

محاكيات الكولاجين نانوية التركيب

في هندسة الأنسجة

Nano-structured Collagen Mimics in Tissue Engineering

سيرجي إي . بارامونوف وجيفري د. هارتجرين

Sergey E. Paramonov and Jeffrey D. Hartgerin

١, ٤ المقدمة Introduction

يتكون الجسم البشري من حوالي ١٠^{١٤} خلية، وهذا العدد الضخم من الخلايا، يُنظم ويُحفظ في عدة مستويات من الحجم. أولاً: يجب المحافظة على النمط الظاهري للخلايا سليماً، وليس فقدان التخصص في الشكل أو الوظيفة dedifferentiate إلى أكثر أنواع الخلايا عامة، أو الخضوع لموت الخلايا المبرمج. التالي: يتم تنظيم مجموعات الخلايا في أنسجة الجسم، التي تشكل الأعضاء، وتجميع هذه الأعضاء معاً، لتكوين الفرد الكامل. ويتم الحفاظ على هذا التنظيم في جزء كبير من المصفوفة خارج الخلية extracellular matrix (ECM). إن المصفوفة خارج الخلية، جنباً إلى جنب، مع الخلايا المحيطة، هما المكونان الضروريان لأي نسيج متعدد الخلايا multicellular tissue. والمصفوفة خارج الخلية بيئة بيولوجية معقدة جداً، تقدم الخلايا ليس فقط مع السطح

الذي يتعلق إلى التحرك، ولكن أيضاً بالمعلومات الكيميائية والبيولوجية المخزنة على شكل جزيئات حيوية نشطة، والإنزيمات، وعوامل النمو. وتعتمد وظيفة الأنسجة السليمة بقوة على بنية المصفوفة خارج الخلية وتكوينها. والعديد من الأمراض الشديدة، مثل (تكوّن العظام الناقص *osteogenesis imperfecta*)، قد تنشأ عندما تفسد أو تعطب المصفوفة خارج الخلية. وأيضاً المصفوفة خارج الخلية مادة متنوعة، ولكن مكوناتها الأساسية، هي سقالة scaffold الكولاجين، التي توفر الدعم للخلايا، ويتيح هلام متعدد السكريات، متمياً بدرجة كبيرة، الانتشار السريع للمغذيات، كما أنه يقاوم القوى الضاغطة.

لقد تقدمت التطورات الحديثة في الطب والجراحة الترميمية بشكل مثير، وأدت إلى نشوء منطقة جديدة كاملة من البحوث، هي هندسة الأنسجة tissue engineering. وتحاول هندسة الأنسجة استبدال أو إعادة الأنسجة التالفة، أو المريضة، أو الأنسجة البشرية المعمرة (شيخوخة)، بتلك النامية خارج الجسم. ويتطلب نمو النسيج خلايا، ويمكن للمتلقي أن تُجهز له في أغلب الأحيان أو خلاياه الخاصة به، وهكذا يتم القضاء على مشاكل إيجاد المتبرع المناسب، ورفض الجهاز المناعي لتلك الأعضاء المتبرع بها. وإحدى السمات الرئيسة لهندسة الأنسجة الناجحة، يتمثل في إعادة البناء الصحيح للمصفوفة خارج الخلية ECM من نسيج خاص. وهذه مهمة صعبة جداً، نظراً لأن المصفوفة خارج الخلية، تكون مادة حيوية استثنائية معقدة. ومن أجل معالجة هذه المشكلة، لا بد من كسر عدد أكثر من المهام البسيطة. ويتركز حالياً الكثير من البحوث في مجال هندسة الأنسجة على تصميم السقالة (حامل الأنسجة). إن اختيار السقالة أمر بالغ الأهمية، نظراً لأنها توفر سطحاً في أي خلايا، تستطيع أن تنمو، وتأخذ الشكل المتوافق لها. ويمكن أن تُقسم تشكيلة السقالات المستخدمة حالياً إلى فئتين، ذات الأصل الاصطناعي أو التشبيدي synthestic، وأخرى ذات الأصل

البيولوجي. وتتضمن السقالات الاصطناعية بوليمرات بسيطة، مثل: بولي حمض اللاكتيك (PLA) poly-lactic acid، وبولي حمض الجليكوليك (PGA) poly-glycolic acid، وبوليمر مشترك من PLA-PGA، وكذلك سيراميك لاعضوي، مثل: فوسفات الكالسيوم المائية (هيدروكسي أباتيت) (HA) hydroxyapatite. إن مبدأ التصميم الرئيس في هذه الحالة، هو التحلل الحيوي، وعدم سمية non-toxicity البوليمر ونواتج تحلله. وتتضمن المزايا التقليدية للبوليمرات الاصطناعية، مراقبة دقيقة على التركيب والوظيفة، وصفات ميكانيكية جيدة، وتكاليف إنتاج منخفضة نسبياً. والفئة الكبيرة من البوليمرات الاصطناعية المتوافقة حيوياً، تشمل بولي (حمض الأكرليك) poly(acrylic acid) ومشتقاته، وبولي (أكسيد الإثيلين) poly(ethylene oxide) وبوليمراتهما المشتركة، وبولي (حمض اللاكتيك) poly(lactic acid)، وبولي (كحول الفينيل) poly(vinyl alcohol)، وبولي الفوسفازين polyphosphazene، وبولي الببتيدات polypeptides [1].

على الرغم من أن هذه السقالات تُظهر خصائص مثيرة للغاية، إلا أنها تفتقر إلى الوظيفة الكيميائية، التي يمكن استخدامها للتضييق النهائي لهذه المواد، بناءً على احتياجات النسيج الخاصة. ونموذجياً فإنها تعمل فقط لتجهيز البنية العيانية، التي قد تنمو عليها الخلايا. وتحتوي نموذجياً السقالات البيولوجية على مادة الكولاجين، التي تم حصادها وتنقيتها كيميائياً. لقد تم دراسة الأنواع المختلفة المحدثة طبيعياً، والبوليمرات المشيدة كيميائياً، واختبارها كسقالات لهندسة الأنسجة. ومن بين البوليمرات المحدثة طبيعياً، السقالات المستندة على الكولاجين، والهيالورونات hyaluronate، والفايبرين fibrin، والغينات (مادة هلامية مستخرجة من أعشاب بحرية) alginate، ومواد أخرى عديدة. ويعد الكولاجين المحصود، سقالة لهندسة الأنسجة المستخدمة على نطاق واسع. وعلى الرغم من أنه محفز مناعي (مستضد)

immunogenic فعلاً، إلا أن الكولاجين يلبي الكثير من المتطلبات؛ لوضع مصفوفة اصطناعية، مثل التحلل الحيوي وتمييز الخلية. ولقد استعمل الكولاجين بنجاح لإعادة بناء الجلد [2]، وكسقالة نسيج للعديد من أنواع الخلايا المختلفة [3]. ونعتقد أن إعادة بناء المصفوفة خارج الخلية ECM، يجب أن يبدأ بمحاكي الكولاجين، الذي يمكن أن يُحضر بطريقة تشييدية. ويجب أن تكون ألياف الكولاجين الاصطناعية هذه، قادرة على أن تكون مُعدّلة لعرض إشارة خلية الببتيد، مثل (IKVAV، RGD)، أو كامل البروتينات، مثل عوامل النمو. ويمكن أن يتضمن الكولاجين المنتج اصطناعياً بروتينات مختلفة، مسؤولة عن تفاضل الخلية وانتشارها. ولو أمكن عمل هذا، فستكون خطوة مهمة نحو تكرار المصفوفة خارج الخلية ECM الكاملة، وتحضير الأنسجة المصممة للاستخدامات الطبية.

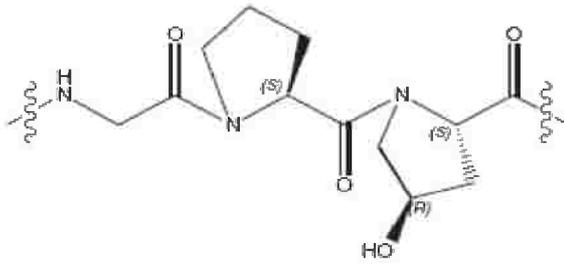
وسوف تناقش هذه المقالة تركيب الكولاجين الطبيعي وخواصه، ومن ثم التركيز على كيفية استخدام هذه المعرفة في المحاولات الرامية لإنتاج الكولاجين الاصطناعي. وبعد ذلك، سوف نناقش أساليب هندسة الأنسجة التي حاولت محاكاة خاصية أو أكثر من خواص المصفوفة خارج الخلية، وسوف نختم بمناقشة أسلوبنا الذي نتبعه في تحضير مُحاكٍ أو مقلد الكولاجين.

٤,٢ التدرج التركيبي للكولاجين

Collagen Structural Hierarchy

إن الكولاجين هو البروتين الأكثر وفرة في جسم الإنسان، ويشكل حوالي 25% من كتلة البروتين الكلية، كما أن للكولاجين تركيباً معقداً بالعديد من مستويات التدرج. وعند أدنى مستوى، يكون تسلسل الأحماض الأمينية، الذي حافظ على تكرر ثلاثة أحماض أمينية بدرجة كبيرة من Gly-X-Y، حيث تحتوي المواقع X و Y

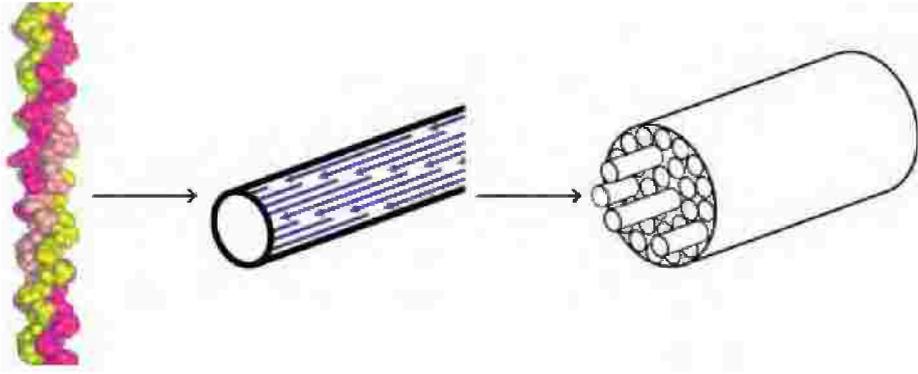
(في هذه الحالة Y تشير إلى حمض أميني عام ، وليس إلى التيروسين tyrosine) ، على نسبة مئوية عالية من الأحماض الأمينية البرولين proline ، والهيدروكسي برولين hydroxyproline ، على التوالي (الشكل رقم ٤.١). وقد تم إيجاد بروتينات بهذا التسلسل ، لتبني ، أو للاعتماد بشكل تفضيلي ، على شكل حلزوني (لولبي) البرولين النوع II ، الذي يسمح لثلاثة من تلك الببتيدات بالتجميع إلى المستوى التالي من التدرج ، اللولب (الحلزون) الثلاثي triple helix . ويتم حزم هذه اللولب في ليفيات (سلاسل بوليمرية) ، وغالبا ما تكون مترابطة عرضياً بشكل تساهمي ، من خلال بقايا اللايسين lysine المعدل. وأخيراً ، يتم حزم هذه الليفيات في ألياف عيانية (الشكل رقم ٤.٢).



الشكل رقم (٤,١). التركيب الكيميائي للكولاجين الثلاثي الأكثر شيوعاً: الجلايسين- البرولين- الهيدروكسي برولين glycine-proline-hydroxyproline.

عندما ينتج الكولاجين داخل الجسم *in vivo* ، يتم تشييده أولاً كبادرة ببتيدي (ببتيد غير فعال) propeptide ، تتكون من منطقة مركزية ثلاثية حلزونية طويلة ، تحيط بها مناطق طرفية من الكربون C ، والنتروجين N ، التي تساعد في الطي ، وتمنع تجميع عالي الرتبة. ويتم إفراز بادرة الكولاجين procollagen هذه إلى الفضاء خارج الخلية ، حيث ينشق أو ينفلق إنزيمياً ، ويترك فقط اللولب الثلاثي المركزي ، الذي يخضع بعد ذلك إلى تجميع إضافي في تراكيب أكبر تسمى الألياف [4]. وتتفاوت أبعاد الليفيات كثيراً

من ١٠ إلى ٣٠٠ نانومتر في القطر، وقد تكون عدة مئات من الميكرومترات في الطول. وتكتسب هذه الليفات قوة إضافية، عبر الترابط العرضي التساهمي من بقايا اللايسين المعدل. ولتركيب الليف نمط ترابط مُميز، كُشف في صور المجهر الإلكتروني، والذي ينتج من تراص اللوالب الثلاثية، التي تعادل إحداها الأخرى. وتتضمن المرحلة النهائية للتجميع، تراص الليفات في ألياف عيانية كبيرة بما فيه الكافية، حتى يتم مشاهدتها في مجهر ضوئي.



الشكل رقم (٤,٢). من اليسار إلى اليمين: لولب الكولاجين الثلاثي، ليف الكولاجين، وليف كولاجين.

٤,٣ تسلسل الأحماض الأمينية والتركيب الثانوي

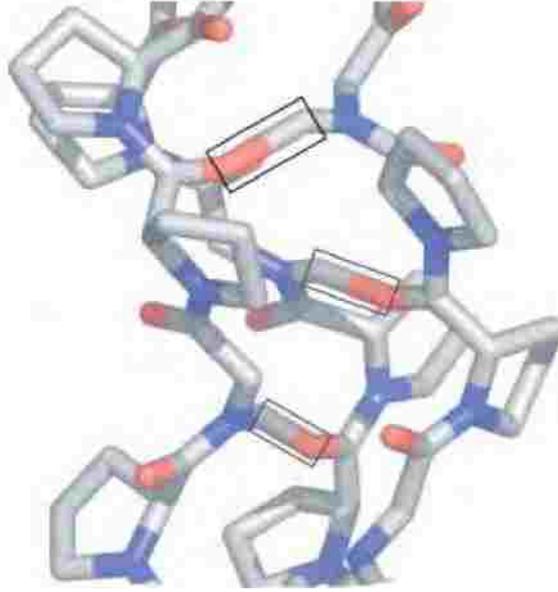
Amino Acid Sequence and Secondary Structure

للكولاجين تركيب ثانوي فريد، يشمل ثلاثاً من سلاسل شبيهة بولي (البرولين II). وتُشكّل هذه السلاسل الثلاث، اللولب الثلاثي الذي تلتف فيه سلاسل الببتيد الواحدة حول الأخرى، مشكلة لولب فوقي (فائق) superhelix يميني [5,6]. إن البارامترات الهندسية لشكل شبيه بولي (البرولين II) والتركيب اللولبي الثلاثي، تكون مختلفة قليلاً، حيث يتميز اللولب الثلاثي بارتفاع ٢,٩ أنجستروم لكل متبق وبقايا ٣,٣٣ لكل دورة بزوايا ثنائيي السطح $\phi = -75^\circ$ و $\phi = 145^\circ$ ، بينما يتم وصف شكل شبيه

بولي (البرولين II)، بالزوايا نفسها، ولكن اللولب أوسع بـ ٣.١ أنجستروم لكل متبقٍ، وبقايا ٣ لكل دورة [5, 7, 8]. ويتفاوت تركيب الكولاجين من نسيج إلى نسيج، وقد تم العثور على حوالي ١٥ نوعاً من جزيئات الكولاجين. وتتكون سلسلة الكولاجين الوحيدة من تسلسل لتكرار حمض أميني ثلاثي Gly-X-Y. ونموذجياً، يتم شغل المواقع X بواسطة برو Pro، ويتم شغل المواقع Y بواسطة ٤-هيدروكسي برولين 4-hydroxyproline؛ وتشكل هذه الأحماض الأمينية سوياً حوالي ٢٠-٢٥٪ من سلسلة الكولاجين الوحيدة.

إن وجود الـ Gly في كل موقع ثالث مطلوب للسماح بتراصص محكم من السلاسل الثلاث الوحيدة؛ لتشكيل اللولب الثلاثي. والبرولين والهيدروكسي برولين يمنعان تشكيل التراكيب الثانوية الأخرى، ويشكلان هيئة العمود الفقري الضروري للتشكيل الثلاثي. تُمسك سلاسل بولي الببتيد الثلاث الوحيدة سوياً، عن طريق الروابط الهيدروجينية الموجودة داخل اللولب الثلاثي. وتتشكل الروابط الهيدروجينية بين ذرة أوكسجين الكربونيل للحمض الأميني في الموقع X، وذرة هيدروجين الأميدو amido للجلايسين glycine من السلسلة المجاورة، بينما تكون ذرة أكسجين الكربونيل من الأحماض الأمينية والجلايسين في الموقع Y، موجهة نحو خارج اللولب (الشكل رقم ٤.٣). ويتطلب تشكيل التركيب فوق الملفوف supercoiled ثلاث سلاسل؛ لكي تحول بمتبقٍ واحد بالنسبة لبعضها بعضاً. ويسمح هذا بأن تكون إحدى السلاسل الثلاث لديها بقايا Gly، تواجه (تقابل) المناطق الداخلية من اللولب الثلاثي في جميع الأوقات. إن الجلايسين، أصغر الأحماض الأمينية، المطلوب في هذا الموقع؛ بسبب الرص المحكم جداً من اللولب مقابل إحداها الأخرى. وتكون البيئة التركيبية للـ Gly، والبقايا في المواقع X و Y مختلفة جداً، حيث تتجه السلاسل الجانبية للأحماض الأمينية

في المواقع X و Y بعيداً عن اللولب الثلاثي ، بينما يتم دفن الـ Gly بالكامل داخل التركيب فوق الملفوف.



الشكل رقم (٤,٣). منظر للولب الكولاجين الثلاثي مع تحديد الروابط الهيدروجينية بين السلاسل.

٤,٤ الملاحظة التجريبية من لولب الكولاجين الثلاثي

Experimental Observation of the Collagen Triple Helix

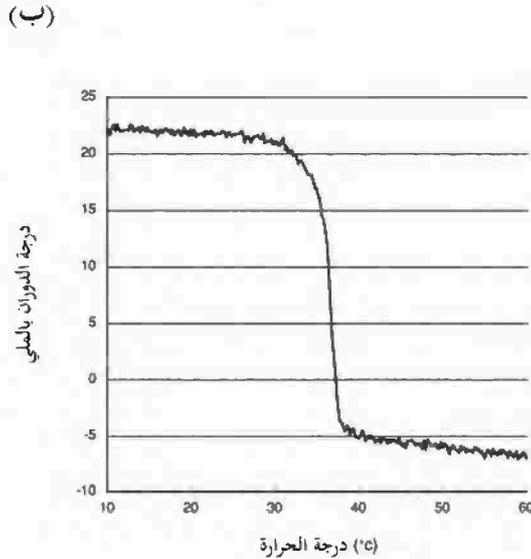
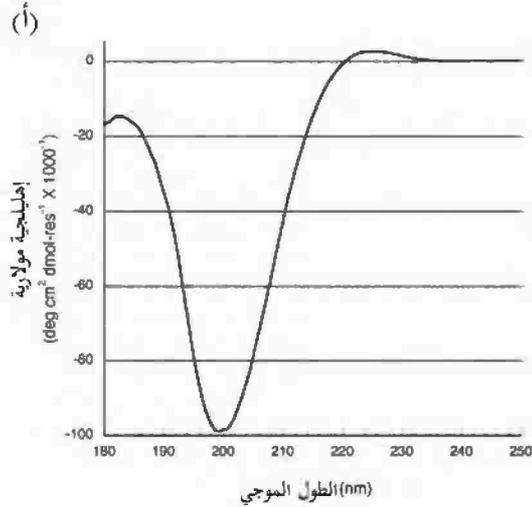
تُشكل دراسة الكولاجين وبتيدات نموذج الكولاجين مهمة معقدة نسبياً. وتعد الملاحظة المباشرة لتركيب الكولاجين اللولبي الثلاثي صعبة، وتقتصر على عدد قليل من الطرائق التجريبية. ومن بين التقنيات الأكثر استعمالاً، مطيافية ازدواج اللون الدائرية (CD) circular dichroism spectroscopy (CD)، والرنين النووي المغناطيسي (NMR). ويعد تحليل التركيب بالأشعة السينية، على الرغم من أنه قوي جداً لتحديد التركيب

مباشرة، إلا أنه محدود؛ نظراً لصعوبة إعداد بلورات عالية الجودة، وقد وصفت بضعة تراكيب فقط.

تعد مطيافية ازدواج اللون الدائرية CD أداة قوية للغاية، تم استخدامها لملاحظة التركيب الثانوي للبروتين لعدة عقود. ولقد تم نشر استعراض لهذه التقنية من قبل سريراما Sreerama وودي Woody في عام ٢٠٠٠ [9]. ويتميز بقمة سالبة كبيرة حول ٢٠٠ نانومتر، وقمة صغيرة موجبة بين ٢١٥ و ٢٢٧ نانومتر [الشكل رقم ٤.٤ (أ)] [10]. ولسوء الحظ، فإنه من الصعب التمييز بين الحلزون الثلاثي الحقيقي، الموجود في المحلول، والسلسلة الوحيدة شبيه بولي برولين II-، ويبدو هذا الأخير مشابهاً جداً لطيف الـ CD، مع حزمة طيف الـ CD موجبة صغيرة، عند حوالي ٢٢٨ نانومتر، وحزمة سالبة كبيرة عند حوالي ٢٠٥ نانومتر [11]. ومع ذلك، فإن كلا من طيف الكولاجين، وطيف شكل شبيه البولي برولين II-، يختلف بشكل كبير عن طيف الـ CD للبولي بيتيدات غير المرتب، الذي له تركيب ديناميكي يقبل مجموعة واسعة من التشكلات الكيميائية conformations. وللأطراف المميزة حزمة سالبة صغيرة بالقرب من ٢٢٥ نانومتر، وحزمة سالبة أكثر كثافة لحد ما بالقرب من ٢٠٠ نانومتر [11, 12].

يمكن معالجة غموض بيانات طيف الـ CD للكولاجين، وذلك من خلال استكشاف تبعيات درجة حرارة الدوران البصري والإهليلجية المولية CD. وأثناء تحول درجة الحرارة، ينهار التركيب الحلزوني الثلاثي، وتتحرك ثلاث سلاسل بيتيد متماسكة معاً بالروابط الهيدروجينية. ويمكن أن يُرى بسهولة هذا التحول من خلال رصد التغير التعاوني اللاخطي في حجم حزمة طيف الـ CD، ويكون إما موجبا وإما سالبا، مع زيادة درجة الحرارة (الشكل رقم ٤.٤ (ب)). وعلى عكس ذلك، تخضع سلاسل الببتيد الموجودة في شكل شبيه بولي برولين II- أو "ملف عشوائي" إلى عملية

تحول حراري خطي ، وتظهر منحنيات دورانها البصرية المعتمدة على درجة الحرارة كأنها خطوط مستقيمة.



الشكل رقم (٤, ٤). (أ) طيف ال CD للولب ثلاثي مثالي. (ب) اعتمادية درجة حرارة الكولاجين الطبيعي غير المطوي كما لاحظت بطيف ال CD في ٢٢٠ نانومتر.

كما يمكن ملاحظة وجود التركيب الحلزوني الثلاثي في المحلول أيضاً بمطيافية الرنين المغناطيسي النووي NMR. ويؤدي طي ثلاث سلاسل بيتيد إلى نظام غزل وحيد، بتأثيرات أوفرهوسير Overhauser النووية بين السلسلة (NOEs)، التي لا يمكن ملاحظتها في السلاسل غير المطوية [13]. وتشير الدراسات التي أجراها برودسكي Brodsky وآخرون [14] إلى أن نظام الغزل لنموذج البيتيد $(\text{Pro-Hyp-Gly})_{10}$ [بولي (برولايل-هيدروكسي برويل-جلايسيل) (poly(prolyl-hydroxyprolyl-glycyl))، يمكن تحديده من خلال مطيافية الارتباط مرشحة الكم المزدوجة (DQF-COSY)، وأطياف مطيافية الارتباط الكلي (TOCSY). ويمكن تمييز الجليسينات من برولايل Pro وهيدروكسي برويل Hyp بروتون الأמיד وبزوج رنين $C_{\alpha}H$. وعلى الرغم من أنه يحتوي على نمط الربط نفسه، مثل برولايل Pro، إلا أنه يتم تمييز هيدروكسي برويل Hyp بسهولة، بواسطة $C_{\beta}H$ التي تنزاح إلى أسفل المجال بمجموعة HO. ويمكن إثبات تشكّل الحلزون الثلاثي من خلال تحليل أطياف تأثير أوفرهوسير النووية NOE للبيتيدات. وتحدث تأثيرات أوفرهوسير النووية NOEs بين ذرتين في مسافات أقل من ٥ أنجستروم. ويمكن استخدام ثوابت اقتران غزل-غزل، المعتمدة على زاوية ثنائي السطح، جنباً إلى جنب مع المسافات المشتقة من تأثيرات أوفرهوسير النووية NOEs؛ لتحديد تركيب البيتيد. ولسوء الحظ، يكون من الصعب جداً، أن نتميز بين تأثيرات أوفرهوسير النووية بين السلسلة وداخل السلسلة في اللولب الثلاثي؛ نظراً لأن كليهما - على حد سواء - قد تقعان ضمن مسافة ٥ أنجستروم. والطريقة الوحيدة لحل هذه المشكلة، تتمثل في إجراء مقارنة بين تأثيرات أوفرهوسير النووية الملاحظة من العمود الفقري، مع تلك المحسوبة من نماذج البيتيد، المستندة على بيانات الأشعة السينية التركيبية [14]. ويتضمن الأسلوب الآخر إدراج جلايسيل Gly مرقوم $(^{15}N\text{-Gly}, ^{13}C\text{-Gly})$ ، في المدى المتوسط، ويتم رصد أطياف الارتباط غير متجانس

النواة ^1H - ^{15}N ، بالإضافة إلى استرخاء الـ ^{15}N ، وتأثيرات أوفرهوسير النووية غير متجانسة النواة [13, 15].

٤,٥ حركة الطي (اللف) Folding Kinetics

إن حركة طي الكولاجين، تجذب الكثير من الاهتمام؛ نظراً لأنها توفر أسلوباً لفهم العملية المعقدة لتشكيل الحلزون الثلاثي. ويحتوي الكولاجين على عدد كبير من الأحماض الإيمينية imino acids، التي تشارك في عملية الطي. فمن المعروف أن رابطة الإيميد imide bond للبرولايل Pro، يمكنها أن تتخذ الشكل سيس cis بسهولة أكثر من رابطة الأميد amide، وعدد كبير من البرولايل Pro، قد يكون موجوداً في شكل سيس في سلسلة بولي برولايل Pro غير المطوية [16]. وبالتالي تماكب isomerization روابط الببتيد سيس-ترانس cis-trans، والتي تتضمن البرولين والهيدروكسي برولين hydroxyproline، يمكن أن يحد من معدل امتداد (أو تكاثر) propagation الحلزون الثلاثي في الكولاجين. ويجب أن يتم تحويل جميع روابط الإيمينو خلال تشكيل الحلزون الثلاثي، إلى شكل ترانس، ويسمى هذا النوع من الطي باسم "امتداد أو تكاثر يشبه السوستة أو السحابة" zipper-like propagation [17]. وتم تمييز هذا النوع من طي الكولاجين الطبيعي للنوع I و III من الكولاجين [18]، ويبدأ طي الكولاجين بمشاركة ذاتية من ثلاثة ببتيدات كولاجين. والطرف C- لبوادر الببتيدات هذه يعد غنيا بتكرارات Gly Gly-Pro-Hyp، ويبتدئ تكرار هذه الوحدات بتشكيل الحلزون الثلاثي. وتنامي الشكل الحلزوني الثلاثي، محدود بتماكب سيس-ترانس، من الطرف C إلى N للبروتين، الذي يُنهي تشكيل تركيب كولاجين الحلزون الثلاثي. وتكشف الدراسات التي أُجريت على ببتيدات نموذج الكولاجين، أن الخطوة المحددة للمعدل، تعتمد على التركيز. وعند التركيز العالي، تكون الخطوة المحددة للمعدل، هي تماكب سيس-

ترانس ، المتبع بعد تفاعل التنوي ، حيث يتم فيه اتحاد ثلاث سلاسل ببتيد أحادي الوحدة ، للبدء في تشكيل الحلزون الثلاثي. وفي التركيز المنخفض ، يكون تفاعل التنوي ، هو الخطوة المحددة للمعدل بينما خطوة التنامي أو الامتداد ، تكون سريعة نسبياً. لقد درس زو Xu وآخرون [19] الخطوات المبكرة لطبي الببتيد شبيه الكولاجين بطرف C- (Gly-(Gly-Pro-Hyp)₄) ، وتسلسل متبقي -18 للطرف N- من سلسلة α1(I) لنوع الكولاجين I. وقد وجدوا أن الببتيد يتبنى شكلاً حلزونياً ثلاثياً قاسياً أو صلباً ، بدرجة حرارة انصهار قرب 26 م° [20]. ويقترح مخطط الحركية المشتق ، أن 40-50% من تجميع المونومر البادئ ، يستلزم أن يمتلك روابط ترانس المطلوبة ؛ لكي يبدأ في تشكيل الحلزون. ووجدوا أن تراكم قليل من الوسيطات ، مثل المركبات ثنائية الوحدة المطوية جزئياً محتمل ؛ نظراً لأن تفاعل الرتبة الثالثة كافٍ لوصف طبي المونومر المتماكب إلى الحلزون الثلاثي. وقد تم رصد طاقة تنشيط سالبة لتفاعل الطبي من الرتبة الثالثة هذه ، والذي يكون مماثلاً لطبي البروتينات الكروية ، أو للفائف ملفوفة حلزونية-α. وتشير طاقة التنشيط السالبة ، إلى أن حاجز الأنتروبي يؤدي دوراً أكبر من حاجز الأنثاليبي ، وتقتصر وجود اتزان سابق سريع بين اثنتين أو ثلاث من سلاسل الكولاجين ، قبل خطوة التنوي المحددة للمعدل. لقد قام بودكو Boudko وآخرون [21] بدراسة حركية تشكيل الكولاجين في مدى واسع من التراكيز ، من أجل توضيح آلية التنوي. وقد لاحظوا تحول الرتبة من الثالثة إلى الأولى بزيادة التركيز ، وقد نسبوا هذا إلى انتقال الخطوة المحددة للتفاعل من التنوي إلى التنامي. واقتنعوا بأن معدل الرتبة الثالثة المرصود الثابت لـ (Pro-Pro-Gly)₁₀ في التركيز المنخفض ، سيتضمن الاصطدام المتزامن لثلاث سلاسل ببتيد منفردة ، وهو حدث نادر جداً. وقد قادهم ذلك إلى افتراض أن تشكيل مركب ثنائي الوحدة غير مستقر جداً ، ويكون في اتزان سابق سريع مع سلسلة أحادية الوحدة ، موجوداً قبل تنوي الحلزون الثلاثي. كما يؤكد المؤلفون أن

المركبات ثنائية الوحدة غير مستقرة جداً، وتظهر مثل نوبتين قصيرتين مجذولتين من شكل مناسب، لإضافة السلسلة الثالثة. وبمطابقة اعتماد التركيز على المعدلات الابتدائية للسلاسل المنفردة، وجد أن معدل تنامي الحلزون الثلاثي، يكون $k = 0.0007$ ث⁻¹ في درجة حرارة ٧ م. ووجدوا أن معدل التنامي هذا، يكون في توافق جيد مع معدل تماكب سيس- ترانس، الذي تم الحصول عليه من قبل بوتشنجر Bächinger وآخرين. والبطء الشديد في عملية طي الكولاجين، مقارنة مع الجزيئات البيولوجية الأخرى، مثل لفائف ملفوفة حلزونية α - أو الحمض النووي DNA [22]، يمكن تفسيره من خلال مراعاة عدم الاستقرار الكبير للمركبات ثنائية الوحدة للكولاجين. ولم تكن هذه المركبات ثنائية الوحدة مكتشفة قط، في الوقت الذي كان فيه الحمض النووي DNA، أو لفائف ملفوفة حلزونية α - ذات ترايب مجذولة مزدوجة معروفة جيداً. وعدم استقرار المركبات ثنائية الوحدة للكولاجين، يمكن أن يفسر أيضاً ضرورة مجالات التنوي في الكولاجين.

٤,٦ تحقيق الاستقرار من خلال اختيار التسلسل

Stabilization through Sequence Selection

في الآونة الأخيرة تم تركيز الكثير من الجهود البحثية على تحقيق استقرار الكولاجين، وكيف أن تباينات مختلفة في تركيب الكولاجين، تؤثر على الاستقرار العام في الحلزون الثلاثي. ومن المعروف جيداً، أن Gly موجود ككل متبقي ثالث؛ لكي يسمح بحزم ثلاث سلاسل كولاجين في حيز ثلاثي. ومع ذلك، فقد تحتوي مواقع X و Y على أحماض أمينية مختلفة، والتي لا تقتصر على أحماض الإيمينو. وعلى الرغم من ذلك، فيتطلب التركيب الحلزوني الثلاثي المستقر وجود حوالي ٢٠٪ من أحماض الإيمينو في المواقع X و Y. وهناك أكثر من ٤٠٠ مجموعة ممكنة من الـ Gly-X-Y، ولكن

تحدث حوالي ٢٥ مجموعة ثلاثية محتملة فقط بتعدد أكثر من ١٪. وتظهر بعض البقايا على نحو أكثر تواتراً في الموقع X، مثل (Glu، Leu، Phe)، أو Y، مثل (Lys، Arg)، وبعض منها غير موجودة أو نادرة في الكولاجين، مثل (Tyr، Trp). وبين أحماض الإيمينو، يوجد عادة البرولايل Pro في الموقع X، بينما يوجد هيدروكسي برويل Hyp- الذي ينتج من تعديلات انتقالية تالية للبرولايل Pro- عادة في الموقع Y. إن الـ Pro-Hyp-Gly، هو الثلاثي الأكثر استقراراً، وكثيراً ما يحدث في تسلسل الكولاجين. وأي استبدال للبرولايل Pro أو الهيدر البروييل Hyp، يقلل استقرار الحلزون الثلاثي، إلا أن العديد من البقايا الأخرى موجودة فيه. وقد يكون سبب حدوثها إداً، هو قدرتها على حث التجميع الذاتي لمستويات أخرى من تدرج الكولاجين، مثل تشكيل ليف وليف. وعلى سبيل المثال، يمكن أن تساعد الشحنات الكهربائية المستقرة، أو عدم الألفة المائية للأحماض الأمينية على توسط التجميع المتداخل أو المتخالف للوالب الكولاجين الثلاثية [23]. وتحمل المجموعات الثلاثية غير Gly-Pro-Hyp أيضاً وظائف بيولوجية، مثل توفير مناطق تمييز للكولاجينازات collagenases، وتوفير مواقع ترابط لبروتينات الأنتجرين integrins، والبروتيوجليكان proteoglycans، والفايبرونكتين fibronectin [23]، والسماح للترابط العرضي التساهمي من خلال سلاسل اللايسين lysine الجانبية.

واستبدال الـ Gly في مجموعة ثلاثية Gly-X-Y بأي بقايا أخرى، تثير تناقصاً كبيراً من استقرار الكولاجين. وقد وُجد أن المرض الوراثي تكوّن العظام الناقص *osteogenesis imperfecta*، ينتج من مثل هذا الاستبدال. في هذا المرض، تؤدي المعدنة المعيبة لكولاجين النوع I، إما في سلسلة $\alpha 1$ أو $\alpha 2$ ، إلى تكوين عظام هشّة قابلة للكسر. وتعتمد شدة مرض تكوّن العظام الناقص على الطفرات الفعلية؛ لبعض الأحماض الأمينية المستبدلة (Cys، Ser)، التي يمكن أن تكون غير قاتلة، بينما

الأخرى ، مثل (Ser, Cys) تكون قاتلة في كل الحالات ، ما لم تكن الأحماض الأمينية المستبدلة ، واقعة بالقرب من الطرف N-. وتشير دراسات من قبل لونغ Long وآخرين [24] ، إلى أن استبدال Gly وحيد لـ Ala في بيتيد النموذج $(\text{Pro-Hyp-Gly})_{10}$ ، يظل يسمح بتشكيل اللولب الثلاثي ، ولكن يقلل استقراره الحراري بنسبة تصل إلى ٣٠ م. لقد أوضحت بيانات الأشعة السينية التي تم الحصول عليها بواسطة بيلا Bella وآخرين [8] ، أن البيتيد المشوه طفيف عند موقع الاستبدال وجسور الماء ، تحل محل الروابط الهيدروجينية بين السلاسل المعتادة. لقد قام بيرسيكوف Persikov وآخرون [25] بتعيين رتبة الاستقرار الحراري النسبي لسلاسل البيتيد المختلفة Hyp-Pro-Hyp ، ففي حالة أن $X = \text{Gly}$ ، كانت درجة حرارة الانصهار ٤٤,٥ م° ، وتقل بشكل كبير بالنسبة لأي بقايا أخرى. وفي بعض الحالات ، لم يكن المؤلفون قادرين على كشف أي تشكيل تركيب حلزوني ثلاثي ، وتم تقدير درجات حرارة الانصهار المقابلة بالاستنتاج الخطي من البيانات التي تم الحصول عليها في أكسيد-N- ثلاثي ميثيل الأمين trimethylamine-N-oxide . واستناداً على بياناتهم ، وحسب الترتيب التالي للاستقرار النسبي الحراري ، يمكن أن تشتق : $\text{Asp} > \text{Glu} > \text{Val} > \text{Arg} > \text{Cys} > \text{Ala} > \text{Ser} > \text{Gly}$ ، مع حيازة الـ Asp درجة حرارة انصهار مقدرة بـ ١٧ م°.

وقد تم دراسة مقياس النزعة للأحماض الأمينية المختلفة في المواقع X و Y ، باستخدام البيتيدات المضيفة ، بتسلسل البيتيد المستقر [26]. كما تم إدراج وحدات العائل أو الضيف المتغير Gly-X-Y في منتصف تسلسل $(\text{Gly-Pro-Hyp})_3\text{-Gly-X-Hyp}$ ، وأيضا تم دراسة استقرارياتها الحرارية بمطافية الـ CD. وبدون شك ، فالـ Pro في الموقع X ، يعطي التركيب اللولبي الثلاثي الأكثر استقراراً ، بدرجة حرارة انصهار (T_m) ، تساوي ٤٧,٣ م°. إن وجود أي بقايا أخرى في الموقع X ، تخفض الاستقرار ، وقد تم رصد

درجة حرارة الانصهار الدنيا $T_m = 31.9$ م° في حالة $X = \text{Trp}$. وبجوار الـ Pro مجموعة الأحماض الأمينية الأكثر استقراراً، وتتضمن كل الأحماض الأمينية المشحونة (Arg، Glu، Asp و Lys)، بالإضافة إلى Ala و Gln. وقد ينشأ تأثير الاستقرار من تفاعلات السلسلة الجانبية مع مجموعات كربونيل العمود الفقري المتاحة. وتشكل البقايا اللاتقطبية Met، Val، Ile و Leu سويةً مع Ser و Asn لوالب ثلاثية أقل استقراراً. ووجود Thr، His و Cys في الموقع X، يقلل الاستقرار أكثر من ذلك بكثير. إن وجود الـ Gly و البقايا الأروماتية، هما الأكثر زعزعة للاستقرار، وعلى الأرجح بسبب أشكالها غير المناسبة وتفاعلاتها الفراغية.

وقد أظهرت اختلافات بقايا الأحماض الأمينية في الموقع Y، أن البقايا الأكثر استقراراً، هي Hyp ($T_m = 47.3$ م°)، و Arg ($T_m = 47.2$ م°)، بينما البقايا الأروماتية، هي الأكثر زعزعة للاستقرار مرة أخرى ($T_m = 26.1$ م°). وما تبقى من الأحماض الأمينية، يقع في مدى متصل من درجات الحرارة الانتقالية بدون أفضليات خاصة لبقايا مشحونة أو قطبية.

وتكشف مقارنة تأثيرات الأحماض الأمينية المختلفة في المواقع X و Y عن أن الاستقرار الأكبر، يحدث عند $X = \text{Pro}$ و $Y = \text{Hyp}$ ، بينما في وجود Gly أو بقايا أروماتية، يُزعزع استقرار اللولب الثلاثي بشكل ملحوظ. إن قلة الارتباط بين البقايا المشحونة والقطبية، يوحي بأن التفاعلات بين السلاسل وتعرض المذيب، تكون مختلفة للمواقع X و Y للتركيب اللولبي الثلاثي. والعلاقة بين تردد الأحماض الأمينية الحادث في تسلسلات الكولاجين الليفي fibrillar، ودرجة حرارة انتقال بيتيدات صيف-عائل المناظرة، تسمح للواحد بأن يفترض أن هذا التردد، يرتبط بالاستقرار اللولبي الثلاثي. إن وجود بقايا لزعة الاستقرار، قد يكون ضرورياً لتشكيل ليف fibril، وربط مكونات المصفوفة خارج الخلية المختلفة، وفي الوقت نفسه، يوفر درجة حرارة تحويل

الصفات الطبيعية denaturation المناسبة للتركيب اللولبي الثلاثي ؛ لتقترب من درجة الحرارة الحد الأعلى للجسم.

٤,٧ تحقيق الاستقرار عن طريق هيدروكسي البرولين: تجعد حلقة البيروليدين

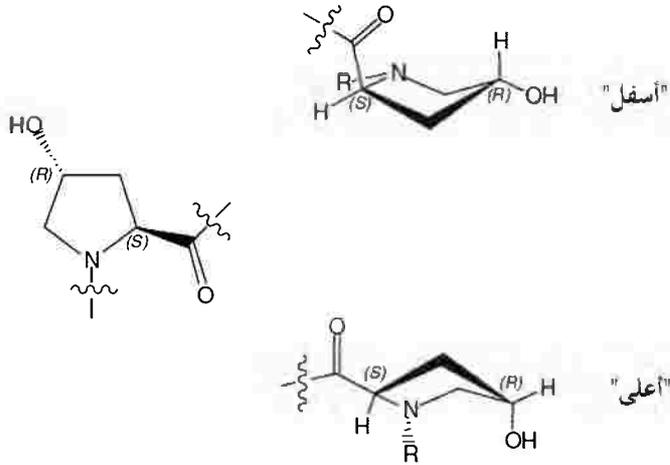
Stabilization via Hydroxyproline: The Pyrrolidine Ring Pucker

وقد لوحظ في وقت سابق، أن هيدروكسيلة (أو إضافة هيدروكسيل) hydroxylation انتقالية تالية للـ Pro تحدث في الموقع Y. وتكشف دراسات نموذج الببتيدات عن أن وجود الـ Hyp في الموقع X، يُزعزع التركيب اللولبي الثلاثي فعلياً [27]. ولفهم هذه الملاحظة، يجب أن يفهم المرء الآلية التي يؤدي فيها الـ Hyp في الموقع Y إلى تحقيق الاستقرار. وتقتصر النتائج الأخيرة تفسيرين بديلين. ينص التفسير الأول على أن تحقيق الاستقرار ينشأ من الروابط الهيدروجينية المتكونة بين مجموعة هيدروكسيل الـ Hyp، وأكسجين كربونيل الـ Gly، من السلسلة المجاورة [8, 28]. في حين يقترح التفسير الثاني أن السالبة الكهربائية (الكهروسالبية) لمجموعة الهيدروكسيل، تؤدي دوراً رئيساً من خلال تفضيل شكل حلقة البيروليدين المناسب للـ Hyp، بينما لا تساهم الروابط الهيدروجينية بالقدر نفسه.

يمكن أن توجد حلقة بيروليدين الـ Pro و Hyp في شكلين متميزين، أو حلقات مجمعة puckerings (الشكل رقم ٤.٥). وعادة يتم الإشارة لهذين الشكلين المجمعين بـ خارجي - C^γ (أعلى) C^γ -exo (up)، وداخلي - C^γ (أسفل) C^γ -endo (down). وتنشأ الفروق بين الاثنين من إزاحة ذرات الـ C^β و C^γ من المستوى المتوسط للحلقة. ويحدث تجعيد أسفل البرولينات في الموقع X، بينما الموجودة في الموقع Y، تتبنى تجعيداً أعلى. وتم رصد هذا التناوب من التجعيد (داخلي) -X (خارجي) Y في الأشعة السينية للتركييب البلورية لببتيدات نموذج الكولاجين [29]. ويرتبط نمط التجعيد بقوة بزوايا ثنائية ϕ للعمود الفقري، وسوبياً مع مقترحاتهم بأن تجعيد الحلقة الصحيح مع الـ Pro

أسفل الموقع X، وبالنسبة ل Pro أو ال Hyp أعلى الموقع Y، يكون مهماً جداً لتشكيل اللولب الثلاثي.

لقد تم الحصول على الدليل الأقوى لهذه الآلية من قبل رينز Raines وزملائه [30]، حيث إنهم شيدوا بولي بيتيد، يحتوي على ٤- فلوروبرولين 4(R)-fluoroproline، و (fPro^R)، و (Pro-fPro^R-Gly)₁₀، ووجدوا أن استبدال مجموعة الهيدروكسيل بالفلورين، يزيد درجة حرارة الانصهار كثيراً إلى حوالي ٩٠ م°، وهي الأعلى من بين البولي بيتيدات شبيهة الكولاجين المعروفة. والحقيقة أن الفلورين أكثر سالبية كهربية، ولا يستطيع العمل كمانح رابطة هيدروجينية، تُدعم فكرة أن عوامل الفراغية الإلكترونية stereoelectronic، هي السبب الأساسي لتحقيق استقرار اللولب، على عكس الرابطة الهيدروجينية. وعلاوة على ذلك، فقد أظهرت دراسة مماثلة من قبل المجموعة نفسها، على تسلسل يحتوي على ٤(S)- فلوروبرولين (fPro^S) 4(S)-fluoroproline، و (Pro-fPro^S-Gly)₇، أن الانتقال - إن وجد - يحدث عند درجة حرارة أقل من ٢ م°.



الشكل رقم (٥، ٤). التشكل "أعلى" و"أسفل" حلقة الهيدروكسي برولين hydroxyproline.

لقد أجرى بارون Baron وزملاؤه [31] حسابات ميكانيكا الكم والميكانيكا الجزيئية على نموذج البولي بيتيدات، $(\text{Pro-Pro-Gly})_n$ ، من أجل دراسة أهمية تأثيرات بقايا بينية طويلة المدى، ومجاورة على استقرار اللولب الثلاثي. وقد وجدوا أن إدراج تفاعلات البقايا البينية، لا تعمل على استقرار الشكل أعلى $-Y$ / أسفل $-X$. وعلاوة على ذلك، فإن المتماكب أسفل $-Y$ / أسفل $-X$ ، كان دائماً أكثر استقراراً من المتماكب أعلى $-Y$ / أسفل $-X$ ، الموجود في اللولب الثلاثي؛ ولذلك لا يمكن أن يكون تفضيل أعلى $-Y$ / أسفل $-X$ في الكولاجين خاصية جوهرية في التسلسل Pro-Pro-Gl. ويضيف هذا ثقلاً لدور استقرار الـ Hyp أو $f\text{Pro}^R$ في الموقع X . وقد تبين من قبل المؤلفين أنفسهم [32]، أن وجود مستبدل سالب الكهربية (R) 4، يفضل التجعيد أعلى. وعلاوة على ذلك، فإن الاستقرار النسبي للمتماكب أعلى، يزداد بزيادة السالبة الكهربية للمستبدل. والتنظيم السابق الصحيح لعمود فقري الببتيد، الذي له Hyp في الموقع Y ، يقلل من حد الأنثروبي entropic penalty لتشكيل اللولب الثلاثي. وتتفق هذه النتيجة مع التحسين الملاحظ تجريبياً في استقرار اللولب الثلاثي، في حالة السلاسل المحتوية على $f\text{Pro}^R$.

لقد تم دراسة تأثير $f\text{Pro}^R$ و $f\text{Pro}^S$ في الموقع X بعدة مجموعات [33]. وكما يتوقع المرء، فإن اثنين من هذه البقايا يتبينان تفضيلياً اثنين من تجعيد مختلف مع الـ $f\text{Pro}^R$ - أعلى، والـ $f\text{Pro}^S$ - أسفل، وتأثيرهما على استقرار اللولب الثلاثي، ينبغي أن يكون متعاكسا. وفي الحقيقة، لقد اتضح أن درجة حرارة التحول للـ $(f\text{Pro}^S\text{-Pro-Gly})_7$ ، كانت حوالي 33°M ، بينما لا يشكل الـ $(f\text{Pro}^R\text{-Pro-Gly})_7$ لولبا ثلاثيا مستقرا. وبزيادة طول الببتيد، تزداد أيضاً درجة حرارة التحول، ويخضع الـ $(f\text{Pro}^S\text{-Pro-Gly})_{10}$ لمثل هذا التحول عند 58°M ، بينما يظل تشكيل اللولب الثلاثي للـ $(f\text{Pro}^R\text{-Pro-Gly})_{10}$ غير قابل للكشف. وعموماً يبدو على الأرجح، أن أثر استقرار الـ Hyp، ينشأ في تفضيل

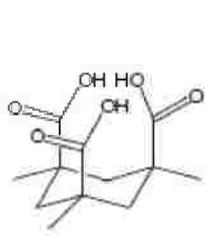
الفراغية الإلكترونية من حلقة البيروليدين، ذات الهيدروكسيل (أو الهيدروكسيلية)؛ لتبني تجعيد الحلقة الأعلى المناسب.

٤,٨ استقرار اللولب الثلاثي من خلال التكدس القسري

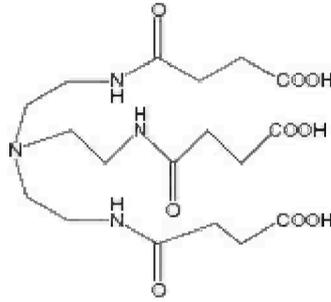
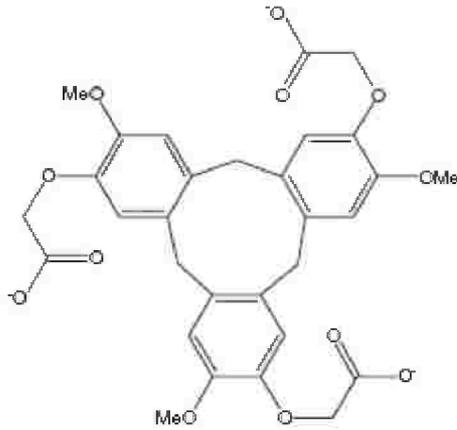
Triple Helix Stabilization Through Forced Aggregation

لقد تم بذل العديد من المحاولات لقسر أو لتعزيز تشكيل اللولب الثلاثي، باستخدام سقالات جزيئية منظمة مسبقاً. وفي هذا الأسلوب، تم تحقيق تأثير الاستقرار بثبيت ثلاث سلاسل بولي بيتيد، بشكل تساهمي معاً في تقارب وثيق، وهكذا تم خفض التكاليف الأنتروبية للتنبؤي، إضافة إلى زيادة تركيز الببتيد الموضوعي.

على سبيل المثال، فقد تم تحضير ٢، ١، ٣- حمض بروبان ثلاثي كربوكسيليك 1,2,3-propanetricarboxylic من قبل غيرمان Germann وهيدمان Heidmann [34]، لتجسير ثلاث سلاسل بيتيد، والتي تم تحضيرها لتشكيل اللولب الثلاثي. واستخدام جزيء عضوي محصور أكثر شكلياً conformationally كقالب من قبل غودمان Goodman وآخرين [35]. لقد شيدوا مشتقاً من حمض ثلاثي كيمب Kemp (KTA) [35] (الشكل رقم ٤.٦)، حيث يحتوي هذا الحمض على ثلاث وظائف حمض كربوكسيلبي محوري متوازية لبعضها بعضاً، والتي تم تعديلها أكثر لتشمل فواصل Gly؛ من أجل جعل التركيب الناتج أكثر مرونة، والحد من الإعاقة الفراغية. وقد بين المؤلفون بأن قالباً أساسه-KAT، يعمل على تحقيق استقرار تركيب اللولب الثلاثي، ووجدوا أن درجة حرارة تحول الـ $KTA-[Gly-(Gly-Pro-Hyp)_5-NH_2]_3$ ، كانت ٧٠ م، وهي أعلى من ٥٢ م للـ $Ac-(Gly-Pro-Hyp)_5-NH_2$ البسيط. وعلاوة على ذلك، فقد تم إيجاد هذه السقالة؛ لحت طبي لولب ثلاثي من الببتيد القصير جداً، يحتوي على ثلاثة تكرارات فقط من Gly-Pro-Hyp.



KTA

TREN-(suc-OH)₃ $(+/-)\text{CTV}[\text{CH}_2\text{CO}_2^-\text{Bu}_4\text{N}^+]_3$

الشكل رقم (٦، ٤). التراكيب الكيميائية لـ KTA، TREN، وCTV، التي استخدمت لربط جدران البيتيد سوياً، وتحسين خاصية اللولب الثلاثي.

وتم استخدام سقالة حمض ثلاثي كيرالي أخرى، مستندة على ثلاثي فيرتريلين حلقي cyclotrimeratriylene مخروطي الشكل (CTV)، من قبل ليسكامب Liskamp وآخرين [37]؛ لفرض طبي لولب ثلاثي لكل من سلاسل الكولاجين

الطبيعية والنمذجية. كما ذكر في الفقرات السابقة، أن استبدال الأحماض الإيمينية في بولي الببتيد Gly-Pro-Hyp بأحماض لا إيمينية non-imino، تُزعزع استقرار اللولب الثلاثي كثيراً؛ لذلك فقد اهتم المؤلفون بدراسة تأثير السقالة على استقرار تسلسلات الكولاجين الطبيعية، المحتوية على نسبة مئوية كبيرة من بقايا لا إيمينية non-imino. وقد أظهرت البيانات التي تم الحصول عليها بأن ال (-)-CTV (+)، كان أكثر فعالية من (-)-CTV في تعزيز الطي الصحيح. وفي حالة تسلسل الكولاجين الطبيعي، كان الطي غير قابل للقياس بالنسبة ل (-)-CTV، بينما تبين أن المتماكب الفراغي (+)، هو المناسب لحت تشكيل اللولب الثلاثي.

وحديثاً، تم دمج ثلاثي (٢-أمينو إيثيل) الأمين (TREN-2) tris(aminoethyl)amine، المقترن بفواصل حمض الساكسينيك (succinic (suc)؛ لتجميع لولب ثلاثية تحتوي على تسلسلات ال Gly-Nleu-Pro (Nleu : N-أيزوبيوتيل الجليسين (N-isobutylglycine) [38]. وكشفت دراسات الرنين المغناطيسي النووي وال CD سوباً، مع تحويل الصفات الطبيعية الحرارية والنمذجة الجزيئية، بأن ال TREN-[suc-(Gly- $[(Nleu-Pro)_n-NH_2]_3$ ، حيث $n = 5$ و 6 شكّل لولباً ثلاثياً مستقراً في الماء. ودلت المقارنة بين سقالات TREN و KTA على أن ال TREN يستحث تشكيل اللولب الثلاثي بفعالية أكثر من السقالة KTA. وعلى الأرجح يعود سبب التعزيز الملاحظ في الاستقرار إلى المرونة العظمى لجزيء ال TERN.

والأسلوب الآخر لتحقيق استقرار اللولب الثلاثي المستخدم من قبل تيريل و Tirrell وآخرين [39]، هو ربط أحماض دهنية طويلة السلسلة بنهاية الطرف N أو C لببتيد نموذج الكولاجين، مولداً بذلك مزدوج ألفة الببتيد amphiphile. وتمتلك ذيول الأحماض الدهنية نزعة قوية للتجميع في الماء، والتي تجمع سلاسل الببتيد المرفقة معاً؛ مما يؤدي إلى زيادة فعالية تركيز الببتيد الموضعي، وبالتالي يساعد على استقرار

اللؤلؤ الثلاثي. وتتكون الببتيدات مزدوجة الألفة من جزأين: "مجموعة الرأس"، متكونة من ببتيد بتسلسل يشبه الكولاجين، و"مجموعة الذيل"، مصنوعة من سلسلة كربونية مشبعة. ولدى مجموعة الرأس ميول لتبني الشكل اللولبي الثلاثي، وبالتالي توفر العنصر التركيبي الذي يمكن تمييزه من قبل الخلايا والجزيئات الحيوية الأخرى. وتقدم مجموعة الذيل الكارهة للماء سجلاً صحيحاً لجداول الببتيد، ويمكنها حث طي اللؤلؤ الثلاثي؛ نتيجة للتجميع الذاتي في المذيبات القطبية. وعلاوة على ذلك، فقد يكون الذيل الكاره للماء مفيداً للتفاعل مع السطوح البيولوجية الأخرى، مثل (غشاء الخلية).

ووفقاً لملاحظات طبقتها الأحادية، وبيانات الـ NMR والـ CD، كانت مزدوجات ألفة الببتيد بالفعل قادرة على الانطواء أو التلوي في تراكيب لولبية ثلاثية، تشبه بولي البرولين-II مرتب جداً. وتؤكد منحنيات انصهار الـ CD، أن درجة حرارة تحول تجربة مزدوجات ألفة الببتيد متطابقة إلى بسط (إزالة طي) unfolding ثلاث سلاسل ببتيد. كما تبين أيضاً، أن وجود ذيل كاره للماء، يعمل على تثبيت التركيب اللولبي الثلاثي كثيراً. وكانت درجات حرارة تحول الصفات الطبيعية للببتيدات البسيطة، تقع في مدى من ١٥-٢٠ م تحت درجات حرارة التحول للنظائر المؤكلمة .alkylated.

وتؤدي أطوال الذبول المختلفة إلى تراكيب نانوية مختلفة من الببتيدات مزدوجة الألفة [40]. وجميع مزدوجات ألفة الببتيد بذيول وحيدة، تشكل مذيلات (غرويات) كروية spheroidal micelles. وتزايد طول الذيل إلى ١٦ ذرة كربون، في حالة مزدوجات ألفة الببتيد ثنائية الذيل؛ يؤدي إلى تغير مهم في التركيب الإجمالي من مذيلات كروية إلى جدائل، والشكل المفترض بتجميع المذيلات الكروية في مذيلات تشبه القرص، والتي تتراكم أو تتكدس على بعضها بعضاً. وتُظهر مزدوجات ألفة الببتيد بذيول

ألكيلية Alkyl ، بطول من ١٨ إلى ٢٠ ذرة كربون تحوّل انصهار السلسلة، ويتمزق التركيب اللولبي الثلاثي لمجموعة رأس الببتيد من قبل تنظيم بلوري للذيول الأليفاتية aliphatic.

٩, ٤ المصفوفة خارج الخلية ومحاكاة الكولاجين في هندسة الأنسجة

Extracellular Matrix and Collagen Mimics in Tissue Engineering

يمكن اعتبار محاكاة المصفوفة خارج الخلية في فئتين، تلك التي تحاكي وظيفة المصفوفة خارج الخلية (ECM)، والأخرى التي تحاكي تركيب المصفوفة خارج الخلية ECM، وإلى حد ما تتداخل هاتان الفئتان. ولقد تركزت الجهود المبذولة لمحاكاة وظيفة المصفوفة خارج الخلية بشكل كبير على تطوير مصفوفات البوليمر، التي يمكن أن تتحلل بمرور الزمن، وتلك التي توفر إمكانيات التمييز الجزيئي الحيوي. وبدون تمييز جزيئي حيوي، يتم امتصاص المصفوفة خارج الخلية، وبروتينات سطح الخلية بشكل غير نوعي على سطح المادة الحيوية؛ مما يسمح بنمو الخلية غير المحكوم. ولذا تم تعديل مواد حيوية لتشمل الببتيد أو سلاسل البروتين، من أجل توجيه استجابات خلوية معينة، وارتفاعات سقالة خلية وسيطة [41]. وقبل اكتشاف مجالات الترابط في بروتينات المصفوفة خارج الخلية، كانت ترفق سلاسل طويلة من الفبرونكتين fibronectin، وفيترونكتين vitronectin، ولامينين laminin على سطح السقالة، وقد عُرِّضت لتعزيز التصاق الخلية وانتشارها [42]. ولاحقاً، ثبت أن إرفاق سلاسل ببتيد قصيرة، تكون أكثر كفاءة من إرفاق البروتين الكامل، نظراً لنزعة البروتينات إلى تبني أشكال مطوية عشوائية أو مشوهة على التصاقها للسقالة، ولم تكن مجالات ترابطها بالمستقبل سهلة الوصول فراغياً.

هناك عدة سلاسل ببتيد مشتقة من مجال إرسال إشارة signaling الفيرونيكتين fibronectin ، واللامينين laminin والتي تم إيجادها- بشكل مدهش- للعمل بشكل مستقل إلى حد كبير عن البروتين الكامل. ومن بين سلاسل الببتيد تلك الـ RGD ، والـ IKVAV ، والـ YIGSR. وقد تم ربط سلاسل الببتيد هذه إلى عدد من الركائز. وعلى سبيل المثال ، لقد قام سالتمان Saltzman وآخرون [43] بربط سلسلة الـ RGD إلى العمود الفقري لبوليمر أثيلين جليكول PEG ، كما قام الباحثون بتحضير هذا البوليمر الهجين hybrid polymer ؛ لتعزيز تجميع خلايا المخ الجنينية المفصولة ميكانيكياً ، وخلايا ورم القوائم (PC12) pheochromocytoma ، وخلايا ورم الأرومة العصبية neuroblastoma. وتم تثبيت مستقبل التصاق الخلية البطانية REDV على سطح البوليمر ، وهي ما عدا ذلك ليست خلية لاصقة [44]. وقد تبين أن مثل هذا الاشتقاق من البوليمر ، يسمح فقط بربط الخلايا البطانية ونشرها على السطح ، بينما تبقى خلايا العضلات الملساء الوعائية والخلايا الليفية fibroblasts سليمة. وتم ربط سلسلة محتوية على ١٩ وحدة من الـ IKVAV وببتيدات أوليغمرية مشتقة اللانين ، إلى أغشية برويلين الإثيلين المفلورة [45] ، وقد أدى ذلك إلى ارتفاع النسبة المئوية لارتباط خلية المستقبل المتوسطة على أسطح الغشاء الوظيفية عنه على الأسطح غير الوظيفية. والطريقة الأخرى لتعزيز طبيعة المحاكاة الحيوية biomimetic لهذه السقالات ، هي إدراج سلاسل ببتيد تتحلل أنزيمياً في العمود الفقري للبوليمر ؛ لتمكين تحلل البوليمر بالبروتيازات (الإنزيمات البروتينية) proteases [46]. وقد أُدرج موقع تمييز كولا جيناز الخلايا الليفية APGL في بولي (إثيلين جلايكول) ، وتبين أن المادة الناتجة تتحلل بسهولة بالبروتياز المستهدف.

لقد تم دراسة تأثيرات ارتباط الببتيد إلى المواد الحيوية في العديد من الأنسجة ، بما في ذلك النسيج العظمي ، والعصبي ، والقلبي الوعائي ، والأوعية الدموية. ويبدو

أن مثل هذا التعديل من السقالات مهم جداً للتجديد الناجح للأنسجة، حيث يُعدّل الببتيد المرفق التصاق الخلية، والانتشار، والهجرة. ومع ذلك، مازال العديد من المشاكل، مثل تشييد المواد بالصفات الميكانيكية المناسبة، وتصميم جزيئات التصاق مناسبة لأنواع خلية معينة بدون حل [41].

إن محاولات تقليد (محاكاة) تركيب المصفوفة خارج الخلية، بفكرة أن الوظيفة تتبع الشكل، تعدُّ أقل شيوعاً، ربما بسبب تعقيد التراكيب الموجودة ضمن المصفوفة خارج الخلية. وقد استُخدمت مزدوجات ألفة الببتيد؛ لجعل تركيب نانوي السقالة الليفية يشبه المصفوفة خارج الخلية [47,48]. وفي هذا الأسلوب يتم محاكاة الطبيعة الليفية للمصفوفة خارج الخلية، ولكن ليس من تركيب وتنظيم الألياف نفسها. وقد تضمن تصميم مزدوج ألفة الببتيد منطقة ذيل كاره للماء، ومجموعة رأس الببتيد، حيث تتكون مجموعة رأس الببتيد من ثلاث مناطق. وتم إدخال أربعة بقايا سيستين cysteine متتالية في السلسلة؛ لكي تكون قادرة على التقاط التركيب المتجمع ذاتياً بشكل تساهمي خلال روابط ثنائي الكبريتيد في الترابط العرضي cross-linking. وتضمنت المنطقة الثانية بقايا الفوسفوسرين phosphoserine، الذي يتم تجميعه ذاتياً بعد أن يتعرض للبيئة للمائية، ويمكن أن يستحث تنوُّي فوسفات الكالسيوم على السطح الخارجي للألياف المتجمعة ذاتياً؛ مما يؤدي إلى تشكيل تراكيب تشبه العظم عضوية/ لا عضوية مركبة. وقام المؤلفون أيضاً بإدراج سلسلة الـ RGD كجزء ثالث، والذي تم إيجاده ليكون مهماً جداً في عمليات التصاق الخلية [49]. وقد كشف فحص مزدوج ألفة الببتيد المتجمع ذاتياً في أس هيدروجيني حمضي بالمجهر الإلكتروني النفاذ (TEM) شبكة من الألياف، بقطر يبلغ 6 نانومتر. ويعتقد أن هذه الألياف مصنوعة من مذيلات أسطوانية، تقع فيها ذيول الألكيل داخل الألياف ومنطقة الببتيد، مكشوفة على السطح الخارجي للتركيب. ويسمح اتجاه الببتيد على سطح الألياف لهذا النظام لأن

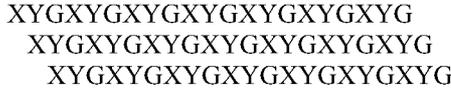
يكون مصمماً بسهولة لتقديم وظائف كيميائية مختلفة على سطح الألياف. وأظهرت تجارب المعدنة (التمعدن) Mineralization ، أن مزدوجات ألفة البيتيد كانت قادرة على حث تنوُّي فوسفات الكالسيوم المائي أو هيدروكسي أباتيت على سطحها. ووجد أن النمو البلوري لفوسفات الكالسيوم المائي ، كان موجهاً بشكل تفضيلي على طول المحاور الطويلة للألياف النانوية ، وهي ظاهرة تم رصدها على نطاق واسع في النمو الفلزي الحيوي داخل الجسم الحي *in vivo* [50]. وفي دراسة أخرى للمجموعة البحثية نفسها ، أظهرت جميعاً ذاتياً لمزدوجات ألفة البيتيد المشحونة بشكل معاكس في ألياف ، من خلال تشكيل أزواج ملح جسرية عند رقم هيدروجيني متعادل pH [48]. والحقيقة أن التجميع الذاتي يحدث عند رقم هيدروجيني متعادل ، تشير بقوة إلى أن مزدوجات الألفة المشحونة إيجابياً وسلبياً ، تكون مختلطة في ليف واحد ، بدلاً من تشكيل ألياف متجانسة الوحدة. وهذا الخلط يخفض تركيز الشحنة المعاكس غير المناسب جداً ، كما يخفض التنافر الإلكترونيستاتيكي.

٤,١٠ "الأطراف اللزجة" والبلمرة فوق الجزيئية

"Sticky Ends" and Supramolecular polymerization

تندرج إستراتيجيتنا لتحضير محاكيات الكولاجين ضمن فئة محاكيات المصفوفة خارج الخلية ، التي تحاول نسخ تركيب المصفوفة خارج الخلية. وأسلوبنا هو تصميم بيتيدات قصيرة بتسلسل عام (XYG) ، والتي تستطيع أن تتجمع ذاتياً في لواب ثلاثية ، واعتماداً على التسلسل المختار ، يجرى تجميع إضافي إلى جداول لولبية ثلاثية أطول بكثير. وإذا نجح أسلوبنا هذا ، فسوف يُعالج إحدى المشاكل المهمة في تشييد الكولاجين الكيميائي ، وهي أن بيتيدات الكولاجين الطبيعية تكون نموذجياً في ترتيب يصل إلى ١٠٠٠ حمض أميني في الطول ، بينما يكون تشييد بيتيد الطور الصلب التقليدي محدوداً إلى ١٠٠ حمض أميني تقريباً.

عموماً سيتم تجميع الببتيد بتسلسل $(XYG)_n$ إلى لولب ثلاثي، على افتراض أن n تكون كبيرة بما فيه الكفاية، ويتم اختيار X و Y ؛ ليكون لهما نسبة عالية من البرولين والهيدروكسي برولين على التوالي. ويوفر هذا الشكل المرغوب، ويستوفي أيضاً الترابط الهيدروجيني بين الببتيدات. وبسبب الاشتراط بأن متبقي الجليسين يجب أن يكون في داخل اللولب الثلاثي في كل الأوقات، وأن متبقي الجليسين هذا يكون مساهمة من جدائل الببتيد المتناوبة؛ فإنه يتم معادلة لولب ثلاثي متكون من ثلاث ببتيدات متماثلة طبيعياً بحمض أميني واحد (المخطط رقم ٤.١).



المخطط رقم (٤,١). لولب ثلاثي من ٢١- حمض أميني. المطلوب لحزم الجليسين في داخل اللولب الثلاثي، بسبب معادلة حمض أميني وحيد بين الببتيدات. وتشير X و Y إلى أي حمض أميني.

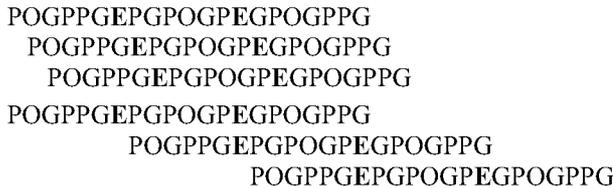
الجدول رقم (٤,١). تم دراسة خمسة ببتيدات، وتحضير الأطراف $-N$ و $-C$ كأمين حر، وحمض كربوكسيلي على التوالي. O ، هيدروكسي برولين؛ P ، برولين؛ G ، جليسين؛ E ، حمض الجلوتاميك؛ K ، ليسين.

الببتيد	التسلسل	الشحنة الخالصة
1	PPGPPGPPGPPGPPGPPGPPG	0
2	PPGPOGPPGPOGPPGPOGPPG	0
3	POGPPGEPGPPGKGPPOGPPG	0
4	POGPPGEPGPPGEGPOGPPG	-2
5	POGPPGKGPPOGPPGKGPPOGPPG	+2

ويعني هذا أن أي جزء معين عمودي على المحور الطويل للولب الثلاثي، يجب أن يمتلك جليسين واحداً، وحمضاً أمينياً واحداً من الموقع X ، وحمضاً أمينياً واحداً من الموقع Y . وقد ثبت أن الاختيار الصحيح للأحماض الأمينية المشحونة في لفائف لولبية ملفوفة، يمكن أن يجبر لولبين خارج السجل مع بعضها بعضاً، وتتولد "أطراف لزجة" [51]، ومن ثم يمكن استخدام هذه الأطراف اللزجة لتجميع مزيد من

الببتيدات ؛ مما يؤدي إلى بلمرة فوق جزيئية أو لا تساهمية ، ويمكن تطبيق الفكرة نفسها فيما يتعلق بلولب الكولاجين الثلاثي. وقد يؤدي الاختيار الصحيح للأحماض الأمينية المشحونة ، مثل الليسين وحمض الجلوتاميك إلى ازدواج مفضل ، والذي ينتج حمضا أمينيا أكبر ، بدلاً من حمض أميني وحيد. ولاختبار هذه الفكرة ، قمنا بتحضير خمسة ببتييدات بالتكرار XYG ، كما هو موضح في الجدول رقم (٤.١).

لقد تم تصميم الببتيدات 1 و 2 كببتيدات منظمة أو متحركة ؛ لفحص مستوى خط الأساس لتشكيل اللولب الثلاثي ، عندما لا تُستخدم البقايا المشحونة. ولا يحتوي الببتيد 1 على هيدروكسي برولين ، بينما يحتوي الببتيد 2 على ثلاثة بقايا هيدروكسي برولين في الموقع Y. وتحتوي كل الببتيدات 3-5 على ثلاثة بقايا هيدروكسي برولين في المواقع Y ، ولها أيضاً اثنان من البقايا المشحونة في الموقع X ، وواحد في الموقع Y. وللببتيد 3 كل من حمض الجلوتاميك والليسين ، بينما للببتيد 4 حمض جلوتاميك فقط ، وللببتيد 5 الليسين فقط. وإذا تم إذابة الببتيد 4 عند رقم هيدروجين pH يساوي ٧ ، فسيكون من المتوقع أن تُعَوَّق الشحنات على سلاسل الجوتاميدات الجانبية التجميع ، من خلال التنافر الإلكترونيستاتيكي ، كما هو موضح في المخطط رقم (٤.٢).



المخطط رقم (٤.٢). أنماط التجميع المتناوب للببتيد 4 ، التي فيها بقايا جلوتاميت متعددة مصطفة بشكل غير مناسب لبعضها بعضاً ، بينما يتم فرض تراصف الجليسين .

ومع ذلك ، فإذا تم إضافة الببتيد 5 إلى محلول بنسبة 1:1 ، فقد يكون من المتوقع أن يتحول هذا التنافر الإلكترونيستاتيكي إلى تجاذب مناسب بين الجلوتاميت والليسين المشحونين عكسياً ، كما هو موضح في المخطط رقم (٤.٣). ويؤدي هذا إلى تدلي أو

بروز كبير، للطرف "اللزج"، الذي يمكن أن يؤدي إلى مزيد من تجميع الببتيدات. ويمكن أن يستمر هذا التجميع الذاتي إلى أجل غير مسمى، وهو الأساس لتحضير جدائل لولبية ثلاثية طويلة جداً.

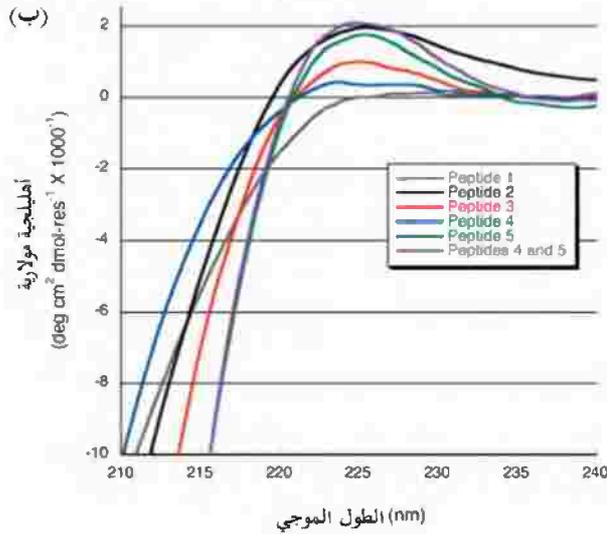
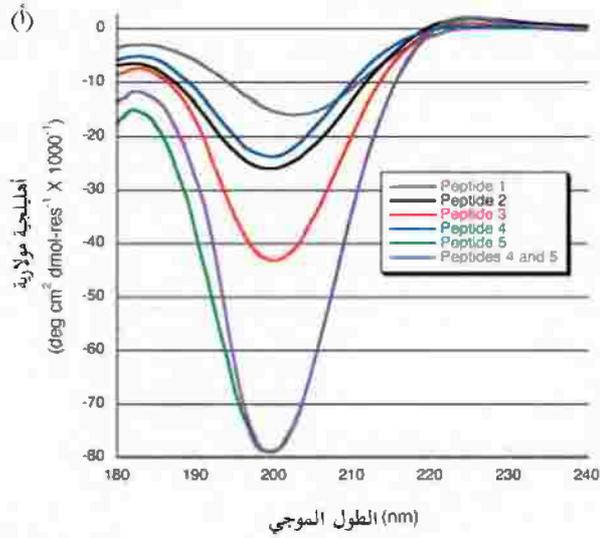


المخطط رقم (٣، ٤). الآلية المقترحة لتجميع الببتيدات 4 و 5. يتم تعزيز تجميع اللوالب الثلاثية المتعرجة أو المتداخلة staggered، بتزاج الشحنة بين بقايا الليسين وحمض الجلوتاميك المشحون عكسياً. وتجميع أول ثلاثة ببتيدات يُشكل "أطرافاً لزجة"، ومن ثم يمكن تجميع الببتيدات الإضافية، وتتكاثر لأطراف اللزجة.

إن وظائف الببتيد 3، تكون في شكل مماثل لخليط الببتيدات 4 و 5، لكن الشحنتات المكتملة موجودة على حد سواء داخل الببتيد نفسه.

وقد تم تحضير الببتيدات 1-5 بمشيد (بمؤلف) synthesizer ببتيد متعدد التقنية الكيميائية المتقدمة Advanced ChemTech APEX396، باستخدام بروتوكولات تشييد ببتيد الطور الصلب ٩-فلورنيل ميثوكسي كربونيل (Fmoc)-9-fluorenylmethoxy- carbonyl القياسي. وتم تحضير الطرف N- و الطرف C- كأمينات حرة، وأحماض كربوكسيلية على التوالي. وتم تنقية الببتيدات عن طريق كروماتوجراف سائل الطور المعكوس، عالي الأداء، وتحديد كتلتها بمطياف الكتلة MS MALDI-TOF (زمن تأين/مج ليزر مصفوفة مساعدة من مطيافية انطلاق الكتلة). وحضرت محاليل لكل ببتيد بتركيز ٦ ملي مول، وتم ضبط الرقم الهيدروجيني pH إلى ٧، باستخدام هيدروكسيد الصوديوم NaOH، وقد جُمع طيف الـ CD لكل عينة بوعاء عينة حجمه ٠,٠١ ملم. وتم دراسة الطيف لمحلول خليط من الببتيد 4 و 5 أيضاً، والذي كان فيه تركيز كل ببتيد ٣ ملي مول بالنسبة إلى تركيز الببتيد الكلي ٦ ملي مول (الشكل رقم

(٤.٧). وبشكل غير مفاجئ، كان البيتيد 1، هو البيتيد ذو الإشارة الأضعف عند ٢٢٥ نانومتر، والذي يفتقر إلى أي بقايا هيدروكسي برولين. وعلى النقيض من ذلك، فقد أظهر البيتيد 2، ذو الثلاث بقايا هيدروكسي برولين قمة موجبة كبيرة عند ٢٢٥ نانومتر، وقمة سالبة تحت ٢٠٠ نانومتر. ومن بين الثلاثة بيتيدات المحتوية على أحماض أمينية مشحونة، كان للبيتيد 4 إشارة اللولب الثلاثي الأضعف. وهذا هو المتوقع؛ لأن اقتران الشحنة غير مُستحب بين بقايا الجلوتاميت المتأينة، والتي تنتج من تشكيل اللولب الثلاثي. وللبيتيد 3، الذي له قدرة على ترتيب نفسه بمثل هذه الطريقة؛ لتشكيل أزواج شحنات تعاونية بين الليسين والجلوتاميت، إشارة معززة بشكل كبير عند ٢٢٥ نانومتر، بالمقارنة مع البيتيد 4. وعلى أية حال، كان طيف ال-CD للبيتيد 5 مفاجئاً، وقد توقعنا أن هذا البيتيد يتصرف بطريقة مشابهة للبيتيد 4، مع إشارة لولب ثلاثي ضعيفة فقط؛ بسبب توازن الشحنة غير المستحب بين أحماض أمينية الليسين المشحونة إيجابياً، ولكن في الحقيقة، كان للبيتيد 5، أحد أقوى أطيف اللولب الثلاثي. وتضمنت التجربة السادسة خلط البيتيد 4، المشحون سلبياً مع البيتيد 5 المشحون إيجابياً. وإذا لم يكن هناك تفاعل بين تلك البيتيدات، فإننا نتوقع طيف ال-CD، الذي يكون متوسطاً للأطيف المستقلة أو الفردية من 4 و5 بمفردها. وبدلاً من ذلك، فقد رأينا طيفاً لولبياً ثلاثياً قوياً جداً، حيث كان أكثر حدة إلى حد ما من طيف البيتيد 5 بمفرده. والفحص الأولي لهذه البيانات، قد يقود المرء للاعتقاد بأن هذا الطيف ببساطة، هو نتيجة سيطرة البيتيد 5 على الإشارة. وعلى أية حال، يجب أن يوضع في الاعتبار أن تركيز البيتيد 5 في العينة المختلطة، يكون عند النصف، بالمقارنة بذلك التركيز في التجربة المنفصلة. ولذلك، فالإشارة القوية التي نراها يجب أن تكون نتيجة للتفاعل بين البيتيدات 4 و5، والذي يكتسب فيه البيتيد 4 طابعاً لولبياً ثلاثياً مُحسناً، عندما يشترك مع البيتيد 5، على النحو المقترح في المخطط رقم (٤.٣).



الشكل رقم (٤,٧). بيانات ال CD من الببتيدات 1-5 ، والمخلوط بنسبة 1:1 من ببتيدات 4 و5. الببتيدات تكون عند تركيز ٦ ملي مول ، وفي منظم الفوسفات ١٠ ملي مول، ورقم هيدروجيني pH يساوي ٧ في درجة حرارة ٢ م°. وقد تم خلط ببتيد 4 و5 بنسبة 1:1 لتركيز ببتيد كلي، يساوي ٦ ملي مول. (أ) طيف ال CD الكامل حتى ١٨٠ نانومتر. (ب) منظر موسع للمنطقة الحرجة القريبة من ٢٢٥ نانومتر.

ولدراسة التركيب النانوي لنظام الببتيد المختلط هذا، استخدمنا المجهر الإلكتروني النفاذ سالب الصبغة negative-stain TEM. وإذا كان افتراضنا بخصوص تجميع هذه الببتيدات، كما هو ملخص في المخطط رقم ٤.٣ دقيقاً، فإننا نتوقع إيجاد مادة ليفية، وهي نتيجة البلمرة فوق الجزيئية. وتكشف الصورة الملتقطة بتكبير ٥٠ مرة عن تركيب ليفي بأطوال تتجاوز ١٠٠ نانومتر (انظر الشكل رقم ٤.٨). وعلى افتراض أن التجميع اللولبي الثلاثي يشبه الكولاجين، فإن هذا يُشير إلى أطوال تتجاوز ٣٠٠ حمض أميني. ومع ذلك، فقطر هذه الألياف أكبر من المتوقع ١.٥ نانومتر للولب الثلاثي، ومن المحتمل أن يكون مثل لولب ثلاثي ممتد على المستوى الثاني لحدوث التجميع الذاتي؛ مما يؤدي إلى حزم لوالب ثلاثية في تراكيب فائقة شبه ليفية fibril-like. وعلى أية حال، فبدون تحليل أكثر تفصيلاً، فإنه لم يكن من الممكن تأكيد هذه النظرية إلى الآن.



الشكل رقم (٤.٨). صورة مجهر إلكتروني نفاذ مصبوغة سلبياً لخليط من الببتيد 4 و 5. وتبين هذه الصورة ما يبدو ليكون تشكيلة لألياف نانوية بطول تقريباً ١٠٠ نانومتر، وبقطر ١٠ نانومتر.

٤,١١ الخلاصة Conclusion

إن المصفوفة خارج الخلية بيئة غنية ومعقدة. وتبقى محاكاة التركيب النانوي ووظيفته تحدياً كبيراً، على الرغم من القدر الكبير من المعرفة فيما يتعلق بمكوناتها الرئيس، الكولاجين. ومعظم التحدي في إعادة إنتاج الكولاجين، سيكون في كشف كيف يتم التحكم في مستويات أعلى من التجميع - ليف وليف. ومن المرجح أن يكون هذا الفهم مكتسباً، ليس من دراسات الببتيد الصغير، ولكن مع الأنظمة الأكبر. ونأمل أن يكون عملنا سيساعد على توفير الوصول إلى آلية التجميع الليفى والليفى، وفي النهاية إلى المواد المشيدة، التي يمكن أن تُستخدم في أساليب أو طرائق هندسة الأنسجة المتطورة.

الاختصارات Abbreviation

تم استخدام رموز الحرف الواحد والثالث عادة، لاختصارات الحمض الأميني.

CD - circular dichroism spectroscopy	مطيافية ازدواج اللون الدائري
CTV – cyclotrimeratrylene	سيكلوتراي فيراتريلين
DNA – deoxyribonucleic acid	الحمض النووي DNA
DQF-COSY – double quantum-filtered correlation spectroscopy	مطيافية الارتباط مرشحة الكم مزدوجة
ECM – extracellular matrix	مصفوفة خارج الخلية
FMOC – 9-fluorenylmethoxycarbonyl	٩-فلوورينيل ميثوكسي كربونيل
fProR – 4(R)-fluoroproline	٤-(R)-فلوروبرولين
fProS – 4(S)-fluoroproline	٤-(S)-فلوروبرولين
HA – hydroxyapatite	فوسفات الكالسيوم المائي، هيدروكسي أباتيت،
KTA – Kemp triacid	حمض ثلاثي كيمب

Nleu – isobutylglycine	أيزوبيتل جليسين
NMR – nuclear magnetic resonance	رنين نووي مغناطيسي
NOE – nuclear Overhauser effect	تأثير أوفرهاوشر النووي
PC12 – pheochromocytoma cells	خلايا ورم القواتم
PGA – poly-glycolic acid	حمض بولي الجليكوليك
PLA – poly-lactic acid	حمض بولي اللاكتيك
suc – succinic acid	حمض السكسينيك
TE – tissue engineering	هندسة الأنسجة
TEM – transmission electron microscopy	مجهر إلكتروني نفاذ
TOCSY – total correlation spectroscopy	مطيافية الارتباط الكلية
TREN – tris(2-aminoethyl)amine	ثلاثي (٢-أمينوإيثيل) أمين

المراجع References

- 1 K. Y. Lee, D. J. Mooney, Hydrogels for tissue engineering, Chem. Rev. 2001, 101, 1869.
- 2 F. A. Auger, M. Rouabhia, F. Goulet, F. Berthod, V. Moulin, L. Germain, Tissue engineering human skin substitutes developed from collagen-populated hydrated gels: clinical and fundamental applications, Med. Biol. Engin. Comput. 1998, 36, 801.
- 3 P. M. Kaufmann, S. Heimrath, B. S. Kim, D. J. Mooney, Highly porous polymer matrices as a three-dimensional culture system for hepatocytes, Cell Transplant. 1997, 6, 463; D. Seliktar, R. A. Black, R. P. Vito, R. M. Nerem, Dynamic mechanical conditioning of collagen-gel blood vessel constructs induces remodeling in vitro, Ann. Biomed. Eng. 2000, 28, 351.
- 4 K. E. Kadler, D. F. Holmes, J. A. Trotter, J. A. Chapman, Collagen fibril formation, Biochem. J. 1996, 316, 1.
- 5 A. Rich, F. H. C. Crick, The molecular structure of collagen, J. Mol. Biol. 1961, 3, 483.
- 6 G. N. Ramachandran, Treatise on Collagen, Academic, New York, 1964.
- 7 P. M. Cowan, S. McGavin, The structure of poly-L-proline, Nature 1955, 176, 501.

- 8 J. Bella, M. Eaton, B. Brodsky, H. M. Berman, Crystal and molecular structure of a collagenlike peptide at 1.9Å resolution, *Science* 1994, 266, 75.
- 9 N. Sreerama, R. W. Woody, in *Circular dichroism: principles and applications*, 2nd ed. (Eds.: N. Berova, K. Nakanishi, R. W. Woody), John Wiley & Sons, Inc., New York, 2000, pp. 601.
- 10 M. G. Venugopal, J. A. M. Ramshaw, E. Braswell, D. Zhu, B. Brodsky, Electrostatic interactions in collagen-like triple-helical peptides, *Biochemistry* 1994, 33, 7948; F. R. r. Brown, J. P. Carver, E. R. Blout, Low temperature circular dichroism of poly (glycyl-L-prolyl-L-alanine), *J. Mol. Biol.* 1969, 39, 307.
- 11 D. D. Jenness, C. Sprecher, W. C. J. Johnson, Circular dichroism of collagen, gelatin, and poly(proline) II in the vacuum ultraviolet, *Biopolymers* 1976, 15, 513.
- 12 A. A. Adzhubei, M. J. E. Sternberg, Left handed polyproline II helices commonly occur in globular proteins, *J. Mol. Biol.* 1993, 229, 472; D. J. Russell, G. Pearce, C. A. Ryan, J. D. Satterlee, Proton NMR assignments of systemic, *J. Protein Chem.* 1992, 11, 265.
- 13 B. Brodsky, M. Li, C. G. Long, J. Apigo, J. Baum, NMR and CD studies of triple-helical peptides, *Biopolymers* 1992, 32, 447.
- 14 M. Li, P. Fan, B. Brodsky, J. Baum, Two dimensional NMR assignments and conformation of (Pro-Hyp-Gly)₁₀ and a designed collagen triple-helical peptide, *Biochemistry* 1993, 32, 7377.
- 15 J. Baum, B. Brodsky, Real-time NMR investigations of triple-helix folding and collagen folding diseases, *Folding Des.* 1997, 2, R53; K. H. Mayo, NMR and x-ray studies of collagen model peptides, *Biopolymers (Pept. Sci.)* 1996, 40, 359; C. G. Long, M. H. Li, J. Baum, B. Brodsky, Nuclear magnetic resonance and circular dichroism studies of a triple-helical peptide with a glycine substitution, *J. Mol. Biol.* 1992, 225, 1.
- 16 J. F. Brandts, H. R. Halvorson, M. Brennan, Consideration of the possibility that the slow step in protein denaturation reactions is due to cis-trans isomerism of proline residues, *Biochemistry* 1975, 14, 4953; T. E. Creighton, Possible implications of many proline residues for the kinetics of protein unfolding and refolding, *J. Mol. Biol.* 1978, 125, 401.
- 17 J. Engel, D. J. Prockop, The zipper-like folding of collagen triple helices and the effects of mutations that disrupt the zipper, *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 1991, 20, 137.
- 18 P. Bruckner, E. Eikenberry, Procollagen is more stable in cellulo than in vitro, *Eur. J. Biochem.* 1984, 140, 397; H. P. Bachinger, P. Bruckner, R. Timpl, D. J. Prockop, J. Engel, Folding mechanism of the triple helix in type-III collagen and type-III pN-collagen. Role of disulfide bridges and peptide bond isomerization, *Eur. J. Biochem.* 1980, 106, 619.
- 19 Y. Xu, M. Bhate, B. Brodsky, Characterization of the nucleation step and folding of a collagen triple-helix peptide, *Biochemistry* 2002, 41, 8143.
- 20 W. Yang, M. L. Battineni, B. Brodsky, Amino acid sequence environment modulates the disruption by osteogenesis imperfecta glycine substitutions in

- collagen-like peptides, *Biochemistry* 1997, 36, 6930; X. Liu, S. Kim, Q.-H. Dai, B. Brodsky, J. Baum, Nuclear magnetic resonance shows asymmetric loss of triple helix in peptides modeling a collagen mutation in brittle bone disease, *Biochemistry* 1998, 37, 15528.
- 21 S. Boudko, S. Frank, R. A. Kammerer, J. Stetefeld, T. Schulthess, R. Landwehr, A. Lustig, H. P. Bachinger, J. Engel, Nucleation and propagation of the collagen triple helix in single-chain and trimerized peptides: translation from third to first order kinetics, *J. Mol. Biol.* 2002, 317, 459.
 - 22 E. Durr, H. R. Bosshard, Folding of a threestranded coiled coil, *Protein Sci.* 2000, 9, 1410; D. Porschke, M. Eigen, Co-operative nonenzymic base recognition. 3. Kinetics of the helix-coil transition of the oligoribouridylic-oligoriboadenylic acid system and of aligoriboadenylic acid alone at acidic pH, *J. Mol. Biol.* 1971, 62, 361.
 - 23 D. J. S. Hulmes, A. Miller, D. A. D. Parry, K. A. Piez, Analysis of the primary structure of collagen for the origins of molecular packing, *J. Mol. Biol.* 1973, 79, 137.
 - 24 C. G. Long, E. Braswell, D. Zhu, J. Apigo, J. Baum, B. Brodsky, Characterization of collagen-like peptides containing interruptions in the repeating Gly-X-Y sequence, *Biochemistry* 1993, 32, 11688.
 - 25 A. V. Persikov, J. A. M. Ramshaw, B. Brodsky, Collagen model peptides: sequence dependence of triple-helix stability, *Biopolymers* 2000, 55, 436.
 - 26 A. V. Persikov, J. A. M. Ramshaw, A. Kirkpatrick, B. Brodsky, Amino acid propensities for the collagen triple-helix, *Biochemistry* 2000, 39, 14960.
 - 27 J. Engel, D. J. Prockop, Does bound water contribute to the stability of collagen? *Matrix Biol.* 1998, 17, 679.
 - 28 J. Bella, B. Brodsky, H. M. Berman, Hydration structure of a collagen peptide, *Structure* 1995, 3, 893.
 - 29 R. Berisio, L. Vitagliano, L. Mazzarella, A. Zagari, Crystal structure of a collagen-like polypeptide with repeating sequence Pro-Hyp-Gly at 1.4Å resolution: implications for collagen hydration, *Biopolymers* 2000, 56, 8.
 - 30 S. K. Holmgren, K. M. Taylor, L. E. Bretscher, R. T. Raines, Code for collagen's stability deciphered, *Nature* 1998, 392, 666.
 - 31 R. Importa, F. Mele, O. Crescenzi, C. Benzi, V. Barone, Understanding the role of stereoelectronic effects in determining collagen stability. 2. A quantum mechanical/molecular mechanical study of (proline-prolineglycine) n polypeptides, *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 7857.
 - 32 R. Importa, C. Benzi, V. Barone, Understanding the role of stereoelectronic effects in determining collagen stability. 1. A quantum mechanical study of proline, hydroxyproline, and fluoroproline dipeptide analogues in aqueous solution, *J. Am. Chem. Soc.* 2001, 123, 12568.
 - 33 M. Doi, Y. Nishi, S. Uchiyama, Y. Nishiuchi, T. Nakazawa, T. Ohkubo, Y. Kobayashi, Characterization of collagen model peptides containing 4-fluoroproline; (4(S)-fluoroproline-Pro-Gly)₁₀ forms a triple helix, but (4(R)-fluoroproline-Pro-Gly)₁₀ does not, *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 9922; J. A.

- Hodges, R. T. Raines, Stereoelectronic effects on collagen stability: the dichotomy of 4-fluoroproline diastereomers, *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 9262.
- 34 H. P. Germann, E. Heidemann, A synthetic model of collagen: an experimental investigation of the triple-helix stability, *Biopolymers* 1988, 27, 157.
- 35 Y. Feng, G. Melacini, J. P. Taulane, M. Goodman, Acetyl-terminated and template-assembled collagen-based polypeptides composed of Gly-Pro-Hyp sequences. 2. Synthesis and conformational analysis by circular dichroism, ultraviolet absorbance, and optical rotation, *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118, 10351.
- 36 D. S. Kemp, K. S. Petrakis, Synthesis and conformational analysis of *cis,cis*-1,3,5-trimethylcyclohexane-1,3,5-tricarboxylic acid, *J. Org. Chem.* 1981, 46, 5140.
- 37 E. T. Rump, T. S. Dirk, D. T. S. Rijkers, H. W. Hilbers, P. G. De Groot, R. M. J. Liskamp, Cyclotriveratrylene (CTV) as a new chiral triacid scaffold capable of inducing triple helix formation of collagen peptides containing either a native sequence or Pro-Hyp-Gly repeats, *Chem. Eur. J.* 2002, 8, 4613.
- 38 J. Kwak, A. De Capua, E. Locardi, M. Goodman, TREN (tris(2-aminoethyl) amine): an effective scaffold for the assembly of triple-helical collagen mimetic structures, *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 14085.
- 39 Y.-C. Yu, P. Berndt, M. Tirrell, G. B. Fields, Self-assembling amphiphiles for construction of protein molecular architecture, *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118, 12515.
- 40 T. Gore, Y. Dori, Y. Talmon, M. Tirrell, H. Bianco-Peled, Self-assembly of model collagen peptide amphiphiles, *Langmuir* 2001, 17, 5352.
- 41 H. Shin, S. Jo, A. G. Mikos, Biomimetic materials for tissue engineering, *Biomaterials* 2003, 24, 4353.
- 42 M. J. Humphries, S. K. Akiyama, A. Komoriya, K. Olden, K. M. Yamada, Identification of an alternatively spliced site in human plasma fibronectin that mediates cell type-specific adhesion, *J. Cell Biol.* 1986, 103, 2637.
- 43 W. Dai, J. Belt, W. M. Saltzman, Cell-binding peptides conjugated to poly(ethylene glycol) promote neural cell aggregation, *Bio/Technology* 1994, 12, 797.
- 44 J. A. Hubbell, S. P. Massia, N. P. Desai, P. D. Drumheller, Endothelial cell-selective materials for tissue engineering in the vascular graft via a new receptor, *Biotechnology* 1991, 9, 568.
- 45 J. P. Ranieri, R. Bellamkonda, E. J. Bekos, J. T. G. Vargo, J. A. G. Aebischer, Neuronal cell attachment to fluorinated ethylene propylene films with covalently immobilized laminin oligopeptides YIGSR and IKVAV. II. *J. Biomed. Mater. Res.* 1995, 29, 779.
- 46 J. L. West, J. A. Hubbell, Polymeric biomaterials with degradation sites for proteases involved in cell migration, *Macromolecules* 1999, 32, 241.
- 47 J. D. Hartgerink, E. Beniash, S. I. Stupp, Self-assembly and mineralization of peptideamphiphiles nanofibers, *Science* 2001, 294, 1684; G. A. Silva, C.

- Czeisler, K. L. Niece, E. Beniash, D. A. Harrington, J. A. Kessler, S. I. Stupp, Selective differentiation of neural progenitor cells by high-epitope density nanofibers, *Science* 2004, 303(5662), 1352.
- 48 K. L. Niece, J. D. Hartgerink, J. J. J. M. Donners, S. I. Stupp, Self-assembly combining two bioactive peptide-amphiphile molecules into nanofibers by electrostatic attraction, *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 7146.
- 49 M. D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule, *Nature* 1984, 309, 30.
- 50 S. Weiner, H. D. Wagner, The material bone: structure-mechanical function relations, *Annu. Rev. Mater. Sci.* 1998, 28, 271; W. Traub, T. Arad, S. Weiner, Three-dimensional ordered distribution of crystals in turkey tendon collagen fibers, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1989, 86, 9822.
- 51 M. J. Pandya, G. M. Spooner, M. Sunde, J. R. Thorpe, A. Rodger, D. N. Woolfson, Sticky-end assembly of a designed peptide fiber provides insight into protein fibrillogenesis, *Biochemistry* 2000, 39, 8728.