

## **5-mavzu. Oqsillarning birlamchi tuzilishini aniqlash.**

### **Reja:**

**1.Oqsillarning birlamchi tuzilishini aniqlashda qo'llaniladigan zamonaviy uslublar.**

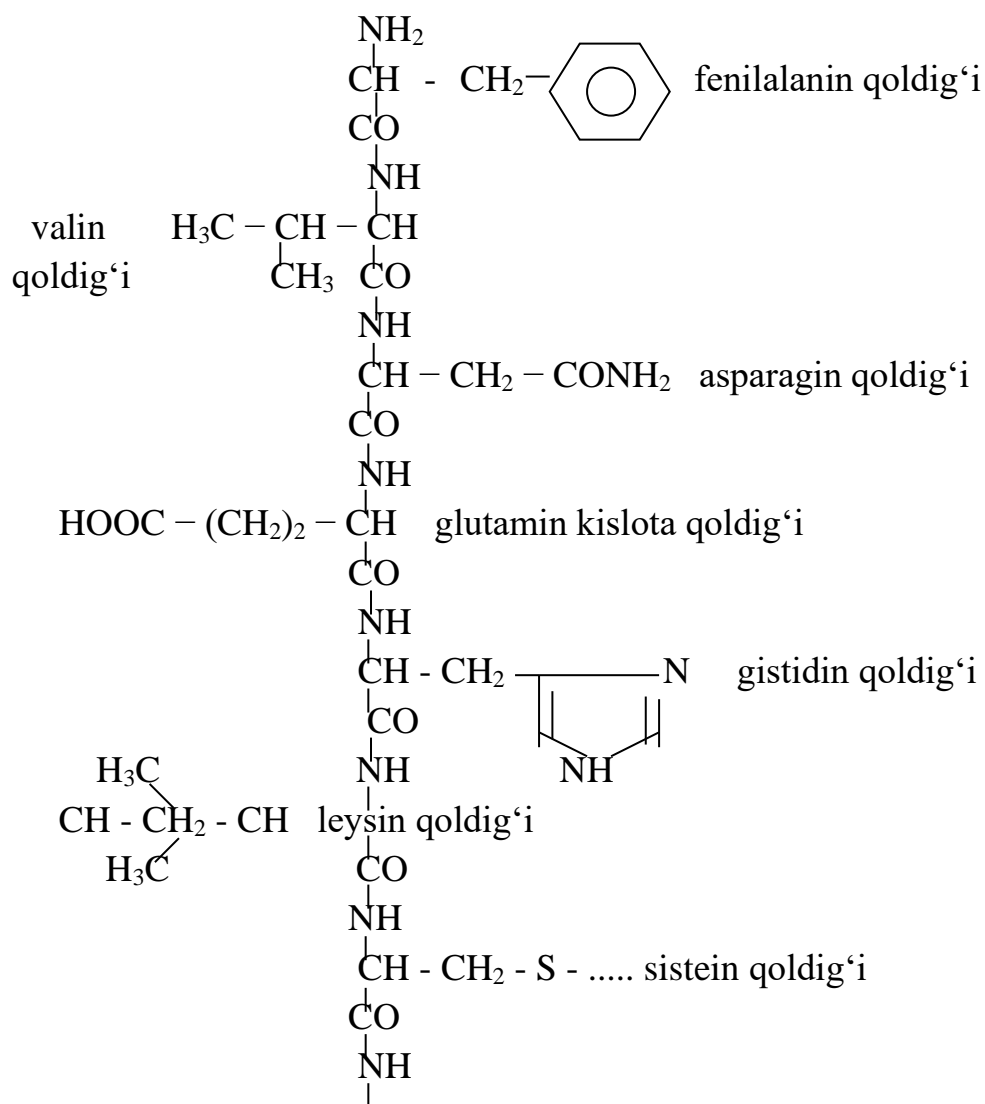
**2.Oqsillar va peptidlarning fazoviy tuzilish darajalari.**

**3.Peptid bog'ining tabiati.**

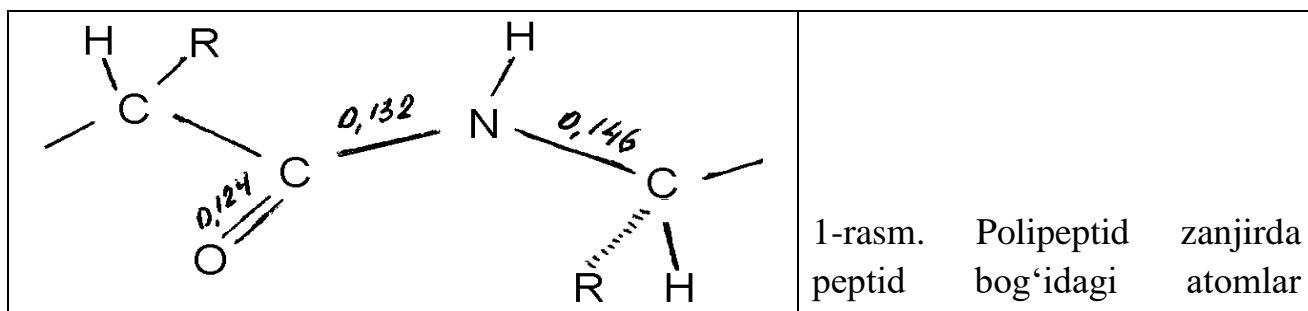
Oqsillar aminokislotalarning o'zaro birikishidan hosil bo'lganligi aniqlangandan so'ng, o'tgan asrning oxiri va XX asrning boshlarida ularning bog'lanish tartibini o'rganish ustida juda ko'p tadqiqotlar o'tkazildi.

Bu sohada birinchilar qatorda mashhur rus olimi A.Y. Danilevskiy XIX asrning 80-yillarida muhim izlanishlar olib borib, oqsil molekulasini polimer tabiatiga ega ekanligini, uning parchalanishi suv biriktirish bilan kelishini takidlagan. Buyuk nemis kimyogari Emil Fisher XX asrning boshlarida (1902 y) oqsil tuzilishining polipeptid nazariyasini ishlab chiqdi. Bu nazariyaga muvofiq, oqsil molekulasini o'nlab, yuzlab aminokislota qoldiqlarining peptid bog' (-CO-NH-) orqali birikishidan hosil bo'lgan yirik polipeptid zanjirdan iboratdir.

Oqsil molekulasini tuzilishining polipeptid nazariyasi birinchi bo'lib laboratoriya sharoitida insulin sintezlanishi bilan uzil-kesil isbotlandi. Hozirgi vaqtda oqsil molekulasini strukturasini asosi bo'lgan polipeptid zanjirining tuzilishi rentgen struktura analizi vositasida to'liq o'rganilgan. Undagi atomlar orasidagi masofa, valent burchaklari RSA ma'lumotlari asosida aniqlangan. Polipeptid zanjirda NH - CO - CH - fragmentlari uning o'zagini hosil qiladi. Aminokislotalar radikali esa polipeptid zanjirining o'zagi hosil bo'lishida hech qanday ishtirok etmaydi. Buni insulin molekulasini bir qismini tuzilishida ko'rish mumkin:



Insulin polipeptid zanjiri bo'lagining tuzilishi ana shunday shaklda bo'ladi. Polipeptid zanjirida - CO - NH bog'lanish alohida xususiyatga ega. Ma'lumki,  $\alpha$  - uglerod atomi bilan azot atomi o'rtasidagi masofa 0,147 nm ni tashkil etadi. Lekin peptid bog'idagi N bilan S o'rtasidagi masofa esa 0,132 nm. Agar bu azot bilan uglerod o'rtasida hosil bo'lishi mumkin bo'lgan qo'shbog' - C = N - bilan solishtirilgan bo'lsa (uzunligi 0,125 nm), u holda bu masofa ancha uzunlik qiladi. Demak, - SO - NH - dagi C - N bog'lanish xarakteri jihatidan yuqoridagi bog'lanishlarni, ya'ni oddiy va qo'shbog' orqali bog'lanishning oraliq shaklini egallaydi (1-rasm).





Shuning uchun oqsilning tuzilishini aniqlashda uning birlamchi strukturasi belgilash asosiy vazifaning butun qiyinchiligini ko‘z oldiga keltirish uchun oqsil atigi 11 ta har xil aminokislotalardan tuzilgan va har bir aminokislota molekulada faqat bir marta uchraydi, deb faraz qilaylik. U holda, molekulada faqat bir marta uchraydigan 11 ta har xil aminokislotalardan nazariy jihatdan 40000000 ta izomer hosil qilish mumkin. Shuncha miqdordagi izomerlarni sintezlash va ularning xossalari tekshirila-yotgan oqsil bilan solishtirishning hech iloji yo‘q. Endi oqsillarda ko‘pincha 20 ta har xil aminokislota bo‘lishi e‘tiborga oladigan bo‘lsak, vujudga kelishi ehtimol bo‘lgan izomerlarning miqdori astronomik raqamlarga yetib qoladi.

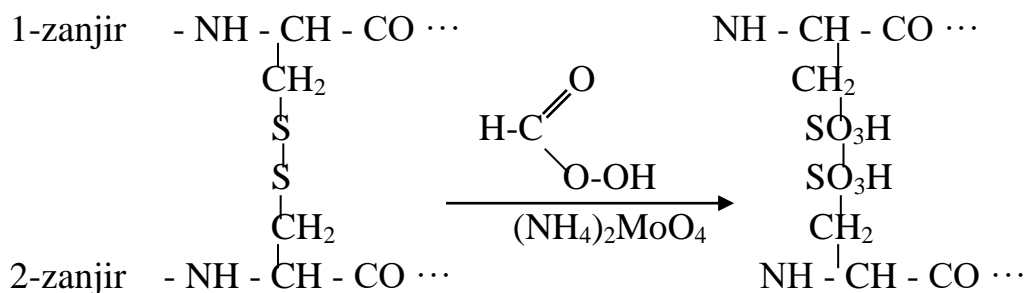
Peptid bog‘dagi aminokislota qoldig‘i	Izomerlari soni
3	6
4	24
5	120
6	720
7	5040
8	40320
9	362780
10	3362780
20	2000000000000000000

Lekin ana shunday juda qiyin vazifani ham hal qilish imkoniyatlari ko‘zga aniq tashlanib qolmoqda.

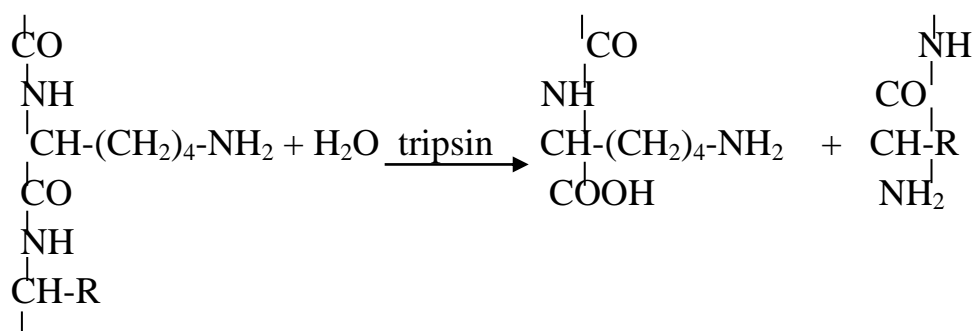
Avvalo oqsil tarkibiga kirgan aminokislotalarning sifat tarkibi va har birining miqdorini aniqlash zarur. Buning uchun oqsil molekulasi to‘liq gidrolizlanadi. Gidrolizdan keyin hosil bo‘lgan aminokislotalar aralashmasining tarkibini belgilash avtomatik tarzda ishlaydigan aminokislotalar aralashmasining tarkibini belgilash avtomatik tarzda ishlaydigan aminokislota analizatorida tez va aniq bajariladi. Lekin oqsilning umumiy aminokislota tarkibidan uning tuzilishi haqida yetarli axborot olinmaydi. Oqsilning tuzilishini aniqlashda uning birlamchi strukturasi, ya’ni aminokislotalar ketma-ketligini belgilash asosiy vazifadir. Birlamchi strukturani o‘rganish quyidagi bosqichlar bo‘yicha bajariladi:

- 1) polipeptid zanjirini ma’lum joylaridan gidroliz qilib, kaltaroq bo‘lakchalar (fragmentlar) ga parchalash;
- 2) olingan bo‘lakchalardagi aminokislotalar tartibini aniqlash;
- 3) aminokislotalar tartibi aniqlan-gan peptid bo‘lakchalarining umumiy zanjirdagi o‘rnini topish.

Polipeptid zanjirini fragmentlarga parchalashdan oldin uning tarkibidagi disulfid bog'lar uzilishi kerak. Buning uchun sistinning -S-S- bog'i ustchumoli kislota NS(O)SOON bilan oksidlanib, -SO<sub>3</sub>H guruhga o'tkaziladi:

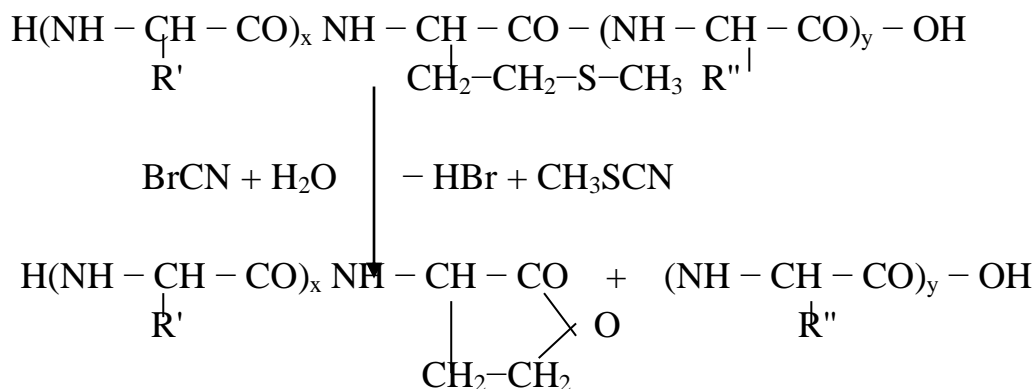


Oqsil tanlab ta'sir etuvchi proteolitik fermentlar (tripsin, ximotripsin) yordamida ham bo'lakchalarga bo'lainadi. Oqsillarni parcha-laydigan bu fragmentlar alohida aminokislotalar hosil qilgan peptid bog'larni tanlab uzish qobiliyatiga ega. Tripsin Liz va Arg, ximotripsin esa aromatik aminokislotalar (Tir, Fen va Tri) ning karboksil gruhlari hosil qilgan peptid bog'larni uzadi:

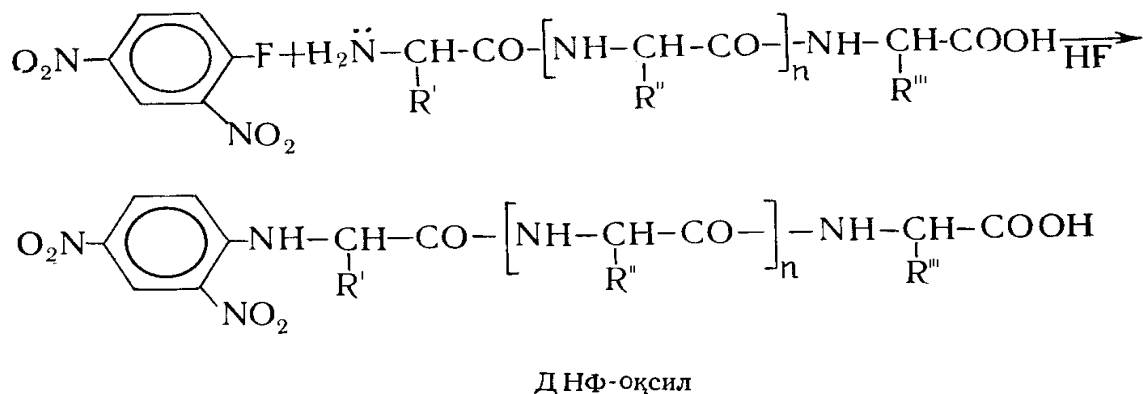


Fermentlar ishtirokida oqsil gidrolizlanib, qator peptidlar hosil bo'ladi. Bu peptidlar bir-biridan yuqori voltli elektroforez va xromotografiyadan foydalanib ajratiladi. So'ngra har bir bir peptid alohida-alohida analiz qilib, undagi aminokislotalar tartibi aniqlanadi.

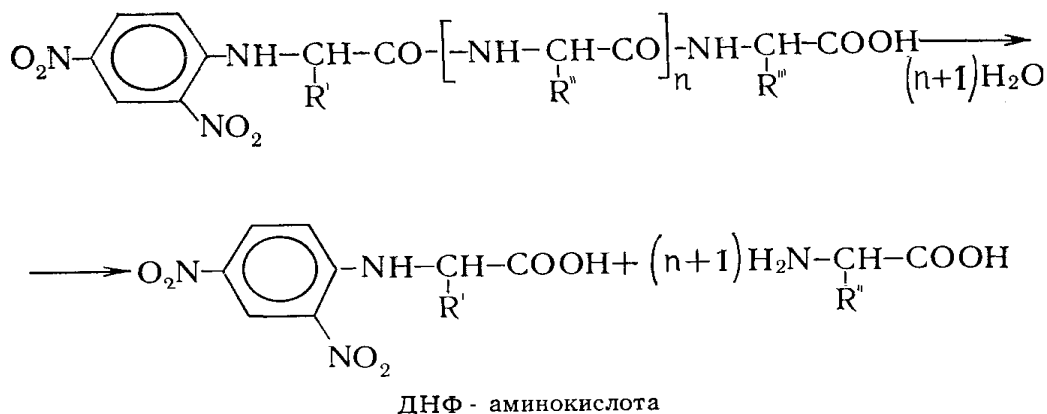
Oqsillarni kimyoviy usullar bilan ham peptidlargacha parchalash mumkin. Masalan, Bromsian yordamida metionin qoldig'i bo'yicha parchalash:



Agar oqsil eritmasi Sanger usuli bo'yicha dinitroftorbenzol bilan (DNFB) ishlansa, dastlab bu reaksiya erkin holdagi amin guruh bilan birikadi:

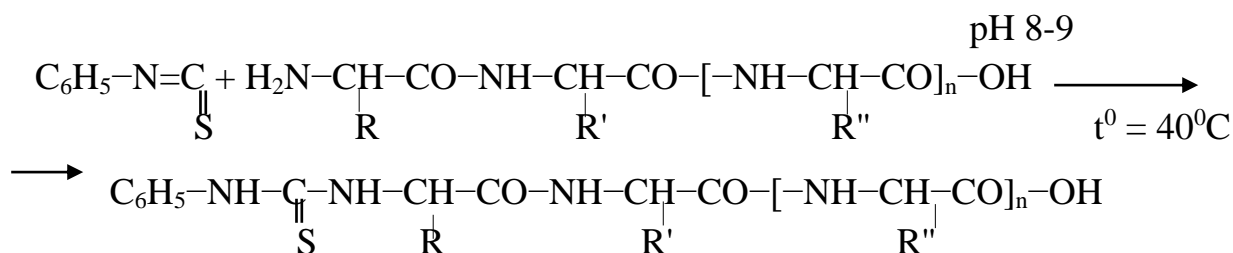


Hosil bo'lgan modda gidrolizlanganda faqat aminokislota qoldig'i dinitrofenolli hosila ko'rinishida ajralib chiqadi, ya'ni:

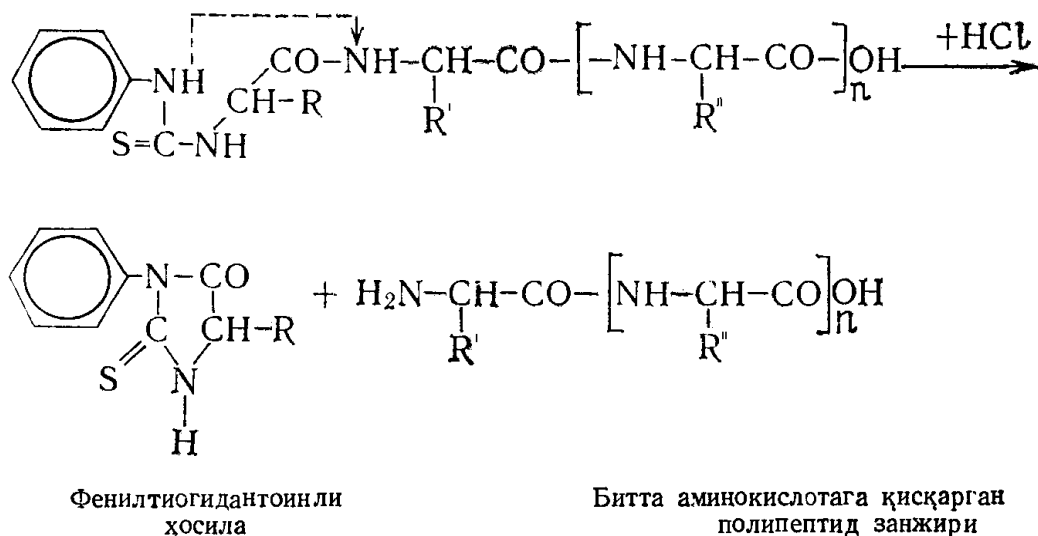


DNF - aminokislota sariq rangli bo'lib, xromatografiya metodi yorda-mida oson aniqlanadi. N - uchidagi aminokislotalarning miqdoriga qarab oqsil molekulasidagi polipeptid zanjirlar soni aniqlanadi. Agar oqsil molekulasidagi N - uchki aminokislota bitta bo'lsa, molekula faqat bitta, ikkita bo'lsa ikkita polipeptid zanjiridan iborat bo'ladi.

N - uchki aminokislotani Edman usuli bo'yicha fenilizotiotsianat yordamida ham aniqlash mumkin. Buning qulayligi shundaki, polipeptid zanjirdan faqat N - uchki aminokislota ajratib olinadi. Zanjirning qol-gan qismi o'zgarmasdan qolaveradi. Demak, jarayonni uzliksiz takrorlab zanjirdagi aminokislotalar qoldig'ini birin-ketin aniqlash mumkin. Bu reaksiya quyidagicha boradi:

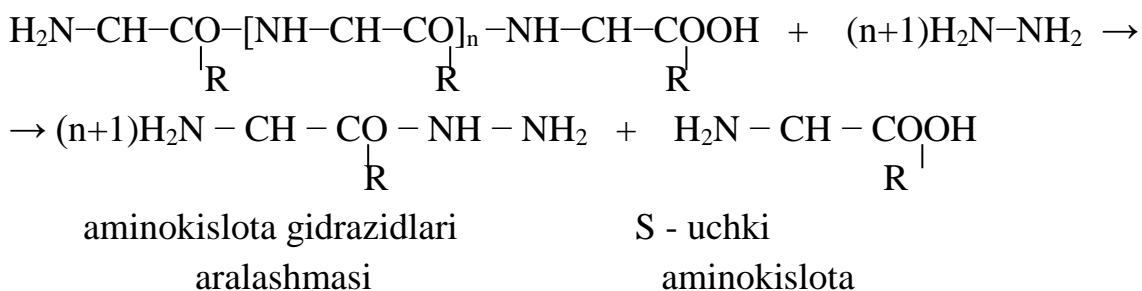


Hosil bo'lgan birikma suvsiz NCI bilan ishlansa, N - uchki kislota-ning ajralishi halqa hosil bo'lishi bilan boradi va feniltiogidantoin hosil bo'ladi. Oqsil molekulasining qolgan qismi erkin holda ajralib chiqadi:

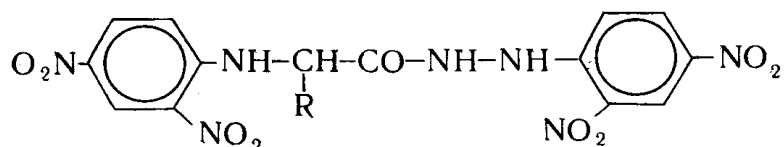
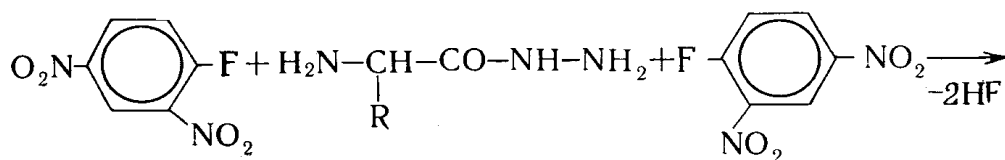


Yaqinda yaratilgan asbob - sekvenator (inglizchadan sequence - ketma - ketlik) ning ishlash prinsipi ana shu reaksiyaga asoslangan. Bu asbob berilgan dastur bo'yicha avtomatik tarzda ishlab, har ikki soatda bitta aminokislota ajratib oladi va tahlil qiladi.

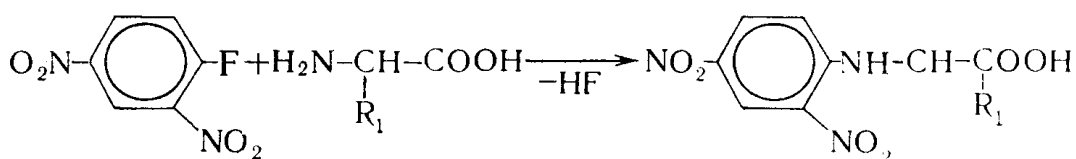
S - uchki aminokislota qoldig'ini aniqlash usullari ham ishlab chiqilgan bo'lib, ular ichida eng oddiy yapon olimi Akabori tomonidan ochilgan **gidrazinoliz** reaksiyasidir:



Bu jarayon tugagandan keyin aralashma DNFB bilan ishlansa, ikki xil mahsulot hosil bo'ladi, ya'ni aminokislotalar gidrazidi ikki molekula DNFB bilan, erkin holdagi S - uchki aminokislota esa uning bir molekula-si bilan birikadi:



Аминокислоталар гидразидларининг ДНФ-ҳосиласи



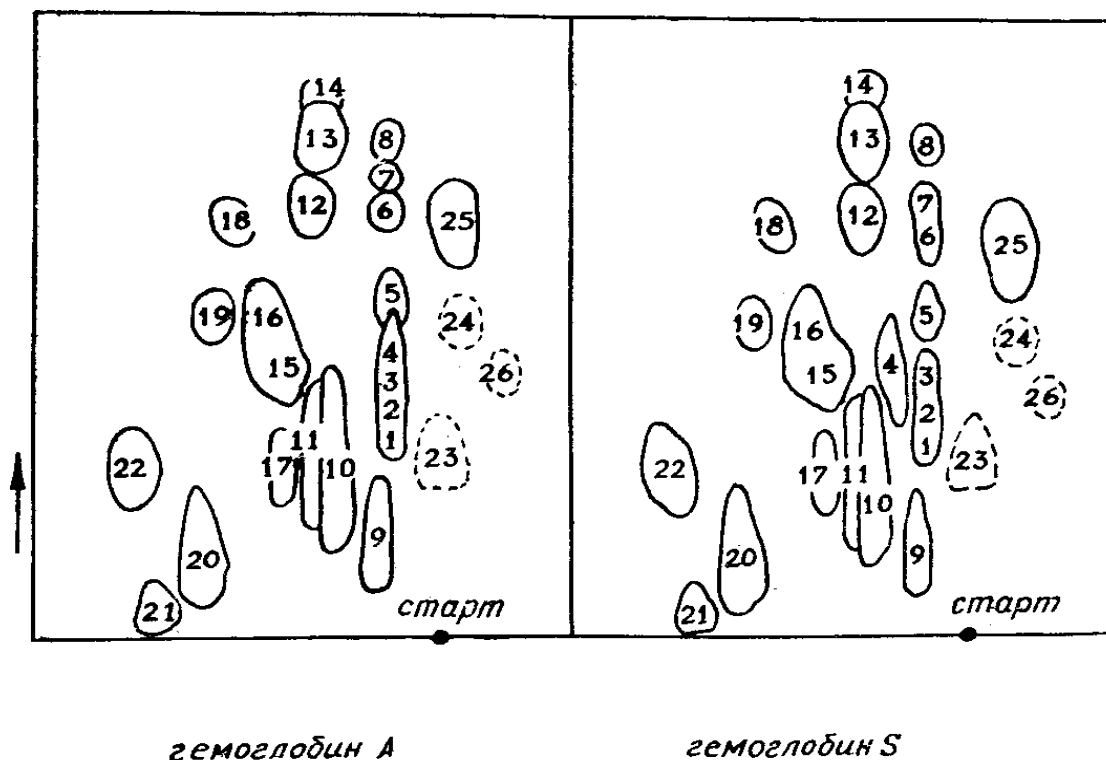
С-учки аминокислота

С-учки ДНФ-аминокислота

DNF - aminokislota gidrazidi DNF - aminokislotadan sirkaetil-efir yordamida ekstraksiya qilib ajratib olinadi. DNF - aminokislota tabiati xromatografiya metodi bilan aniqlanadi.

S - uchki aminokislota karboksipeptidaza fermenti yordamida ham osongina aniqlash mumkin. Agar oqsil shu ferment bilan gidroliz qilinadigan bo'lsa, polipeptid zanjirning S - uchidan birin-ketin amino-kislotalar ajraladi. Ularni har bosqichda alohida ajratib, qaysi aminokislota ekanligini oson aniqlash mumkin. Aminokislotalarning joylashish tartibini aniqlashning karbopeptidaza metodi qiziq. Polipeptid zanjirdan prolin aminokislotasini ajrata olmaganligi uchun, agar oxirgi zvenoda shu aminokislota bo'lsa, bu bosqichda karboksidazaning ta'siri to'xtaydi. Polipeptid zanjiridan turli uzunlikdagi peptidlar aralashmasi ajratilib, alohida tahlil qilinadi. Ular ko'pincha ion almashtirgichli xromatografiya yoki qog'oz xromatografiyasi bilan elektroforezni birlashtirib "Barmoq izlari" metodi bilan aniqlanadi.





"Barmoq izlari" usulida peptid yoki aminokislotalar xromatografik qog'ozda joylashuviga qarab, o'ziga xos barmoqlar iziga o'xshash izlar qoldiradi. 2-rasmda normal gemoglobir (gemoglobin A) va o'roqsimon kamqonlik kasalligini keltirib chiqaruvchi gemoglobin (gemoglobin S) ni tripsin yordamida gidrolizga uchratib olingan peptidlar kartasi -"barmoq izlari" ko'rsatilgan. Unga e'tibor berilsa, har ikki gemoglobin faqat bitta peptid bilan farq qilishini ko'rish mumkin, ya'ni HbS dagi (4) peptid HbA da yo'q. HbA dagi peptid esa, aksincha HbS da yo'q. Bu peptidlar alohida ajratib analiz qilinganda ular aminokislotalar tarkibi bilan bir-biridan farq qilishi aniqlangan. Bu esa muayyan kasallikning kelib chiqishiga sabab bo'ladi.

Oqsilning chala gidrolizi natijasida hosil bo'lgan peptidlar ajratib olingach, ulardagi aminokislotalarning ketma-ket joylashuvi aniqlanadi. So'ngra N- va S - uchki aminokislotalar topib olinib tuzilishi aniqlangach, turli xildagi fermentlar ta'sirida hosil bo'lgan peptidlarning tuzilishini solishtirish bilan tekshiriladigan oqsilning birlamchi tuzilishi tiklanadi.

Hozirgi vaqtda molekulyar massasi turlicha bo'lgan 1000 dan ortiq oqsilning birlamchi strukturasi o'rganilgan. Bundan tashqari, yuzlab oqsil tabiatli peptidlarning birlamchi strukturasi ham aniqlangan.

Oqsillar ichida birinchi bo'lib oshqazon ositi bezi ishlab chiqaradigan garmon-insulinning birlamchi strukturasi 1953 yilda ingliz olimi Senger tomonidan aniqlandi. Bu tarixiy voqea oqsillar biokimyosi va molekulyar biologiyani

shakllanishida muhim qadam bo'ldi. Uning molekulasini ikkita polipeptid zanjirdan iborat bo'lib, A zanjirda 21 ta, B zanjirda 30 ta aminokislota qoldig'i joylashgan. Insulin molekulasining uchlaridagi aminokislotalar o'rganilganda N- uchida 2 ta aminokislota Gli va Fen, S- uchida esa Asp va Ali topilgan. Demak, u ikkita polipeptid zanjirdan tuzilgan ekan. Ma'lumki, bunday zanjirlar disulfid ko'priklari orqali bog'langan bo'ladi.

Insulin molekulasida uchta disulfid bog' bo'lib, ulardan ikkitasi A va V zanjirlar orasida, bittasi A zanjirning ichida, ya'ni A zanjirdagi 6- va 11- sisteinlarni bir-biri bilan bog'langan.

Turli hayvonlar insulinining birlamchi strukturasi farq A va V zanjirlarning ma'lum qismlarida bir aminokislota o'rniga boshqa aminokislota joylashganligidan kelib chiqadi. Bu oqsilning turi spetsifikligiga misoldir. Lekin bunday almashinuvlar ko'p emas, faqat polipeptid zanjirning qisqa bo'lakchasi, ayrim hollarda 1-2 ta aminokislota qoldig'i bilan farq qilishi mumkin. Quyida ba'zi organizmlar insulinini strukturasi farq ko'rsatilgan:

Ho'kizda                      ----sis – sis – ala – ser – val – sis

Qo'yda                        ----sis – sis – ala – gli – val – sis

Otda                          ----sis – sis – tre – gli – ley

CHO'chqa va kitda        ----sis – sis – ala – ser – ley

Odanda                      ----sis – sis – tre – ser – ley

Shuningdek, ular B zanjirning S- uchki aminokislota qoldig'i bilan ham farq qilishi mumkin. Masalan, odam insulinida bu o'rinni treonin, quyonda serin egallaydi. Lekin ko'pchilik hayvonlarda alanin joylashgan.

Sengerning birinchi kashfiyotidan keyin tezda boshqa oqsillarning birlamchi strukturasi keng miqyosida o'rganila boshlandi. Qisqa vaqt ichida bir qator muhim oqsillar - ribonukleaza fermenti, kislorod bog'lovchi, temir saqlagan oqsillar mioglobin, gemoglobinlar, sitoxromlar tuzilishi aniqlandi. 2-jadvalda ribonukleazadagi aminokislotalar tartibi keltirilgan. Merrifield sintez qilgan 124 ta aminokislotalardan tuzilgan ribonukleazadagi aminokislotalar tuzilgan ribonukleaza fermenti tabiiy ribonukleaza kabi aktiv bo'lib chiqdi. Bu dalil tabiiy fermentga xos barcha xususiyatlar sintez qilingan polipeptidning strukturasi mujassamlashtirilganligini tasdiqlaydi.

### **Oqsillarning birlamchi tuzilishi bilan ular funksiyalari orasidagi bog'liqlik**

Oqsil molekularining birlamchi strukturasi o'rganish eng muhim qonuniyatlardan birini, ya'ni ularning molekulasini istalgan tartibdagi aminokislotalar kombinatsiyasidan hosil bo'ladimi yoki polipeptid zanjirda aminokislotalar tartibi ma'lum qonuniyat asosida tarkib topadimi degan masalani

aniqlashga imkon beradi. Bu haqdaga tekshirishlar peptidlar bo'lakchasida struktura bir xilligi va o'xshashlik mavjud ekanligini ko'rsatadi (3-jadval).

3 - жадвал

Инсулин ва рибонуклеазанинг структура жиҳатдан ўхшашлиги

Пептидларнинг хили	Инсулин		Рибонуклеаза
	А занжир	Б занжир	
Бир хиллик асосида ташкил топган три ва тетрапептидлар	ала-сер-вал 8 9 10		ала-сер-вал 122 123 124
	вал-цис-сер 10 11 12		вал-цис-сер 57 55 59
Ўхшашлик принципида ташкил топган три- тетра ва пентапептидлар	асн-тир-цис-асн 18 19 20 21	вал-глу-ала 12 13 14	вал-гln-ала 54 55 56
	<u>глу</u> -гln-цис 4 5 6		асн-тир-цис-асн 24 25 26 27
			<u>асн</u> -гln-цис 70 71 72
		вал-цис- <u>гли</u> 18 19 20	вал-цис- <u>сер</u> 57 58 59
		глу-ала- <u>лей</u> 13 14 15	гln-ала- <u>вал</u> 55 56 57
		<u>глу</u> -ала-лей 13 14 15	<u>асн</u> -ала-лей 53 52 51
		гln-гис- <u>лей</u> 4 5 6	глу-гис- <u>вал</u> 49 48 47
	глу-асп-тир-цис- <u>асн</u> 17 18 19 20 21		асп-гln-цис-тир- <u>гln</u> 70 71 72 73 74
		вал-цис- <u>гли</u> -глу 18 19 20 21	вал-цис- <u>сер</u> -гln 57 58 59 60

Э с л а т м а :  $\boxed{\phantom{00}}$  — структураси жиҳатдан б.р. бирига алмашина оладиган аминокислоталар.

Jadval ma'lumotlaridan ko'rinyaptiki, insulin va ribonukleaza zanjirlarining ba'zi bo'laklarida aminokislota qoldiqlari aynan bir xil bo'ladi. (Struktura bir xilligi prinsipi). Struktura o'xshashligida esa tuzilishi o'zaro yaqin bo'lgan aminokislotalar ayni fragmentda bir-birini almashtirib kelishi mumkin.

Oqsillar birlamchi strukturasi aniqlanishi biologiya va tibbiyot uchun juda katta ahamiyatga ega bo'ladi. Birinchidan, hayvonlar va o'simliklar oqsilining birlamchi strukturasi ularning turiga xos bo'lib, doim aniq tartibda sintez qilinishi aniqlandi. Ikkinchidan, oqsillar molekulasida bironta aminokislotaning almashinib qolishi organizm hayotida muhim rol o'ynashi, ayrim hollarda og'ir oqibatlariga olib kelishi ma'lum bo'ldi. Masalan, yaqin vaqtlargacha o'roqsimon hujayrali

anemiya (kamqonlik kasalligi) ning aniq sababi hakimlarga noma'lum edi. Buning ustiga bu kasallik avloddan-avlodga berilib, ko'pincha o'lim bilan yakunlanardi. Ma'lum bo'lishicha, bu kasallikka chalingan odamlar qonining eritrotsiti yumaloq shaklda bo'lmay, o'roqsimon yoki yarim oy shaklida bo'lib, kislorodni to'qimalarga zarur miqdorda yetkaza olmaydi. Eritromitsitlar tarkibidagi oqsil-gemoglobinining birlamchi strukturasi aniqlanishi bilan buning haqiqiy sababi ochildi. Odam gemoglobinining 4 ta ( $2\alpha$  va  $2\beta$ ) polipeptid zanjirdan iborat bo'lib, ular 574 ta ( $2\alpha$  -141x2,  $2\beta$  - 146x2) aminokislota qoldig'idan tashkil topgan. Shu kasallikka duchor bo'lgan odam gemoglobini (HbS) dan gemoglobini (HbA) dan faqat bitta aminokislota qoldig'i bilan farq qiladi, ya'ni:

1      2      3      4      5      6      7      8

Gemoglobin A – val – gis – ley – tre – pro – glu – glu – liz....

( $\beta$  - zanjir)

1      2      3      4      5      6      7      8

Gemoglobin S – val – gis – ley – tre – pro – val – glu – liz....

( $\beta$  - zanjir)

Xuddi ana shu 6-o'rindagi ikki asosli aminokislota-glutamin qoldig'i neytral aminokislota- valinga almashinib qolishi yumaloq eritrotsitlar o'roqsimon shaklga o'tib qolishiga sabab bo'ladi. Hozirgi vaqtda gemoglobin molekulasiga bog'liq bo'lgan 100 dan ortiq irsiy kasallikning hammasining sababi xuddi ana shunday aniqlangan, shu sababli ular molekulyar kasallik deb ataladi.

### **Tayanch iboralar**

Birlamchi struktura, peptid bog', keto-yenol tautomeriya, aminokislotalar tartibini aniqlash, oqsillarni kimyoviy usulda parchalash, fermentativ usullar, N – va S – uchki aminokislotalar, insulin, ribonukleaza.

### **Nazorat savollar**

1. Oqsillar va peptidlarning fazoviy tuzilish darajalarini tushuntiring.
2. Peptid bog'ining tabiati darajalarini tushuntiring.
3. Oqsillarning yuqori tuzilish darajalarini tadqiq qilish qilishda qo'llaniladigan spektroskopik usullari darajalarini tushuntiring.