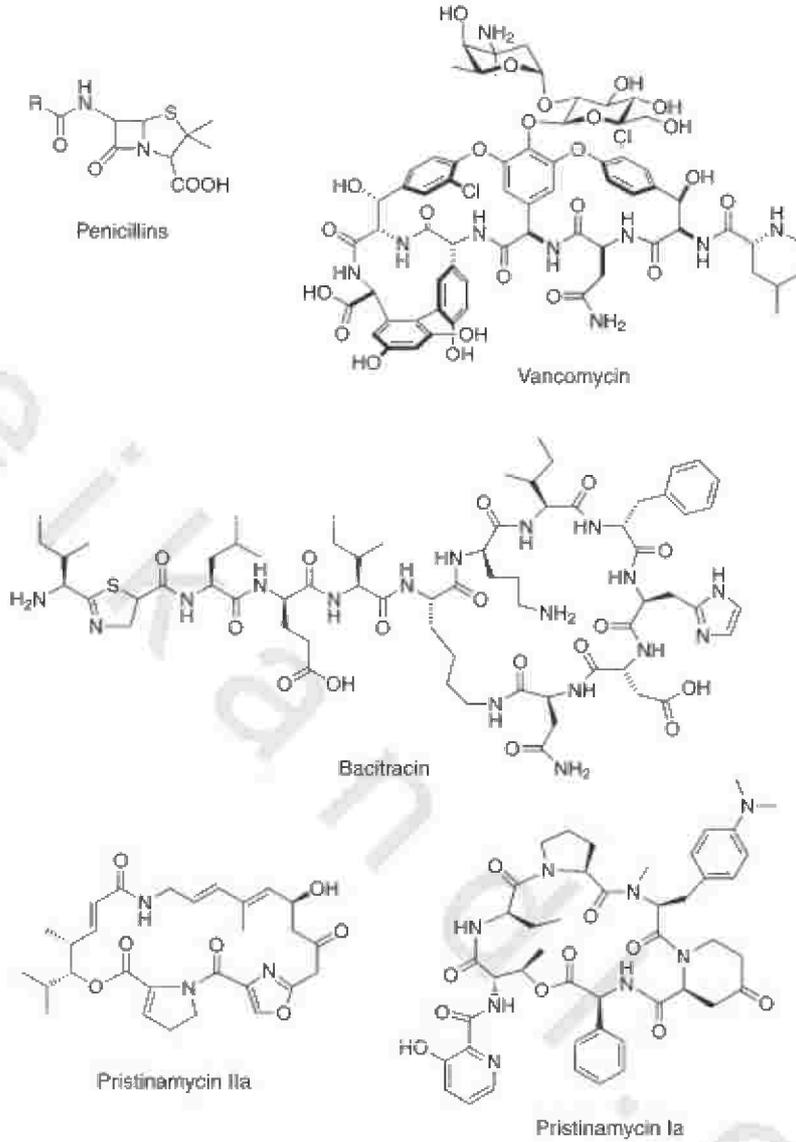


خطوط التجميع الإنزيمية لمضادات الببتيد الحيوية غير الريبوسومية ENZYMATIC ASSEMBLY LINES FOR NONRIBOSOMAL PEPTIDE ANTIBIOTICS

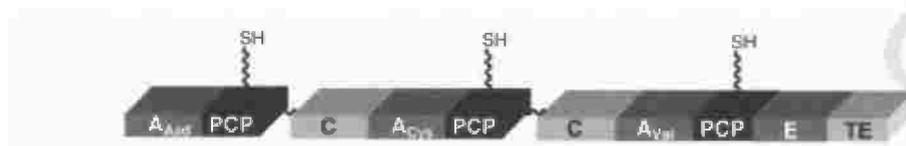
كما لوحظ في الفصول السابقة (الفصول الثالث والسادس والعاشر)، تنتج نسبة كبيرة من منتجات الببتيديك (peptidic) الطبيعية التي لها نشاط المضاد الحيوي بواسطة ببتيد سينثاز غير الريبوسومية (NRPSs) (peptide synthases) (الشكل ١٣.١) (للمرجعة، انظر كونز وماراهيل 1999، Konz and Marahiel, 1999، ماراهيل وآخرون 1997، Marahiel et al., 1997، وفون دورين وآخرون 1997، von Dohren et al., 1997). وتشمل هذه ACV (إل-أمينوأديبيل-إل-سيسستينيل-دي-فالين) (L-aminoadipyl-L-cysteinyl-D-valine) ACV، طليعة الببتيد الثلاثي لعائلة مضادات بيتا لكتام الحيوية، تيروسيدين وجراميسيدين S (tyrocidine and gramicidin S) والمضاد الحيوي الموضوعي باستراسين. وبالإضافة إلى أن الغليكوبيبتيدات من مجموعة فانكوميسين تنشأ على خطوط تجميع NRPS، ومن ثم تعدل بشكل كبير، كما لوحظ لاحقاً في هذا الفصل. وبالمثل، مضادات الببتيد الدهنية (ليوببتيد) الحيوية مثل راموبلانين ودابتوميسين (ramoplanin and daptomycin) تصنع بهذه الطريقة. وأخيراً، بريستسناميسينات-ذو-الشقين من معقد سينيرسيد هما هجين للببتيد غير الريبوسومي وخطوط-تجميع بوليكتيد سينثاز.

وحدات الاستهلال، الإطالة والإتمام: الحقول الأساسية والحقول الإضافية

تمتلك حفازات NRPS متشابهات تنظيمية مع النوع I بوليكتيد سينثاز (PKSs) كمحفزات متعددة الحقول منظمة إلى وحدات، مع وحدات متعددة تم تجميعها في وحدة بروتين فرعية واحدة أو أكثر. والمثال الأقصى هو الإنزيم الفطري سيكلوسبورين سينثاز (cyclosporine synthetase) الذي يجمع دواء أنديكاببتيد الحلقي المثبط لمناعة سيكلوسبورين أ (cyclic undecapeptide immunosuppressant drug cyclosporine A) على عديد الببتيد مفرد ذي الوزن الجزيء 1.5MDa، مع ٤٣ حقول في ١١ وحدة، واحدة لكل حامض أميني التي تم اختيارها، تنشيطها، ودمجها إلى داخل السلسلة النامية. ويمتلك ACV synthetase ثلاث وحدات في عديد الببتيد ذا 450 kDa (الشكل ١٣.٢)، في حين أن سقالة الببتيد السباعي للفانكوميسين أو كلوروراموميسين (chloroermomycin) (الشكل ١٣.٢) تجمع بواسطة ثلاث وحدات فرعية مع ثلاثة، ثلاثة، ووحدة واحدة، بالترتيب.



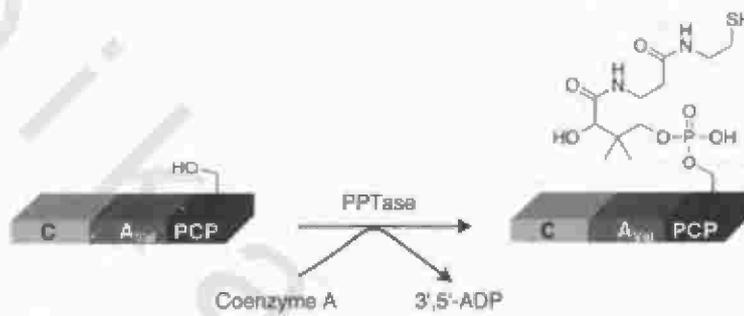
الشكل (١٣, ١). أمثلة على المضادات الحيوية التي تُصنع على خطوط - تجميع بيبتيد مستثنى غير الريبوسومية.



الشكل (١٣, ٢). تنظيم خط - تجميع NRPS: الوحدات الثلاث لـ ACV synthetase.

وكما في خط - تجميع النوع PKS I، خطوط - تجميع NRPS لها وحدة بدء (استهلال) السلسلة عند النهاية N، ومن ثم ترتب وحدات الإطالة ترادفياً قبل وحدة الإنهاء عند نهاية C لخط - تجميع البيبتيد. الحقول الأساسية لوحدة الإطالة متشابهة مع تلك خطوط - تجميع في النوع PKS I (انظر الفصل الثاني عشر) ولكن تسمى في

وحدات NRPS تكثيف (C)، أدلة (A)، وحقول البروتين حامل ببتيديل (peptidyl carrier protein (PCP)). وكل حقل PCP 8-to-10-kDa مماثل تركيبياً ووظيفياً لحقول ACP (الفصل الثاني عشر)، وتم بنفس التعديلات بعد-الانتساخ للسلسلة الجانبية سيرين على HS-pant holo PCP apo PCP to HS-pantetheinylated بواسطة الإنزيمات الشريكة المكرسة فوسفوانتثينيل ترانسفيراز (phosphopantetheinyltransferase (PPTase) (لامبالوت وآخرون (Lambalot *et al.*, 1996). ويخدم حقل HS-pant-PCP في كل وحدة كموضع إرساء للربط التساهمي للحمض الأميني الموحد الذي سوف يندمج في داخل السلسلة النامية (الشكل ١٣.٣).

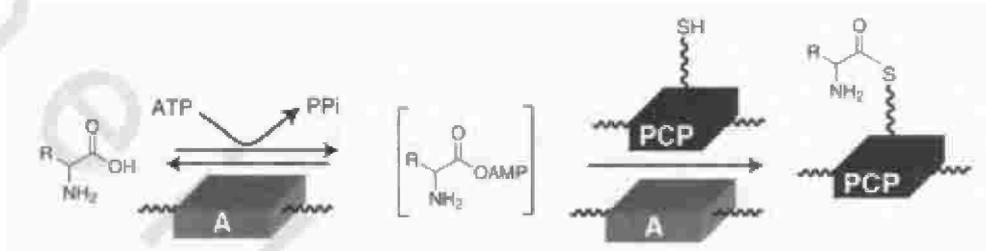


الشكل (١٣.٣). الحقول الأساسية لوحدة إطالة NRPS: C-A-PCP وتحويل Apo PCP إلى حقول PCP الكاملة بواسطة عملية فوسفوانتثينيليشن بعد - الإنتساخية.

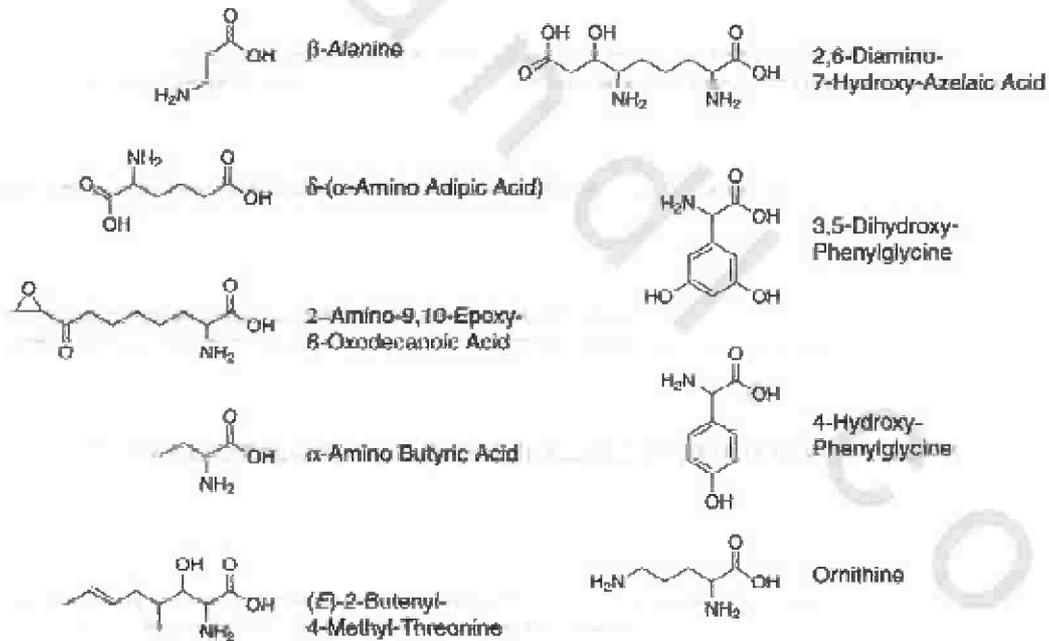
كل حقل A في الوحدة C-A-PCP ينتهي وينشط الحمض الأميني ليربط على HS-PCP المجاور. ويحدث انتقاء الحمض الأميني بواسطة ربط الحقل A في الموقع النشط، والرمز للتمييز قد فُكَّت شفرته بواسطة توليفة تحليل أشعة -إكس على phe- المنشطة لحقل A من جراماسيدين إس سنتيثاز (gramicidin S synthetase)، تحليل المعلوماتية الحيوية لأكثر من ١٥٠ حقل، نشوء الطفرات (mutagenesis) لتغيير الانتقاء (ستاكيلهوس وآخرون، Stachelhaus *et al.*, 1999). يحول الحمض الأميني المرتبط إلى أمينو أسيل - AMP بمجرد انفلاق ATP (الشكل ١٣.٤) وإطلاق PP. وبعد تفاعل النصف الأول لحقول A هذه مماثل لتلك لأمينو أسيل - tRNA سينثيلازات التي تنشط الأحماض الأمينية لتكوين رابطة الببتيد المعتمدة على - الريبوسوم، يقترح تحليل أشعة - إكس التطور المتقارب لحقول A للربط مع tRNAs المشابهة، تنقل حقول A مجموعة أمينو أسيل إلى حقل HS-pant-PCP *cis* لتوليد aminoacyl-S-PCP في كل وحدة (الشكل ١٣.٤).

الخصوصية (النوعية) لحقول A وترتيبها واستبدالها في وحدات خط التجميع NRPS تزود الإرشادات لبناء الببتيد في القالب ثيو (thiotemplated). وعلى النقيض من ببتيد سنتيثاز الريبوسومي، حيث ينشط جمع أمينوأسيل -

tRNA سينثيتيسز الخلوي فقط ٢٠ من الأحماض الأمينية المولدة للبروتين، تم العثور على أكثر من ١٠٠ حامض أميني في منتجات الببتيد الطبيعية غير الريبوسومية، مشيراً إلى التنوع الكبير في تمييز موحود الحمض الأميني، ويشمل تنشيط الأحماض الأمينية β -، γ - و δ -، مثل بيتا-الأنين (β -alanine)، γ -امينوبوتائيريت (γ -aminobutyrate) و δ -أمينوأديبيت (δ -aminoadipate) (كونز وماراهيل Konz and Marahiel، ١٩٩٩) (الشكل ١٣.٥).



الشكل (١٣،٤). خطوتين من تحفيز أدنلة حقل NRPS: انتقاء وتنشيط الحمض الأميني كأمينو أسيل-AMP (aminoacyl-AMP) بمحکم الربط، نقل مجموعة أمينو أسيل لتوليد وسيط aminoacyl-S-PCP المكافيء.



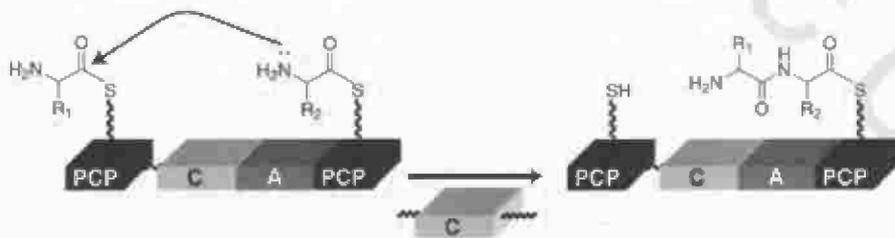
الشكل (١٣،٥). أمثلة للأحماض الأمينية غير المولدة للبروتين منتقاة لدمج السلسلة بواسطة حقل NRPS A.

والتالثة من الحقل الأساسية في وحدة إطالة NRPS، الحقل C، هي حفازات تكثيف لتكوين رابطة- الببتيد، التي تستعمل المتبع القوري ببتيديل - S-PCP بين الوحدة (intermodular peptidyl-S-PCP) كمانح لسلسلة أسيل

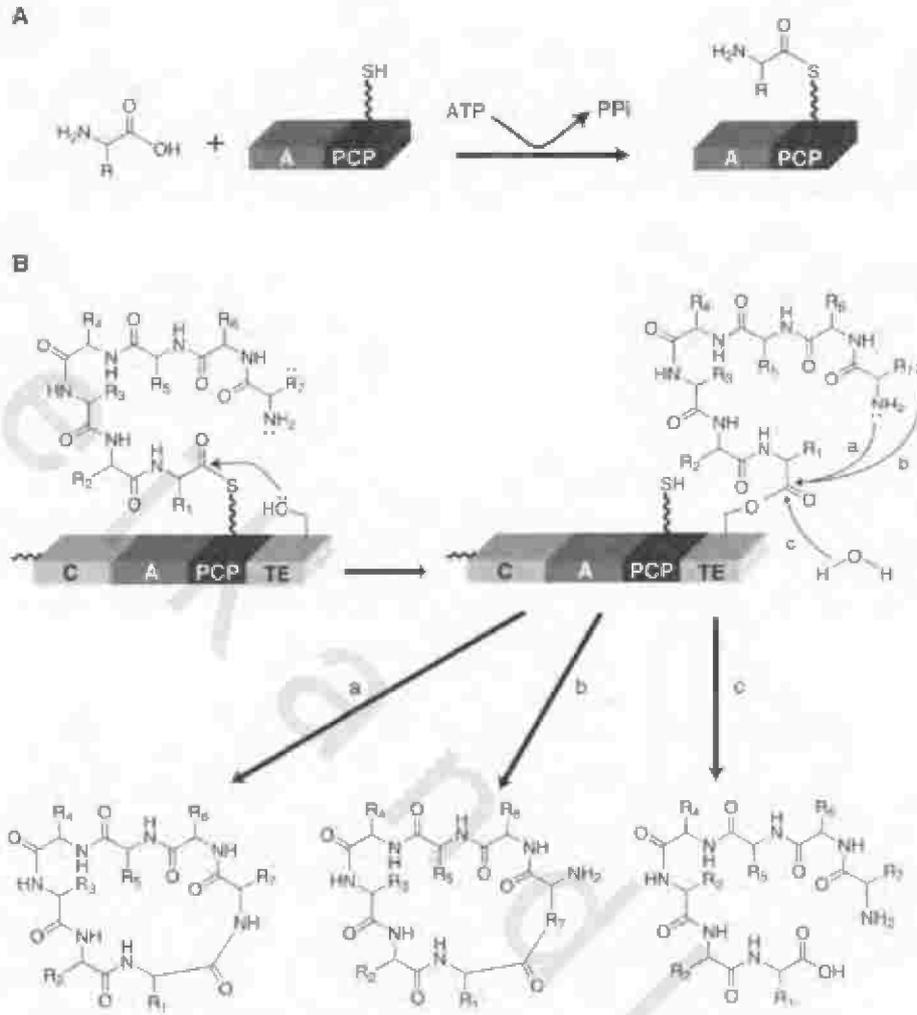
وأمينو أسيل-PCP-S داخل الوحدة (intramodular aminoacyl-S-PCP) كقابل أليف النواة (الشكل ١٣.٦) من خلال مجموعة أمينو الحرة. وتشكيل رابطة بيتيد أحادي الاتجاه وتنحرك سلسلة بيتيديل النامية من المنبع إلى حقل المصب HS-PCP. الحقل C مشابه وظيفياً لحقل كيتوسينثاز (ketosynthase) في خطوط تجميع النوع PKS I، ولكن، بدلاً من صنع الروابط -C-C، يصنع اتصال C-N في تكوين رابطة البيتيد.

تميل وحدات إطالة السلسلة لأن تفتقر لحقل C وبدلاً من ذلك تمتلك تركيب حقل - اثنين A-PCP لتنشط وتحمّل الحمض الأميني الأول فوق حقل HS-PCP الأول (الشكل ١٣.٧ A)، كما مثل في ACV synthetase المشروحة أدناه. وتملك وحدات إنهاء السلسلة التركيب العام C-A-PCP-TE، حيث النهاية - C لحقل ثيوستيراز (thioesterase domain) (TE) لها نفس الدور كما في خطوط - تجميع النوع PKS I، لفصل رابطة ثيوستر التساهمية بين سلسلة بيتيديل - كاملة الطول وحقل PCP أقصى المنبع. ومثل خطوط - تجميع PKS، بإمكان حقل NRPS TE كحفازات حالة مائية أو حفازات تحليق ضخمة (macrocyclization) (الشكل ١٣.٧ B) (Trauger *et al.*, 2000).

وبالإضافة إلى حقول C-A-PCP الأساسية في وحدات NRPS ربما تجري خطوط - تجميع خاصة خطوات كيميائية إضافية أثناء إطالة السلسلة وتوضع حقول إضافية في هذه الوحدات حيث يحدث حياكة كيميائية للسلسلة النامية. وعلى سبيل المثال، يملك انديكايبتيد (undecapeptide) الحلقي سيكلوسبورين A المثبط للمناعة مجموعات N-methyl فوق سبعة من روابط البيتيد، وتوجد سبعة حقول S-ادينوسيل ميثيونين (S-adenosylmethionine) - تستعمل -N-ميثيل ترانسفيراز (N-methyltransferase) المظمورة في الوحدات السبعة لخط - تجميع سيكلوسبورين سنثيتاز (فون دورين وآخرون *et al.*, 1997). وسوف نلاحظ أدناه حقول التقسيم الفوقي (epimerization) في خطوط - تجميع ACV، فانكوميسين، وتيروسيدين (tyrocidine) وحقول التحليق المتغاير (heterocyclization) في الوحدة الثانية من باستراسين سنثيتاز كحقول حياكة إضافية وضعت في *cis* في خطوط - التجميع.



الشكل (١٣.٦). عمل حقل C في تحفيز NRPS: تكيف رابطة البيتيد والإطالة عن طريق نقل سلسلة بيتيديل إلى مصب الحقل PCP.



الشكل (١٣،٧). (A) الحقلين - PCP لوحدة سلسلة الإطالة، (B) الأربعة حقول C-A-PCP-TE لوحدة إنهاء السلسلة وثلاث مسارات مختلفة لإنهاء السلسلة.

مخطوط - التجميع لـ ACV، ببتيدات الفانكوميسين السباعية، تيروسيدين، وياستراسين: التزامر، التحليق الضخم، والتحليق المتغاير

الإنزيم الذي يجمع طبيعة الببتيد الثلاثي الأحلقي (الآدوري) لأنواع البنسيلين والكيفالوسبورين في أكرينونيم كريسوجينم (*Acremonium chrysogenum*)، الكائن المنتج للبيتاكتام، هو عديد الببتيد-المفرد (single-NRPS polypeptide). وكما هو مبين في الشكل (١٣،٢)، يملك ACV سنثيتاز ١٠ حقول في بروتين 450kDa ليقوم بتجميع قالب ثيو (thiotemplated) من ACV. توجد ثلاثة أحماض أمينية التي يتعين انتقائها وتنشيطها كأمينو أسيل - AMPs وهكذا يوجد ثلاثة حقول A، ب، Aac، Acyc، Aval، ترتب بهذا النظام في وحدات الإنزيم الثلاث. كما

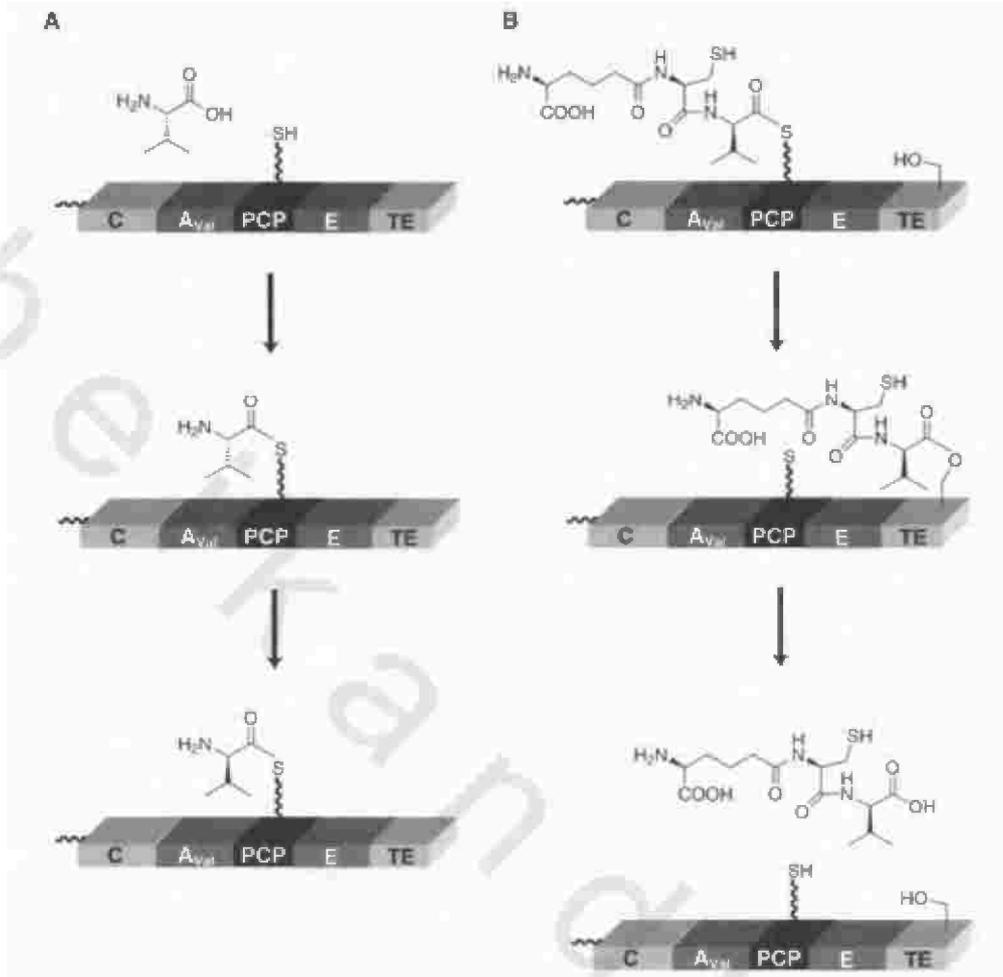
يوجد ثلاثة حقول holo HS-PCP، أنشأت بواسطة فوسفوبانتثينيليشن بعد الانتساخي من apo PCPs، للربط التساهمي كأمينوأديليل - S-PCP₁ (aminoadeipyl-S-PCP₁)، سيسينيل - S-PCP₂ (cysteiny-S-PCP₂) وفاليل - S-PCP₃ (valyl-S-PCP₃). وتشكل ٢ رابطة بيتيد، الأولى بين أمينو أديبيت وسيسين والحفازة بواسطة الحقل C في الوحدة ٢، والثانية بين Aad-Cys-S-PCP₂ كمانح و Val-S-PCP₃ كمستقبل، بواسطة الحقل C في الوحدة ٣، مولداً إنزيم-إس-بيبتيديل الثلاثي (tripeptidyl-S-enzyme) المُرسى عند PCP. وهذا مسئول عن ثمانية من ١٠ حقول.

والحقل التاسع هو حقل التزامر (E) في الوحدة ٣، حيث يستطيع تزامر L-Val-S-PCP₃ نحو D-Val-S-PCP₃. ويمر لتزامر خلال Ca-كاربانيون (Ca-carbanion) الخطي المرسخ-بالرنين ويسمح بدخول هذه بسهولة أكثر في فاليل-ثيوإستر (valyl-thioester)، Val-S-PCP₃، ومن ثم في فالين الحر. وهو من غير الواضح إلى الآن إذا ما كانت فضالة فاليل تزامر نحو خليط - D,L قبل أو بعد التكتيف (مثل L,L,L-tripeptidyl-S-PCP). وإذا حدث ذلك قبل، فمن ثم الحقل C في الوحدة ٣ يجب أن يكون نوعياً (خاصاً) للمستقبل Val-S-PCP₃. وإذا أثر التزامر على tripeptidyl-S-PCP₃ بعد التكتيف، بعدها الحقل TE ربما يكون خاصاً بـ D (D-specific) (الشكل ١٣.٨ A). الحقل العاشر والأقصى نهاية-C، الحقل TE، يعمل في خط-التجميع هذا كإنزيم مذوب (hydrolase) بسيط. وحقل TE هو عضو من عائلة ضخمة من الإنزيمات المذوية-ألفا-بيتا (α-β-hydrolases) ذات الموقع النشط سيرين. وتستعمل الموقع النشط للسلسلة الجانبية Ser كأليف النواة ليهاجم ترايببتيديل ثيو إستر وينقل السلسلة ليصنع الإنزيم الوسيط tripeptidyl-O-Ser-TE (الشكل ١٣.٨ B).

وهذا النوع الذي بعد ذلك يتحلل مائياً في خطوة نزع الأسيل التي تحرر خط التجميع NRPS لدورة التحفيز التالية، مطلقاً L,L,D-tripeptide-COOH. وهكذا فمنطق وترتيب الحقول العشرة في ACV سنثيتاز واضح وبيّن (التغيير) التطبع في عملية تجميع سلسلة قالب ثيو بيتيديل.

وتجدر الإشارة إلى خاصيتين من انتقاء الحمض الأميني في استعمال ACV سيثيتيسزلامينو اديبيت. فهو ليس فقط حامض أميني غير مولد للبروتين وكذلك فإن حقل A في الوحدة ١ والخاصة بـ Aad، تنشط C₆-COOH، وليس C₁-COOH. في أمينوأديبيت في هيئة أسيل - AMP.

وهكذا فوسيط رابطة أميد في Aad-Cys-S-PCP₂ المشكل بواسطة الحقل C للوحدة ٢ هو رابطة بيتيد متساوية (isopeptide bond) تُحمل إلى الأمام للبيتيد الثلاثي المحرر. في القسم التالي من هذا الفصل سوف نتعطف إلى الحياكة الإنزيمية بعد-خط-التجميع لتحويل acyclic ACV نحو نظام الأربع/الخمس حلقات بنسليبات المندجة.

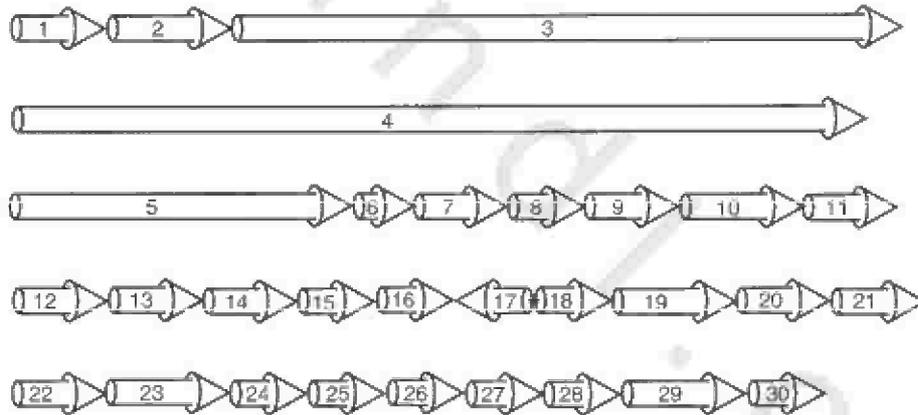


الشكل (١٣,٨). وظيفة الحقل في حط - تجميع ACV synthetase: (A) عمل الحقل E لصنع D-Val-S-PCP، (B) إنهاء السلسلة بواسطة الحقل TE من خلال وسيط إنزيم acyl tripeptidyl-O-Ser-TE.

التجميع الإنزيمي للبيبتيد السباعي للفانكوميسين وكلوروارموميسين (chloroermomycin) للفانكوميسين وكلوروارموميسين هيكل بيتيد سباعي ذا ربط-تبادلي مشابه. وكتلة جين البناء الحيوي لكلوروارموميسين، ولكن ليست بعد للفانكوميسين، قد وُجد أنها تحتوي على كتلة من بعض ٣٠ جين (فان واجيننجين وآخرون van Wageningen *et al.*, 1998) (الشكل ١٣,٩). والجدير بالذكر في هذه الكتلة ثلاثة أطر قراءة مفتوحة كبيرة جداً، 6 إلى 4 ORFs، التي ترمز الوحدات الفرعية الثلاث CepA، CepB، CepC من NRPS heptapeptide. ومعناية ترتيب الحقل المفترض من التحليل المعاماتية الحيوي (الشكل ١٣,١٠) يظهر ٢٤ حقل موزعة فوق الثلاث وحدات الفرعية، مع الوحدات التي تحتوي على CepA ١ إلى ٣، الوحدات CepB ٤ إلى ٦، والوحدة السابعة CepC. والمنطق المستعمل لـ ACV ترايببتيد ستيتاز هو قابل للانتقال لحط -تجميع NRPS هذا. وسبعة

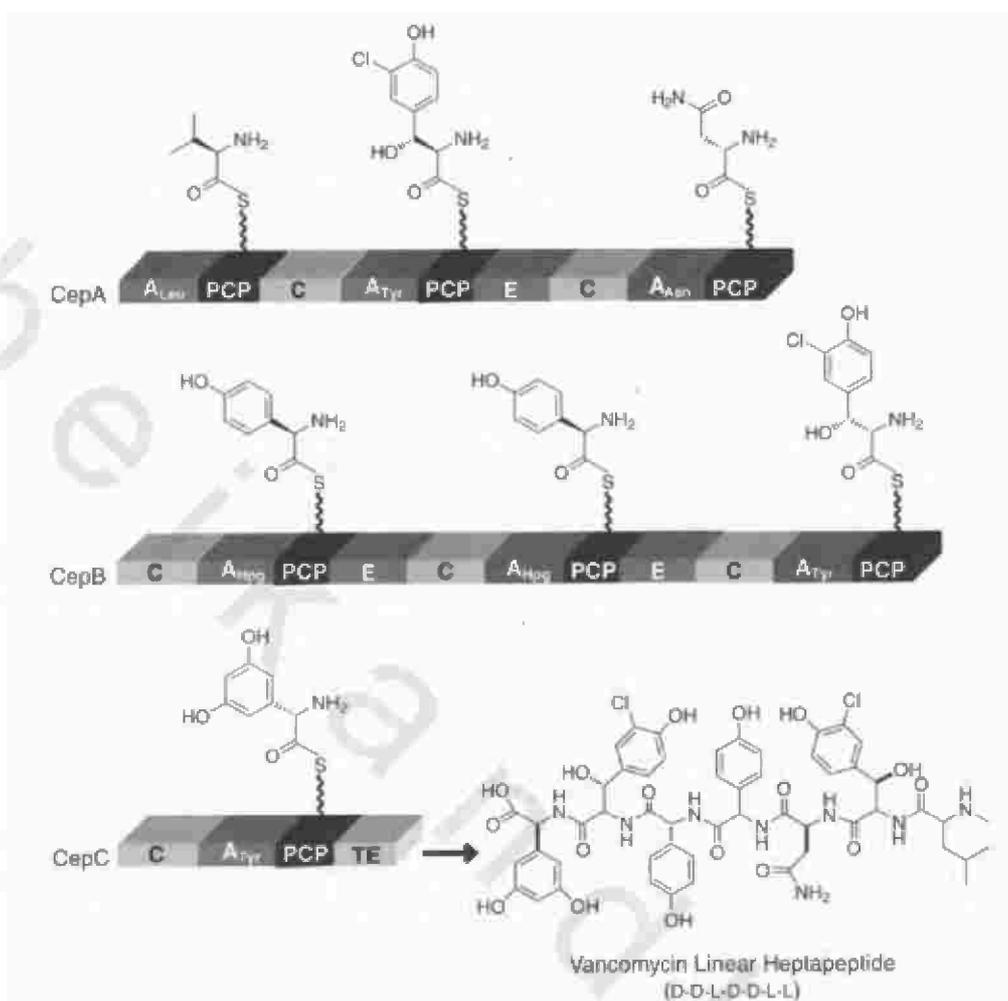
أحماض أمينية في الببتيد السباعي تلزم حقول سبعة A وسبعة حقول PCP مقترنة بالشكل HS-pantetheinyl holo لتكون وظيفية. وتوجد ستة روابط ببتيدي لتصنع و ٦ حقول. كما توجد أربعة أحماض أمينية-دي (D-amino acids) في الأحلقي السباعي (D,D,L,D,D,L,acyclic heptamer). وتوجد حقول التزامر في الوحدات ٢، ٤، و ٥ ولكن ليس في الوحدة ١. وأخيراً، هيكل الببتيد السباعي في المنتج الطبيعي هو الحامض الحر وحقل TE يفترض بأن يكون الإنزيم المذوب لببتيديل السباعي - S-PCP₇ (heptapeptidyl-S-PCP₇ hydrolase). ومصدر D-Leu عند الفضالة الولي مازال غير معروف، ولكن الحقل A يستطيع أن ينشط كل من L-Leu و D-Leu ويغرس D-Leu على HS-PCP المجاور من الوحدة ١ (تروجر ووالش، 2000 Trauger and Walsh).

وإذا كان الحقل C للوحدة ٢ هو D-specific خاص للمانح Leu₁، بعد ذلك يمكن حل المسألة. وافترضياً الحقل C في الوحدة ٣ هو خاص للمانح D-D-dipeptidyl ولكنه مستقبل L-Asn-S-PCP₃، بينما حقل C في الوحدة ٥ سوف يفترض بأنه يميز مانح الإنزيم D-D,L,D-tetrapeptidyl-S-enzyme ومستقبل D-4-OH-pheGly-S-PCP. والنوعية شيرال (chiral specificity) لحقول C لم يتم بعد التحقق من صحتها تجريبياً.



Function	ORF	Function	ORF
Nonribosomal Peptide Synthetase	3-5	HPG Synthesis	1, 17, 21, 22
Oxidative Crosslinking	7-9	DHPG Synthesis	27-30
N-Methylation	16	β-OH Tyr Synthesis	18-20
Halogenation	10	Transport	2
Glycosyl Transfer	11-13	Regulation	6
Sugar Synthesis	14, 23-26	Epimerase	15

الشكل (٩، ١٣). ثلاثون جينات مجتمعة للبناء الحيوي لكلوروازموسين.



الشكل (١٣،١٠). ٢٤ حقل، سبعة خطوط تجميع الوحدة للعمود الفقري للبتيد السباعي لكلورواروميسين أو فانكوميسين ستيناز.

والخاصية الأخيرة الجديرة بالذكر في خط تجميع الببتيد السباعي هذا هي إستعمال إثنين من موحودات الحمض الأميني الغير مولد للبروتين، D-4-OH-pheGly عند المواضع ٤ و ٥ و 3,5-(OH)₂-pheGly عند الموضع ٧. وجميع سلاسل أربيل الجانبية - الغنية بالإلكترون تشارك في تفاعلات الربط - التصالبي لما - بعد - خط - تجميع NRPS، سيتم شرحها أدناه. يُصنع 4-OH-pheGly و موحودات 3,5-(OH)₂-pheGly بواسطة الإنزيمات التي ترمز كذلك في كتلة البناء الحيوي (الشكل ١٣،٩). تؤدي أربعة مسارات - إنزيم من كوريسميت (chorismate) عن طريق بارا-هيدروكسيفينيل بيروفيت (*para*-hydroxyphenylpyruvate) وبارا-هيدروكسيمانديليت (*para*-hydroxymandelate) إلى 4-OH-pheGly (ORFs 1,17,21,22)، بينما 3,5-dihydroxy isomer تشتق بدلا من ذلك ومن النوع III PKS يتبعها الثلاث إنزيمات من عائلة كروتوناز (crotonase) (ORFs 27 to 30) في الشكل ١٣،٩)،

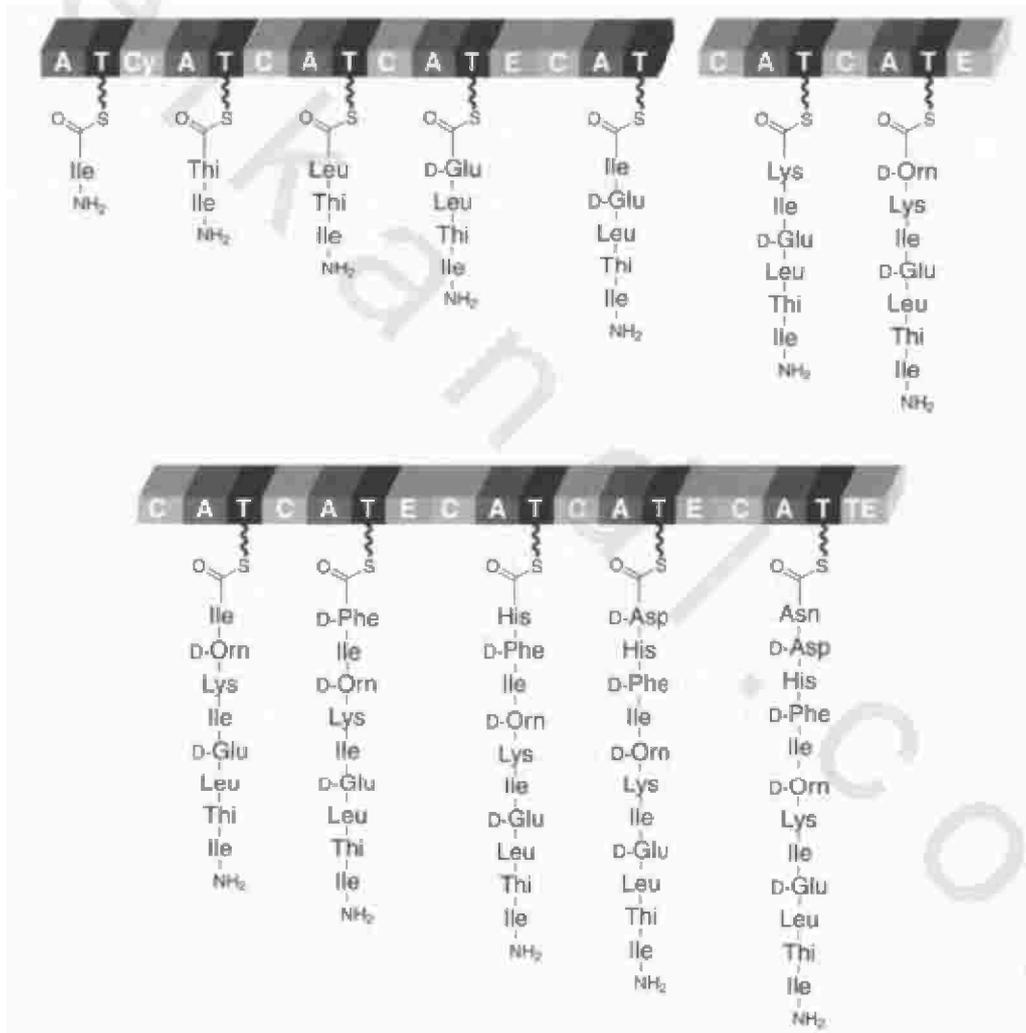
مستعملة أسيل - CoAs في تكثيفات كلايزين التكرارية (iterative Claisen condensations) لبناء الحمض الأميني - ذي الثمانية كربون المندمج عند الفضالة ٧ (تشين وآخرون 2002, Chen *et al.*). وهذه الثمانية ORFs تؤكد على تنسيق التنظيم والالتزام لإنتاج موحودات الحمض الأميني غير المولدة للبروتين في قاعدة في - الوقت المحدد وتصادق على تقلبات (تعددت) NRPS لحقول A لتدخل التغيرات في خطوط - تجميع البيبتيد في قالب ثيو.

خطوط تجميع باستراسين وتيروسيدين: التحليلقات الضخمة (macrocyclizations) بواسطة حقول TE

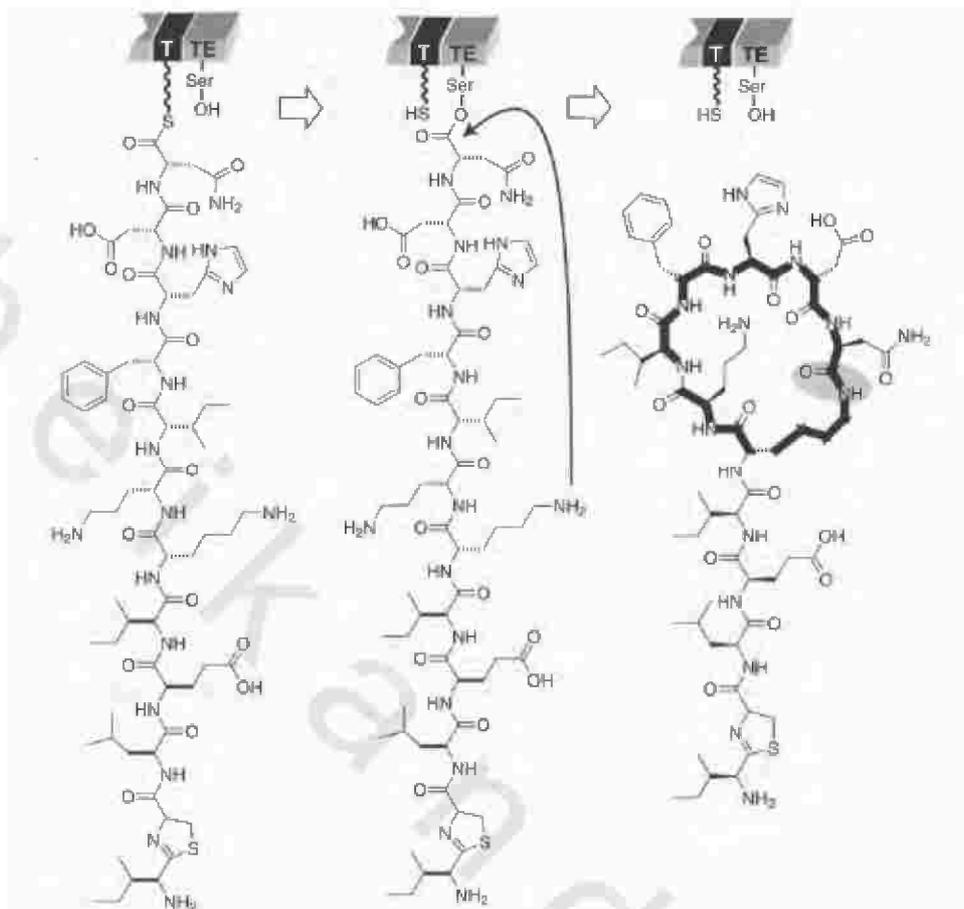
تتألف خطوط تجميع تيروسيدين سينثاز وباستراسين سينثاز من العصية بريفييس (*Bacillus brevis*) والعصية ليكينيفورميس (*Bacillus licheniformis*)، بالترتيب (الشكل ١٣، ١١)، من ثلاث وحدات فرعية التي تحتوي على ١٠ و ١٢ وحدة، بالترتيب، لمضادات ديكا - ودوديكا بيبتيد الحيوية (deca-and dodecapeptide antibiotics). وكلاهما بيبتيدات حلقة متصلة بتخليق الناحية الكيميائية (regiochemistry) المختلف. وتيروسيدين حلقي من الرأس إلى الذيل، ومجموعة أمينوم D-phe₁ تهاجم كربونيل - Leu₁₀ carbonyl) Leu₁₀ لتصنع الأميد الحلقي (انظر تروجر وآخرون Trauger *et al.*, 2000)، ولكن باستراسين قد تم تخليقه ليعطي تركيب أولى طويل مع سلسلة جانبية مجموعة أمينو من Lys₇ التي تهاجم كربونيل من فضالة النهاية Asn₁₂ (الشكل ١٣، ١٢). التحليلقات المتميزة تحفز بواسطة حقول TE عند نهاية خطوط -تجميع NRPS هذه، تعمل كإنزيمات مُحلقة ماكرولكتاميزنج سيكلازات (macrolactamizing cyclases) بدلاً من الإنزيمات الحالة (hydrolases). يجب أن تُحجز (تفصل) وسائط acyl-O-TE حركياً من الماء وتطوى في داخل هيئة - نشطة - الموقع بحيث إن روابط إستر Leu₁₀-COO-TE و Asn₁₂-COO-TE يمكن أسرها بين الجزئيات بواسطة أمين أليفات النواة في سلاسل بيبتيد. وفي حالة تيروسيدين سنثياز، فقد ثبت بأن حقل TE يملك جميع المعلومات الضرورية لتحريض ثني (طي) السلسلة والتخليق بما أن حقل TE المستاصل يحتفظ تلقائياً بالكفاءة المحفزة لتخليق ديكا بيبتيد - ثيوإستر وعندما يعرض مع استبدال دي - فينيل أكتيل (D-phenylactyl) عند D-phe₁، سوف تُنتج الماكرولاكتون. الفرق بين التحليل بالماء (hydrolyzing) والتخليق (cyclizing) لحقول TE في النوع I PKS وفي خطوط - تجميع NRPS ليس واضحاً بعد ولكن ستكون ذات أهمية في الأساليب التوافقية نحو التحليلقات الضخمة.

إضافة إلى نوع تركيب ماكرولكتام الوهق الخاص به، يملك باستراسين خاصية تركيبية إضافية جديرة بالذكر: الفضالات ١ و ٢، يتم تحويلها إلى خمس -حلقات داي هيدروثيازول (five-ring dihydrothiazole)، ثيازولين (thiazoline)، أثناء خطوة إطالة السلسلة في الوحدة ٢ (الشكل ١٣، ١٣). وتحليل حقل التكثيف في الوحدة ٢ لباستراسين سنثياز يكشف أن بديل (متغير) وعضو من العائلة الفرعية لحقل التحليلق (Cy) (كياتنج ووالش Keating and Walsh, 2001). وبالإضافة إلى التصرف كحقل C نموذجي ومحفزاً لتكوين رابطة أميد، فحقول Cy هذه، توجد

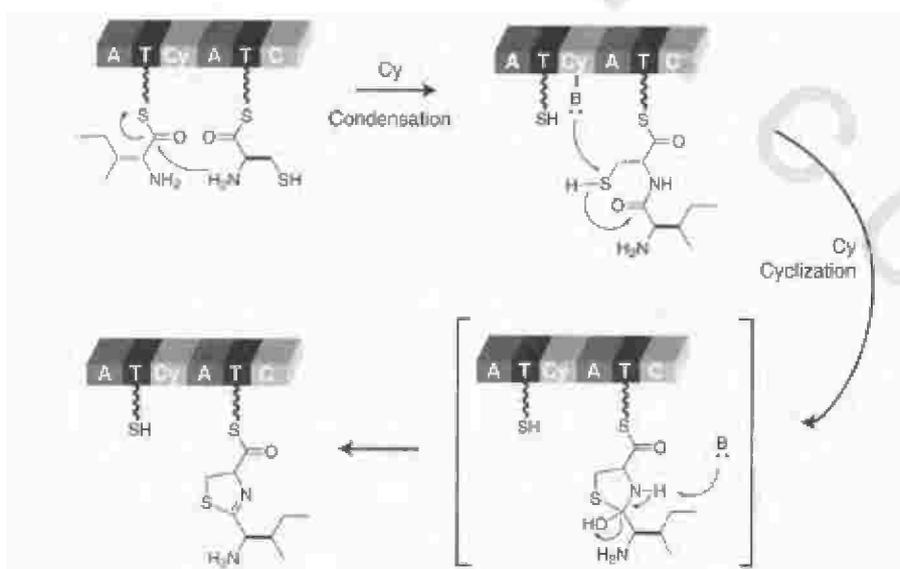
كذلك في بليوميسين سنثيتاز (bleomycin synthetase) (انظر دو وآخرون 2001, Du et al.)، وتحفز أولاً تحليق السلسلة الجانبية ثيوليت (thiolate side chain) من سيستين فوق رابطة البيئيد كاربونيل التي فقط الانتهاء من تشكيلها ومن ثم التجفاف لتوليد رابطة أيمين الحلقية المزدوجة (cyclic imine double bond) ويستمد توازن التحليق إلى حلقة ثيازولين. هذا التعديل يغير الربط لسلسلة أسيل. وكذلك، فحلقة ثيازولين تعدُّ مستخلب (chelator) أيون معدني ثنائي التكافؤ جيد، التي يعتقد بأن تكون ذات صلة مع التنسيق المتواسط بـ Mg^{2+} الخاص بأنديكابرينيل فوسفيت (undecaprenyl phosphate) في عمله المضاد الحيوي (الفصل الثالث).



الشكل (١٣, ١١). خط تجميع NRPS لتروسيدين سنثيتاز.



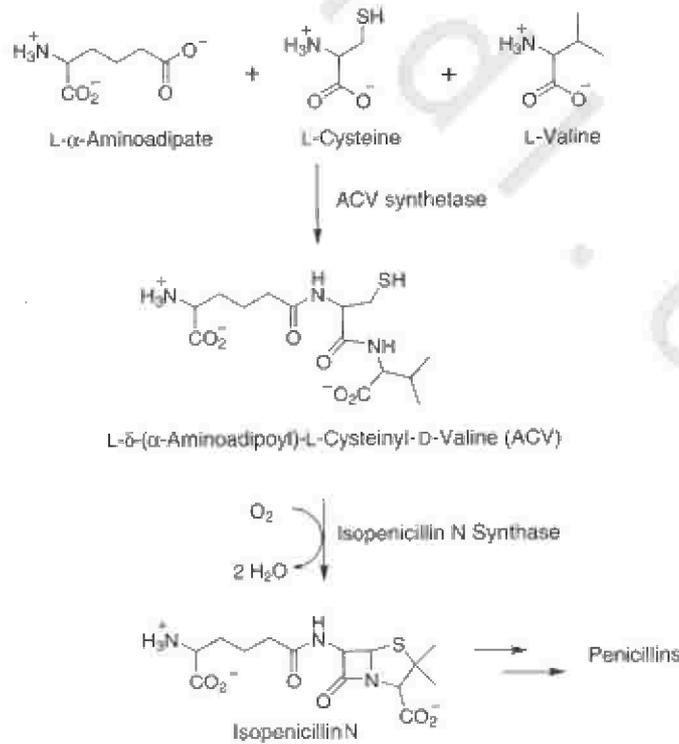
الشكل (١٢، ١٣). إطلاق سلسلة باسترامين بواسطة ماكروكيتاميزيشن المين الخزين بواسطة حقل TE لباستراسين سينثيلاز: لصنع رابطة بيتيد المتساوية لـ Lys_7-Asn_{12} .



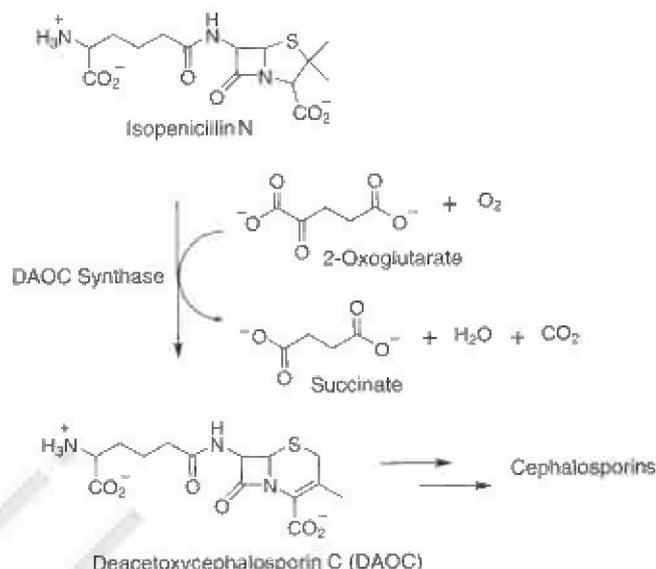
الشكل (١٣، ١٣). عمل حقل التحليق لباستراسين سينثيلاز لإنشاء حلقة ثيازوليدين من Cys_1-Leu_2 .

علم إنزيمات بعد - خط تجميع ACV: ACV إلى بنسيلينات إلى كيفالوسبورينات - مقارنة مع البناء الحيوي لكارباينيم و كلافوليتيت.

يحفز التحويل الإنزيمي للبيبتيد الثلاثي ACV الأحلقي إلى تركيب بيتا لكتام ثنائي الحلقة من البسيلينات بواسطة إنزيم Fe^{11} واحد غير محتوٍ على الهيم (nonheme)، أيزو بنسيلين N سينثاز (IPNS) (isopenicillin N synthase) الذي يختزل المادة المشاركة O_2 بواسطة أربعة إلكترونات إلى جزئين من الماء (الشكل ١٣،١٤). وبدوره فحلقة بيتا لكتام تمتد من ثيازوليدين ذي الخمس - حلقات (five-ring thiazolidine) إلى حلقة ثنائي هيدروثيازولين ذات الست - حلقات (six-ring dihydrothiazine ring) لمضادات كيفالوسبورين الحيوية، مرة أخرى بواسطة إنزيم غير المحتوي على الهيم Fe^{11} دايوكسيجينيز (epimerase) (الشكل ١٣،١٥) التي تعمل بعد أن يُحول إبيميراز (epimerase) أيزو بنسيلين N إلى (isopenicillin N) بواسطة توازن مركز C_2 aminoadipyl L- مع الخليط - D-L. ويعرف إنزيم إكسانداز كذلك بديكتوكسي كيفالوسبورين سي سينثاز (DAOCS) (deacetoxycephalosporin C synthase)، يعمل فقط على د-أمينو ادبييل-بنسيلين (D-aminoadipyl-pencillin)، ويتطلب جزيء من ألفا-كيتوجلوتاريت (α -ketoglutarate) كمادة مشاركة و وينزع الكربوكسيل إلى سكسينيت (succinate) و CO_2 بينما يُختزل O_2 إلى H_2O وذرة الأكسجين الثانية تدمج في داخل سكسينيت كربوكسيل.



الشكل (١٣،١٤). التحليق المزدوج لـ ACV إلى هيكل بيتا لكتام البنسيلينات بواسطة أيزو بنسيلين إن سينثاز.



الشكل (١٣، ١٥). تمديد حلقات البينسلينات الخمس إلى ست حلقات للكيفالوسبورينات بواسطة إكسيتاداز (deacetoxycephalosporin (expandase) (C synthase).

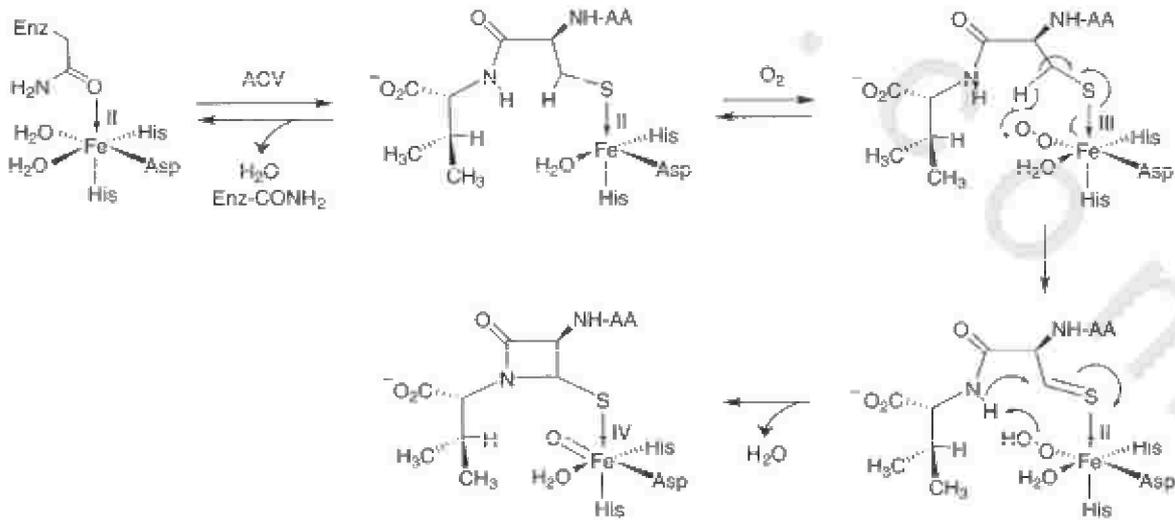
ولقد تم حل تراكيب أشعة-إكس لكل من IPNS، من الرشاشية نيدبولانس (*Aspergillus nidullans*) (روتش وآخرون 1997، Roach *et al.*) (الشكل ١٣، ١٦)، و daocs من المتسلسلة كلافوجيريس (فاليجارو وآخرون Valegard *et al.*, 1998)، وكشف أن الإنزيمين هما أعضاء من العائلة الكبيرة (الشكل ١٣، ١٧) دايأكسيجينازات حديد فروز (ثنائي التكافؤ) غير المحتوي على الهيم (nonheme ferrous iron dioxygenases). ويستعملوا ٢ His وواحد كاربوكسيلات (Asp/Glu) كبريطات للهيكل (انظر كيو Que, 2000) لـ Fe^{II}، كما يعمل الإنزيم الثالث في استقلاب بيتالكتا المؤكسد، كلافامينيت سينثاز (clavaminatase synthase) (CAS) (زانج وآخرون Zang *et al.*, 2000)، المذكور لاحقاً.

بينما يظهر DAOCs وCAS ألفا-كيتو ديوكسيجيناز نازع كربوكسيل-الحمض (α-keto acid-decarboxylating dioxygenase) النموذجي قياس العناصر (stoichiometry) من هيكل الموقع - النشط لحديد الفروز الشائع هذا، يتشعب (يحيد) IPNS بحيث لا يتطلب المادة المشاركة ألفا-كيتو الحامضية وبواسطة عدد الإلكترونات التي تمت إزالتها من المادة. يؤكسد IPNS، بواسطة أربعة إلكترونات كلما أنشأ نظام الأربع/الخمس حلقات المندمج لهيكل البينسلين، بعمل كل الإلكترونات الأربعة في شكل قمع (funneling) نحو O₂ عندما يختزل إلى جزئين من H₂O. وعلى النقيض، يعمل DAOCs وCAS اثنين أكسدة إلكترونات للمادة المرتبطة في كل دورة تحفيزية. ومن الواضح بأن نفس المنصة (البرنامج) المعمارية لحديد الفروز يمكن توجيهها نحو الكيمياء المتنوعة ولكن الانتقائية المستندة - على الأكسجين بواسطة ربط المادة القابلة للأكسدة. ويعتقد بأن جميع الإنزيمات الثلاث تولد أنواع فريل Fe^{IV}=O ferryl باعتبارها مفتاح أكسدة لدورة - أكسدة الإلكترونين (two-electron redox cycle). ويولد DAOCs

و CAS مؤكسد فرييل من عملية نزع الكربوكسيل المؤكسدة من ألفا-كيتوغلوتاريت المرتبط ، في حين يعتقد بان IPNS يولد المؤكسد $Fe^{IV}=O$ بواسطة أكسدة - اثنين إلكترونات من ACV بمجرد أن يتم تحليقه ، مع تكوين رابط C-N ، لوسيط بيتا لكتام الأحادي الحلقة المنسق - بالحديد (iron-coordinated monocyclic β - lactam intermediate) (الشكل ١٣.١٧) (روتش وآخرون 1997, Roach et al.).

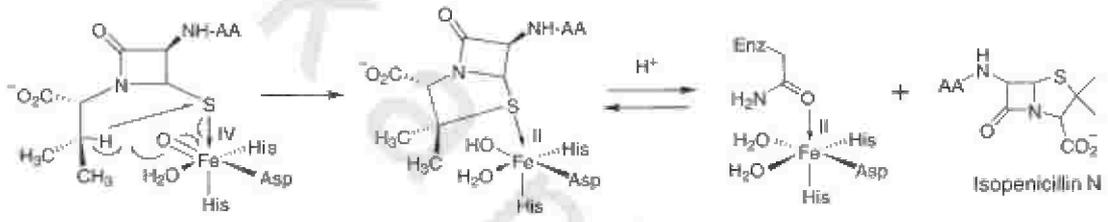


الشكل (١٣, ١٦). تركيب أشعة - إكس لـ IPNS مع الحديد الموقع - النشط والمادة المرتبطة ACV.

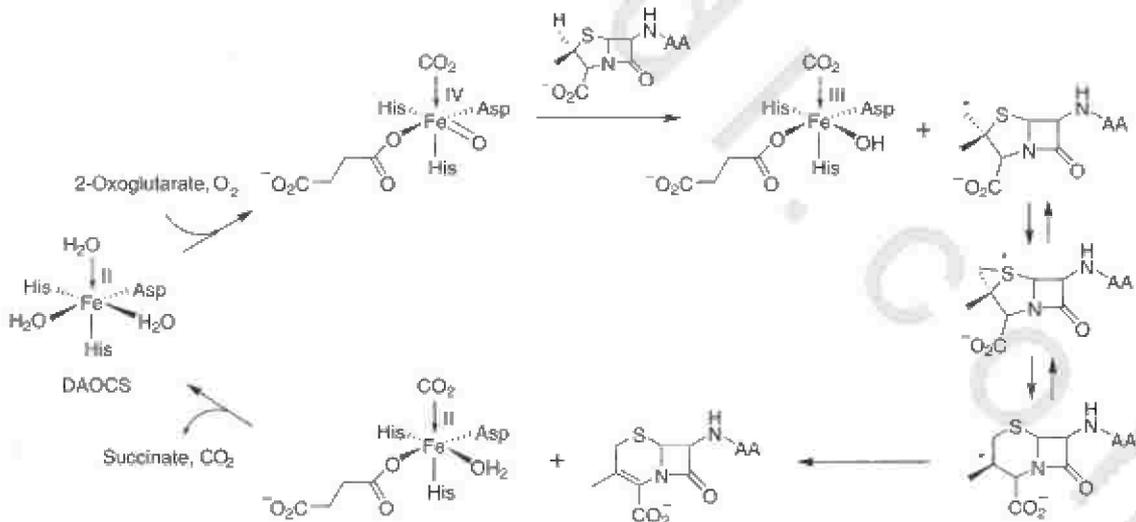


الشكل (١٣, ١٧). الآليات المقترحة لتكوين الحلقة الأولى (بيتا لكتام) بواسطة IPNS.

النصف الثاني من تفاعل IPNS هو أكسدة - اثنين إلكترون جي /تخليق (two-electron oxidation G/cyclization) للاكتام الأحادي المنسق - بثيول نحو حلقة ثيازوليدين مع تكوين رابطة $S_{C\beta} \text{ val}$ إلى $S_{C\gamma}$ بواسطة خطوتين واحد- إلكترون (الشكل ١٣، ١٨) واختزال اثنين - إلكترون الملازم لـ $Fe^{IV}=O$ عودة إلى $Fe^{II}-OH$. وبشكل مماثل، فتمديد الحلقة بواسطة الإنزيم إكسبانديز DAOCS expandase يستخدم $Fe^{IV}=O$ لكسر رابطة $S-C\beta$ في الثيازوليدين ومن ثم يعيد إغلاق الكبريت الجذري (sulfur radical) فوق CH_2 الجذري المشتق من تجريد ذرة الهيدروجين من أحد مجموعات بروشيرال-بيتا ميثيل (prochiral β -methyl groups). وذلك يمد (يوسع) الحلقة من خمسة إلى ستة ويولد أولفين الداخلي الحلقة (endocyclic olefin) (الشكل ١٣، ١٩) بمجرد إعادة توليد القاعدة الأساسية Fe^{II} . ويحتمل بأن فعالية أنواع حديد Fe^{II} oxo عدلت بواسطة نهج مادة القيود الهندسية في كل موقع نشط وربما كذلك بواسطة التغييرات المحكمة في مجال تنسيق الحديد عند نقاط مختلفة في هذه الدورات الحفازة المعقدة.



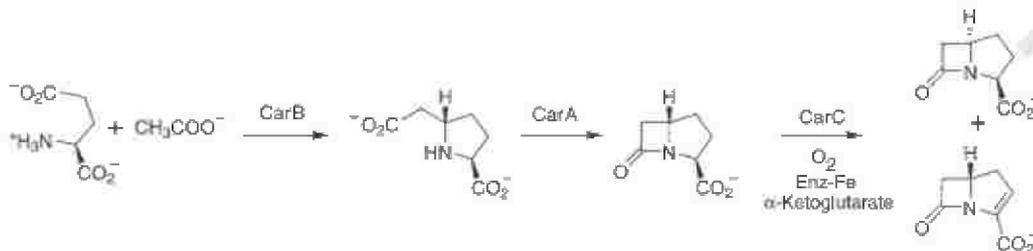
الشكل (١٣، ١٨). تكوين الحلقة الثانية من البسيسليينات بواسطة IPNS مع إختزال وسيط فيريل (ferryl intermediate).



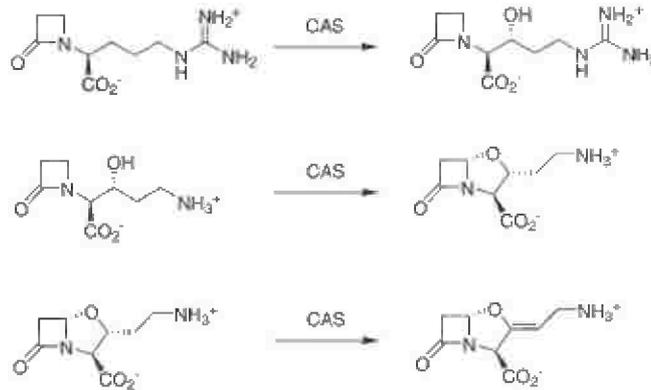
الشكل (١٣، ١٩). تمديد الحلقة بواسطة DAOCS مع إختزال وسيط فيريل.

الكارباينيمات وهيكل أوكسوبينام (oxopenam) من الكلافولينات يُحضرا بواسطة إستراتيجية إنزيمية مختلفة. ولا يشتقا من منتجات البثيد غير الريبوسومية. وفي الواقع، ينتج 2-em-3-carboxylate 5R-carba- بواسطة

إروينيا كاروتوفورا و سيريشيا مارسيسينز (*Serratia marcescens*) المجمعة من acetyl-CoA والحمض الميني غلوتامات بواسطة كتلة ثلاثة-إنزيمات للبناء الحيوي، CarA-C (الشكل ١٣،٢٠) (لي وآخرون 2000، Li *et al.*). والحلقة الخامسة تُصنّع أولاً، بواسطة CarB إلى ٢-كربوكسيمثيل برولين (2-carboxymethyl proline). وينشط الكربوكسييلات بواسطة CarA، البيتالاكتام سينثيتاز (β -lactam synthetase) في التفاعل الذي يصنع وسيط acyl-AMP على السلسلة الجانبية $\text{CH}_2\text{-COOH}$ ومن ثم يستعمل الأمين للإزاحة البين الجزئية لـ AMP بمجرد تكوين لاكتام ذا-الأربع أعضاء (باكمان وآخرون 1998، Bachmann *et al.*). ووسيط كارباينيم هذا غير مشبع بطريقة مؤكسدة بواسطة CarC والرسم البياني ٤/٥ رأس الجسر المتزامن ليولد المنتج الطبيعي. ولـ CarA و CarB مناظرات في مسار البناء الحيوي لكلافولينيت (الشكل ١٣،٢١) حيث إن الحمض الأميني أرجنين (arginine) والمستقلب الأولي دي-جليسرالديهيد-٣ فوسفيت (D-glyceraldehyde-3-phosphate) الطلائع. والخطوة الأولى هي ثيامين-بيروفوسفيت المعتمد على التولي الإنزيمي (thiamine-pyrophosphate dependent enzymatic generation) لكربوكسيمثيل أرجنين (carboxyethylarginine)، التحويل غير العادي للغاية، الذي يشمل التحكم الداخلي للأوكسدة والتخلص (من P_i) وإضافة مجموعة أرجنين ألفا- NH_2 (arginine $\alpha\text{-NH}_2$ group). الخطوة الثانية هي فلق - ATP بيتا لكتام سنثاز (ATP-cleaving β -lactam synthase) آخر لتوليد الاكتام الأحادي عن طريق الهندسة المعمارية المختلفة من أسباراجين سنثاز (asparagines synthetase) (خليلي وآخرون 2001، Khaleeli *et al.*). ويقترح تركيب أشعة - إكس للكتام سنثيتاز مع كربوكسيمثيل أرجنين المرتبط ومشابه ATP هندسة مطابقة مسبقة التنظيم موافقة لتكوين بيتالاكتام البين الجزئي (ميلر وآخرون 2001، Miller *et al.*). ومن ثم يعمل $\text{CAS Fe}^{\text{II}}$ داي أكسيجينيز ($\text{CAS Fe}^{\text{II}}$ dioxygenase) في ثلاث خطوات منفصلة (الشكل ١٣،٢١)، أولاً كهيدروكسيلاز ليركب OH بالقرب من الكربوكسييلات وينتج بروكلافوأمينيت (proclavuaminite). ثم يعمل CAS كسيكليز مؤكسد مضيفاً أكسجين الكحول إلى C_4 من بيتا لكتام، مولدا ٤/٥ وصل الحلقة في دايهيدروكلاف أمينيت (dihydroclavaminite) (زانج وآخرون 2000، Zhang *et al.*). والتفاعل الثالث المتتالي لـ CAS هو نزع التشعب المؤكسد، إدخال الرابطة المزدوجة الخارجية الحلقية التي تنتج إينول إثير (enol ether) في كلاف أمينيت. وتظهر الثلاث تفاعلات لـ CAS معالجة متقنة للتفاعلات الكيميائية لمنصتي (برناجي) two-His/ Asp platform لـ Fe^{II} في الموقع النشط.



الشكل (١٣،٢٠). عمل الترادف لـ CarA-C لتوليد نواة الكربايينيم.

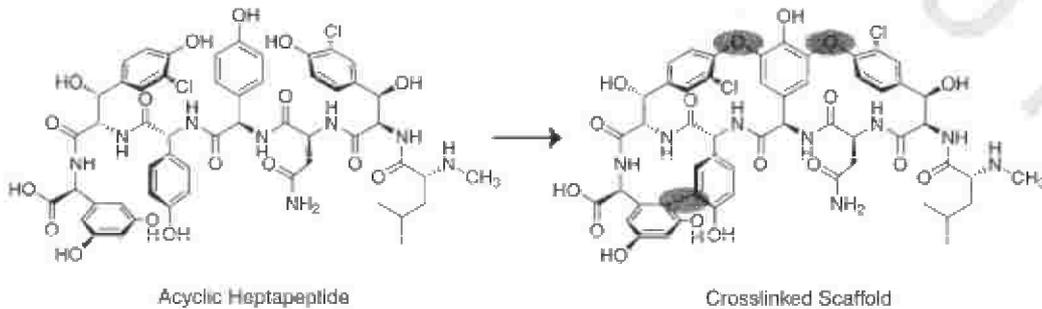


الشكل (١٣، ٢١). ثلاث تحولات مؤكسدة بواسطة CAS أثناء بناء كلاف أمينيت.

تفاعل إنزيمات بعد - مخط - التجميع: الأكسجة وارتباط بالغليكوزيل لأجليكونات (aglycones) للفانكوميسين وتيكوبلانين وأسلة تيكوبلانين

تحول ثلاثة إلى أربعة أنواع من تفاعلات النضوج الإنزيمية ببثيد أجليكونات السباعي (هيتايبثيد) الأحلطي (acyclic heptapeptide aglycones) من الفانكوميسين وتيكوبلانين إلى مضادات الغليكوبثيد وجليكوبثيد الدهنية الحيوية النشطة، بالترتيب (انظر هوبارد ووالش Hubbard and Walsh, 2002). أولاً: مجموعة أمينو الحرة من D-Leu، للفانكوميسين هيتايبثيد يؤمئل (N-methylated)، باستعمال S-أدينوسيل ميثونين (S-adenosylmethionine) كمادة مشاركة، تنفذ بواسطة إن - ميشيل ترانسفيراز الذي هو ORF 17 في مجموعة البناء الحيوي كلورورإرموميسين (الشكل ١٣، ٩).

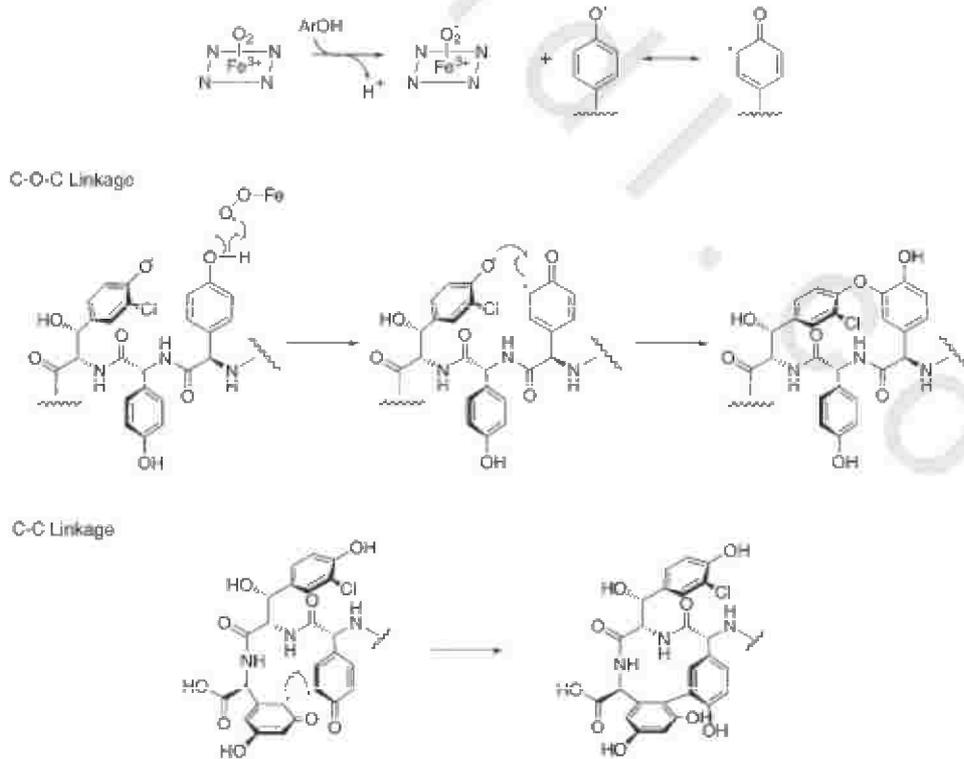
ثانياً: الربط - التصالبي المصلب الذي يحدث في سلسلة أريل الجانبية. ففي هيكل كلورورإرموميسين / فانكوميسين، يوصل الربط-التصالبي سلاسل أريل الجانبية للفضالة ٢ و٤، ٤ و٦، ٥ و٧ (الشكل ١٣، ٢٢)، بينما في هيكل تيكوبلانين، ترتبط فضالات ١-٣ و٤-٦ و٥-٧ تصالبياً. وبحول الربط-التصالبي البثيد الأحلطي المرن إلى شكل بناء هندسي على شكل -كوب شديد التقيد الذي يعطي السطح المتمم ليتفاعل مع الهدف ن-أسيل - د-الأنين - د-الأنين N-acyl-D-Ala-D-Ala في نهاية ببثيدوغليكان جدار الخلية البكتيري.



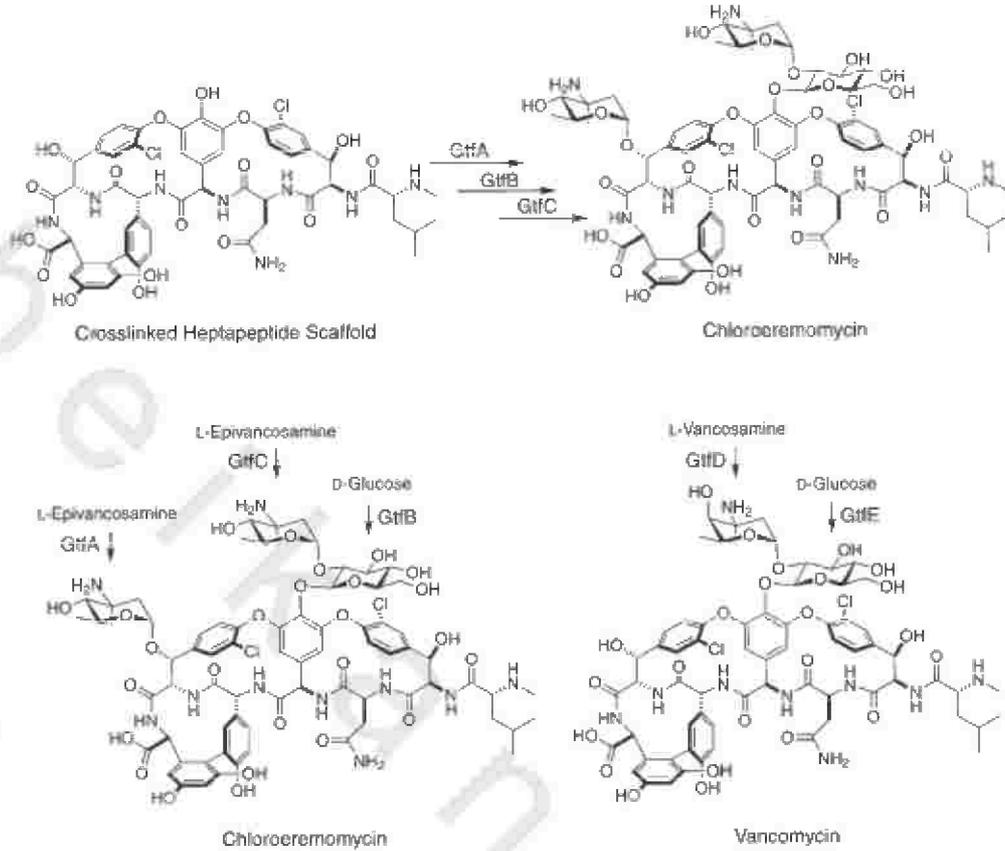
الشكل (١٣، ٢٢). الروابط - التصالبي المصلبة التي توصل سلاسل أريل في عائلة الفانكوميسين.

والربط-التبادلي ٢-٤ و ٤-٦ هما روابط أريل إيثر (aryl ether bonds)، في حين أن الربط-التبادلي ٥-٧ هو رباط C-C مباشر، ولكن بالإمكان صياغة كليهما كازدواج جذري لبيتا-OH كلورو-تيروسينات electron-rich β (OH-chloro-tyrosines) الغني بالإلكترونات (الفضالات ٢ و ٦)، ٤-OH-فينيل جليسين (4-OH-phenylglycine) (الفضالات ٤ و ٥)، ٣,٥-داي هيدروكسي فينيل جليسين (3,5-dihydroxy phenylglycine) عند الفضاة ٧ (الشكل ١٣.٢٣). في مجموعة كلورواروميسين، يوجد ثلاثة أنصاف بروتينات، 7 to 9 ORFs، وتوجد مشابهن في مجموعة باهليميسين (bahlimycin) المتورطة في عمليات الطرد الجيني (بيسكوف وآخرون 2001 Bischoff *et al.*) كحفازات الربط-التصالي. وهذه السيتوكرومات P450 المفترضة، تستطيع توليد جذور فينوليكس في السلاسل الجانبية لمواد البيثيد السباعي لتبدأ الروابط-التبادلية. وإذا كانت أنصاف البروتين (hemiproteins) الفردية حفازات لانتقائية موضع (regioselective) الربط-التصالي لم يحدد بعد.

والمجموعة الثالثة من إنزيمات النضوج هي غليكوزيلترانسفيرازات (glycosyltransferases)، ثلاثة (GtfA, GtfB, and GtfC) للثلاثة سكريات المراد إضافتها إلى كلورواروميسين واثنين (GtfE و GtfD) في مجموعة فانكوميسين للسكريات الاثني هناك (لوسي وآخرون 2001 Losey *et al.*، سولينبيرج وآخرون 1997 Solenberg *et al.*). يضاف السكر الأول لفينوليك-OH (phenolic-OH) من فضاة PheGly، ويدفن في الربط-التصالي ٦-٤-٢ (الشكل ١٣.٢٤) ويستعمل TDP-glucose كمادة مانحة مع GtfB كحفاز.



الشكل (١٣، ٢٣). آليات تخليق فينوكسي الجذري للربط - التصالي المتواسط - بانصاف البروتين المقترحة في عائلة فانكوميسين.



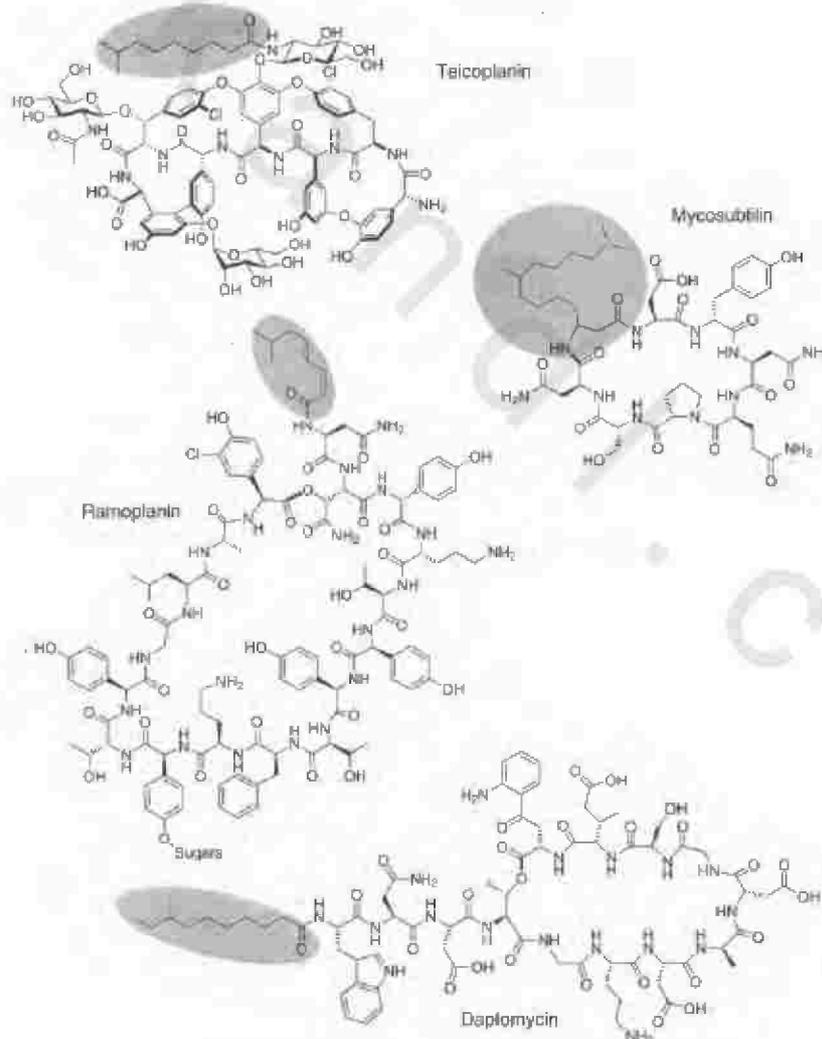
الشكل (١٣،٢٤). ثلاثة غليكوزيل ترانسفيرازات نوعية الموضع لحياكة أجلبكون في نضوج كلورواروميسين.

وهذا الببتيد السباعي المرتبط تصاليفاً من غلوكوزيل (glucosyl-cross-linked heptapeptide) هو الآن المادة الثانية لـ $[m\ hglahv;m\ hglh]m\ GtfC$ (for chloroeremomycin) $GtfC$. المادة المشاركة لمسار كلورواروميسين هي L-TDP بيتا - إيبيفانكوسامين (TDP-L- β -epivancosamine)، بينما في مسار فانكوميسين هي شطر TDP-L- β -vancosamine مع اختلاف فقط في تكوين C₄-OH في السكر. وشطر إيبيفانكوميسين/فانكوميسين ينقل إلى C₂-OH في مجموعة غليكوزيل، مكوناً رابطة ٢.١ ناي سكريد (1,2-disacchride linkage). وهذا يكمل البناء الحيوي للفانكوميسين، بينما يستعمل $Gtf(GtfA)$ الثالث في مسار كلورواروميسين جزئياً آخر من TDP-L- β -epivancosamine لعملية β -OH (epivancosaminylate) للفضالة السادسة في هيكل ببتيد ومنتج مضاد كلورواروميسين الحيوي.

والنوع الرابع من التعديلات في هذه العائلة من المضادات الحيوية تحدث فقط في الصنف الفرعي للتيكوبلانين ويتضمن أسلة (acylation) مجموعة أمينو لسكر واحد، جلوكوسامين. وسوف يتم شرحه في سياق عمليات أسلة أخرى لمضادات الببتيد غيرالريبوسومية أدناه. وفي تيكوبلانين تختلف الهوية ووضع السكريات، مع إن-أسيل أمينوجلوكوسيزات (N-acylaminoglucooses) على أكسجين فينوليك من $PhGly_4$ و β -OH-Tyr₆ ومجموعة مانوسيل (mannosyl group) على الفضالة ٧.

مضادات الببتيد الدهنية وجليكوببتيد الدهنية الحيوية

عدد من الببتيدات غير الريبوسومية هي ببتيدات دهنية بخاصية أسلة-إن (*N*-acylation) مع سلاسل أسيل الدهنية على مجموعة أمينو لفضالة الحمض الأميني الأول. ويشمل ذلك دابتوميسين (daptomycin)، راموبلانين (ramoplanin)، ميكوسوبتيلين (mycosubtilin)، وتيكوبلانين (الشكل ١٣،٢٥). ويامكان سلسلة أسيل أن تكون مستقيمة مشعبة (ميكوسوبتيلين)، مشعبة طرفياً (سورفاكتين surfactin)، وغير مشعبة (راموبلانين)، يعكس تكملة الأحماض الدهنية المصنوعة من هذه الكائنات المنتجة. ولقد تم نشر البناء الكامل لراموبلانين، مما يفتح الباب أمام دراسات النشاط-التركيبى (جيانج وآخرون 2002). ودابتوميسين في المرحلة ٣ للتجارب السريرية للعداوى المزجة-الغرام (انظر برونسون وباريت 2001 a). وتظهر مستبدلات بيتا أمينو-أسيل الدهني (β -amino fatty acyl)، كما في ميكوسوبتيلين وتصنع في الموقع (*in situ*)، كما هو مبين لاحقاً.



الشكل (١٣،٢٥). الببتيدات الدهنية المصنوعة بواسطة خطوط - تجميع ببتيد ستيلاز غير الريبوسومية.

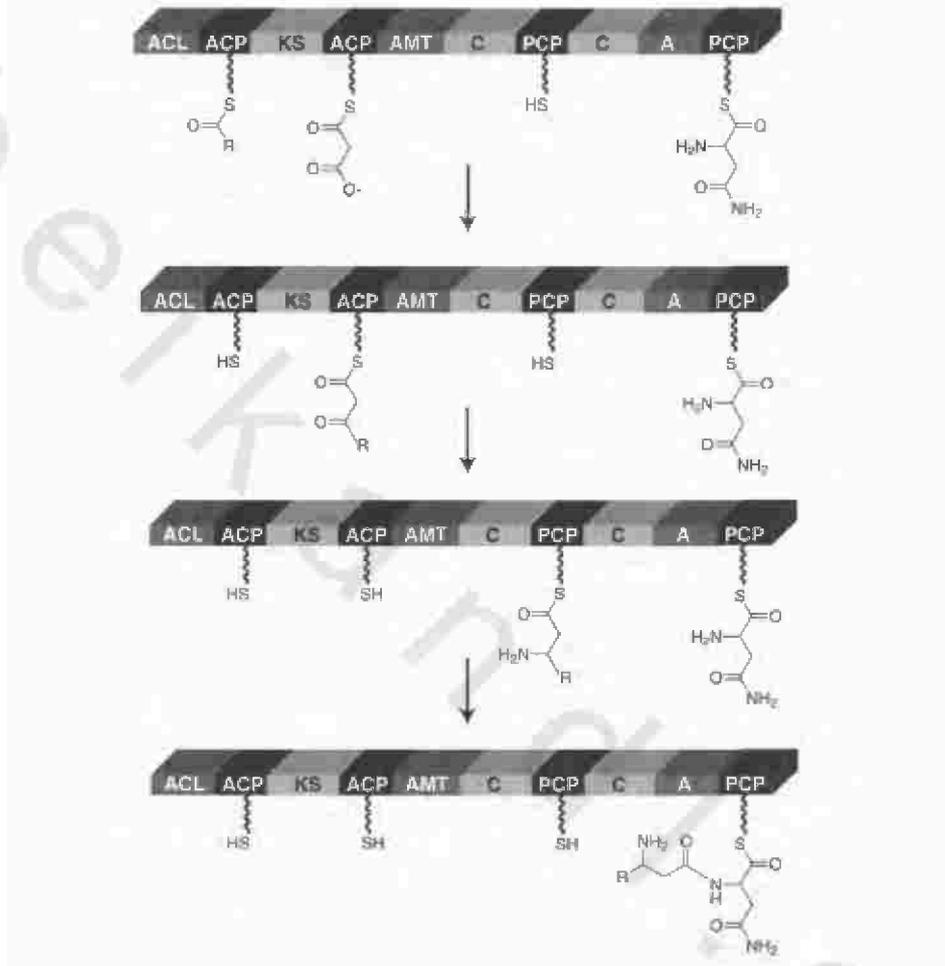
في معظم مجموعات الببتيد الدهني NRPS التي تم تسلسلها إلى اليوم، أسيل ترانسفيراز المسئول عن أسلة -غير منتهية - إن للحمض الأميني لا تتمين مع مجموعة (كتلة) البناء الحيوي ويعرف القليل عن نوعيتها (خصوصيتها). وفي حالة ميكوسوتيلين، الحقول الخمس الأولى للوحدة الفرعية MycA (الشكل ١٣،٢٦) تكون مكرسة لبناء مجموعة $C_{16}\beta\text{-NH}_2\text{-acyl group}$ (دوتمان وآخرون 1999, Duitman *et al.*). ويعتقد بأن حقل ليقاز أسيل أم ب acyl-AMP ligase ينشط بالميتيت (palmitate) ويفرسه على الحقل ٢، الواقع مباشرة عند مصب ACP_1 . وحقل ٣ هو كيتوسيتيز، حقل ٤ هو ACP_2 الذي يُحمل افتراضياً مع مجموعة مالونيل. التكتيف بواسطة كيتوسيتيز (ketosynthetase) سينقل سلسلة أسيل C_{16} ويصنع سلسلة $\beta\text{-keto-acyl-}C_{18}$ على ACP_2 . والحقل الخامس له تشابه مع أمينوترانسفيرازات (aminotransferases) ومن المحتمل أنه ينقل عبر الأمين (transaminase) $\beta\text{-keto-acyl-S-ACP}$ إلى بيتا-أمينو على حساب مادة الحمض الأميني المشاركة التي يجري أكسدتها إلى حمض كيتو.

يفترض بأن الحقل التالي، C_1 ، ينقل سلسلة أسيل إلى PCP_1 ومن ثم يكثفه C_2 فوق مجموعة أمينو من Asn_1 المربوطة عند PCP_2 لتعطي $N\text{-capped Asn-PCP}_2$.

ومن هنا تتواصل إطالة السلسلة بواسطة عمليات خط - تجميع - NRPS الطبيعية. وأسلة- N لنهاية N لهذه الببتيدات غير الريبوسومية لها تشابه مع فورميلة- N-formylation لنهاية N ميثونين في بناء البروتين الريبوسومي في البكتيريا، مما يفرض اتجاهية بما أن فورميلمثيونيل (formylmethionyl) يستطيع أن يعمل فقط كمانح، وليس مستقبل، في خطوة تكوين رابط-الببتيد. ومن المحتمل كذلك بأن الببتيد غير الريبوسومي N-acylations توفر مراسي للغشاء لتحدد موقع المنتجات عند واجهات الغشاء. الهدف لرامولانين هو الدهن II في البناء الحيوي لببتيدوغليكان، الذي هو في مثل هذا الموقع. السلسلة الدهنية في دابتوميسين يحتمل بأن تكون حاسمة (مهمة) لخواصها-المقلقة للغشاء. الاستعمال الثالث لسلاسل أسيل الدهنية $\beta\text{-OH}$ و $\beta\text{-NH}_2$ fatty acyl chains، مثال، سورفاكتين وفي مضادات الببتيد الدهنية الحيوية أيتورين (iturin)، هي أنها توفر ألياف النواة البين الجزئية في التحليق المتواسط ب TE كخطوات إنهاء في خطوط-تجميع NRPS. حلقة ماكرولاكتون من بيتا هيدروكسي أسيل الببتيد السباعي سورفاكتين هو من $\beta\text{-O fatty acyl}$ إلى الكربونيل من Leu_7 .

تعد أسلة تيكوبلانين التي تكمل تكوين مضادات غليكوببتيد الحيوية مميزة عن الأمثلة أعلاه. سلسلة أسيل ليست على نهاية N من هيكل الببتيد. وبدلاً عن ذلك فتوجد على مجموعة أمينو لسكر أمينو. ولم تحدد هوية أسيل ترانسفيرازات بعد، على الرغم من أنه من المحتمل أن تكون acyl-CoAS أو acyl-S-ACPs هي المواد المشاركة. وتوجد مشابهاً في البناء الحيوي للدهن A في البكتيريا السالبة-لغرام، حيث الفضالة GlcNAc ينزع منها الأسيتيل (deacetylated) إنزيمياً ومن ثم يعاد أسلتها (reacylated) بواسطة الإنزيم البنائي الحيوي مستعملاً السلسلة الطويلة acyl-S-ACP كمادة مشاركة.

المعالجة لسلاسل أسيل في كلا الشكلين من مضادات الببتيد الدهنية الحيوية ربما تكون أحد الطرق لتفاوت التركيب وتحسين الخواص ضد الكائنات المقاومة.



الشكل (٢٦، ١٣). آلية الأسلة-N عند النهاية N خط - تجميع ميكوسوبتيلين ستيثاز.

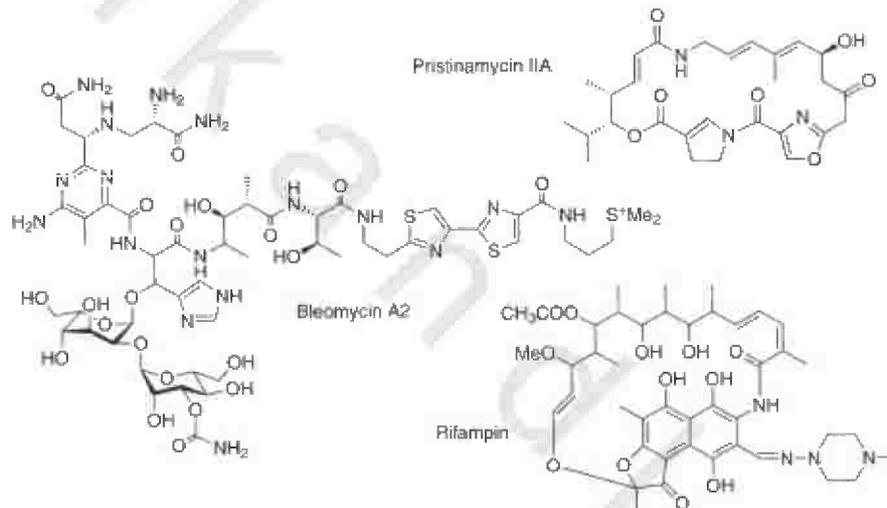
خطوط - تجميع مهجن NRPS-PKS: بريستيناميسينات (pristinamycins)،

ريفاميسين (rifamycin)، وبليوميسين (bleomycin)

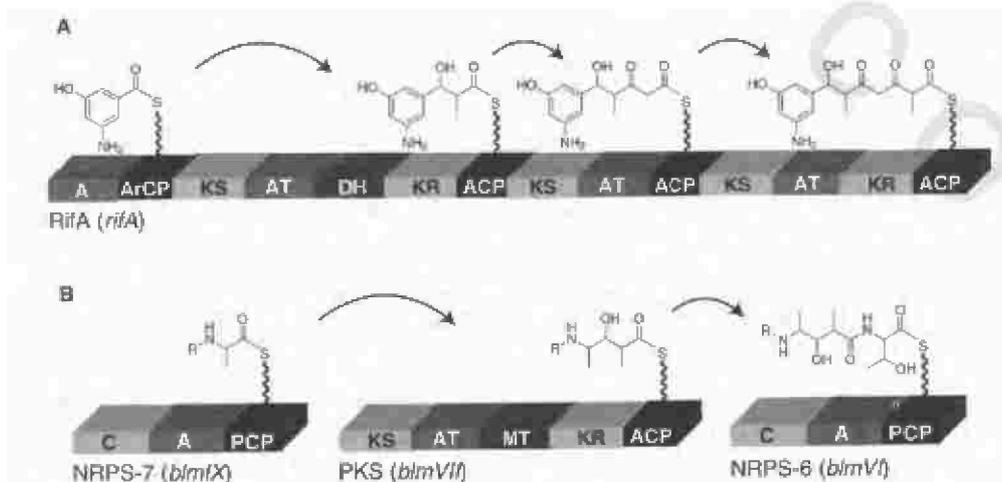
تعهد بعض المضادات الحيوية هجين للببتيدات غير الريبوسومية وبوليكتيدات (انظر دو وآخرون 2001، Du *et al.*)، وتشمل بريستيناميسين IIB، المضاد الحيوي المضاد للورم بليوميسين وريفاميسين (الشكل ٢٧، ١٣). المركبان الأوليان يظهران بوضوح جزء تراكيب من كل نوع من خط التجميع. ولبريستيناميسين IIB ثلاثة أحماض أمينية، Gly, Ser و Pro ومدفونة فيما بين امتدادات بوليكتيد. وبليوميسين له امتداد بوليكتيد قصير، مرمز بواسطة الوحدة الفرعية BLM VIII، المدفونة في تركيب الببتيد غير الريبوسومي. وريفاميسين، وإن كان يبدو أنه

مضاد بوليكتيد حيوي بواسطة المسح الضوئي لتركيبه، له وحدة بادئة ٣-أمينو-٥-هيدروكسي بنزويت (3-amino-5-hydroxybenzoate) (الشكل ١٣،٢٨) التي تنشط بواسطة بادئ-السلسلة ديدومين (didomain) الذي يعدُّ أدنلة (adenylation) وبرتين حامل أريل، مذكراً ببداية الببتيد غير الريبوسومي سيروفور سيثيتازات (siderophore synthetases) (أدميرال وآخرون 2001, *Admiraal et al.*).

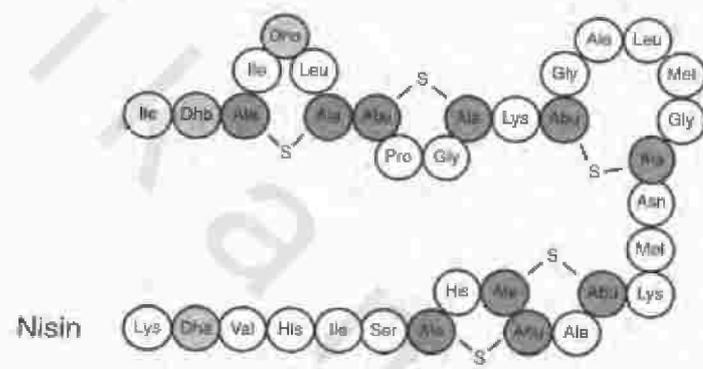
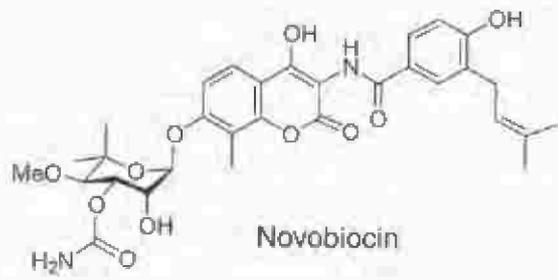
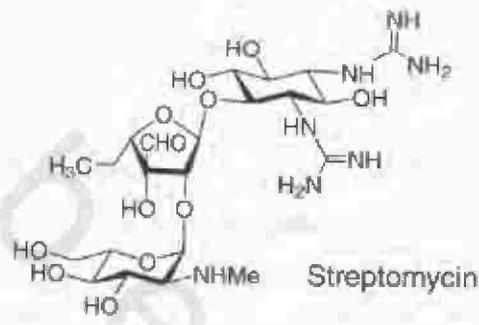
وفي هذه الحالات حيث جينات البناء الحيوي قد تم استساخها وتسلسلها، فخطوط-التجميع تمثل بالفعل فسيفساء (mosaic) لوحداث PKS وNRPD. وترتيب ووضع الوحدات يتنبأ بالبوليكتيد أو موحداث الببتيد غير الريبوسومية التي حصل وتم إختيارها ودمجها في سلاسل أسيل الهجينة بمجرد نموها ونقلها كسلسلة من وسائط إطالة acyl-S-(ACP/PCP) التساهمية.



الشكل (١٣،٢٧). هجين NRPS-PK: بليوميسين، بريستيناميسين IIA، وريفاميسين، العضو من عائلة ريفاميسين.



الشكل (١٣،٢٨). وحدات NRP و PK في خطوط-تجميع (A) ريفاميسين و (B) بليوميسين.



المضادات الحيوية المصنعة بتتوع