٢-٣ الرسم البياني لهندرسون للمثبط محكم الارتباط

شكل ١٢-٤ يوضح التطابق المباشر لبيانات السرعة الجزئية مقابل تركيز المثبط لمعادلة ١٢-٦. وهذه البيانات تتطلب التقدير المسبق لقيمة  $K_m$  للمادة الخاضعة (كما تم وصفه في فصل ٦) ومعرفة تركيز المادة الخاضعة  $[S]$  في الإختبارات. ومن ثم فإن البيانات مثل النقاط في شكل ١٢-٤ سوف تتطابق مع معادلة موريسون، التي تسمح بتقدير كل من  $K_i^{app}$  و  $[E]$  في نفس الوقت كمعاملات (بارمترات) التطابق. وقياسات من هذا النوع عند عدة تركيزات من المادة الخاضعة سوف تسمح بتعيين نوع المثبط، ومن ثم فإن قيم  $K_i^{app}$  المقاسة تجريبياً يمكن أن تحول إلى قيم  $K_i$  الحقيقية (المعادلات ١٢-٧ إلى ١٢-١٠).



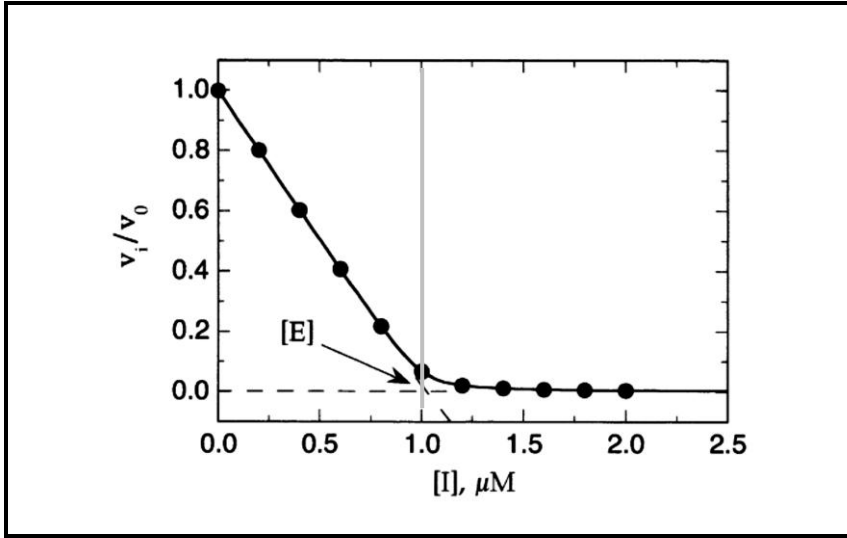
شكل ١٢-٤ الرسم البياني للسرعة الجزيئية كدالة في تركيز المشبّط لمشبّطات الارتباط المحكم. الخط المتواصل خلال نقاط البيانات يعبر عن أفضل تطابق لمعادلة موريسون (معادلة ١٢-٦)

## ١٢-٤ استخدام مشبّطات الإرتباط المحكم في تقدير التركيز الفعال للإنزيم

في كثير من المخططات التجريبية قد يكون من المرغوب معرفة تركيز الإنزيم في عينة لإستخدامه في التحليل التالي للبيانات. وهذا الاتجاه يطبق ليس فقط للبيانات الحركية، ولكن أيضاً لأنواع أخرى من الدراسات الكيموحيوية والفيزيوكيميائية مع الإنزيمات. ويوجد في أدبيات الإنزيمات المنشورة عديد من الطرق التي تستخدم في تقدير تركيز البروتين الكلي في العينة إعتماًداً على تقنيات التحليل الطيفي spectroscopy والقياس اللوني colorimetry وغيرهما من التقنيات التحليلية. مع ذلك، فإن كل هذه الطرق تقيس التركيز الكلي للبروتين وليس تركيز الإنزيم المستهدف على وجه الخصوص. إضافة إلى ذلك، فإن هذه الطرق ليست بالضرورة أن تميز بين جزيئات الإنزيم النشطة والجزيئات المتغيرة (غير النشطة) للإنزيم. وفي كثير من التطبيقات التي نقابلها، فإن تركيز جزيئات

الإنزيم النشطة هي التي تكون مناسبة للدراسة. إن متاحة المثبط محكم الارتباط للإنزيم المستهدف توفر طريقة ملائمة للتقدير الدقيق لتركيز الإنزيم النشط في العينة، حتى في وجود جزيئات إنزيمات غير نشطة (متغيرة denatured) أو بروتينات غير إنزيمية أخرى.

بالرجوع إلى معادلة ١٢-٦، فإذا وضعنا تجربة التي فيها كل من  $[E]$  و  $[I]$  أكبر كثيراً عن  $K_i^{app}$  في هذه المعادلة، فإننا يمكن إهمال الحد  $K_i^{app}$  في هذه المعادلة. وتحت هذه الظروف، فإن السرعة الجزئية  $(v_i/v_0)$  للتفاعل الإنزيمي سوف تتخفض بصورة شبه خطية بزيادة تركيز المثبط حتى يصبح  $[I] = [E]$ . وعند هذه النقطة فإن السرعة الجزئية سوف تدنو إلى الصفر وسوف تبقى هكذا بزيادة تركيز المثبط. في هذه الحالة فإن رسم السرعة الجزئية كدالة في تركيز المثبط سوف يظهر كما في شكل ١٢-٥، عند تطابقة مع معادلة موريسون. والبيانات عند التركيز المنخفض للمثبط يمكن أن تتطابق مع خط مستقيم الذي يمتد إلى محور  $x$  (الخط المتقطع في شكل ١٢-٥)، ونقط البيانات عند التركيز العالي من المثبط يمكن أن تتطابق مع خط مستقيم أفقي عند  $v_i/v_0 = 0$ . ومن ثم فإن الخطين سوف يتقاطعان عند نقطة ما على المحور  $x$  حيث يكون  $[I] = [E]$ . مع ذلك لاحظ أن هذه المعالجة تكون فعالة فقط عندما يكون  $[E]$  أكبر كثيراً عن  $K_i$ . وعندما يكون  $[E]$  أقل من  $K_i$  200 فإن البيانات لا يمكن أن توصف بتقاطع الخطين. في مثل هذه الحالات فإن البيانات يمكن أن تتطابق مباشرة لمعادلة ١٢-٦ لتقدير  $[E]$  كما سبق شرحه.

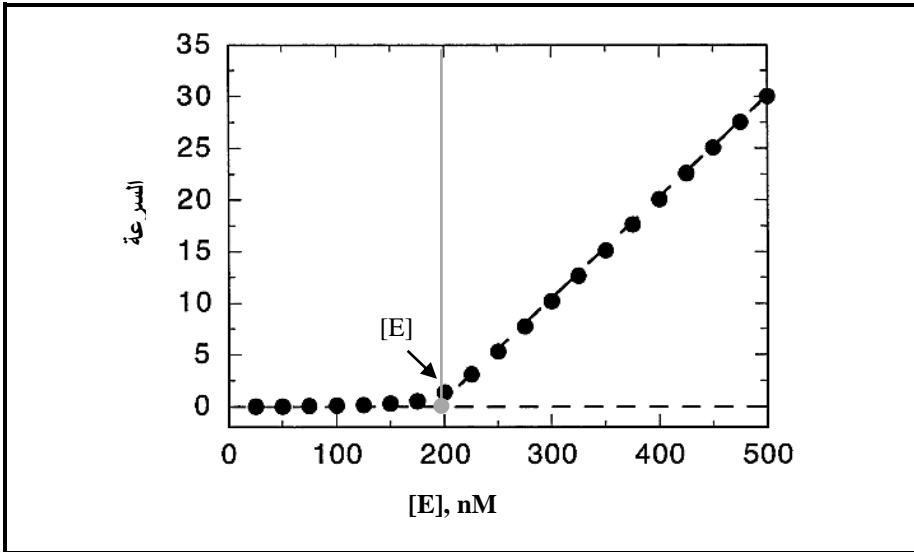


شكل ١٢-٥ تقدير التركيز النشط للإنزيم بالمعايرة مع المثبط محكم الارتباط (عند  $[E]/K_i = 200$ ). الخط المصمت (غير المتقطع المرسوم خلال البيانات هو أفضل تطابق لمعادلة موريسون (معادلة ١٢-٦). الخط المتقطع رسم بواسطة التطابق الخطي لأقل خطأ للبيانات عند التركيز المنخفض للمثبط وعند التركيز العالي. والتركيز النشط للإنزيم يقدر من قيمة المحور  $x$  عند تقاطع الخطين المستقيمين ( $E = 1.0 \mu\text{M}$ ).

هذا النوع من المعالجة يكون ملائم لتقدير تركيز الإنزيم النشط في المحلول الأصلي (المخزن) للإنزيم stock enzyme solution (أى التركيز العالي من الإنزيم) الذي سوف يتم تخفيفه إلى مستوى مخلوط التفاعل التجريبي. فعلى سبي المثال، فإننا قد نقوم بتخزين عينة الإنزيم عند تركيز  $100 \mu\text{M}$  في محلول يحتوي على  $1 \text{ mg/mL}$  جيلاتين بغرض المحافظة على ثباتية الإنزيم (أنظر فصل ١٠). إن وجود الجيلاتين يعوق التقدير الصحيح لتركيز الإنزيم بأحد طرق التقدير الطيفي التقليدية، إضافة إلى ذلك فإن تركيز الإنزيم النشط لا يمكن تقديره بمثل هذه الطرق. وباستخدام تركيز نانومولر  $\text{nM}$  من مثبط الإنزيم المستهدف، فإننا يمكن أن نخفف عينة الإنزيم الأصلية إلى تركيز مناسب للاختبار الإنزيمي الذي ما زال أكبر عن  $K_i$  (مثال ذلك  $1 \mu\text{M}$ ). وبمعالجة السرعة الجزئية مقابل تركيز المثبط كما سبق شرحه يمكننا من تقدير التركيز الحقيقي للإنزيم النشط في المحلول المستخدم، ثم من هذا التقدير يمكن العودة وحساب تركيز الإنزيم

النشط في المحلول الأصلي. وهذه تمثل خطة روتينية تستخدم في عديد من معامل الدراسات الإنزيمية.

وتقدير مساوي لتركيز الإنزيم النشط يمكن إجراؤه بتجربة عكسية التي فيها يثبت تركيز المثبط عند قيمة معينة أكبر من  $K_i$  (حوالي  $200 K_i$  أو أكبر) بينما كمية الإنزيم المضافة تكون هي المتغيرة. ونتائج مثل هذه التجربة موضحة في شكل ١٢-٦. إن السرعة الابتدائية تبقى صفر حتى يتساوى تركيز الإنزيم مع تركيز المثبط الموجود في المحلول. والمعايرة الإضافية بالإنزيم فيما وراء هذه النقطة يؤدي إلى التغلب على تثبيط المعايرة ومن ثم بدأ زيادة خطية في السرعة الابتدائية. ومرة ثانية فإنه من نقطة التقاطع للخطوط المنقطعة المرسومة خلال البيانات يمكن تعيين تركيز الإنزيم النشط (شكل ١٢-٦). وميزة استخدام هذه الطريقة لتقدير تركيز الإنزيم النشط أنها تستخدم كمية أصغر من الإنزيم الأصل في المعايرة، ومن ثم ينصح باستخدامها عندما تكون كمية الإنزيم الأصل محدودة.



شكل ١٢-٦ تقدير تركيز الإنزيم النشط بواسطة معايرة تركيز مثبت من مثبط محكم الارتباط مع الإنزيم ( $[I]/K_i = 200$ ). تحليل البيانات يكون مماثلاً لتلك الموصوفة في شكل ١٢-٥.

## أسئلة

- ١- عرف المثبط محكم الارتباط.
- ٢- أذكر نوعين من مشبطات الارتباط المحكم التي تستخدم كعقاقير.
- ٣- كيف تميز أن المثبط تحت الدراسة هو مثبط محكم الارتباط .
- ٤- كيف يمكن تمييز نوع المثبط محكم الارتباط (تنافسي، لا تنافسي وغير تنافسي).
- ٥- اكتب معادلة هندرسون التي تستخدم في تقدير ثوابت المثبط  $K_i$ ، لمشطات الارتباط المحكم. ما هي دلالة الميل والتقاطع مع المحور  $y$  في الرسم البياني لـ هندرسون.
- ٦- وضح كيف يمكن استخدام مشبطات الارتباط المحكم في تقدير التركيز الفعال للإنزيم.





---

## فصل ١٣ مثبطات الارتباط البطئ (التثبيط المعتمد على الوقت)

Slow binding inhibitors (time dependent inhibition)

---

|      |                                                                               |
|------|-------------------------------------------------------------------------------|
| ١-١٣ | صغ التأثير المتبادل بين الإنزيم ومثبطات الارتباط البطئ                        |
| ٢-١٣ | منحنيات تقدم التفاعل لمثبطات الارتباط البطئ                                   |
| ٣-١٢ | التمييز بين مخططات الارتباط البطئ                                             |
| ٤-١٣ | التمييز بين طرق التأثير المتبادل بين المثبطات والإنزيم                        |
| ٥-١٣ | تقدير المعكوسية                                                               |
| ٦-١٣ | عديد من مثبطات الارتباط البطئ تستخدم كعقاقير                                  |
| ٧-١٣ | المثبطات غير العكسية يمكن أن تستخدم في التعرف على تركيب الإنزيم وآلية التفاعل |

كل المثبطات التي نوقشت حتى الآن في الفصلين ١١ و ١٢ هي مثبطات عكسية سريعة حيث تنشئ إتران إرتباط سريع مع الإنزيم بمقياس زمني أسرع بالنسبة لمعدل التحول للتفاعل المحفز إنزيمياً، ومن ثم فإنه يمكن قياس السرعة الابتدائية مباشرة بعد خلط الإنزيم والمثبط. في فصل ١٢ لاحظنا أن عديد من مثبطات الارتباط المحكم تنشئ إتران بمقياس زمني أبطأ من معدل التحول الإنزيمي، ولقد تم التغلب على هذه المشكلة تجريبياً بالتحضين المسبق للإنزيم مع المثبط لفترة كافية لضمان الوصول إلى حالة إتران قبل بدأ الحالة الثابتة بإضافة المادة الخاضعة. وبالرغم من أن هذه الاتجاه ربما يكون مرضي في

حالة المثبطات اللاتنافسية، فإن المادة الخاضعة سوف تغير درجة التنشيط في حالة المثبطات التنافسية وغير التنافسية. إضافة إلى ذلك فإن معلومات قيمة حول عملية التنشيط ذاتها سوف تفقد.

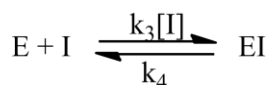
في هذا الفصل سوف نناقش المثبطات التي ترتبط ببطئ بالإنزيم بالنسبة للمقياس الزمني للتحويل الإنزيمي، ومن ثم فإنها تظهر تغير في السرعة الابتدائية مع الوقت. وهذه المثبطات يشار إليها بمثبطات الارتباط البطئ *slow binding inhibitors* أو المثبطات المعتمدة على الوقت *time-dependent inhibitors* للإنزيمات.

### ١-١٣ صيغ التأثير المتبادل بين الإنزيم ومثبطات الارتباط البطئ

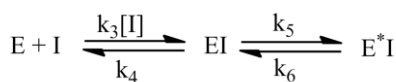
يمكن تمييز أربع صيغ مختلفة للتأثير المتبادل بين المثبط والإنزيم التي تؤدي إلى حركات الارتباط البطئ. والاتزان المشتلة في هذه العمليات معروضة في شكل ١-١٣

● **المخطط (أ)** في شكل ١-١٣ يعرض الاتزان في حالة التفاعل الإنزيمي غير المثبط الذي تم مناقشته في فصل ٦ و  $k_1$  هو ثابت المعدل المرافق لإرتباط المادة الخاضعة مع الإنزيم لتكوين المعقد ES، أحياناً يطلق عليه  $k_{on}$  (الوصول المادة الخاضعة إلى الإنزيم)، والثابت  $k_2$  في شكل ١-١٣ (أ) هو ثابت معدل التفكك أو ثابت معدل الانفصال *off rate constant* ( $k_{off}$ ) لتفكك المعقد ES في الاتجاه الخلفي للإنزيم الحر والمادة الخاضعة الحرة، و  $k_{cat}$  هو ثابت معدل الحفز كما تم تعريفه في فصل ٦.

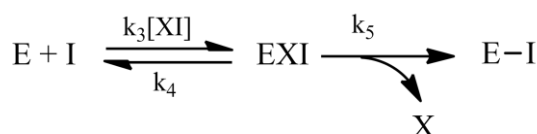
والمخططات الباقية (ب-د) في شكل ١-١٣، فإن الاتزان الموصوف بالمخطط (أ) يحدث كتفاعل منافس (كما أوضحنا في حالة المثبطات الإنزيمية العكسية البسيطة في فصل ١١).



(ب) الارتباط العكسي البطئ البسيط



(ج) تشكّل الإنزيم



(د) التثبيط غير العكسي

- التحرير التساهمي  
- المثبطات المعتمدة على الآلية

شكل ١٣-١ مخططات تثبيط الإنزيمات المعتمد على الوقت (التثبيط البطئ) (أ) مخطط للتفاعل الإنزيمي غير المثبط (ب) مخطط للتفاعل الإنزيمي المثبط بواسطة مثبط عكسي. (ج) في هذا المخطط فإن الارتباط الأولي للمثبط بالإنزيم يؤدي إلى تكوين المعقد EI الذي يدخل في عملية تشكّل للإنزيم ويؤدي إلى تكوين معقد جديد  $E^*I$ . (د) هذا المخطط يعبر عن إتحاد الإنزيم بمثبط غير عكسي الذي يؤدي إلى خمد الإنزيم نتيجة لتكوين رابطة تساهمية بين الإنزيم ومجموعة فعالة على المثبط الذي يؤدي إلى تكوين  $E-I$  (أنظر المتن). والمثبطات في المخطط (د) يمكن أن تكون تحويل تساهمي أو مثبطات معتمدة على الآلية.

### ● المخطط (ب) يشرح الحالة التي فيها ارتباط المثبط بالإنزيم يكون تفاعل ثنائي

الجزيئية بسيط مثل ذلك الذي تم مناقشته في فصل ١١ وفصل ١٢. مع ذلك ففي هذه الحالة فإن ثابتي الارتباط والتفكك ( $k_3$  و  $k_4$  على التوالي) يكونا بحيث أن الاتزان ينشأ ببطئ. ومثل مثبطات الارتباط السريع، فإن ثابت تفكك الإيزان  $K_i$  يعطي كالتالي:

$$K_i = \frac{k_4}{k_3} = \frac{[E][I]}{[EI]} \quad (١-١٣)$$

وفي هذه الحالة يقال للمثبط أنه مثبط ارتباط بطيء عكسي slow-binding reversible inhibitors. ومن ناحية أخرى إذا كان المثبط أيضاً ذو ارتباط محكم يشار إلى المثبط بمثبط الارتباط المحكم البطيء slow tight binding inhibitor، وفي هذه الحالة فإن استنفاد تركيز الإنزيم الحر وتركيز المثبط الحر نتيجة لتكوين المعقد EI يجب أيضاً أن يؤخذ في الاعتبار

$$K_i = \frac{([E_t] - [EI])([I] - ([EI]))}{[EI]} \quad (٢-١٣)$$

حيث  $[E_t]$  تعبر عن التركيز الكلي للإنزيم (أى كل صور الإنزيم) الموجودة في المحلول

● **في المخطط (ج)** فإن الإنزيم يلاقي المثبط وينشأ إتران ارتباط الذي يعين بواسطة ثابتي الاتحاد والتفكك  $k_3$  و  $k_4$  مثل المخطط (ب). مع ذلك فإنه في المخطط (ج) فإن ارتباط المثبط يحدث تغير في البنية الفراغية للإنزيم أو تشكل isomerization الذي يؤدي إلى تكوين معقد جديد بين الإنزيم - المثبط  $E^*I$ ؛ وثابتي المعدل للتحويل الأمامي والخلفي للإتران بين هاتين الصورتين EI و  $E^*I$  للإنزيم يكونا  $k_5$  و  $k_6$  على التوالي، وثابت التفكك للمعقد EI الأولى ما زال يعطي بـ  $K_i$  (أى  $k_4 / k_3$ )، ولكن يجب الأخذ في الاعتبار أيضاً ثابت تحول البنية الفراغية للإنزيم ( $EI \rightleftharpoons E^*I$ ) الذي يشار إليه بـ  $K_i^*$  ويعطي بالصيغة التالية:

$$K_i^* = \frac{K_i k_6}{k_5 + k_6} = \frac{[E][I]}{[EI] + [E^*I]} \quad (٣-١٣)$$

لاحظ أنه لمشاهدة حركات الارتباط البطئ ليس كافياً أن يكون تحول EI إلى  $E^*I$  فقط بطئاً. فالتفاعل العكسي يجب أن يكون أيضاً بطئاً. وفي الحقيقة فإنه لمشاهدة الارتباط البطئ، فإن ثابت المعدل الخلفي ( $k_6$ ) يجب أن يكون أقل من ثابت التشكل الأمامي ( $k_5$ ). وفي الحالة الحادة التي فيها يكون ( $k_5 \ll k_6$ )، فإن خطوة تشكل الإنزيم تؤدي إلى تثبيط غير عكسي. في هذه الحالة يمكن إهمال  $k_6$  ويمكن معالجة التشكل عملياً كخطوة غير عكسية تحكم بواسطة ثابت المعدل  $k_5$ .

● **في المخطط (د)** فإننا نتعامل مع التثبيط غير العكسي irreversible inhibition الذي فيه يكون  $k_6$  يساوي صفر. وهنا يجب أن نميز بين التثبيط العكسي وغير العكسي. في كل مخططات التثبيط التي نوقشت إلى الآن، حتى في حالة تثبيط الارتباط المحكم، فإن  $k_6$  لا تساوي صفر. وثابت المعدل هذا ربما يكون صغيراً جداً، والمثبط ربما من الناحية العملية يعمل كمثبط غير عكسي. مع ذلك فإنه بالتخفيف الكافي للمعدد EI وإعطاء الوقت الكافي فإنه في آخر الأمر يمكن استعادة الإنزيم الحر النشط. أما في الحالة المثبط غير العكسي فإن جزئ الإنزيم المرتبط لا ينفصل مطلقاً. فأى فترة من الزمن أو أى درجة من التخفيف لن ينتج عنها إعادة تنشيط الإنزيم المرتبط بهذا النوع من المثبطات. ومثل هذه المثبطات كثيراً ما يشار إليها بخاملات الإنزيمات enzyme inactivators.

والمثبطات غير العكسية يمكن تصنيفها إلى مجموعتين (١) الألفة المميزة affinity labels أو التحوير التساهمي covalent modification (٢) المثبطات المعتمدة على الآلية mechanism-based inhibitors التي يشار إليها أيضاً بأسماء مختلفة في أدبيات الإنزيمات مثل المواد الخاضعة للقائلة suicid substrates وخاملات الإنزيمات القائلة suicid enzyme inactivators، مثبطات النشاط الإنزيمي غير العكسي وغيرهم.

(١) الألفة المميزة (أو التحوير التساهمي) للإنزيمات: في هذا النوع فإن المركب المثبط يرتبط بالإنزيم ويحور تساهمياً مجموعة أو مجموعات حفازة على الإنزيم. والتحوير

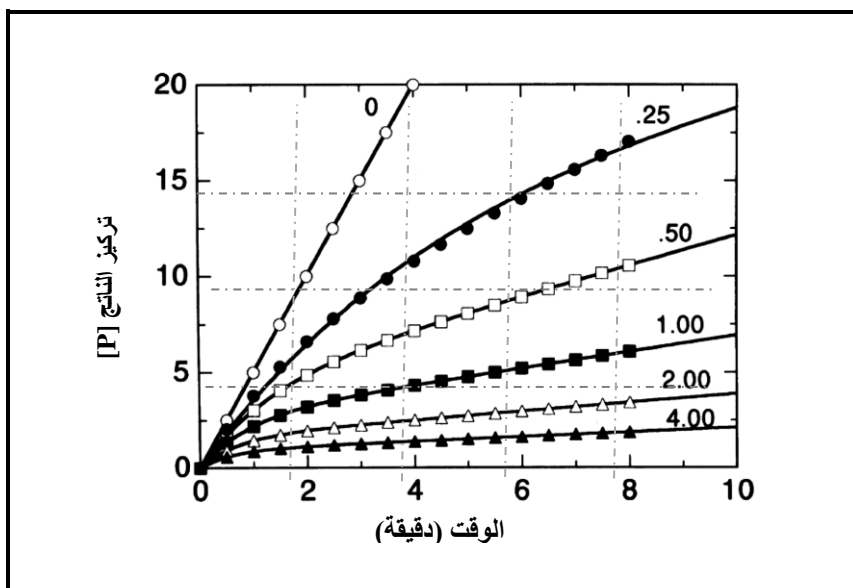
التساهمي يشتمل على تغيير كيميائي للجزئ المثبط، ولكن تعتمد العملية على الكيمياء التي تحدث عند موضع التحوير في غياب أى حفز إنزيمي. ومثبطات الألفة المميزة تكون مفيدة ليس فقط كمثبطات للنشاط الإنزيمي ولكنها أيضاً أصبحت وسائل أبحاث مفيدة. بعض هذه المركبات تكون انتقائية لبواقي أحماض أمينية خاصة ومن ثم يمكن استخدامها لتمييز بواقي أحماض أمينية أساسية مشتملة في دورة الحفز للإنزيم.

(٢) **المثبطات المعتمد على الآلية:** في هذا النوع من التثبيط غير العكسي فإن الجزئ المثبط يرتبط بالموقع النشط للإنزيم ويميز بواسطة الإنزيم على أنه مناظر (مماثل) للمادة الخاضعة substrate analogue. لذلك فإن المثبط يتحول كيميائياً خلال آلية الحفز للإنزيم ليكوّن معقد E-I الذي لم يعد نشطاً حفزياً. وعديد من هذه المثبطات تحدث فقد للنشاط الإنزيمي بتكوين رابطة تساهمية غير عكسية في المتراكب E-I. وفي حالات أخرى فإن جزئ المثبط يتحرر لاحقاً من الإنزيم وهى العملية التي يشار إليها بالتثبيط غير التساهمي، ولكن الإنزيم يقيد بصورة دائمة في صورة التي لم تعد قادرة على الحفز. ونظراً لأن الإنزيم يتغير خلال آلية الحفز الإنزيمي عند الموقع النشط، فإن المثبطات المعتمدة على الآلية دائماً ما تعمل كمثبطات تنافسية للإنزيم. وفي المناقشة التالية سوف نصف الطرق التجريبية للكشف عن مثبطات الارتباط البطئ المعتمد على الوقت وطرق تحليل البيانات التي تسمح بتمييز طرق التأثير المتبادل مع الإنزيم. وأيضاً سوف نشرح طرق تقدير ثوابت المثبط  $K_i$  و  $K_i^*$  لهذه المثبطات.

### ٢-١٣ منحنيات تقدم التفاعل لمثبطات الارتباط البطئ

منحنيات تقدم التفاعل الإنزيمي، في وجود مثبط بطئ الارتباط لا تظهر العلاقة الخطية البسيطة للنواتج- مقابل الوقت التي تشاهد في حالة المثبطات العكسية البسيطة. على عكس ذلك، فإن تكوين المنتج مع الوقت سوف يكون دالة منحنية. وشكل ٢-١٣ يعرض منحنيات تقدم التفاعل النموذجية عندما يبدأ التفاعل الإنزيمي بإضافة الإنزيم. في الجزء

الإبتدائي من المنحني يظهر علاقة شبه خطية ثم تصبح بطيئة تدريجياً حيث يتم تثبيط مزيد من الإنزيم. ومن الضروري تقييم عدة إتحدات من تركيزات الإنزيم والمادة الخاضعة والمشط لإيجاد المدى لكل منها لإجراء قياسات الإعتماد على الوقت.



شكل ١٣-٢ أمثلة لمنحنيات تقدم التفاعل الإنزيمي في وجود تركيزات مختلفة من المشط الإنزيمي المعتمد على الوقت للتفاعل الذي يبدأ بإضافة الإنزيم لمخلوط يحتوي على المادة الخاضعة والمشط. ورقمت المنحنيات للإشارة إلى التركيزات النسبية للمشط الموجود. لاحظ أنه خلال الـ 10 دقائق الأولى فإن الإنزيم غير المشط يظهر منحني تقدم خطي.

ومنحنيات تقدم التفاعل عند تركيزات مختلفة من المشط المعتمد على الوقت يمكن التعبير عنها بتكوين الناتج [P] كدالة في الوقت بالصيغة التالية:

$$[P] = v_s t + \frac{v_i - v_s}{k_{obs}} [1 - e^{-k_{obs} t}] \quad (١٣-٤)$$

حيث  $v_i$  هي السرعة الإبتدائية في وجود المشط

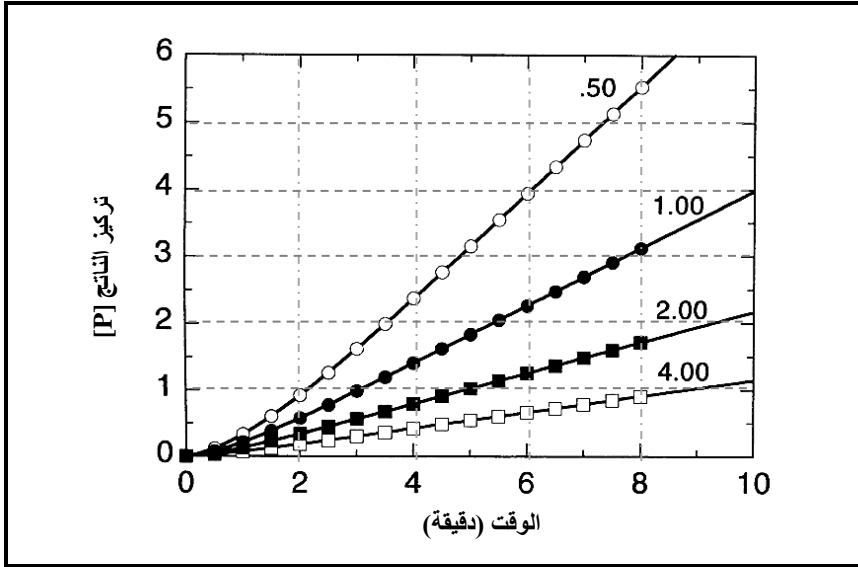
$v_s$  هي سرعة الحالة الثابتة (أى السرعة النهائية) للتفاعل في وجود المشط



$k_{obs}$  هو ثابت معدل الرتبة الأولى الظاهر (المشاهد) للتحويل من  $v_i$  إلى  $v_s$  الطريقة الثانية لقياس منحنيات تقدم التفاعل لمخططات الارتباط البطيء هو البدء بتحضير الإنزيم مع المثبط لفترة زمنية طويلة بالنسبة لمعدل ارتباط المثبط ثم بدأ التفاعل بتخفيف محلول الإنزيم- المثبط بمحلول يحتوي على المادة الخاضعة للإنزيم. أثناء فترة التحضير الأولى يتم إنشاء الإتزان بين الإنزيم والمثبط وإضافة المادة الخاضعة يشوش هذا الاتزان. ونظراً لمعدل التحرر (الانفصال) البطيء للمثبط، فإن منحنى التقدم سوف يظهر ميل مسطح قليلاً في البداية، الذي يتحول أخيراً إلى سرعة الحالة الثابتة كما هو موضح في شكل ١٣-٣. ومنحنيات تقدم التفاعل هنا توصف أيضاً بمعادلة ١٣-٤، باستثناء أن السرعة الابتدائية سوف تكون أقل من سرعة الحالة الثابتة، بينما للبيانات المتحصل عليها ببدء التفاعل مع الإنزيم، فإن السرعة الابتدائية تكون أكبر من سرعة الحالة الثابتة. وللتغلب على هذا الاختلاف فإن بعض الباحثين استبدل الحد  $v_i$  في معادلة ١٣-٤ مع  $v_r$  في حالة التفاعل الذي يبدأ بإضافة المادة الخاضعة. ومرة ثانية فإنه يمكن استخدام معادلة ١٣-٤ كمعادلة تجريبية والسماح لـ  $v_i$  (أو  $v_r$ ) و  $v_s$  و  $k_{obs}$  أن تكون المعلمات (البارامترات) التي تكيف (تضبط) وقيمها تعين بتحليل التوافق غير الخطي.

### ١٣-٣ التمييز بين مخططات الارتباط البطيء

للتمييز بين مخططات الارتباط البطيء المعروضة في شكل ١٣-١، فإننا يجب أن نقدر تأثير تركيز المثبط على ثابت معدل الرتبة الأولى الظاهري  $k_{obs}$  الذي يتم تقديره كما هو موضح في قسم ١٣-٢. وهنا سوف نعرض العلاقة بين  $k_{obs}$  و  $[I]$  لهذه المخططات المختلفة بدون عرض عمليات اشتقاق هذه العلاقات.



شكل ١٣-٣ أمثلة لمنحنيات تقدم التفاعل في وجود تركيزات مختلفة للمثبط الإنزيمي المعتمد على الوقت الذي يبدأ بتخفيف معقد الإنزيم- المثبط بإضافة محلول منظم يحتوي على المادة الخاضعة. ورقمت المنحنيات للإشارة إلى التركيز النسبي للمثبط.

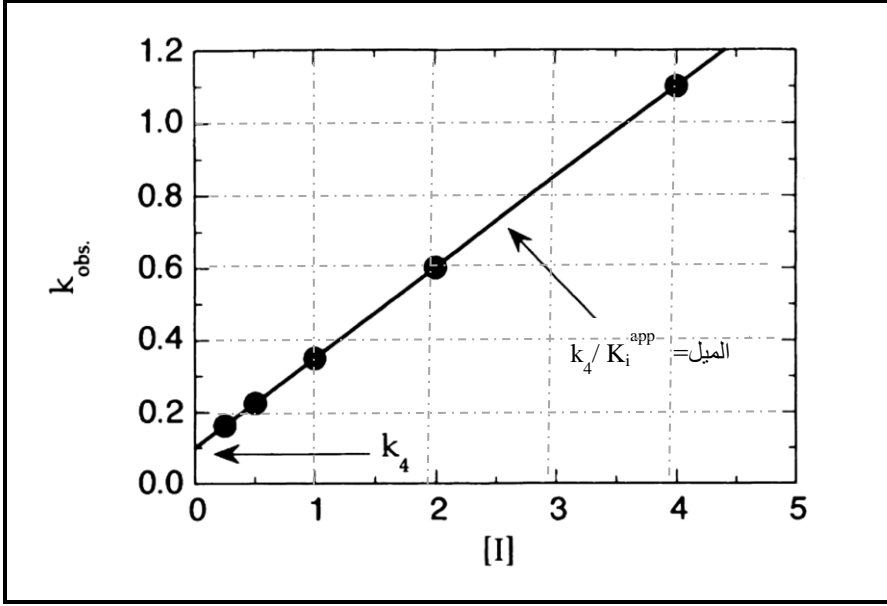
### ١٣-٣-١ المخطط ب

للمثبط الذي يرتبط وفقاً للمخطط ب في شكل ١٣-١ (الارتباط العكسي البطئ البسيط)  $(E + I \xrightleftharpoons[k_4]{k_3} EI)$ ، فإن العلاقة بين  $k_{obs}$  و  $[I]$  تعطي بمعادلة ١٣-٥:

$$k_{obs} = k_4 \left( 1 + \frac{[I]}{K_i^{app}} \right) \quad (١٣-٥)$$

حيث  $K_i^{app}$  هو الثابت  $K_i$  الذي يرتبط بـ  $K_i$  الحقيقي بدوال مختلفة التي تعتمد على طريقة التأثير المتبادل بين المثبط والإنزيم (أي تنافسي، لا تنافس أو غير تنافسي؛ انظر قسم ١٣-٤). ومن معادلة ١٣-٥ نجد أن رسم  $k_{obs}$  كدالة في  $[I]$  يجب أن يعطي خط مستقيم الذي يكون له ميل يساوي  $k_4 / K_i^{app}$  والتقاطع مع المحور  $y$  يساوي  $k_4$  (شكل ١٣-٤). ومن ثم فإنه من تحليل الإنحدار الخطي لمثل هذه البيانات يمكن في نفس

الوقت تقدير قيمتي  $k_4$  و  $K_i^{app}$ . وإذا كانت طريقة عمل المثبط معلومة، فإنه يمكن تحويل  $K_i^{app}$  إلى  $K_i$  (أنظر قسم ١٣-٤)، ومن هذا يمكن تقدير قيمة  $k_3$  بواسطة معادلة ١٣-١.



شكل ١٣-٤ رسم  $k_{obs}$  كدالة في تركيز المثبط [I] لمثبط الارتباط البطيء الذي يعمل وفقاً للمخطط ب في شكل ١٣-١

### ١٣-٣-٢ المخطط ج

للمثبط الذي يعمل وفقاً للمخطط ج في شكل ١٣-١ (تشكل الإنزيم  $(E+I) \xrightleftharpoons[k_4]{k_3} EI \xrightleftharpoons[k_6]{k_5} E'I$ ) فإن  $k_{obs}$  ترتبط ب [I] كالتالي:

$$k_{obs} = k_6 + \left[ \frac{k_5 [I]}{K_i^{app} + [I]} \right] \quad (١٣-٦)$$

التي يمكن إعادة صياغتها كالتالي:

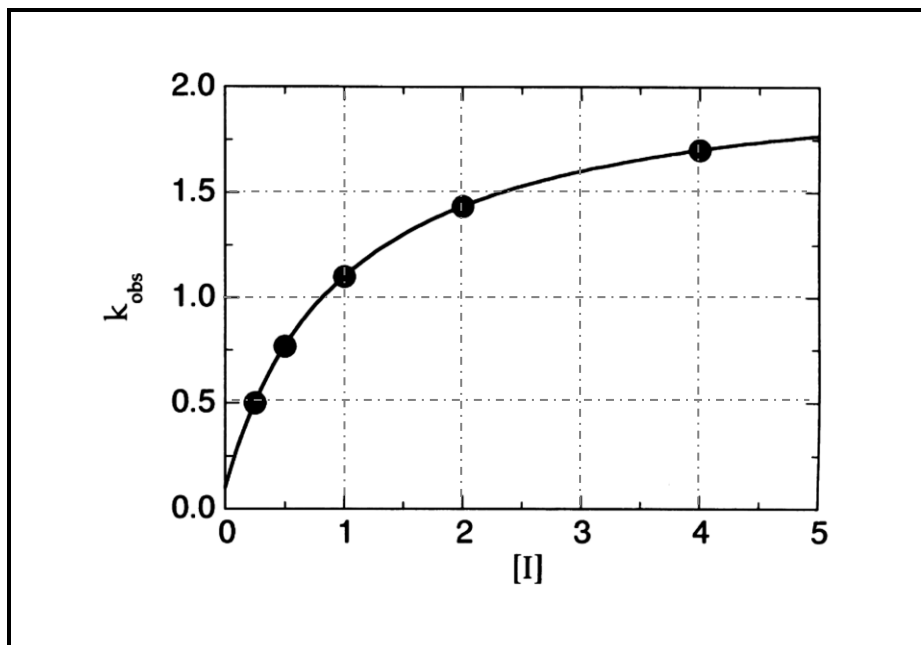
$$k_{obs} = k_6 \left[ \frac{1 + \frac{[I]}{K_i^{*app}}}{1 + \frac{[I]}{K_i^{app}}} \right] \quad (٧-١٣)$$

إن صورة المعادلتين ٦-١٣ و ٧-١٣ تنتبأ أن  $k_{obs}$  سوف تتغير كدالة قطع زائد hyperbolic function لـ  $[I]$  كما هو موضح في شكل ١٣-٥. إن التقاطع مع المحور  $y$  للمنحني في هذا الشكل يعطي تقدير لثابت المعدل  $k_6$ ، بينما القيمة العظمى لـ  $k_{obs}$  المتوقعة تكون عند التركيز اللانهائي للمشبوط وفقاً لمعادلة ٦-١٣ وتكون  $k_6 + k_5$ ، ومن ثم فإنه بالتطابق غير الخطي لبيانات معادلة ٦-١٣ يمكن في نفس الوقت تقدير كل من  $k_6$  و  $K_i^{app}$  و  $K_i^{*app}$ .

لاحظ أنه إذا كان  $K_i$  أكبر كثيراً عن  $K_i^{*app}$ ، فإن تركيز المشبوط المطلوب للتنشيط بطئ الارتباط يكون أقل كثيراً عن  $K_i$ . وتحت هذه الظروف، فإن تركيز الحالة الثابتة لـ  $[EI]$  يكون حركياً غير هام، وتختزل معادلة ٦-١٣ إلى:

$$K_{obs} = k_6 \left[ 1 + \frac{[I]}{K_i^{*app}} \right] \quad (٨-١٣)$$

في هذه الحال فإن رسم  $k_{obs}$  كدالة في  $[I]$  سوف ينتج خط مستقيم مثل المشبطات الموصوفة في المخطط ب. وفي هذه الحالة فإننا لا نستطيع أن نميز بين هاتين الحالتين.



شكل ٥-١٣ الرسم البياني لـ  $k_{obs}$  كدالة في تركيز المثبط لمثبط الارتباط البطئ الذي يؤكد المخطط ج في شكل ١-١٣

### ٣-١٣-١٣ المخطط د

إذا كان الثابت الحركي  $k_6$  صغيراً جداً في المخطط ج أو يساوي صفر. كما في المخطط د، فإن المثبط من الناحية العلمية يعمل كمثبط غير عكسي للإنزيم. وفي هذه الحالة، فإن معادلة ٦-١٣ تختزل إلى:

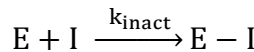
$$k_{obs} = \frac{k_5[I]}{K_i^{app} + [I]} \quad (٩-١٣)$$

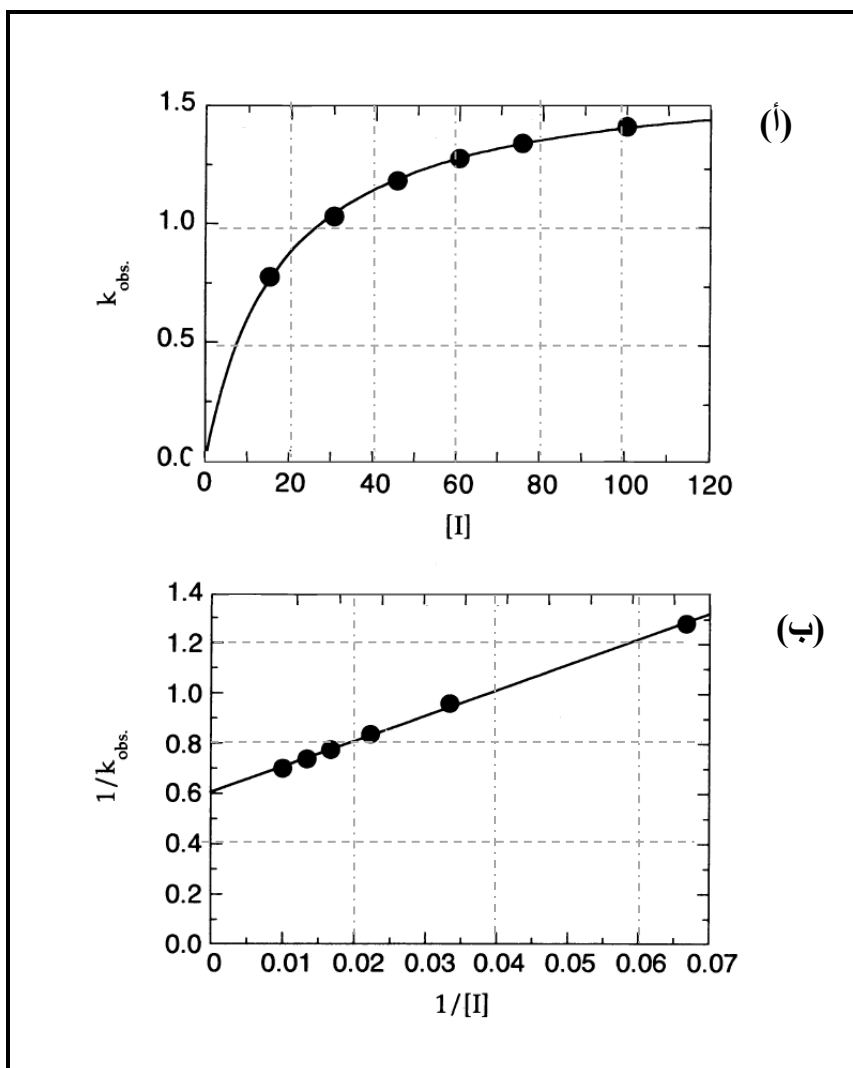
وهنا فإن رسم  $k_{obs}$  كدالة في  $[I]$  سوف ينتج منحنى قطع زائد (شكل ٦-١٣ أ)، ولكن التقاطع مع المحور  $y$  سوف يكون صفراً (الذي يعكس القيمة صفر أو القريبة من الصفر لـ  $k_6$ ).

في حالة المثبّطات غير العكسية فإن الرجوع إلى الإنزيم الحر  $E$  والمثبّط الحر  $I$  من المعقد  $EI$  يكون غير متاح نتيجة للحاجز غير العكسي التالي (الذي يعبر عنه بـ  $k_5$ ). ولهذا السبب فإن  $K_i$  لم يعد يعبر عن ثابت التفكك البسيط للمعقد  $EI$ . ولكن في الواقع فإن الحد  $K_i^{app}$  في معادلة ٩-١٣ يعرف بأنه التركيز الظاهري (المشاهد) المطلوب للوصول إلى نصف معدّل التنشيط الأقصى للإنزيم. ومن ثم فإنه يمكن إستبدال  $k_5$  في معادلة ٩-١٣ بـ  $k_{inact}$  التي تعرف بالمعدل الأقصى لتنشيط الإنزيم. وبهذه التعريفات، فإن المعلمات (البارامترات)  $k_{inact}$  و  $K_i^{app}$  تذكرنا بالمعلمات  $V_{max}$  و  $K_m$  على التوالي في معادلة ميكليس - منتين (فصل ٦). وتاماً مثل أن النسبة  $k_{cat}/K_m$  هي أفضل مقياس لكفاءة الحفز في التفاعل المحفز إنزيمياً، فإن أفضل مقياس لفاعلية التنشيط لمثبّط غير عكسي هو ثابت المعدّل ثنائي الرتبة المتحصل عليه من النسبة  $k_{inact}/K_i$ .

ومثل رسومات لينويفر - بورك التي عرضت في فصل ٦، فإن رسم المقلوب المزدوج لـ  $1/k_{obs}$  كدالة في  $1/[I]$  ينتج علاقة خط مستقيم. معظم المثبّطات غير العكسية ترتبط بالموقع النشط للإنزيم بنمط عكسي (الذي يعبر عنه بـ  $K_i^{app}$ ) قبل حدوث خطوة خمل  $inactivation$  الإنزيم البطيئة (التي يعبر عنها بـ  $k_5$ ). ومن ثم فإنه كما يتضح من المخطط د في شكل ١-١٣، فإن خمل الإنزيم يتطلب خطوتين متعاقبتين؛ خطوة الإرتباط وخطوة الخمل. والمثبّطات غير العكسية التي تعمل بهذا النمط تظهر علاقة خطية بين  $1/k_{obs}$  و  $1/[I]$  التي تتقاطع مع المحور  $y$  عند قيمة أعلى من صفر (شكل ١٣-٦ ب).

مع ذلك إذا كان التكوين العكسي للمعقد  $EI$  غير هام حركياً بالنسبة لمعدّل الخمل، فإن رسم المقلوب المزدوج سوف يتقاطع عند نقطة الأصل الذي يعكس عملية الخمل في خطوة فردية:

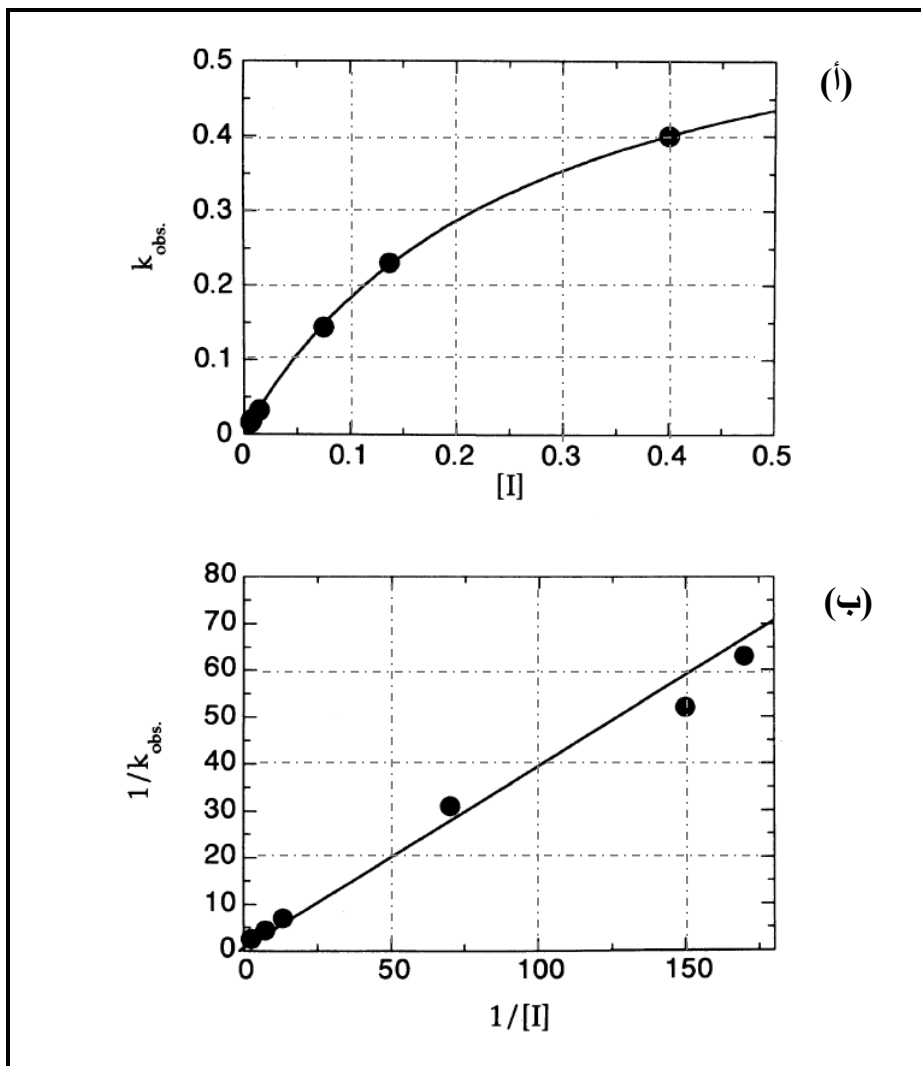




شكل ١٣-٦ (أ) رسم  $k_{obs}$  كدالة في تركيز المثبط للتفاعل غير العكسي البطيء الذي يتوافق مع المخطط د في شكل ١٣-١ (ب) البيانات من الرسم (أ) معروضة في صورة المقلوب المزدوج. والتقاطع غير الصفري يشير إلى أن التنشيط يسير خلال خطوتين؛ خطوة ارتباط أولية يتبعها تنشيط أبطأ.

ورغم أن نمط الخمل خلال خطوة واحدة ليس شائعاً مثل نمط الخمل في خطوتين المعروض في شكل ١٣-١ د، فإن هذا النوع من السلوك يشاهد في حالة الألفة المميزة للجزيئات الصغيرة للإنزيمات. وأحد الأمثلة لذلك مركب ميثايل سلفونيل فلوريد

acetyl methylsulfonyl floride الذي يثبط إنزيم أسيتايل كولين إستريز cholinesterase بواسطة التكوين غير العكسي لمعقد السلفونيل- الإنزيم الذي يبدو أنه يتكون خلال خطوة واحدة (شكل ٧-١٣).



شكل ٧-١٣ (أ) رسم  $k_{abs}$  كدالة في تركيز المثبط  $[I]$  لتثبيط إنزيم أسيتايل كولين أستريز بواسطة ميثايل سلفونيل فلوريد (ب) البيانات في (أ) رسمت في صورة المقلوب المزدوج



### ١٣-٤ التمييز بين طرق التأثير المتبادل بين المثبطات والإنزيم

من ناحية المبدأ فإنه يمكن للمثبطات بطيئة الارتباط أن تتفاعل مع الإنزيم بواسطة التنشيط التنافسي أو اللاتنافسي أو غير التنافسي. في المعادلات السابقة فإن العلاقة بين  $K_i$  و  $K_i^{app}$  وبين  $K_i^*$  و  $K_i^{app}$  هي نفسها مثل تلك المعروضة في فصل ١١ وفصل ١٢ للعلاقة بين  $K_i$  و  $K_i^{app}$  لأنماط التنشيط المختلفة.

ومن ثم فإنه للتمييز بين أنماط عمل المثبطات يجب استخدام العلاقات المناسبة لـ  $K_i$  و  $K_i^*$  في المعادلات، فإننا يجب تقدير تأثيرات تركيزات مختلفة من المادة الخاضعة على قيمة  $k_{obs}$  عند تركيز ثابت من المثبط. ولقد تم اشتقاق العلاقة بين  $k_{obs}$  كدالة في تركيز المادة الخاضعة للمثبطات غير العكسية التنافسية واللاتنافسية وغير التنافسية (ونفس النمط سوف يشاهد أيضاً لمثبطات الارتباط البطيء التي تتطابق مع المخطط ج) وهذه العلاقات معطاه بالمعادلات ١٣-١٠ إلى ١٣-١٢.

#### ● للمثبط التنافسي

$$k_{obs} = \frac{k}{1 + [S]/K_m} \quad (١٣-١٠)$$

#### ● للمثبط اللاتنافسي ( $\alpha=1$ )

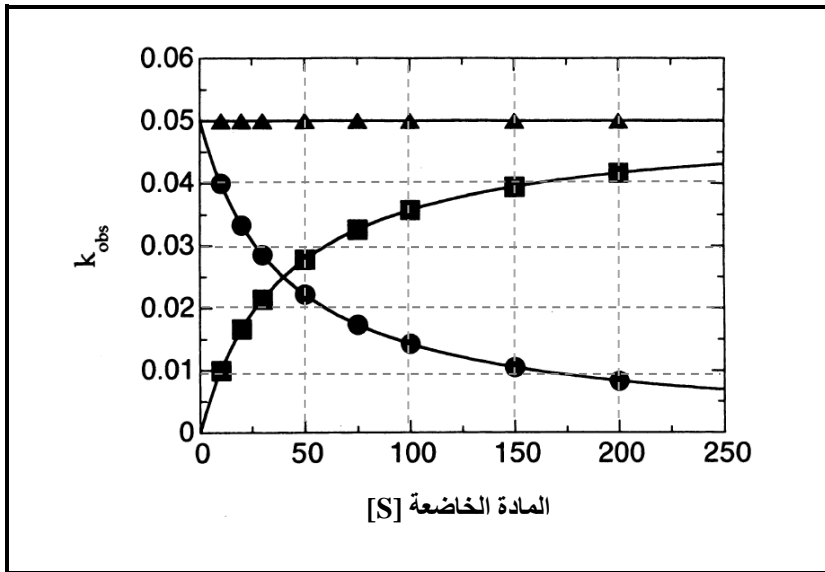
$$k_{obs} = k \quad (١٣-١١)$$

#### ● للمثبط غير التنافسي

$$k_{obs} = \frac{k}{1 + K_m/[S]} \quad (١٣-١٢)$$

والثابت  $k$  في هذه المعادلات يمكن معاملته كمتغير تجريبي لأغراض تطابق المنحنى.

ومن صيغ المعادلات ١٠-١٣ إلى ١٢-١٣ نجد أن المثبط بطئ الإرتباط التنافسي يظهر نقصان في  $k_{obs}$  بزيادة تركيز المادة الخاضعة. من ناحية أخرى فإنه للمثبط اللاتنافسي فإن  $k_{obs}$  لا تتغير مع تركيز المادة الخاضعة (عندما تكون  $\alpha=1$ ) بينما للمثبط غير التنافسي فإن قيمة  $k_{obs}$  سوف تزيد مع زيادة تركيز المادة الخاضعة. وهذه العلاقات بين  $k_{obs}$  وتركيز المادة الخاضعة معروض في شكل ١٣-٨.



شكل ١٣-٨ الاعتماد المتوقع لـ  $k_{obs}$  على تركيز المادة الخاضعة للمثبطات غير العكسية المعتمدة على الوقت التي تتطابق مع أنماط التنشيط التنافسي (●)، التنشيط اللاتنافسي (▲) والتنشيط غير التنافسي (■) مع الإنزيم.

### ١٣-٥ تقدير العكسية

لقد ذكرنا أنه عندما يتطابق المثبط مع المخطط ج في شكل ١٣-١، يكون له قيمة صغيرة جداً لـ  $k_6$ ، ويكون من الصعب التفرقة بين هذا النمط من التنشيط والخمل غير العكسي طبقاً للمخطط د. وللتمييز بين هذين الاحتمالين، فإننا يجب أن نحدد ما إذا كان النشاط الإنزيمي يسترد بإزالة المثبط غير المرتبط من محلول الإنزيم. ويمكن تحقيق ذلك نموذجياً بالتخفيف الكبير، الفرز الغشائي أو الكروماتوجرافي المعتمد على الإقصاء

بالحجم size exclusion chromatography. افترض على سبيل المثال أن مثبط بطيء الارتباط يخفض سرعة الحالة الثابتة بمقدار 50% عند تركيز 100 nM. فإذا حضرنا 1 mL من محلول الإنزيم الذي يحتوي على 100 nM من المثبط وقمنا بالفرز الغشائي لهذه العينة في واحد لتر من محلول المنظم، فإن التركيز النهائي للإنزيم في أنبوب الفرز سوف لا يتغير، ولكن تركيز المثبط سوف ينخفض 1000 مرة. فإذا كان المثبط يرتبط عكسياً بالإنزيم، فإننا نشاهد أن نشاط الإنزيم بعد الفرز الغشائي يعود إلى نشاطه الأصلي غير المثبط. وفي حالة القيمة المنخفضة جداً لـ  $k_6$ ، فإن الوصول إلى الاتزان الجديد بين المثبط الحر والمثبط المرتبط ربما يحتاج إلى وقت- ساعات أو أيام. مع ذلك، إذا كانت  $k_6$  لا تساوي صفر فإن عكس التنشيط سوف يحدث في آخر الأمر. بالطبع فإننا يجب أن نتأكد أن الإنزيم بذاته يكون ثابتاً أثناء هذه العملية.

ولكن نميز بين حمل النشاط الإنزيمي بالارتباط التساهمي والتنشيط غير التساهمي. فإننا ننظر إلى تحرير جزئ المثبط الأصلي عند تغيير طبيعة denaturation عينة الإنزيم. افترض أن مثبط الارتباط البطيء حقيقة يرتبط تساهمياً مع الإنزيم المستهدف؟ فإذا قمنا بتغيير طبيعة الإنزيم بعد عملية التنشيط ثم فصلنا بروتين الإنزيم المتغير من بقية المحلول فإن جزئ المثبط سوف يبقى مع بروتين الإنزيم المتغير نتيجة للارتباط التساهمي بين المثبط والإنزيم. من ناحية أخرى إذا كان اتحاد المثبط مع الإنزيم ليس تساهمياً، فإن المثبط سوف يتحرر إلى المحلول عند تغيير طبيعة الإنزيم.

### ١٣-٦ عديد من مثبطات الارتباط البطيء تستخدم كعقاقير

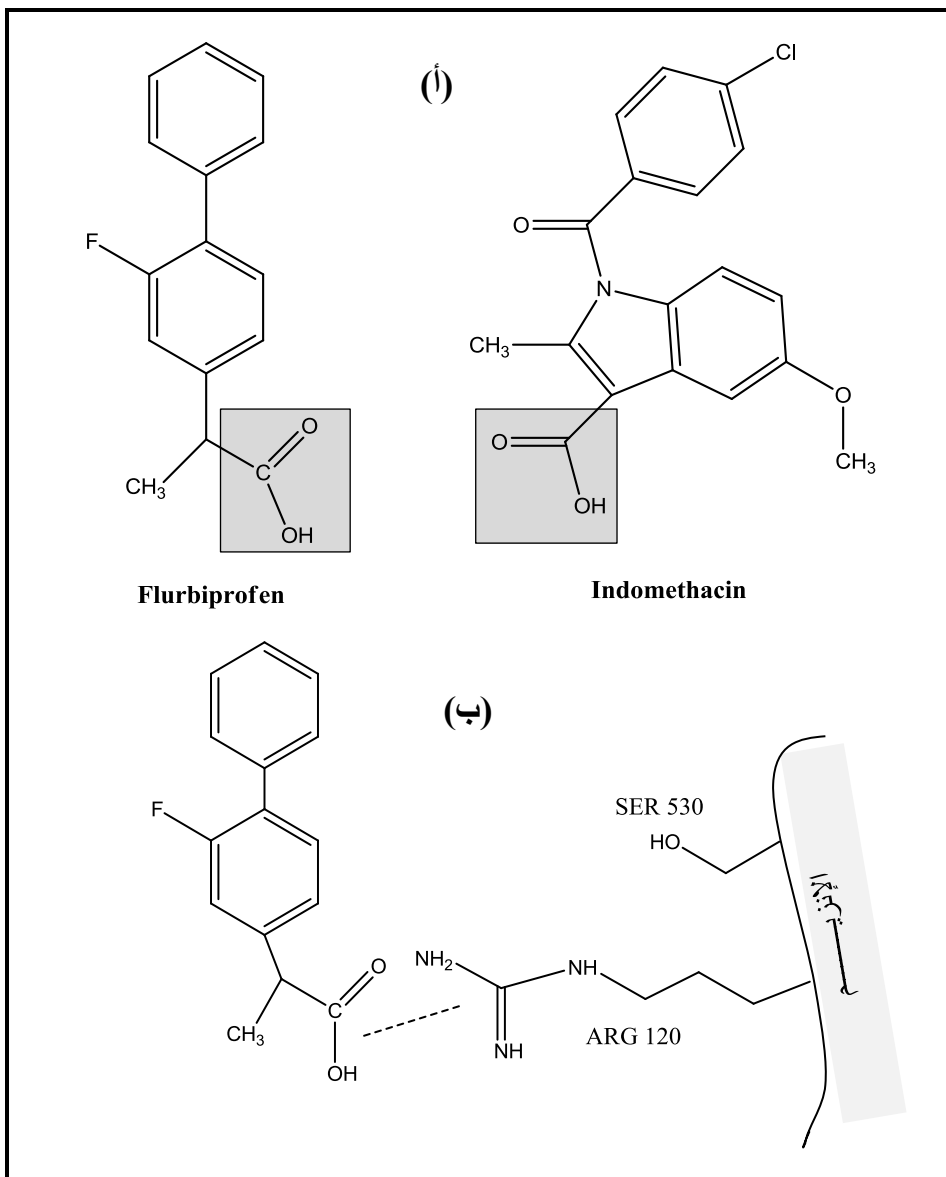
منشور في أدبيات الإنزيمات أمثلة عديدة من مثبطات الارتباط العكسي البطيء ومثبطات الارتباط المحكم البطيء والمثبطات غير العكسية (مثبطات الألفة المميزة والمثبطات المعتمدة على الآلية). وعديد من هذه المثبطات المعتمدة على الوقت تستخدم كعقاقير. وهنا سوف نعرض مثالين لأنظمة الإنزيمات التي تثبط بالمثبطات المعتمدة على الوقت وهما إنزيم تخليق البروستاجلاندين G/H (Prostaglandin G/H synthase) وإنزيم جلايكوببتيد ترانس ببتيداز glucopeptide transpeptidase.

### ١٣-٦-١٣ مثبطات إنزيم البروستاجلاندين G/H

البروستاجلاندينات prostaglandins هي وسائط لعدد من التأثيرات الفسيولوجية المرتبطة بالالتهابات التي تؤدي إلى أعراض مثل الألم، والورم والحمى. إن التخليق الحيوي لهذه الوسائط يكون معدلة مقيد بتحويل حمض أراشيدونيك arachidonic acid إلى البروستاجلاندين  $GH_2$  بواسطة إنزيم تخليق البروستاجلاندين G/H (PGHS). أحد أكثر العقاقير المستخدمة في الوقت الحالي في تسكين الألم هو الأسبرين aspirin.

في بداية سبعينات القرن الماضي أتضح أن الأسبرين يحدث تأثيره المضاد للالتهاب بتثبيط التخليق الحيوي للبروستاجلاندينات. ثم وجد بعد ذلك أن الأسبرين يعمل كمثبط عكسي (من نوع الألفة المميزة) لإنزيم PGHS حيث يثبط الإنزيم بأسئلة acetylating السيرين في الموقع النشط للإنزيم. وأسئلة باقي الحمض الأميني سيرين يمنع حمض أراشيدونيك من الإرتباط بالموقع النشط للإنزيم. مع ذلك فإن الإستخدام الطويل (المكرر) للأسبرين ربما يؤدي إلى ألم وقرحة في المعدة وفشل كلوي نتيجة لتحلل الغشاء المخاطي المبطن للمعدة والمعوي والكلي.

لعدة سنوات قام العلماء والأطباء بالبحث عن عقاقير مضادة للالتهاب التي يمكن أن تؤخذ خلال فترات طويلة دون أن يظهر لها تأثيرات جانبية. ونتيجة لهذا المجهود قد ظهر قسم واسع من العقاقير التي تعرف بالعقاقير غير الإستيرويدية المضادة للالتهاب nonsteroidal anti-inflammantory drugs (NSAIDs). ومجموعة من هذه العقاقير الذي ينصح بإستخدامها هي مركبات تحتوي على حمض كربوكسيلي، ومثال من هذه الأدوية فلوربيروفين flurbiprofen وأندوميثاسين indomethacin (شكل ١٣-٩). هذه المركبات اتضح أنها مثبطات معتمدة على الوقت لإنزيم PGHS وتتطابق مع المخطط ج في شكل ١٣-١. مع ذلك فإن  $k_6$  صغيرة جداً بحيث يمكن اعتبارها من الناحية العملية مثبطات غير عكسية.

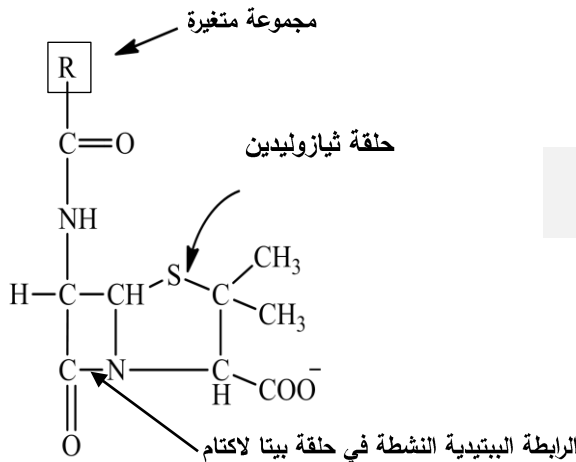


شكل ٩-١٣ (أ) مثالين للعقاقير غير الستيرويدية المضادة للالتهاب NSAIDs التي تحتوي على الكربوكسيلات التي تعمل كمثبطات بطيئة الارتباط لإنزيم PGHS. (ب) رسم إيجازي لإرتباط فلوربيروفين flurbiprofen بالموقع النشط لـ PGHS خلال تكوين قنطرة ملحية مع أرجنين ١٢٠. اعتماداً على التركيب البلوري لمعقد PGHS-flurbiprofen.

والدراسات التي أجريت على التركيب البلوري لإنزيم PGHS مع المثبط الكربوكسيلي فلوريبوروفين المرتبط بالموقع النشط، أوضحت أن مجموعة الكربوكسيلات لهذا المثبط تشارك في تكوين قنطرة ملحية مع الأرجنين 120 في فجوة ارتباط حمض أراشيدونيك. وتكوين هذه القنطرة الملحية بإزاحة بواقي الحمض الأميني القريب، ربما تكون الخطوة المحددة للمعدل في التنشيط المعتمد على الوقت للإنزيم بهذا المثبط. وشكل ١٣-٩ (ب) يعرض رسم إيجازي للتأثير المقترح بين الأرجنين في الموقع النشط ومجموعة الكربوكسيلات في المثبط.

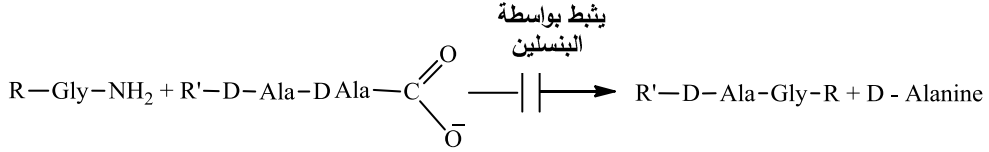
### ١٣-٦-٢ البنسلين مثبط غير عكسي لإنزيم جلايكوبيتيد ترانس بيتيديز وهو إنزيم أساسي في تخليق جدر الخلايا البكتيرية.

في عام ١٩٢٨ لاحظ ألكسندر فليمنج Alexander Fleming أن تلوث بيئة نمو البكتيريا (بالمصادفة) بفطر *Penicillium notatum* قد أدى إلى تحلل خلايا البكتيريا المجاورة للفطر. وهذا كان نتيجة لوجود مركب البنسلين Penicillin وهو مضاد حيوي يفرز بواسطة الفطر. والبنسلين يحتوي على حلقة ثيازوليدين Thiazolidine ring المندمجة مع حلقة بيتا لكتام  $\beta$ -lactam ومجموعة R متغيرة التي ترتبط بحلقة بيتا لكتام خلال رابطة بيتيدية.

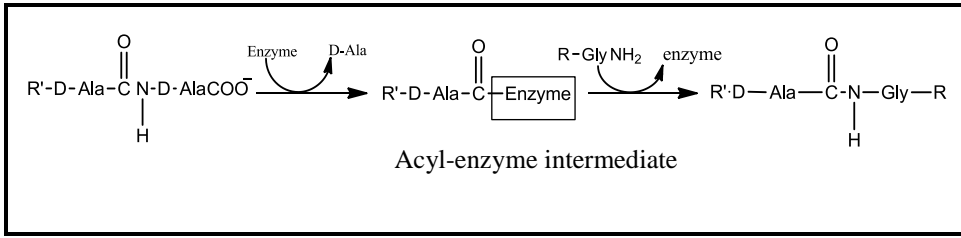


بنسلين Penicillin

والبنسلين يرتبط بصورة متخصصة ويثبط إنزيم ترانس ببتيداز transpeptidase الذي يربط تصالبياً cross-link سلاسل الببتيدوجلوكان لجدر الخلايا البكتيرية

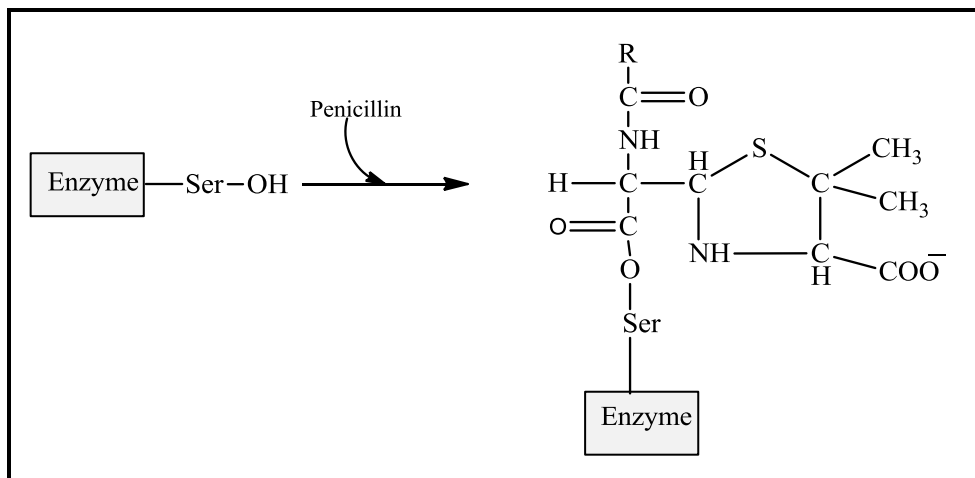


إن إنزيم ترانس ببتيداز طبيعياً يكون مركب وسيط من الأسايل مع الحمض الأميني قبل الأخير D - آلانين للببتيد (شكل ١٣-١٠).



شكل ١٣-١٠ في تفاعل إنزيم ترانس ببتيداز يتكون مركب وسيط من الأسايل - الإنزيم Acyl-enzyme intermediate

وهذا المركب الوسيط من الأسايل - الإنزيم بعدئذ يتفاعل مع الحمض الأميني الطرفي جليسين في ببتيد ثاني. والدراسات التي أجريت عن تثبيط الإنزيم أوضحت أن البنسلين يثبط إنزيم ترانس ببتيداز بتكوين رابطة تساهمية مع باقي الحمض الأميني سيرين عند الموقع النشط للإنزيم (شكل ١٣-١١). وهذا المعقد من البنسلين - الإنزيم لا يتفكك. ومن ثم فإن إنزيم ترانس ببتيداز يثبط غير عكسياً بواسطة البنسلين.



شكل ١٣-١١ تكوين معقد البنسلين - الإنزيم (بيبتيديز)، الذي يكون ثابتاً

## ٧-١٣ المثبطات غير العكسية يمكن أن تستخدم في التعرف على تركيب الإنزيم وآلية التفاعل

عديد من المثبطات تستخدم كمحورات كيميائية التي توفر معلومات تركيبية لأنواع واسعة من الإنزيمات والمستقبلات. وهذه المثبطات تعمل كخاملات غير عكسية تتطابق مع المخطط د في شكل ١٣-١، حيث ترتبط تساهمياً وتحور حمض أميني خاص (أو مجموعة من الأحماض الأمينية) التي تكون حاسمة للوظيفة الحفزية للإنزيم. والتحليل الكمي لهذا التشبيط يمكن أن يعطي معلومات عن عدد بواقي الأحماض الأمينية المحورة وتركيبها وطبيعة عملية الحفز. والمثبطات التي تستخدم في هذا المجال يمكن تصنيفها إلى قسمين (١) الكشافات الخاصة بالمجموعة (الكيمويات المحورة لأحماض أمينية منتقاة) (٢) الألفة المميزة (مناظرات المادة الخاضعة).

### ١-٧-١٣ الكشافات الخاصة بالمجموعة (الكيمويات المحورة لأحماض أمينية منتقاة)

عديد من المواد الكيميائية تقوم بتحويل إنتقائي للسلاسل الجانبية لأحماض أمينية خاصة في البروتين. بعض هذه المواد شائعة الاستخدام في خمل الإنزيمات مسجلة في جدول ١٣-١. هذه المركبات تحور تساهمياً الأحماض الأمينية التي يمكن الوصول إليها



بصورة عامة. ومن ثم فإن معاملة الإنزيم بمثل هذه الكشافات سوف يؤدي إلى تحويل كل من بواقي الأحماض المهمة في عملية الحفز بالإضافة إلى البواقي غير المهمة. والكشافات المسجلة في جدول ١٣-١، إما تنتج علامة ملونة على الإنزيم المحور أو نحصل على نسخة معلمة إشعاعياً، وبالتالي فإنه بهذه الطريقة يمكن أن نحصل على العدد الكلي من الكشافات المرتبطة تساهمياً بكل إنزيم (z) الذي يمكن تقديره كمياً. وبمعرفة تركيز كل من الإنزيم والكشاف المحور، فإننا يمكن أن نعين عدد مولات الكشاف المحور المطلوب لتثبيط واحد مول من جزيئات الإنزيم.

جدول ١٣-١ بعض الأمثلة للكشافات المحورة لأحماض أمينية منتقاة

| الحمض الأميني المحور | الكشاف المحور                           | ملاحظات                                                                                                                            |
|----------------------|-----------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| سستئين cysteine      | أيودو أسيتاميد                          | أيودو أسيتاميد يمكن أيضاً أن يحور بواقي هستيدين ولايسين                                                                            |
| هستيدين Histidine    | داي إيثايل بيروكربونات                  | يمكن أن يتفاعل أيضاً مع لايسين سستئين وتيروزين                                                                                     |
| لايسين Lysine        | أنهيدريد الحمض<br>أيسوسيانات            | الكشافات تتفاعل مع الأمينات الأولية. ومن ثم يمكن أن تحور الطرف الأميني للبروتين                                                    |
| سيرين Serine         | هالوميثيل كيتون<br>الألدهيدات الببتيدية | مفيد في تحويل الموقع النشط لإنزيمات سيرين بروتينيز- الألدهيدات الببتيدية تحور أيضاً الموقع النشط سستئين في أنزيمات سستئين بروتينيز |
| تريبتوفان Tryptophan | N- بروموسكسينيميد<br>نيتروبنزويل هاليد  |                                                                                                                                    |
| تيروزين Tyrosine     | تتراينيتروميثان NaI والبيروكسيديز       |                                                                                                                                    |

افترض على سبيل المثال أنه يوجد عدد n باقي حمض أميني متاحة للتفاعل بصورة متساوية مع الكشاف الكيميائي المحور مثل تلك المسجلة في جدول ١٣-١. افترض أنه من بين تلك الـ n يوجد x من البواقي تكون ضرورية للنشاط الحفزي. فإذا حصّنا الإنزيم

مع الكاشف المحور لفترة من الزمن بحيث يتحور متوسط  $z$  من بواقى الأحماض على كل جزئ إنزيم، فإن احتمال تحوير أى باقى مفرد يساوى  $z/n$ ، وبالمثل يكون احتمال أن يبقى باقى حمض أميني غير محور يساوى  $1-z/n$ . ولكى يستمر الإنزيم فى إظهار النشاط، فإن كل بواقى الأحماض الأمانية الضرورية للحفز يجب أن تكون غير محورة. واحتمال أن يحدث ذلك يعطى بـ  $(1-z/n)^x$ . ومن ثم فإن جزء النشاط الذى يبقى بعد التحوير للمجموعات  $z$  لكل جزئ يعطى بالعلاقة التالية:

$$\frac{v_i}{v_0} = \left(1 - \frac{z}{n}\right)^x \quad (١٣-١٣)$$

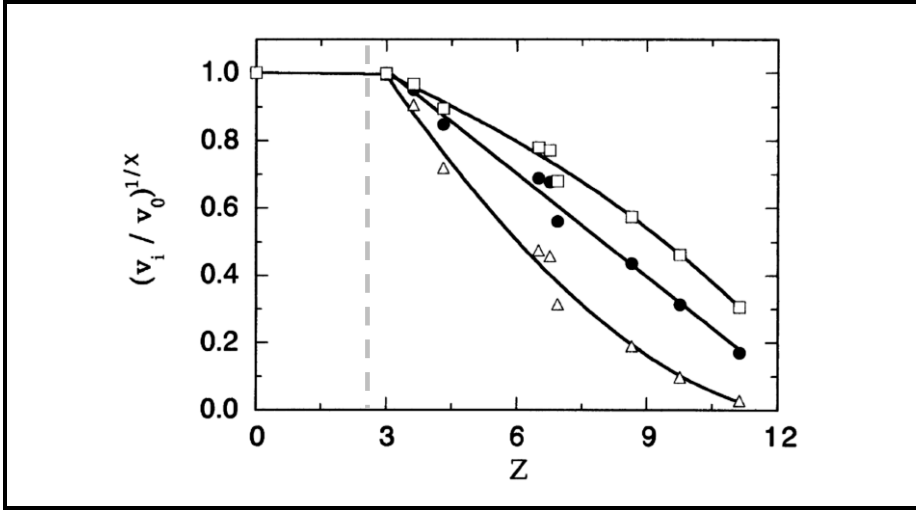
لذلك يكون:

$$\left(\frac{v_i}{v_0}\right)^{1/x} = 1 - \frac{z}{n} \quad (١٣-١٤)$$

حيث  $v_0$  هى السرعة فى غياب المشبب و  $v_i$  السرعة فى وجود تركيز ما من المشبب (العامل المحور). إن قيمة  $v_i/v_0$  يمكن قياسها عند كل تركيز من العامل المحور، وقيمة  $z$  لكل تجربة يمكن تقديرها من قياس كمية الامتصاص الطيفي أو النشاط الإشعاعي المرتبط بالإنزيم. ورسم العلاقة بين  $(v_i/v_0)^{1/x}$  كدالة فى  $z$  ينتج خط مستقيم طبقاً لمعادلة ١٣-١٤. ولكن حيث أننا لانعلم قيمة  $x$ ، فإننا يمكن أن نشيد سلسلة من الرسومات لـ  $v_i/v_0$ ،  $(v_i/v_0)^{1/2}$  و  $(v_i/v_0)^{1/3}$  وهكذا مقابل  $z$  ونقوم بتقديرهم لتعيين قيمة  $x$  التى تعطي أفضل تطابق خطي. وهذا النوع من الرسومات يطلق عليها رسومات تسو Tsou Plots. وهذه الطريقة تعطي قياس جيد لعدد بواقى الأحماض الأمانية المهمة حفزياً التى تحور بواسطة مشبب خاص.

أحد التعقيدات المصاحبة للطريقة السابقة هو أن كل بواقى الأحماض الأمانية ليس من الضروري أن تحور بمعادلات متساوية بواسطة عامل كيميائي محور مفرد. فمن

الشائع في بعض التجارب أن عدد ما من بواقي الأحماض الأمينية غير الأساسية في الحفز تحور أسرع من بواقي الأحماض الأمينية المهمة في عملية الحفز. وتأثير هذه الحالة أن المرحلة الأولى في رسم تسو سوف تظهر بدون انخفاض في النشاط الإنزيمي تليها المنطقة المتوقعة بانخفاض خطي في النشاط مع زيادة قيمة  $z$  (شكل ١٣-١٢). وفي هذه الحالة ما زال من الممكن تقدير عدد بواقي الأحماض الأمينية المهمة في الحفز من جزء الانحدار الخطي للرسم. وشكل ١٣-١٢ هو نتائج التجربة التي أجريت لتعيين عدد مجموعات الكربوكسيلات المطلوبة للنشاط الحفزي لإنزيم الببسين pepsin (Paterson and Knowles (1972). في هذه التجربة تم معاملة الإنزيم بـ  $[^{14}\text{C}]$  trimethyloxonium fluoroborate، وهو كشاف يدخل مجموعة الأسيتايل على مجموعات الكربوكسيلات في البروتين. ومن ثم يدخل الكربون المعلم  $^{14}\text{C}$  في بروتين الإنزيم بعد كل تفاعل. وبمعرفة النشاط الإشعاعي النوعي للكشاف المحور (فصل ١٠)، فإنه يمكن تقدير عدد ذرات  $^{14}\text{C}$  التي تدمج في الإنزيم بعد كل تفاعل.



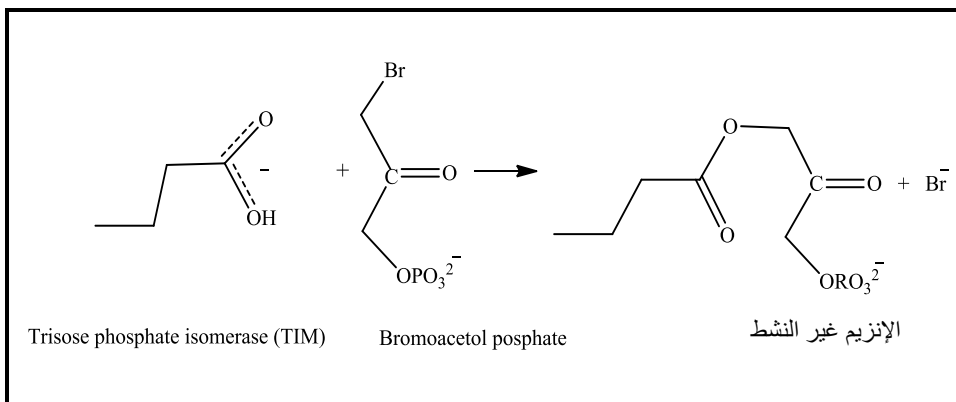
شكل ١٣-١٢ الرسم لـ  $(v_i/v_0)^{1/x}$  كدالة في  $z$  لتحوير مجموعات الكربوكسيلات للببسين بواسطة  $[^{14}\text{C}]$  ثلاثي ميثايل أكسونيم فلوريدات. رسمت البيانات لـ  $x=3$  (□)،  $x=2$  (●)،  $x=1$  (Δ). أدنى  $z=3$ ، فإن تحوير الكربوكسيلات ليس له تأثير على النشاط الإنزيمي. والبيانات أعلى  $z=3$  تتطابق مع المعادلة الخطية لـ  $x=2$ . والتطابق الخطي للبيانات لـ  $x=2$  تقترح أن اثنين من مجموعات الكربوكسيلات تكون مهمة (حاسمة) للنشاط الإنزيمي.

### ١٣-٧-٢ الألفة المميزة للإنزيمات

المجموعات المحورة تساهمياً كثيراً ما تدمج في مناظرات المواد الخاضعة أو متصلات أخرى (العوامل المساعدة، المثبطات، المنشطات وغيرهم) لتوجيه التحوير التساهمي لمواقع وظيفية خاصة على جزئ الإنزيم. ومن ثم فإن هذه الكشافات تكون أكثر تخصصاً للمجموعات في الموقع النشط للإنزيم عن الكشافات المتخصصة للمجموعة التي شرحت في القسم السابق.

كما رأينا في قسم ١٣-٧-١، فإن بعض الكشافات تتفاعل انتقائياً مع سلاسل طرفية خاصة للأحماض الأمينية، وبعض هذه الكشافات الفعالة يمكن أن تدمج كيميائياً في جزيئات المادة الخاضعة. فعلى سبيل المثال فإن المالميدات Malemides وأسترات السكسانيل succinyl esters قد تم إدماجهم في مناظرات المادة الخاضعة أو مناظرات المثبطات لتحوير إنتقائياً بواقي السستين واللايسين في الموقع النشط على التوالي. والمواد الخاضعة الببتيدية لإنزيمات بروتينيز السيرين والسستين يمكن أن يدمج فيها كيتونات وألدهيدات هاليدات الميثايل لتحوير الموقع النشط المحب للشحنة الموجبة لهذه الإنزيمات بصورة خاصة. أيضاً فإن مركب 3-بروموأسيتول فوسفات Bromoacetol phosphate له ألفة مميزة لإنزيم triose phosphate isomerase (TIM) وهذا المركب يحاكي المادة الخاضعة الطبيعية ثنائي هيدروكسي أسيتون فوسفات بالارتباط بالموقع النشط ثم يحور بواسطة الإنزيم بحيث يثبط الإنزيم غير عكسياً (شكل ١٣-١٣).

الألفة المميزة للإنزيمات هي أداة شائعة وفعالة لدراسة تركيب وآلية عمل للإنزيمات. ولقد أستخدمت هذه الأداة في دراسة عديد من الإنزيمات وتوجد عدة مراجع تعرض هذه الطرق، وأحد هذه المراجع هو مجلد خاص من سلسلة طرق علم الإنزيمات Method in Enzymology



شكل ١٣-١٣ بروموأسيتول فوسفات Brmoacetol phosphate، له ألفة مميزة للإنزيم Triose phosphate isomerase (TIM)، بروموأسيتول فوسفات (مناظر للمادة الخاضعة ثنائي هيدروكسي أسيتون فوسفات) يرتبط بالموقع النشط للإنزيم ويحور تساهميا باقي حمض الجلوتاميك المطلوب للنشاط الإنزيمي.

## أسئلة

- ١- كيف تميز عملياً بين التنشيط غير العكسي والتنشيط العكسي للمثبطات المعتمدة على الوقت؟
- ٢- قارن بين آليات التنشيط في مثبطات الألفة المميزة والمثبطات المعتمدة على الآلية؟
- ٣- أذكر اثنين من مثبطات الارتباط البطئ التي تستخدم كعقاقير.
- ٤- وضح كيف يمكن استخدام المثبطات غير العكسية في التعرف على تركيب الإنزيمات.
- ٥- عديد من الإنزيمات تثبط غير عكسياً بواسطة أيونات المعادن الثقيلة، مثل  $Hg^{2+}$  و  $Cu^{2+}$  و  $Ag^{2+}$  التي يمكن أن تتفاعل مع مجموعة السلفهيدريل (-SH)
 
$$E - SH + Ag \longrightarrow E - S - Ag + H^+$$
 وألفة  $Ag^+$  لمجموعة -SH تكون عالية جداً بحيث يمكن استخدامها في معايرة مجموعة -SH كميًا. لـ 10 mL من محلول إنزيم نقي أضيف كمية كافية من  $AgNO_3$  لخمّد الإنزيم بصورة كاملة. وجد أن  $0.342 \mu mol$  من  $AgNO_3$  كانت مطلوبة. أحسب الوزن الجزيئي الأدنى للإنزيم. لماذا أن القيمة المتحصل عليها تعطي الوزن الجزيئي الأدنى للإنزيم.

## الجزء الخامس

### التأثيرات غير الوضعية وتنظيم نشاط الإنزيمات Allosteric Effects and Regulation of Enzymes Activities

|                                               |        |
|-----------------------------------------------|--------|
| التعاونية والتنظيم غير الوضعي لنشاط الإنزيمات | فصل 14 |
| الطرق الأخرى لتنظيم نشاط الإنزيمات            | فصل 15 |

إن نشاط الإنزيمات (والبروتينات الأخرى) في الكائنات كثيراً ما يتم تنظيمها بحيث تؤدي وظائفها في الوقت والمكان المناسبين. فكل كائن يحب أن يكون قادراً على تنظيم النشاط الحفزي لعناصره من الإنزيمات الأساسية للأغراض التالية:

- المحافظة على الحالة المنتظمة للأنسجة بنمط زمني بدون تبديد الموارد.
  - حفظ الطاقة باستهلاك المغذيات بالمقدار الكاف.
  - الاستجابة السريعة للتغيرات البيئية.
  - التنسيق بين مسارات الأيض المختلفة بتوجيه الأيضات إلى المسار المناسب اعتماداً على احتياجات الخلايا.
  - الاستجابة للتغيرات الداخلية في الكائن أثناء النمو وتميز الخلايا.
- وكل هذه العوامل تؤدي إلى الاتزان الجسدي والمحافظة على المغذيات. والنشاط الحفزي للإنزيمات (والبروتينات الأخرى) في الكائنات تنظم بخمسة طرق أساسية:

١- التحكم غير الوضعي (الألوستيري) **Allosteric control**. البروتينات غير الوضعية (الألوستيرية) **allosteric proteins** تحتوي على مواقع تنظيمية **regulatory sites** ومواقع وظيفية **function sites** متعددة. والتنظيم بواسطة جزيئات إشارة صغيرة هو وسائل أساسية في التحكم في نشاط عديد من البروتينات. فارتباط هذه الجزيئات المنظمة **regulatory molecules** عند مواقع مميزة عن المواقع النشطة يحدث تغيرات في البنية الفراغية التي تنتقل إلى الموقع النشط. إضافة إلى ذلك فإن البروتينات غير الوضعية تظهر خاصية التعاونية **cooperatively**: فالنشاط عند أحد المواقع الوظيفية يؤثر على نشاط المواقع الأخرى. والبروتينات التي تظهر التحكم غير الوضعي تكون بذلك محول للمعلومات **information transducers**: فنشاطها

يمكن أن يحور إستجابة لجزيئات إشارة، أو أن المعلومات تشارك بين المواقع النشطة. والإنزيمات غير الوضعية لا تتبع قوانين المعدل القياسية (ميكيلس- منتين) وأكثر مثالين دراسة وفهما للبروتينات غير الوضعية هما إنزيم *aspartate transcarbamoylase* (ATCase) والبروتين الحامل للأكسجين هيموجلوبين *Hemoglobin*. والحفز بواسطة ATCase للخطوة الأولى في التخليق الحيوي للبريميدينات *pyrimidine* يثبط بواسطة سيتيدين ثلاثي الفوسفات CTP وهو الناتج النهائي لمسار التخليق الحيوي هو مثال للتنشيط بالتغذية الخلفية *feedback inhibition*، كما أنه ينشط بواسطة الأدينوزين ثلاثي الفوسفات ATP. وارتباط  $O_2$  بالهيموجلوبين يكون تعاونياً وينظم بواسطة  $H^+$ ,  $CO_2$ .

٢- الصور المتعددة للإنزيمات أو نظائر الإنزيمات *isoenzymes* أو *isozymes* توفر وسيلة للتنظيم لنفس التفاعل عند مواقع مميزة في الكائن أو عند فترات مميزة أثناء تطور الكائن. ونظائر الإنزيمات هي إنزيمات متناظرة (متماثلة) خلال كائن فردي التي تحفز نفس التفاعل ولكنها تختلف قليلاً في تركيبها ولكنها أكثر إختلافاً في قيم الثوابت الحركية  $V_{max}$ ,  $K_m$  بالإضافة إلى خواصها التنظيمية. وعادة ما توجد نظائر الإنزيمات في أنسجة مميزة أو أعضاء أو عند مراحل مميزة أثناء النمو.

٣- التحوير التساهمي العكسي *reversible covalent modification*. الخصائص الحفزية لعديد من الإنزيمات تتغير بصورة واضحة بالارتباط التساهمي مع مجموعة محورة، غالباً ما تكون مجموعة فوسفوريل، و ATP يستخدم كمناح لمجموعة الفوسفوريل في هذه التفاعلات التي تحفز بواسطة إنزيم فسفرة



البروتين **Protein kinase** . وإزالة مجموعة الفوسفوريل من الإنزيم بالتحلل المائي يحفز بواسطة إنزيم إزالة الفوسفات من البروتين **Protein phosphatase**.

٤- التنشيط بالتحلل المائي للبروتين **Proteolytic activation**. أيضاً بعض الإنزيمات تخلق في صور غير نشطة يطلق عليها الإنزيمات الأولية **Proenzymes** أو مولدات الإنزيمات **Zymogens**. ومولدات الإنزيمات تنشط بالتحلل المائي لعدد قليل من الروابط الببتيدية، وأحياناً رابطة ببتيدية واحدة في مولد الإنزيم. هذه الآلية التنظيمية تستخدم في إنتاج إنزيمات الهضم كيميوتريسين **chemotrypsin** تريسين **trypsin**، ببسين **pepsin**. وكاسباسيس **caspases**، وهي إنزيمات التحلل المائي للبروتين المنفذة لموت الخلية المبرمج تنشط بالتحلل البروتيني لـ **Procaspase** . إن تجلط الدم يرجع إلى سلسلة غير عادية من تنشيط مولدات الإنزيمات. والهضم النشط وتجلط الدم يتم غلقهما بالارتباط غير العكسي ببروتينات تنشط خاصة. والأهمية البيولوجية لتخليق الإنزيمات في صورة غير نشطة ثم تنشطها هي (أ) حماية الأنسجة التي تقوم بتخليقها من الهضم الذاتي (ب) التأكد من التحريك السريع لنشاط الإنزيم عند الإحتياج إليه استجابة للإحتياج الفسيولوجي.

٥- التحكم في متاحة الإنزيم **control of enzyme availability**. إن كمية إنزيم ما في خلية ما يعتمد على معدل تخليقه ومعدل تفككه. وكل من هذين المعدلين يحكمان مباشرة بواسطة الخلية ويخضعان لتغيرات مفاجئة من دقائق (البكتريا) إلى ساعات (الكائنات الراقية).

في الفصل التالي (فصل ١٤) سناقش التنظيم غير الوضعي (الألوستيري) في الإنزيمات والبروتينات غير الوضعية مع مقارنة حركات هذه الإنزيمات مع حركات ميكلس- منتين التقليدية مع عرض نموذج لكل من الإنزيمات والبروتينات غير الوضعية. وفي الفصل الأخير (فصل ١٥) سنعرض الطرق الأربعة الأخرى المستخدمة في تنظيم نشاط الإنزيمات.



## التعاونية والتنظيم غير الوضعي لنشاط الإنزيمات

فصل ١٤

### Cooperatively and Allosteric Regulation of Enzyme Activities

|      |                                                    |
|------|----------------------------------------------------|
| ١-١٤ | نماذج السلوك غير الوضعي (الألوستيري)               |
| ٢-١٤ | تأثير التعاونية على منحنيات السرعة                 |
| ٣-١٤ | مثالين للتعاونية والتأثير غير الوضعي في البروتينات |

كما أوضحنا في فصل ٤ فإن بعض الإنزيمات تعمل كمعقدات بروتينية تتألف من عدة وحدات فرعية، والوحدات الفرعية قد تتألف من نفس النسخ أو من نسخ مختلفة من سلاسل عديد الببتيد. في بعض الإنزيمات متعددة الوحدات، فإن كل وحدة فرعية تحتوي على موقع نشط للإرتباط بالمادة الخاضعة والحفز. وفي الحالة البسيطة، فإن المواقع النشطة على الوحدات الفرعية المختلفة تعمل باستقلالية كما لو أنها تعبر عن وحدات حفزية منفصلة. وفي حالات أخرى فإن إرتباط المادة الخاضعة عند موقع نشط في الإنزيم يمكن أن يزيد أو يخفض ألفه المواقع النشطة في الوحدات الفرعية الأخرى في

الإنزيم للإرتباط بالمادة الخاضعة. وعندما تتأثر ألفة الإرتباط بأحد المواقع النشطة في الإنزيم بإشغال موقع نشط آخر بالمادة الخاضعة، فإنه يقال أن المواقع النشطة تعمل بتعاونية *acting cooperatively*. وفي التعاونية الموجبة *positive cooperatively*، فإن إرتباط المادة الخاضعة بأحد المواقع تزيد ألفة المواقع الأخرى للإرتباط بالمادة الخاضعة، وفي التعاونية السلبية *negative cooperatively*، فإن ألفة المواقع الأخرى تنخفض بإرتباط الموقع الأول بالمادة الخاضعة المتصلة.

ولحدوث التأثير التعاوني المتبادل بين موقعين نشطين منفصلين بمسافة ما (أى يوجدان على وحدتين فرعيتين من المعقد الإنزيمي)، فإن إرتباط أحد المتصلات عند أحد المواقع يجب أن يحدث تغير تركيبى في البروتيني المحيط الذي ينتقل خلال سلسلة عديد الببتيد، إلى الموقع (أو المواقع) البعيدة. وفكرة نقل التغيرات التركيبية في البروتين الذي ينتج عنها اتصال خلال مسافة بعيدة يطلق عليها غير الوضعي "Allostery"، والإنزيمات التي تظهر هذا التأثير تعرف بالإنزيمات غير الوضعية (الإنزيمات الألوسثيرية) *allosteric enzymes* (كلمة *allosteric* مشتقة من الكلمتين اليونانيتين - *allos* تعني الآخر *the other* و *stereos* التي تعني الموضع *object*) التي إبتكرت للتأكيد على أن التغيرات التركيبية خلال البروتين تحدث بواسطة التأثيرات التعاونية المتبادلة فيما بين المواقع المختلفة. ويوجد نوعين من التأثير غير الوضعي:

١- التأثير غير الوضعي يمكن أن يحدث بين مواقع الإرتباط المفصولة لنفس المادة الخاضعة خلال الإنزيم كما سبق توضيحه. وهذه يطلق عليها المؤثر المتجانس التعاوني *homotropic cooperativity*.

٢- أيضاً فإن ارتباط المادة الخاضعة بالموقع النشط للإنزيم يمكن أن يتأثر بإرتباط متصلة مختلفة تركيبياً بموقع منفصل بعيد، وهذا التأثير يعرف بالمؤثر غير المتجانس التعاوني *hetertrophic cooperativity*، ومن ثم فإن جزيئات صغيرة (مختلفة تركيبياً عن المادة الخاضعة) يمكن أن ترتبط بمواقع خلاف الموقع النشط للإنزيم، ونتيجة لإرتباطها فإنها تحدث تغير في البنية الفراغية للإنزيم الذي ينظم

ألفة الموقع النشط لمادته الخاضعة. ومثل هذه الجزيئات يطلق عليها المؤثرات غير الوضعية allosteric effectors ويمكن لها أن تعمل على تعزيز ألفة الموقع النشط للمادة الخاضعة (بمعنى أنها تعمل كمنشطات غير وضعية allosteric activators). أو تخفض الألفة للمادة الخاضعة (أي تعمل كخامدات غير وضعية allosteric repressors). إن الفصل بين المؤثرات غير الوضعية allosteric effectors والتعاونية cooperativity يكمن في الجزئ الذي يقوم بالتأثير. فإذا كان الجزئ المؤثر يعمل على موقع آخر والمؤثر ليس المادة الخاضعة، فإن التأثير يعتبر غير وضعي allosteric ويكون غير متجانس heterotropic. وإذا كان الجزئ المؤثر هو المادة الخاضعة بذاتها، فإن التأثير يطلق عليه تعاوني و/أو متجانس homotropic.

#### التعاونية والتأثير غير الوضعي Cooperativity and Allosterism

التعاونية والتأثير غير الوضعي قد جمعا مع بعضهما لإشتراكهما في التغيرات التركيبية المطلوبة لكلاهما. إن جوهر كلا التأثيرين هو أن أحداث الارتباط (والحفز) عند أحد المواقع النشطة يمكن أن يؤثر على أحداث الارتباط (والحفز) في موقع نشط آخر في البروتينات متعددة الوحدات.

**التعاونية:** تشاهد عندما يؤدي تفاعل أحد جزيئات المادة الخاضعة مع البروتين إلى التأثير على تفاعل جزئ آخر من المادة الخاضعة مع موقع نشط آخر في البروتين.

**تعاونية موجبة:** ارتباط المادة الخاضعة الأولى يؤدي إلى زيادة ارتباط المادة الخاضعة التالية.

**تعاونية سالبة:** ارتباط المادة الخاضعة الأولى يؤدي إلى انخفاض ارتباط المادة الخاضعة التالية.

**التأثير غير الوضعي:** يشاهد عندما يؤدي ارتباط جزئ صغير (مختلف تركيبياً عن المادة الخاضعة) على موقع خاص في الإنزيم خلاف الموقع النشط إلى تنظيم ألفة الموقع النشط لمادته الخاضعة.

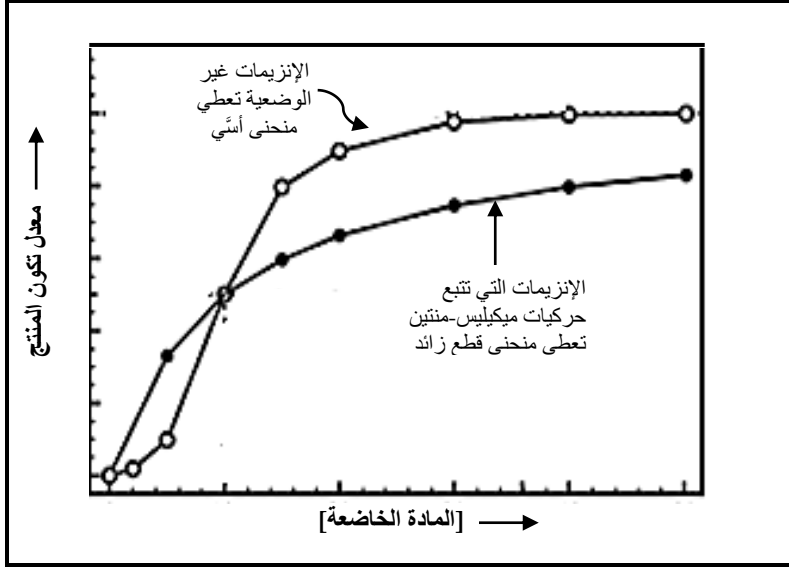
**المنشطات غير الوضعية:** يؤدي ارتباطهما بالإنزيم إلى تعزيز ألفة الموقع النشط لمادته الخاضعة.

**الخامدات غير الوضعية:** يؤدي ارتباطها بالإنزيم إلى خفض ألفة الموقع النشط لمادته الخاضعة.

وكلا نوعي المؤثرات غير الوضعية يوجدان في الأنظمة البيولوجية ويشكلان أساس لآلية تنظيم الأيض. وآليات التحكم هذه تؤدي أدوار أفضية أساسية. فعلى سبيل المثال فإن عديد من الإنزيمات المشتملة في سلاسل التخليق الحيوي للمركبات تظهر ظاهرة التثبيط بالتغذية الخلفية. وهنا فإن جزئ الناتج النهائي أو قبل الناتج للسلسلة سوف يعمل كمثبط لأحد الإنزيمات التي توجد مبكراً في بداية المسار.

من الناحية النظرية، فإن الإنزيمات أحادية الوحدة يمكن أن تخضع للتأثير غير الوضعي إستجابة للمؤثرات غير الوضعية. في هذه الحالة فإن الإنزيم يحتوي على موضعين منفصلين أحدهما لإرتباط المادة الخاضعة والآخر لإرتباط المؤثر غير الوضعي. وإرتباط المؤثر غير الوضعي بموقعه، فإنه يحدث تغير في البنية الفراغية للإنزيم الذي يؤدي إلى زيادة أو خفض ألفة الإنزيم للمادة الخاضعة. لكن من الناحية العملية فإنه معروف فقط إنزيمين غير وضعيين أحادية الوحدة هما: ribonucleotide diphosphate reductase و pyruvate-UDP-N و acetylglucoseamine transferase، لكن معظم الإنزيمات غير الوضعية تكون وحدتين أو أكثر. والإنزيمات غير الوضعية والإنزيمات التعاونية تظهر حركات أسية sigmoidal kinetics لأن اعتماد السرعة الابتدائية على تركيز المادة الخاضعة يعطي منحنى أسّي sigmoidal curve (شكل ١٤-١) وليس منحنى ميكيلس-منتين.

في هذا الفصل سوف نصف الأساس النظري للتعاونية والتأثير غير الوضعي والنماذج التي تستخدم في تفسير السلوك غير الوضعي، ثم عرض مثال لكل من التعاونية والتأثير غير الوضعي (الألوستيري).

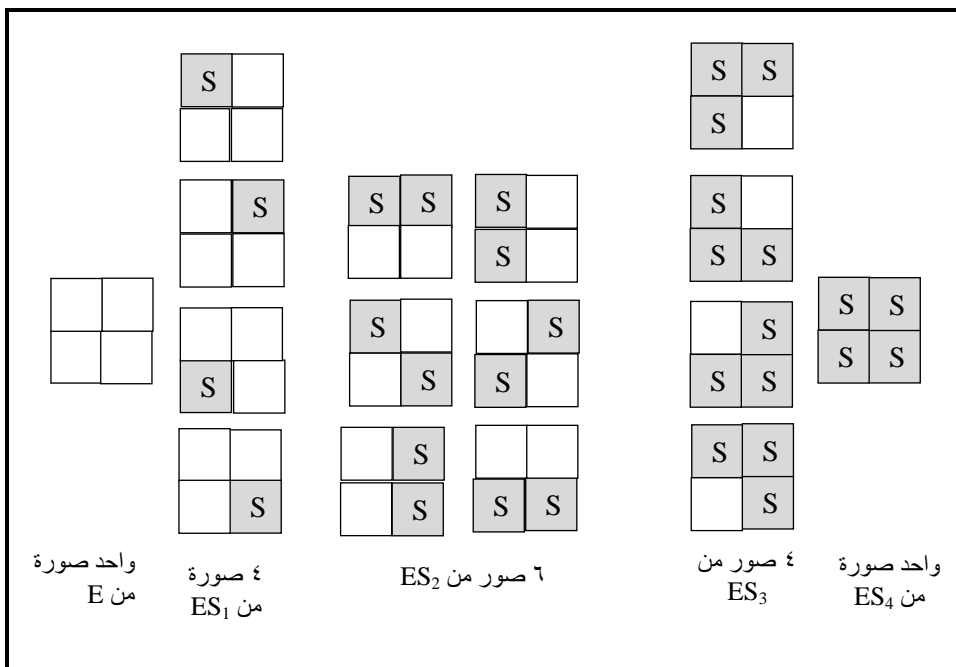


شكل ١٤-١ الإنزيمات غير الوضعية تظهر حركات أسية sigmoidal kinetics. فرسم معادل تكوين المنتج (السرعة) مقابل تركيز المادة الخاضعة يعطي منحنى أسّي (o) مقارنة بمنحنى القطع الزائد لحركات ميكيليس-منتين (•).

#### ١٤-١ نماذج السلوك غير الوضعي (الالوستيري)

عندما يحتوي الإنزيم متعدد الوحدات الفرعية على مراكز ارتباط التي تكون متماثلة في سلوكها (أي تظهر نفس  $K_m$  و  $k_{cat}$  للمادة الخاضعة) وتكون مستقلة، فإن معادلة السرعة تكون مماثلة للإنزيم الذي يحتوي على موقع نشط فردي. وفي هذه الحالة فإن قيم  $k_{cat}$  أو  $V_{max}$  يمكن قسمتها على عدد الوحدات للحصول على رقم التحول الحقيقي لكل وحدة فرعية. وسواء كان يوجد تأثير متبادل بين المواقع النشطة أم لا، فإن الإنزيمات متعددة الوحدات الفرعية سوف تحتوي على توزيع مختلف لأشغال المواد الخاضعة بين الوحدات الفرعية المختلفة عند مستويات مختلفة من التشبع بالمادة الخاضعة. مثال ذلك فإنه توجد ستة احتمالات من التنظيمات (الإتحادات) لشغل الوحدات الفرعية بمادتين خاضعتين للإنزيم الذي يحتوي على أربع وحدات فرعية. وهذا موضح في شكل ١٤-٢ كمثال لإنزيم يتألف من أربع وحدات فرعية.





شكل ١٤-٢ مخطط توضيحي لعدد الصور المحتملة لإرتباط المادة الخاضعة بإنزيم يحتوي على أربع وحدات فرعية متماثلة: المربعات الحرة، تمثل الوحدات الفرعية التي تكون فيها مواقع الارتباط غير مشغولة؛ والمربعات المظلمة مع S تمثل الوحدات الفرعية التي تكون فيها جزيئات المادة الخاضعة مرتبطة بالموقع النشط.

عندما يحدث تأثير غير وضعي بين مواقع ارتباط المتصلة في الإنزيم متعدد الوحدات الفرعية، فإننا نحتاج إلى تعديل معادلات الحركية لتأخذ في الاعتبار هذا التأثير. ولقد وضع نموذجين نظريتين لتفسير الألوسثيرية في الإنزيمات والبروتينات الأخرى وهما:

١- نموذج الانتقال المتوافق أو المتماثل concerted transition or symmetry model

٢- نموذج التأثير المتبادل المتعاقب البسيط Simple sequential interaction model.

#### ١٤-١-١ نموذج الإنتقال المتوافق أو المتماثل

وضع هذا النموذج كل من Changeues, Wyman, Monod (عام 1965) لذلك يطلق عليه أيضاً نموذج MWC. ولقد طبق كثيراً على البروتينات مثل الهيموجلوبين لتفسير الإرتباط التعاوني للمتصلة. وهذا النموذج يفترض:

- الإنزيمات غير الوضعية (الألوستيرية) تكون متعددة الوحدات تؤلف من وحدات أدنى (وحدات فرعية subunit أو أجزاء بدائية Protomers) تنظم بنمط متماثل بالنسبة لبعضها البعض وكل وحدة فرعية تحتوي على موقع ارتباط فردي للمتصلة (المادة الخاضعة).
- الإنزيم متعدد الوحدات الكلي يمكن أن يوجد فقط في حالتين من البنيات الفراغية Conformation state الذي يعكس إما تغير التركيب الرباعي أو التركيب الثلاثي خلال كل وحدة فرعية. وهاتين البنيتين الفراغيتين يكونين في حالة اتزان، ولكي يحدث ذلك فإن الوحدات الفرعية يجب أن يتغيران معاً، فلا توجد وحدات متعددة لها بناء فراغي مختلط (أى لا توجد بعض الوحدات الفرعية في بنية فراغية ما والبعض الآخر في بنية فراغية أخرى).
- إن ألفة متصلة (المادة الخاضعة أو غيرها) للإرتباط بموقع نشط لأحد الوحدات يعتمد على حالة البنية الفراغية لتلك الوحدة. وبكلمات أخرى فإن المتصلة تحت الإعتبار سوف ترتبط بأفضلية لأحدي البنيتين الفراغيتين للوحدات الفرعية. ومن ثم فإن ارتباط المتصلة على أحد مواقع الإرتباط سوف يغير الإلتزان بين حالتين البنية الفراغية في اتجاه البناء الذي له ألفة عالية للإرتباط بالمتصلة (المادة الخاضعة). ومن ثم فإن نموذج MWC يشرح التعاونية الموجبة القوية حيث أن إرتباط المتصلة بأحد المواقع سوف يجعل بقية المواقع في البروتين متعدد الوحدات أن تتحول إلى البنية الفراغية التي لها ألفة عالية للمتصلة.

في نموذج MWC إفتراض أن حالة البنية الفراغية التي لها ألفة منخفضة تكون تركيب مشدودة T (من tense أى مشدودة)، والبنية الفراغية التي لها ألفة عالية للمتصلة يشار إليها بالحالة المسترخاة R (من relaxed، أى مسترخاة). وتوجد حالة اتزان بين الحالة T والحالة R. وعملية الانتقال بين الحالتين تكون متوافقة concerted أو متماثلة symmetry. وبغرض التعبير البياني لنموذج MWC، فإننا نرمز للحالات المشغولة بالمتصلة للبنيتين الفراغيتين بـ  $T_x$ ,  $R_x$ ، حيث x تشير إلى عدد المتصلة المرتبطة. لذلك فإن الإنزيم رباعي الوحدات يمكن من ناحية المبدأ أن يوجد في الحالات  $R_0$  إلى  $R_4$  و  $T_0$  إلى  $T_4$ . وبذلك فإنه عند أى لحظة يوجد مخلوط من هاتين الحالتين. وفي غياب المتصلة حيث يشار إلى الحالتين غير المرتبطتين (الخاليتين) من البنيات الفراغية بـ  $T_0$ ,  $R_0$ ، فإن ثابت الاتزان بين الحالتين غير المرتبطتين (الحالتين) يطلق عليه الثابت الألوسثيري (الثابت غير الوضعي) allosteric constant الذي يشار إليه بـ L:

$$L = \frac{[T_0]}{[R_0]} \quad \text{و} \quad T_0 \xrightleftharpoons{L} R_0 \quad (1-14)$$

ويفترض أن  $[T_0]$  أكبر بكثير من  $[R_0]$ ، بمعنى أنه في غياب الإرتباط فإن معظم الجزيئات تكون في حالة  $T_0$ ، والفكرة الأساسية أن إرتباط المتصلة (المادة الخاضعة أو المؤثر الألوسثيري) سوف تحول الاتزان في اتجاه الحالة R التي لها ألفة عالية للإرتباط، وهذا يمدنا بآلية بسيطة للتعاونية الموجبة. فإضافة المتصلة إلى النظام يزيد نسبة المواقع غير المشغولة في البنية الفراغية R التي سوف ترتبط بألفة عالية. وسوف نفترض أن الصورتين T, R للجزئ يحتوي كل منهما على عدد n من مواقع الإرتباط المتماثلة. وسوف نرمز إلى ثابت الإتران لإرتباط المتصلة (S) بالوحدات الفرعية R, T بـ  $K_{ST}$  و  $K_{SR}$  على التوالي والنسبة  $K_{SR}/K_{ST}$  يشار إليها بمعامل الإرتباط غير الإقصائي ويرمز له بـ c، وكل من c, L يؤثران على درجة التعاونية التي يظهرها الإنزيم. فزيادة L، فإن منحنى السرعة يظهر خواص أسية أكبر، لأن الاتزان  $T_0 - R_0$  يكون في جانب

الحالة  $T_0$  أكثر، وازيادة  $c$  فإن ألفة الحالة  $T$  للمتصلة يزيد بالنسبة للحالة  $R$ . ومن ثم فإن التعاونية العالية ترتبط بالقيمة الصغيرة لـ  $c$ . وشكل ١٤-٣ هو مخطط بياني يعبر عن الاتزانات لهذا النظام لإنزيم رباعي الوحدات الفرعية.

أبسط الأمثلة لنموذج MWC هو الإنزيم ثنائي الوحدات الفرعية الذي يفترض فيه أن الحالة  $T$  ليس لها أى ألفة مطلقاً للمادة الخاضعة (أى  $c = 0$ ). وشكل ١٤-٤ هو مخطط بياني للتعبير عن الاتزانات لهذا النظام، حيث ترتبط المادة الخاضعة فقط بالحالة  $R$  للإنزيم ثنائي الوحدات.

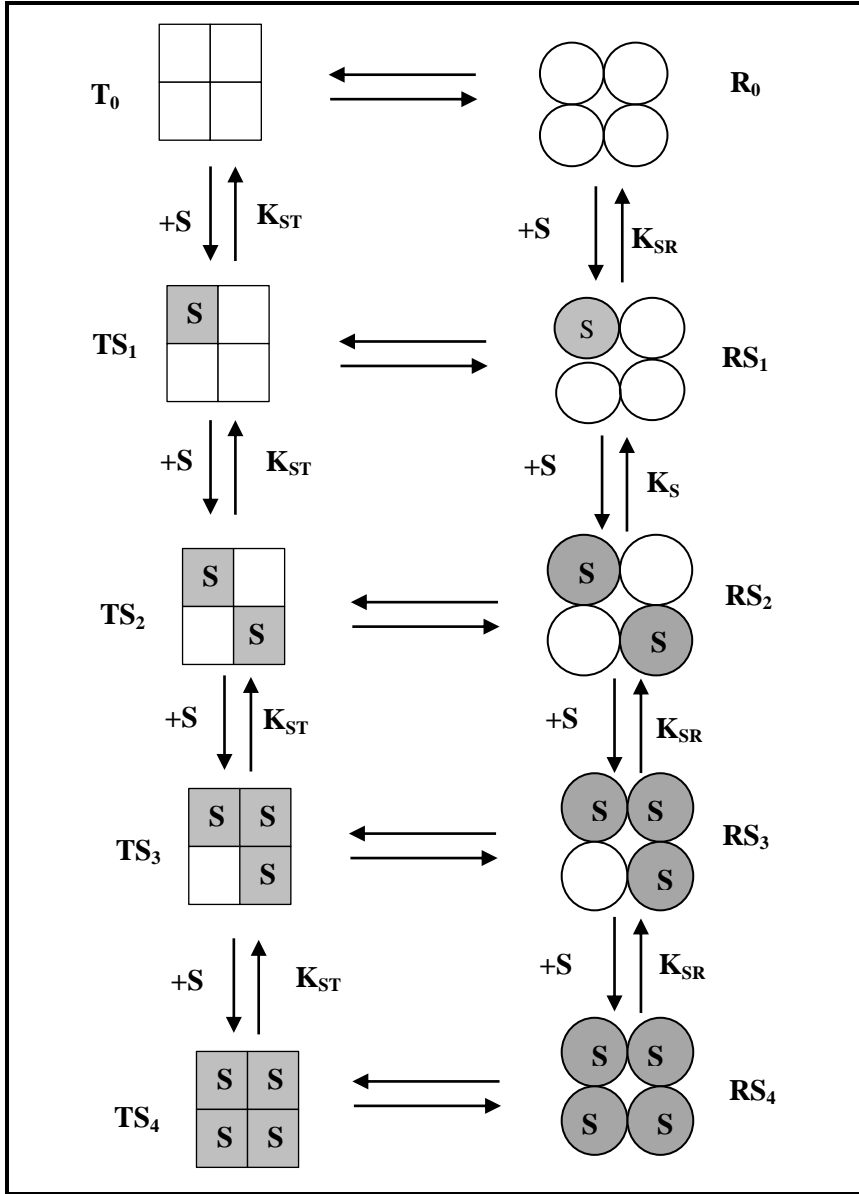
وحيث أن الحالة  $R$  فقط لها ثابت تفكك غير مطلق للمادة الخاضعة، فإننا يمكن إستخدام الرمز  $K_s$  بدلاً من  $K_{SR}$  لهذا النظام ومعادلة السرعة لهذا النظام التي يمكن إستقاقهما من افتراضات الاتزان السريع تنتج صورة المعادلة التالية:

$$v = \frac{V_{\max} \frac{[S]}{K_s} \left( 1 + \frac{[S]}{K_s} \right)}{L + \left( 1 + \frac{[S]}{K_s} \right)^2} \quad (١٤-٢)$$

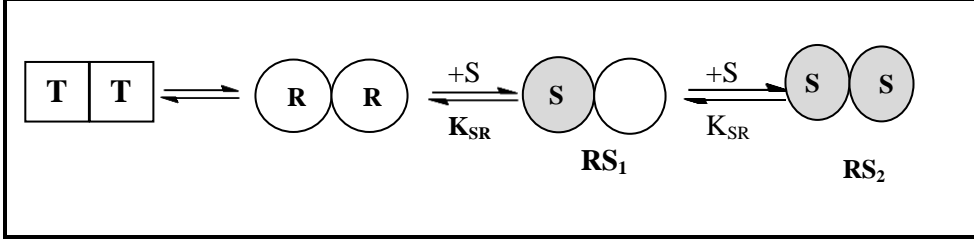
وفي الإنزيمات التي تتألف من أكثر من وحدتين فرعيتين فإن الصورة العامة لمعادلة ١٤-٢ يمكن إستقاقها وهى كالتالى:

$$v = \frac{V_{\max} \frac{[S]}{K_s} \left( 1 + \frac{[S]}{K_s} \right)^{h-1}}{L + \left( 1 + \frac{[S]}{K_s} \right)^h} \quad (١٤-٣)$$

حيث  $h$  هى العدد الكلي لمواقع إرتباط المادة الخاضعة على الإنزيم متعدد الوحدات الفرعية.



شكل ١٤-٣ مخطط تعبير عن الاتزانات المشتملة في ارتباط المواد الخاضعة لإنزيم رباعي الوحدات اعتماداً على نموذج MWC.



شكل ١٤-٤ مخطط بياني للإنتزانة المشتتة في ارتباط المواد الخاضعة لإنزيم ثنائي الوحدات الفرعية على أساس نموذج MWC الذي فيه ترتبط المادة الخاضعة فقط بالحالة R.

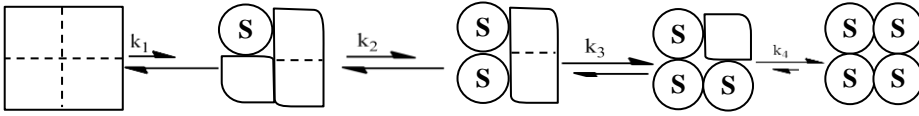
إن نموذج MWC يعطي هيكل مفيد لفهم التعاونية المتجانسة الموجبة. ويمكن تعديله لمعالجة التعاونية غير المتجانسة مع ذلك فإن هذا النموذج لا يمكن أن يفسر ظاهرة التعاونية غير المتجانسة السالبة. وعندما توجد ظاهرة التعاونية غير المتجانسة السالبة، فإنه يمكن تفسيرها باستخدام نموذج التأثير المتعاقب البسيط لكوشلاندر.

والتعاونية المتجانسة الموجبة (أو التنشيط غير الوضعي، أو التعديل غير الوضعي الموجب) يحدث عندما يؤدي ارتباط أحد المتصلات إلى تعزيز (زيادة) التجاذب بين جزيئات المادة الخاضعة ومواقع الارتباط الأخرى. أحد الأمثلة هو ارتباط جزيئات الأكسجين بالهيموجلوبين، حيث يمثل الأكسجين كل من المادة الخاضعة والمؤثر. والمواقع غير الوضعية (المواقع الأخرى) هي المواقع النشطة في الوحدات الفرعية المجاورة في البروتين. فارتباط الأكسجين لأحد الوحدات الفرعية يحدث تغيير في البنية الفراغية في هذه الوحدة الفرعية التي تؤثر على المواقع النشطة الأخرى وتزيد ألفتها للأكسجين.

#### ١٤-٢ نموذج التأثير المتعاقب البسيط

في النموذج المتوافق (المتماثل) أو نموذج MWC. فإن كل الوحدات الفرعية في الإنزيم غير الوضعي يمكن أن توجد فقط في واحد من الحالتين T, R ولا توجد الحالة المختلطة التي يكون فيها بعض الوحدات T والبعض الآخر R. من ناحية أخرى فإن نموذج التأثير المتعاقب البسيط simple sequential model (الذي اقترح أولاً بواسطة

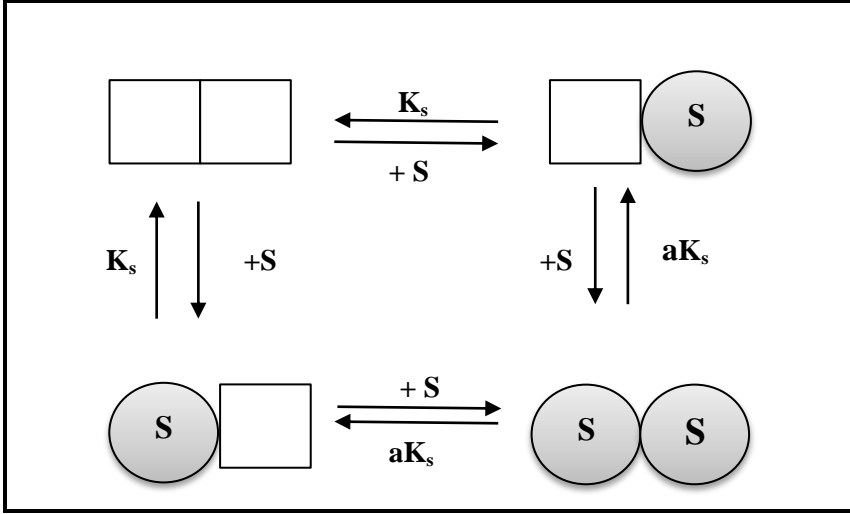
كوشلاند (Koshland) يفترض حدوث تغيرات متعاقبة في التركيب خلال الإنزيم عديد الوحدات بإشغال المواقع النشطة. فارتباط المادة الخاضعة لأحد المواقع تؤثر على ألفة المادة الخاضعة للمواقع المجاورة بدون الإضرار لإحداث تغير يشمل كل الوحدات (شكل ١٤-٥).



شكل ١٤-٥ نموذج التأثير المتعاقب البسيط لإنزيم رباعي الوحدات. إن ارتباط المتصلة (المادة الخاضعة) (S) لوحدة فرعية تغير البنية الفراغية لهذه الوحدة الفرعية من الحالة T (المربع) إلى الحالة R (الدائرة). وهذا الانتقال يؤثر على ألفة الوحدات الفرعية الأخرى بنمط تعاقبي.

دعنا نأخذ في الاعتبار أبسط الإنزيمات الألوسثيرية الذي يحتوي على موقعين لارتباط المادة الخاضعة الذي يظهر تعاونية موجبة. إن الاتزان المشتملة في ارتباط المادة الخاضعة وثابت اتزان الارتباط موضحة بيانياً في شكل ١٤-٦. إن ثابت التفكك لجزئ المادة الخاضعة الأولى يعطي بـ  $K_s$ . وعندما يصبح أحد المواقع مشغول بالمادة الخاضعة، فإن ثابت التفكك للموقع الثاني سوف يعدل بالعامل  $a$  الذي تكون قيمته أقل من واحد في حالة التعاونية الموجبة. ومعادلة السرعة الكلية لهذا الإنزيم تعطي كالتالي:

$$v = \frac{V_{\max} \left( \frac{[S]}{K_s} + \frac{[S]^2}{aK_s^2} \right)}{1 + \frac{2[S]}{K_s} + \frac{[S]^2}{aK_s^2}} \quad (١٤-٤)$$



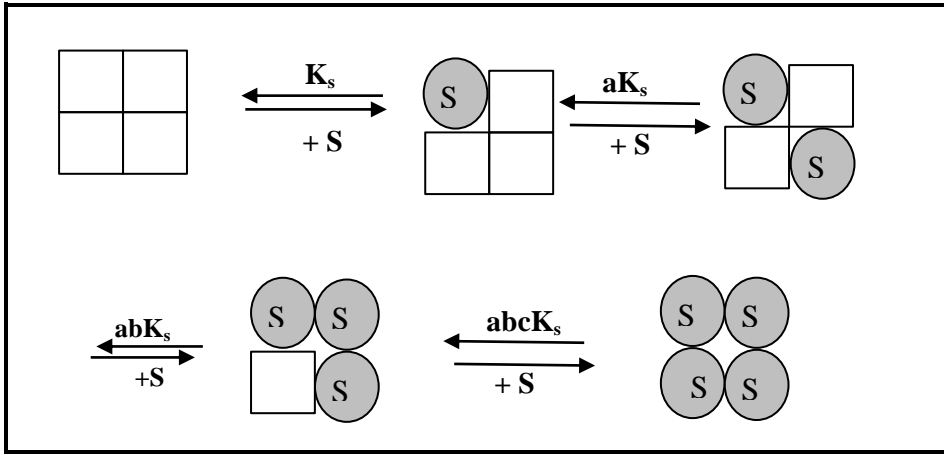
شكل ١٤-٦ مخطط بياني يعبر عن الاتزانات المشتملة في ارتباط المادة الخاضعة لإنزيم ثنائي الوحدات متجانس حيث يصاحب ارتباط المادة الخاضعة انتقال للبنية الفراغية للوحدة الفرعية التي ترتبط بها اعتماداً على نموذج كوشلاند وآخرون.

دعنا الآن نمد هذا النموذج لإنزيم رباعي الوحدات (شكل ١٤-٧). في هذه الحالة فإن ارتباط جزئ المادة الخاضعة الأولى سوف يحور ثابت التفكك لمواقع الارتباط الثلاثة الأخرى بالعامل  $a$ . وإذا ارتبط الآن جزئ ثاني من المادة الخاضعة فإن موقعي الارتباط غير المشغولتين سوف يحور ثابتي التفكك لهما بعامل إضافي  $b$ ، وسوف يكون ثابت التفكك لهما  $abK_s$ . وعند ارتباط الجزئ الثالث من المادة الخاضعة، فإن الموقع النشط الأخير غير المشغول سوف يحور إضافياً بالعامل  $c$ ، وسيكون ثابت التفكك  $abcK_s$ ، وبالأخذ في الاعتبار كل هذه العوامل في شكل ١٤-٧ فإننا يمكن أن نكتب السرعة الكلية للتفاعل الإنزيمي كالتالي:

$$v = \frac{V_{\max} \left( \frac{[S]}{K_s} + \frac{3[S]^2}{aK_s^2} + \frac{3[S]^3}{a^2bK_s^3} + \frac{[S]^4}{a^3b^2cK_s^4} \right)}{1 + \frac{4[S]}{K_s} + \frac{6[S]^2}{aK_s^2} + \frac{4[S]^3}{a^2bK_s^3} + \frac{[S]^4}{a^3b^2cK_s^4}} \quad (١٤-٥)$$



ومعادلة ٥-١٤ هي معادلة السرعة التي يمكن أن تفسّر التعاونية المتجانسة الموجبة أو السالبة اعتماداً على القيم العددية للعوامل  $a$ ,  $b$ ,  $c$ . وفي هذا النموذج فإن كل حادثة ارتباط يرافقها إعاد تكيف (تنظيم) للبنية الفراغية للإنزيم. مع ذلك حيث أن التأثيرات تكون مضافة ومتصاعدة، فإنه بمجرد ارتباط أحد جزيئات المادة الخاضعة، فإن الخطوات التالية تكون مواتية (إيجابية) وبقوة.



شكل ١٤-٧ مد تطبيق نموذج كوشلاند من شكل ١٤-٦ لإنزيم رباعي الوحدات الفرعية.

### ٣-١٤ تأثير التعاونية على منحنيات السرعة

بالرجوع إلى نموذج التأثير المتبادل المتعاقب البسيط (كوشلاند) فإننا يمكن أن نقرر أنه إذا كانت التعاونية كبيرة، فإن تركيز الأنواع على الأقل لأحد مواقع ارتباط المادة الخاضعة غير المشبعة سوف يكون صغيراً جداً عند أي تركيز من المادة الخاضعة أكبر من  $K_s$ . وفي حالة الإنزيمات رباعية الوحدات الفرعية على سبيل المثال، فإنه تحت هذه الظروف تختزل معادلة ٥-١٤ إلى معادلة أكثر بساطة:

$$v = \frac{V_{\max}[S]^4}{K'[S]^4} \quad (١٤-٦)$$

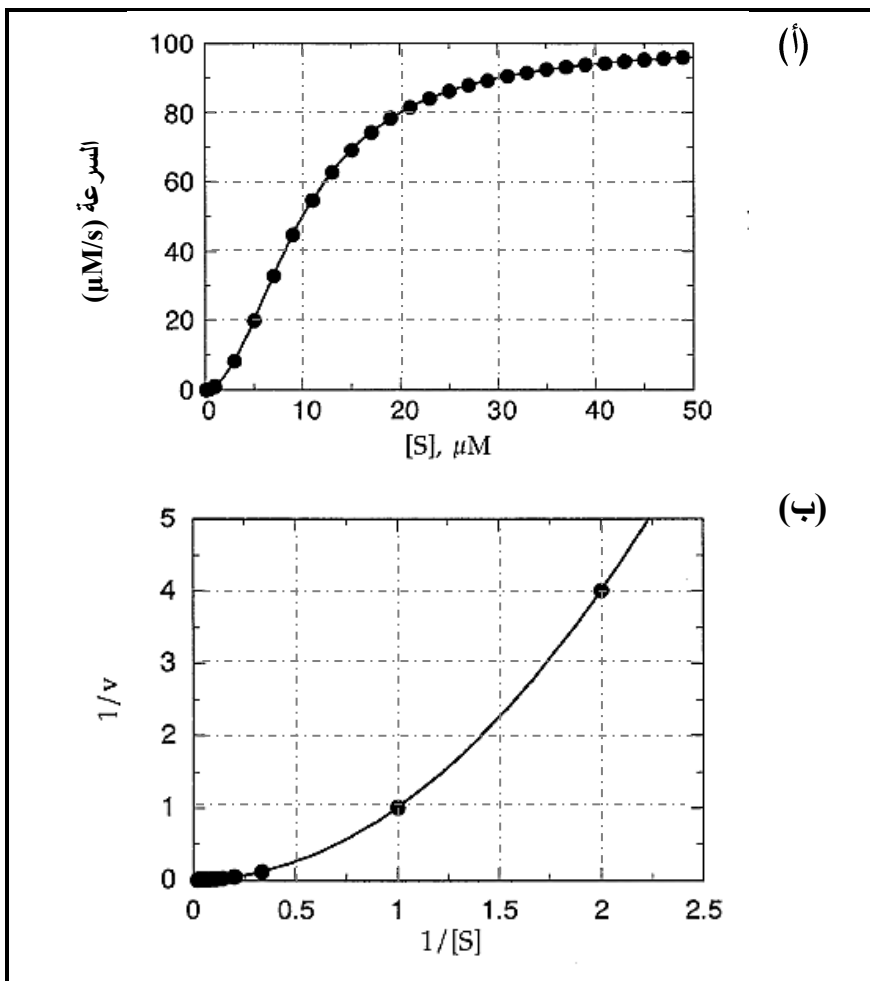
حيث  $K' = a^3 b^2 c K_s^4$ . ومعادلة ١٤-٦ هى حالة خاصة (أى للإنزيمات رباعية الواحدات الفرعية) للمعادلة البسيطة الأكثر عمومية:

$$v = \frac{V_{\max}[S]^h}{K'[S]^h} \quad (٧-١٤)$$

حيث  $h$  تعبر عن العدد الكلي لمواقع ارتباط المادة الخاضعة في جزئ الإنزيم متعدد الوحدات الفرعية و  $K'$  ثابت الذي يربط عوامل التأثير المتبادل الفردية  $a$  إلى  $h$  وثابت التفكك الحقيقي  $K_s$ . لاحظ أنه في غياب التعاونية وعندما تكون  $h = 1$ . فإن معادلة ٧-١٤ تختزل إلى معادلة تماثل معادلة ميكليس-منتين (معادلة ٦-٢٥). مع ذلك فإنه عندما توجد التعاونية، فإن الثابت  $K'$  لم يعد يربط تركيز المادة الخاضعة المطلوبة للوصول إلى نصف السرعة القصوى.

معادلة ٧-١٤ تعرف بمعادلة هيل Hill equation والمعامل  $h$  يطلق عليه ثابت هيل Hill constant. والصورة البسيطة لهذه المعادلة يمكن أن تستخدم للتطابق مع البيانات التجريبية لمنحنى سرعة الإنزيم. وشكل ١٤-٨ يوضح كيف تؤثر التعاونية الموجبة على الرسوم البيانية لميكليس-منتين ولينوفير-بورك للتفاعل الإنزيمي. حيث بدلاً من منحنى القطع الزائد الذي يشاهد في حالة ميكليس-منتين. فإنه يظهر منحنى أسّي sigmoidal curve للسرعة كدالة في تركيز المادة الخاضعة. يمكن تحويل معادلة هيل (معادلة ٧-١٤) إلى صورة خطية بأخذ اللوغاريتم لكل طرفي المعادلة ثم إعادة الترتيب لتنتج المعادلة التالية:

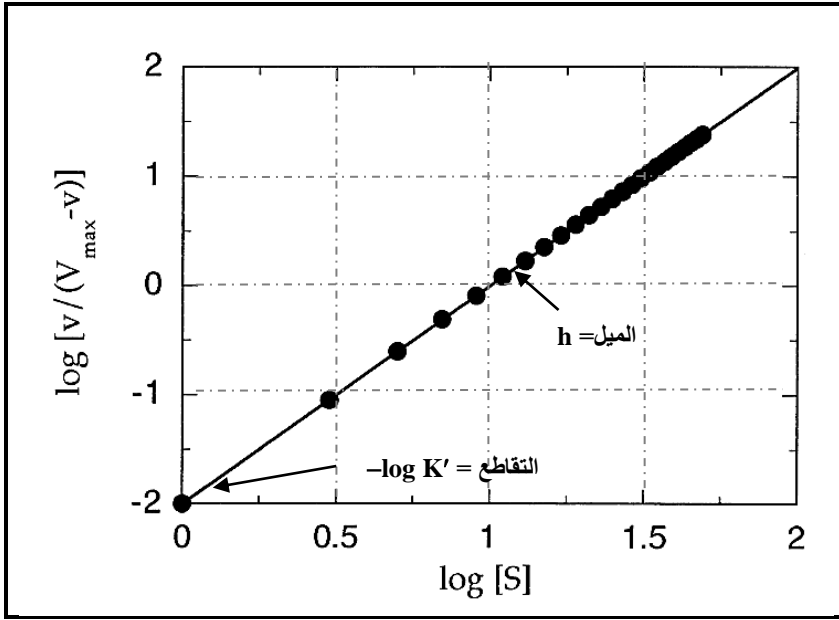
$$\log \left( \frac{v}{V_{\max} - v} \right) = h \log[S] - \log(K') \quad (٨-١٤)$$



شكل ٨-١٤ تأثير التعاونية الموجبة على حركيات التفاعل المحفز إنزيمياً (أ) البيانات تم رسمها على أساس ميكليس-منتين (أي  $v$  مقابل  $[S]$  في معادلة ٨-١٤) (ب) إعادة رسم البيانات في صورة المقلوب المزدوج (لينوفير-بورك  $1/v$  مقابل  $1/[S]$ )

ويمكن استخدام هذه المعادلة لتشييد رسم بياني خطي الذي يمكن منه تقدير قيم  $K'$  و  $h$  من الميل والتقاطع على التوالي. وأحد الأمثلة لرسم هيل الخطي معروض في شكل ٨-٩. وبالرغم من صورة معادلة ٨-١٤، فإن الرسم البياني التجريبي عادة ما ينحرف عن الخطية في منطقة التركيز المنخفض للمادة الخاضعة حيث أن الأنواع المرتبطة بجزيئات المادة التي تكون أقل من  $h$  يمكن أن تشارك في السرعة الإجمالية. ونموذجياً

فإن البيانات تتوافق مع الدالة الخطية بين قيم  $[S]$  التي تنتج 10-90% تشبع (أى من 10-90% من  $V_{max}$ ). وميل أفضل تطابق للخط بين هذه الحدود من الشائع أن يؤخذ كقيمة متوسطة لـ  $h$  (التي أحياناً تعطي الرمز  $h_H$ ). مع ذلك فإن استخدام مثل هذه الرسومات تحتاج إلى معرفة مسبقة لـ  $V_{max}$ . لذلك، فإنه إذا أمكن يكون من المفضل تقدير  $V_{max}$ ،  $h$ ، و  $K'$  للإنزيمات موجبة التعاونية باستخدام المنحنى غير الخطي الذي يتطابق مع معادلة ١٤-٧.



شكل ١٤-٩ الرسم البياني لهيل البيانات من شكل ١٤-٨ : يرسم  $\log [v/(V_{max} - v)]$  كدالة في  $\log [S]$ . ميل الخط لأفضل تطابق يعطي تقدير لمعامل هيل  $h$  والتقاطع مع المحور  $y$  يعطي تقدير لـ  $-\log (K')$ .

إن درجة السيسية (الأسية) degree of sigmoidicity في رسم السرعة المباشرة (معادلة ١٤-٧) هو مقياس لقوة التعاونية بين المواقع في الإنزيم متعدد الوحدات الفرعية. وأفضل قياس لها هو أخذ نسبة تركيز المادة الخاضعة المطلوبة للوصول إلى سرعتين اللذان يعبران عن أجزاء (كسور) مختلفة من  $V_{max}$ . ومن الشائع إجراء ذلك باستخدام تراكيزات

للمادة الخاضعة التي عندها  $v = 0.9 V_{\max}$  التي تعرف بـ  $[S]_{0.9}$  والأخرى عند  $v = 0.1$   $V_{\max}$  التي تعرف بـ  $[S]_{0.1}$ . والنسبة  $[S]_{0.9}/[S]_{0.1}$  التي يشار إليها بمؤشر (دليل) التعاونية cooperatively index هي مقياس عكسي للتأثيرات التعاونية؛ وبكلمات أخرى فإنه كلما كان تركيز المادة الخاضعة المطلوب لإمتداد المدى من  $v = 0.1 V_{\max}$  إلى  $v = 0.9 V_{\max}$  كبيراً كلما كانت قيمة  $[S]_{0.9}/[S]_{0.1}$  كبيرة وتكون درجة التعاونية بين المواقع ضعيفة.

إن قيمة مؤشر التعاونية يرتبط بمعامل هيل  $h$  و  $K'$  كالتالي:

● عند  $v = 0.9 V_{\max}$

$$v = 0.9 V_{\max} = \frac{V_{\max}[S]_{0.9}^h}{K' + [S]_{0.9}^h} \quad (٩-١٤)$$

$$\therefore [S]_{0.9} = (9K')^{1/h}$$

● عند  $v = 0.1 V_{\max}$

$$v = 0.1 V_{\max} = \frac{V_{\max}[S]_{0.1}^h}{K' + [S]_{0.1}^h} \quad (١٠-١٤)$$

$$\therefore [S]_{0.1} = \left(\frac{K'}{9}\right)^{1/h}$$

ومن ثم:

$$\frac{[S]_{0.9}}{[S]_{0.1}} = \frac{(9K')^{1/h}}{(K'/9)^{1/h}} = (81)^{1/h} \quad (١١-١٤)$$

أو

$$h = \frac{\log(81)}{\log\left(\frac{[S]_{0.9}}{[S]_{0.1}}\right)} \quad (١٤-١٢)$$

ومن ثم فإن معامل هيل ومؤشر التعاونية لإنزيم متعدد الوحدات الفرعية يرتبطان مع بعضهما، والإثنين مع بعضهما يقيسان درجة التعاونية بين مواقع الارتباط على الإنزيم والعدد الأدنى من المواقع المتفاعلة.

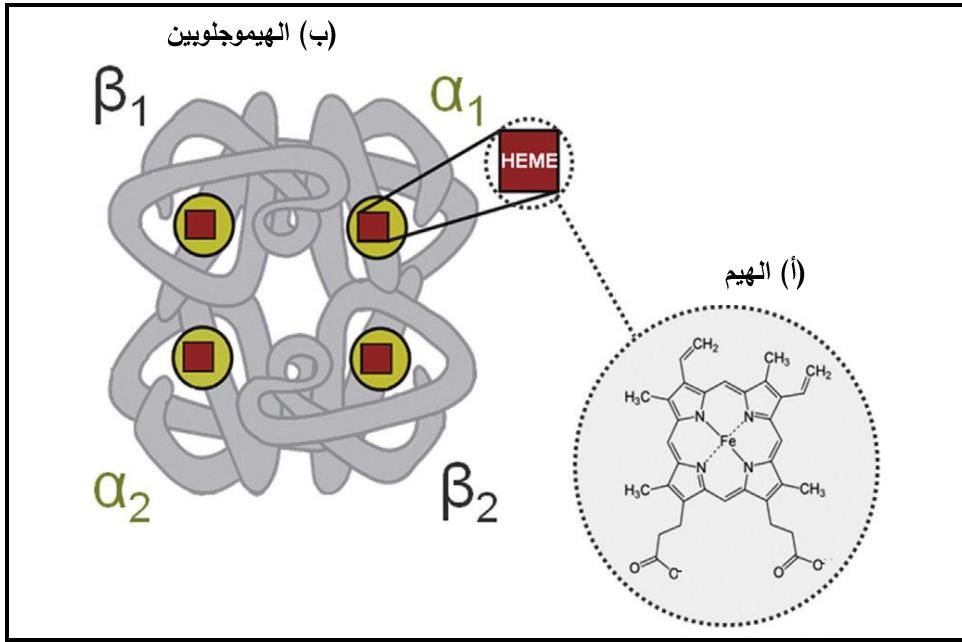
### ١٤-٣ مثالين للتعاونية والتأثير غير الوضعي في البروتينات

بروتين الهيموجلوبين hemoglobin وإنزيم aspartate transcarbamoylase (ATCase) يعطيان مثالين جيدين لفكرة تعاونية المتصلة ligand cooperativity والتنظيم غير الوضعي allasteric regulation على التوالي. وكثيراً ما يؤخذ الهيموجلوبين كنموذج لفكرة التعاونية في البروتينات. ويرجع ذلك جزئياً للمعلومات الوفيرة المتاحة عن التقديرات التركيبية في هذا البروتين نتيجة لدراسات التصوير البلوري بأشعة إكس للهيموجلوبين المرتبط وغير المرتبط بالمتصلة ( $O_2$ ). وبالمثل فإن كثيراً من المعلومات عن تنظيم إنزيم ATCase جاءت من دراسات التصوير البلوري بأشعة إكس.

### ١٤-٣-١ الهيموجلوبين ينقل الأكسجين بكفاءة بالارتباط تعاونياً بالأكسجين

التنظيم الألوسثيري ليس مفيداً فقط للإنزيمات ولكنه يوجد أيضاً في البروتينات الوظيفية الأخرى مثل الهيموجلوبين الذي يقوم بنقل الأكسجين من الرئة حيث يكون الضغط الجزئي للأكسجين  $O_2$  كبيراً (حوالي 100 تور torr) إلى الأنسجة حيث يكون الضغط الجزئي للأكسجين أقل كثيراً (حوالي 20 تور). الهيموجلوبين عبارة عن جزئ رباعي الوحدات الفرعية غير المتجانسة heterotetramer يتألف من نسختين من الوحدات الفرعية ألفا ( $\alpha$ ) ونسختين من الوحدات الفرعية بيتا ( $\beta$ ). وهذه الوحدات الفرعية يطوي

كل منها بصورة مستقلة إلى تركيبات ثلاثية متماثلة. وكل وحدة فرعية ترتبط بالعامل المساعد الهيم heme. ومجموعة الهيم تتألف من مكون عضوي (بورفورين) وذرة حديد مركزية (شكل ١٤-١٠). والهيم في كل وحدة فرعية يتحد مع البروتين بواسطة رابطة تناسقية بين نيتروجين الحمض الأميني هستدين وذرة الحديد المركزية للهيم. والحديد نموذجياً يأخذ شكل هندسي تناسقي ثنائي الأسطح يتألف من ستة مواقع ارتباط تناسقية. وفي مجموعات الهيم في الهيموجلوبين فإن أربعة من المواقع التناسقية تشغل بواسطة نيتروجين نظام حلقة البورفورين والموقع الخامس يشغل بالحستدين تاركاً موقع الإرتباط التناسقي السادس مفتوحاً للإرتباط بـ  $O_2$  لكل وحدة فرعية في الهيموجلوبين.



شكل ١٠-١٤ (أ) الهيم: يتألف من مكون عضوي بورفورين Porphyrin وذرة حديد مركزية (ب) الهيموجلوبين يتألف من وحدتين فرعيتين  $\alpha$  ووحدتين فرعيتين  $\beta$  ( $\alpha_2\beta_2$ ). وكل وحدة فرعية ترتبط بمجموعة هيم

#### تور Tor

وحدة ضغط تساوي تلك التي تبذل بواسطة عمود من الزئبق (Hg) ارتفاعه 1 ميللي متر 1mm عند 0°C والجاذبية القياسية (1 mm Hg) وقد سميت نسبة إلى العالم -1608 Evangelista Torricelli (1643) الذي اخترع البارومتر الزئبقي لقياس الضغط الجوي.

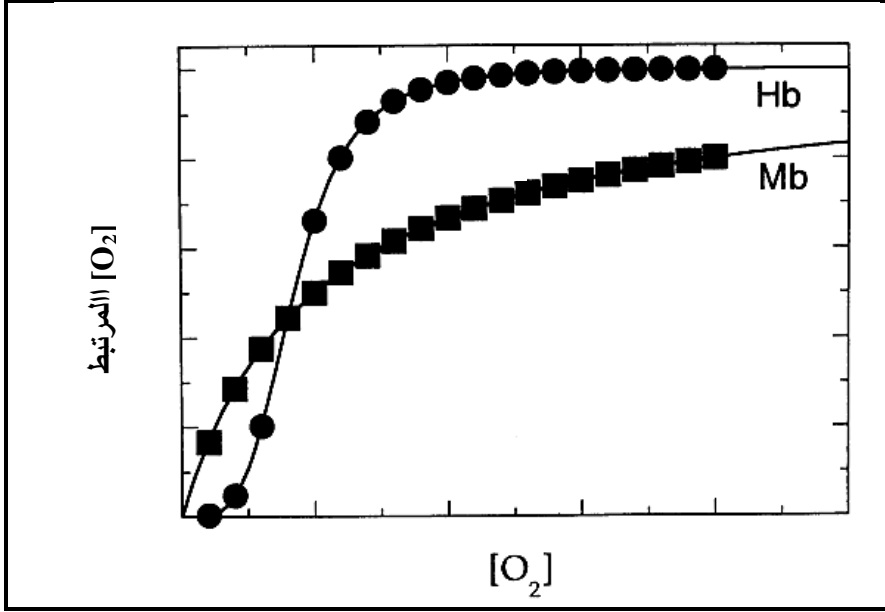
#### ١٤-٣-١-١ الميموجلوبين يرتبط بالأكسجين تعاونياً

إن نمط متماثل جداً للتركيب الثلاثي وارتباط الهيم يشاهد في البروتين أحادي الوحدة ميوغلوبين myoglobin الذي يماثل الوحدات الفرعية في الهيموجلوبين ويرتبط ويحرر الأكسجين الجزيئي عند مركز الحديد في الهيم. وإعتماداً على التماثل في التركيب بين الهيموجلوبين والميوغلوبين، فإننا نتوقع أن كل الهيمات الأربعة في الهيموجلوبين رباعي الوحدات أن ترتبط بالأكسجين بنمط مستقل، مع ألفة مماثلة للميوغلوبين. مع ذلك، فإنه عند قياس منحنى ارتباط  $O_2$  بهذين البروتينين، وجد أن النتائج كانت مختلفة جوهرياً (شكل ١٤-١١). فالميوغلوبين (Mb) يظهر منحنى القطع الزائد hyperbolic لـ ميكليس-منتين المتوقع. من ناحية أخرى فإن الهيموجلوبين (Hb) بدلاً من أن يظهر منحنى القطع الزائد فإنه يظهر منحنى أسي لإرتباط  $O_2$  بالبروتين كدالة في تركيز  $O_2$ . وهذا هو الإشارة التقليدية للتأثيرات التعاونية بين مواقع الارتباط. بمعنى أن مجموعات الهيم الأربع في الهيموجلوبين لا تعمل كمواقع ارتباط مستقلة للأكسجين، ولكنها تظهر تعاونية موجبة في ألفتها الارتباطية.

#### ١٤-٣-٢-١ التعاونية في الميموجلوبين ترجع إلى تغيرات في التركيب الرباعي

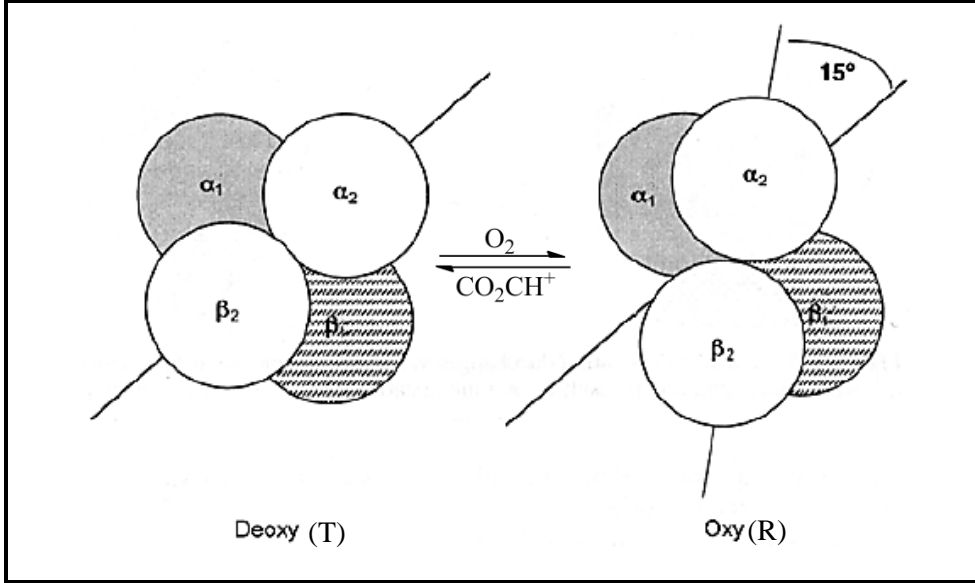
إن التركيبات البلورية لأوكسي هيموجلوبين oxy-hemoglobin (الهيموجلوبين المرتبط بأربع جزيئات  $O_2$ ) ودي أكسي هيموجلوبين deoxy-hemoglobin (الهيموجلوبين غير المرتبط بـ  $O_2$ ) تعطي الأساس التركيبي لهذه التعاونية. فالتركيب الرباعي الأبعاد للهيموجلوبين يمكن وصفه كزوج من الوحدات الثنائية المتماثلة ( $\alpha_1\beta_1$  و  $\alpha_2\beta_2$ ) اللذان يتجمعان لتكوين الهيموجلوبين. وارتباط الأكسجين بالصورة دي أكسي هيموجلوبين (التي يشار إليها بالصورة المشدود T) يؤدي إلى دوران الزوج  $\alpha_1\beta_1$  بـ  $15^\circ$  بالنسبة إلى الزوج





شكل ١٤-١١ الرسم البياني لإرتباط الأكسجين الجزيئي كدالة في تركيز الأكسجين لبروتين للهيموجلوبين (Hb) والميوجلوبين (Mb)، الذي يشير إلى التعاونية لإرتباط الأكسجين بالهيموجلوبين

$\alpha_2\beta_2$  لتعطي أكسي هيموجلوبين (الذي يشار إليه بالصورة المسترخاه R) (شكل ١٤-١٢). وهذه التغيرات تحدث بالتغير بين الوحدات الفرعية عند السطح البيني بين الوحدات. وهذه التغيرات في التركيب الرباعي في جزئ الهيموجلوبين تؤثر على الألفة النسبية لمجموعات الهيم الأربعة للأكسجين التي توفر وسيلة للإرتباط العكسي للأكسجين بالبروتين. إن العكسية في إرتباط الأكسجين للهيموجلوبين هي التي تسمح له بالعمل كناقل بيولوجي مهم. والسؤال الآن هو هل الإرتباط التعاوني للأكسجين بالهيموجلوبين يوصف أفضل بالنموذج المتوافق (نموذج MWC) أو النموذج المتعاقب لـ كوشلاندر. إن دراسة سلوك إرتباط الأكسجين بالهيموجلوبين أوضحت أن لا أحد من هذين النموذجين بالصورة النقية لا تفسر كاملاً سلوك الهيموجلوبين. بدلاً من ذلك فإن نموذج مجمع منهما يكون مطلوباً.



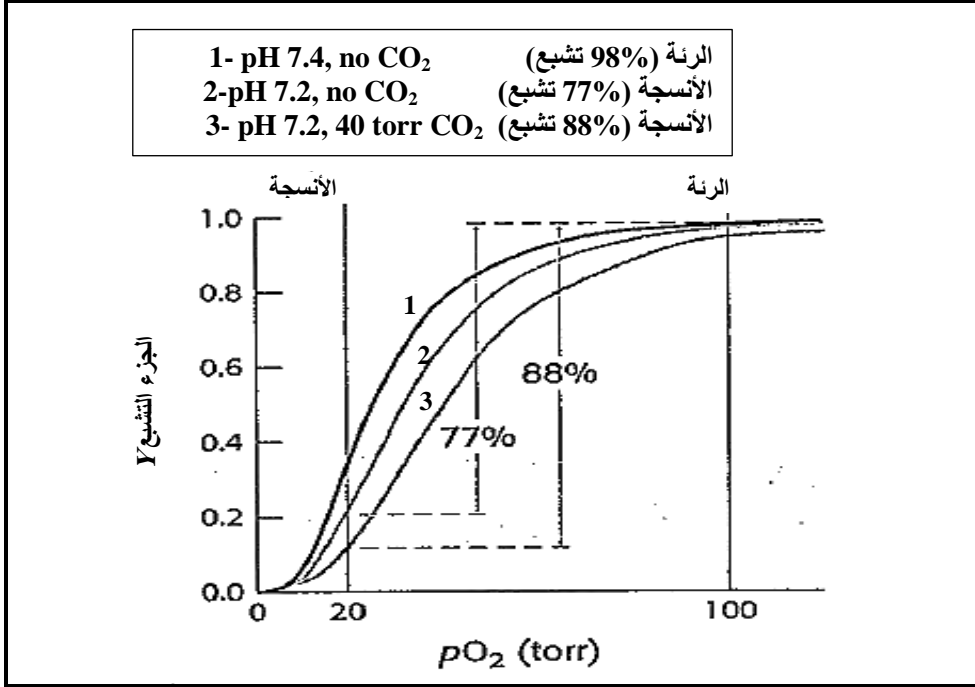
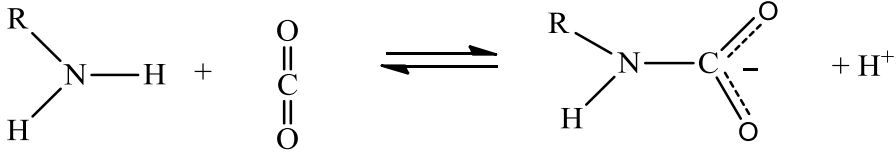
شكل ١٤-١٢ رسم إيجازي يوضح التغير في التركيب الرباعي الذي يصاحب ارتباط الأكسجين بالهيموجلوبين. بالارتباط بالأكسجين (الصورة T) فإن أحد الأزواج  $\alpha$  ,  $\beta$  تدور بالنسبة للزوج الآخر - ١٥ درجة.

#### ٣-١-٣-١٤ أيونات الهيدروجين وثاني أكسيد الكربون يعزز تحرير الأكسجين من الهيموجلوبين في الأنسجة

الأنسجة النشطة أيضاً مثل العضلات المنقبضة تحتاج إلى كميات كبيرة من الأكسجين وتنتج كميات كبيرة من أيونات الهيدروجين وكذلك ثاني أكسيد الكربون. وكلا النوعين هما مؤثرات غير متجانسة للهيموجلوبين التي تعزز تحرير الأكسجين من الهيموجلوبين في أنسجة العضلات. إضافة إلى ذلك، فإن الاختلاف في الضغط الجزئي للأكسجين له دوراً معنوياً في عملية النقل.

- في الرئة حيث يكون الضغط الجزئي للأكسجين حوالي 100 تور ( $pO_2 = 100 \text{ torr}$ ) فإن الهيموجلوبين يصبح تقريباً مشبعاً بالأكسجين بحيث أن 98% من مواقع ارتباط الأكسجين تكون مشبعة. وعندما ينتقل الهيموجلوبين إلى الأنسجة حيث يكون الضغط الجزئي للأكسجين حوالي 20 تور، فإن مستوى التشبع ينخفض إلى 32%. لذلك فإن ما مقداره 66% ( $98 - 32 = 66$ ) من مواقع ارتباط الأكسجين الناتجة عن اختلاف الضغط الجزئي للأكسجين تشارك في نقل الأكسجين (شكل ١٤-١٣).

- انتقال الهيموجلوبين من الرئة حيث يكون الـ pH يساوي 7.4 والضغط الجزئي للأكسجين 100 تور إلى العضلات النشطة حيث تكون الـ pH تساوي 7.2 والضغط الجزئي للأكسجين 20 تور يؤدي إلى تحرير ما مقداره 77% من السعة الكلية للهيموجلوبين. لاحظ أن 66% فقط من الأكسجين تحرر في غياب أى تغير في الـ pH. معنى ذلك أن حوالي 11% تحرير للأكسجين ينشأ من التغير في الـ pH.
- إضافة إلى ذلك، فإن الهيموجلوبين يستجيب لثاني أكسيد الكربون ( $CO_2$ ) بإنخفاض ألفته للأكسجين، ومن ثم تحرير الأكسجين في الأنسجة عند التركيز العالي مع  $CO_2$ . فعند وجود  $CO_2$  عند ضغط 40 تور فإن كمية الأكسجين المتحررة تصل إلى 88% من السعة الكلية لحمل الأكسجين (شكل ١٤-١٣)، ومن ثم فإن التنظيم غير المتجانس heterotropic regulation بواسطة أيونات الهيدروجين وثنائي أكسيد الكربون تزيد أيضاً كفاءة نقل الأكسجين لهذا البروتين الألوستيري.
- تنظيم ارتباط الأكسجين بأيونات الهيدروجين وثنائي أكسيد الكربون يطلق عليها تأثير بوهر Bohr effect، نسبة إلى C. Bohr الذي وصف هذه الظاهرة عام ١٩٥٧. والدراسات التركيبية والكيميائية قد أوضحت الأساس الكيميائي لتأثير بوهر:
- فى دى أوكسي هيموجلوبين، فإن ثلاثة من الأحماض الأمينية:  $\beta_1$  His 146 و  $\beta_1$  Asp 94 و  $\alpha_2$  Ly 40 تكون إثنين من الروابط الملحية التي تثبت التركيب الرباعي T. وتكوين أحد هذه الروابط الملحية يعتمد على إضافة بروتون  $\beta_1$  His 146  $H^+$ ، ومن ثم فإن إنخفاض الـ pH يؤدي إلى تثبيت التركيب الرباعي T المميز لـ دي أوكسي هيموجلوبين الذي يؤدي إلى تحرير الأكسجين.
- ثاني أكسيد الكربون أيضاً يثبت دى أوكسي هيموجلوبين بالتفاعل مع المجموعات الطرفية للأحماض الأمينية ليكون مجموعات الكربامات carbamate التي تكون سالبة الشحنة:



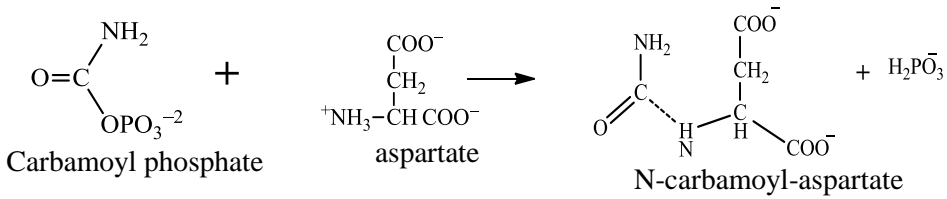
شكل ١٤-١٣ تأثير الـ pH وتركيز CO<sub>2</sub> على ألفة الهيموجلوبين للأكسجين انخفاض ضغط O<sub>2</sub> من 100 تور في الأنسجة يؤدي إلى تحرير O<sub>2</sub> من أوكسي هيموجلوبين بمقدار 66%. إنخفاض الـ pH من 7.4 (في الرئة) إلى 7.2 (في الأنسجة) ينتج عنه تحرير O<sub>2</sub> من أوكسي هيموجلوبين بمقداره 11%. وبذلك يكون تأثير إختلاف الضغط وتغير الـ pH معا هو تحرر ما مقداره 77% من الأكسجين من أوكسي هيموجلوبين. ارتفاع الضغط الجزئي لـ CO<sub>2</sub> من 0 إلى 40 تور أيضا بدعم تحرير O<sub>2</sub> من أوكسي هيموجلوبين بمقداره 11% في الأنسجة وبذلك فإن كمية الأكسجين المتحررة في الأنسجة تصل إلى 88%.

- إن مجموعات الأمينو الطرفية تقع عند السطح البيني بين الثنائي  $\alpha\beta$ ، ومجموعات الكربامات السالبة الشحنة تشارك في تكون جسور ملحية المميزة لتركيب الحالة T، التي تثبت تركيب دى أكس هيموجلوبين الذي يدعم تحرير الأكسجين.

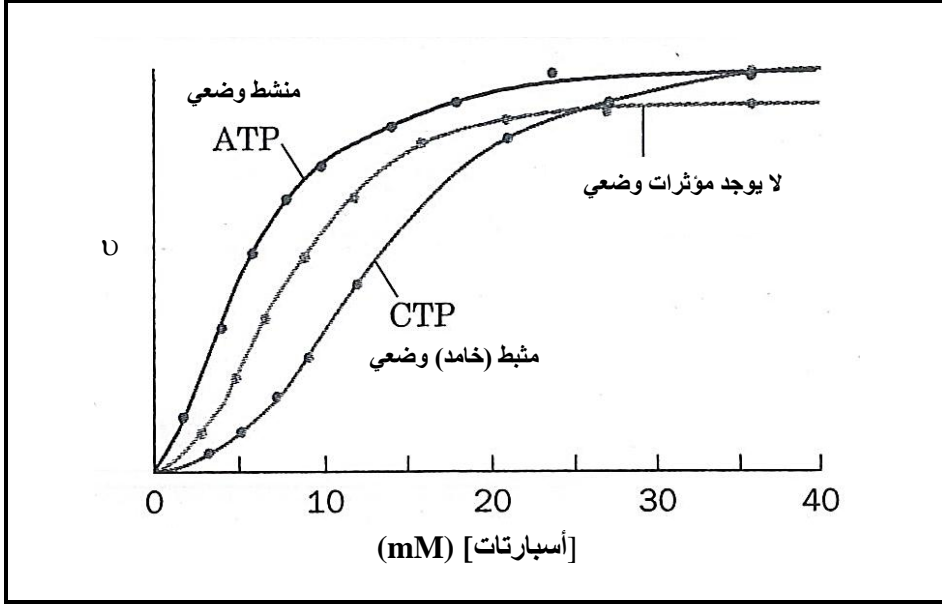
- والهيموجلوبين المرتبط بـ ثاني أكسيد الكربون وأيونات الهيدروجين يحمل بواسطة الدم عائداً إلى الرئة، حيث يحرر أيونات الهيدروجين و  $\text{CO}_2$  ويرتبط من جديد بالأكسجين وبذلك يساعد في نقل  $\text{H}^+$  و  $\text{CO}_2$  بالإضافة إلى  $\text{O}_2$ . مع ذلك فإن نقل  $\text{H}^+$  و  $\text{CO}_2$  بالهيموجلوبين يشكل فقط 14% من النقل الكلي لكل من  $\text{H}^+$  و  $\text{CO}_2$ ، بالإضافة إلى  $\text{O}_2$ . وكل من  $\text{H}^+$  و  $\text{CO}_2$  تنقل أيضاً في الدم في صورة بيكربونات ( $\text{HCO}_3^-$ ) التي تتكون تلقائياً أو تحت تأثير إنزيم Carbonic anhydrase الذي يوجد بوفرة في خلايا الدم الحمراء.

#### ١٤-٣-٢ إنزيم ATCase يثبط غير وضعياً بالنتائج النهائي للمسار

إنزيم (ATCase) aspartate trans carbamoylase يحفز الخطوة الأولى في التخليق الحيوي للبيريميديات وهي القواعد التي تشكل عناصر أساسية في الأحماض النووية. والتفاعل الذي يحفز بهذا الإنزيم هو تكثيف أسبارتات aspartate مع فوسفات الكارباميل carbamoyl phosphate لتكوين N-carbamoyl-aspartate والارثوفوسفات.



إن منحنى السرعة  $v$  في مقابل تركيز المادة الخاضعة [S] لإنزيم ATCase (شكل ١٤-١٣) يكون أسى sigmoidal الذي يشير إلى التعاونية لإرتباط المادة الخاضعة. إضافة إلى ذلك، فإن ATCase يثبط غير وضعياً (ألوستيرياً) بالسيتيدين ثلاثي الفوسفات (CTP) وينشط غير وضعياً بالأدينوزين ثلاثي الفوسفات (ATP).

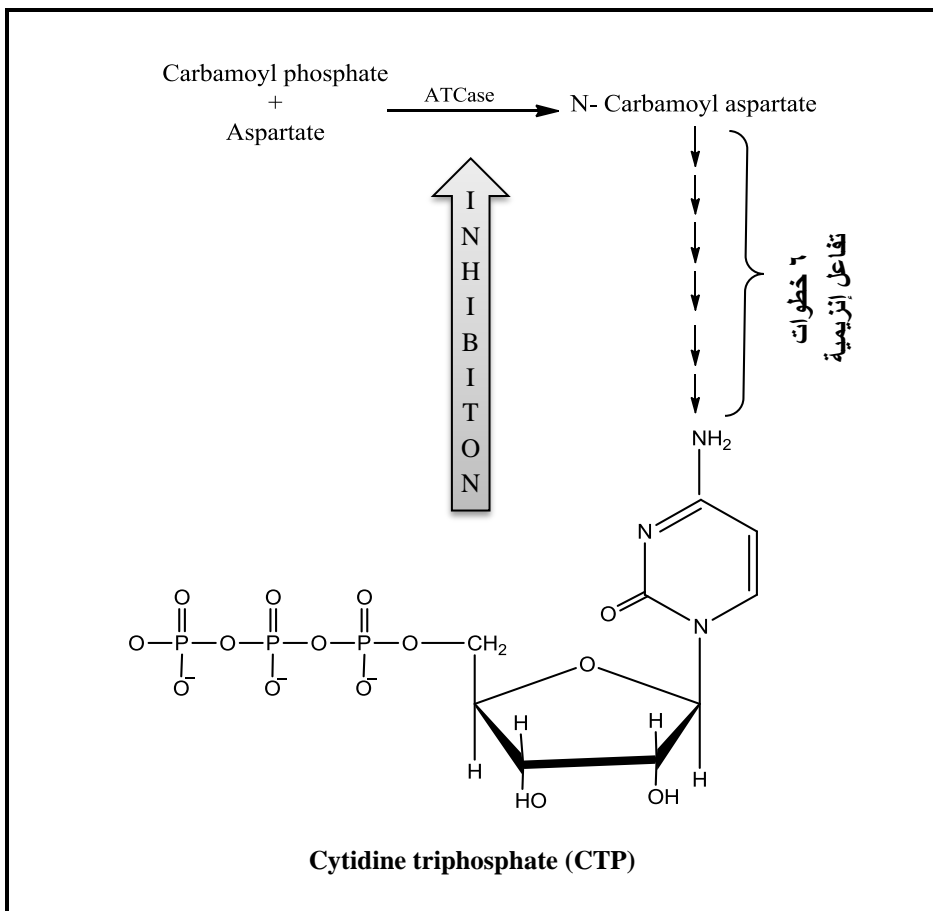


شكل ١٤-١٤ رسم U (معدل تكوين N-كارباميل فوسفات) مقابل تركيز المادة الخاضعة (أسبارتات). تم قياس سرعة التفاعل في غياب المؤثرات، وفي وجود 0.4 ميلي مولر CTP (مثبط) وفي وجود 0.2 ميلليمولر ATP (منشط)

#### ١٤-٣-٢-١ التثبيط بالتغذية الخلفية لـ ATCase ينظم تخليق البريميدات

وجد كل من John Gerhart و Arthur Pardee أن إنزيم ATCase يثبط بواسطة CTP وهو الناتج النهائي للمسار. إن معدل التفاعل المحفز بواسطة ATCase يكون سريعاً في غياب تركيز عالي من CTP، ولكن ينخفض المعدل بزيادة تركيز CTP. وتأثير CTP على الإنزيم يعطي مثلاً للتثبيط بالتغذية الخلفية feedback inhibition أو التثبيط بالناتج النهائي (شكل ١٤-١٥).

إن CTP يختلف تركيبياً عن المواد الخاضعة للتفاعل، ومن ثم فإن CTP يجب أن يرتبط بموقع مميز عن الموقع النشط الذي ترتبط به المادة الخاضعة. ومثل هذا الموقع يطلق عليه الموقع غير الوضعي (الموقع الألوسستيري) أو الموقع التنظيمي. و CTP هو مثال للمثبط (الخامد) غير الوضعي. في ATCase (وليس كل الإنزيمات المنظمة غير وضعياً) فإن المواقع الحفزية والمواقع المنظمة توجد على سلاسل عديدة ببتيد منفصلة.

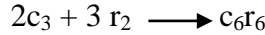


شكل ١٤-١٥ مخطط بياني لمسار التخليق الحيوي للبريميديات. CTP وهو الناتج النهائي للمسار يقوم بتنشيط ATCase الذي يحفز الخطوة الأولى في المسار

#### ١٤-٢-٢-٢ ATCase يتألف من وحدات فرعية حفزية ومنظمة يمكن فصلها

ما هو الدليل أن ATCase يحتوي على مواقع حفزية ومواقع تنظيمية مميزة ؟  
قام كل من Howard, Gerhart بإستخدام مركبات الزئبق في فك ATCase إلى نوعين مميزين من الوحدات الفرعية التي تختلف في حجمها إعتقاداً على معامل الترسيب في مجال الطرد المركزي، وبذلك يمكن دراستها منفصلة:

- الوحدة الفرعية الكبيرة تظهر نشاط حفزي ولكنها لا تتأثر ب CTP ويطلق عليها الوحدة الفرعية الحفزية (أو c).
- الوحدة الفرعية الصغيرة المفصولة يمكن أن ترتبط ب CTP ولكن ليس لها نشاط حفزي، وهذه الوحدة الفرعية يطلق عليها الوحدة الفرعية المنظمة (أو r).
- والتركيب البللوري بأشعة إكس لإنزيم ATCase أوضح أن الوحدات الفرعية الحفزية تنظم في صورة وحدتين كل منهما يتألف من ثلاثة وحدات فرعية، يشار إليها ب c<sub>3</sub> للذان يرتبطان مع ثلاثة مجموعات ثنائية الوحدات من الوحدات المنظمة التي يشار إليها ب r<sub>2</sub>، والمعدّد الناتج له نفس تركيب الإنزيم الطبيعي c<sub>6</sub>r<sub>6</sub>



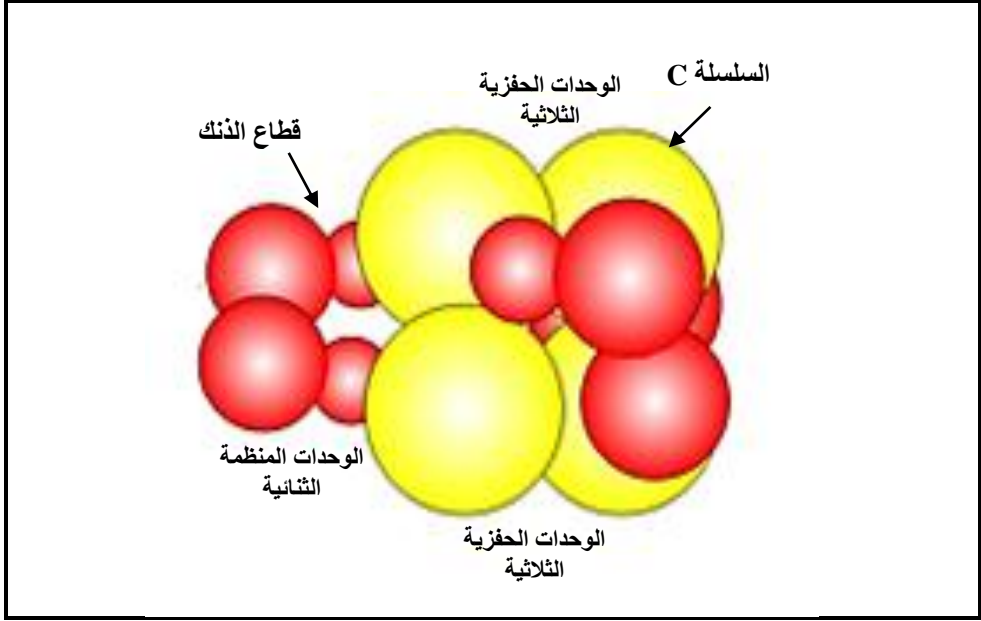
والإنزيم المعدّد تشييده من هذه الوحدات له نفس الخواص غير الوضعية (الألوستيرية) مثل الإنزيم الطبيعي.

#### ١٤-٣-٢-٣ التأثيرات غير الوضعية في ATCase تحدث نتيجة للتغيير في التركيب الرباعي

كيف يمكن لإرتباط CTP للوحدة الفرعية المنظمة أن يؤثر على تفاعلات الموقع النشط في الوحدة الفرعية الحفزية؟ وللإجابة على هذا السؤال تم تعيين التركيب ثلاثي الأبعاد لـ ATCase باستخدام التحليل البللوري بأشعة إكس في المعمل في أربعة حالات (أ) في غياب المادة الخاضعة (ب) في وجود مناظرات المادة الخاضعة المرتبطة بالإنزيم (ج) في وجود CTP المرتبط بالإنزيم (د) في وجود ATP المرتبط بالإنزيم

(أ) في غياب المادة الخاضعة وجد أن الوحدات الثلاثية الحفزية 2c<sub>3</sub> تتكدس أحدهما فوق الأخرى وتتصل بثلاثة من الوحدات الثنائية المنظمة 3r<sub>2</sub> (شكل ١٤-١٦). ويوجد تماس هام بين الإثنين من الوحدات الثلاثية الحفزية. أيضاً فإن كل سلسلة r خلال الثنائي المنظم تتفاعل مع السلسلة، خلال الثلاثي الحفزي خلال قطاع تركيب يثبت بواسطة أيون الزنك.

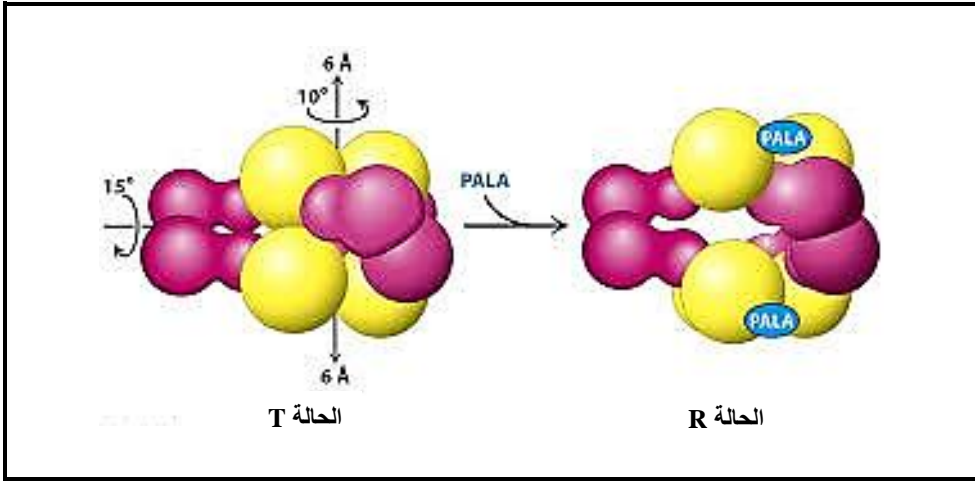




شكل ١٤-١٦ تركيب ATCase

(ب) تم بلورة الإنزيم في وجود N-(phosphonacetyl) – L – aspartate (PALA) وهو نظير للمادتين الخاضعتين للإنزيم وهو مثبط تنافسي لـ ATCase؛ فهو يرتبط ويغلق المركز النشط. وفحص تركيب المعقد ATCase – PALA أظهر حدوث تغيير غير عادي في التركيب الرباعي عند ارتباط PALA. فالوحدتين الحفزيتين ثلاثية الوحدات تتحرك بعيداً عن بعضهما بمقدار  $12 \text{ \AA}$  وتدور حوالي  $10^\circ$  درجة حول محور التماثل الثلاثي. إضافة إلى ذلك فإن الوحدات المنظمة الثلاثية تدور بحوالي  $15^\circ$  درجة لتتكيف مع هذه الحركة (شكل ١٤-١٧) وجوهر ذلك أن ATCase له صورتين من التركيب الرباعي؛ أحدهما تكون السائدة في غياب المادة الخاضعة والأخرى تكون سائدة عندما تكون المواد الخاضعة أو منازراتها مرتبطة. وإعتماداً على نظرية التنظيم غير الوضعي، فإن هاتين الصورتين يشار إليهما بالحالة T (T State) والحالة R (R State) على التوالي. والحالة T لها ألفة منخفضة للمادة الخاضعة ومن ثم يكون لها نشاط حفزي منخفض بالنسبة للحالة R. وفي وجود أي

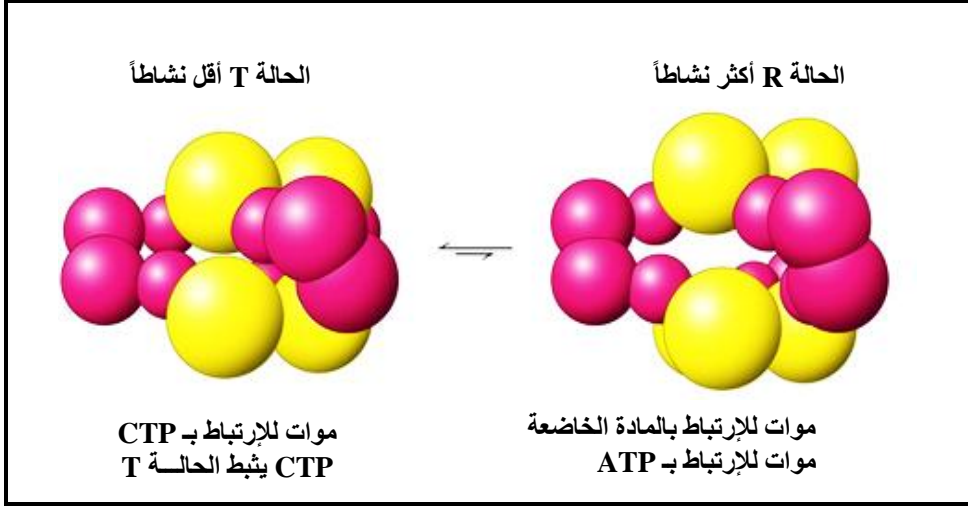
تركيز مثبت من الأسبارتات وفوسفات الكرباميل، فإن الإنزيم يوجد في حالة إتران بين الصورتين T و R. وموقع الاتزان يعتمد على عدد المواقع النشطة المشغولة بواسطة المادة الخاضعة. لذلك فإن ATCase يتطابق مع النموذج المتوافق (نموذج MWG)، فارتباط المادة الخاضعة عند أحد المواقع الحفزية يزيد ألفة المادة الخاضعة للمواقع الحفزية الأخرى.



شكل ١٤-١٧ الانتقال من الحالة T إلى الحالة R في ATCase. إنزيم ATCase يوجد في اثنين من البنىات الفراغية. صورة مدمجة غير نشطة نسبياً (الحالة T) وصورة ممتدة نشطة (الحالة R). إرتباط PALA (مناظر للمادتين الخاضعتين) يثبت الحالة R.

(ج) ونعود الآن إلى تأثير CTP. تعيين تركيب ATCase في وجود CTP، أوضح إرتباط CTP بكل سلسلة من الوحدات المنظمة في مجال الذي لا يتيح للتأثير المتبادل مع الوحدات الحفزية. وقد وجد أن إرتباط المثبط CTP يغير الاتزان في اتجاه الحالة T الذي يخفض النشاط الإنزيمي النهائي ويخفض معدل تكوين ناتج التفاعل (N-كارباميل أسبارتات)، وهذه الآلية للتنظيم غير الوضعي تتبع آلية النموذج المتوافق (نموذج MWC) لأن الإنزيم الكلي يتحول من الصورة R إلى الصورة T الذي يؤثر على كل مواقع الارتباط بالتساوي (شكل ١٤-١٧). وعلى ذلك، فإنه في وجود CTP، فإن الإنزيم يكون

أقل إستجابة للتأثيرات التعاونية التي تنشأ من ارتباط المادة الخاضعة، فيكون مطلوب مادة خاضعة أكثر للوصول إلى معدّل تفاعل ما (شكل ١٤-١٨).



شكل ١٤-١٨ الحالة T والحالة R يكونا في حالة اتزان. حتى في غياب أى من المواد الخاضعة أو المنظمات فإن إنزيم ATCase يوجد في حالة اتزان بين الحالتين R, T. وتحت هذه الظروف فإن الحالة T تكون مواتية بعامل حوالي 200. الحالة T تفضل الإرتباط ب CTP والحالة R تفضل الإرتباط بالمادة الخاضعة

(د) أيضاً وجد أن إنزيم ATCase ينشط غير وضعياً بواسطة الأدينورين ثلاثي الفوسفات ATP؛ حيث يؤدي إرتباط ATP بالإنزيم إلى زيادة معدل الحفز. و ATP بخلاف CTP يرتبط بالحالة النشطة (الحالة R التي لها ألفة عالية للمادة الخاضعة) عند مواقع ارتباط CTP. مع ذلك، فإن ATP له تأثير معاكس عند ارتباطه بالحالة T للإنزيم حيث يجعل الوجدتين الحفزيتين ثلاثية الوحدات الفرعية تتحرك بمسافة  $0.4\text{\AA}$  (تصبح مماثلة أكثر للحالة R الأكثر نشاطاً) ومن ثم يعيد توجيه بواقي الأحماض الأمينية الأساسية في الحفز في المواقع النشطة للإنزيم ويزيد النشاط الحفزي. لذلك، فإن ATP هو مثال للمنشط غير الوضعي لإنزيم ATCase. وعند التركيز العالي من ATP، فإن النمط الحركي يظهر سلوك أسّي أقل فالمنحني يعتمد بحدّة على تركيز المادة الخاضعة (شكل ١٤-١٤).

إن الزيادة في نشاط إنزيم ATCase إستجابة لزيادة تركيز ATP له إحتمالين من التفسيرات الفسيولوجية: الأول أن التركيز العالي من ATP يعطي إشارة إلى ارتفاع تركيز نيوكليوتيدات البيورين في الخلية، والزيادة في نشاط ATCase سوف تفضي إلى توازن في المحتوى من البيورينات والبريميدات. وثانياً فإن التركيز العالي من ATP يشير إلى أنه توجد طاقة مخزنة كافية في الخلية التي تعزز تخليق mRNA وتكرر DNA.

## أسئلة

- ١- صفّ الفرق في التركيب والوظيفة بين ميوجلوبيين وهيملوبيين؟
- ٢- إشرح الأساس التركيبي لتعاونية ارتباط  $O_2$  بالهيموجلوبيين
- ٣- مادة خاضعة ترتبط 100 مرة بإحكام للحالة R لإنزيم غير وضعي بالنسبة للحالة T. افترض أن نموذج (MWC) المتوافق يطبق على هذا الإنزيم.
  - (أ) بأى عامل يؤدي إرتباط جزئى مادة خاضعة لكل جزئى إنزيم يغير نسبة تركيز جزيئات الإنزيم في الحاتين R و T.
  - (ب) افترض أى L ، وهى نسبة [T] إلى [R] في غياب المادة الخاضعة تكون  $10^3$  وأن الإنزيم يحتوى على أربع مواقع إرتباط للمادة الخاضعة. ما هى نسبة جزيئات الإنزيم في الحالة R إلى لتلك في الحالة T في وجود كميات تشبع من المادة الخاضعة.
- ٤- دعنا ننظر إلى بروتين غير وضعي الذي ينطبق عليه النموذج المتوافق (MWC). افترض أن نسبة T إلى R في غياب المتصلة تكون  $10^3$  و  $K_T = 2\text{mM}$  و  $K_R = 5\mu\text{M}$  والبروتين يحتوي على أربع مواقع للارتباط بالمتصلة. ما هو الجزء من الجزيئات في الصورة R، عندما يرتبط بـ 0 و 1 و 3 و 4 من المتصلة.
- ٥- افترض أنك فصلت إنزيم ثنائي الوحدات الفرعية يحتوي على إثنين من المواقع المتماثلة. إن ارتباط المادة الخاضعة لأحد المواقع يخفض ألفة الموقع النشط الآخر. ما هو النموذج غير الوضعي المناسب لهذه التعاونية السالبة.

٦- أحد الإنزيمات غير الوضعية الذي يتبع النموذج المتوافق له نسبة T/R تساوي 300 في غياب المادة الخاضعة. افترض أن طفرة عكست هذه النسبة. كيف لهذه الطفرة أن تؤثر على العلاقة بين معدل التفاعل وتركيز المادة الخاضعة.

٧- ما هو تأثير كل من المعاملات التالية على ألفة الهيموجلوبين في المعمل؟

(أ) تغير الـ pH من 7.2 إلى 7.4

(ب) رفع  $pCO_2$  من 10 إلى 40 تور

(ج) تفكك  $\alpha_2\beta_2$  إلى الوحدات الفردية.

---

## فصل ١٥ الطرق الأخرى لتنظيم نشاط الإنزيمات

### The Other Methods of Regulation of Enzymes Activity

---

|      |                                     |
|------|-------------------------------------|
| ١-١٥ | نظائر الإنزيمات                     |
| ٢-١٥ | التعديل (التحوير) التساهمي          |
| ٣-١٤ | التنشيط بالتحلل المائي للبروتين     |
| ٤-١٥ | متاحية الإنزيم (تنظيم كمية الإنزيم) |

في مقدمة هذا الجزء ذكرنا أن نشاط البروتينات بما فيها الإنزيمات يتم بعدة آليات، وأحد هذه الآليات هو التحكم غير الوضعي (الألوستيري) Allosteric control للإنزيمات غير الوضعية متعددة الوحدات الفرعية. وفي فصل ١٤ ناقشنا فكرة التأثيرات التعاونية والتأثيرات غير الوضعية في الإنزيمات. وهذه الإنزيمات تنحرف عن السلوك الحركي الطبيعي لـ ميكيلس-منتين الذي نوقش في فصل ٦، فهذه الإنزيمات تعطي شكل أسّي Sigmoid لمنحنى السرعة بدلاً من منحنى القطع الزائد لـ ميكيلس-منتين. في هذا الفصل سوف نناقش الآليات الأخرى التي تستخدم في تنظيم نشاط الإنزيمات التي تشمل:

١- الصور المتعددة (نظائر) الإنزيمات

٢- التحوير التساهمي

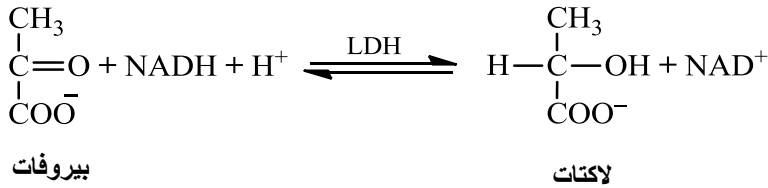
٣- التنشيط بالتحلل المائي للبروتين

٤- متاحة الإنزيم

## ١٥-١ نظائر الإنزيمات

حوالي 50% من الإنزيمات التي تم دراستها حتى الآن توجد في صور جزيئية متعددة التي يطلق عليها نظائر الإنزيمات. ونظائر الإنزيمات isoenzymes (أو isozymes) هي إنزيمات التي تختلف في تسلسل الأحماض الأمينية ولكنها تحفز نفس التفاعل. وعادة ما تظهر هذه الإنزيمات إختلافاً في المعلمات (البارامترات) الحركية مثل  $K_m$  أو إختلاف في الخواص التنظيمية كالحساسية تجاه المنشطات والمثبطات. وهذه الإنزيمات تشفر بواسطة مواضع مختلفة التي عادة ما تنشأ من تضاعف الجين والتشعب divergence . وكثيراً ما يمكن التميز بين نظائر الإنزيمات بواسطة الخواص الكيميائية مثل الحركية في مجال كهربي.

إن وجود نظائر الإنزيمات تسمح بالضبط الدقيق للأبيض لتوفر إحتياجات خاصة لنسيج ما أو مرحلة نمو. ويمكن توضيح الأساس الوراثي ووظيفة نظائر الإنزيمات بالنظر إلى إنزيم لاکتات ديهيدروجينيز (LDH) Lactate dehydrogenase كمثال. هذا الإنزيم يشارك في الأبيض غير الهوائي للجلوكوز وتخليق الجلوكوز، ويتألف من أربع وحدات من سلاسل عديد الببتيد. يقوم إنزيم لاکتات ديهيدروجينيز بتحويل البيروفات إلى اللاكتات تحت الظروف اللاهوائية مثل أنسجة العضلات الهيكلية أثناء المجهود العضلي المكثف.



ويبدو أن الإنزيم تحت الظروف الفسيولوجية يلعب دوراً مهماً في حفز التفاعل في كلا الإتجاهين، إلا أن تحول البيروفات إلى اللاكتات تحت الظروف اللاهوائية هي أكثر الوظائف فهما. واللاكتات التي تنتج في هذه الأنسجة تفرز إلى الدم حيث تمتص بواسطة الأنسجة التي تعمل هوائياً (مثل الكبد وعضلات القلب) حيث يمكن لإنزيم لاكتات ديهيدروجينيز من تحويل اللاكتات مرة أخرى إلى البيروفات حيث يمكن إستخدامها في دورة كريبس.

معظم الفقاريات تحتوي (على الأقل) على إثنين من الجينات الخاصة بإنزيم لاكتات ديهيدروجينيز التي توجّه بناء (تشفر) إثنين من سلاسل عديد الببتيد المتشابهة ولكن غير متماثلة يطلق عليهما M و H. وفي أنسجة الجنين يكون كلا الجينين نشطين بدرجة متساوية والذي يؤدي إلى تكوين كميات مولارية من سلسلتي عديد الببتيد H و M والإنزيم النشط يكون رباعي الوحدات، واتحادات مختلفة من الوحدات الفرعية H, M, يمكن أن تتكون وبذلك فإن نظائر الإنزيمات التي يمكن أن تتكون هي  $M_4$ ,  $M_3H$ ,  $M_2H_2$ ,  $M_1H_3$ , و  $H_4$  تكون بنسبة ١ : ٤ : ٦ : ٤ : ١، ويمكن الكشف عن هذه النظائر بواسطة الإختلاف في الهجرة الكهربائية. ويتضاعف النسيج الجنيني وتميزه بتغير الكميات النسبية من M, H, ففي أنسجة القلب التي تعمل دائماً تحت الظروف الهوائية فإن النظير  $H_4$  يكون هو السائد. من ناحية أخرى نجد أنه في العضلات الهيكلية التي تكون لا هوائية تحت ظروف النشاط العضلي المكثف يكون النظير  $M_4$  هو السائد. وتسلسل الأحماض الأمينية في نظيري الإنزيم  $M_4$  و  $H_4$  تكون 75% متماثلة. ومن الثابت أن الصورتين  $M_4$  و  $H_4$  قد صمما للقيام بوظائف مميزة. فالنظير  $H_4$

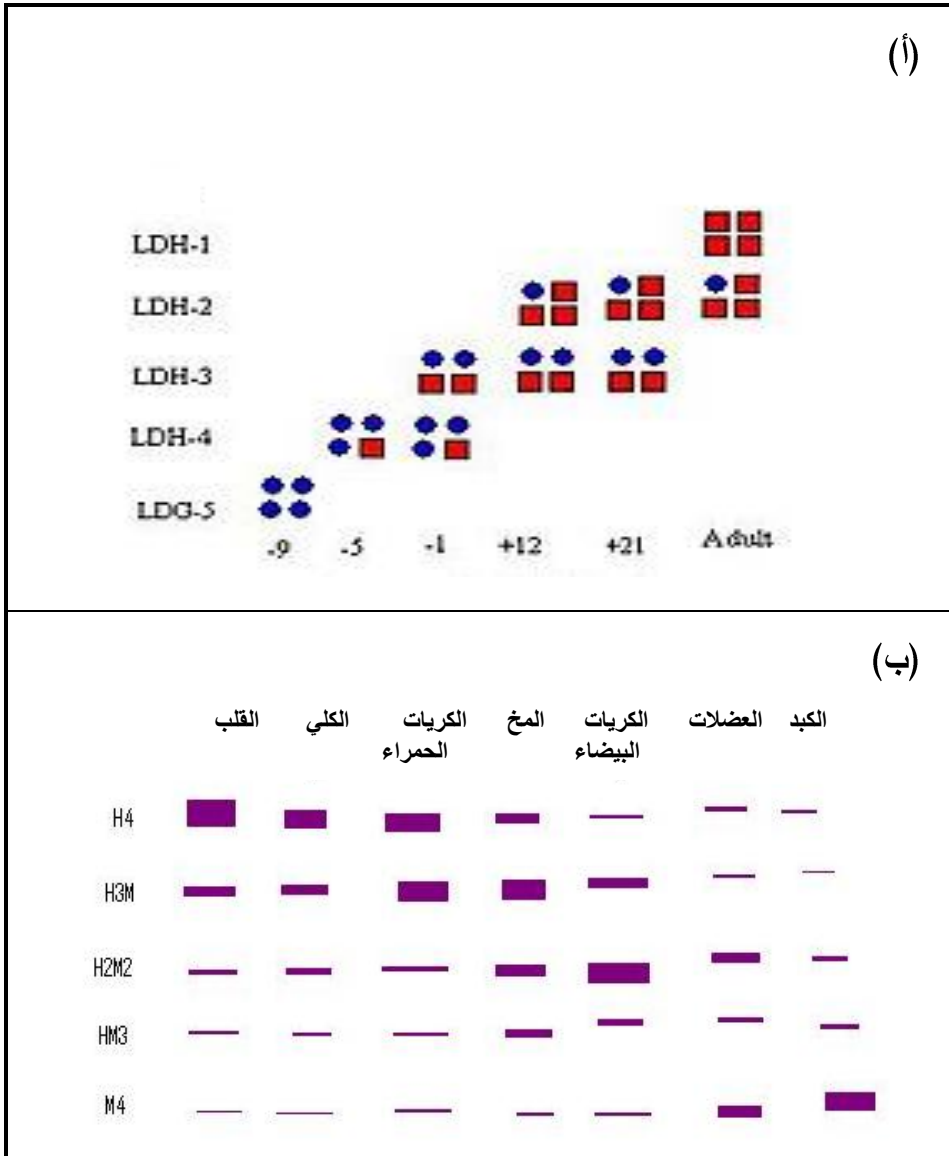


الذي يوجد في القلب له ألفة عالية للمواد الخاضعة عن النظير  $M_4$ . وأيضاً فإن النظيرين يختلفان في أن التركيز العالي من البيروفات يثبط النظير  $H_4$  ولكن ليس النظير  $M_4$ . والاتحادات الأخرى  $H_3M$ ,  $H_2M_2$ ,  $HM_3$  يكون لها خواص وسط اعتماداً على نسبة نوعي السلسلتين. وشكل ١٥-١ يظهر التخصص النسيجي لنظائر إنزيم لاكتات ديهيدروجينيز في أنسجة الجرزان البالغة. ونمط تغير نظائر الإنزيم في قلب الجرزان أثناء النمو.

إن ظهور بعض نظائر الإنزيمات في الدم هو مؤشر لتلف النسيج ويمكن أن يستخدم في التشخيص التحليلي (السريري). على سبيل المثال فإن زيادة مستوى  $H_4$  في مصل الدم بالنسبة إلى  $H_3M$  هو إشارة إلى حدوث إحتشاء عضلة القلب myocardial infraction أو نوبة قلبية heart attack.

## ١٥-٢ التعديل (التحويل) التساهمي هو أحد الطرق لتنظيم نشاط الإنزيمات

إن الارتباط التساهمي لجزئ الإنزيم بجزئ آخر يمكن أن يعدل (يحول) نشاط الإنزيم. والارتباط التساهمي يستخدم أيضاً في تنظيم نشاط عدد من البروتينات غير الإنزيمية. في هذه الحالات فإن الجزئ الذي يرتبط بالإنزيم يوفر جزء فعال الذي يحور خصائص الإنزيم. ومعظم هذه التحورات تكون عكسية. والفسفرة phosphorylation وإزالة الفسفرة dephosphorylation هي أكثر الطرق شيوعاً في التحورات التساهمية ولكنها ليست الطريقة الوحيدة للتحورات التساهمية. فالهستونات Histones- وهي بروتينات التي تساعد في تعبئة DNA في الكروموسومات بالإضافة إلى تنظيم نشاط الجينات- يتم تنظيم نشاطها عن طريق ارتباطها بمجموعة الأسيتايل acetylated وإزالة مجموعة الأسيتايل deacetylated في الكائنات. وفعلياً كل عمليات الأيض تنظم جزئياً بواسطة التحويل التساهمي. وفي الحقيقة فإن الخواص غير الوضعية (الألوستيرية) لعدد من الإنزيمات تحور بواسطة التحويل التساهمي.

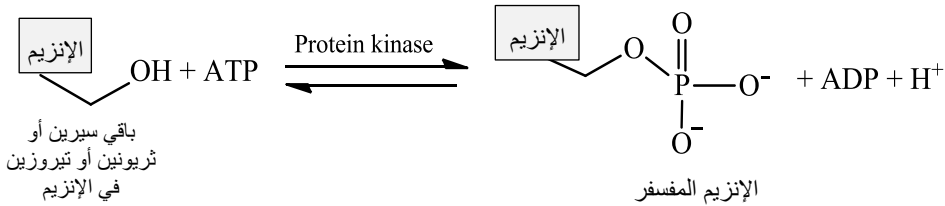


شكل ١٥-١ : نظائر إنزيم لاکتات ديهيدروجينيز (LDH) في الجرزان (أ) نمط تغير نظائر إنزيم LDH في قلب الجرزان أثناء النمو. النظير H معبر عنه بمربعات (■) والنظير M معبر عنه بدائرة (●). الأرقام السالبة والموجبة تشير إلى الأيام قبل وبعد الولادة على التوالي (ب) محتوى نظائر LDH في الأنسجة المختلفة في الجرزان البالغة

## ١٥-٢-١ الفسفرة هي وسيلة فعالة لتنظيم أنشطة عديدة في الإنزيمات والبروتينات

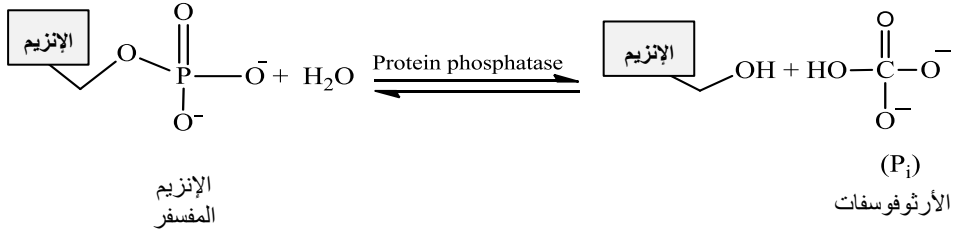
إن نشاط عديد من الإنزيمات (وكذلك قنوات الغشاء وعديد من البروتينات) تنظم بواسطة الفسفرة، وهي تمثل التحوير التساهمي العكسي السائد. وهذه الآلية التنظيمية توجد تقريباً في كل عملية أيضية في الخلايا مميزة النوايا eukaryotic cells. والإنزيمات التي تحفز تفاعلات الفسفرة يطلق عليها إنزيمات فسفرة البروتينات Protein kinases، التي تشكل أحد أكبر فصائل البروتينات المعروفة، حيث يوجد أكثر من 100 إنزيم متناظر في الخميرة وأكثر من 550 في الكائنات البشرية. وهذا العدد الوافر للإنزيمات يسمح للتنظيم أن يكون متوافقاً ودقيقاً اعتماداً على نوع النسيج، الوقت أو المادة الخاضعة (أى نوع الإنزيم أو البروتين المستقبل).

- إن مجموعة الفوسفات الطرفية (جاما  $\gamma$ ) في ATP تنقل إلى مجموعة OH- في باقي السيرين أو الثريونين بأحد أقسام إنزيمات Protein kinases أو إلى باقي التيروسين بواسطة قسم آخر.



البروتينات التي تدخل في تفاعلات الفسفرة توجد داخل الخلايا، حيث يوجد ATP وهو مانح مجموعة الفوسفات بوفرة. والإنزيمات والبروتينات التي توجد خارج الخلايا لا يتم تنظيمها بواسطة الفسفرة العكسية.

- إنزيمات بروتين الفوسفاتيز protein phosphatases تعكس تأثير إنزيمات بروتينات الفسفرة Kinases بحفز إزالة مجموعات الفوسفوريل المرتبطة بالإنزيمات (أو البروتينات) بالتحلل المائي:



وفي هذا التفاعل يعاد توليد مجموعة الهيدروكسيل غير المحورة في السلسلة الجانبية للإنزيم مع إنتاج مجموعة الأرثوفوسفات ( $\text{P}_i$ ).

ومن المهم ملاحظة أن الفسفرة وإزالة الفسفرة ليست عكسية بالنسبة لبعضها البعض، فكل منهما يكون غير عكسي تحت الظروف الفسيولوجية. إضافة إلى ذلك، فإن كلا التفاعلين يحدث بمعدلات يمكن إهمالها في غياب الإنزيمين. ومن ثم فإن فسفرة المادة الخاضعة (الإنزيم أو البروتين) سوف تحدث فقط خلال تأثير إنزيم بروتين الفسفرة Protein kinase خاص على حساب طاقة تحلل ATP، وإزالة الفسفرة سوف تنتج فقط خلال تأثير إنزيم الفوسفاتيز phosphatase. ومعدل الدوران بين الحالة المفسفرة والحالة غير المفسفرة تعتمد على النشاط النسبي لإنزيمات Phosphatases, Kinases.

إن الفسفرة هي وسيلة فعالة جداً للتحكم في نشاط الإنزيمات لأسباب تركيبية وحركة حرارية وحركية وتنظيمية:

١- إن مجموعة الفوسفات تضيف إثنتين من الشحنات السالبة للإنزيم المحور. ومن ثم فإن التأثيرات المتبادلة الكهربائية الساكنة في الإنزيم غير المحور يمكن أن تتغير، وتأثيرات كهربية ساكنة جديدة يمكن أن تتكون. وهذه التغيرات التركيبية يمكن أن تغير ارتباط المادة الخاضعة والنشاط الحفزي للإنزيم.

٢- مجموعة الفوسفات يمكن أن تكون ثلاثة أو أكثر من الروابط الهيدروجينية. إن الشكل الهندسي رباعي الأسطح لمجموعة الفوسفات تجعل هذه الروابط الهيدروجينية عالية التوجيه التي تسمح بالتأثير المتبادل مع مانحات للروابط الهيدروجينية.

٣- إن الطاقة الحرة للفسفرة تكون عالية. فـ ATP يوفر 12- كيلو كالوري لكل مول ( $-12 \text{ kcal/mol}$ )، حوالي نصف هذا المقدار يستهلك في جعل الفسفرة غير عكسية

والنصف الآخر يحفظ في الإنزيم المفسفر. لاحظ أن التغير في الطاقة الحرة بمقدار 1.36 kcal/mol يقابل عامل 10 في ثابت الاتزان. ومن ثم فإن الفسفرة يمكن أن تغير ثابت الاتزان بعامل 10. لذلك فإن الفسفرة يمكن أن تغير ثابت اتزان البنيات الفراغية بين الحالات الفعالة بعامل كبير يصل إلى  $10^4$ .

٤- إن عملية الفسفرة وإزالة الفسفرة يمكن أن تستغرق أقل من ثانية أو تمتد لأكثر من ساعات. إن الحركية يمكن أن تضبط لتلائم الوقت المطلوب لعملية فسيولوجية ما.

٥- الفسفرة كثيراً ما تثير تأثيرات عالية التضخيم. فاجزئ kinase فردي يمكن أن يفسفر مئات من جزيئات الإنزيم المستهدف في وقت قصير.

٦- ATP هو مصدر الطاقة الخلوي المتداول. وإستخدام هذا المركب كمانح لمجموعة الفوسفوريل يربط حالة الطاقة في الخلية بتنظيم الأيض.

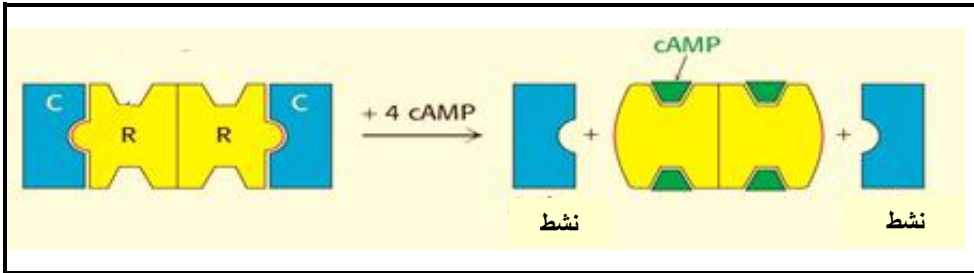
إنزيمات فسفرة البروتين protein kinases تختلف في تخصصها. فإنزيمات فسفرة البروتين المتخصصة يقوم كل منهما بفسفرة بروتين فردي أو عدة بروتينات قريبة الارتباط. وإنزيمات فسفرة البروتينات متعددة الوظائف يمكن أن تحور عديد من المواد الخاضعة المستهدفة.

### ١٥-٢-٢ الأدينوزين أحادي الفوسفات الحلقي (cAMP) ينشط إنزيمات الفسفرة

إنزيمات فسفرة البروتين تعدل نشاط عديد من الإنزيمات (والبروتينات)، ولكن ما الذي يؤدي إلى تنشيط إنزيمات الفسفرة؟ إن التنشيط عادة ما يشتمل على عملية متعددة الخطوات تبدأ بواسطة الهرمونات. في بعض الحالات فإن الهرمونات تحدث تكوين الأدينوزين أحادي الفوسفات الحلقي cyclic AMP (أو cAMP) وهو الجزيء الذي يتكون بعملية حلقة cyclization  $\downarrow$  ATP. و cyclic AMP يعمل كرسول (ناقل) messenger داخل الخلايا في إحداث التأثيرات الفسيولوجية لتأثيرات الهرمونات. والملاحظة الجديرة بالذكر هو أن معظم تأثيرات cyclic AMP في الخلايا مميزة النواة تنجز خلال تنشيط إنزيم فسفرة بروتين فردي بواسطة cyclic AMP. هذا الإنزيم يطلق عليه إنزيم فسفرة البروتين (A) (Protein Kinase A) أو PKA. و PKA يعدل أنشطة البروتينات

المستهدفة بواسطة فسفرة بواقي سيرين أو ثريونين خاصة. وفي الحقيقة فإن PKA يعطي مثال واضح لتكامل كل من التنظيم غير الوضعي والفسفرة.

PKA ينشط بواسطة cAMP، ما هي آلية التنشيط؟ PKA في العضلات يتألف من إثنين من الوحدات الفرعية: الوحدة الفرعية المنظمة (R) التي لها ألفة عالية لـ cAMP، والوحدة الحفزية (C). في غياب cAMP، فإن الوحدات الفرعية المنظمة والحفزية تكون المعقد  $R_2C_2$  الذي يكون غير نشط إنزيمياً. وارتباط إثنين من جزيئات cAMP لكل من الـ R وحدتين المنظمين يؤدي إلى تفكك  $R_2C_2$  إلى وحدة  $R_2$  ووحدتين C. وهذه الوحدات الفرعية الحرة تكون نشطة إنزيمياً (شكل ١٥-٢). ومن ثم فإن ارتباط cAMP للوحدة المنظمة يزيل تثبيطها للوحدة الحفزية. PKA ومعظم إنزيمات الفسفرة الأخرى Kinases توجد في صورة نظائر الإنزيمات isozymes forms للتنظيم الدقيق الذي يفي باحتياجات نوع خاص من الخلايا أو مرحلة نمو ما.



شكل ١٥-٢ تنظيم إنزيم فسفرة البروتين A (PKA). ارتباط أربع جزيئات من cAMP تنشط إنزيم فسفرة البروتين A (pK<sub>a</sub>) بواسطة تفكيك الإنزيم الكامل المثبط  $R_2C_2$  إلى الوحدة الفرعية المنظمة  $R_2$  وإثنين من الوحدات الفرعية النشطة C.

### ١٥-٢-٣ تنظيم أيض الجلايكوجين ودور إنزيمات الفسفرة

أوضحنا سابقاً أن تعديل نشاط إنزيمات فسفرة البروتين عادة ما تشتمل على عملية متعددة الخطوات تبدأ بواسطة الهرمونات. دعنا الآن نرى الارتباط بين الهرمونات التي تؤثر على أيض الجلايكوجين وتفاعلات الفسفرة التي تحدد نشاط كل من الإنزيمين

glycogen synthetase والـ phosphorylase في خلايا العضلات. ويوضح شكل ١٥-٣ سلسلة الاستحثاث الهرموني لأبيض الجلايكوجين في العضلات.

١- يتحرر هورمون إبينيفرين epinephrine من غدة الكظر إلى الدم إستجابة لإنخفاض مستوى الجلوكوز في الدم.

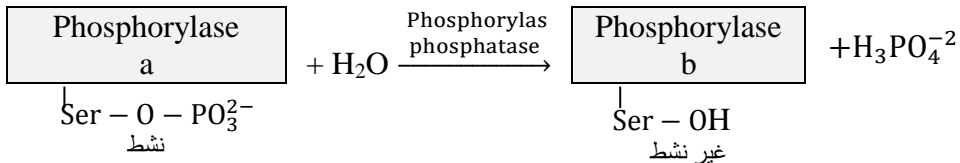
٢- يرتبط epinephrine بالغشاء البلازمي لخلايا العضلات الذي يستحث إنزيم adenylate cyclase.

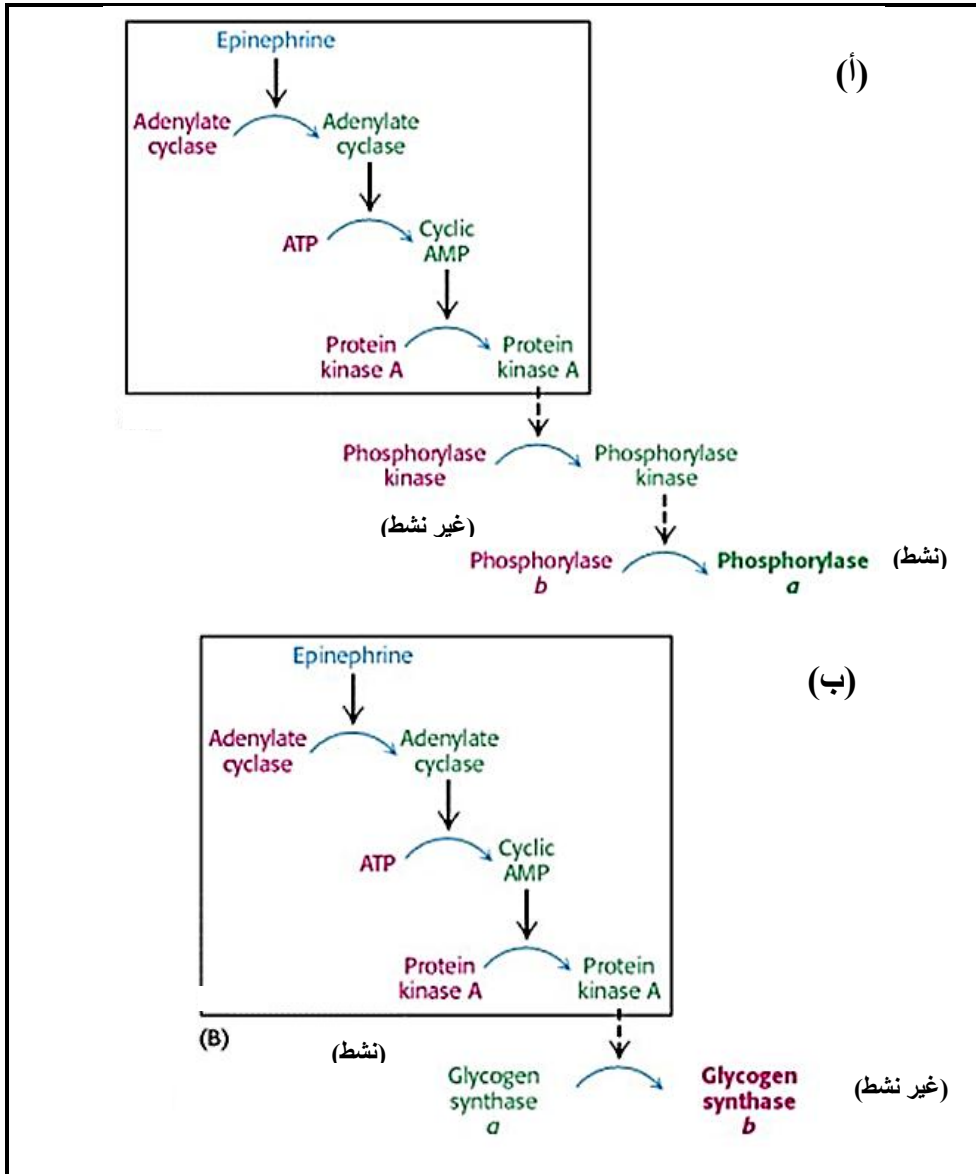
٣- إنزيم adenylate cyclase في الغشاء البلازمي يحفز تكوين cAMP من ATP.

٤- إرتفاع مستوى cAMP داخل الخلايا ينشط إنزيم protein kinase، وهذا الإنزيم يكون غير نشط في غياب cAMP، وإرتباط cAMP ينشط إنزيم protein kinase.

٥- إنزيم protein kinase (المعتمد على cAMP) يقوم بفسفرة كل من الإنزيمين glycogen synthetase, phosphorylase kinase. إن فسفرة كل من الإنزيمين هو أساس التنظيم المتناسق لتخليق وتفكيك الجلايكوجين. فالفسفرة المعتمدة على cAMP لإنزيم glycogen synthetase يؤدي إلى تثبيط الإنزيم ووقف تخليق الجلايكوجين، بينما فسفرة إنزيم Phosphorylase kinase في نفس الوقت يؤدي إلى تحول إنزيم phosphorylase من الصورة غير النشطة b إلى الصورة النشطة a الذي يفكك الجلايكوجين إلى جلوكوز ١-فوسفات.

إن التغير في النشاط الإنزيمي الذي ينتج بعملية الفسفرة يمكن عكسه بإزالة مجموعة الفوسفوريل بالتحلل المائي، فعلى سبيل المثال، فإن تحول phosphorylase a إلى phosphorylase b يحفز بواسطة إنزيم phosphorylase phosphatase.





شكل ١٥-٣ سلسلة التفاعلات التي تتحكم في أيض الجلايكوجين (أ) تفكك الجلايكوجين (ب) تخليق الجلايكوجين. وسلسلة التفاعلات تؤدي إلى تنشيط Protein kinase A الذي يؤدي إلى تثبيط إنزيم glucogen synthetase (الذي يؤدي إلى وقف تكوين الجلايكوجين) وفي نفس الوقت ينشط إنزيم phosphorylase الذي يؤدي إلى تفكك الجلايكوجين إلى جلوكوز.



وهذا الإنزيم أيضاً يزيل مجموعة الفوسفوريل من الصورة النشطة لإنزيم Phosphorylase kinase الذي يتحول إلى الصورة غير النشطة. إضافة إلى ذلك فإن نفس إنزيم الـ phosphatase أيضاً يزيل مجموعة الفوسفوريل من إنزيم glycogen synthetase b ليحوّله إلى الصورة a الأكثر نشاطاً. من ناحية أخرى فإن نشاط إنزيمات الـ phosphatases يكون تحت تحكم تنظيمي.

### ١٥-٣ عديد من الإنزيمات يتم تنشيطها بالتحلل البروتيني المتخصص

ننتقل الآن إلى آلية مختلفة لتنظيم نشاط الإنزيمات. فعدد من الإنزيمات تكتسب نشاطها الحفزي الكامل بمجرد أن تطوى تلقائياً إلى بنيتها الفراغية ثلاثية الأبعاد المميزة. بالمقابل فإن إنزيمات أخرى تخلق كمادة بادئة غير نشطة ثم تنشط فيما بعد بشطر (تفكك) واحد أو عدة روابط ببتيدية خاصة. والمادة البادئة غير النشطة يطلق عليها مولد الإنزيم Zymogen (أو بشير الإنزيم Proenzyme). وهذا الانشطار لا يحتاج إلى مصدر للطاقة (مثل ATP). ومن ثم فإنه مقارنة بالتنظيم العكسي بالفسفرة، فإن البروتينات التي توجد خارج الخلايا بالتوازي يمكن أن تنظم بهذه الوسيلة. والاختلاف الآخر الجدير بالملاحظة هو أن التنشيط بالانشطار البروتيني بالمقارنة بالتحكم غير الوضعي والتحويل التساهمي العكسي يحدث مرة واحدة أثناء فترة بقاء جزئ الإنزيم. التحلل البروتيني الخاص هو وسيلة شائعة لتنشيط الإنزيمات (والبروتينات الأخرى) في الأنظمة البيولوجية. فعلي سبيل المثال:

١- إنزيمات الهضم التي تفكك البروتينات بالتحلل المائي تخلق في صورة مولدات الإنزيمات في المعدة والبنكرياس (جدول ١٥-١).

٢- تجلط الدم يحدث بواسطة سلسلة متعاقبة من التنشيط بالتحلل البروتيني التي تضمن إستجابة سريعة مسهبة للجرح.

٣- بعض الهرمونات البروتينية تخلق في صورة أولية (بشير) Precursor مثال ذلك فإن الإنسولين insulin يشتق من بشير الأنسولين proinsulin بإزالة ببتيده بالتحلل البروتيني.

٤- الموت المبرمج للخلية apoptosis يحدث بواسطة إنزيمات تحلل بروتيني يطلق عليها caspases التي تخلق في صورة أولية ك procaspases

جدول ١٥-١ مولدات الإنزيمات المعدية والبنكرياسية

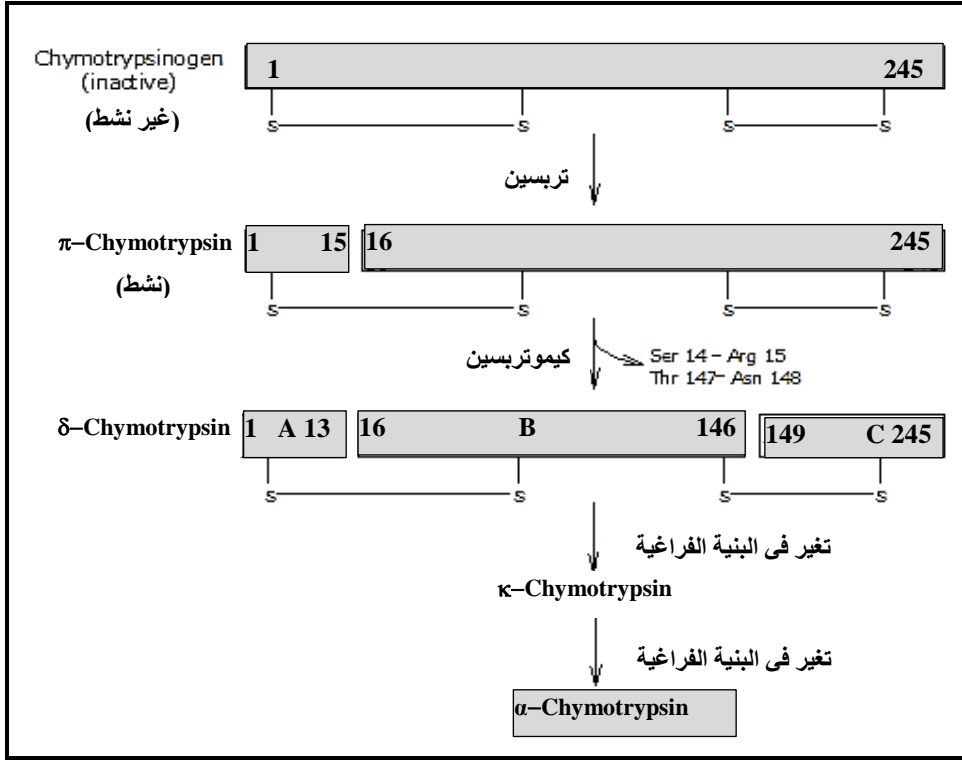
| موضع التخليق | مولد الإنزيم        | الإنزيم النشط                       |
|--------------|---------------------|-------------------------------------|
| المعدة       | Pepsinogen          | (بيبسين) Pepsin                     |
| البنكرياس    | Chymotrypsinogen    | (كيموتريرسين) Chemotrypsin          |
| البنكرياس    | Trypsinogen         | (تريرسين) Trypsin                   |
| البنكرياس    | Procarboxypeptidase | (كاربوكسي ببتيداز) Carboxypeptidase |
| البنكرياس    | Proelastase         | (الإستاز) Elastase                  |

وفي الجزء التالي سوف نفحص تنشيط والتحكم في مولد الإنزيم بإستخدام الكيموتريرسينوجين والتريرسينوجين كمثالين:

### ١٥-٣-١ الكيموتريرسينوجين ينشط بتفكك خاص لرابطة ببتيدية واحدة

الكيموتريرسين هو إنزيم هضمي الذي يحلل مائياً بروتينات الغذاء في الأمعاء الدقيقة. ومولد الإنزيم غير النشط كيموتريرسينوجين يخلق في البنكرياس حيث يتخلق أيضاً مولدات إنزيمات أخرى وإنزيمات الهضم. وفي الحقيقة فإن البنكرياس هو أكثر الأعضاء نشاطاً في تخليق وإفراز البروتينات. والإنزيمات ومولدات الإنزيمات تخلق في خلايا acinar في البنكرياس وتخزن داخل حبيبات محاطة بغشاء. وحبيبات مولد الإنزيم تجمع عند قمة خلايا الـ acinar، وعندما تستحث الخلية بإشارة هرمونية أو نبضة عصبية، فإن محتويات الحبيبات تحرر إلى قناة التي تؤدي إلى الأثنى عشر.

الكيموتريرسينوجين، وهو سلسلة عديد ببتيد فردية يتألف من بواقي 245 حمض أميني، كما أنه يحتوي على خمسة من الروابط الثنائية الكبريتيد المتقاطعة. والكيموتريرسينوجين يكون فعلياً مجرد من أى نشاط إنزيمي. ويتحول إلى الإنزيم كامل النشاط عند فك



شكل ١٥-٤ التنشيط المعتمد على التحلل البروتيني للكينوترسينوجي. الثلاث سلاسل ل-α-كينوترسين ترتبط مع بعضها بواسطة اثنين من الروابط ثنائية الكبريتيد بين السلاسل (A مع B، B مع C)

الرابطة الببتيدية التي تربط الأرجنين 15 والأيسوليوسين 16 بواسطة الترسيين (شكل ١٥-٤). والإنزيم النشط الناتج يطلق عليه باي-كينوترسين π-chymotrypsin، يعمل على جزيئات باي كيموترسين الأخرى. ونتيجة لذلك يزال اثنين من الببتيدات لينتج دلتا - كيموترسين δ-chymotrypsin. والسلاسل الثلاثة الناتجة في دلتا-كينوترسين تبقى مرتبطة مع بعضهما البعض بواسطة اثنين من الروابط ثنائية الكبريتيد بين السلاسل. ودلتا كيموترسين يدخل في تغير للبنية الفراغية ويتحول إلى كابا كيموترسين κ-chymotrypsin ثم إلى ألفا كيموترسين α-chymotrypsin (شكل ١٥-٤). والسمة اللافتة للنظر في عملية التنشيط هذه هو أن شطر رابطة ببتيدية واحدة يحول صورة البروتين غير النشط حفزاً إلى الصورة كاملة النشاط.

### ١٥-٣-٢ تنشيط الكيموتريبسينوجين بالتحلل البروتيني يؤدي إلى تكوين موقع ارتباط المادة الخاضعة

كيف يمكن لإنشقاق رابطة ببتيديّة واحدة أن تنشط مولد الإنزيم؟ المفتاح لذلك هو تغيير البنية الفراغية التي تم الكشف عنها من التركيب ثلاثي الأبعاد الذي يحدث من تحول الكيموتريبسينوجين إلى الكيموتريبسين نتيجة لفك الرابطة الببتيديّة بين الأحماض الأمينية 15 و 16.

١- مجموعة الأمينو-الطرفية في الأيسوليوسين 16 المتكونة حديثاً تتحرك إلى الداخل وتكون رابطة أيونية مع الأسبارتات 194 في الجزء الداخلي من جزئ الكيموتريبسين. وارتباط البروتون مع مجموعة الأمين يثبت الصورة النشطة للكيموتريبسين.

٢- وهذا التأثير المتبادل الكهربائي الساكن يحدث عدد من التغيرات في البنية الفراغية. فالمثيونين 192 يتحرك من موقع عميق مطمور في مولد الإنزيم إلى السطح في الإنزيم النشط، وبواقي الأحماض الأمينية 187 و 193 تصبح أكثر امتداداً. هذه التغيرات تؤدي إلى تكوين موقع متخصص للمادة الخاضعة التي تشتمل على مجموعات عطرية ومجموعات كبيرة غير قطبية.

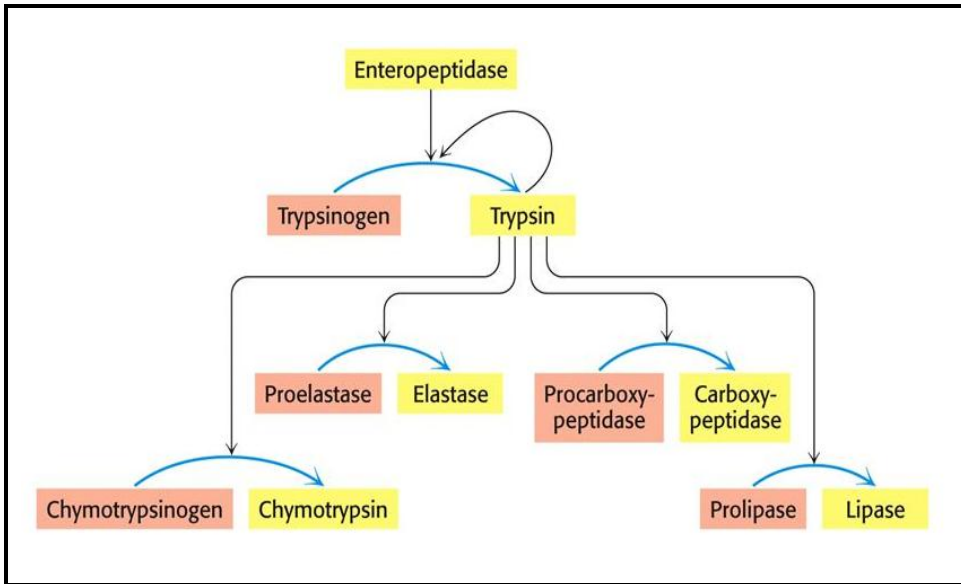
٣- إن التغيرات في البنية الفراغية في أي مكان آخر في الجزئ تكون صغيرة جداً. ومن ثم فإن الانتقال في النشاط الإنزيمي في البروتين يمكن إنجازه بتغيرات متمركزة منفصلة في البنية الفراغية التي تحدث بالتحلل المائي لرابطة ببتيديّة فردية.

### ١٥-٣-٣ توليد تريسين من تريسينوجين يؤدي إلى تنشيط مولدات إنزيمات أخرى

إن التغيرات المصاحبة لتنشيط تريسينوجين trypsinogen وهو المادة البادئة للإنزيم المحلل للبروتين تريسين trypsin تكون مختلفة لحد ما عن تلك التي تحدث في تنشيط كيموتريبسينوجين، بالرغم من أن عملية التنشيط في كلاهما تتم بتفكيك رابطة ببتيديّة واحدة.

فقد أوضح التحليل بأشعة إكس X-ray analysis أن التغير في البنية الفراغية لأربع مناطق (قطاعات) لسلسلة عديد الببتيد، تشكل حوالي 15% من الجزئ تتغير بوضوح بالتنشيط.

إن هضم البروتينات في الاثني عشر يحتاج إلى عمل متزامن من عدة إنزيمات محللة للبروتين، لأن كل منها يكون متخصصاً لعدد محدد من السلاسل الجانبية للأحماض الأمينية حول الرابطة الببتيدية. ومن ثم فإن مولدات الإنزيمات يجب أن تتحول إلى الصور النشطة في نفس الوقت. والتحكم المتناسق ينجز بعمل الترسين كمنشط عام لكل مولدات الإنزيمات البنكرياسية: ترسينوجين، كيموترسينوجين، بروالستاز Proelastase، بروكاربوكسي ببتيداز Procarboxypeptidase وبروليباز Prolipase وهو الإنزيم المحلل للبيدات. وإنتاج الترسين النشط، فإن الخلايا المبطنة للإثنا عشر تفرز أحد الإنزيمات enteropeptidase الذي يحلل مائياً رابطة ببتيدية فردية بين لايسين- أيسوليوسين في ترسينوجين بمجرد دخول ترسينوجين الاثنا عشر من البنكرياس. والكمية الصغيرة من الترسين الناتجة بهذه الطريقة تنشط مزيد من ترسينوجين ومولدات الإنزيمات الأخرى (شكل ١٥-٥). وبذلك فإن تكوين الترسين بواسطة enteropeptidase هو خطوة نشطة.



شكل ١٥-٥ تنشيط مولد الإنزيم بواسطة التفكك المائي للبروتين. إنزيم enteropeptidase يبدأ بتنشيط مولدات الإنزيمات البنكرياسية بتنشيط الترسين الذي يقوم بدوره في تنشيط مولدات الإنزيمات الأخرى

### ١٥-٣-٤ بعض إنزيمات التحلل البروتيني لها مثبطات خاصة

إن تحول مولد الإنزيم إلى الإنزيم النشط بشرط رابطة ببتيديّة واحدة هو وسائل دقيقة لتحول النشاط الإنزيمي. مع ذلك، فإن خطوة التنشيط تكون غير عكسية، لذلك يكون مطلوباً آليات أخرى لوقف التحلل البروتيني. من أجل ذلك تستخدم مثبطات إنزيم التحلل البروتيني للقيام بهذه المهمة. فعلى سبيل المثال، فإن مثبط بنكرياسي للترسين - وهو بروتين له كتلة 6 كيلو دالتون  $6 - kd$  - يثبط الترسين بالإرتباط بقوة بالموقع النشط للإنزيم. إن ثابت التفكك لهذا المعقد يساوي ١. بيكومولر (0.1 PM)، الذي يقابل طاقة حرة قياسية للإرتباط تقدر بـ  $18 \text{ kcal mol}^{-1}$ . وبالمقارنة مع كل المعقدات البروتينية المعروفة، فإن هذا المعقد البروتيني للترسين- المثبط (البروتيني) لا يتفكك إلى مكوناته بالمعاملة بالعوامل المحدثة لتغير طبيعة البروتين مثل اليوريا بتركيز 8M. والسبب في ذلك الثبات الإستثنائي هو أن مثبط الترسين يعمل ك مناصر للمادة الخاضعة.

### ١٥-٤ متحية الإنزيم (تنظيم كمية الإنزيم)

أى إنزيم هو بروتين في جوهرة، فهو يصنّع من الأحماض الأمينية تحت التحكم الجيني، ويتحلل (يتفكك) ثانية إلى الأحماض الأمينية بعد قيامه بعمله. وكمية إنزيم ما تعتمد على معدّل تصنيعه ومعدّل تفككه. والتصنيع والتفكك الإجمالي لإنزيم ما الذي يطلق عليه أيضاً رقم التحول turnover number هو أحد الطرق لتنظيم كمية إنزيم ما. والإنزيمات الخلوية تصنف إلى نوعين:

أ- الإنزيمات الأساسية (البنوية) constitutive enzymes (أو إنزيمات إدارة شئون الخلية house-keeping enzymes) هي تلك التي توجد بتركيز ثابت أثناء فترة حياة الخلية. مثال ذلك الإنزيمات التي تشارك في مسارات الأيض المركزية مثل إنزيمات الإنحلال السكري. وثبات تركيز الإنزيمات الأساسية ينجز تقريباً بواسطة العلاقة الثابتة بين عمليات تصنيع الإنزيم وعمليات تفككه. إن تعرض الإنزيم للتفكك يعتمد على بنيته الفراغية. إن وجود المادة الخاضعة، العامل المساعد أو أيونات

المعادن المنشطة تخفض التغير في البنية الفراغية للإنزيم ومن ثم خفض معدل تفككه.

ب- الإنزيمات المستحثة induced enzymes (أو الإنزيمات المكيفة adapted enzymes) هي الإنزيمات التي تتغير كميتها اعتماداً على إحتياج الخلية. فقد تحتوي الخلية على كمية صغيرة جداً من الإنزيم، ولكن كميته يمكن أن ترتفع إلى ألف ضعف أو أكثر عند إحتياج الخلية للإنزيم وذلك بزيادة معدل تصنيع أو استحداث تصنيع الإنزيم. وتنظيم كمية الإنزيم بهذه الطريقة ينجز خلال التحكم في تعبير الجينات بإستخدام المستحاثات inducers والكابحات repressors. فعلى سبيل المثال عند تنمية بكتريا القولون *E. coli* على بيئة تحتوي على جلوكوز فإن كل خلية تحتوي تقريباً على حوالي عشرة جزيئات من إنزيم  $\beta$ -galactosidase (الذي يحلل سكر اللاكتوز إلى جلوكوز وجالاکتوز) ولكن عند نقل البكتريا إلى بيئة تحتوي على لاكتوز كمصدر وحيد للطاقة والكربون، فإنه خلال دقيقة أو دقيقتين تقوم الخلايا ببناء إنزيم  $\beta$ -galactosidase بكميات كبيرة ويصبح عدد نسخ الإنزيم في كل خلية حوالي ألف أو أكثر. ويقوم إنزيم  $\beta$ -galactosidase المتكون بتحليل اللاكتوز إلى جلوكوز وجالاکتوز اللذان يمكن إستخدامهما بواسطة الخلية كمصدر للطاقة والكربون. وبناءً على ذلك، فإن إنزيم  $\beta$ -galactosidase يعتبر إنزيم مستحث induced enzyme، حيث يستحث تصنيعه بوجود المادة الخاضعة وهي اللاكتوز. ويتكون أيضاً إثنين من البروتينات الأخرى مع  $\beta$ -galactosidase هما thiogalactosid transacetylase, galactoside permease وبينما يقوم البروتين الأول بنقل اللاكتوز إلى داخل الخلية فإن الوظيفة البيولوجية للبروتين الثاني غير معروفة على وجه اليقين. في غياب اللاكتوز فإن بروتين كابح repressor (في حالة اللاكتوز يعرف بـ lac repressor) يرتبط بموقع خاص على DNA ويمنع نسخ جينات البروتينات الثلاثة نتيجة لإعاقته دخول إنزيم بلمرة RNA الذي يقوم بعملية النسخ. أما في وجود اللاكتوز، فإنه تتكون كمية صغيرة ألولاکتوز

allolactose الذي يعمل كمستحث inducer حيث يرتبط بالبروتين الكابح ويمنع ارتباطه بـ DNA ويبدأ نسخ الجينات. وتوجد أمثلة عديدة للإنزيمات المستحثة في كل من الكائنات أولية النواة والكائنات مميزة النواة التي تتم بالدرجة الأولى عند مستوى النسخ وفي بعض الحالات عند مستوى الترجمة. مثال ذلك أن بعض الإنزيمات المسؤولة عن أيض الجلوكوز يمكن أن تستحث بزيادة كمية الجلوكوز في الحيوان عن الكمية المطلوبة. وبالمثل فإن بعض الإنزيمات المشتملة في الأيض الهدي للأحماض الأمينية يستحث تصنيعها إما بالجرعات الزائدة من الأحماض الأمينية بذاتها أو بواسطة بعض الهرمونات.

## أسئلة

- ١- ما أهمية وجود نظائر الإنزيمات في أنسجة الكائن أو مراحل نمو مختلفة؟
- ٢- لماذا تعتبر الفسفرة آلية شائعة في تنظيم نشاط الإنزيمات؟
- ٣- عند إضافة تركيز منخفض من بيسينوجين إلى وسط حامضي، كيف تعتمد فترة نصف العمر للتنشيط على تركيز مولد الإنزيم؟
- ٤- أكتب الآلية بالتفصيل لتحويل الأسبارتات وكارباميل فوسفات إلى N- كارباميل أسبارتات متضمنا دور بواقي هستيدين الذي يوجد في الموقع النشط.
- ٥- أكتب الآلية بالتفصيل لفسفرة بواقي السيرين بواسطة ATP الذي يحفز بواسطة Protein kinase. ما هي المجموعات التي تتوقع أن توجد في الموقع النشط في الإنزيم.





## ملحق (١)

### النظام الدولي للوحدات والثوابت International System of Units and Constant

إن تقدير الخواص الطبيعية للكون يكون قياساً نسبياً فقط، بمعنى أنه لا يوجد مقياس مطلق لهذه الخواص، ولكن يتم القياس بالنسبة لمقادير قياسية يطلق عليها الوحدات units. ولقد تعددت الوحدات بتعدد الدول وبمرور الزمن الذي أحدث تغيرات على الوحدات المستخدمة كلما دعت الحاجة إلى ذلك. ولقد وجدت الهيئات العلمية ضرورة الاتفاق على وحدات أساسية Basic units تتصف بسهولة الاستعمال وسهولة اشتقاق وحدات أخرى منها. ونظام الوحدات الشائع الاستخدام في الوقت الحالي على المستوى الدولي في المجالات العلمية بصورة خاصة وفي المجالات الأخرى بصورة عامة هو ما يسمى بالنظام الدولي للوحدات International System of Units ويختصر إلى (SI).

#### ١-١ الوحدات الأساسية

يعتمد النظام الدولي للوحدات على سبع وحدات أساسية موضحة بالجدول (١-١).

#### جدول ١-١ أسماء ورموز الوحدات الأساسية في النظام الدولي للوحدات

| الوحدات تتبعاً لنظام SI |          | الرمز شائع    | إسم الكمية                   |
|-------------------------|----------|---------------|------------------------------|
| الرمز                   | الإسم    | الاستعمال     |                              |
| m                       | Meter    | المتر         | الطول                        |
| kg                      | Kilogram | كيلو جرام     | الكتلة                       |
| s                       | Second   | ثانية         | الزمن                        |
| A                       | Ampere   | أمبير         | التيار الكهربائي             |
| °K                      | Kelvin   | كلفن          | درجة الحرارة الترموديناميكية |
| Mol                     | Mole     | مول           | كمية المادة                  |
| cd                      | Candela  | شمعة (قنديلة) | شدة الإضاءة                  |

والوحدات الأساسية في جدول أ-١ قد تكون أكبر أو أصغر من الكميات المراد تقديرها. ولهذا فإن النظام الدولي للوحدات يعبر عن مضاعفات الوحدة أو أجزاء منها بإضافة مقطع سابق يسبق إسم الوحدة. ومدون في جدول أ-٢ المقاطع شائعة الاستعمال والرموز المعطاء لها.

### جدول أ-٢ المقاطع المعبرة عن الأجزاء والمضاعفات لوحدات النظام الدولي

| الجزء             | المقطع | الرمز | المضاعفات | المقطع | الرمز  |    |
|-------------------|--------|-------|-----------|--------|--------|----|
| 10 <sup>-1</sup>  | ديسي   | deci  | d         | ديكا   | Deca   | da |
| 10 <sup>-2</sup>  | سنتي   | centi | c         | هكتو   | Hector | h  |
| 10 <sup>-3</sup>  | ميلي   | Miili | M         | كيلو   | Kilo   | K  |
| 10 <sup>-6</sup>  | ميكرو  | Micro | μ         | ميغا   | Mega   | M  |
| 10 <sup>-9</sup>  | نانو   | Nano  | N         | جيجا   | Giga   | G  |
| 10 <sup>-12</sup> | بيكو   | Puco  | P         | تيرا   | Tera   | T  |
| 10 <sup>-15</sup> | فمتو   | Femto | F         | بيتا   | Peta   | P  |
| 10 <sup>-18</sup> | آتو    | Atto  | A         | إكزا   | Exa    | E  |

وهناك العديد من الوحدات التي ما زالت شائعة الاستعمال في المجال العلمي، وإن لم تكن من وحدات النظام الدولي. فمن وحدات الطول الشائعة الاستخدام في المجال العلمي هي وحدة الانجستروم ( $\text{\AA}$ ) angstrom وقيمة  $10^{-10} \text{ m} = 1 \text{\AA}$ ، وكذلك وحدة مليمكرون

$$1 \text{ m}\mu = 1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m} \text{ وقيمه } \text{millimicron (m}\mu\text{)}$$

وتدرج الحرارة المطلق الذي يعتمد على خواص الغاز المثالي (ترموتر الغاز المثالي) هو الذي يستخدم في المجالات العلمية. ودرجة الحرارة على هذا التدرج تعرف بدرجة الحرارة المطلقة absolute temperature، ووحدة هذه الدرجة هي كالفن ( $^{\circ}\text{K}$ ). أما تدرج درجة الحرارة شائع الاستخدام في المجالات غير العلمية خلاف تدرج النظام الدولي هو التدرج المئوي أو سلسيس Celsius نسبة إلى العالم الفلكي السويدي Anders Celsius. وفي هذا التدرج تعرف درجة تجمد الماء بـ  $0.0^{\circ}\text{C}$  ودرجة غليان الماء  $100.0^{\circ}\text{C}$ ، ويطلق على كل درجة على هذا المقياس إسم واحد درجة مئوية  $1^{\circ}\text{C}$ . والعلاقة بين التدرج المطلق والمئوي هي:

$$^{\circ}\text{K} = ^{\circ}\text{C} + 273.15$$

وعليه يتضح أن مقدار الدرجة المطلقة والدرجة المئوية متساوى والخلاف بينهما هو أن الصفر المطلق مزاح من الصفر المئوي بمقدار ٢٧٣.١٥ درجة. وفي الولايات المتحدة يستخدم التدرج الفهرنهايتي Fahrenheit في المجالات غير العلمية. وفي هذا التدرج تعرف درجة تجمد الماء بـ  $32^{\circ}\text{C}$  ودرجة غليان الماء  $212^{\circ}\text{F}$ ، والعلاقة بين التدرج الفهرنهايتي والمئوي هي:

$$^{\circ}\text{F} = (1.8 \times ^{\circ}\text{C}) + 32^{\circ}\text{F}$$

$$^{\circ}\text{C} = 5/9 (^{\circ}\text{F} - 32)$$

#### أ-٢ الوحدات المشتقة

في السابق عرفنا سبع وحدات أساسية لا تعتمد في تعريفها على غيرها في التحديد. وكل الكميات يمكن التعبير عنها بواسطة هذه الوحدات والوحدات المشتقة منها التي يتحصل عليها جبرياً بالضرب و/ أو القسمة للوحدات الأساسية. فالمساحة مثلاً تعرف بأنها مربع الطول أو الطول مضروب في العرض، وعليه فإن وحدة المساحة هي مربع وحدة الطول، أي  $m \times m = m^2$ . وجدول أ-٣ يعطي وحدات الكميات المشتقة حسب النظام الدولي للوحدات.

### جدول أ-٣ وحدات مشتقة تتبع النظام الدولي للوحدات

| الكمية              | الرمز     | التعريف                                         | الوحدة                                                 |
|---------------------|-----------|-------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| المساحة             | A         | مربع الطول                                      | $m^2$                                                  |
| الحجم               | V         | مكعب الطول                                      | $m^3$                                                  |
| الكثافة             | $\rho$    | الكتلة على وحدة الحجم                           | $Kg\ m^3$                                              |
| السرعة              | v         | المسافة على وحدة الزمن                          | $ms^{-1}$                                              |
| العجلة              | A         | تغير السرعة على وحدة الزمن                      | $ms^{-2}$                                              |
| القوة               | F         | الكتلة مضروبة في العجلة                         | $Kg\ ms^{-2}m^{-2} (=Newton.N)$                        |
| الضغط               | P         | القوة على وحدة السطح                            | $Kg\ ms^{-2}m^{-2} (=pascal, Pa)$                      |
| الطاقة              | E         | مضروب القوة في المسافة                          | $Kg\ m^{-1}s^{-2} = joule\ J=Nm$                       |
| القدرة              | P         | معدل تغير الطاقة على الزمن                      | $Kg\ m^2\ s^{-3} = Js^{-1} = wat, w$                   |
| الشحنة الكهربائية   | C         | التيار مضروب في الزمن                           | $VA^{-1} = AsV^{-1} = Farad, F\ s^{-1} =$<br>Hertz, Hz |
| الجهد الكهربائي     | V, $\phi$ | القدرة مقسومة على التيار                        | $WA^{-1} = JA^{-1}s^{-1} = Volt.v$                     |
| المقاومة الكهربائية | $\Omega$  | الجهد الكهربائي مقوم على التيار                 | $CV^{-1} = AsV^{-1} = Farad, F$                        |
| التردد              | v         | واحد على الزمن<br>(عدد الذبذبات في ثانية واحدة) | $s^{-1} = Hertz, Hz$                                   |

جدول أ-٤ ثوابت فيزيائية وكيميائية ورياضية

| الثابت             | الرمز    | القيمة                                       |
|--------------------|----------|----------------------------------------------|
| رقم أفاجاردو       | $N_A$    | $6.022045 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$   |
| وحدة الكتلة الذرية | amu      | $1.661 \times 10^{-24} \text{ g}$            |
| كتلة الإلكترون     | $m, m_e$ | $9.1091 \times 10^{-31} \text{ kg}$          |
|                    |          | $٥.٤٨٦٠ \times 10^{-٤} \text{ amu}$          |
|                    |          | 0.5110 MeV                                   |
| كتلة البروتون      | $m_p$    | $1.6726485 \times 10^{-27}$                  |
|                    |          | 1.007276470 amu                              |
| ثابت بولتزمان      | $K_B$    | $1.380662 \times 10^{-23} \text{ JK}^{-1}$   |
| ثابت بلانك         | $h$      | $6.626176 \times 10^{-34} \text{ J s}$       |
|                    |          | $6.626176 \times 10^{-27} \text{ erg s}$     |
| ثابت الغاز         | $R$      | $8.31441 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  |
|                    |          | $1.9872 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ |
| ثابت فاراداي       | $F$      | $9.64867 \times 10^{-4} \text{ C mol}^{-1}$  |
| سرعة الضوء         | $c$      | $2.99792458 \times 10^8 \text{ m s}^{-1}$    |
| نصف قطريوهر        | $a_0$    | $0.52917706 \times 10^{-10} \text{ m}$       |

## ملحق (ب)

### برامج الحاسوب ومواقع الشبكة العنكبوتية الخاصة بالإنزيمات

---

#### ١- برامج الحاسوب لتحليل بيانات حركات الإنزيم

في دراستنا لحركات الحالة الثابتة للإنزيمات، فإنه طرح نوعين من الأسئلة: الأول ما هو النموذج الرياضي الذي يصف البيانات؟ والثاني هو كيف للمعلمات الحركية أن تتغير مع تغير خاص في ظروف التفاعل، وهل هذه التغيرات معنوية؟. وفي فصول هذا الكتاب قد تم إشتقاق النماذج الرياضية mathematical models أو المعادلات equation للحالات المختلفة. وقيم المعلمات الحركية تنتج من تطابق البيانات التجريبية مع المعادلة المناسبة. والسؤال الثاني يتم الإجابة عليه بمقارنة المعلمات الحركية تحت ظروف مختلفة. وفي معظم الحالات، فإنه يتم تطابق البيانات مع المعادلات بواسطة برامج الحاسوب Computer program.

إن النموذج (المعادلة) الرياضي هو معادلة التي تحتوي على متغير معتمد dependent variable عادة السرعة الابتدائية (ب) وواحد أو أكثر من المتغيرات المستقلة independent variable مثل تركيز المادة الخاضعة (s) وواحد أو أكثر من المعلمات الحركية مثل ثابت ميكليس  $K_m$ . فعلى سبيل المثال إذا كانت المعادلة الرياضية (النموذج الرياضي) هي معادلة ميكليس- منتين لمادة خاضعة فردية (معادلة ٦-٢٥)، فإن المطلوب هو إيجاد القيم المثلى لكل من  $K_m$  و  $V_{max}$  بحيث أن السرعة الابتدائية المحسوبة عند كل تركيز تجريبي تكون قريبة بقدر الإمكان للقيمة المقاسة تجريبياً.

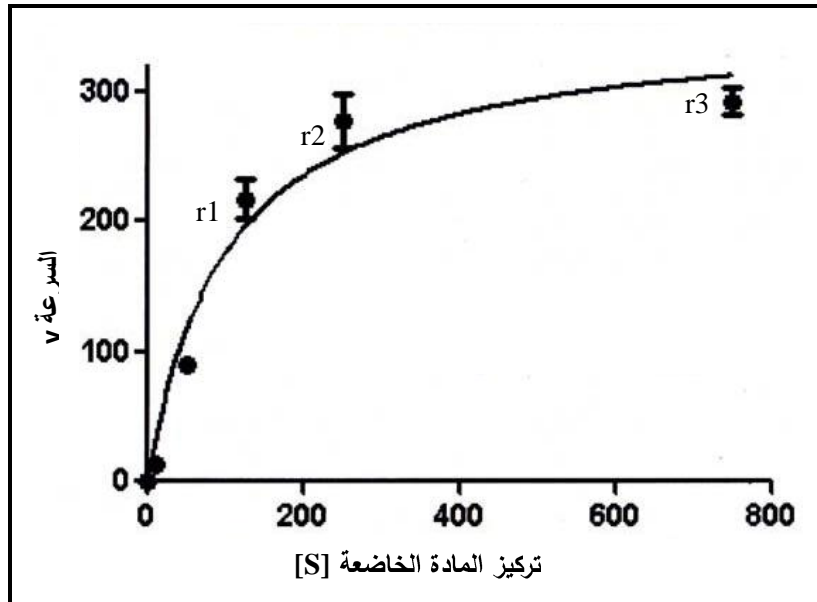
$$v = \frac{V_{max} * (S)}{K_m + (S)} \quad \text{ب-١}$$

لذلك تستخدم الطرق الإحصائية للتأكد من الوصول إلى أفضل تطابق بين السرعة المحسوبة والسرعة التجريبية - بتقدير جودة التطابق goodness - of - fit وتقدير درجة الثقة degree of confidence في قيم المعلمات الحركية  $K_m$  و  $V_{max}$ .  
إن دالة مربعات أقل خطأ  $s^2$ , least - square: function, هي مجموع مربعات الفروق بين القيم التجريبية  $v_{exp}$  والقيم المحسوبة  $v_{cal}$  للمتغير المعتمد (معادلة ب-٢ وشكل ب-١)، وهي حتى الآن الأوسع استخداماً في تقدير جوده التطابق.

$$s^2 = \sum (r^2)$$

$$s^2 = \sum (v_{exp} - v_{cal})^2$$

$$s^2 = \sum \left\{ v_{exp} - \frac{(S_{exp}) * V_{max}}{(S_{exp}) + K_m} \right\}^2 \quad (\text{ب-٢})$$



شكل ب-١ الانحرافات r بين القيم التجريبية والقيم المحسوبة



وتطبيق معادلة ب-٣ تحتاج إلى بعض الافتراضات:

- ١- الخطأ المحسوس يكون في المتغير المعتمد (السرعة الابتدائية في حالتنا هذه) الذي يمكن خفضه بأخذ الإحتياطات التجريبية (فصل ١٠)
  - ٢- كل نقط البيانات متساوية الدقة (أى لها نفس الإنحراف القياسى)
  - ٣- كل الأخطاء التجريبية تكون عشوائية ولا يوجد إخطاء نظامية)
  - ٤- توجد نقاط بيانات كافية لتعطي عينة صحيحة للنتائج التجريبية.
  - ٥- القيم المقاسة للمتغير المستقل تكون مستقلة بعضها على بعض.
- ومتوفرة عدة طرق للحسابات لتطابق النماذج الرياضية. والهدف من الحسابات العديدة هو التقدير الأفضل (الأمثل) لقيم المعلمات  $K_m$  و  $V_{max}$  بحيث أن القيم المحسوبة للمتغير المعتمد (عادة السرعة الابتدائية) يكون قريباً بقدر الإمكان من القيم التجريبية، وذلك لإيجاد القيمة الأدنى لدالة أقل المربعات.
- ومتوفر تجارياً عدد كبير ومتنامي من برامج الحاسوب التي تكون مفيدة في تحليل بيانات حركيات الإنزيمات. ومسجل في جدول ب-١ بعض برامج الحاسوب المفيدة في تحليل بيانات الإنزيمات.

جدول ب-١ برامج الحاسوب المتاحة لتطابق بيانات الإنزيمات

| البرنامج        | المصدر                                                                                                              | ملاحظات                         |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| Scientist       | <a href="http://www.micromath.com">http://www.micromath.com</a>                                                     | General curve-fitting           |
| FitAll          | <a href="http://home.ican.net/~mtrsoft/abtaw.htm">http://home.ican.net/~mtrsoft/abtaw.htm</a>                       | General curve-fitting           |
| Dynafit         | <a href="http://www.biokin.com">http://www.biokin.com</a>                                                           | Enzyme-fitting, PC & Mac, Free  |
| EnzFitter       | <a href="http://www.biosoft.com">http://www.biosoft.com</a>                                                         | Enzyme fitting                  |
| EZ-Fit          | <a href="http://www.jle.net/~fperrell/webpx_05.htm">http://www.jle.net/~fperrell/webpx_05.htm</a>                   | Enzyme fitting                  |
| SigmaPlot 2000  | <a href="http://www.spssscience.com">http://www.spssscience.com</a>                                                 | Graphics package, Enzyme module |
| MLAB            | <a href="http://www.civilized.com">http://www.civilized.com</a>                                                     | Math/statistical package        |
| Matlab          | <a href="http://www.math.utah.edu/lab/ms/matlab/matlab.html">http://www.math.utah.edu/lab/ms/matlab/matlab.html</a> | Math/statistical package        |
| CurveExpert 1.3 | <a href="http://www.ebicom.net/~dhyams/c_vxpt.htm">http://www.ebicom.net/~dhyams/c_vxpt.htm</a>                     | General curve-fitting           |

## ٢- مواقع الشبكة العنكبوتية الخاصة بالإنزيمات

المصدر المفيد الآخر الذي يعطي معلومات عن الكيمياء الحيوية للإنزيمات والبروتينات بصورة عامة هو الشبكة العنكبوتية. والبحث في الشبكة العنكبوتية تحت مصطلح "Enzyme" يعطي عدد ضخم من العناوين التي تعطي معلومات وبرامج الحاسوب الذي يمكن الحصول عليها. ومدون أسفل بعض المواقع المهمة:

Data/Information for Enzymologists and Kineticists

<http://med.umich.edu/biochem/enzresources/realenzymes.html>

الموقع يحتوي على مجموعة من الروابط للمواقع المفيدة للعاملين في مجال الإنزيمات

The Enzyme Data Bank

<http://192.239.77.6/Dan/proteins/enzymes.html>

هذا الموقع يعطي معلومات عن أرقام EC للإنزيمات، الأسماء المقترحة والأسماء البديلة، الأنشطة الحفزية، استخدام العوامل المساعدة، الأمراض المصاحبة، وحقائق مفيدة أخرى.

ExPASy Molecular Biology Server

<http://www.expasy.ch>

هذا الموقع لخدمات البيولوجيا الجزيئية للمعهد السويدي للمعلوماتية البيولوجية. يحتوي على عدد من قواعد البيانات المفيدة عن أدوات تحليل البروتين، ويوفر أيضاً ربط مباشر مع مواقع أخرى للكيمياء الحيوية والبيولوجيا الجزيئية.

## ملحق (ج)

### التطفير موجه - الموقع وبحث تركيب المواقع النشطة في الإنزيمات Site – direct mutagenesis and investigation of the structure of active sites of enzymes

---

كما عرضنا في هذا الكتاب، فإن الموقع النشط للإنزيم هو المنطقة التي ترتبط بها المواد الخاضعة (والعامل المساعد أياً وجد) وتوفر بواقي الأحماض الأمينية التي تشارك مباشرة في الارتباط بالمادة (أو المواد الخاضعة) وبواقي الأحماض الأمينية التي تشارك مباشرة في عملية الحفز (تفكيك وتكوين الروابط) وهذه البواقي يطلق عليها مجموعات الحفز catalytic groups. ولقد عرضنا في هذا الكتاب عدة طرق التي يمكن أن تستخدم في تمييز بواقي الأحماض الأمينية التي تشارك في عملية الحفز، منها:

١- تأثير الـ pH على  $\log (k_{cat}/K_m)$  (شكل ١٠-١٢) حيث يمكن من المنحنى

تعيين عدد المجموعات القابلة للتأين المرتبطة بالحفز وقيم  $pK_a$  لهما.

٢- استخدام مناظرات المادة الخاضعة التي يتبعها التصوير بأشعة إكس.

٣- استخدام المثبطات غير العكسية (قسم ١٣-١١).

وبالرغم من أهمية هذه الطرق في تمييز بواقي الأحماض الأمينية في المواقع النشطة، فإن تقدم هام في هذا المجال قد جاء من استخدام التطفير موجه-الموقع site-directed mutagenesis في الإنزيمات التي تعتمد على تقنية DNA المؤلف recombinant DNA technology أو هندسة البروتين protein engineering.

لقد درسنا في فصل ٤ من هذا الكتاب أن الإنزيمات هي بروتينات. ومثل كل البروتينات، فإنها تتألف من أحماض أمينية ترتبط مع بعضها بتسلسل خاص. ونوع وتسلسل الأحماض الأمينية في البروتين يكون خاص لكل بروتين الذي يتحدد بتسلسل القواعد في الجين الخاص بالبروتين (الإنزيم). وتقنية التطفير موجه-الموقع تتضمن إجراء تغيير محكوم في تسلسل النيوكليوتيدات التي تشفر لعديد الببتيد للإنزيم المستهدف

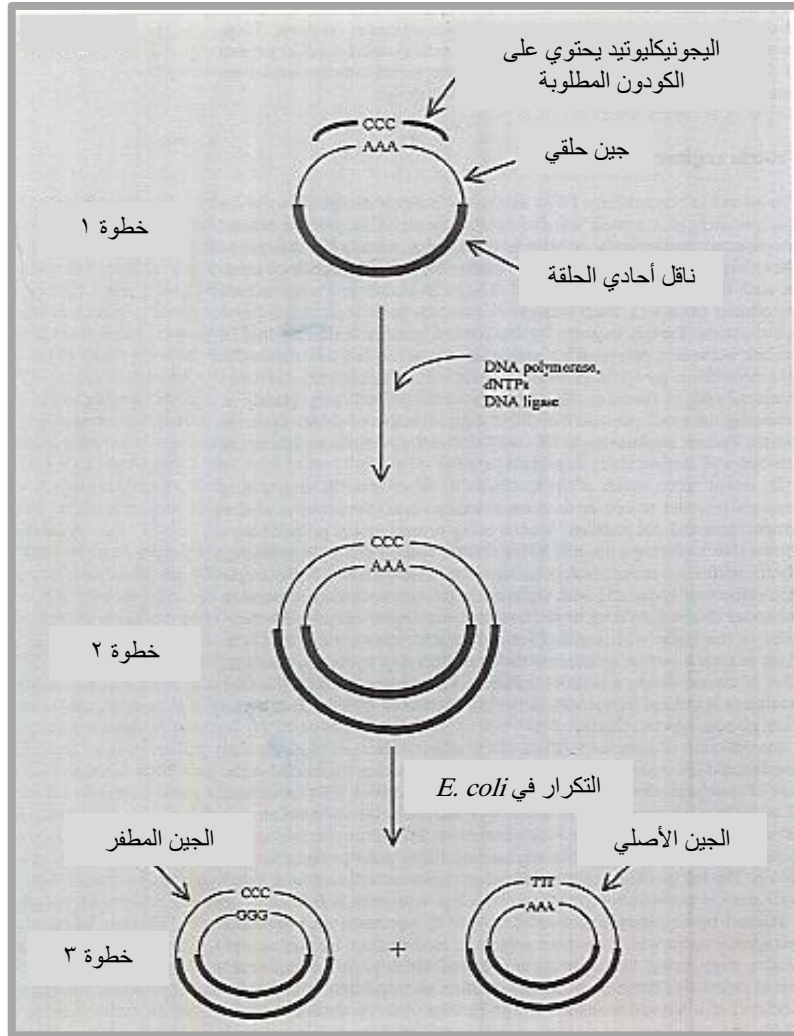
بحيث أن تغيرات خاصة تم تحديدها مسبقاً في تسلسل الأحماض الأمينية يمكن إدخالها في الإنزيم. وشكل ج-١ يوضح كيف يتم إستبدال اللايسين (المقابل للشفرة AAA) بالبرولين (المقابل للشفرة GGG). وهذا يتم كالتالي:

١- الجين الأصل / cDNA الذي يشفر للإنزيم الطبيعي (غير المحور) ينسل في ناقل (مثل ناقلات الفاج) الذي منه يمكن الحصول على سلسلة فردية من DNA الأصل غير المحور. وسلسلة DNA الفردية غير المحورة هذه تربط بناقل أحادي الخيط مثل البلازميد.

٢- تصمم وتصنع كيميائياً أو ليجونيوكلويتيد. إن طرفي الاليجونيوكلويتيد تكون متتامة في التسلسل لكل الطرفين لجزء من الجين المرغوب تغيير. فعل سبيل المثال، فإنه في حالة المثال الموضح في شكل ج-١، يكون مطلوب إستبدال حمض أميني واحد؛ وهو إستبدال لايسين (المقابل للشفرة AAA في تسلسل الجين) إلى برولين (المقابل للشفرة GGG على الخيط الجديد). وعند الإرتباط الهيدروجيني بين السلسلة الأصل والاليجونيوكلويتيد الجديد، فإن الشفرة الجديدة CCC سوف تكوّن عقدة، بينما الأطراف حول هذه العقدة سوف ترتبط جيداً بالروابط الهيدروجينية نتيجة للتمتة بين أزواج القواعد.

٣- إضافة DNA polymerase و dNTPs و DNA ligase يسمح بتصنيع DNA مكوناً مزدوج حلقي مغلق (المرحلة الثانية في شكل ج-١).

٤- إدخال المزدوج الحلقي المغلق في بكتريا القولون *E. coli* حيث يتم تكرار كلا الخيطين (المرحلة الثالثة في شكل ج-١). والجين المطفر (المحور) يمكن إزالته وتنسيهه والتعبير عنه في عائل مناسب للحصول على كمية كبيرة من الإنزيم المطفر بالطرق القياسية لـ DNA المؤلف



شكل ج- ١ خطوات التطفير موجه- الموقع لإستبدال الحمض الأميني لايسين (المقابل للشفرة AAA) في الإنزيم الطبيعي بالحمض الأميني بروتين (المقابل للشفرة GGG) لإنتاج الإنزيم المطفر

ولقد إستخدمت طرق التطفير موجه- الموقع في دراسة أهمية بواقي حمض أميني ما في الإنزيم وذلك بإستبدال هذا الحمض الأميني بـ حمض أميني آخر، ثم مقارنة الخصائص الحفزية للإنزيم المطفر مع الإنزيم الطبيعي. وسنعرض هنا بعض الأمثلة:

● في إنزيم triose phosphate isomerase تم إستبدال الحمض الأميني glutamate-165 بالحمض الأميني aspartate. ونتيجة لهذا الإستبدال هو إنخفاض 1000- مرة في النشاط الحفزي في الإنزيم، مما يشير إلى أهمية Glu-165 في عملية الحفز.

● في دراستنا لإنزيمات تحلل البروتين المعتمدة على السيرين (قسم ٨-٥) مثل كيموتريسين وتريسين أوضحنا أنها تعتمد في نشاطها الحفزي على مركز حفز ثلاثي catalytic triad يتألف من Ser-195 و His-57 و Asp-102. ولتوضيح أهمية Asp-102 في عملية الحفز تم استبدال هذا الحمض الأميني بالأسباراجين Asn قد أدى إلى خفض النشاط الحفزي بعامل 10000 مرة، مما يشير إلى أهمية Asp-102 في عملية الحفز الثلاثي في هذه المجموعة من الإنزيمات.

وحديثاً تبذل مجهودات عديدة مهمة تجاه الإنزيمات المهندسة وراثياً بهدف زيادة النشاط الحفزي و/ أو زيادة الثبات تجاه الحرارة والـ pH للإنزيمات المهمة صناعياً أو طبيياً:

● فعلى سبيل المثال، فإن إستبدال Lys-235 بـ Arginin في إنزيم glucose isomerase (المستخدم صناعياً في إنتاج الشراب عالي الفركتوز بتحويل الجلوكوز إلى فركتوز) قد زاد من الثبات الحراري للإنزيم المهندس. ويبدو أن إستبدال لايسين بالأرجنين قد غير من البنية الفراغية للإنزيم بطريقة عززت المستوى الإجمالي للروابط غير التساهمية. وهذا بدوره يكون له تأثير إيجابي على ثبات الإنزيم.

● منشط بلازمينوجين الأنسجة البشري Human tissue plasminogen activator (t-PA) يعتبر أحد العوامل العلاجية المهمة الذي تعرض لتعديل بطرق هندسة البروتين. t-PA هو إنزيم بروتيناز Protease يحتوي على الحمض الأميني سيرين في مركز الحفز ويلعب دوراً مهماً في تعزيز تحلل

الليفين (إنحلال الفبرين) Fibrinolysis في تفك جلطات الدم. ولقد وجد أن إزالة ببتييد ثلاثي (Tyr-Phe-Ser) من قطاع خاص خلال t-PA قد خفض بدرجة معنوية معدّل إزالة هذا الجزئ من البلازما. فا t-PA الطبيعي له فترة نصف حياة في البلازما صغيرة جداً. وهذا يتطلب إمداد طويل المدى خلال الوريد لهذا العقار والإنزيم المهندس وراثياً الذي له فترة نصف حياة طويلة في البلازما يمكن إعطاؤه كجرعة فردية خلال الوريد. وأمثلة أخرى للبروتينات المهندسة التي لها تطبيقات تجارية تشمل الأنسولين طويل-أو قصير الفعل وإنزيمات المنظفات المقاومة للتأكسد.

## ملحق (د) إجابة بعض الأسئلة المختارة

### فصل ٣

٢- (أ)

$$\begin{aligned}v &= k [A] \\k &= v / [A] \\k &= (5 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}) \\&= (0.005 \text{ mM} \cdot \text{min}^{-1}) / (20 \text{ mM}) \\&= 2.5 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}\end{aligned}$$

(ب) التفاعل له جزيئية واحد.

٣- من معادلة ٣-١٩

$$\begin{aligned}[A]_t &= [A]_0 e^{-kt} \\t^{1/2} &= 0.693 / k, \text{ وحيث أن} \\k &= 0.693 / 14 \text{ d} , = 0.05 \text{ d}^{-1}\end{aligned}$$

- (أ)  $7 \mu\text{mol}$
- (ب)  $5 \mu\text{mol}$
- (ج)  $3.5 \mu\text{mol}$
- (د)  $0.3 \mu\text{mol}$

$$\begin{aligned}v &= k [A]^2 \quad -٤ \\v &= (10^{-6} \text{ M}^{-1}, \text{ s}^{-1}) (0.01 \text{ M}) (0.01 \text{ M}) \\v &= (10^{-10} \text{ M} \cdot \text{s}^{-1})\end{aligned}$$

٥- للتفاعل (أ) فقط فإن رسم [المتفاعل]/ $1/t$  مقابل  $t$  يعطي خط مستقيم، ومن ثم، فإن التفاعل رتبة ثانية. والميل  $k$  يكون  $0.15 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ . للتفاعل (ب) فقط فإن رسم  $\ln [\text{المتفاعل}]$  مقابل  $t$  يعطي خط مستقيم، لذلك فإن التفاعل رتبة أولى، والميل السالب  $k$  يكون  $0.17 \text{ s}^{-1}$



٦- الماء السائل يكون له انتروبي أعلى عن الثلج نتيجة لحرية الحركة الأكبر عن الثلج الذي تكون فيه الجزيئات مقيدة في الحركة في التركيب البلوري.

٧- (أ) ينخفض الإنتروبي الآن ناتج التفاعل ٢ جزئ بينما عدد جزيئات المتفاعلات ٤ جزيئات.

(ب) يزداد الإنتروبي لأن عدد جزيئات ناتج التفاعل ٣، بينما عدد جزيئات المتفاعلات ٢.

(ج) يزداد الإنتروبي لأن نفس كمية NaCl تكون في حجم واحد لتر وبذلك تزداد عدد طرق تنظيم NaCl مقارنة بوجودها في نصف لتر.

(د) ينخفض نتيجة لتقييد حركة المادة الخاضعة بارتباطها بالإنزيم

$$T = 273 + 10 = 283 \text{ K} \quad (أ) - ٨$$

$$\Delta G = 15 \text{ kJ} - (283 \text{ K}) (0.06 \text{ kJ.K}^{-1}) = 0.85 \text{ kJ}$$

$\Delta G$  أكبر من الصفر، وبذلك فإن التفاعل لا يكون تلقائياً

$$T = 273 + 80 = 375 \text{ K} \quad (ب)$$

$$\Delta G = 15 \text{ kJ} - (375 \text{ K}) (0.05 \text{ kJ.K}^{-1}) = -2.65 \text{ kJ}$$

$\Delta G$  أقل من الصفر، وبذلك يكون التفاعل تلقائياً

٩- (أ) خطأ

(ب) خطأ

(ج) صح

(د) صح

١٠- (أ) HCl حمض قوي يتفكك كلياً في المحلول

$$\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$$

$$\text{pH} = -\log [10]^{-3} = 3$$

$$\text{pH} = \text{pK} + \log \frac{[\text{Acetate}]}{[\text{Acetic acid}]} \quad (ب)$$

$$\text{pH} = 4.76 + \log \frac{0.03 \text{ M}}{0.1 \text{ M}} \quad (ج)$$

$$= 4.76 + \log (0.3)$$

$$= 4.76 - \log (0.3)$$

$$= 4.14$$

١١- إفتراض أن:



ويزدواج التفاعلين



١٢-

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{[\text{القاعدة المرافقة}]}{[\text{تيروزين}]}$$

$$\text{pH} - \text{pK}_a = \log \frac{[\text{القاعدة المرافقة}]}{[\text{تيروزين}]}$$

(أ) عند pH

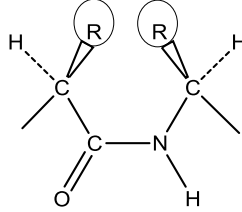
$$7.0 - 2.20 = 4.8 = \log \frac{[\text{القاعدة المرافقة}]}{[\text{تيروزين}]}$$

$$\text{anti log } 4.8 = 63.09 = \frac{[\text{القاعدة المرافقة}]}{[\text{تيروزين}]}$$

ونفس الطريقة تطبق على (ب) و (ج)

## فصل ٤

-٢



- ٣- لأن هذه البنية الفراغية تؤدي إلى أقل تداخل مجسم بين السلاسل الجانبية للأحماض الأمينية مما يؤدي إلى ثبات البنية الفراغية للبروتين.
- ٤- لأن الفرق في الطاقة بين المضاهي والمضاد تكون صغيرة جداً  $2 \text{ Kcal/mol}$ ، وبذلك فإن المضاهي يمكن أن يوجد بدون تغير محسوس في ثبات البروتين.
- ٥- يرجع ذلك إلى طاقة التنشيط  $\Delta G^\ddagger$  الكبيرة نتيجة أن الرابطة  $C - N$  تحتوي على 40% من خصائص الرابطة المزدوجة  $C = N$  :
- ٧- نظراً لإصطدام المجموعات الجانبية للأحماض الأمينية التي ترتبط بالذرات ألفا. أيضاً فإن حرية الدوران تكون مقيدة حول إثنين من الروابط الفردية  $\phi$  و  $\psi$  (شكل ٤-١٠ وشكل ٤-١١)
- ٨- الروابط الهيدروجينية في الحلزون ألفا تكون بين مجموعة الكربونيل  $C = O$  في أحد بواقي الأحماض الأمينية (i) وبروتون  $NH$  في باقي الحمض الأميني  $(i + 4)$  في السلسلة الرئيسية (العمود الفقري).
- ٩- حتى يمكن تكوين روابط هيدروجينية بين السلاسل المتجاورة التي تثبت الشريحة.
- ١٠- حتى يمكن أن تشارك في التأثيرات المتبادلة بين البروتينات والجزيئات الأخرى مثل التأثيرات المتبادلة بين الإنزيمات والمواد الخاضعة والمثبطات.
- ١١- داخل البروتين توجد السلاسل الجانبية للأحماض غير القطبية (النافرة للماء). وعلى سطح البروتين توجد السلاسل الجانبية للأحماض الأمينية القطبية والمشحونة.

- ١٢- مجموعة الميثايل المرتبطة بذرة الكربون بيتا ( $\beta$ ) في الأيسوليوسين تتداخل تجسماً (فراغياً) مع تكوين الحلزون ألفا ( $\alpha$ ). في ليوسين فإن مجموعة الميثايل ترتبط بذرة الكربون جاما ( $\gamma$ ) التي تكون بعيدة عن السلسلة الرئيسية وبذلك لا تتداخل.
- ١٣- بالنسبة للإنزيمات التي تتألف من وحدات متماثلة، فإن ذلك يؤدي إلى زيادة الكفاءة لأن كل وحدة فردية تحتوي على موقع نشط. إضافة إلى ذلك، فإن تشييد الوحدات الفرعية لكثير من الإنزيمات توفر الأساسي التركيبي لتنظيم نشاط الإنزيمات.
- ١٥- تنخفض الطاقة في عملية طي البروتين، كما ينخفض الإنتروبي.
- ١٦- (أ) Ala: Val و Phe كلاهما نافر للماء، ولكن Phe أكبر كثيراً وربما لا يتطابق جيداً في مكان Val.
- (ب) Asp : الإستبدال بـ Lys الذي يحمل شحنة موجبة بـ Asp المضاد في الشحنة، ربما يؤدي إلى تشوه كبير.
- (ج) Glu: Glu: استبدال بـ Asn الذي يحتوي على مجموعة - أميد يكون استبدال مفضل عن Gln.
- (د) Pro : استبدال بـ Gly الذي ليس له سلسلة طرفية يكون أفضل عن الإستبدال بـ Hys الذي يحتوي على سلسلة طرفية أكبر.
- ١٧- الطفرة الأولى تؤدي إلى هدم النشاط لأن الفالين يشغل فضاء أكبر عن الذي يشغله آلانين، ومن ثم فإنه يجب أن يأخذ شكل مختلف، بافتراض أن هذا الباقي يقع قريباً من الجيب الداخلي، الطفرة الثانية تعيد النشاط نتيجة لتعويض الانخفاض في الحجم لأن جليسين أصغر من أيسوليوسين.
- ١٨- إن تعيين التشكيل الفراغي المطلق يحتاج إلى تعيين الأسبقية (الأولية) للمجموعات الأربعة التي ترتبط بذرة الكربون. لكل الأحماض الأمينية ما عدا سستين فإن الأولية تكون (١) مجموعة الأمينو (٢) مجموعة الكربونيل (٣) السلسلة الجانبية (٤) الهيدروجين. بالنسبة لسستين نظراً لوجود الكبريت في السلسلة الجانبية فإنها لها الأولية (الأسبقية) من مجموعة الكربونيل الذي يؤدي إلى أن يأخذ التشكيل الفراغي R بدلاً من S.

## فصل ٥

١- (ج)

$$[RL] = \frac{[R][L]}{K_d + L}$$

$$[R][L] = [RL](K_d + [L])$$

$$[R] = [RL](K_d + [L]) / [L]$$

$$[R] = 5 \times 10^{-6} \text{ M} \{ (10^5) + 10^{-5} \} / 10^{-5}$$

$$[R] = 5 \times 10^{-6} \text{ M} = 5 \mu\text{M}$$

٣- رسم المقلوب المزدوج أو رسم سكاتشر نجد أن  $K_d = 50 \mu \text{ mol dm}^{-3}$

٤- من رسم سكاتشر نجد أن التقاطع مع المحور  $x$  يساوي 2 ومن ثم فإن  $n = 2$  ، وميل الخط يساوي 76 وبذلك فإن  $K_d = 15.2 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$  . والموقعين متكافئين ومستقلين .

## فصل ٦

٦- نشاط الإنزيم يقاس كالسرعة الابتدائية للفاعل، وهي السرعة قبل أن تستهلك كمية كبيرة من المادة الخاضعة وقبل إنتاج كمية كبيرة من الناتج. ومن السهل قياس ظهور كمية صغيرة من الناتج من الخط الأساسي صفر للناتج عن قياس اختفاء كمية صغيرة من المادة الخاضعة مقابل خلفية من تركيز عالي للمادة الخاضعة.

$$v = V_{\max} [S] / (K_m + [S]) \quad -٧$$

$$v/V_{\max} = [S] / (K_m + [S])$$

$$0.95 = [S] / (K_m + [S])$$

$$[S] = 0.95 K_m + 0.95 [S]$$

$$0.05 [S] = 0.95 K_m$$

$$[S] = (0.95 / 0.05) = K_m$$

$$[S] = (0.95 / 0.05) K_m = 19 K_m$$

٨- (أ) خطأ.  $v$  تكون مستقلة عن  $[S]$  فقط عند  $[S] \gg K_m$

(ب) صح.  $v = k_2 [E]_0$

(ج) صح

(د) خطأ. قيمة  $K_m$  تكون مستقلة عن تركيز الإنزيم

(هـ) صح. كلما استهلكت المادة الخاضعة فإن المعدل ينخفض

٩- ترسم العلاقة بين ناتج التفاعل كدالة في الزمن (كما هو موضح في شكل ٦-٣)، ويمكن تقدير السرعة الابتدائية لكل قيمة من التركيز الابتدائي للمادة الخاضعة. بعد ذلك ترسم السرعات الابتدائية  $v$  مقابل تركيز المادة الخاضعة  $[S]$ ، لنحصل على رسم لينوفوسبورك (كما هو موضح في شكل ٦-٣ب) ويمكن في هذه الحالة استخدام التطابق غير الخطي للحصول على قيمة كل من  $V_{max}$  و  $K_m$ . والآن يمكن تشييد رسم لينوفير- بورك وتقدير  $V_{max}$  و  $K_m$  باستخدام التطابق الخطي ومقارنة النتائج مع التطابق الخطي. استخدم أحد برامج الحاسوب المدونة في ملحق (ب)

١٠- (أ) نعم ،  $K_m = 5.2 \times 10^{-6} M$

(ب)  $V_{max} = 6.8 \times 10^{-10} \text{ mol minute}^{-1}$

(ج)  $337 \text{ s}^{-1}$

١١- (أ)  $v = V_{max} - (v/[S]) K_m$

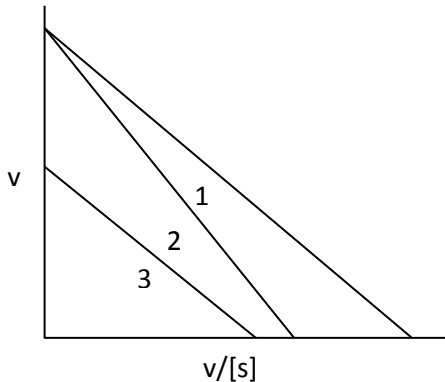
(ب)  $V_{max}$  = التقاطع مع  $y$  و  $-K_m$  = الميل و  $V_{max} / K_m$  = التقاطع مع  $x$

(ج) رسم أدى- هوفستى

1- لا يوجد مثبت

2- مثبت تنافسي

3- مثبت غير تنافسي



١٢- معادل استخدام (تحول) المادتين الخاضعتين A و B تعطي كالتالي:

$$v_A = \left( \frac{k_2}{K_m} \right) [E][A]$$

$$v_B = \left( \frac{k_2}{K_m} \right) [E][B]$$

ومن ثم فإن نسبة هذين المعدلين يكون:

$$(v_A/v_B) = \left( \frac{k_2}{K_m} \right) [A] / \left( \frac{k_2}{K_m} \right) [B]$$

ومن ثم فإن الإنزيم يميز بين المادتين المتنافسين على أساس قيم  $k_2/K_m$  لهما وليس  $K_m$  بمفردهما.

١٣- إذا زاد [E] الكلي، فإن  $V_{max}$  ستزيد لأن  $V_{max} = k_2 [S]$ ، ولكن:  $K_m = (k_{-1} + k_2)/k_1$ ، أى أنها لا تعتمد على تركيز المادة الخاضعة والرسم في المنتصف يصف هذه الحالة.

١٤- الخطوة الأولى سوف تكون الخطوة المحددة للمعدل. الإنزيمي  $E_B$  و  $E_C$  يعملان عند  $\frac{1}{2} V_{max}$ ، بينما  $K_m$  للإنزيم  $E_A$  أكبر من تركيز المادة الخاضعة.  $E_A$  يعمل بالتقريب عند  $10^{-2} V_{max}$ .

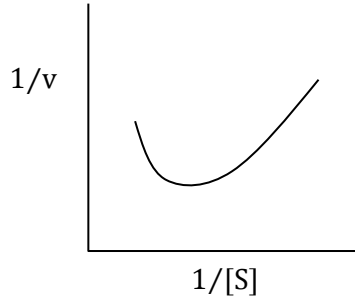
١٥- الناتج P سوف يوجد بكمية أكبر لأن الإنزيم A له  $K_m$  أقل كثيراً للمادة الخاضعة عن الإنزيم B. ونظراً لأن  $V_{max}$  تكون هي نفسها للإنزيمين، فإن الكفاءة النسبية للإنزيمين تعتمد كلية تقريباً على قيم  $K_m$ .

١٦- (أ) المادة الخاضعة N-acetyltyrosine ethyl ester لها ألفة عالية للإنزيم لأن لها  $K_m$  منخفضة.

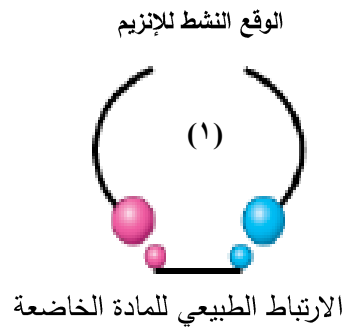
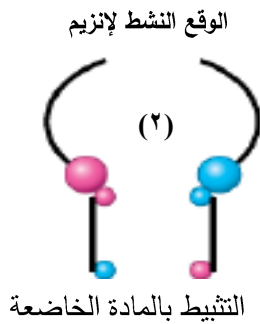
(ب) قيمة  $V_{max}$  لا ترتبط بقيمة  $K_m$ ، وبذلك لا يمكن استنتاج أى قرار

$$V_{\max} = 11 \mu\text{mol minute}^{-1} \quad -١٧$$

(أ) -١٨



(ب) هذا السلوك يعبر عن التنشيط بالمادة الخاضعة- عند التركيز العالي فإن المادة الخاضعة تكون معقد عند الموقع النشط الذي لا يؤدي إلى إنتاج الناتج. والرسم السفلي يوضح ماذا يمكن أن يحدث. إن المادة الخاضعة ترتبط بتوجيه معين (١). وعند التركيز العالي، فإن المادة الخاضعة ربما ترتبط بالموقع النشط بحيث أن التوجيه المناسب يتحقق لكل طرف من الجزيء، ولكن يرتبط جزيئين مختلفين من المادة الخاضعة (٢).



$$K_s = k_{-1}/k_1 = 6 \times 10^4 \text{ s}^{-1} / 4 \times 10^6 \text{ s}^{-1} = 0.15 \text{ M} \quad -١٩$$



$$K_m = k_{-1} + k_2 / k_1 = 6 \times 10^4 s^{-1} + 0.2 \times 10^3 s^{-1} / 4 \times 10^6 M^{-1} s^{-1} = 0.155 M$$

إن الثابتين ليس متساويين، ومن ثم فإن الارتباط لا يتبع الاتزان السريع.

٢٠- إذا افترضنا أن الاتزان السريع يكون مناسب، فإن  $k_{-1} \gg k_2$ ، ومن ثم فإن  $K_m = K_s$ . في

هذه الحالة، فإن قيم  $k_{-1}$  و  $k_2$  لا يختلفان بصورة كبيرة، ومن ثم فإننا نحسب  $K_m$  و  $K_s$  ونقارن.

١- حساب  $K_m$

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = 0.01 M$$

٢- حساب  $K_s$

$$K_s = \frac{k_{-1}}{K_1} = 0.01 M$$

٢١- رقم التحول هو عدد الجزيئات المادة الخاضعة التي تتحول إلى الناتج لكل

وحدة زمن (عندما يكون الإنزيم في حالة تشبع كامل). ومن ثم فإننا ببساطة

نأخذ المقلوب لنحصل على الوقت الذي يستغرقه كل جزيء من المادة

الخاضعة في عملية التحول

$$\frac{1}{3.5 s^{-1}} = 0.30 s$$

## فصل ٧

١- التطابق التركيبي والمجسم (البنية الفراغية- التطابق الالكتروني).

٢- (ب) لأن التخصص لا يعتمد على الكتلة الذرية للعنصر

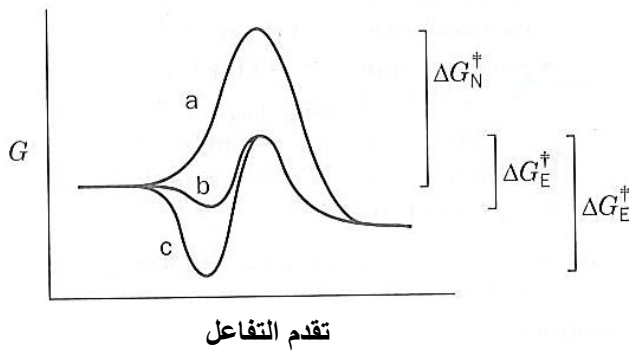
٣-  $k_{cat} / K_m$

٤- متخصصة لنوع معين من الروابط مثل الروابط البيتيديّة مثل:

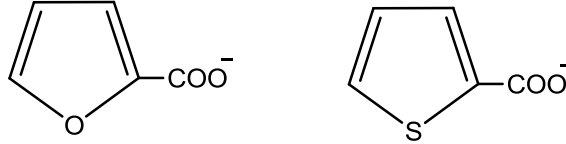
- إنزيم الببتيديز الذي يكون متخصص للرابطة الببتيدية التي تتكون بين أى من الأحماض الأمينية.
- إنزيم ألفا أميليز الذي يفكك الرابطة  $\alpha$ -1-4 الجلاكوسيدية في كل من النشا والجلايكوجين.
- ٥- تخصص للمجموعة
- ٦- التخصص الموجه بالقلب (المصيغ)- التخصص بالتماثل (التناسق) المتكافئ بين الإنزيم والمادة الخاضعة
- ٧- التماثل المتكافئ بين الإنزيم والمادة الخاضعة
- ٨- (أ) أكسدة واختزال  
(ب) التحلل المائي  
(ج) إنزيمات النزع  
(د) إنزيمات التشكل  
(هـ) إنزيمات الربط  
(ز) إنزيمات النقل

## فصل ٨

- ٣- كلما كان ارتباط S بالإنزيم أكثر إحكاماً كلما زادت  $\Delta G_E^\ddagger$ . وباقترب من  $\Delta G_N^\ddagger$  فإن معدل التفاعل المحفز بالإنزيم يقترب من معدل التفاعل غير المحفز.



- ٦- حفز حامضي خلال الجزئ. (مجموعة الكربوكسيل تكون مرتبطة بالهيدروجين عند pH 4  
٧- اثنتين من هذه المركبات تكون



٨- الصورة النشطة للإنزيم تحتوي على أيون الثيولات. إن زيادة  $pK_a$  ربما تزيد الجهد المحب للشحنة الموجبة في الثيولات ومن ثم زيادة معدل التفاعل المحفز بواسطة الصورة النشطة للإنزيم. مع ذلك، فإن عند الـ pH الفسيولوجية ربما توجد صورة أقل نشاطاً للإنزيم، ومن ثم فإن المعدل الإجمالي ربما ينخفض.

٩- Glu له  $pK_a$  حوالي 4، وفي صورته المتأينة يمكن أن يعمل كحفاز قاعدي. Lys له  $pK_a$  حوالي 10، وفي صورته المرتبطة بالبروتون يعمل كحفاز حامضي.

١٠- تكوين المركب الوسيط أسايل-إنزيم يكون أبطأ من التحلل المائي للمادة الخاضعة أميد، ومن ثم لا يظهر طور متسارع. وللمواد الخاضعة من الاسترات، فإن تكوين أسايل-إنزيم يكون أسرع.

١١- هذا الاستبدال يقابل أحد الاختلافات الأساسية بين تريسين وكيموتريسين. بحيث أن التخصص للتريسين (إنشطار الرابطة بعد لايسين Lys وأرجنين Arg) يتوقع حدوثه، وفي الحقيقة فإن تغيرات إضافية تكون مطلوبة للتأثير على هذا التخصص.

١٢- لا. بمجرد أن النشاط الحفزي قد انخفض تقريباً إلى الصفر بواسطة طفرة لباقي حمض أميني ضروري، فإن إدخال أي طفرة أخرى ضارة لا يمكن أن تخفض النشاط إلى حد أبعد من ذلك.

١٣- هذه المعادلة تكون فعالة. فالإيثانول سوف يتنافس مع الميثانول على الموقع النشط للإنزيم وبذلك يخفض من تكوين الفورمالدهيد السام. من ناحية أخرى فإن ناتج أكسدة الإيثانول يكون الأسيتالدهيد ( $CH_3-CHO$ ) وهو غير سام للجسم.

## فصل ٩

٣- لمعالجة هذه البيانات يتم إجراء التالي:

(أ) تعيين قيم  $\frac{1}{v}$  وقيم  $1/[AX]$  لكل قيم  $[B_0]$ .

(ب) رسم المقلوب المزدوج لـ  $\frac{1}{v}$  مقابل  $1/[AX]$  عند قيم  $[B_0]$  المثبتة.

(ج) الرسم سوف يعطي ثلاثة خطوط متوازية (مثل ذلك المرسوم في شكل ٩-٥). وهذه

الخصائص تشير إلى آلية الإزاحة - المزدوجة (بنج-بونج).

٤-  $P^*$  سوف تظهر فقط إذا كانت آلية التفاعل تتبع الإزاحة-المزدوجة (بنج-بونج)، حيث أن

الإزاحة - المزدوجة فقط يمكن أن تستبدل النظير من P خلفاً إلى A في غياب B. ومن

ثم، فإنه في تفاعل الإزاحة المزدوجة، فإن A لن تصبح معلمة بالنظير.

## فصل ١٠

٦-  $K_m$  المقدرة عملياً سوف يكون أكبر من  $K_m$  الحقيقية لأن تركيز المادة الخاضعة الحقيقية

يكون أقل من المتوقع.

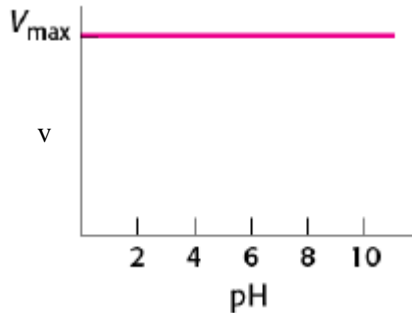
٧- تركيز الإنزيم يكون مساوي للتركيز الأدنى للمادة الخاضعة، ولذلك فإنه لا يتوافق مع

متطلب أن  $[E] \ll [S]$ . ويجب تصحيح هذه المشكلة بخفض كمية الإنزيم المستخدم في

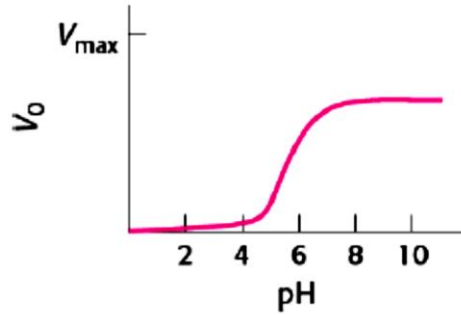
كل تجربة.

٨- (أ) عندما تكون  $[S^+]$  أكبر كثيراً عن قيمة  $K_m$ ، فإن الـ pH سوف يكون لها تأثير على

الإنزيم يمكن إهماله لأن  $S^+$  سوف تتفاعل مع  $E^+$  حالما يصبح الإنزيم متاح.



(ب) عندما يكون  $[S^+]$  أصغر كثيراً عن قيمة  $K_m$ ، فإن رسم  $v$  مقابل الـ pH يصبح أساساً منحنى معايرة للمجموعات المتأينة مع نشاط الإنزيم يصبح الواسم المعايير. عند الـ pH المنخفضة، فإن التركيز العالي من  $H^+$  سوف يحفظ الإنزيم في الصورة EH وغير نشط، ويزيادة الـ pH فإن الإنزيم سوف يكون في الصورة  $E^-$  النشطة أكثر فأكثر (باطراد). وعند الـ pH العالية ( $H^+$  منخفضة) فإن كل الإنزيم سوف يكون  $E^-$



(ج) إن نقطة منتصف المنحنى سوف تكون  $pK_a$  للمجموعة المتأينة التي تساوي pH 6.

٩- يمكن استخدام معادلة أرهينوس في الصورة اللوغاريتمية (معادلة ١٠-٥) بإجراء التفاعل الإنزيمي عند درجات حرارة مختلفة (٢٥ إلى ٤٠ درجة مئوية) ورسم العلاقة بين  $\log k_{cat}$  للتفاعل الإنزيمي كدالة في  $1/RT$ . وميل الخط يعطي القيمة السالبة لـ  $E_a$  (أي  $\Delta G^\ddagger$ ) وهي طاقة التنشيط. يمكن إجراء التفاعل في المدى من ٢٥ إلى ٤٠ درجة مئوية، وفي هذا المدى لا يحدث تغير لطبيعة الإنزيم.

## فصل ١١

٣- (أ) في غياب المثبط فإن  $V_{max} = 47.6 \mu\text{mol minute}^{-1}$  و  $K_m = 1.1 \times 10^{-5}$ . في

وجود المثبط فإن  $V_{max}$  هي نفسها، و  $K_m^{app}$  تكون  $3.1 \times 10^{-5}$

(ب) مثبط تنافسي

(ج)  $1.1 \times 10^{-3} \text{ M}$

(د)  $f_{EI} = 0.488$  و  $f_{ES} = 0.243$

(هـ)  $f_{ES} = 0.73$  في غياب المثبط و  $0.49$  في وجود  $2 \times 10^{-3} M$  من المثبط. إن نسبة

هذه القيم هي  $1.49$  وهي نفس النسبة لسرعات التفاعل تحت هذه الظروف.

٤- (أ)  $V_{max} = 9.5 \mu \text{ mol minute}^{-1}$  ,  $K_m = 1.1 \times 10^{-5} M$  وهي نفسها في غياب المثبط

(ب) غير تنافسي

(ج)  $2.5 \times 10^{-5} M$

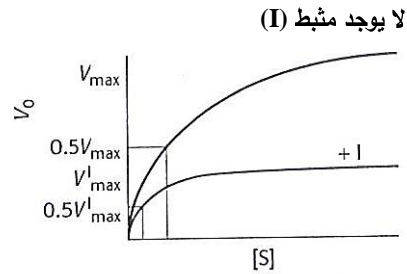
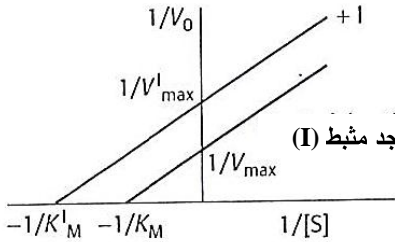
(د)  $f_{ES} = 0.73$  في وجود أو غياب المثبط

٥- (أ) مثبط غير تنافسي

(ب) 20%

(ج)  $K_I = 0.02 \text{ nM}$

٦- (أ)



(ب) التفاعل يظهر أنه حتى في وجود تركيز عالي جداً من المادة الخاضعة فإنها لا تدفع كل الإنزيم للصورة ES، سوف يوجد دائماً بعض ESI، ومن ثم فإن  $V_{max}$  سوف تكون أقل في وجود المثبط اللاتنافسي.  $K_m$  سوف تنخفض لأن التفاعل مع I سوف يخفض [ES] التي تجعل تفاعل ارتباط المادة الخاضعة أن يسير أكثر في اتجاه اليمين.

## فصل ١٢

- ١- المثبط المحكم الارتباط يعرف بأنه المثبط الذي له ثابت تفكك ( $K_i$ ) حوالي  $10^{-9}$ .
- ٢- السمة المميزة لمثبطات الارتباط المحكم هو اختلاف قيمة  $IC_{50}$  المشاهدة مع التركيز الكلي للإنزيم عند وجود تركيز مثبت من المادة الخاضعة (شكل ١٢-١).
- ٣- تعيين قيم  $IC_{50}$  للمثبط عند تركيز مثبت من الإنزيم ولكن عند عدة تراكيزات مختلفة من المادة الخاضعة، حيث ينتج أنماط مختلفة اعتماداً على نوع المثبط (شكل ١٢-٢ والمعادلات ١٢-٢ إلى ١٢-٥).
- ٤- استخدام معادلة هندرسون (معادلة ١٢-١١). هذه المعادلة تعطي خط مستقيم بصرف النظر عن نوع المثبط. مع ذلك فإن ميل الخط في هذه الرسوميات يتغير بطرق مختلفة اعتماداً على نوع المثبط، الذي يكون مماثل لشكل ١٢-٢.
- ٥- معادلة هندرسون (معادلة ١٢-١١ وشكل ١٢-٣) الميل  $K_i^{app}$  والتقاطع مع المحور  $y$  يساوي  $[E]$ .
- ٦- إذا وضعنا تجربة التي يكون فيها كل من  $[E]$  و  $[I]$  أكبر كثيراً عن  $K_i^{app}$  في معادلة موريسون (معادلة ١٢-٦)، فإن السرعة الجزئية  $v_i/v_0$  للتفاعل الإنزيمي سوف تنخفض بصورة شبه خطية بزيادة تركيز المثبط حتى يصبح  $[I] = [E]$  (شكل ١٢-٥).

## فصل ١٣

- ١- يمكن التفريق بين المثبط غير العكسي (ارتباط تساهمي للمثبط بالإنزيم) والمثبط العكسي بإجراء عملية فرز عشائي لمخلوط الإنزيم- المثبط، والنظر هل نشاط الإنزيم سيعود إلى إلى نشاطه الأصلي غير المثبط أم لا. إذا استعاد الإنزيم نشاطه فالنشط يكون عكسي.
- ٢- في مثبطات الألفة المميزة، فإن المثبط يرتبط بالإنزيم ويحور تساهمياً مجموعة أو مجموعات حفازة على الإنزيم. في المثبطات المعتمدة على الآلية فإن المثبط يرتبط بالموقع النشط للإنزيم ويميز بواسطة الإنزيم على أية مناظر للمادة الخاضعة ويتحول كيميائياً خلال آلية الحفز للإنزيم ليكون معقد  $E-I$  الذي لم يعد نشطاً حفزياً.
- ٣- إنزيم تخليق البروستاجلاين  $G/H$
- ٤- إنزيم جلايكوببتيد ترانس ببتيديز

## فصل ١٤

١- الميوجلاجلوبيين بروتين أحادي الوحدة بينما الهيموجلوبين بروتين رباعي الوحدات الفرعية. الميوجلوبين ينقل الأكسجين في العضلات بينما الهيموجلوبين ينقل الأكسجين في الدم. أيضاً فإن الهيموجلوبين ينقل  $H^+$  و  $CO_2$  بالإضافة إلى  $O_2$ . ارتباط الهيموجلوبين بـ  $O_2$  ينظم بواسطته  $H^+$  و  $CO_2$ ، ارتباط  $O_2$  بالهيموجلوبين يعزز ارتباط جزيئات  $O_2$  إضافية لنفس جزيء الهيموجلوبين، وبكلمات أخرى فإن  $O_2$  يرتبط تعاونياً بالهيموجلوبين. بالمقارنة فإن ارتباط  $O_2$  بالميوجلوبيين ليس تعاونياً.

٢- (أ) 100 التغير في النسبة  $[R] / [T]$  لإرتباط جزيء مادة خاضعة يجب أن يكون نفسه مثل نسبة ألفة المادة الخاضعة للصورتين.

(ب) 10. إن إرتباط أربع جزيئات من المادة الخاضعة تغير  $[R]/[T]$  بعامل يساوي  $100^4$   $10^8$  =. إن النسبة في غياب المادة الخاضعة يكون  $10^{-7}$ . ومن ثم فإن المتصلة (جزيئات المادة الخاضعة)، المرتبطة كلية تكون  $10^{-7} \times 10^8 = 10$ .

٣- إن أجزاء الجزيئات في الصورة R تكون  $10^{-5}$ ، 0.004 و 0.15 و 0.998 و 1 عندما يرتبط ب، 0 و 1 و 3 و 4 من المتصلة على التوالي.

٤- النموذج المتعاقب يمكن أن يستخدم في معالجة التعاونية السالبة، بينما النموذج المتوافق (المتماثل) لا يمكن أن يستخدم.

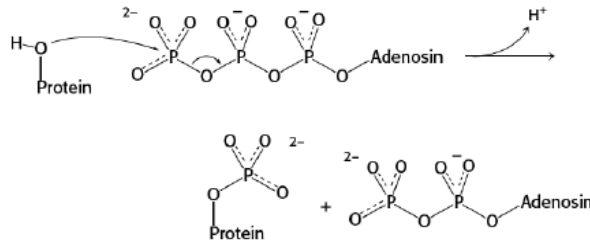
٥- سوف يتبع حركات ميكليس- منتين البسيط لأنه دائماً وأساساً يكون في الحالة R.

٦- (أ) يزيد (ب) ينخفض (ج) تزداد الألفة للأكسجين

## فصل ١٥

٣- التنشيط لا يعتمد على تركيز مولد الإنزيم لأن التفاعل يكون خلال الجزيء.

٥-





المجموعات المتوقعة في الموقع النشط تشمل قاعدة لتزيل البروتون من السيرين، ومجموعات مثل Asp و Glu لترتبط بأيون المغنسيوم بالإتحاد مع ATP، ومجموعات أخرى تثبتت مجموعة ADP المغادرة

## مراجع

## References

### Enzyme Nomenclature تسمية الإنزيمات

Enzyme nomenclature (1976) Biochem. Biophys. Acta. 429, 1-45

Schomburg, D., Salzman, M. (1990). Enzyme-Handbook, Springer Verlag, Berlin.

Webb, E.C. ed. (1992). Enzyme Nomenclature, Academic Press, San Diego, CA.

### History of Enzymology تاريخ علم الإنزيمات

Copeland, R.A. (2000). A practical Introduction to Structure. Mechanism, and Data Analysis, Wiley-VCH, Inc., New York.

Friedmann, H. C., Ed. (1981) Enzymes, Hutchinson Ross, Stroudsburg, PA. [This book is part of the series “Benchmark Papers in Biochemistry.”]

Judson, H. F. (1980) The Eighth Day of Creation, Simon & Schuster, New York.

Kornberg, A. (1989) For the Love of Enzymes. The Odyssey of a Biochemist, Harvard University Press, Cambridge, MA.

Werth, B. (1994) The Billion Dollar Molecule, Simon & Schuster, New York.

### Chemical Bonds and Chemistry of Life الروابط الكيميائية وكيمياء الحياة

Atkins, P.W. (1995). Physical Chemistry 5th ed., Freeman, New York.

Grey, H.B. (1973). Chemical Bonds: An Introduction to Atomic and Molecular Structure, Benjamin / Cummings, Menlo Park, CA.

Lowry, T.H., and Richardson, K.S. (1981). Mechanism and Theory in Organic Chemistry, 2nd ed., Harper & Row, New York.

Pauling, L. (1960). The Nature of Chemical Bond, 3rd ed., Cornell University Press, Ithaca, NY.

Stryer L. (1989). Molecular Design of Life, Freeman, New York.

Van Holde, K.E., Johnson, W.C. and Hu, P.S. (1998). Principles of Physical Chemistry, Prentice Hall.

### **Proteins and Enzymes Structure** تركيب البروتينات والإنزيمات

Angelitti, R. (1998). Proteins, Academic Press, London.

Branden, C. and Tooze, J. (1991). Introduction to Protein Structure, Garland, New York.

Carey, P. (1996). Protein Engineering and Design. Academic Press, London.

Copeland, R.A. (1994). Method for Protein Analysis: A Practical Guide to Laboratory Protocols, Chapman & Hall, New York.

Creighton, T.E. (1984). Proteins Structure and Molecular Properties, Freeman, New York.

Dixon, M., and Webb, E.C. (1979). Enzymes, 3rd ed., Academic Press, New York.

Dobson, C. (1996). Protein Folding, Cambridge University Press, Cambridge.

Fresht, A. (1999). Structure and Mechanism in Protein Science. Freeman, Basingstoke.

Stryer L. (1989). Molecular Design of Life, Freeman, New York.

Walsh, G. (2002). Proteins Biochemistry and Biotechnology, John Wiley & Sons, England.

### **Protein – Ligand Binding** ارتباط البروتين المستقبل

Ackers, G.K. (1973). Methods Enzymol., 27, 441.

Attle, A.D., and Raines, R.T. (1995). Analysis of Receptor – Ligand Interaction, J. Chem., Ed., 92: 199-224.

Bell, J.E. and Bell, E.T. (1988). Proteins and Enzymes, Prentice Hall Englewood Cliffs, NJ.

Campbell, I.D. and Dwek, R.A. (1984). Biological Spectroscopy Benjamin / Cummings, Mento Park, CA.

Copeland, R.A. (1994). Method for Protein Analysis: A Practical Guide to Laboratory Protocols, Chapman & Hall, New York.

- Hulme, E.C. (1992). Receptor – Ligand Interactions: A Practical Approach, Oxford University Press, New York.
- Klotz, I.M. (1997). Ligand – Receptor Energetics: A Guide for the Perplexed, Wiley, New York.
- Perutz, M. (1990). Mechanisms of Cooperativity and Allosteric Regulation in Proteins, Cambridge University Press, New York.
- Segel, I.H. (1976). Biochemical calculations, 2nd ed., Wiley, New York.
- Weber, G. (1975). Energetics of Ligand Binding to Protein, Adv. Protein Chem., 29: 1-83.
- Wyman, J. and Gill, S.J. (1990). Binding and Linkage University Science Books, Mill Valley, CA.

### Enzymes Kinetics and Mechanisms حركيات وآليات الإنزيمات

- Bell, M.L., Bergeron, R.J. and Komiyama, M. (1984). Proteins and Enzymes, Prentice – Hall; Englewood Cliffs, NJ.
- Bender, M.L., Bergeron, R.J. and Komiyama, M. (1984). The Bioorganic Chemistry of Enzymatic Catalysis, Wiley, New York.
- Bugg, T. (1997). An Introduction to Enzyme and Coenzyme Chemistry, London, Blackwell Press.
- Cornish – Bowden, A. (1995). Fundamentals of Enzyme Kinetics, London; Portland Press.
- Fresht, A. (1999). Enzymes Structure and Mechanism: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding, Freeman, New York.
- Fierke, C.A. and Hammes, G.G. (1995). Methods Enzymol., 249, 3-37.
- Fischer, E. (1894). Berichte, 27, 2985.
- Henri, V. (1903). Lois Generales de L'action des diastases Hermann, Paris.
- Hammes, G.G. (1982). Enzyme catalysis and Regulation, Academic Press, New York.
- Johnson, K.A. (1992). Enzymes, XX, 1-61.
- Koshland, D.E. (1958). Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 44, 98.
- Kraut, J. (1988). How do Enzymes work? Science 242: 533, XX, 1-61.
- Lineweaver, H. and Burk, J. (1934). J. Am. Chem. Soc. 56, 658.

- Michaelis, H. and Menten, M.L. (1913). Biochem. Z. 49, 333.
- Plowman, K.M. (1972). Enzyme Kinetics, McGraw-Hill, New York.
- Schulz, A.R. (1994). Enzymes Kinetics from Diastase to Multi-enzyme Systems, Cambridge University Press, New York.
- Segal, I.H. (1975). Enzyme Kinetics, Wiley, New York.
- Walsh, C. (1979). Enzyme Reaction Mechanisms, Freeman, New York.

### **Enzymes Assays** اختبارات الإنزيمات

- Dixon, M., and Webb, E.C. (1979). Enzymes, 3rd ed., Academic Press, New York.
- Easterby, J.S. (1973) "Coupled Enzyme Assays: A General Expression for the Transient", Biochem., Biophys. Acta, 293, 552-8.
- Fersht, A. (1985). Enzyme Structure and Function, 2nd ed., Freeman, New York.
- Gabriel, O. and Gersten, D.M. (1992). In Enzyme Assays, A Practical Approach, R. Eisenthal and M.I. Danson, Eds., IRL Press, Oxford.
- Gomori, G. (1992). In CRG Practiced Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, G.D. Fasman, Ed., CRC Press, Boca Raton FL.
- Knight, C.G. (1995). Methods Enzymol., 248, 18-34.
- Kyte, J. (1995). Mechanisms in Protein Chemistry, Garland, New York.
- Lackowicz, J.R. (1982). Principles of fluorescence Spectroscopy, Plenum Press, New York.
- Oldham, K.G. (1968). Radiochemical Methods of Enzyme Analysis. Amersham International, Amersham, U.K.
- Oldham, K.G. (1992). In Enzyme' Assays, A Practical Approach, R. Eisenthal and M.J. Danson, Eds. IRL Press Oxford.
- Segal, I.H. (1976). Biochemical calculations, 2nd ed., Wiley, New York.
- Tipton, K.F. (1992). In Enzyme Assays, A Practical Approach, R. Eisenthal and M.J. Danson, Eds., IRL Press, Oxford.

## Enzyme Inhibition تثبيط الإنزيمات

- Bieth, J. (1974). In Protein Inhibitors, Bayer-Symposium V. Springer-Verlag, New York.
- Cleland, W.W. (1979). Methods Enzymol., 63, 103.
- Copeland, R.A. (1994). Methods of Protein Analysis, A Practical Guide to Laboratory Protocols, Chapman & Hall, New York.
- Dixon, M., and Webb, E.C. (1979). Enzymes, 3<sup>rd</sup> ed., Academic Press, New York.
- Douglas, H., and Penny, C. (1981). Bioorganic Chemistry. A Chemical Approach to Enzyme Action, Springer – Verlag, New York.
- Glazer, A.N., Delange, R. and Sigman, D.S. (1975). Chemical Modification of Proteins, Elsevier, New York..
- Gringauz, A. (1996). Medicinal Chemistry: How Drugs Act and Why, Wiley, New York.
- Hammet, L.P. (1970). Physical Organic Chemistry, McGraw – Hill, New York.
- Hansch, C., and Leo, A. (1979). Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology Wiley, New York.
- Jakoby, W.B. and Wilchek, M., Eds. (1977). Methods in Enzymology, Vol. 46, Academic Press, New York.
- Kubinyi, H. (1993). QSAR: Hansh Analysis and Related Approaches, VCH, New York.
- Lundlad, R. (1991). Chemical Reagents for Protein Modification, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Martin, Y.C. (1978). Quantitative Drug Design, Dekker, New York.
- Sandler, M. and Smith, H.J. (1994). Design of Enzyme Inhibitors as Drug – Vols 1 and 2, Oxford University Press, New York.
- Segel, I.H. (1993). Enzyme Kinetics, Wiley, New York.
- Segel, I.H. (1976). Biochemical calculations, 2<sup>nd</sup> ed., Wiley, New York.
- Silverman, R.B. (1988). Mechanism – Based Enzyme Inactivation: Chemistry and Enzymology, Vols. I and II, CRC Press Boca Raton, FL.

**التعاونية والتنظيم غير الوضعي Cooperativity and Allosteric Regulation**

Boyer, P.D., (ed.), (1970). The Enzymes, 3<sup>rd</sup> ed. Academic Press, New York.

Lipscomb, W.N. (1991). Structure and Function of Allosteric Enzymes, Chemtracts – Biochem. Mol. Biol. 2, 1 – 15.

Perutz, M. (1990). Mechanisms of Cooperativity and Allosteric Regulation in Proteins, Cambridge University Press, New York.

Segel, I.H. (1993). Enzyme Kinetics, Wiley, New York.