

مقاومة المضاد الحيوي بواسطة تبديل أو تعديل هدف المضاد الحيوي ANTIBIOTIC RESISTANCE BY REPLACEMENT OR MODIFICATION OF THE ANTIBIOTIC TARGET

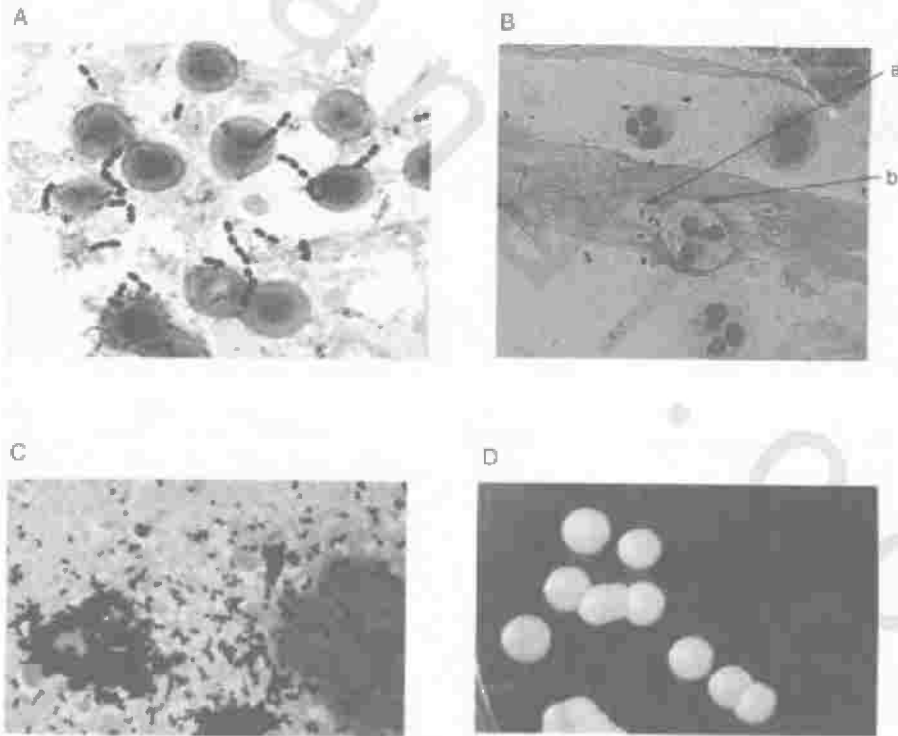
الطرق الثلاث الأخيرة التي تؤدي إلى المقاومة السريية المهمة في البكتيريا الممرضة هي قدرة الممرضات المقاومة- للدواء على تعديل الدواء المستهدف إلى عدم الحساسية في حين المحافظة على وظيفته الخلوية الرئيسية. الصورة في مقدمة الفصل هي عصف من القسم للشكل (٢،٢) التي يشرح المبادئ لمقاومة المضاد الحيوي التي تنشأ من تبديل أو تعديل الهدف إلى الشكل غير الحساس.

وبالإمكان تحقيق ذلك بواسطة الطفرة عند واحد أو أكثر من المواقع في الجين المستهدف أو بواسطة استيراد الجين التي يخصص إنزيم تبديل جديد الذي يملك حساسية منخفضة واضحة للدواء. تمثل مقاومة البيتالكتام في سلالات المكورة العقدية الرئوية والمكورة العنقودية الذهبية الموجبة -لغرام هذين الاختلافيين في الموضوع. ولكل من الإريثروميسين من عائلة الميكروليبيدات وعائلة ستربتوجرامين B انجذاب ناقص في الاستجابة مثيلة (methylation) أدنين واحد في 23S rRNA في الوحدة الفرعية الريبوسومية 50S. وأخيراً سوف نلاحظ بأن إعادة برمجة جدار الخلية في مقاومة المكورة المعوية المقاومة -للفانكوميسين الأنماط الظاهرية (VRE)، A,B و C. الرسومات البيانية الدقيقة للمكورة العنقودية الذهبية، المكورة العقدية الرئوية والمكورة المعوية البرازية تظهر في الشكل (١٠،١).

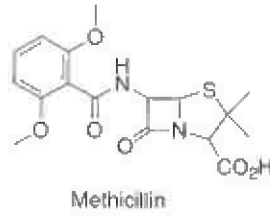
مقاومة المشيلين في المكورة العنقودية الذهبية

أدخل المشيلين (الشكل ١٠،٢)، مع ٢،٥ -دايميثوكسي بنزويل (2,5-dimethoxybenzoyl) الضخم المستبدل على هيكل ٦- أمينونيسيلين (6-aminopenicillin)، في ١٩٥٠م لمعالجة العدوى البكتيرية الموجبة -لغرام التي أصبحت مقاومة للنيسيلين بواسطة التحلل المائي للبيتالكتاماز المحرض للمضاد الحيوي. والسلسلة الجانبية الضخمة المستبدلة في وسيط إنزيم بنسيلويل -O- لكتاميزأسيل (pencilloyl-O-lactamase acyl) يبطئ انتقائياً خطوة نزع الأسيل الحالة المائية (deacylation hydrolytic step) (انظر الفصل الثامن) ويطيل العمر الزمني لإنزيم أسيل التساهمي، ويطول نشاط البيتا لكتاميز بشكل فعال أثناء تلك الفترة. وكانت هذه الإستراتيجية فعالة لعشر سنوات قبل تطوّر

فاشيات المكورة العنقودية الذهبية المقاومة للمثسيلين (MRSA) في أوروبا في ١٩٦١م، وبحلول الثمانينيات كانت MRSA قد انتشرت عالمياً. ولا تنتج MRSA نسخة محسنة من بيتالكتاماز التي تعد أكثر فعالية عند مضغ المثسيلين، ولكن على العكس فقد اكتسبت جين *mecA*، الذي يرمز بروتين مرتبط- بالبنسيليّن جديد (PBP)، يسمى PBP2A (وكذلك PBP2')، في أكثر من ٩٠٪ من العزل السريري المقاوم -للدواء (انظر هيرماتسو وآخرون 2001 *et al.*, Hiramatsu). وفي بيئة المستشفى في الولايات المتحدة وقد يصل معدل حدوث (incidence) MRSA إلى ٢٠-٤٠٪، وفي تقرير في اليابان وصل معدل الحدوث إلى حد ٦٠٪ (تشو وآخرون 1996 *Shaw et al.*). وبإمكان MRSA أن تكون سائدة بالأخص في مراكز الحروق، ولكنها توجد أيضاً في دور الرعاية الطويلة الأمد الأخرى. MRSA تواجه مشكلات للمعالجة؛ بسبب أنها مقاومة لجزيئات بيتا لكتام الرئيسة، وتشمل البنسيلينات، كيفالوسبورينات، وبيتيمات. وعدم الحساسية العامة- للبيتالكتام تنسب إلى التجاذب الربط المنخفض لـ PBP2A المرمز بـ *mecA*، 76-kDa ترانسغليكوسيلاز/ بيتيدترانسبيتيداز الثنائي الوظيفة. وعلى النقيض، فال PBP's الطبيعية عالية-الوزن-الجزيئي، PBP1 خلال ٤، ربما تظل حساسة للأسلة بواسطة بيتالكتامات في المكورة العنقودية الذهبية الحساسة للمثسيلين (MSSA).



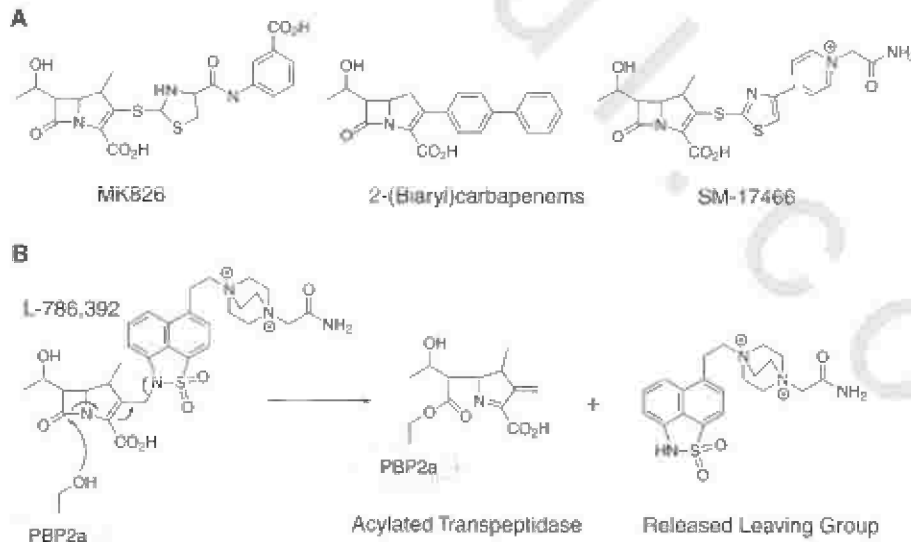
الشكل (١٠،١). المُرَضَات الموجبة-لغرام التي أصبحت مقاومة للدواء بواسطة تغير الدواء: (A) المكورة المعوية البرازية في مزرعة الدم، (B) المكورة العقدية الرئوية المحفوظة (encapsulated)، وتشمل (1) المكورات المزدوجة الموجبة-لغرام المحاطة بمحفظة (2) الكرية البيضاء متعددة الأشكال مفصصة النوى (polymorphonuclear leukocyte) ذات النواة متعددة الفصوص، (C) صبغة غرام لبغيم مريض مصاب بالتهاب رئوي بالمكورة العنقودية الذهبية، (D) مستعمرات المكورة العنقودية "الذهبية" على طبق إيفار الدم. (من إليوت وآخرون ١٩٩٧م)، بالإذن).



الشكل (١٠, ٢). تركيب الميثيسيلين.

الأساس الجزيئي لعدم حساسية PBP2A للاكتامات في حين أنها ما تزال تقوم بوظائف الربط - التبادلي للبيتيدوبتييدوغليكان (PG) ليس واضحاً بعد وربما سيتطلب مقارنة تركيب أشعة-إكس مع PBPs الحساس لنفس الكائن. ومصدر جين *mecA* غير معروف كذلك، على الرغم من افتراض الانتقال الأفقي من بعض أنواع المكورات الأخرى (الفصل السابع). ومن المعروف بأن النمط الظاهري لـ MRSA نشأ من انتقال عنصر دنا المتحرك 30-40 kb مع ثلاثي الجينات *mecR1-mecI-mecA* عند لب النمط الظاهري المحرض - للمثيسيلين. ولاحظنا في الفصل الثامن (الشكل ٨, ١٢) قرب موازاة المنطق لدائرة *blaR1-blaI-blaZ*، وفي تلك الحالة لتحريض البييتالاكتاماز، لدائرة *mecR1-mecI-mecA* للنمط الظاهري لـ MRSA (بواسطة الشلال المنشط ذا المكونات -الاثنين من الجين الحال للبروتين) (a proteolytic two-component gene activating cascade). ويعدُّ بروتين MecR1 68-kDa مستشعر/ محول طاقي (transducer) عبر الغشاء، مع الحقل الخارجي إكسو PBP (exo PBP) كلاسيكي الذي يمكن أسلته بواسطة الميثيسيلين، وهذا الاحتلال التساهمي يحول (transduced) للحقل الداخلي (endo domain)، زنك بروتياز زيموجين (zinc protease) الذي يخضع لتحلل ذاتي للبروتين (autoproteolysis). الجزء MecR1 السيتوبلازمي المنطلق، الذي هو بروتياز فعال الآن، بعد ذلك يفلق الكابت MecI بحيث إنه لا يستطيع أن يتزمر مثنوياً (dimerize) ويرتبط بال دنا. يرتاح كبح الانتساخ لجين *mecA* ويصنع بروتين PBP2A، وينقل لسطح الخلية ويوظف غير متلف للربط -التساهمي للبيتيدوغليكان في وجود الميثيسيلين الخارج الخلية وغيره من مضادات اللاكتام الحيوية. ومورفولوجي (علم التشكل) بيتيدوغليكان الذي تم تصنيعه بواسطة PBP2A في غياب PBPs الوظيفية الأخرى يتغير بعض الشيء ولكنه كاف بشكل واضح ليسمح بنمو MRSA. وتوجد جينات مساعدة في MRSA، جينات *fem* التي تضيف جسر غليسيل الخماسي (pentaglycyl) العابرة إلى خيوط بيتيدوغليكان قبل الربط - العبري، الذي سوف يساهم في النمط الظاهري (بيرجر-باتشي و تششيرسكي 1998، Berger-Bachi and Tschierske، فيليب وآخرون 2000، Filipe et al، تشولار وبرات 2000، Scholar and Pratt). ولقد تم تقدير عدد جزيئات PBP خلية MSSA ونفس الخلية التي تحولت إلى النمط الظاهري لـ MRSA مع *mec* DNA (بوسي ودوجيرتي 2002، Pucci and Dougherty). وخلية MSSA حوالي ١,١٠٠ نسخة من PBPs (PBP1-4) ويبلغ PBP2 حوالي ٤٥٪ من المجموع. وخلية MRSA حوالي ١,٩٠٠ إلى ٢,٠٠٠ PBPs لكل خلية، ويشكل PBP2A ٤٠٪ و PBP2 ٢٥٪ من المجموع.

الفعالية الطبية الكيميائية المكثفة لإنتاج اللاكتامات سوف تستهدف PBP2A وتعكس النمط الظاهري MRSA إلى MSSA قد أدت إلى بعض تراكيب اللاكتام الجديدة ذات الفعالية الواعدة. الأمثلة في سلسلة الكاربابينيم ظهرت في الشكل (١٠,٣) A، مع بدائل ٢-أريل (2-aryl) أو ٢-كاربولينيل (2-carbolinyl)، إضافة إلى بيتا-ميثيل المستبدل أريل كاربابينيم MK-826 (تشو وآخرون ١٩٩٦، لبي وهيكير Lee and Hecker, 1999). ول MK-826 خواص حركيات دواء (pharmacokinetic) التي تقترح جرعة واحدة يومياً. واحد الكاربابينيم تم تصميمه عند ميرك (Merck) ليكون فعال ضد MRSA بخاضية السلسلة الجانبية ألفة الدهون الكبيرة. ولوحظ أن البدائل الراهبة للماء الكبيرة هذه كانت مستضدية (antigenic) وسببت فرط الحساسية (hypersensitivity)، على حد قول روزين وآخرون 1999، Rosen et al.، إيتكر الكاربابينيم L-786, 392 الذي عند المهاجمة بواسطة الموقع النشط - سيرين لـ PBP2A، يخضع إلى تجزيء كيميائي وطرده سلسلة الجانبية المستضدة للتقليل من المناعة الوراثية (الشكل ١٠,٣) B (روزين وآخرون 1999، Rosen et al.). وبإمكان مثل هذه الجزئيات أن تشبع الحاجة الإكلينيكية الملحة؛ بسبب أن العزل السريري قد اكتسب محددات مقاومة دواء أخرى من الجهود المبذولة لمعالجته بواسطة مختلف المضادات الحيوية. وعلى سبيل المثال، ثلثي العزل السريري لـ MRSA في اليابان في ١٩٩٢م له مقاومة دواء إضافية (تشو وآخرون 1996، Chu et al.). وبإمكان الانتقاء لمقاومة إضافية أن تحدث بسرعة. وبعد الانتشار الواسع لاستعمال الفلوروكوينولون السبروفلوكساسين لمعالجة عداوى MRSA، ارتفع معدل حدوث المقاومة المجتمعة لـ MRSA والكوينولون من ٥٪ إلى > ٨٥٪ في خلال سنة.



الشكل (١٠,٣). الكاربابينيمات ذات الفعالية ضد MRSA: (A) الجزئيات بدائل أريل السلسلة الجانبية، (B) إطلاق السلسلة الجانبية المولدة المناعة للكاربابينيم L-786,392 على هجوم بيتا لاكتام بواسطة الموقع - النشط سيرين لـ PBP2A.

المكورة العقدية الرئوية المقاومة للبيتا لكتام

تعدُّ المكورة العقدية الرئوية عامل مسبب مهم في الالتهاب الرئوي المكتسب من -المجتمع، التهاب السحايا، التهاب الأذن الوسطى، والتهاب الجيوب. وبخلاف سلالات المكورة العنقودية الذهبية وغيرها العديد من الممرضات، المكورة العقدية الرئوية لا تستخدم بيتا لكتامازات كطريق أساسي لمقاومة البنسيلين. ومن ناحية أخرى، ارتفعت مقاومة البنسيلين ٢٤٠- طية لأكثر من خمسة عقود من ١٩٤١-١٩٩١ م (انظر تشو وآخرون 1996 *Chu et al.*) بسبب تطوُّر المقاومة في الأهداف PBP نفسها. والفاشية الأولية للمكورة العقدية الرئوية في جنوب إفريقيا في ١٩٧٧ م قد انتشرت في معظم أنحاء العالم (تشو وآخرون 1996 *Chu et al.*). ولقد أظهر تحليل بيتيدترانسبيتيدازات / ترانسغليكوسيلازات في المكورة العقدية الرئوية خمسة PBPs ذات الوزن -الجزئي- العالي التي ساهمت في القتل بواسطة البيتا لكتامات: PBP1A, 1B, 2A, 2B and 2X. و PBP3 بالوزن -الجزئي- المنخفض ليس هدف قتل، في حين أن PBP2B و 2X يعتبران أساسيين. وتشمل المقاومة -منخفضة- المستوى للبنسيلين PBP2X بينما الكيفالوسبورينات تظهر PBP2B ذا الانجذاب المنخفض، وهؤلاء هم مقدمة لتغيرات إضافية في أنماط المقاومة -العالية. وتوجد طفرات في العزل السريري المقاومة للبيتا لكتام في جميع PBPs الخمس بالتوازن -الجزئي- العالي التي سببت انجذابات منخفضة للبيتا لكتامازات (ناجاي وآخرون 2002 *Nagai et al.*). وهذا الاكتساب لخمس أنواع من البروتينات الطافرة يبدو أن له احتمالية منخفضة جداً إذا تطلب كل منها طفرة مستقلة. وهناك دليل على أنه على الأقل PBP2B و 2X قد خضعوا لتأشب (recombination) مماثل في أجزاء مختلفة للجينات المشفرة لإيجاد جينات فوسفاسائية (mosaic genes) حيث تطوَّرت المقاومة بواسطة آلية الكاسيت (cassette mechanism) (هاكينبيك 1998 *Hakenbeck*، سبرات 1994 *Spratt*). وهذا سوف يمثل خلط جين طبيعي وقد يسرع نشوء بروتينات PBP مقاومة -فوسفاسائية.

وقد أخبر عن تركيب أشعة- إكس للشكل الذائب من PBP2X (باريس وآخرون 1996 *Pares et al.*) بعد بتر نهاية N- (N-terminal) لمرساة الغشاء، لتظهر تركيب ثلاثة -حقول، مع حقل بيتيدترانسبيتيداز بين أمينو (amino) وحقل نهاية -كربوكسي (carboxy). ولقد تم تحديد تسلسل جين *pbp2x* من ٣٥ عزل سريري من المكورة العقدية الرئوية المقاومة للبنسيلين (أساهي وآخرون 1999 *Asahi et al.*) وعُين على تركيب أشعة - إكس لحقل بيتيدترانسبيتيداز، مما يعكس تجمعات لتبديلات السلسلة الجانبية في موقع ربط البنسيلين. والطبيعة النموذجية لهذه البروتينات قد تسهل خطة خلط الجينات لتوليد التنوع وتتيح الطريق لنشوء المقاومة. وباختصار، فالميزة الأبرز في مقاومة المكورة العقدية الرئوية للبنسيلين هي العدد الكبير من أهداف PBP التي تم تعديلها لعدم الحساسية لإظهار النمط الظاهري (هاكينبيك وآخرون 1999 *Hakenbeck et al.*). يعكس هذا اللدونة (المرونة) (plasticity) الجينية السريعة والرائعة للبكتيريا عندما تواجه خطر الإخماد بواسطة المضاد الحيوي.

مقاومة الميكروبيدات بواسطة أمثلة 23S rRNA

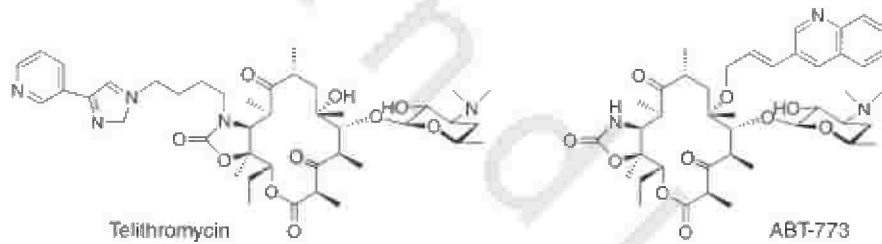
المضادات الحيوية من صنف الميكروبيد، وتشمل إريثروميسين والعوامل ممتدة-المدى أزيثروميسين وكلاريثروميسين (azithromycin and clarithromycin)، قد استعملت على نطاق واسع في عداوى الجهاز التنفسي، ولكن مقاومة الإريثروميسين قد أصبحت إشكالية. العزل السريري المكوراتي الرئوي (pneumococcal) هو مقاوم بشكل كبير للإريثروميسين، وفي دراسة واحدة في إفريقيا الجنوبية في ١٩٩١م، كان ٧٠٪ من عزل MRSA مقاوم للإريثروميسين (تشو وآخرون 1996). والطريق الرئيس للمقاومة هو تعديل 23S rRNA في الوحدة الفرعية الريبوسومية 50S لتصبح غير حساسة، في حين أن التدفق، كما لوحظ في الفصل التاسع، يمكن أن يكون معتداً كذلك.

تحديد أشعة- إكس الحديث للوحدة الفرعية 50S للريبوسوم المتوقعة بالإريثروميسين (الشكل ٤.٥) صور المضاد الحيوي مرتبط في تجويف ببتيديل ترانسفيراز (ناقلة الببتيديل) (peptidyltransferase cavity)، على مقربة من كلا الحلقات A (العقد) (A Loops) والحلقات P وبجانب A_{2058} (انظر الفصلين الرابع والسابع). وهو أحادي المثيلة الأحادية (monomethylation) أو المثيلة الثنائية (dimethylation) لمجموعة أمينو N_6 الحلقية الخارجية (N_6 exocyclic amino group) من A_{2058} (الشكل ٧.٦) بواسطة تعديل إنزيم مثيلة الريبوسوم بالإريثروميسين (Erm) الذي ينتج النمط الظاهري Erm وتخفيض الجذب رنا للمضاد الحيوي، بدون التأثير على دور أو وظيفة A_{2058} في البناء الهندسي لببتيديل ترانسفيراز (ناقلة الببتيديل). المادة المشاركة هي المانح للميثيل العام البيولوجي إس-أدينوسيل ميثونين (S -adenosylmethionine)، لكل من إن-المثيلة (N -methylation) الأولى والثانية. وهناك العديد من إن-ميثيل ترانسفيرازات (N -methyltransferases) المعروفة، وتشمل رنا-إن-ميثيل ترانسفيراز $RNA-N$ -methyltransferases ونشوء Erm ميثيل ترانسفيرازات من هذه السلائف هو محتمل. وبالأخص، واحد مثل Erm، هو إنزيم تركيب فعال في منتج الإريثروميسين سكاروبولسورا إريثري (*Saccharopolyspora erythraea*)، حيث إنه يوفر مناعة ذاتية لمنتج المضاد الحيوي (الفصل السابع) وربما يكون السلف الحديث لـ Erm في الممرضات المقاومة. وقد تم وصف أكثر من درزيتين من إنزيمات Erm في البكتيريا المقاومة ووصف تركيب أشعة- إكس لـ ErmX (بوسير وآخرون 1998).

التعديل الإنزيمي النوعي- ميثيل A_{2058} في 23S RNA لا يقلل الانجذاب لمضادات الميكروبيد الحيوية من صنف الإريثروميسين فقط، ولكن أيضاً لتلك من صنف لينكومييسين/كلنداميسين، فضلاً عن مجموعة ثالثة، عائلة سترتوجرامين B (بريستينايسين)، وقد وصفت هذه بالنمط الظاهري ميكروبيد-ليمكوساميد-ستريتوجرامين B (MLS_B) لمقاومة الدواء الريبوسومي (انظر الفصل الرابع، الشكل ٤.٥). وبينما إنزيم ErmE في *S. erythraea* ينتج تركيباً (بنوياً)، فعادة النمط الظاهري MLS_B محرض بواسطة الإريثروميسين في الممرضات المقاومة. ولقد تمت دراسة انتساخ جين *ermC* جيداً في المكورة العنقودية الذهبية (تشو وآخرون 1996) ودلت على أن 141-bp التسلسل القائد (leader sequence) مباشرة ضد تيار شفرة البدء *ermC* يتبنى تركيب ثانوي الذي يفصل موقع ربط

الريبوسوم وبذلك يعرقل انتساخ *ermC*. وفي وجود مستويات منخفضة من الإريثروميسين، بواسطة آليات غير واضحة إلى الآن، يفترض بأن التركيب الثانوي للقائد يعاد طيه، ليكشف موقع ربط الريبوسوم، ويسمح بانتساخ *ermC*، وينتج ErmC ميثيل ترانسفيريز، الذي يؤمثل A₂₀₅₈ (methylates) ويحمي الريبوسوم قبل أن تتراكم التراكيز القاتلة من الإريثروميسين في الخلية.

أحد أهداف الكيمياء الطبية في تطوير أنواع الإريثروميسين واسعة - المدى هو التغلب على الأنماط الظاهرية بواسطة إيجاد نسخ شبة اصطناعية أو متبدلة من الميكروليدات التي لا تزال ترتبط مع نسخ A₂₀₅₈ المؤمثلة من 23S rRNA. التعديلات في الدواء الواسع - المدى كلاريثروميسين تشمل أكسدة ٣- هيدروكسي إلى مجموعة ٣- أوكسو، وتنتج سلسلة الكيتوليد (الشكل ١٠،٤)، التي تعدُّ فعالة ضد المكونة العقدية الرئوية المقاومة للإريثروميسين مثلما أنها لا تحرض النمط الظاهري MLS_B (تشو وآخرون 1996, *Chu et al.*). التعديلات الإضافية في الجانب- الأيمن لهيكل الماكرولاكتون وربط بدائل الأريل (aryl substituents) تتيح انجذاب كافي لوحداث الريبوسوم الفرعية 50S المؤمثلة لتجعل الكيتوليدز أدوية جديدة واعدة. ولقد تمت المصادقة على تليثروميسين حديثاً للاستعمال البشري و ABT-773 في مرحلة متقدمة من التقييم السريري.

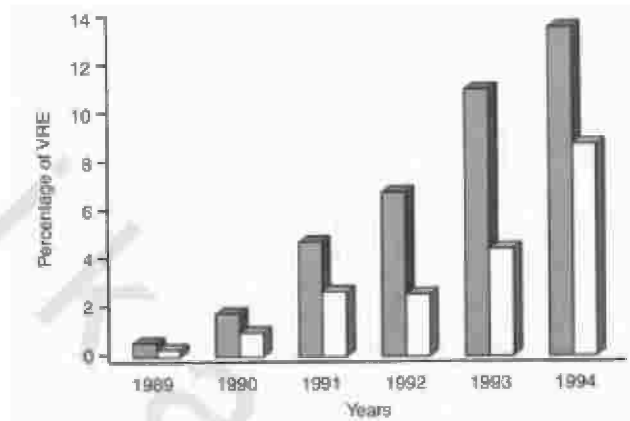


الشكل (١٠،٤). تركيب ٣-كيتوليدات (3-ketolides) تليثروميسين و ABT-773، مشتقات الإريثروميسين واسعة-المدى.

إعادة برمجة VRE لنهايات بيتيدوغليكان

الاستعمال المتزايد للفانكوميسين لمعالجة العدوى التي تسببها MRSA الموجبة -لغرام في الثمانينيات والتسعينيات انتقت للمكورات المعوية المقاومة - للدواء، المُمْرِضات الأقل قوة من المكورات العنقودية ولكنها انتهازية في المكان الذي تم إخلائه بواسطة البكتيريا الأخرى وفي المرضى المصابين بأجهزة مناعة ضعيفة. وأنواع المكورة المعوية البرازية (*E.faecalis*) مسئولة عن حوالي ٩٠ إلى ٩٥ ٪ من العزل السريري المقاوم -للفانكوميسين وتسبب المكورة المعوية فيسييم (*E.faecium*) ٥ ٪ أخرى مع أنواع صغرى مسئولة عن البقية. تعدُّ المكورات المعوية المسببات الرئيسة لالتهاب شغاف القلب (endocarditis) وهي مُمْرِضات شائعة في المرضى بالقشاطر المستقرة (indwelling catheters) وتشمل مرضى الديليزة (dialysis) والذين يجرون معالجة كيميائية الذين يعانون من نضوب الخلايا البيضاء -المُحرض بالمعالجة الكيميائية في منتصف دورة المعالجة (موراي 2000, *Murray*). يُظهر الشكل (١٠،٥) ارتفاع في معدل حدوث VRE

من أقل من ٠.٥٪ في ١٩٨٩م إلى ٢٦٪ في ١٩٩٤م في أجنحة المستشفى ووحدات العناية الفائقة ، حيث بإمكان المكورات المعوية أن تلوث وتتضاعف في الجروح الجراحية (انظر بول 2001، Poole، والمراجع فيه). ولقد كان هناك القليل من الاختيارات العلاجية لمعالجة VRE، ولكن المصادقة الحديثة لكل من توليفة سينيرسيد واوكسازوليدينون لينيزوليد (Synercid combination and the oxazolidinone linezolid) (الفصل الرابع) قد أتت بدلائل الفعالية ضد VRE.



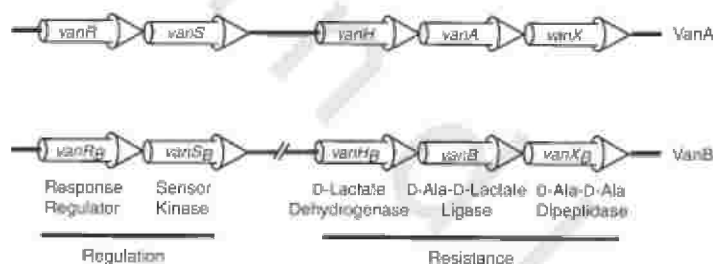
الشكل (١٠.٥). معدل حدوث VRE في وحدات العناية الفائقة (الخطوط المظلمة) في أوائل التسعينيات (بالإذن من هيوز وتينوفر Hughes and Tenover, 1997).

النمط الظاهري الرئيس الأول لـ VRE كان يسمى VanA، تلاه النوع VanB وثيق الصلة، الذي له في الأساس نفس الآلية الجزيئية ولكن يختلف في الحساسية المستمرة للتيكوبلانين (الجدول ١٠.١) (انظر الشكل ٧.٨ لتركيبة التيكوبلانين). ولقد تم العثور على النمط الظاهري لـ VanC في المكورة المعوية جالينارم (*Enterococcus galinarum*)، وقد تم وصف هذه التغييرات للأنماط الثلاث اللاحقة (سيتينكايا وآخرون Cetinkaya et al., 2000).

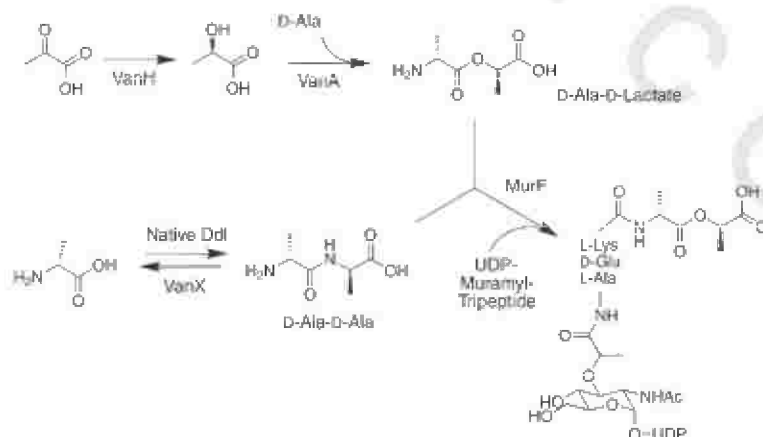
الجدول (١٠.١). الأنماط الظاهرية للمكورات المعوية المقاومة - للجليكوبييد.

النمط الظاهري	عينة الأنواع	(MIC) ملغم / فانكوميسين	نتر تيكلانين	المقاومة القابلة للإنتقال	التحريض
VanA	المكورة المعوية فيسيم	64 > 1,000	16-512	نعم	نعم
	المكورة المعوية البرازية				
	المكورة المعوية أفيم				
	المكورة المعوية جالينارم				
VanB	المكورة المعوية فيسيم	4-1,024	0.25-2	نعم	نعم
	المكورة المعوية البرازية				
VanC	المكورة المعوية جالينارم	2-32	0.12-2	لا	البعض
	المكورة المعوية كاسيلفلافس				

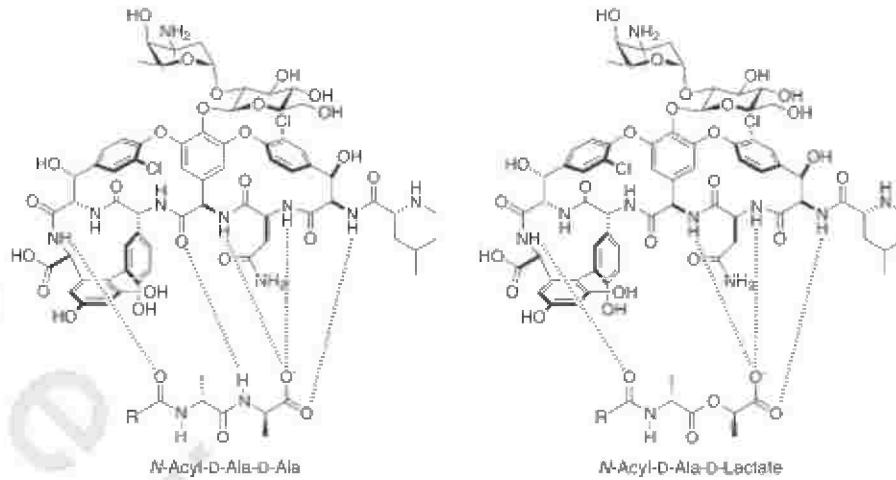
الأنماط الظاهرية VanA و VanB هي متولدة من البلاسميد وغالباً ما توجد الجينات ذات العلاقة على العناصر القابلة للانتقال المسؤولة المسببة لانتشارها السريع خلال الجمهرة الميكروبية المعوية. وقد وجد أن خمسة جينات منسقة تبادلياً هي ضرورية وكافية لكلتا النمطين الظاهريين VanA و VanB (الشكل ١٠,٦)، مع ثلاثة إنزيمات، VanH, VanA, VanX، لها دور في إعادة برمجة نهايات الببتيدوغليكان من *N*-acyl-D-Ala-D-Ala إلى *N*-acyl-D-Ala. D-lactate (الشكل ١٠,٧)، واثنان من البروتينات، VanS و VanR، تتكون من زوجين من العناصر التنظيمية التي تعتبر استشعار ومنظم استجابة لإعادة البرمجة المحرصة لمقاومة الفانكوميسين. والتحويل من د- د- ثنائي الببتيد (D,D-dipeptide) إلى د- د- ديسيبيبتيد (D-D-depsipeptide) في الترابط - غير المتقاطع لنهاية ببتيدوغليكان يؤثر أضعاف على النقصان في الربط الثابت للفانكوميسين (بج وآخرون 1991, Bugg *et al.*) ويعكس ألف- أضعاف في الزيادة في MICs للفانكوميسين المشاهدة في VRE (الشكل ١٠,٨). وفقد الانجذاب هو في جزء كبير؛ بسبب فقد رابطة الهيدروجين الوسطى من كربونيل الببتيد (peptide carbonyl) على الجانب السفلي لجزء الفانكوميسين على شكل-كأس نحو الأميد N-H للنهاية D-Ala-D-Ala جنباً إلى جنب مع تناورات الحالة الأساسية بين إلكترونات الزوج الوحيد ديسيبيبتيد على إستر أكسجين D-Ala-D-Lac.



الشكل (١٠,٦). مجموعة - خمس جينات ضرورية وكافية لتضفي الأنماط الظاهرية VanA و VanB لـ VRE.



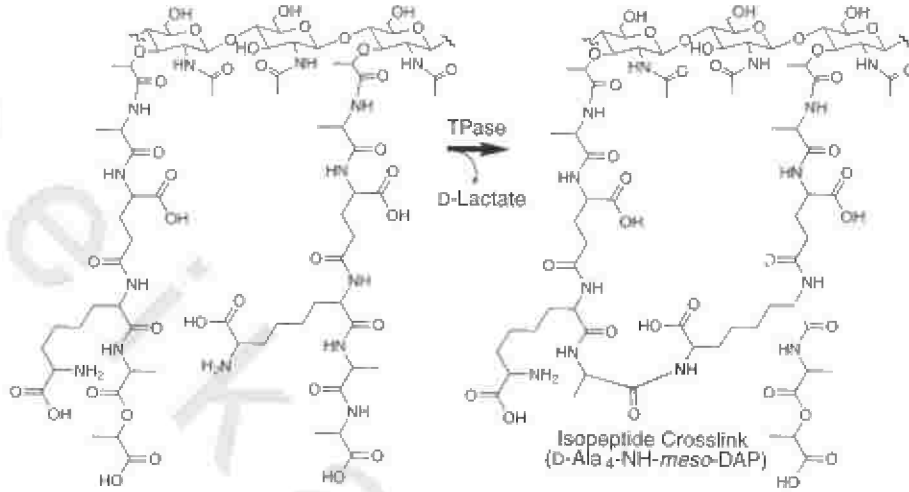
الشكل (١٠,٧). إعادة برمجة نهايات PG من D-Ala-D-Ala إلى D-Ala-D-lactate بواسطة كاسيت الثلاث إنزيمات VanH-VanA-VanX، دور VanX و MurF في تجزئة D-Ala-D-Ala مقابل D-Ala-D-Lac للتدمير أو الاستطالة.



الشكل (١٠,٨). خسارة أحد روابط الهيدروجين بين الفانكوميسين و D-Ala-D-lactate يتيح انخفاض ألف-ضعف في التجاذب الربط.

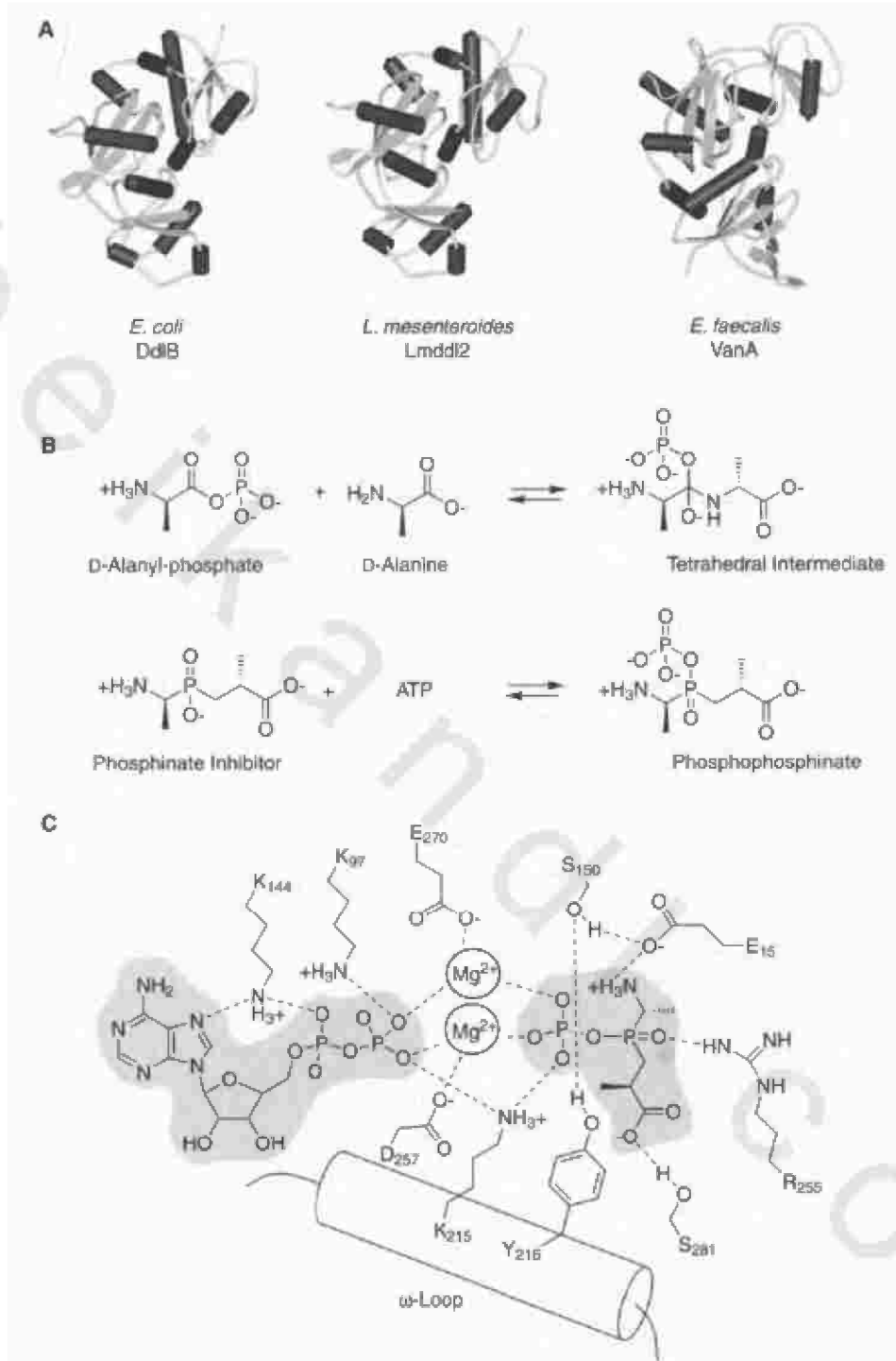
VanH هو إنزيم بيروفيت مختزل (pyruvate reductase) (D-lactate dehydrogenase) (د-لاكتيت نازع للهيدروجين) في الاتجاه المعاكس) مستعملاً NADH ليختزل C_2 -كيتون إلى C_2 -OH في اللاكتيت، مع تحكم رئيسي لينتج D-lactate. وتوفر حامض د-هيدروكسي (D-hydroxy acid) هذا بكميات كبيرة يسمح الآن لإنزيم VanA ليعمل كإنزيم رابط (ليغاز) للديبسي ببتيد (D-Ala-D-lactate depsipeptide ligase) مع ١٥٠ تفضيل - إلى ١ عند pH 6 لصنع د-الآئين-د-لاك D-Ala-D-Lac على D-Ala-D-Ala (ليسارد وآخرون 1999, Lessard *et al.*). وفي هذه الأثناء ظل يعمل د-الآئين-د-الآئين D-Ala-D-Ala ليغاز الأصلي لينتج ناتجه، د-الآئين-د-الآئين D-Ala-D-Ala وبهذا سيكون هناك كلا د-د-ثنائي الببتيد (D-D-dipeptide) و د-د-ديبسي ببتيد (D-D-depsipeptide) (الشكل ١٠,٦) في خلية VRE. وهذه طبيعياً تتنافس مع بعضها بعضاً للاستطالة بواسطة MurF، الإنزيم المضيف د-الآئين-د-الآئين (D-Ala-D-) (Ala-adding enzyme) الذي يحول ميوراميل الببتيد الثلاثي UDP- (UDP-muramyl tripeptide) إلى UDP-ميوراميل خماسي الببتيد (UDP-muramyl pentapeptide) لاختتام المرحلة السيتوبلازمية للبناء الحيوي للبيبتيدوغليكان (الفصل الثالث). ووجود الإنزيم الثالث، فان إكس VanX مطلوب لأنماط VRE الظاهرية رفيعة المستوى، ويعمل فان إكس VanX بالتحديد كبيبتيداز د-د (D-D-peptidase) في حين أنه يجنب د-الآئين-د-لاكتات D-Ala-D-lactate من التحلل المائي (ليسارد وولش 1999, Lessard and Walsh). الانتقائية على أساس k_{cat} / K_m تقرب من 10^{10} ، الفرق المذهل التي يضمن بقاء د-الآئين-د-لاكتات D-Ala-D-lactate فقط في الخلية التي تظهر VanX، VanH، VanA. وبعد ذلك MurF ليس لديه منافسة من د-الآئين-د-الآئين D-Ala-D-Ala عندما يستعمل د-الآئين-د-لاكتات D-Ala-D-lactate ليصنعودي بي-ميوراميل ل-الآئين-د-غلوتامين-ل-ليسين-د-الآئين-د-لاكتات UDP-muramyl-L-Ala-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-lactate. والإنزيمات اللاحقة في مسار البيبتيدوغليكان تمسك ديبسي ببتيد إلى مرحلة الدهن II.

وهذا التشابه هو ركيزة جيدة للربط - التبادلي (التصالي) للترانسبيثيداز (الشكل ١٠,٩)، ويمكن من إنتاج طبقة الببتيدوغليكان المرتبطة - تصالياً التساهمية والثابتة ميكانيكياً بحيث إن VRE لا تكون قابلة للتحلل الأوزموزي.



الشكل (١٠,٩). نهايات PG-D-Ala-D-Lac التي تعبر مواد للربط - التصالي المتواسط بالترانسبيثيداز.

لاحظنا في الفصل السابع بأن منتجي مضاد غليكوببتيد الحيوية يستعملوا إستراتيجية مماثلة لتشغيل VanX و VanH, VanA المناظرات لإعادة برمجة طبقات الببتيدوغليكان التابعة لها وتولد حماية مناعة-ذاتية لإجراءات مضادات الغليكوببتيد التي تصنعها وتصدرها (الشكل ٧,٩). ومثل هذه الجينات المنتجة قد تكون المصدر لكاسيت الإنزيمات-الثلاث في VREs الممرضات الانتهازية. ولقد تم تحديد تراكيب أشعة-إكس لأنزيم ليغاز د-الأنين د-الأنين (D-Ala-D-Ala ligase) من الإشريكية القولونية (فان وآخرون 1994, Fan et al.), ليغاز د-الأنين د-لاكتات (D-Ala-D-lactate ligase) من بكتيريا التربة لوكونوستوك ميزينثيرويديس (*Leuconostoc mesenteroides*) (كوزين وآخرون 2000, Kuzin et al.) التي لديها مناعة فطرية للفانكوميسين، و ليغاز فان A (VanA ligase) من VRE (روبير وآخرون 2000, Roper et al.)، مما أكد ي تماثلها في التركيب والتغيرات في الموقع النشط من Tyr₂₁₆ إلى Phe₂₁₆ إلى His₂₁₆ عندما يتقدم أحدهم خلال الإنزيمات الثلاث (الشكل ١٠,١٠ A) ويكتسب إنتقائية متزايدة لتكوين د-الأنين د-الأنين لاكتات D-Ala-D-lactate أكثر من د-الأنين د-الأنين D-Ala-D-Ala. وجميع تراكيب أشعة-إكس الثلاث لها مشبطات فوسفينوفوسفيت (phosphinophosphate) مرتبطة، ومنتجة من الفوسفينيت (phosphinate) الذي يتفاعل مع ATP في الموقع النشط (الشكل ١٠,١٠ B و C). ويعد الفوسفينيت فعال ضد ليغازات د-الآ-د-إكس (D-Ala-D-X ligases) في المختبر، ولكن هذه الجزئيات المشحونة لا تدخل إلى داخل السيتوبلازم البكتيري وهكذا فهي ليست فعالة ضد البكتيريا ككل.



الشكل (١٠، ١٠). (A) تراكيب أشعة-إكس للليغاز د-الأنين د-الأنين D-Ala-D-Ala ligase من الإشريكية القولونية، سليغاز د-الأنين د-الأنين D-Ala-D-Lac ligase من ليوكونوستوك مزيتروديز و سليغاز فان أ -د-الأنين د-لاك VanA-D-Ala-D-Lac ligase من المكنورة المعوية البرازية. (B) فسفرة مشابه دايالكيل فوسفينيت (dialkylphosphinate) في الموقع النشط للليغاز ينتج حالة -إنتقال مشابهة التي تسلك مسلك المشط البطي للربط-الضيق. (C) الرسم المعماري للموقع -النشط للإشريكية القولونية DdlB مع رابطة ADP فوسفوفوسفينيت. (بالإذن من شاي (Shi) ووالش (Walsh) (١٩٩٥)).

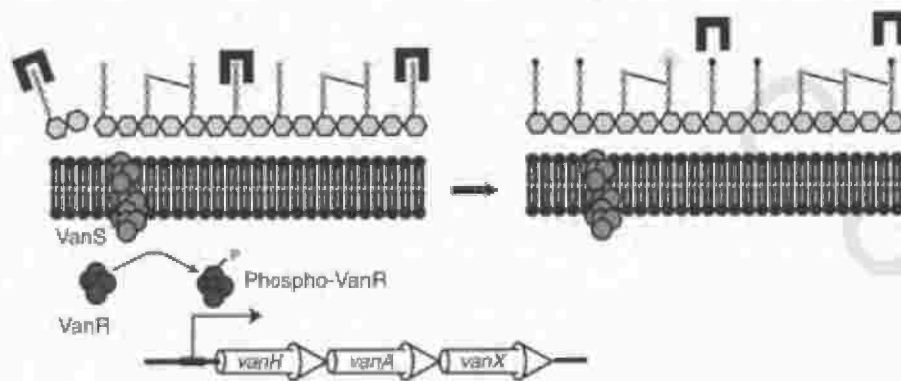
وامتداداً للفرضية بأن أنماط VRE الظاهرية تعكس إعادة البرمجة الجزيئية لليغازات د-الآئين د-الآئين D-Ala-D-Ala ligases هي ليغاز فان ج (VanC ligase) من المكورة المعوية جالينارم (نافارو و كورفالين Navarro and Courvalin, 1994). وهذا الإنزيم هو ليغاز د-الآئين د-سيرين D-Ala-D-Ser ligase ، ويظهر حوالي ٣٥٠-ضعف إتقائية لـ D-Ser في مكان D-Ala₂ في الموقع النشط لليغاز (بارك وآخرون Park et al., 1997). كما أن حمل D-Ala-D-Ser للأمام بواسطة MurF ويليهِ البناء الحيوي للبيتيدوغليكان يثمر عنه نهاية بيتيدوغليكان لها D-Ala-D-Ser حيث تتداخل السلسلة الجانبية لـ CH₂OH لـ D-Ser مع التمييز بواسطة الفانكوميسين مقارنة مع تطابق سطحها المكمل للمجموعة الأصغر CH₃ للنهاية D-Ala. وانخفاض الانجذاب هو أكثر اعتدالاً، حوالي ١٠- أضعاف.

مشغل VanB له مجموعة خمس-جينات مقارنة VanS_B, VanR_B, VanH, VanB, and VanX_B - والمنطق الجزيئي لإنزيمات إعادة برمجة البيتيدوغليكان مشابهة لتلك التي في المشغل VanA. ما الذي اختلف هو أن الملاحظة بأنه بينما كل من الفانكوميسين والتيكوبلاني يحرزان انتساخ الجينات الخمس للمشغل VanA فإنه فقط الفانكوميسين وليس التيكوبلاني الذي يُعرض مشغل VanB (الجدول ١٠.١)، مما يفسر لماذا تبقى سلالات VanB حساسة للتيكوبلاني (آرثر وكورفالين Arthur and Courvalin, 1993). وهذه النتائج توحي بأن مضاد (مضادات) غليكوبيتيد الحيوية هي المُحرّضة لـ VanA أو VanB (فانكوميسين فقط) وبالفعل، فالطفرات في بروتين مستشعر VanS_B تحولها إلى لتستجيب للتيكوبلاني الخارج الخلية. ويبدو أن منطق المكونات الإثنين Vans-VanR نموذجي لهذه الأنظمة الإستشعارية/والحوالة البكتيرية (والش وآخرون Walsh et al., 1996 B). يستشعر الفانكوميسين في البيئة الخارجية الدقيقة بواسطة حقل إكسو لـ VanS، إما مباشرة أو غير مباشرة بواسطة بعض أجزاء من البيتيدوغليكان كما في نظام استشعار AmpC- (انظر الفصل الثامن). وهذه الإشارة تحول عبر الغشاء نحو حقل هيستدين كيناز (histidine kinase) السيتوبلازمي لـ VanS، والذي يفعل ذاتياً ليفسفر شريكه الوحدة الفرعية ثنائي الجزء في ترانس (trans) (الشكل ١٠.١١).

ويمكان الشكل فوسفو-هيس (phospho-His form) من VanS أن ينقل مجموعة PO₃- إلى البروتين المنظم للاستجابة النوعية VanR، وعنصر الانتساخ ثنائي الحقل، إلى السلسلة الجانبية Asp في حقل نهاية-N. والشكل فوسفو-Asp (phospho-Asp form) من حقل نهاية-N من VanR يوصل هذه الشحنة في حالة الفسفرة إلى حقل ربط نهاية-C لـ دنا ويحدث التفعيل الانتساخي لـ VanH, VanA و Vanx لتبدأ إعادة البرمجة. وهناك بعض الأدلة على أنه في حالة التخلف في الأنماط الظاهرية VanA، يعمل VanS في طريقة شبكة ككيناز VanR، بينما VanS_B ربما يعمل في حالة الاستراحة غالباً كفوسفاتاز يُفسفر-Asp VanR_B.

وبالنظر بأن الأنماط الظاهرية VanA و VanB من VRE تجمع خمسة جينات لتجعل إعادة برمجة PG أن تغير رابطة هيدروجين واحدة على الفانكوميسين، هناك عدة طرق لعكس النمط الظاهري. إحدى الطرق هي استعمال VanX و VanS, VanR, VanH, VanA كأهداف للجزيئات التي تبطل فعاليتها، ولقد تم وصف بعض مثبطات VanX (أراوز وآخرون 2000, Araoz et al.).

ومثل هذا المثبط في توليفة مع الفانكوميسين سوف يحاكي استراتيجية أوجمنتين (Augmentin) لمضادات بيتالكتام الحيوية (انظر الفصل الثامن). الإستراتيجية الثانية قد كانت للفحص (للمسح) ضد VRE مع الغليكوبيبتيدات التي تحتفظ بنشاط المضاد الحيوي. وأدى ذلك إلى نسخ شبه اصطناعية من الغليكوبيبتيدات السكرية الدهنية (ليپوغليكوبيبتيدات) (lipoglycopeptides) مثل LY333328 (انظر الفصل الخامس عشر، الشكل ١٥.٦) التي تعتبر ٨٠-١٠٠ أضعاف أكثر فعالية من الغليكوبيبتيدات الأبوية التي تفتقر لسلسلة الدهن، مستعيداً اثنين من ثلاثة من سجلات النشاط (الفعالية) التي فقدت ضد النمط الظاهري VRE. وهذا المركب هو في التطوير السريري تحت اسم أورتا فانسين (ortavancin). وبإمكان شطر كلوروفينيل الراهب للماء (chlorobiphenyl) أن يتحرك حول سلسلة ثنائي السكريد (جي وآخرون 1999, Ge et al.) ويستعيد نشاط VRE، مما يوحي بأن الدهن هو مرساة غشاء ليعيد تركيز غليكوبيبتيد الدهني ويوفر تركيز أعلى وفعال عند السطح الخارجي للغشاء حيث تتم الربطات-التصالبية للبيتيدوغليكان، ولقد افترض بأن مثل هذه المشتقات الراهبة للماء من الغليكوبيبتيدات تثبط انتقائياً عملية (إنزيمات ناقلة الغليكوزيل) ترانسفليكوسيلازات (transglycosylases) في VRE، لتعيد توجيه هذه الأدوية المرشحة من تثبيط ترانسبيتيداز نحو أهداف جديدة (جي وآخرون 1999, Ge et al.، سن وآخرون 2001, Sun et al.).



الشكل (١٠،١١). الفرضية لـ VanS-VanR مستشعر كيناز/منظم الإستجابة لتشغيل جينات *VanH, vanA, and vanX* لإعادة برمجة البناء الحيوي للبيتيدوغليكان.