الحموض الآمينية الأوكسيدازيـــــة (L-AMINOACIDES OXYDASES) لأغلفـــة (ENVELOPPES) بكتريا PROTEUS MIRABILIS
الخواص العامـــة (PROPRIETES GENERALES)

د. ابراهيم جبور
أستاذ مساعد في كلية العلوم
بجامعة تشريـــن

تنجز بكتريا Proteus نزع الزمرة الآمينية التأكسدية Désamination oxydative لجميع الحموض الآمينية تقريبا بوجود أكسجين الهواء . تستخدم طريقة التفسخ القلوي (Lyse alcaline) لتحضير الأغلفة الخلوية لبكتريا P.mirabilis . تقاس الفعالية الأوكسيدازية اما باستخدام تفاعل الفنيل بيروفات اعتبارا من L- فنيل آلانين الذي يشير الى أن تشكل(١) ميللي ميكرومول من الفنيل بيروفات يطابق استهلاك $\frac{1}{2}$ ميللي ميكرو مول من الأوكسجين المستعمل أو باستخدام تفاعل ارجاع الـ DCIP بوجود الـ PMS . بالاضافة الى الفعالية L فنيل آلانين أوكسيداز تحتوي أغلفة P.mirabilis NADH - oxydase وعدة سيتوكرومات . تتأثر الفعالية L - فنيل آلانين أوكسيداز بدرجة الحموضة حيث إن درجة الحموضة المثلى تتوضع بين 7,3 - 7,8 . تحفز الشوارد الموجبة (Cations) هذه الفعالية في حين أنها تتثبط بمثبطات السلسلة التنفسية . تسبب الفوسفوليباز A (Phospholipase A) ازالة الفعالية L - فنيل آلانين أوكسيداز جزئيا بوجود شوارد المغنزيوم مما يشير الى ارتباط البروتين الأنزيمي بفوسفوليبيدات الغشاء . كذلك يؤكد منحني أرينوس ، الحاصل بقياس ارجاع الـ DCIP بدلالة درجة الحرارة ، وجود مثل هذا الارتباط بين الفوسفوليبيدات والبروتين الأنزيمي . تتميز الفعالية L - فنيل آلانين أوكسيداز بحساسية كبيرة تجاه المنظفات الأيونية أو غير الأيونية حيث التثبيط يتطلب فترة حضن بوجود المنظف . تبين دراسة ثابت ميكائليس (Km) أن P.mirabilis تحتوي على الأقل على ثلاثة حموض أمينية أوكسيدازية : الأولى نوعية ازاء الحموض الأمينية ذات السلسلة الجانبية القطبية والثانية نوعية ازاء الحموض الآمينية القلوية والثالثة ازاء الحموض الآمينية ذات السلسلة الجانبية اللاقطبية . من المرجح جدا أن تكون هذه الـ Oxydoreductases ذات طبيعة فلافوبروتينية وأنها تشارك في عملية نقل الالكترونات (السلسلة التنفسية) .

مقدمة :

تنجز بكتريا من نوع Proteus نزع الزمرة الآمينية التأكسدية (Désamination oxydative)

لجميع الحموض الآمينية تقريبا بوجود أكسجين الهواء (١) وتشكيل الفنيل بيروفات (phényl pyruvate) اعتبارا من الفنيل آلانين L - (L-Phenylalanine) يستعمل بكثرة لتمييز بكتريا Proteus و Providencia (٢-٤) . تؤكسد أجزاء غشائية معزولة من Proteus بواسطة السحق الميكانيكي الـ NADH الـ Succinate ، الـ Lactate والـ Formiate (٦،٥) . وهذه الفعاليات الأوكسيدازية (Activites oxydasiques) برهن أيضا على وجودها في أغشية بكتريا Escherichia coli (٧ - ٩) حيث تكون مرتبطة مع السلسلة التنفسية (١٠) ، وأكسدة الـ Lactate تكون أيضا مقرونة مع النقل الفعال لعدة سكريات وحموض آمينية (١١) .

يؤكسد بسرعة كبيرة جزء مستخلص من سفيروبلاست (Sphéroplastes) بكتريا P.mirabilis بواسطة التفسخ القلوي (Lyse alcaline) بوجود عامل معقد للشوارد الموجبة (Cations) ثنائية التكافؤ ، الفنيل آلانين L - بوجود أكسجين الهواء (١٢) . تصف هذه النشرة العلمية بعضا من خواص هذا الجزء ، المكون أساسيا من أغلفة خلوية حيث الفعالية الأوكسيدازية ، المرتفعة والثابتة في الوقت نفسه ، تبدو فوق عدة حموض آمينية ويمكنها أن تقاس بوجود مستقبل الكترونات اصطناعي. ان نزع الزمرة الآمينية التأكسدية للحموض الآمينية بواسطة هذا الجزء تنجز على الأقل بواسطة نظامين أنزيميين متميزين مستقلين عن الـ NADH - oxydase لكنهما مرتبطان الى سلسلة السيتوكرومات التنفسية كما هو الحال بالنسبة للـ NADH - oxydase

الاختصارات :

Chel-De : Ethylenglycol-bis-(2 - amino ethyl)-N,N,N',N'-tétraacetate.

DCIP : Dichlorophenolindophenol.

PMS : Phénazine méthosulfate(=5 -methyl phynaziniumm éthyl sulfate)

HOQNO : 2-n- heptyl- 4- hydroxyquinoline - N - Oxyde .

NEM : N - éthylmaléimide

PCMB - P - chloromercuribenzoate .

اللوازم والطرق
(Materiel et méthodes)

الأرومات وأوساط الزرع :

تتأتى P. mirabilis و P.vulgaris و P.morganii دون خواص وراثية خاصة ، من منتخبات معهد باستور في باريس . تحفظ الأرومات وتصان فوق الجيلوز (Gélose) المغذي الحاوي بالليتر الواحد على Peptone (٥ غ) ، مستخلص الخميرة (٣غ) ، لاكتوز(١٠ غ) ، (BDH) Tergitol 7 (٠،١غ) ، أزرق البروموتيمول (Bleu de bromothymol) (٠،٠٢٥غ) (pH 6,8 - 7,0) . وهذا الوسط يفيد في الوقت نفسه في التأكد من الخاصية اللاكتوزية السلبية للبكتريا. يعاد عزل الأرومات دوريا اعتبارا من مستعمرة، وتُراقب من أجل تشكيل الـ Urease والفنيل بيروفات .

تحتوي الزراعة في وسط سائل بالليترالواحد على :

(٢٠غ) ،مستخلص الخميرة (٥ غ) ،غليكوز

(٤غ) . تُهوّى المزارع بواسطة التحريك (زمن الجيل : ٢٥ – ٣٠ دقيقة في الدرجة ٣٧°م) .

تحضير الأغلفة :

تستعمل لتحضير الأغلفة الطريقة المرجعية (١٢) المعدلة بشكل خفيف. فالى ١٦٠٠ مل من زراعة أسية (Culture exponentielle) في الدرجة (٣٧°م) الحاوية بالميلليليتر الواحد على ٥ × $١٠^{٨}$ خلية يضاف : سكاروز ٧٥٪ (وزن / حجم) (٣٨٠ مل) ؛ $MgCl_2$ ١ مول (٢٠ مل) ؛ بنسيلين G (٥ × $١٠^{٦}$ وحدة) . يستمر الحضن مع التهوية لمدة ثلاث ساعات في الدرجة ٣٠°م . وبعد التشفيل (١٠ دقيقة بسرعة ٨ – ١٠ ٠٠٠ غ) يعلق راسب السفير وبلاست ويغسل مرة واحدة بواسطة التشفيل في محلول الصيانة (Tampon) المكون من : السكاروز ٠٫٥ مول ، $MgCl_2$ ١٠ ميللي مول ، Tris ٢٠ ميللي مول (pH 7,5)ثم تعلق السفير وبلاست من جديد في ٥٠ مل من نفس محلول الصيانة المذكور أعلاه ، وجميع العمليات حتى المرحلة النهائية تتم بين ٠° – ٤° م . يضاف الى المعلق ٥٠ مل من محلول الـ Chel - DE ٠٫٢ مول وتضبط الـ pH عند ١٠٫٥ . ثم يحرك المزيج بواسطة محرك مغناطيسي خلال ٣٠ دقيقة في درجة حرارة الجليد ، ودرجة الحموضة يحافظ عليها خلال العملية مابين ١٠٫٥ – ١٠٫٧ بواسطة اضافة البوتاس . والراسب الناتج بعد مرور ٢٠ دقيقة من التشفيل عند سرعة ٣٠ ٠٠٠ يغسل مرتين بواسطة التشفيل من جديد في الـ Tris ٢٠ ميللي مول (pH 7,5)، والسكاروز ٠٫٥ مول ثم يوضع في ١٥ مل من نفس محلول الصيانة المذكور أعلاه . بعد ذلك يضاف الى المحضر ١٥٠ ميكرومول من $MgCl_2$ ، حوالي ١٥٠ ميكروغرام من RNase و٣٠ميكرو غرام من DNase . وبعد مرور ١٥– ٢٠ ساعة عند الدرجة صفر مئوية يوضع المحضر ضمن ثلاثة أنابيب تشفيل سريع بمعدل ٥ مل بالانبوب الواحد فوق سطح وسط حاو على طبقة سفلية (٥ مل) من السكاروز ٧٥ ٪ (وزن / حجم) ، والـ Tris ٢٠ ميللي مول ، pH 7,5 وعلى طبقة علوية (٨ مل) من السكاروز ٣٧ ٪ (وزن / حجم) والـ Tris ٢٠ ميللي مول pH 7,5 . ثم بعد ساعة من التشفيل السريع (Ultra - Centrifugation) بسرعة ٨٠–١٠٠ ٠٠٠ غ (MSETC 50 ، دوار ذو فنجان قلاب ٣ × ٢٣ $سم^{٣}$) تجمع الأغلفة الخلوية المتجمعة عند منطقة الفصل بين محلولي السكاروز . والمعلق الناتج عن حفظ هذه الأغلفة عند الدرجة صفر مئوية في وسط سكاروزي مركز (٥٠ – ٦٠ ٪) يحتفظ بأكثر من نصف فعاليته الأوكسيدازية فوق الفنيل آلانين بعد مرور عدة أسابيع .

قياس تفاعلات الأكسدة

(Meusure des oxydations)

١ – استهلاك الأكسجين

(Consommation d'oxygene)

تتم القياسات عند الدرجة ٣٠°م بواسطة مقياس الأكسجين **(Oxygraphe)** من نوع **Gilson** المزود بالكترود **Clark** مستقطب عند ٠٫٨ فولط وبخلية مثبتة الحرارة **(Thermostatée)** ذات ١٫٦ مل . تركيب المزيج النموذجي بالميلليليتر هو التالي : Tris (٢٠ ميكرومول) – maléate ، حمض آميني (٥٠ ميكرومول)، $MgCl_2$ (١٠ ميكرومول) ، معلق غشائي (٥٠ – ٢٠٠

ميكروغرام بروتينات كلية) ، درجة الحموضة النهائية pH 7,5 • تركيز الأكسجين المنحل يمكن اعتباره ٢٤٠ ر ٠ ميللي مول •

٢ـ تشكيل الفنيل بيروفات
:(Formation de phényl-pyruvate)

يحتوي مزيج الاختبار بالميلليليتر الواحد على : L ـ فنيل آلانين (٥٠ ميكرومول) $MgCl_2$ (١٠ميكرو مول) ، Tris ـ (٢٠ ميكرومول) Maléate ، pH 7,5 ، معلق غشائي (١٠ ـ ١٠٠ ميكروغرام بروتينات كلية) • يوقف التفاعل باضافة (٥٠) ميكروليتر من HCl (١) نظامي و(٢٠) ميكروليتر من $FeCl_3$ ٥٪ عند الدرجة صفر مئوية • يتطور التلوين ببطء ولا يثبت الا بعد مرور ٣٠ دقيقة على الأقل عند الدرجة صفر مئوية • يقرأ هذا التلوين عند الموجة ٦٣٠ نانوميتر بعد مرور ٤٥ دقيقة عند الدرجة صفر مئوية ضد مزيج شاهد دون أنزيم ، والنتيجة تصحح من أجل امتصاص الجزيئات الغشائية الموجودة في المعلق • تكون القيمة الناتجة متناسبة مع تركيز الفنيل بيروفات ضمن مجال من ٠٫٠ الى ٣ ميكرو مول/ مل ، وتركيز (١) ميللي مول من الحمض السيتوني (Cétoacide) النقي يطابق كثافة ضوئية (Densité optique) قدرها ٧٥ر٠ .

٣ـ ارجاع ال (Réduction du DCIP) :

يستعمل نفس المزيج السابق المذكور أعلاه المضبوط عند درجة الحموضة pH 7,5 وباءدال الفنيل آلانين عند الاقتضاء بأحماض آمينية متنوعة ويضاف بالميلليليتر الواحد ٠٦ر٠ ميكرومول DCIP و ٨٢ر٠ ميكرومول PMS . والمزيج يشكل في لحظة الاستعمال بمعزل عن الضوء • يتغير تركيز الجزيئات من ٢ الى ٥٠ ميكروغرام بروتينات كلية بالميلليليتر الواحد• يسجل تناقص الكثافة الضوئية عند الموجة ٦٠٠نانوميتر بواسطة مقياس الطيف الضوئي (Spectrophotomètre) من نوع Unicam SP 500 المزود بخلية مثبتة الحرارة (٣٠°م) وبمسجل SP 22 • تقاس السرعة الابتدائية للتفاعل ، وتغير كثافة ضوئية مقدارها ١ر٠ يطابق ارجاع ٢٥ر٦ ميللي ميكرومول DCIP .

٤ـ ارجاع السيتوكروم C (Reduction du cytochrome C)

يستعمل نفس المزيج المذكور أعلاه وباءدال الملونات بستوكروم C قلب الحصان بتركيز ٥ر١ × ١٠$^{-5}$مول• وباهمال امتصاص الستوكرومات الغشائية أمام امتصاص السيتوكروم C يقاس معدل الارجاع ، بالنسبة لمعدل السيتوكروم المرجع كليا بواسطة $Na_2S_2O_4$ ، بملاحظة ازدياد الكثافة الضوئية عند الموجة ٤٢٠ نانوميتر التي تطابق تغير موضع العصابة Soret (Bande) .

٥ ـ أكسدة ال NADH (Oxydation du NADH)

يستعمل نفس المزيج السابق لكن باءدال الحمض الآميني والملونات بالNADH بتركيز ٣ر٠ ميكرومول / مل • يسجل كما أوردنا سابقا تناقص الكثافة الضوئية عند الموجة ٣٤٠ نانومتر (nm)

معايرة البروتينات والفوسفور
(Dosage des protéines et du phosphore)

تعاير البروتينات الكلية بطريقة

LOWRY (١٣) المعدلة من قبل ZACK و COHEN(١٤) . أما الفوسفور العضوي فيعاير بطريقة Bartlett (١٥) .

كروماتوغرافيا الفنيل بيروفات
(Chromatographie du phényl-pyruvate)

يستعمل نفس المزيج التفاعلي الموصوف أعلاه (٢ مل) والحاوي على(٢٠) ميكرومول من $[^{14}C]$L-Phenylalanine (2 mC/ mM) . وبعد ٣٠ دقيقة عند الدرجة ٣٠°م تجعل حموضة المزيج حوالي 1N بالـ HCl ويستخلص مرتين بواسطة ٤ مل من أسيتات الايتيل. تجمع الأطوار العضوية وتجفف بوجود زيادة من مسحوق كبريتات الصوديوم. وبعد تبخير السائل الطافي حتى الجفاف تؤخذ الفضلة الناتجة في ٢٥ ميكروليتر من أسيتات الايتيل وتجرى عليها عملية الكروماتوغرافيا الورقية المبدلة للكاتيونات من نوع Whatman CM بوجود الفنيل بيروفات غير الموسوم، بواسطة المحل : بوتانول - 2 (Butanol - 2) ، ميتانول ، ماء (٢:١:١) . يظهرر ورقة الكروماتوغرافيا بكلور الحديد $FeCl_3$ ١٪ الحمض السيتوني باللون الأخضر. يكون للفنيل آلانين والفنيل بيروفات RF من رتبة ٠ر٤٢ و ٠ر٨٦ على التوالي ضمن هذا النظام .

استخلاص وكروماتوغرافيا الفوسفوليبيدات :

تستخلص فوسفوليبيدات الجزيئات الغشائية المجموعة بواسطة التثفيل السريع بطريقة Folch ومساعديه (١٦). ثم تفصل فوق طبقة رقيقة من السيليس G (سماكتها ٥ر٠ ملم ، منشطة خلال ٣٠ر١ ساعة في الدرجة ١٠٠°م) بواسطة الكلوروفورم - ميتالول - أمونياك ٧ نظامي (٦٦: ٣٦ر٤:٥) أثناء الاتجاه الأول وبواسطة الكلوروفورم- ميتانول حمض الخل - ماء (٩٠:١٤:٣ر٦:١) أثناء الاتجاه الثاني . تجفف الصفيحة لمدة ساعتين في درجة الحرارة العادية بين عمليتي الهجرة . تحدد مختلف المكونات حسب طريقة White (١٧) .

النتائج (Résultats) :

تحلل السفير وبلاست
(Lyse des sphéroplastes)

يحتوي الجزء الناتج عن المعالجة القلوية للسفير وبلاست على ٣٠ - ٤٠٪ من - الفنيل آلانين - أوكسيداز (L-Phénylalanine -oxydase) القابلة للقياس في خلايا الانطلاق(الخلايا غير المعالجة) (جدول I). تكون هذه الفعالية كثيرة الثبات الى حد ما لأنهالاتفقد الا نصف قيمتها بعد أربعة الى ثمانيةأسابيع من الحفظ في الدرجة صفر مئوية بوجود السكاروز المركز (٥٥ ٪) . بالمقابل ، فان تحلل السفير وبلاست في درجة الحموضة المعتدلة بواسطة المعالجة الحلولية أو المعالجة بالأمواج فوق الصوتية (ULtra - sons) لايعطي الا فعالية غير منتظمة ، منخفضة بشكل عام ، والتي تميل لأن تتلاشى سريعا بمرور الزمن .

تزيل المتظفات (Détergents) مثل (الـ Désoxycholate الـ 58 Brij ، الـ Tritonx 100 والـ Tuhrol) فعالية النظام كليا .

جدول I : فعاليات مقارنة للسفيرو-بلاست والأغلفة المعزولة من ال P.mirabilis
(تشكل الفنيل بيروفات اعتبارا من الفنيل آلانين - L)

	ملغ بروتينات كلية	فعالية كلية (ميكرومول فنيل بيروفات / دقيقة)	فعالية مئوية %
السفيروبلاست	٧١٢	١٤٦	١٠٠
المرحلة I (*)	١٢٥	٧١	٤٨
المرحلة II (**)	٦٩	٥٦	٣٨

(*) قبل التثفيل في الوسط ذي طبقتي السكاروز •
(**) المعلق النهائي •

تعتبر درجة الحموضة (pH) المرتفعة أثناء التحلل الخلوي ، ٠ر١٠ و ٠ر١١ ، العامل الرئيسي بالنسبة لتحضير الجملة الأوكسيدازية • يسرع اضافة عامل معقد للكاتيونات ثنائية التكافؤ التفكيك الخلوي بجعله أكثر تجانسا ، طبقا للدور الذي تلعبه هذه الشوارد في بنية الأغلفة البكتيرية (١٨-٢٠) • يعطي ال Chel - DE العامل المستعمل في حل السيتوكروم الأوكسيدازي (Cytochrome-Oxydase) الميتوكوندري في وسط قلوي نتائج قابلة للتكرار بوجه خاص (٢١) • يبين الجدول التالي (II) أن زمن تعريض المادة الخلوية لشروط التحلل الخلوي في درجة الحموضة المحصورة مابين ٥ر١٠ - ٧ر١٠ ليس له أي تأثير يذكر. تبين الملاحظة المجهرية بعد مرور ٣٠ دقيقة أن معدل السفير وبلاست غير المتحللة بالنسبة لخلايا الانطلاق أقل من $١٠^{-٣}$ • ان عدد الخلايا السليمة لايمكن في أي حال من الأحوال أن يفسر الفعالية الأوكسيدازية المستردة القوية والتي هي بشكل عام من رتبة ٦ر٠ الى ٨ر٠ ميكرومول فنيل بيروفات المتشكلة بالدقيقة الواحدة وبالميليغرام الواحد من البروتينات الكلية في درجة الحرارة ٣٠°م • ان تحلل خلوي فعال يمكن أيضا أن يتم عند درجة حموضة أصغر بقليل (حوالي ٠ر١٠) ، لكن الفعالية الناتجة أقل استمرارا • بالمقابل ، فان درجة حموضة أعلى ومن رتبة ٣ر١١ - ٥ر١١ في لحظة التحلل الخلوي تسبب وبسرعة معتبرة ازالة فعالية النظام التي تصبح تامة كليا خلال عدة دقائق عند درجة الحموضة ٠ر١٢ •

جدول II : تأثير زمن تحريك السفيروبلاست في وسط التحلل الخلوي على الفعالية الكلية للأغلفة الغشائية الناتجة

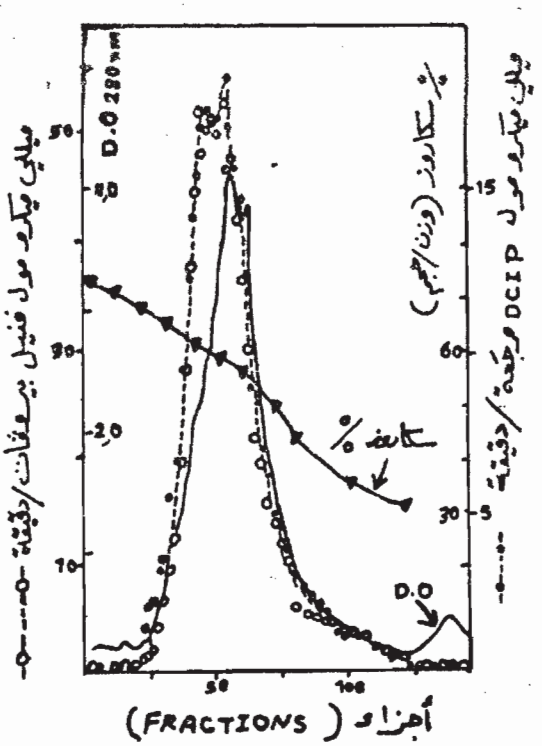
تحريك السفير وبلاست عند درجة الحموضة ٥ر١٠ • الزمن بالدقائق (*) •	الفعالية الكلية ٪
١٠	٣٣
٣٠	٣٩
٥٠	٣٠
٧٠	٢٤

* يكون فصل الجزئيات بواسطة الترسيب بعد زمن تعريض قصير جدا (٠ – ١ دقيقة) غير قابل للتحقيق بشكل صحيح ضمن الشروط الموصوفة بسبب اللزوجة المرتفعة جدا للوسط .

تقاس الفعالية بواسطة تشكل الفنيل بيروفات اعتبارا من الفنيل آلانين L- ويعبر عنها بالنسبة المئوية من الفعالية الكلية بالنسبة للكمية المطابقة لسفير وبلاست الانطلاق . تعاد درجة حموضة الوسط الى ٩ تقريبا باضافة HCl قبل التثفيل .

يمثل معلق الأغلفة في المرحلة النهائية للتحضير حوالي ١٠ / من البروتينات الكلية الأصلية (بروتينات الانطلاق) (جدول I) مع نسبة فوسفور / بروتينات تذهب من ١٨ر٠ الى ٢٢ر٠.تمثل الفوسفوليبيدات المستخلصة بطريقة Folch ومساعديه (١٦) ٢٠ الى ٢٥ ٪ من الفوسفور الكلي ، وتركيبها المحدد بكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (انظر فقرة الطرق)،الممثل بالنسبة المئوية للفوسفور الفوسفوليبيدي ، هو كالتالي : الفوسفاتيديل ايتانول آمين (Phosphatidy ēthanol amine) (٥٠ – ٦٠ ٪) ، الفوسفاتيديل غليسيرول (Phosphatidyl glycērol) (١٠–١٣ ٪) وثنائي الفوسفاتيديل غليسيرول (Diphosphatidyl glycērol) (١٠– ٢٠ ٪) والمحضر يحتوي عادة من ١٠ الى ٢٠ ٪ من الليزوفوسفاتيديل ايتانول أمين (Lyso phosphatidyl ēthanol amine) وهذا ناتج على الأرجح عن عملية تخريب لأن مجموع الفوسفاتيديل ايتانول أمين + الليزوفوسفاتيديل ايتانول أمين يكون ثابتا الى حد ما ويطابق ٧٠ ٪ من الفوسفوليبيدي الحاصل بواسطة هذه الطريقة .

بواسطة الترسيب عند التوازن (Ultra -sedimentation à l'equilibre) ضمن مجال من السكاروز (٣٠ – ٧٥ ٪)(وزن/حجم) تتجمع الجزيئات الفعالة داخل منطقة حيث تركيز السكاروز يتراوح بين ٥٥ – ٦٢ ٪ (الكثافة : ٢١ر١ – ٢٣ر١). انها تمثل على الأرجح مجموعة متغايرة الخواص الى حد ما (شكل –١) حيث الكثافة المتوسطة تبدو أعلى بقليل من كثافة مجموع الجزيئات المترسبة كشاهد على وجود بعض التفاوت (الزيحان) بين منحنيات الفعالية ومنحنيات الكثافة الضوئية .



شكل –١– التثفيل السريع جدا عند التوازن (Ultra-centrifugation à - l'equilibre)

في ممال من السكاروز لأغلفة P.mirahilis

يصان الممال (Gradient) بواسطة محلول الصيانة (Tampon) المكون من فوسفات الصوديوم (١) ميللي مول، pH 7,5 الحجم الكلي : ٢٠ مل + ١ر٨ مل معلق أغلفة الـ P.mirabilis . مدة التثفيل السريع : ١٤ ساعة عند ٧٠ ٠٠٠ g (M.S.E.TC 50) المنحني المستمر: كثافة ضوئية (D.O) عند ٢٨٠ نانوميتر (nm) . المنحني ذي الخط غير المستمر: فعالية أوكسيدازية مقيسة بواسطة ارجاع الـ DCIP (دوائر سوداء) أو تشكل الفنيل بيروفات (دوائر بيضاء).

قياس الفعالية الأوكسيدازية

(Mesure de l'activité oxydasique)

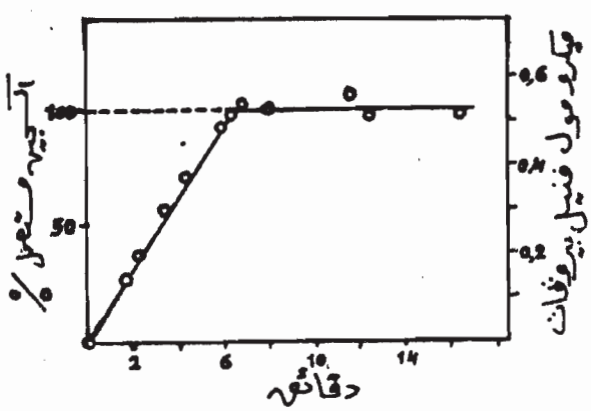
يتم تحول الفنيل آلانين - L الى الفنيل بيروفات بواسطة أغلفة الـ P.mirabilis بسرعة ثابتة خلال الخمس عشرة دقيقة الأولى من الحضن عند الدرجة ٣٠°م (١٢) ، وهذه السرعة تزداد خطيا مع تركيز الجزيئات في المزيج . يسبب ازدياد كبير جدا في كمية الغشاء (أكثر من ٧٥ الى ١٠٠ ميكرو غرام من البروتينات بالميلليليتر) استهلاك الأكسجين المنحل بسرعة حيث عندها يكون من الضروري تهوية المزيج بالتحريك أو جعل سطح التماس بين المحلول والهواء المحيط كبيرا .

من الممكن تحديد النسبة بين الأوكسجين المستهلك والفنيل بيروفات المتشكل بواسطة طريقة الأكسجين (Oxygraphie) (انظر فقرة الطرق) ومن أجل الاقلال (الى الحد الأدنى) من الأخطاء المتأتية من التبادلات الغازية بين المحلول والهواء المحيط ، فانه تستعمل كمية كبيرة من الأغلفة الفعالة ويغطى سطح السائل بطبقة من زيت البارافين أثناء فترة التسجيل . يسمح الشكل -٢- بمقارنة اختفاء الأكسجين المنحل مع كميات الفنيل بيروفات الحاصلة وذلك بايقاف التفاعل بعد فترات متغيرة . بالافتراض أن تركيز الأكسجين في الشروط المستعملة هو ٢٤٠ر٠ ميللي مول ، فاننا نشاهد أن ميللي ميكرومول من الفنيل بيروفات يطابق بشكل ملموس $\frac{1}{2}$ ميللي ميكرو مول من الأكسجين المستهلك . فالنتيجة اذا في صالح الموديل التفاعلي العادي أو المألوف .

$$C_6H_5\text{-}CH_2\text{-}CH(NH_2)COOH + \longrightarrow$$

$$C_6H_5\text{-}CH_2\text{-}CO\text{-}COOH + NH_3 [1,12]$$

تشير النسبة الحاصلة الى أن الفنيل بيروفات هو بالفعل المركب العضوي الوحيد الناتج اعتبارا من الفنيل آلانين في الشروط التجريبية . ان مشتقات أخرى للفنيل آلانين مثل Phynyl acétal-aldéhyde ، الـ Phényl acetate ، والـ P.Hydroxy phényl pyruvate والـ Phényl ethylamine لاتعطي أية تلوين ثابت مع كلور الحديد ($FeCl_3$) في شروط الاختيار . لقد تم تمييز الفنيل بيروفات بعد الاستخلاص في وسط حمضي بواسطة أسيتات الايتيل والكروماتوغرافيا فوق الورق المبدل للشوارد كما هو مبين في فقرة الطرق ، أو الكروماتوغرافيا الغازية (٢٢) .



شكل -٢ - استعمال الأكسجين مع مرورالزمن وتحول الفنيل آلانين الى الفنيل بيروفات .

الخط المتصل : الأكسجين المستهلك (تسجيل بواسطة مقياس الأكسجين) الدوائر البيضاء : كمية الفنيل بيروفات .

حرارة الاختبار : ٣٠°م ، البروتينات الكلية : حوالي ١٤٠ ميكروغرام في ١ر٦ مل . شروط أخرى : انظر فقرة الطرق والنص .

نلاحظ على الشكل -٢- أن مقدار الأكسجين المنحل يتناقص تقريبا بشكل خطي بدلالة الزمن خلال القسم الأكبر من التفاعل حتى يصل الى ١ أو ٢ ٪ من المعدل الأصلي . وهذه الخاصية ، الموصوفة عند أنظمة أخرى (٢٣ - ٢٥) ، يمكن اعتبارها على العموم كانعكاس لالفة قوية للأكسجين ، الذي لأجله يتوضع مستوى الاشباع عند مستوى منخفض جدا . وهذه الظاهرة يمكنها أيضا أن تفسر عن طريق تدخل سلسلة معقدة من الأكسدة - الارجاع (Oxydo - réductions) حيث تدفق الالكترونات يكون محددا بشدة بواسطة مرحلة التي لاتتعلق مباشرة بالأكسجين . وهذه المرحلة المحددة يمكنها أن تكون التفاعل الأصلي لازالة نزع الزمرة الآمينية (Désamination) للسوبسترا (مادة التفاعل الأنزيمي) .

تستعمل أغلفة الـ Proteus بفعالية الـ DCIP كمستقبل للالكترونات بغياب الأكسجين أو بحضوره . والتفاعل ينشط (يتحفز) بقوة (حتى ٥٠ مرة) باضافة الـ PMS كوسيط . تزداد السرعة الابتدائية لارجاع الـ DCIP خطيا مع تركيز الـ PMS حتى قيم أكبر من ٢ × ١٠$^{-٣}$ مول . ومعدل الـ PMS حدد هنا قصدا عند ٢٥٠ ميكروغرام بالميليليتر (٢ر٨ × ١٠$^{-٤}$ مول) من أجل الاقلال من بعض التأثيرات الثانوية ، خاصة التفاعل الحاصل بين الـ PMS والحموض السيتونية - (Céto-acides -) ذات النواة العطرية (Aromatique) أو الايميدازولية (Imidazole) .

يكون ارجاع الـ DCIP خطيا بدلالة الزمن في الشروط المختارة (انظر فقرة الطرق) ويسمح بالكشف عن أكسدة الفنيل آلانين مع عدة ميكروغرامات فقط من البروتينات الغشائية بالميلليليتر . تكون الفعالية الملاحظة وسطيا في الشروط النموذجية من رتبة ٢ر٠ الى ٤ر٠ ميكرو مول DCIP مرجعة بالدقيقة الواحدة وبواسطة ميلليغرام واحد من البروتينات الكلية . واستبعاد الأكسجين المنحل بواسطة التفريغ والبقبقة المطولة للآزوت لايحفز ارجاع الـ DCIP الا بشكل خفيف . بينما اضافة الـ KCN ١٠$^{-٣}$ مول يزيده بحوالي ٣٠ ٪ (انظر فيما بعد) .

اذا فانتقال الالكترونات فوق الـ DCIP يكون أبطأ بقليل من انتقالها فوق الأكسجين لوحده في الشروط العادية . يمكن لسيتوكروم C (Cytochrom C) قلب الحصان أن يعمل أيضا كمستقبل

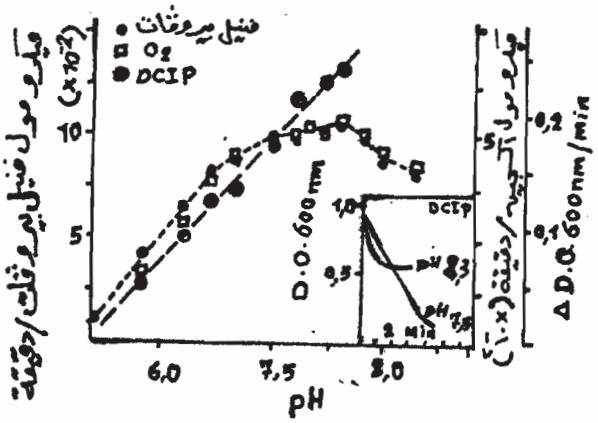
للالكترونات أثناء أكسدة الفنيل آلانين بدلا من المزيج PMS-DCIP . والتفاعل لايتجاوز ٠٫٠٠٥ ميكرو مول من السيتوكروم C المرجع بالدقيقة الواحدة وبالميلليغرام الواحد من البروتينات الكلية ، لكن استنفاد الأكسجين المنحل أو اضافة السيانور يزيده بمقدار ٢ الى ٤ مرات . ان السيتوكروم C المرجع مسبقا بالأسكوربات (Ascorbate) لايمكن اعادة أكسدته بواسطة الأغشية . كذلك فان الـ Nitrobleu de tétrazolium والـ Tétranitrobleu du tetrazolium لايعطيان الا تفاعلات ضعيفة جدا مع أو بدون الـ PMS. بينما أزرق الميتيلين - Bleu de) méthylène) وفيري سيانور البوتاسيوم (Ferri cyanure de potassium) لايُرْجَعان بواسطة الأغلفة .

تحتوي أيضا الأغلفة المعزولة من Proteus على NADH - Oxydase ذات فعالية متغيرة ، التي تميل لأن تتناقص بسرعة معتبرة مع مرور الزمن. ان اضافة الفنيل آلانين بزيادة لاتسبب أي تثبيط لهذا التفاعل عن طريق المنافسة. وخلافا للفنيل آلانين ـ أوكسيداز فان الـ NADH - Oxydase يمكنها أن تستعمل الفيري سيانور كمستقبل للالكترونات . كذلك فان الـ DCIP (دون PMS) وسيتوكروم C الحصان يكونان أيضا مرجَعين . لم يكشف عن أية أكسدة لل Succinate في المحضر .

تأثير بعض العوامل على الفعالية الأوكسيدازية :

يتغير استهلاك الأكسجين وانتاج الفنيل بيروفات أثناء أكسدة الفنيل آلانين بشكل موازٍ مع درجة الحموضة (شكل ـ ٣ـ) حيث إن درجة الحموضة المثلى تكون واسعة بشكل معتبر وتتوضع بالقرب من ٧٫٣-٧٫٨ يعطى ارجاع النظام PMS-DCIP بدلالة درجة الحموضة نتائج صعبة التفسير بسبب أن الحركية التفاعلية ، بعد درجة الحموضة ٧٫٥ ، تميل لأن تترك مظهرها الخطي وتشير الى عدم ثبات الـ PMS في وسط قلوي . ودرجة الحموضة ٧٫٥ المختارة في الاختبارات البروتينية ربما لاتطابق درجة الحموضة المثلى الحقيقية لهذا التفاعل الخاص التي تبدو أنها تتوضع عند درجة حموضة أكبر من ٨٫٠ .

تختلف هذه النتائج عن نتائج Stumpp و Green (١) الحاصلة مع بكتريا كاملة (pH 6,8) وتتقارب بشكل ملموس مع الملاحظات المشاهدة من قبل Chen ومساعديه (٢٦) حول أكسدة الحموض الأمينية الكبريتية بواسطة P. rettgeri . تكون درجة الحموضة المثلى لـ NADH - Oxydase الأغلفة المعزولة قريبة من ٨٫٠

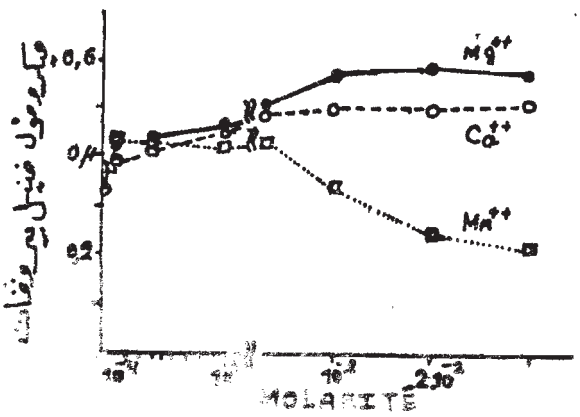


شكل ـ٣ـ : تأثير درجة الحموضة على أكسدة الفنيل آلانين ـ L .
الدوائر السوداء : الفنيل بيروفات

المقدر بواسطة كلور الحديد $FeCl_3$.
المربعات : الأكسجين المستهلك (المقاس بمقياس الأكسجين) .
الدوائر المظللة : ارجاع ال DCIP المقاس عند الموجة ٦٠٠ نانوميتر. ان حركية هذا التفاعل الأخير ، التي تكون خطية خلال الدقيقتين الأولى والثانية على الأقل عند درجة الحموضة ٧ر٥ ، تصبح مقوسة عند درجة الحموضة القلوية وتجعل القياسات غير دقيقة (الأسفل الى اليمين) .

تحفز الشوارد الموجبة (Cations) لاسيما شوارد المغنزيوم (Mg^{++}) بشكل خفيف أكسدة الفنيل آلانين في الهواء بواسطة الجزيئات الغشائية (شكل – ٤ –). وشوارد الكالسيوم (Ca^{++}) والمنغنيز (Mn^{++}) يمكنها أن تحل محل شوارد المغنزيوم الى حد ما رغم أن هذه الأخيرة تكون عوامل مثبطة بوضوح عند التركيز $١٠^{-٢}$ مول وما يليه .

تثبط شوارد النحاس (Cu^{++})، التوتياء (Zn^{++}) والكوبالت (Co^{++}) التفاعل عند تركيز أصغر من $١٠^{-٤}$ – $١٠^{-٥}$ مول . أخيرا فان لشوارد البوتاسيوم (K^{+}) تأثيرا محفزا ضعيفا (٢٠٪) عند تركيز مرتفع نسبيا ($١٠^{-١}$ مول)



شكل –٤– : تأثير شوارد المغنزيوم ، الكالسيوم والمنغنيز على أكسدة الفنيل آلانين – L المقيسة بواسطة تشكل الفنيل بيروفات .
مدة الحضن : ٣٠ دقيقة عند الدرجة ٣٠°م مع Tris – (٢٠ ميللي مول) HCl ، L- فنيل آلانين (٥٠ ميللي مول) ؛ بروتينات كلية : ٦٠ ميكروغرام/مل .

ان ازدياد الفعالية الملاحظة بحضور شوارد ثنائية التكافؤ لاتشاهد عندما يستعمل النظام PMS- DCIP كمستقبل للالكترونات . فشوارد المنغنيز (Mn^{++}) تثبط بشدة ازالة لون (ارجاع) ال DCIP عند تركيز مساو أو أكبر من ٥ × $١٠^{-٥}$ مول . مع ذلك فان هذه الشوارد تعيد بسرعة كبيرة تلوين المزيج PMS-DCIP المرجع اصطناعيا بواسطة ال NADH . وتأثيرها هذا يمكن على مايبدو تفسيره بواسطة اعادة الأكسدة الوساطية لل DCIP التي تكون مستقلة عن التفاعل الأوكسيداري.

يلخص الجدول III تأثير المواد على أكسدة الفنيل آلانين بحضور الأكسجين أو على ارجاع ال PMS-DCIP كمستقبل للالكترونات . يشير التثبيط الملاحظ من قبل شوارد ال CN^- أو ال N_3^- في الحالة الأولى الى تدخل في التفاعل Cytochrome - oxydase لاسيما ال Cytochrome a_2 المصادف عند بكتيريا E. col (٢٧). تحفز هذه العوامل ارجاع ال PMS-DCIP وذلك بالتأكيد بابعاد المنافسة الممارسة من قبل النواقل الطبيعية . بالاضافة الى ذلك فان تأثير ال Antimycine وال HOQNO على أكسدة الفنيل آلانين – L بحضور الأكسجين يشير الى تدخل

جدول III : تأثير المشبطات على أكسدة الفنيل آلانين ـ L بواسطة أغلفة P.mirabilis (*)

المشبطات	تشكل الفنيل بيروفات (*) ٪ من الفعالية بالنسبة للشاهد	ارجاع الـ DCIP ٪ من الفعالية بالنسبة للشاهد
دون اضافة	100	100
KCN 6.10^{-5} M	49	117
= 6.10^{-4} M	5	112
10^{-3} M	2	128
10^{-2} M	< 1	145
HOQNO 5.10^{-6}M	83	100
= 10^{-4} M	48	98
PCMB 2.10^{-4}M	80	-
Iodoacétate 10^{-4}M	100	-
NEM 10^{-2} M	100	-
Antimycine 6.10^{-5}M	45	83
NaN_3 10^{-3}M	5	118
Roténone	100	100

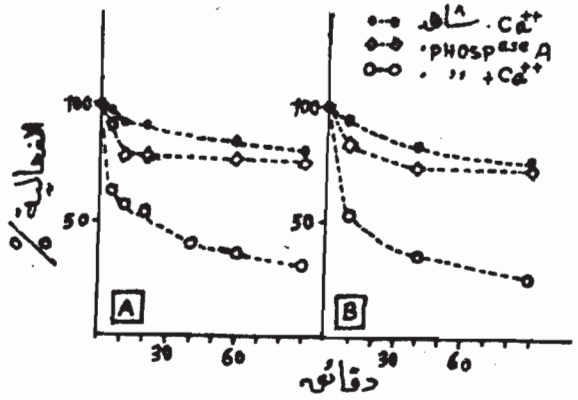
* تركيز البروتينات الكلية : ٦٥ ميكروغرام / مل

السلسلة التنفسية في هذا التفاعل . يكبح هذان المشبطان انتقال الالكترونات داخل السلسلة الميتوكوندرية في نقطة تتوضع بين السيتوكرومات b و C_1 (لاحظ المرجع ٢٨) . ان العامل HOQNO يتدخل على مايبدو بين سيتوكرومات b_1 و a_2 الـ Entéro bacteries وربما في مستوى مكون كينوني (٢٧). كذلك فان الـ Antimycine يتدخل على مايبدو في موضع مشابه أو في نفس الموضع (٢٨) . وتأثير هذين العاملين يبقى هنا جزئيا ولا يشاهد الا عند تراكيز مرتفعة نسبيا . ليس للروتينون (Roténone)، عامل مثبط للجزء الفلافوبروتيني للسلسلة التنفسية الميتوكوندرية (٢٩)، أي تأثير هنا . أخيرا يلاحظ بأنه ليس لكواشف الوظيفة التيولية (Fonction thiol) مثل الـ Iodoacetate، الـ NEM والـ BCMB سوى تأثير ضئيل أومعدوم ، مما يشير الى أن المجموعات التيولية (- SH) الضرورية للآلية ، فيما اذا كانت موجودة ، تكون غير قابلة المنال .

يوقف اضافة الايتير الايتيلي الى المزيج التفاعلي أكسدة الفنيل آلانين

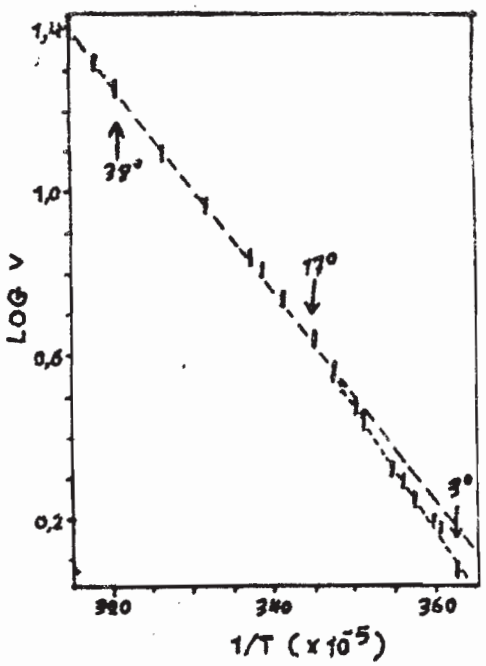
في الهواء فورا مع ترك بقاء معدل ضعيف من الانتقال فوق الـ DCIP (٥-٢٠٪). تكون ازالة فعالية (Inactivation) معلق الأغلفة الغشائية بواسطة الايتير عكوسية بشكل كبير، واستبعاد البقايا المتبقية من الايتير تسبب تفاعلا أكبر من ٩٠ ٪ خلافا للنظام الموصوف من قبل Boll (٣٠).

يبين الشكل ـ٥ ـ ازالة الفعالية التي تعانيها الجزيئات الغشائية بوجود فوسفوليباز (Phospholipase A)A سم الجلجلية . وهذا التأثير لايبدو مهما الا بوجود شوارد الكالسيوم (Ca^{++}) ، التي تكون ضرورية لعمل الأنزيم (٣١) . مع ذلك ، فانه بطيء وجزئي رغم التركيز الكبير المستعمل (٢٥ ميكروغرام لأجل ٦٥ ميكروغرام بروتينات كلية مرتبطة الى ٢ر١ ميكروغرام فوسفور) . يبدو أن النظام الأوكسيدازي يكون مرتبطا ، على الأقل جزئيا بالفوسفوليبيدات الكاملة للغشاء . ومن المحتمل في هذه الحالة أن تكون بعض الفوسفوليبيدات محمية تجاه تأثير الأنزيم . ان ملاحظات مشابهة قد شوهدت من قبل Boll في حالة جزيئات غشائية لبكتريا - Rhodospirillum rubrum ٢٢هذا ويوجز الشكل التالي (ـ٦ـ) ملاحظة أخرى منسجمة مع دور الفوسفوليبيدات في أكسدة الفنيل آلانين : فمن الممكن مشاهدة أن منحني أرينوس (Graphique d'arrhenius) الحاصل بقياس ارجاع الـ DCIP بدلالة درجة الحرارة يكون ثنائي الطور (Biphasique) بشكل خفيف ، مع انتقال (تغير من حال الى حال: (Transition) الذي يطابق ١٧°م تقريبا . وهذه الظاهرة تذكر بالملاحظات المشاهدة فوق أنظمة Permeasiques بكتريا E.Coli من قبل Overath ومساعديه (٣٣) ، Wilson و Fox (٣٤) . ولقد بين هؤلاء المؤلفون أن الانتقال Transition المشاهد في الحالة الأخيرة يتعلق بالتركيب بالحموض الدسمة غير المشبعة للفوسفوليبيدات الغشائية والى أنه يطابق تبديلا بنيويا للطور الليبيدي على الأغلب .



شكل ـ ٥ ـ تأثير فوسفوليباز A سم الجلجلية على أكسدة الفنيل آلانين.

A ـ ارجاع الـ DCIP ؛ B : تشكل الفنيل بيروفات. يحضن المزيج خلال أزمان متغيرة في الدرجة ٣٠°م بغياب السوبسترا وبحضور $CaCl_2$ 2,5 ميللي مول (دوائر سوداء) مع الفوسفوليباز A دون $CaCl_2$ (مربعات بيضاء)، مع الفوسفوليباز A و $CaCl_2$ (دوائر بيضاء . شروط أخرى (انظر فقرة الطرق). النسبة المئوية للفعالية بالنسبة للشاهد دون فوسفوليباز ، دون $CaCl_2$ ودون حضن في الدرجة ٣٠°م قبل اضافة السوبسترا. يبدأ التفاعل باضافة فنيل آلانين ـ L

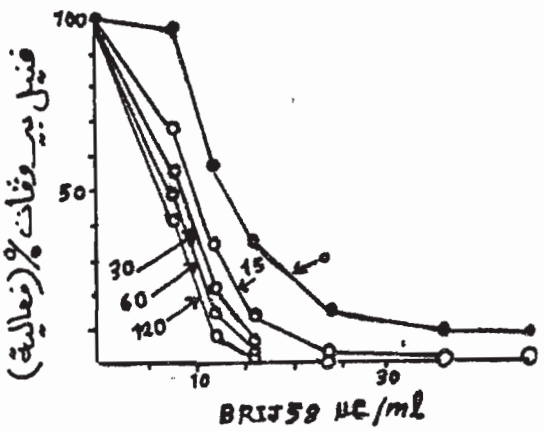


شكل -٦- منحني أرينوس (Graphique d'arrhenius) لتأثير الحرارة على أكسدة الفنيل آلانين -L .

يقاس التفاعل عن طريق ارجاع الـ DCIP . يمثل ارتفاع المستطيلات السوداء الخطأ النسبي للقياسات والمقدر بـ ± ٥ ٪ .

تركيز البروتينات الكلية : حوالي ٥٠ ميكروغرام/مل . تبلغ سرعة التفاعل عند الدرجة ٣٨°م ١٧ر٥ ميللي ميكرومول DCIP مرجعة بالدقيقة الواحدة .

لنشر أخيرا الى أن فنيل آلانين أوكسيداز الأغلفة المعزولة من P.mirabilis تتميز بحساسية كبيرة للمنظفات (Détergents) الأيونية مثل (Désoxycholate,Dodécyl-sulfate) أو غير الأيونية مثل (Triton X- 100 ، Brij 35,Brij 58,Lubrol) والتثبيط الممارس بواسطة المنظفات ليس فوريا ويتطلب فترة تأثير قبل اضافة السوبسترا. يبين الشكل -٧- التأثير المتزايد للـ (Polyoxy éthylène céthyléther)Brij58 خلال فترة ٣٠ دقيقة عند الدرجة ٣٠°م قبل اضافة السوبسترا . تكون الكمية المطلوبة من المنظف لتثبيط نصف أكسدة الفنيل آلانين في نهاية فترة الحضن هذه متناسبة اجمالا مع تركيز المعلق الغشائي وتنخفض ، في حالة الـ Brij 58 الى حوالي ار٠ ميكروغرام لكل ١ ميكروغرام بروتينات كلية . يخص التثبيط أيضا وبطريقة موازية ارجاع الـ PMS-DCIP أو ارجاع السيتوكروم C على الرغم من استمرار ، في حالة الملون ، بعض الفعالية المتبقية (٥- ١٠ ٪) الملاحظة بوجود كميات كبيرة من المنظف . هذا وان تأثيرات مشابهة فوق الـ NADH oxydase - لاتشاهد الا مع كميات أكبر على الأقل بعشرين مرة .



شكل -٧- تأثير الـ Brij 58 على الفنيل آلانين أوكسيداز - L . يحضن النظام بدون سوبسترا بوجود كميات متغيرة من الـ Brij 58 خلال أزمان متغيرة (٠، ١٥، ٣٠، ٦٠، ١٢٠ دقيقة) في الدرجة ٣٠°م . يبدأ التفاعل باضافة السوبسترا .

تركيز البروتينات : ٦٥ ميكروغرام / مل .

يعبر عن النتائج بالنسبة المئوية من الفعالية بالنسبة للشاهد دون منظف ودون حضن قبل اضافة السوبسترا .

يرمم غسل الجزيئات الغشائية بواسطة تشفيل سريع واحد أو عدة تشفيلات سريعة فعالية الفنيل آلانين أوكسيداز جزئيا أو كليا . لكن هذه العكوسية للتثبيط لاتلاحظ الا اذا عرضت للمنظف خلال فترة قصيرة في الدرجة صفر مئوية بينما بالمقابل تختفي بسرعة معتبرة (في أقل من عشر دقائق بالنسبة للـ Brij 58) بعد فترة حضن في الدرجة ٣٠°م حيث خلالها يبدو أن المنظف ينجز تغييرات نهائية . هذا ولم يعثر على أية فعالية أوكسيدازية في السائل الطافي الناتج عن التشفيل السريع . ان ازالة الفعالية هذه بشكل تدريجي يمكن على مايبدو أن تفسر بقبول أن جزيئات المنظف لاتخترق الا ببطء البنية الغشائية وبالتالي يصبح استبعادها صعبا أكثر فأكثر . وبالاضافة الى هذا يمكن التفكير بأن المنظف يخرب تدريجيا بنية ضرورية لعمل الاوكسيداز . ولقد أثبت في الواقع بأن الكميات المثبطة من الـ Brij 58 تحرر في الوقت نفسه جزءا فوسفوليبيديا غير قابل للترسيب الذي يطابق ٣٠ الى ٥٠ ٪ من الفوسفوليبيدات الكلية . ان اضافة جديدة لفوسفوليبيدات الـ Proteus بزيادة ليس لها تأثير يستحق الذكر . وهذه الملاحظات الأخيرة تبدو في مصلحة الفرضية الثانية .

يبين الجدول IV أن سفير وبلاست الـ P.mirabilis والأغلفة المتأتية عنها تؤكسد بحضور الهواء نفس الحموض الآمينية . وهذه الأكسدة تتناول أساسيا السوبسترات ذات السلسلة الجانبية غير القطبية أو الكاتيونية وسرعات الأكسدة النسبية لمختلف هذه المواد تحافظ تقريبا على نفس الدرجة من القيمة في الحالتين بالمقارنة مع سرعة أكسدة الفنيل آلانين . غير أن الحموض الآمينية القلوية تظهر استثناء وتتأكسد على مايبدو بشدة أكبر مع السفير وبلاست منها مع الأغلفة المعزولة . والايزوميرات من السلسلة D للفنيل آلانين ،للـ Leucine للهيستيدين وللتربتوفان لا تتأكسد لا بواسطة السفير وبلاست ولا بالأغلفة المتأتية عنها .

يسمح فحص هذه الأكسدات بواسطة ارجاع الـ PMS - DCIP بايجاد توزع مماثل بشكل ملموس للفعاليات (جدول V) التي لها نفس القيمة تقريبا عند P.Vulgaris و P.morganii . والفعالية الأقوى تخص الحموض الآمينية ذات السلسلة الجانبية الأطول مثل الفنيل آلانين ، اللوسين (Leucine) ،النورلوسين (Norleucine) والميتونين (Méthionine) . هذا ولم يلاحظ أي اختلاف ملموس بين هذين الحمضين الأخيرين حيث المعاملات الحركية هي نفسها بالفعل ، كذلك فان للنورفالين (Norvaline) والـ S - méthylcystéine سلوك متقارب جدا .

يشاهد بأن السلسلة الجانبية الأقصر الموافقة لتفاعل ايجابي هي سلسلة الحمض - L - 2 Aminobuty rique : ان ابدال ذرة هيدروجين في β بجذر هيتيل ، الذي يقود الى الفالين ، يلغي تقريبا بشكل كامل كل

جدول IV : استعمال الأكسجين من قبل سفير وبلاست و الأغلفة الغشائيـــــة لـ P.mirabilis لأكسدة مختلف الحموض الآمينية .

الحمض الأمينـــــي	السفير وبلاست	الأغلفة الغشائية
L- Alanine	1	-
L- Arginine	68	27
L- Asparagine	8 - 12	0
L-Aspartate	0	0
L-Glutamate	0	-
L-Glutamine	8 - 12	-
Glycocolle	0	-
L-Histidine	174	80
L-Isoleucine	12	11
L-Leucine	69	76
L-Lysine	61	33
L-méthionine	74	87
L-Norleucine	82	85
L-Norvaline	62	-
L-Ornithine	73	-
L-Phénylalanine	100(*)	100(*)
L-Proline	0	0
L-Sérine	0	0
L-Thréonine	0	0
L-Tryptophane	31	35
L-Valine	2	2

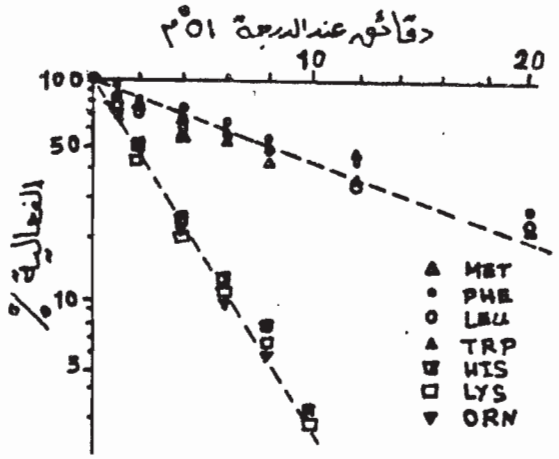
* يعبر عن النتائج بالنسبة المئوية للفعالية بالنسبة لأكسدة الفنيل الآنين

الأكسدة . ونفس العملية مع النورفاليـــن الذي يعتبر سوبسترا جيدة ، تقـــــود الى الايزولوسين وتطابق أيضا الى تناقص في الفعالية . ونشير أيضا الى أن المماثلات الثلاثة وحيدة الفلور فوق النواة العطرية للفنيل آلانين تكون عبارة عن سوبسترات جيدة ، مثلما الحال بالنسبـــــة لـ Thiénylalanine . تعطي أكسدة الفنيل آلانين المفلـــور (Fluoro - Phénylalanines) تفاعلا ايجابيا باضافة كلور الحديد . بالمقابل ، فان مماثلين آخرين مثل الفنيل سيريـــن والفنيل غليكوكول لايتأكسدان . مـــن الواضح أن بعض الحموض الآمينية القطبية

جدول V : أكسدة مختلف الحموض الآمينية بواسطة الـDichlorophénol indophénol(DCIP) بوجود الأغلفة الغشائيـــــــة .

السوبسترا	التركيز (Molarité)	P.mirabilis	P.Vulgaris	P.morganii
L-Alanine	5.10^{-2}	0	0	0
L-2-Amino butrique	=	8	-	-
L-Arginine	=	32	30	3
L-Aspartate	=	0	0	0
L-Asparagine	=	0	0	0
L-S-Méthyl cystéine	=	85	-	-
L-Ethionine	=	135	-	-
L-Glutamate	=	0	0	0
L-Glutamine	=	0	0	0
Glycocolle	=	0	0	0
L-Histidine	=	82	75	12
D-Histidine	=	0	0	0
L-Isoleucine	=	32	11	32
L-Leucine	=	123	99	-
D-Leucine	=	0	-	-
L-Lysine	=	37	40	2
L-Méthionine	=	88	102	84
L-Méthionine sulfoxyde	=	0	-	-
L-Norleucine	=	90	123	105
L-Norvaline	=	68	-	-
L-Ornithine	=	38	-	-
L-Phénylalanine	=	100(*)	100(*)	100(*)
D-Phénylalanine	=	0	0	0
L-2-Fluoro - Phénylalanine	$1,25x10^{-2}$	85	103	80
L-3-Fluoro - Phénylalanine	=	128	131	103
L-4-Fluoro- Phénylalanine	=	97	113	90
DL-Phényl glycocolle	10^{-2}	0	-	-
DL-Phényl-sérine	=	0	-	-
DL-Thiénylalanine	$2,5x10^{-2}$	49	-	-
L-Tryptophane	$2,5 \times 10^{-2}$	43	49	41
DL-5-Méthyl - tryptophane	$2x10^{-3}$	0	-	-
DL-6-Méthyl tryptophane	$2x10^{-3}$	14	-	-
L-Tyrosine	$2,5x10^{-3}$	8	-	-
L-Valine	5.10^{-2}	1-2	1-2	2-3

المتأكسدة بواسطة البكتريا الكاملة في طريق النمو (١)، تطابق واحدا أو عدة أنظمة أنزيمية غير ثابتة التي اختفت من السفير وبلاست في هذه التجارب. بالمقابل فان كل الفعاليات المدونة في الجدول V تكون ثابتة جدا، على الرغم من أن التفاعل الخاص بالهيستيدين باللليزين، بالاورنيتين وبالأرجينين يضعف بسرعة أكبر بقليل مع مرور الزمن. تكون ازالة الفعالية بالحرارة (Inactivation thermique) للأغلفة الغشائية المدروسة عند الدرجة ٥١° (شكل -٨-) أسرع بالنسبة للهيستيدين، لليزين وللأورنيتين منها بالنسبة لمختلف الحموض الآمينية غير القطبية (اللوسين، الميتيونين، النورلوسين، الفنيل آلانين والتريبتوفان). فالأغلفة المعزولة تحتفظ اذا على الأقل بنظامين أنزيميين متميزين قادرين على أكسدة الحموض الآمينية، أحدهما يكون نوعياً ازاء السوبسترات ذات السلسلة الجانبية الكايتونية، بينما يكون الآخر نوعيا السوبسترات ذات السلسلة اللاقطبية. تكون المعاملات الحركية K_m و V_{max} المطابقة لمختلف هذه السوبسترات مبينة في الجدول VI. وفي هذا الجدول يشاهد بأن الـ K_m يكون غالبا قريبا من $10^{-2}M$. لكن الهيستيدين يتميز عن السوبسترات الأخرى بـ K_m أصغر بوضوح ($2,5x10^{-3}M$). تكون قيم K_m على العموم أصغر بالنسبة للسلاسل الجانبية غير القطبية عندما يكون لها خاصية عطرية. يوضح الجدول VII الخاصية الاضافية بشكل جزئي لأكسدة الفنيل آلانين والهيستيدين أو الهيستيدين والايزولوسين. لاتصادف هذه الظاهرة بين الفنيل آلانين واللوسين أو الايزولوسين. تكون هذه القياسات على اتفاق مع وجود نظاميين أوكسيدازيين.



شكل - ٨ - ازالة الفعالية بالحرارة (Inactivation thermique) للفعالية الأوكسيدازية لأغلفة الـ P.mirabilis بالنسبة لسبعة حموض آمينية L- :

تتم المعايرة بواسطة ارجاع الـ DCIP عند الدرجة ٣٠°م. تحضن الأغلفة الغشائية خلال أزمان متغيرة عند الدرجة ٥١°م بدون السوبسترا وبدون الملونات المستقبلة للالكترونات المتميزة

المناقشة : (Discussion)

تخص صفات الحموض الآمينية الأوكسيدازية (Amino acides oxydases) الموصوفة في هذه النشرة العلمية أنظمة مرتبطة بداهة بالبنية الغشائية والتي لم تخضع لا لانحلال ولا لتنقية (purification) اضافية. وعلى الرغم من الشروط القاسية نسبيا المستعملة من أجل تحرير الأغلفة الخلوية فانه يمكننا الاعتقاد بجزم، بناء على الملاحظات المذكورة أعلاه، بأن هذه

الاوكسيداز قد احتفظت بنفس الخواص العامة في الجزيئات كما في الخلية الكاملة . ان فائدة الطريقة المستخدمة والقائمة أساسيا على تأثير درجة حموضة مرتفعة هي على مايبدو حماية وبدرجة كبيرة هذه الأنزيمات والعمل أيضا على ثباتها لأن فعاليتها تميل لأن تختفي بسرعة معتبرة عندما تستعمل الطرق العادية من أجل تجزئة البكتيريا أو السفير وبلاست . تحتفظ المحضرات الحاصلة بخواصها زمنا طويلا مما يسهل الدراسة .مع ذلك يبدو أنه من غير الممكن تعميم تطبيق هذه المعالجة لاستخلاص جميع الأوكسيدازات البكترية حيث إن بعضها ينحل أو يتخرب . وهذه هي حالة Succinate-oxydase السفير وبلاست التي اختفت داخل المحضرات .

ان ازدياد ثبات الحموض الآمينية الأوكسيدازية بعد المعالجة القلوية يجعلنا نفكر بتدخل أنزيمات محللة (Enzymes lytiques) حيث التأثير يكون مؤذيا تجاه النظام المدروس . من بين هذه الأنزيمات يمكن للفوسفوليبازات (Phospholipases) أن تقوم بهذا الدور . ففوسفوليباز A سم الثعبان تخرب النظام مع أن تأثيرها ليس كاملا مما يفسر بالتأكيد من خلال صعوبة الموصلية (٣٢). ان الانتقال الحراري (Transition thermique) الملاحظ على منحني أرينوس يكرر نموذجيا الظاهرة المثبتة أثناء دراسة الانتقال الفعال عند E.Coli (٣٤،٣٣)ويفسر كتبديل بنيوي للطور الليبيدي للغشاء. يترافق التثبيط بواسطة المنظفات ، الذي يصبح بالتدريج غير عكوسي والذي يظهر عند كميات صغيرة ، بضياع تدريجي لبعض فوسفوليبيدات الأغلفة الغشائية (J.Pemont ,G.Arlaud) نتيجة غير منشورة) . حسب فرضية استبعاد الفوسفوليباز البكترية بواسطة المعالجة المطبقة على السفير وبلاست ، فانه من الواضح أن الـ Chel - DE ، حيث وجوده يسرع التفكك الخلوي ، لايمكنه أن يملك الا تأثيرا مؤاتيا وذلك بتحييد الكاتيونات الضرورية عادة لتأثير هذه الأنزيمات . هذا الدور للفوسفوليبيدات في الحموض الآمينية الأوكسيدازية لبكتريا Proteus لن يكون مع ذلك محددا بشكل قاطع الا بواسطة تجارب اعادة التكوين على أنظمة منقاة وليبيداتها مستبعدة مسبقا. اذا اتضح أن الفوسفوليبيدات تبدو فعلا كشركاء ضرورية لفعالية هذه الأوكسيداز فاننا نملك مادة ممتازة من أجل دراسة العلاقات ليبيدات ـ بروتينات حيث الفعالية تكون قابلة للقياس بسهولة بواسطة اختبار ملون سهل وحساس في الوقت نفسه .

يسمح استخدام الـ Dichlorophénolindophénol(DCIP) كمستقبل للالكترونات بمقارنة الفعاليات الأوكسيدازية بسهولة والتي تخص مختلف الحموض الآمينية . يبدو أن الـ P.mirabilis تحتوي على الأقل على ثلاثة حموض آمينية أوكسيدازية ؛ أحدها لايشاهد بوضوح الا في البكتريا الكاملة في طريق النمو ويؤثر على حموض آمينية ذات سلسلة جانبية قطبية بينما يوجد الآخريان في الأغلفة المعزولة ، وأحدهما يكون نوعياً ازاء الحموض الآمينية القلوية ، والآخر تجاه الحموض الآمينية ذات السلسلة اللاقطبية .

من المحتمل جدا أن تقسيمات ثانية

أخرى ستكشف فيما بعد في وسط هذه المجموعات . تمثل الـ Amino acide-DCIP oxydo-réductases المعايرة بواسطة الاختبار الملون على مايبدو المرحلة الأولى من سلسلة نقل الالكترونات التي تتبع ، في جزئها الأخير ، الجذع المشترك للسيتوكرومات التنفسية . انها تتعرف على السوبسترا وتحفز نزع الزمرة الآمينية التأكسدية (Désamination oxydative). وبالتأكيد فان الأمر يتعلق بالمرحلة المحددة لكامل العملية التي تقود الالكترونات الى الأكسجين . بالمقارنة مع الأنظمة البكترية الموصوفة (٣٥)، فانه من الطبيعي أن نفكر في أن هذه الـ Oxydoréductases هي فلافو ـ بروتينات (Flavo-protéines) حيث قد أشير الى وجودها بالدراسة الطيفية ، واثبات هذه الفرضية يتطلب تنقية هذه المكونات الفلافوبروتينية (تجارب قيد الدراسة) . ان تأثيرات الـ Brij 58 على ارجاع الـ DCIP وطيف الفلافوبروتينات تجعلنا نفترض أن هذه الفلافوبروتينات تكون الهدف الأساسي للمنظف . من جهة أخرى فان الفوسفوليباز A تؤثر على ارجاع الـ DCIP في نطاق أن الـ Brij 58 يمكنه أن يزيل فعالية الأكسدات وذلك بحل بعض فوسفوليبيدات الغشاء وهكذا يمكننا أن نستنتج أن هذه الفلافوبروتينات تكون عاديا مرتبطة الى فوسفوليبيدات التي تكون على مايبدو ضرورية لتأثيرها . وهذه الفرضية حاليا قيد الدراسة .

جدول VI المعاملات الحركية (K_m و Vmax) لأكسدة الحموض الامينية- Dichlorophenol indophenol بواسطة الـ

السوبسترا	$K_m (X10^{-2}M)$	Vmax ميكرومول/ملغ بروتين/دقيقة $\times 10^{-3}$
L-Phénylalanine	1,1	505
L-2-Fluorophényl-alanine	2	1110
L-3-Fluorophén lalanine	0,56	930
L-4-Fluorophényl-alanine	0,83	810
L-Thiénylalanine	0,9	348
L-Tryptophane	0,5	206
L-Tyrosine	2,5	-
L-Norvaline	2,6	425
L-Norleucine	3,7	648
L-Leucine	0,9	564
L-Méthionine	3	580
L-S-Ethyl-cysteiine	1,25	440
L-S-Méthyl-cystéine	5	600
L-Ethionine	>12	-
L-Isoleucine	5	267
L-Histidine	0,25	380
L-Lysine	4	280
L-Ornithine	1,15	192

VII أكسدة مزيج من حمضين آمينين بواسطة الـ DCIP

السوبسترا	التركيز $(X 10^{-2}M)$	سرعة التفاعل (ميكرومول / مرجعة / دقيقة / ملغ)	Vmax المحسوبة
L-Phény-alanine	5	0,340	0,414
L-Histidine	4	0,259	0,275
L-Leucine	4	0,335.	0,410
L-Isoleucine	4	0,077	0,173
L-Lysine	4	0,110	0,220
L-Lysine	5		
L-Phényl-alanine + L-Histidine	4	0,476	
L- Phenyl alanine	5	0,332	
+ L-Isoleucine	4		
L-Histidine	4	0,325	
+ L-Isoleucine	4		

RESUME

Les bactéries du genre proteus effectuent la désamination oxydative de presque tous les aminoacides en présence de l'oxygene de l'air. La lyse alcaline est employée pour preparer les enveloppes membranaines de P.mirabilis. L'activité oxydasique est meusurée soit en utilisant la réaction de la formation de phénylpyruvate à partir de la L-phénylalanine qui indique qu'un millimicromole de phénylpyruvate correspond a la consommation de 1/2 millimicromole de l'oxygene utilisé ,Soit en utilisant la réaction de la réduction de DCRP en présence de PMS. En plus de l'activité L-phe oxydase , les enveloppes de P.mirabilis contiennent également une NADH oxydase et plusieurs cytochromes . L'activité L-phe oxydase varie avec le pH dont le pH optimum se situe entre 7,3 - 7,8. Les cations stimulent cette activité, tandis que les inhibiteurs de la chain respiratoire l'inhibent. La phospholipase A inactive partiellement l'activite L-Phe oxydase en présence des ions de Mg^{++} , ce qui indique que la protéine enzymatique est liée aux phospholipides membranaires. Également le graphique d'Arrhenius,obtenu en mesurant la réduction de DCIP en fonction de la température, confirme de telle association entre les phospholipides et la protéine enzymatique , L'activite oxydasique est fortement sensible vis-à- vis des détergents ioniques et non ioniques dont l'inhibition nécessite une période d'incubation avec le détergent. La mesure de la constante de Michaelis (Km) a montré que P.mirabilis contient au moins trois aminoacides oxydases , L'une est spécifique vis - à - vis des aminoacides à chaine latérale polaire, la deuxième est spécifique pour les aminoacides alcalins et la troisième est spécifique vis - à - vis des aminoacides à chaine latérale non polaire. Il est très probable que les oxydoréductases sont des flavoprotéines et qu'elles participent au processus du transfert des électrons.

BIBLIOGRAPHIE

1- Stumpf,P.K.et Green D.E. (1944) J.Biol,chem.,153,387

2- Henriksen,S.D.(1950)J.Bacteriol., 60,225.

3- Shaw,C.et Clarke,P.H(1955)J.Gen Microbiol.,13,155.

4- Hamida,B.et le minor,L.(1956)Ann. Inst.Pasteur (Paris),90,671.

5- Nossal,P.M.,Keech,D.B.et Morton, D.J.(1956) Biochim.Biophys.Acta, 22,412

6- Feldman,W.et O'kane,D.J.(1960) J.Bacterial.80,218 .

7- Asnis ,R.E. Vely ,V.G .et Glick, M.C(1956)J.Bacteriol;72 , 314.

8- Kashket,E.R.et Brodie,A .F(1963) J.Biol. 238,2564.

9- Bragg,P.D.et Hou,C. (1967)Arch. Biochem .Biophys., 119, 194.

10-Birdsell,D.C.et Cota-Robles , E.H. (1970)Biochim.Biophys.Acta , 216 , 250.

11- Kaback ,H.R.et Barnes ,E.M. (1971)J.Biol.Chem.,246 ,5523.

12- Pelmont , J.et Rossat ,A.M . (1970)compt.Rend.Acad.Sci,Paris , 271 , 869.

13-Lowry ,O.H.,ROSEBROUGH ,N.J., FARR ,A.L.et RANDALL,R.J. (1951) J. Biol.Chem;193,273.

14-Zack ,B.et Cohen,J.(1961)Clin. Chim.Acta,6 ,665.

15- Bartlett.G.R. (1959) J.Biol . Chem;234,466 .

16- Folch , J. Lees , M.et S loane Stanley , G.H. (1957)J.Biol.Chem. 226 , 495 .

17- White ,D.C. (1985)J.Bacteriol , 96 ,1160 .

18- Asbell , M.A.et Eagon ,R.G(1983) J.Bacteriol. , 92,380.

19 - Leive ,L. (1968)J.Biol.Chem . 243. 2373 .

20 - Lusk ,J.E. Williams.R.J.P .et Kennedy ,E.P.(1968)J.Biol Chem 243 ,2618.

21- Person ,P. Zipper ,H.et Felton, J.H. (1985)Arch.Biochem.Biophys. 131.457 .

22-Hoffman ,N.E,et Gooding, K.M. (1986)Anal.Biochem.31,471 .

23- Longmuir, I.S. (1954)Biochem . J.57. 81.

24- Taniguchi ,S et Kamen ,M.D. (1965) Biochim. Biopys .Aeta , 96. 395.

25- Daniel, R.M (1970)Biochim. Biophys Acta ,216 , 328 .

26-Chen,S.S.Walgate , J.H.et Duerre, J.A. (1988)Archiv , Biochem . Biophys. 146,54 .

27-Cox ,G.B ,Newton ,N.A.Gibson,F . Snoswfll , A.M. et Hamilton ,J.A. (1978)Biochem.J. 117 , 551 .

28- Kaniuga,Z.,Bryla , J.et Slater , E.C. (1969)dans inhibitors ,Tools in Cell Research, (Bücher T. et Sies H. éd .) Springer-verlag ,P. 282.

29- Ernster , L. Dallner. G.et Azzone G.F. (1963)J.Biol.Chem 238 ,1124

30 -Boll , M.(1988)Arch. Microbiol. 76 ,174 .

31-Awasthi, Y.G.Ruzicka ,F.J.et Crane F.L. (1970)Biochim . Biophys.Acta 203 ,233 .

32- Boll,M.(1979)Z.Natur-forsch. 26b, 246 .

33- Overath , P.,Schairer,H.V. et Stoffel , W. (1970)Proc.Natl.Acad . Sci , (U.S.), 67 ,606 .

34- Wilson ,G.et Fox , C.F. (1985) J.Mol.Biol. 55, 49 .

35 - Smith , L.(1986)dans Biological oxydations (Singer T.P.éd) , Interscience ,P.55 .