الفصل الخامس عشر

نظرات جديدة على الأهداف
NEW LOOKS AT TARGETS

تحديد أهداف جديدة من الجينوميات الجرثومية

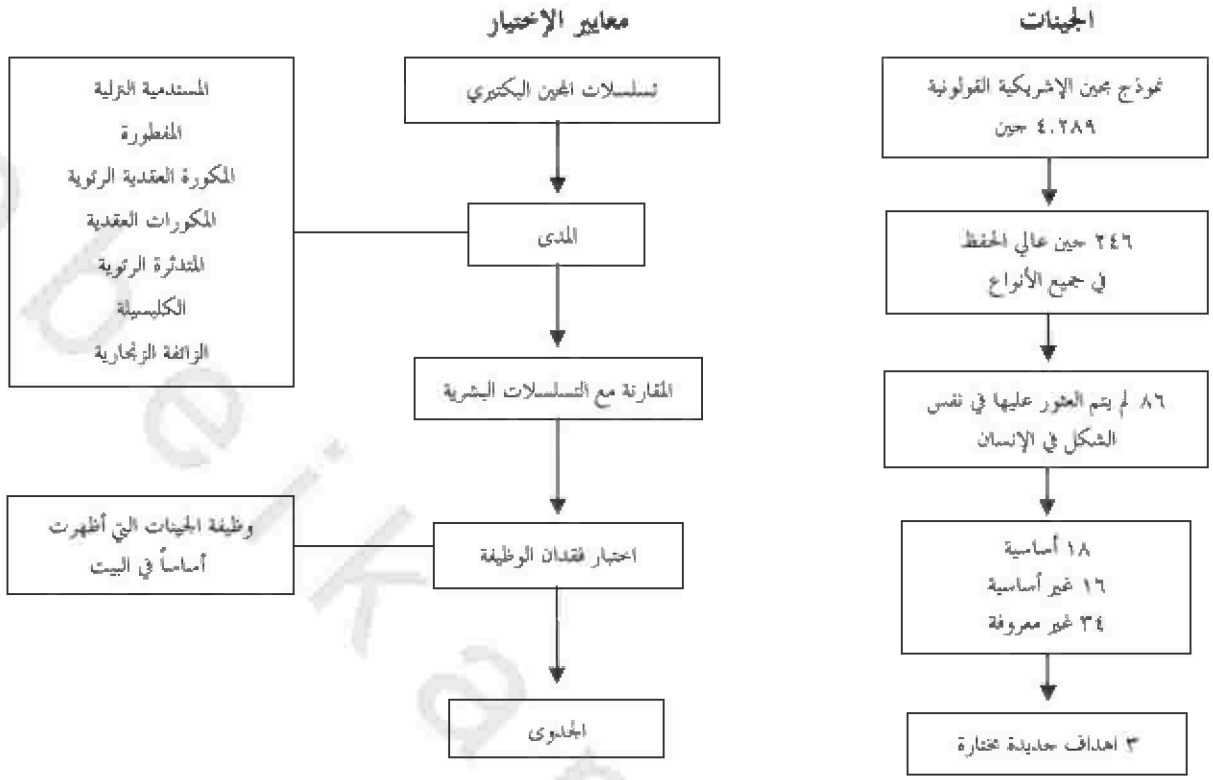
الهدف من إختيارات هدف المضادّات الجرثومية (البكتيرية) المعاصرة لزيادة الفرصة التي يمكن من خلالها إيجاد وتطوير أدوية جديدة إلى أقصى حد يبدأ مع المعلوماتية الحيوية للبحث عن أطر قراءة مفتوحة ((open reading frames (ORF المحفوظة عبر الكائنات الهدف البكتيرية المحتملة، من كل بكتيريا في الحالة الأكثر عمومية لجميع الكائنات الموجبة – لغرام أو السالبة – لغرام كأصغر الفئات التي ما تزال تستحق الهجوم. ومعيار المعلوماتية الحيوية الثانية المرغوبة هو أن يتم العثور على أطر القراءات المفتوحة انتقائياً في بدائيات النواة وليس في سويات النواة، وبالأخص سويات النواة العليا. المعيار الثالث المتفق عليه عموماً هو اختبار تجريبي هو بأن أطر القراءة المفتوحة ضرورية في واحد أو أكثر من المُمْرضات ذي العلاقة بواسطة بعض الطرد الوظيفي أو أسلوب الاستئصال. تعدُّ الجينات التي تمر هذه الفلاتر أفضل المرشحين للذهاب إلى فحوصات عالية – الإنتاجية لتوليد الضربات الأولية. والفحوصات ربما تشمل مقايسة النشاط الإنزيمي إذا كانت واحدة قد أُنشئت أو ربط الربيطة، مثال، تغيير الفلورية (fluoresecence change) أو الحماية ضد الحراري أو الإتلاف (التمسخ) المحفز – بتشاتروب (chaotrope-induced denaturation). وبما أن المركبات في المكتبات غير محسّنة، فقط الانجذابات المعتدلة يتوقع أن تكون في الفحوصات الأولية، وهكذا تتعين التراكيز للكشف عن بعض عتبات (حدود) (threshold) التثبيط أو الربط، مثال، 10 µM. يعاد فحص الضربات الموجبة، ويعاد تصنيعها، وتُختبر في المقايسات الثانوية إذا كانت متوفرة، وبعد ذلك تكون كنقاط انطلاق للكيمياء الموجهة، إما جهود مكتبة صغيرة ومُركّزة وإما تفصيلات جزيء – مفرد لزيادة الفعاليّة في مدى جزء من بليون من المتر (نانومولر) (nanomolar).

تسلسل الجينوم الكامل لمعظم وإن لم يكن لجميع المُمْرضات البكتيرية الرئيسة التي تم العثور عليها خلال السنوات النصف – درزينة الماضية حوَل الأمراض المعدية تماماً في جميع أنحاء المنطقة المستهدفة. من حقل البحث

والتحري الذي كان بشكل فعال هدف ضعيف على مدى العقود الثلاث الماضية (عرقلة الببتيدوغليكان (PG)، تثبيط الريبوسوم، دنا غيراز)، والآن هناك ما لايقل عن الإحراج (العائق) المؤقت لثروات الهدف، مع درزينات إلى مئات من منتجات الجين المرشحة كأهداف جديدة.

التحليل المعلومات الحيوي لأكثرمن ثلاثة درزينات من المجينات الجرثومية المعروفة (كما في يونيو ٢٠٠١م، ٤١ مجين جرثومي أدرج في قاعدة البيانات الجرثومية لمعهد البحوث المجينية) (The Institute for Genomic Research's microbial database) للبحث عن الأهداف المعروفة في واحد او أكثر من الكائنات الدقيقة لتكون ضرورية للبقاء على قيد الحياة، عالية الحفظ عبر مدى واسع من المُمْرضات البكتيرية وإما غائبة أو متميزة في البشر (انظر روسامونڈ وآلسوب Rosamond and Allsop, 2000، للمراجعة). واحد القيود لتحديد الجينات المحفوظة غير المعروفة الوظيفة هي فشل الشرح للوظيفة المفترضة بواسطة التناظر (التشابه) ولكن التحسينات في الطرق الحسابية ستواصل قيادة الجينات غير المعروفة إلى كسر (جزء) صغير جداً الذي بالإمكان اختباره تجريبياً. حتى في حالة عدم وجود وظيفة جيدة – الوصف، مختلف النهج الوراثية، مثال الطفرات الحساسة – للحرارة أو الطفرات الموسومة – بالتوقيع، لتسمية اثنين فقط (هينسيل وآخرون Hensel *et al.*, 1995) يمكن أن تنشئ الأساسية للبروتين وتصادق على صحته للفحص. ولاحظ روسامونڈ وآلسوب (Rosamond and Allsop, 2000) مثال (الشكل ١٥,١)، حيث ٤,٢٨٩ جينات من الإشريكية القولونية تمت مقارنتها ضد مجينات سبعة ممرضات تسبب – المرض التنفسي (وتشمل الزائفة الزنجاؤية، المستدمية النزلية، والمكورة العقدية الرئوية) لتعطي ٢٤٦ جينات محفوظة عبر جميع هذه البكتيريا، ومن ضمنها ٦٨ جيناً كان غائباً من البشر. ونصف هذه الجينات (٣٤/٦٨) كانت غير معروفة الوظيفة وقت الحليل، ١٦ إتضح بأنها غير أساسية و ١٨ كانت أساسية، وتشمل الأهداف المعروفة لمضادّات الكوينولونات وماكروليد الحيوية. وفي ضوء المثال المذكور، تم انتقاء ٣ من ١٨ جينات كأهداف للفحص للبحث عن أدوية مضادة بكتيرية جديدة للجهاز التنفسي.

ولقد تم الشروع في تحديد هوية ١٥٠ جيناً أساسياً لقابلية الحياة (viability) في الممرض الأساسي المكورة العنقودية الذهبية جهازياً بواسطة التعبير عن مضاد حسي رنا (antisense) RNA لاستئصال وظيفة الجين (جاي وآخرون Ji *et al.*, 2001) . ولقد تم التعبير عن المضاد الحسي رنا antisense RNA تحت تحكم المحرضات المدفوعة – بتتراسيكلين، كما أن وجود أو غياب تتراسيكلين سمح بالتعبير عن النمط الظاهري المشروط، ويسمح بإنتعاش (استرداد) المتنسخات (النسيلات) (clones) التي توقت في وجود المضاد الحسي رنا antisense RNA. وحوالي ٣٠٪ من الجينات المكوراتية العنقودية التي ظهرت بأنها حرجة كانت غير معروفة الوظيفة، و٣٠٪ كانوا مشابهين للجينات مع الوظيفة المقترحة والـ ٤٠٪ الباقين كانوا جذوع سوية (orthologs) للجينات البكتيرية المعروفة بأنها أساسية.



الشكل (١٥,١). مثال للمنهج المستند – على الجينوميات للأهداف الجديدة للأدوية المضادة البكتيرية في عداوى الجهاز التنفسي. (بالإذن من روساموند و آلسوب Rosamond and Allsop, 2000).

داخل سلالات الإشريكية القولية نفسها سيكون هناك تباين كبير في الجينات التي تستطيع أن تسهم في الإمراضية. ففي *E.coli* O157: H7، ١,٣٨٧ من ٣,٥٧٤ من الجينات (بيرنا وآخرون Perna *et al.*, 2001) تختلف عن سلالة الإشريكية القولونية التي سبق تسلسلها MG1655، التي وُزعت في مئات الجزر الجينية حيث تم خلط دنا بواسطة النقل الأفقي للجينات، ومشددةً على النشوء التأشيبي (recombinational evolution) في المجينات البكتيرية المعوية. وستكون هناك حاجة إلى المزيد من بيانات تسلسل المجين من سلالات الإشريكية القولونية والتوصيف الوظيفي للعديد من ORFs التي ترمز عوامل الفوعة المفترضة (السموم، الالتصاقات، الإنزيمات، أنظمة الإفراز من النوع III ... إلخ)؛ لفرز الأهداف المفضلة في السلالات العالية الإمراضية.

التسلسلات المجينية لسلالات المكورة العنقودية الذهبية المقاومة للمشسيلين مرسا N315 (MRSA) وسلالات المكورة العنقودية الذهبية المقاومة للفانكوميسين Mu50 (VRSA) من العزلات السريرية في اليابان (كورودا وآخرون Kuroda *et al.*, 2001) (انظر الفصل السابع) سمحت برؤية واسعة لأهداف المضادّات الحيوية المحتملة وكشفت عن حوالي ٧٠ مُرشّحاً (من أصل ٢,٦٠٠ جين) لعوامل الفوعية الجديدة أو الإضافية والتي قد تمكن سلالات المكورة العنقودية الذهبية

المقاومة لتكوين مُمْرضات فعالة للإنسان. وعلى سبيل المثال، اثنان من البيتيدوغليكان ترانسغليكوسيلازات الأحادي الوظيفة (PG monofunctional transglycosylases) المفترض (*sgtA* and *sgtB*) قد تكون أهدافاً لمقايسات لمثبطات جديدة (انظر الفصل السادس عشر)، جنباً إلى جنب مع المشغِل الذي من المحتمل بأن يسمح للمكورة العنقودية الذهبية للنمو عند 3.5 M ملح، المتطابق الجزيء للتسمم الغذائي بواسطة هذه البكتيريا. اثنان من بروتينات ربط القالب خارج الخلية الكبيرة من 722kD، و421kDa ربما تتواسط التصاق المكورة العنقودية الذهبية مع نسيج صمامات القلب في التهاب الشغاف. مجموعة كبيرة من جينات السم الخارجي والسم المعوي تؤوي داخل الجزر الإمراضية في كروموسوم المكورة العنقودية الذهبية، والتي يمكن تقييمها لوظيفة مستضد فائق (ممتاز) (superantigen) في متلازمات الصدمة السمية (toxic shock syndromes)، مرض كواساكي (Kawasaki's disease)، ومختاف الاستجابات الالتهابية التي تسببها هذه الإمراضيات.

وبالمثل، التسلسل الجينومي للسلالة الفوعية من المكورة العقدية الرئوية وقد أدى ذلك إلى اقتراح أهداف جديدة، تشمل بروتينات السطح، كلا البروتينات الدهنية وتلك التي تمت ترسيتها عن طريق عمل سورتاز (sortase)، والتي يمكن أن تكون مرشحة لتطوير اللقاح (تيلين وآخرون Tettelin *et al.*, 2001). وإنزيم سورتاز هذا في البكتيريا الموجبة – لغرام الذي يرسّي تساهمياً بروتينات الغشاء الخارجي أو السطح إلى PG عند LPXTG زخارف السلسل الأولي سوف يتم مناقشته لاحقاً في هذا الفصل وفي الآونة الأخيرة أجري الأسلوب – المدفوع بالجينات لتحديد هوية مثل هذه البروتينات مثل مرشحات الفوعية في المكورات العقدية من المجموعة A (group A streptococci) (ريد وآخرون Reid *et al.*, 2001) وتوصلت إلى ١٢ جيناً يُرمزون مثل زخارف LPXTG. نصف الجينات كانت منتظمة في مرحلة الثبات (stationary phase) و٩ من ١٢ نظمت بواسطة عناصر انتساخ جين الفوعية. وأخيراً، في إظهار البروتينات الاثني عشر والتحليل المناعي مع مصل من الأفراد الذين سبق لهم الإصابة بعداوى المكوراتية العقدية المجموعة A، تفاعلت ١٢ من ١٢ من البروتينات، مما يشير إلى الإظهار (التعبير) كمستضدات أثناء كورس العدوى في البشر. وهؤلاء من الممكن أن يكونوا مُرشّحين لتطوير اللقاح و/ أو أهداف مضادة جرثومية.

وبالإضافة إلى تكرارات الأساليب الحاسوبية لتوصيل الجينات الجرثومية الأساسية غير المعروفة مع البروتينات معروفة الوظيفة، الجهود الجينية التركيبية عالية الإنتاجية (إيرلاندسين وآخرون Erlandsen *et al.*, 2000، ميتل وجروتير Mittl and Grutter, 2001) تجري حالياً لحل تراكيب أشمة – إكس للمئات إلى الألوف من البروتينات وتصنيفها حسب أسلوب البناء الملاحظ وأضعافها بدلاً من التسلسل الأولي وتنبؤ التركيب الثلاثي. وفي غياب الوظائف المتوقعة للقياس، هناك مقايسات عالية – الإنتاجية التي لا تتطلب نشاطاً معروفاً أو ربيطة معروفة التي من الممكن تثبيط ربطها بواسطة المركبات المكتشفة والموجهة المحتملة. وعلى الأصح، يمكن للمرء أن يستخدم الربيطات الفلُورية أو التدوير أو الحراري أو حماية الإتلاف لإيجاد مثبطات محكمة الربط في مركب مكتبات

البروتينات غير المعروفة الوظيفة. ومن ثم يمكن اختبار الربيطات المرشحة في فحص كل الخلية لرؤية ما إذا كان هناك تأثير مثبط للبكتيريا أو مبيد للبكتيريا. وبعد ذلك يمكن استعمال المركب الفعال بكفاية لتشريح الآلية (مثال، جدار الخلية، البروتين، أو تثبيط بناء دنا ومن ثم التصفير (zeroing) في خطوات معينة في تلك المسارات). السبيل الثالث لتحديد هوية الأهداف المحتملة هو استخدام رقائق الصف الدقيق للمجين البكتيري (bacterial genome microarray chips)، أوتنميط التعبير الجيني (انظر ملك ديفيت ورزينبيرج McDevitt and Rosenberg, 2001، بيرجيو وهوتش Pergeo and Hoch, 2001) لتقييم مستويات Mrna الأكثر وفرة تحت مختلف الظروف، مثال، التعرض للمضادّات الحيوية من مختلف الأصناف، أو المضادّات الحيوي الجديدة، لكتالوج الجين الأكثر تضرراً. وعلى سبيل المثال، تأثيرات إضافة الدواء المضاد للدرن (antitubercular drug) على إظهار جين المتفطرة السلية (*Mycobacterium tuberculosis*) قد تم تقييمه (ويلسون وآخرون Wilson *et al.*, 1999) على رقائق دنا تغطي ٩٧٪ من مجين الدرن وترفع إنزيمات البناء الحيوي للحمض الدهني (fatty acid cynthetase) وتريهالوز دي ميكوليل ترانسفيراز (trehalose dimycolyltransferase) (انظر الشكل ١٥,٢٠ و ١٥,٤ ، بالترتيب) الملاحظة.

يصور الشكل (١٥,٢) عملية نموذجية من ثلاث مراحل للأساليب المستندة على المجينات نحو الأدوية المضادة الجرثومية، وتشمل إختيار الهدف، تحديد هوية المركبات الموجهة، والموجهات المثلى (روساموند وآلسوب Rosamond and Allsop, 2000).

وإكمالاً للنهج الجيني لتحديد الجينات الأساسية هي المقايسات للجينات المطلوبة للمُمْرضات البكتيرية لإنشاء العداوى في الفقاريات . وبذلك فهناك مجموعات من الجينات يمكن الاستغناء عنها في البكتيريا التي تنمو في أطباق بتري (petri plates) التي أصبحت ضرورية لهم للبقاء في العداوى في الحيوان والإنسان. وأحد الأساليب لتحديد الجينات التي تم اظهارها انتقائياً في الجسم الحي والمطلوبة للفوعية البكتيرية هي تقنية الإظهار (التعبير) في الجسم الحي (ماهان وآخرون Mahan *et al.*, 1993، ماهان وآخرون Mahan *et al.*,1995)، التي تثري البكتيريا التي تشغل جينات معينة التي تساعدها على البقاء والتكاثر (التضاعف) أثناء العداوى في الحيوانات (انظر شوبرا وآخرون Chopra and Roberts,1997). وعلى سبيل المثال، تشمل هذه الجينات التي تشغل البناء الحيوي وإعادة الامتصاص الموجه لمستخلب الحديد البكتيري بما أن المضيفات الفقارية تملك جميع الحديد المتاح مقيد بين الخلية أو مرتبط مع ترانسفيرين (transferring) في الفراغات خارج الخلية. ويبقى أن نرى إذا كانت المضادّات الحيوي التي تستهدف جينات الفوعية سوف تكون فعالة في العيادة وهل سيكون هناك انخفاض في تواتر تطوّر المقاومة.

لقد تم حديثاً وصف استعمال مُحرضات تتراسيكلين لتوليد الأنماط الظاهرية المشروطة لتثبيط رنا antisense للجينات الأساسية لتشغيل ١٥٠ جيناً في المكورة العنقودية الذهبية (جاي وآخرون Ji *et al.*, 2001). ولقد تم هندسة السلالات البكتيرية لتنظيم مستويات الإظهار للجينات المستهدفة (انظر تراياس ويوان Trias and Yuan, 1999؛

لزيادة الحساسية للبروتين المُظهر للمثبطات المرشحة. وقد عثر دي فيتو وآخرون (DeVito *et al*.,2002) على صفوف لفحص سلالات ذات هدف – محدد تمت هندستها لتعظيم الحساسية للبروتينات المستهدفة مثل إنزيمات هليكازات دنا DNA helicases، البروتين الحامل لإينوا أسيل ريدكتاز (enoyl-acyl carrier protein reductase) (ACP)، دنا غيراز، دايهيدرو فوليت ريدكتاز (dihydrofolate reductase)، ومنتج جين MurA (الفصل الثالث) للفحص الموازي.

توخي الموجهات المثل ← تحديد المركبات الموجهة ← تطوير الفحص ← إختيار الهدف

الأدوية المرشحة	ترقيع (توليد) الموجهات وتوخي الموجهات المثل	الفحص الفائق الإنتاجية	نشاط الإنزيم المحدد ربط الربيطة	تحديد هوية الأهداف المحتملة (منتجات الجين الأساسية أو النوعية)
	القوة في المرض	المقايسات الثانوية / MOA	المسوخ غير النوعي التدوير الحراري	التحقق من الهدف
	الحركيات الدوائية علم السموم المبكر	المركبات المكتشفة المركبات الموجهة	لا يوجد: الفحص بواسطة مكتبة المركبات الفلورية	اختيار الهدف

الشكل (١٥,٢). الأساليب الجينية للأدوية المضادة الجرثومية. (بالإذن من روساموند وآلسوب Rosamond and Allsop, 2000.

نظرات جديدة لبعض الأهداف القديمة

وبينما يجري التوصل إلى أهداف جديدة بواسطة الاستقصاءات المدفوعة – بالجينات، الزيادة في المعلومات الجزيئية حول التراكيب الجرثومية والماكينة الجزيئية لتوفير سبل جديدة لتطوير المضادّات الجرثومية مع التركيز على جوانب مختلفة للأهداف المعقدة والمقايسات المحسّنة وتعزيز النوعية والإنتاجية.

أولاً، لاحظنا بعض المظاهر في مناطق الهدف التقليدي الموثق في البناء الحيوي لجدار الخلية، البناء الحيوي للبروتين، وتكرار وترميم الـ دنا ومن ثم تحديد بعض الأهداف غير التقليدية التي تستحق اهتمام جديد. ولقد راجع بوول Poole, 2001، مك ديفيت وروزينبيرج McDevitt and Rosenberg, 2001، وشوبرا وآخرون Chopra and Roberts, 1997 بعض من هذه الإستراتيجيات.

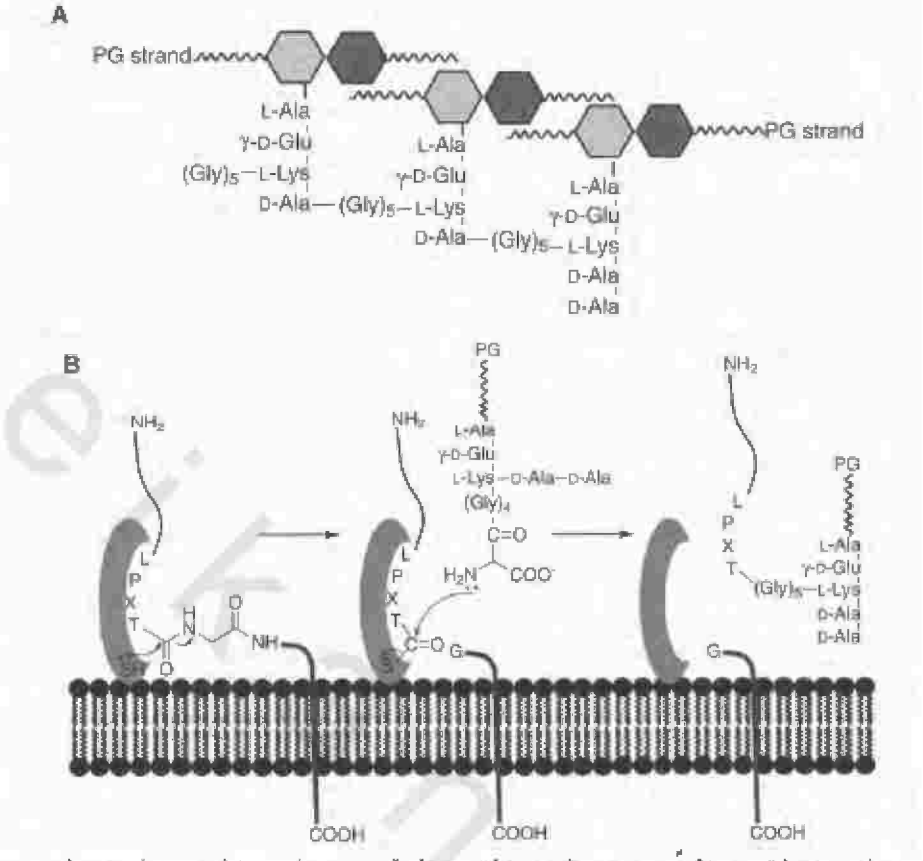
مثبطات البناء الحيوي لجدار الخلية

توجد العديد من التطوُّرات في مجال جدار الخلية وغشاء الخلية التي تستحق البحث.

سورتاز المكورائية العنقودية وA85 المتفطري (staphylococcal sortase and mycobacterial A85)

في البناء الحيوي لطبقة الببتيدوغليكان للمكورات العنقودية المُمْرضة، الجسر التبادلي للبِبْتيد البيني (interpeptide cross bridge) ليس مباشراً بين Lys_3 على سلسلة واحدة و$D\text{-}Ala_4$ على سلسلة البِبْتيد المجاورة، ولكن يشمل جسر جليسين الخماسي (pentaglycin bridge) (الشكل ١٥,٣ A). وتوضع هذه الجليسينات (glycines) في

الداخل بواسطة جينات *fem* التي تعدُّ أهداف مساعدة في MRSA (بيرجر باتشي وتشريسكي Berger-Bachi and Tschierske, 1998)، على الرغم من أنه لم يتم بعد العثورعلى مثبطات محددة. وبروتينات السطح المستضدية الرئيسة، بروتين M من المكورة العقدية القيحية *(S.pyogenes)*، العامل المسبب لالتهاب البلعوم (pharyngitis) والآفات الجلدية، وبروتين A من المكورة العنقودية الذهبية، تربط تساهمياً مع جسرغليسيل الخماسي (بنتاغليسيل) (pentaglycyl bridge) خلال شطر LPET- لنهاية –C للببْتيد الرباعي (C-terminal tetrapeptide-LPET moiety) (نافاري وتشينويند Navarre and Scheenwind, 1999). وأظهر تسلسل مجين سلالة N315 MRSA (كورودا وآخرون Kuroda *et al.*, 2001) كثير من بروتينات السطح التي تعدُّ ركائز لسورتاز ويحتمل بأن لها وظائف التصاق (adhesion)، ترتبط مع بروتينات القالب الخارج الخلية في أنسجة المضيف وتمكّن المكورة العنقودية الذهبية بأن تسبب التهاب العظم والنقي (osteomyelitis) والتهاب المفصل الإنتاني (septic arthritis). عرقلة إنزيم الإرتباط التساهمي، المسمى سورتاز، ربما تكون إستراتيجية واعدة لتقليل الفوعية في العداوى المكوراتية العنقودية. وإنزيم سورتاز، الذي تم تحديد تركيبه حالياً وبذلك قد يساعد تصميم الدواء المستند على – التركيب (إلانجوفان وآخرون Ilangovan *et al.*, 2001)، هو ترانسببتيداز (transpeptidase)، يعمل على الفراغ حول – الجبلة مع نوعية لطلائع بروتينات سطح – الخلية للبكتيريا الموجبة –لغرام التي لها تسلسل LPXTG بحوالي ٣٠ – ٤٠ فضالات من النهاية C للبروتين (مازامانيان وآخرون Mazamanian *et al.*, 1999). ويفلق سورتاز الطليعة (الشكل B١٥,٣) عند رابط ببتيد T-G، مطلقاً قطعة (شظية) النهاية –C ومولداً إنزيم أسيل التساهمي. ويؤسر وسيط acyl-LPXT هذا بواسطة مجموعة امينو من سلسلة Gly_5 من خيط ببتيدوغليكان، محرراً الإنزيم لدورة ترانسببتيداز حفَازة أخرى، ويقيد تساهمياً سلسلة البروتين مع خيط الببتيدوغليكان خلال جسر غليسين الخماسي. ونظراً لأن سورتاز يستعمل نفس نوع منطق التفاعل كترانسببتيداز الحساس للبنسيلّين، فإنه ينبغي أن يكون من الممكن التوصل إلى مثبطات فعالة ومحددة لسيستين هيدروليز نشط –الموقع (active-site cysteine hydrolase) (تون – ذات وآخرون Ton-That *et al.*, 1999). ولقد كشف تحليل المعلوماتية الحيوية (بالين وآخرون Pallen *et al.*, 2001) عن توزيع واسع النطاق لسورتازات المفترضة وركائز (مواد) بروتين سورتاز في البكتيريا الموجبة – لغرام وسورتازات المتعدِّدة داخل المجينات. ويتوقع بأن يكون لمجين المتسلسلة كوليكولرسبعة سورتازات مما يوحي إما بتداخل جزئي لرسو ترانسببتيداز سطح – الخلية للبروتينات وإما وظائف أخرى.

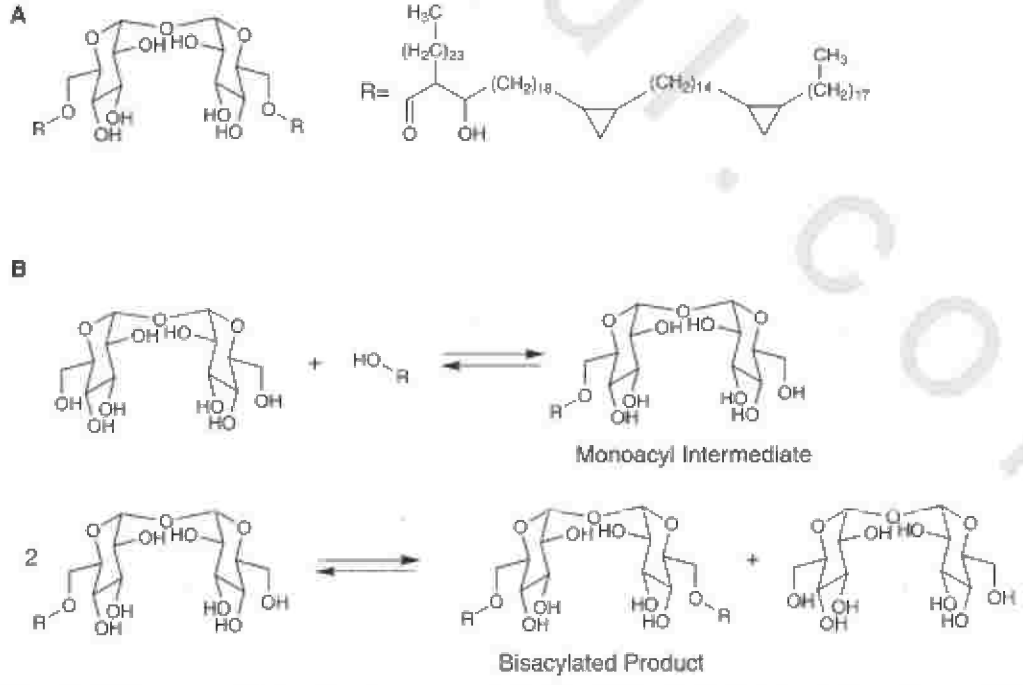


الشكل (١٥,٣). عمل سورتازليقيد تساهمياً بروتينات الغشاء الخارجي إلى تمديدات جليسين الخماسي على خيوط بيتيدوغليكان للمكورة العنقودية الذهبية: (A) خيوط بيتيدوغليكان المحتوية على جليسين الخماسي، (B) إنفلاق تسلسل LPTXG في ركائز البروتين الطليعة وترانسبيتيديشن بواسطة سورتاز. (بالإذن من مازامانيان وآخرون Mazamanian *et al.*, 2001).

وفي منطق جزيئ مشابه، ربما يكون أسيل ترانسفيراز في البناء الحيوي لجدار الخلية في المتفطرة السلية لتريهالوز داي ميكوليت (trehalose dimycolate) (الشكل A١٥,٤) هدف جديد واعد للمعالجة لمضادّات الدرن. يكوّن المعقد المكون من ٣٠- إلى kDa - ٣٢ ميكوليلترانسفيرازات (mycolyltransferases) (Ag85A,B,and C) (بويتش وآخرون Puech *et al.*, 2000) مكونات بروتين رئيسية لجدار الخلية المتفطرية الشمعي. ويبدو بأنها تعمل كبروتينات رابطة لنيكتين الليفي (فيبرونيكتين) (fibronectin) لمساعدة المتفطرات لدخول الخلايا البلعمية الكبيرة (macrophages). كما أنها تنقل السلسلة-الطويلة ألفا-ألكيل (α-alkyl)، وسلاسل بيتا-هيدروكسي أسيل الدهني (*β*-hydroxy fatty acyl) (الميكوليل) (the mycolyl) إلى 6-OH لتريهالوزالسكريد الثنائي (disaccharide trehalose) لتنتج ترهالوز ميكوليل الثنائي (dimycolyl trehalose)، عن طريق وسيط تريهالوز أحادي ميكوسيل (monomycosyl trehalose intermediates)، عند السطح الخارجي لجدران الخلية (الشكل B ١٥,٤) (ساثيمورثي وتاكاياما Sathymoorthy and Takayama, 1987). وعرقلة النشاط الإنزيمي هذا قد يزيل حاجز النفاذية الرئيسي تجاه عدد من المضادّات الحيوية.

وكشف تحليل أشعة – إكس لـ Ag85C بأنه عضو من العائلة العليا سيرين ألفا، بيتا هيدرولاز (α,β-hydrolase) ذات الموقع النشط–سيرين. وهذا يتوقع وسائط إنزيم mycolyl-*O*-Ser acyl enzyme intermediates، مثل ترانسبيتيدازات لجدار الخلية وسورتازات المذكورة أعلاه، التي بالإمكان إستهداف تشكيلها وكسرها ميكانيكياً. والإستراتيجيات الرامية لمعوقات تفاعلات Ag85-fibronectin ربما تكون مبينة أيضاً.

تملك المتفطرات جسور أرابينوجالاكتان (arabinogalactan bridges) التي توصل طبقة الببتيدوغليكان مع أحماض ميكوليك (الأحماض الفطرية) (mycolic acids) (بيرسا وآخرون Bersa *et al.*, 1995) الذي فيه يكون جالاكتوز (galactose) في الحلقة–الحرة فيورانوز (Gal_f) (free-ring furanose) بدلاً من الشكل الشائع بيرانوز ذا الست – حلقات (six-ring pyranose). الصلة بين سلاسل أرابينوجالاكتان وطبقة ببتيدوغليكان يتم توفيرها بواسطة -1,3-L rhamnosyl-GlcNAc disaccharide، والإنزيمات التي تحوّل dTDP-D-glucose إلى dTDP-L-rhamnose ربما تكون الأهداف المضادة البكتيرية في المتفطرة السلية (ما وآخرون Ma *et al.*, 2002). يعتبر الإنزيم البنائي الحيوي UDP-جالاكتزبيرانوز ميوتاز (UDP-galactopyranose mutase) أساسي لعيوشية (حيوية) الخلية في المتفطرة سميجماتيس (*M.smegmatis*). ويوجد Gal_f كذلك في مستضدات -O لسلاسل عديدالسكريد الدهني للغشاء الخارجي من البكتيريا السالبة – لغرام. ولقد تم حل تركيب أشعة – إكس لميوتاز (mutase) من الإشريكية القولونية (ساندرز وآخرون Sanders *et al.*, 2001)، موفراً نظرة ثاقبة لحفّاز فلافوبروتين هذا وإعداد المرحلة لفحص وتصميم المثبط.



الشكل (١٥,٤). عمل إنزيم المتفطرة السلية ميكوليل ترانسفيراز Ag85: (A) تريهالوز دايميكوليت، (B) تفاعل نقل ميكوليل.

GlmU: الإنزيم ثنائي الوظيفة المولّد UDP-GlcNAc

لاحظنا في الفصل الثالث بأن فوسفوميسين يثبط الإنزيم الأول في مسار البناء الحيوي لببتيدوغليكان. وMurA الذي يحفز عملية إينول بيروفيشن (enolpyruvylation) لمسار تصنيع سكر نيوكليوسايد UDP-GlcNAc. ويُنتج UDP-GlcNAc في تسلسل — خطوتين (GlmU) من جلوكوسامين-1-P (glucosamine-1-P)، الذي بدوره يتولد من المستقلب الأولي fructose-6-P (بواسطة الأمّنة من المادة المشاركة جلوتامين (GlmS) وبعد ذلك تحويل glucosamine-6-P إلى glucosamine-1-P بواسطة GlmM mutase) (للمراجعة، انظر فان هيجينورت van Heijnoort, 2001b). يعدُّ الإنزيم GlmU ثنائي الوظيفة في العديد من البكتيريا، مع حقلين مستقلين، الذيْن يحفزا أولاً N-acetylation، عن طريق acetyl-CoA، ومن ثم نقل الشطر UDP فوق ١-فوسفيت لينتج UDP-GlcNAc (جيهرينج وآخرون Gehring et al., 1996). وبسبب أن UDP-GlcNAc هو المستقلب الرئيس، فالجين الأساسي هو *glmU*، وفي البكتيريا السالبة-لغرام يعد UDP-GlcNAc مستقلب نقطة الفرع، ويعمل كطليعة لكل من البناء الحيوي لببتيدوغليكان ومكونات الغشاء الخارجي: الدهن A وسلاسل مستضد -O. وحتى الآن لم يتم العثور على مثبطات نوعية فعالة لأي من نشاط حقل أسيل ترانسفيراز أو نشاط حقل نقل يوريديليل (uridylyl) لـ GlmU. ولقد تم وصف التركيب الكريستالي (crystal structure) لمثلوث GlmU(trimer GlmU) للمكورة العقدية الرئوية (كوستريوا وآخرون Kostrewa *et al.*, 2001)، مجيزاً طرق التركيب/الوظيفة وكذلك الفحص.

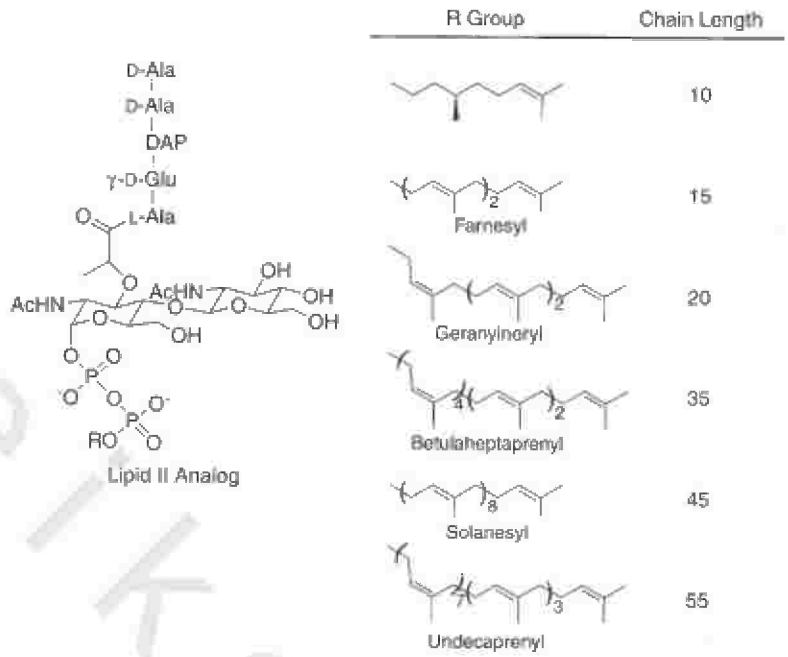
ترانسغليكوزيلازات (Transglycosylases)

في حين أنه كان معروفاً لسنوات بأن ترانسغليكوزيلازات كانت عناصر حاسمة للمرحلة — الأخيرة من البلمرة (late-stage polymerization) لوحدات ثنائي سكريل الببْتيد الخماسي (disaccharyl pentapeptide) إلى خيوط ببتيدوغليكان الموجودة، فقد كانت أقل دراسة كصنف؛ بسبب عدم توفر المواد للمقايسة؛ وبسبب طبيعتها المرتبطة – بالغشاء، الذي جعل تنقيتها وتوصيفها صعباً (انظر فان هيجينورت van Heijenoort, 2001a، للمراجعة). ولقد بين تسلسل المجين أربعة ترانسغليكوسيلازات في الإشريكية القولونية وأعداد مقارنة في المُمْرضات الأولية، بعضها كترانسغليكوسيلازات/ترانسببتيدازات ثنائية الوظيفة وبعضها كترانسغليكوزيلازات أحادية الوظيفة. وبعض التقارير الأخيرة، التي تسلط الضوء على مجالين من التطور تجدرالإشارة إليها.

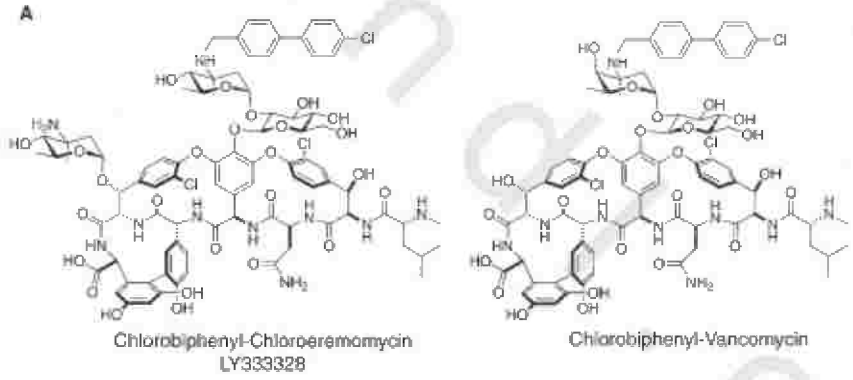
أولاً، الطرق الكيميائية الإنزيمية المشتركة من إس. والكر (S.Walker) وزملائه، مستعملاً مناظرات الدهن I (الفصل الثالث) وMurG glycosyltranferases، قد سمحت بالوصول إلى lipid II lipid-disacchride-pentapeptide analogs المتنوعة (الشكل ١٥.٥) التي يمكن ان تستخدم لفحص تسرانسغليكوسيلازات المرتبطة — بالغشاء (يي وآخرون Ye *et al.*, 2001). وعلى وجه الخصوص، سلسلة الدهن C_{35} مع وصلات 4-*cis*-olefinic كانت نشطة، كانت أقل عرضة للتجميع من سلسلة أيزوبرينويد C_{55} isoprenoid الطبيعية، واقتُرح بأنه من الممكن إنشاء بروتوكول

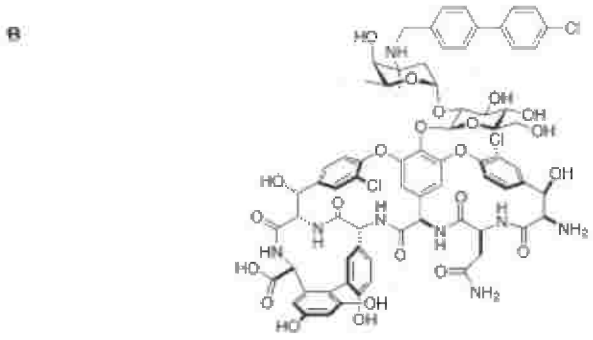
فحص مفيد لاختبار المواد والمثبطات. وسينثيسازات لمناظرات الدهن II الإضافي (كوديك واوتفوس Cudic and Otvos, 2002) والدهن II نفسه (فان نيووينهز وآخرون Van Nieuwenhze *et al.*, 2002) سوياً مع تصميم المقايسات (الاختبارات) المحسَن (شوارتز وآخرون Schwartz *et al.*, 2001) توعد بتحريك الحقل. والوجه الثاني هو أن المنتج الطبيعي موإينوميسين (moenomycin) (الفصل الثالث) تثبط ترانسغليكوزيلازات، ومقايسات الإزاحة (التبديل) من السهل إنشائها للفحص (فولمير وهولتجي Vollmer and Holtjie, 2000). لاحظنا في الفصل الثالث عشر بأن تيكوبلانين هو غليكوبيتيد دهني طبيعي، أُسل على مجموعة غلوكوسامين أمينو (glucosamine amino group) على قمة غليكوبيتيد (الشكل ١٣.٢٦). مشتقات *N*-aryl النصف إصطناعية، مثل كلوروبيفينيل فانكوميسينات (chlorobiphenyl vancomycins) وكلوروإرموميسيات (الشكل ١٥.٦ A) هي حوالي ٨٠-ضعفاً أكثر نشاطاً ضد المكورات المعوية المقاومة-لفانكوميسين (VRE) من الغليكوبيتيدات الأبوية. ونظراً لأن *N*-aryl glycopeptides لا تربط N-acyl-D-Ala-D-Lac أكثر إحكاماً من فانكوميسين أو كلوروإرموميسين، فقد افتُرض بأنهم يبحثون عن هدف ثان (جي وآخرون Ge *et al.*,1999، سن وآخرون Sun *et al.*, 2001). وفي الواقع، فتدمير موقع ربط N-acyl-D-Ala-D-Ala/D-Ala-D-Lac بواسطة إزالة *N*-MeLeu (الشكل ١٥.٦ B) يحافظ على النشاط ضد VRE. ولقد اقترح كاهني وزملاء العمل بأن ترانسغليكوسيلازات يمكن أن تكون الأهداف الإضافية (جي وآخرون Ge, *et al.*, 1999)، الفرضية التي من شأنها فتح سبل جديدة لانعكاس VRE. الجين المسئول عن حساسية خلايا الإشريكية القولونية لمشتقات الدهن السكري (glycolipid) من فانكوميسين ولكن ليس فانكوميسين نفسه، كما تم تأكيده في الآونة الأخيرة (إيجيرت وآخرون Eggert *et al.*, 2001)، مما يصادق على الأساس الجزيء للتميز. وكذلك، مشتقات *N*-aryl من فانكوميسين الراهبة للماء النشطة ضد VRE والتي تثبط نشاط ترانسغليكوزيلاز في المختبر (سينها روي وآخرون Sinha Roy *et al.*, 2001) قد استُعملت في استشراب الانجذاب (affinity chromatography) لعزل فرعية من بروتينات غشاء الإشريكية القولونية، وتشمل البروتين المرتبط بالبنسيلّين PBP6وB(PBP1B),PBP2,PBP3,PBP5، متناسقة مع ترانسغليكوزيلازات كأهداف.

القدرة على إنتاج مكتبات كبيرة من الكربوهيدرات بواسطة الاصطناع (synthesis) (بيزمان وآخرون Baizman *et al.*, 2000) قد يؤدي إلى ربيطات (ligands) ذات نوعية وفعاليّة لتثبيط ترانسغليكوزيلاز. تركيب ترانسغليكويلاز الانحلالي (الذوباني) من الإشريكية القولونية، SLT_{35}، الذي يشارك في إطلاق بيتيد موراميل اللآمائي (anhydromuramyl peptide) بواسطة الهجوم بين الجزيئات لـ C_6-CH_2OH على رابط C_1 غليكوسيد (C_1 glycoside link) أثناء الإشارات المستحثة - ببيتا لكتاميز (فان أسيلت وآخرون van Asselt *et al.*, 2000)، قد تم حله وربما يكون نموذجاً بدئياً (protoptype) ؛ لتصميم ونشوء مثبطات غليكوزيلاز.



الشكل (١٥,٥). نظيرات ركازة الدهن II المحددة لمقايسة ترانسغليكوسيلاز الغشاء.





الشكل (١٥,٦). نظائر كلوروفينيل من كلورواريموميسين وفانكوميسين النشطة ضد VRE: (A) المركبات النوعية، ضد (B) أريل جليكوبيتيدات النشط ضد VRE مع تدمير موقع الربط د- الآنين-د-الآنين D-Ala-D-Ala.

مثبطات البناء الحيوي للبروتين

في المنطقة المستهدفة الكلاسيكية الثانية للأدوية المضادة البكتيرية، وتثبيط تصنيع البروتين، هناك أيضاً عديد من الفرص لمزيد من البحث عن أهداف مضاد حيوي جديدة.

المضادّات الحيوي المستهدفة ضد الريبوسوم

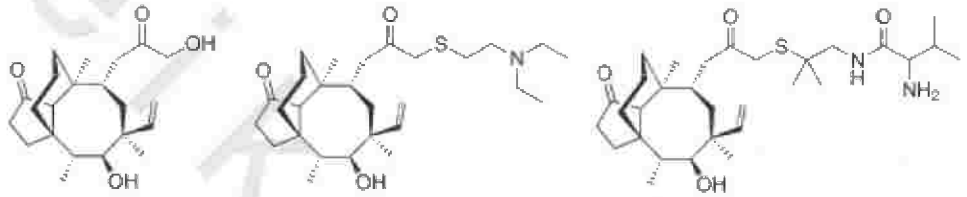
من المؤكد بأن تراكيب أشعة-إكس للوحدات الفرعية الريبوسومية 30S و 50S ومعقدات 70S الكاملة (الفصل الرابع) تساعد في تطوير المقايسة ونشوء مضادّات حيوية جديدة التي ترتبط عند كل من المواقع الكلاسيكية والمواقع غير الكلاسيكية في أي من جزيئات 16S أو 23S rRNA، التي تشكل معاً ثلثي كتلة الريبوسوم.

تشمل منطقة الحقل V من 23S rRNA مركز ببتيديل ترانسفيراز (ناقلة الببتيديل) من الموقع ببتيديل ترانسفيراز (ناقلة الببتيديل) إلى بداية نفق الخروج لسلسلة عديد الببْتيد الوليدة (بان وآخرون Ban *et al.*, 2000، نيسين وآخرون Nissen *et al.*, 2000) ويشمل موقع الربط لكل من ماكروليد إريثروميسين العضوية -١٤ وتيلوسين ماكروليد الحلقة العضوية -١٦ (دوثويت وآخرون Douthwaite *et al.*, 2000، بولسين وآخرون Paulsen *et al.*, 2000).

كما أنها تتداخل جزئياً مع المضادّات الحيوية الخرى مثل ستربتوجرامينات ولينكوساميدات، وعلى سبيل المثال، كلنداميسين. التصميم المستند على - التركيب للمضادّات الحيوي الجديدة التي تملأ واحداً أو أكثر من مواقع رنا الفرعية هذه ينبغي أن تكون مشروع إنتاجي. ويبلغ طول نفق خروج الببْتيد حوالي 100 Å (انظر نيسين وآخرون Nissen *et al.*,2000)، مبطنة معظمها برنا من الحقول I إلى V من 23S rRNA ولكن أيضاً مع بعض الإحتكاكات من البروتينات L4, L22 و L39. وإذا ما كان بالإمكان إيجاد المثبطات التي تملأ النفق فذلك غير واضح، ولكن يجدر الذكر بأن الدواء المضاد للالتهاب غير الستيرويدي (nonsteroidal) فلوربايبروفين (flurbiprofen) يعوق النفق في داخل الموقع النشط للخمائر الأكسيجينية الدورية لبروستاجلاندين سيكلواكسيجينازات (prostaglandin cyclooxygenases) (سيلينسكي وآخرون Selinsky *et al.*, 2001).

يبدو بأن مايكروليد كاربوميسين (carbomycin) يرتبط بشكل مختلف قليلاً عن إريثروميسين بما أن، خلافاً للإريثروميسين، فإنه يثبط تفاعل ببتيديل ترانسفيراز (ناقلة الببتيديل) الفعلي في مقايسات نقل أمينو أسيل إلى بيوروميسين (بولسين وآخرون Paulsen *et al.*, 2001). تصل سلسلة السكر الممتدة على C_5-OH من هيكل ماكروليد كاربوميسين للخلف نحو مركز ببتيديل ترانسفيراز (ناقلة الببتيديل) رنا (هانسين وآخرون ٢٠٠٢). إثنان من المضادّات الحيوية المستخدمة في الطب البيطري، تياميولين وفالينميولين (tiamulin and valenmulin)، المشتقات الشبه إصطناعية للمنتج الطبيعي بليوروميووتيلين (pleuromutilin) (الشكل ١٥,٧)، قد يكونا نقطتا البداية لتحديد هذه الأهداف أكثر. ويظهر تياميولين وفالينميولين آثار الأقدام التي تؤثر في النيوكليوتيدات في الحقل V من 23S rRNA

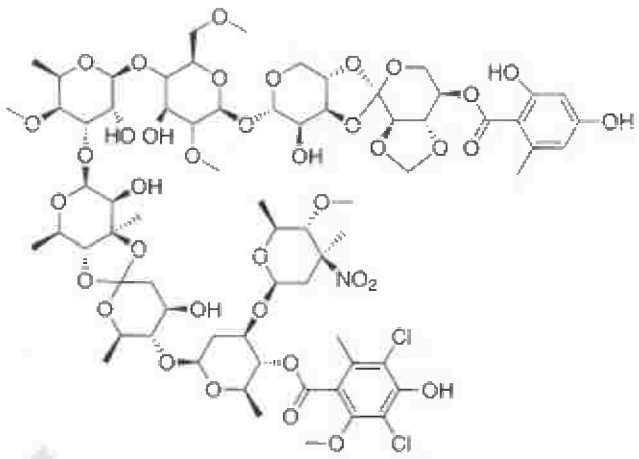
التي تورطت كجزء من مركز ببتيديل ترانسفيراز (ناقلة الببتيديل) الديناميكي المتحرك (بولسين وآخرون Paulsen *et al.*, 2001)، وكذلك يعرقلا بالكامل تكوين رابط الببْتيد. وهؤلاء يتنافسون مع كاربوميسين ولكن ليس إريثروميسين، مما يوحي بأن كلاً من بليوروميوتيلينات وإريثروميسين بإمكانهما الربط في الوقت نفسه في المواقع المجاورة ولكن غير المتداخلة. وربما يتداخل بليوروميوتيلينات مع بريستينااميسين IIA (بولسين وآخرون Paulsen *et al.*, 2001)، مشيراً بأنه سيكون هناك تحليل مثمر في خريطة التركيب – الدقيق للمضادّات الحيوية في وحول مركز ببتيديل ترانسفيراز (ناقلة الببتيديل) للوحدة الفرعية 50S مع احتمال تصميم تراكيب تجميعية للمضادّات الحيوية.



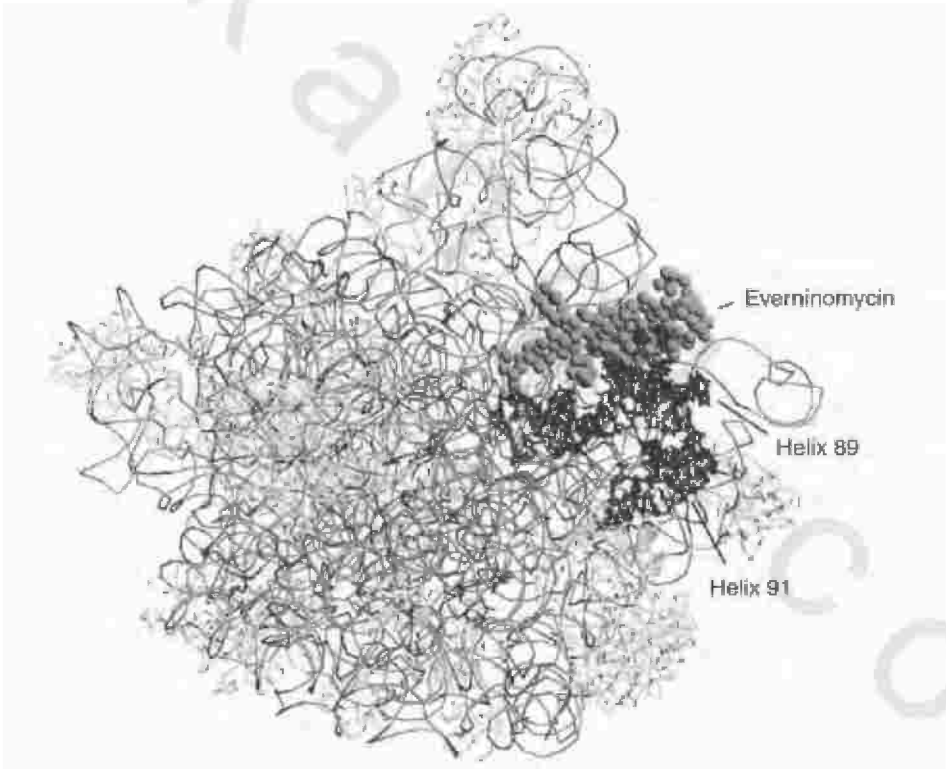
الشكل (١٥,٧). تراكيب أعضاء عائلة بليوروميوتيلين التي تعرقل مركز ببتيديل ترانسفيراز (ناقلة الببتيديل) على الريبوسوم.

المثال على وجود مواقع الريبوسوم غير الكلاسيكي لربط المضاد الحيوي يتم توفيره من قبل الدراسات الحديثة على المنتج الطبيعي إيفرنينوميسين (everninomycin) (الشكل ١٥,٨)، عضو من أحادي السكريد أورثوسوميسينات (oligosaccharide orthosomycins) (بيلوفا وآخرون Belova *et al.*, 2001).

يعدُّ إيفرنينوميسين سكريد ثماني (octasaccharide) مغطى عند كلا النهايتين بواسطة إيسترات فينوليك أريل كاربوكسيليك (phenolic aryl carboxylic esters). ويرتبط مع 23S rRNA بعيداً عن مركز ببتيديل ترانسفيراز (ناقلة الببتيديل) الذي يعد الهدف للميكروليدات وستربتوجرامينات. واستخدمت الطفرات المقاومة لتحديد ربط إيفرنينوميسين عند الحلقات ٨٩ و ٩١ (الشكل ١٥,٩) وربما تعرقل ربط بروتين عنصر البدء IF2، الذي يجلب المبادر (initiator) فورميل ميثيونيل (formylmethionyl) (Met) (Trna). ولاحظ بيلوفا وآخرون Belova *et al.*, 2001 بأن هذا موقع متميز من المضادّات الحيوية المعروفة التي ترتبط – بالريبوسوم والتي تستهدف مراكز ببتيديل ترانسفيراز وموقع الخروج لسلاسل الببْتيد الناشئة. وقد يكون هذا الموقع هدف جيد للجزيئات الصغيرة الأخرى، التي بالإمكان قياسها بواسطة إزاحة إيفرنينوميسين. ويستعمل إيفرنينوميسين كمُحرض لنمو الحيوان؛ بسبب أن سميته قد حدت تطوُّره في الإنسان، ولكن المتغيرات غير السامة المستندة على معلومات من هذا القبيل ربما تكون ممكنة.



الشكل (١٥,٨). تركيب إيفرنينوميسين.

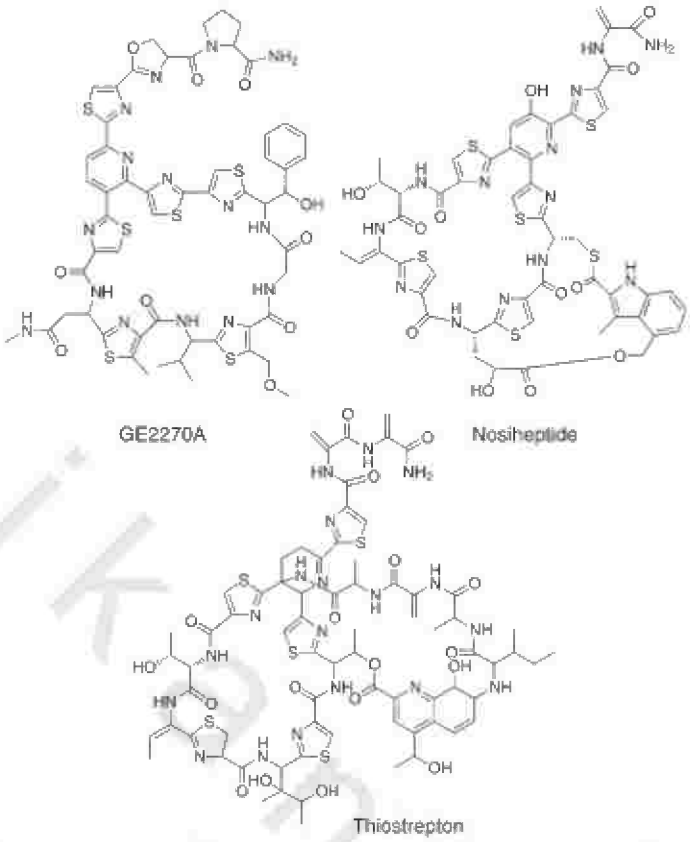


الشكل (١٥,٩). موقع ربط إيفرنينوميسين على 23S rRNA. (بالإذن من مازمانيان وآخرون Mazmanian *et al.*,2001).

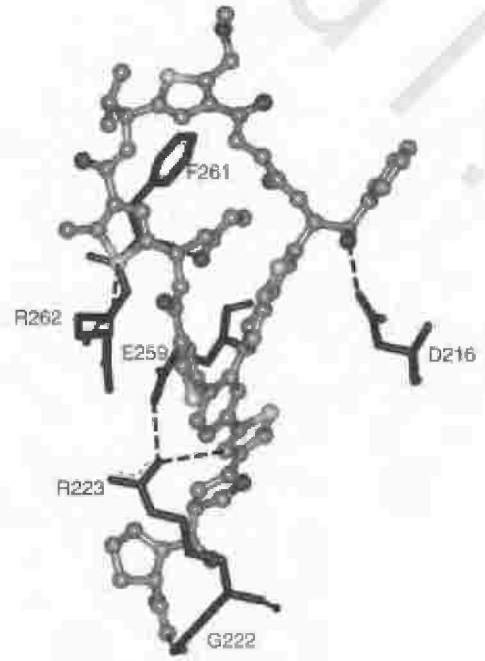
الصنف الثاني من المنتجات الطبيعية التي تعمل كمضادّات حيوية بواسطة إعتراض واحد من البروتينات التي تعمل كشريك للريبوسوم أثناء البناء الحيوي للبروتين هو صنف ثيوبِبْتيد (thiopeptide class)، ممثلاً بواسطة

GE2270A، ثيوستربتون (thiostrepton)، ونوسيهيبتيد (nosiheptide) (الشكل ١٥,١٠) (انظر سينها روي وآخرون Sinha Roy *et al.*, 1999، للمراجعة). تحتوي الببتيدات غير الريبوسومية هذه على فضالات Ser و Cys، والتي تم إزالة الهيدروجين من الحلقة (cyclodehydrated) وإزالة الهيدروجين (dehydrogenated) لإيجاد نظم حلقة ثيازول وثيازولين، وأوكسازولين (thiazole,thiazoline,and oxasoline ring systems) التي تدخل الصلابة. يستهدف ثيوستربتون ونوسيهيبتيد 23S rRNA في المنطقة A_{1087}، إضافة إلى عرقلة ربط عنصر الإطالة EF-G إلى الريبوسوم عند موقع ببتيديل ترانسفيراز (ناقلة الببتيديل). ويعرقل ثيازول ببتيد GE2270A نقل ببْتيديل –المتواسط بالريبوسوم بواسطة GTPase EF-Tu، بروتين تشابيرون (chaperone protein) الذي من شأنه أن يوصل aminoacyl-tRNAs إلى رامزات mRNA عند موقع ببتيديل ترانسفيراز (ناقلة الببتيديل) (انظر الفصل الرابع). ويرتبط المضاد الحيوي مع معقد EF-Tu complex، ويشدد ربط GTP، يباطئ عمل GTPas، ويمنع تكوين معقد EF-Tu-GDP القابل للإطلاق، مماطلاً عملية إطالة ببتيد الريبوسوم (الشكل ١٥,١١). ولقد تم تحديد تركيب أشعة–إكس لمعقد EF-Tu-GE2270A (آنبورج وبارميجياني Anborgh and Parmeggiani, 1991)، وبشكل عام، يوفر EF-Tu مواقع متعدِّدة للتفاعل مع المضادّات الحيوي الأخرى، وتشمل بولفوميسين وكيروميسين (pulvomycin and kirromycin) (انظر سينها روي وآخرون Sinha Roy *et al.*, 1999). وتشير هذه النتائج بأن البرنامج الأمثل المستند – على التركيب ضد EF-Tu ربما يكون مجدياً. اتباعاً لموضوع المضادّات الحيوية التي تستهدف تسلسلات رنا، فقد إستعرض سوتشيك وونج (Sucheck and Wong, 2000) السبل الحديثة لتصميم واختبار الجزيئات الصغيرة التي تتفاعل مع تسلسلات معينة في mRNA و rRNA.

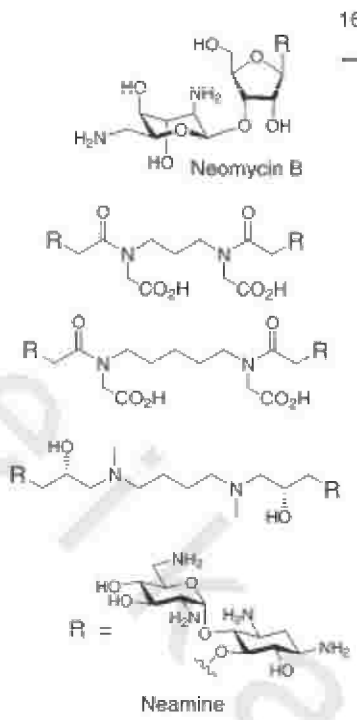
يقدم تفاعل أمينوغليكوسيدات مع 16S rRNA وكلاهما من أشعة – إكس ودراسات التصوير بالرنين المغنطيسي النووي (nuclear magnetic resonance imaging studies)، نموذج مستند – على التركيب لتصميم جزيئات جديدة. ولقد إستعمل في النهج التكميلي، وونج وزملائه (سوتشيك وآخرون Sucheck *et al.*, 2000) نيامين تترا–امينو داي سكاريد (neamine tetra-amino disaccharide) (الشكل ١٥,١٢) كعنصر أساسي لتحقيق محددات الربط لـ 16S rRNA. وإرتبطت مثنويات نيامين (dimmers of neamine) لتنتج أمينوغليكوسيد إصطناعي ثنائي التكافؤ مع خواص مبقية على الإنجذاب العالي لـ rRNA والتمييز المنخفض بواسطة الإنزيمات – المعدلة للأمينوغليكوسيد (aminoglycoside-modofication enzymes). وتتيح روابط *N,N'*-methyl diamine linkers البسيطة (الشكل ١٥,١٢) نشاط ربط ومع ذلك كانت مواد فقيرة لتعديل أسيل ترانسفيرازات (acyltransferases) وفوسفوترانسفيرازات (phosphotransferases) التي تبطل نشاط أمينوغليكوسيدات. وهذه نقطة بداية واعدة للسبل الجديدة لمحاكيات أمينوغليكوسيد.



الشكل (١٥,١٠). أمثلة على صنف ثيوبِبْتيد من المضادّات الحيوية التي تحتوي على حلقات ثيازول وأوكسازول.



الشكل (١٥,١١). موقع الربط لثيوبِبْتيد GE2270A على عنصر الإطالة EF-Tu (بالإذن من هيفرون وجورانك Heffron and Jurank,2000).



	16S RNA A-Site K_d (μM)	*E. coli* MIC (μM)	AAC-(6') K_m (μM)	APH-(2'') *K* (μM)
Neomycin B	0.2	3.1	3.64 X 10^5	1.9 (K_m)
	1.1	31	1.6 X 10^4	0.78 (K_i)
	0.8	125	2.26 X 10^4	0.15 (K_i)
	0.04	6.25	9.26 X 10^3	0.94 (K_i)

الشكل (١٥,١٢). المثنويات الإصطناعية من مشتقات نيامين مثل محاكيات الأمينوغليكوسيد المستهدف – رنا.

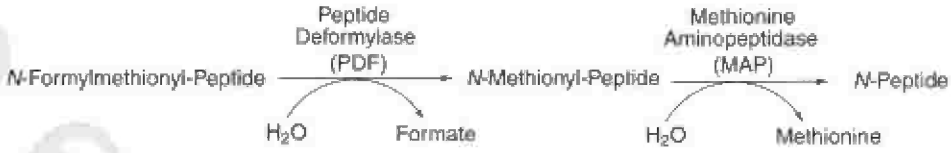
ببتيد ديفورميلاز ومثيونين أمينوبِتيداز

(Peptide deformylase and methionine aminopeptidase)

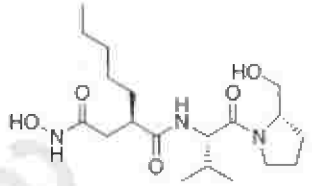
يبدأ البناء الحيوي للبروتين البكتيري مع fMet tRNA كبادئي لأمينوأسيل–tRNA، مرافق لمركز ببتيديل ترانسفيراز (ناقلة الببتيديل) على الريبوسوم بواسطة بروتين تشابيرون IF2 الملاحظ سابقاً. ويكفل فورميلة –ن -N formylation لمجموعة مثيونيل أمينو (methionyl amino group) بأن fMet يستطيع أن يعمل فقط كمانح وليس كمستقبل في تكوين رابطة البِبْتيد، فارضاً اتجاهية على عملية البدء. وبمجرد ظهور سلسلة البِبْتيد المطيل من الريبوسوم، تزال مجموعة *N*-formyl إنزيمياً بواسطة الإنزيم المعروف بِبِبتيد ديفورميلاز (peptide deformylase) (هنتينجتون وآخرون Huntingtone *et al.*, 2000، راجاجوبالان وآخرون Rajagopalan *et al.*, 1997) (الشكل ١٥,١٣). وبعد ذلك تزال النهاية-N ميثيونين (*N*-terminal methionine) بالتحليل المائي بواسطة مثيونين أمينوببتيداز (methionine aminopeptidase). ويعد كلاً من ديفورميليز وأمينوببتيداز أساسيان بواسطة تحليل حذف الجين (gene deletion analysis) في الإشريكية القولونية، مما يثير الإحتمال بأن هذين الإنزيمين هدفين صالحين لمضادّات جرثومية (بكتيرية). وديفورميزهو ببتيداز معدني (ميتالوببتيداز metallopeptidase)، يثبط بواسطة ربيطات معدن – مستخلبة (metal-chelating ligands) (أبفيل وآخرون Apfel *et al.*, 2001، تشين وآخرون Chen *et al.*, 2000) مثل هيدروكسامات (hydroxamate) الموجودة في داي بِبْتيديل هيدروكسامات أكتينونين (dipeptidyl hydroamate

obeikandl.com

actinonin) الطبيعي (الشكل ١٥,١٤) (ترایاس Trias, 2001) وكثير من النظيرات. وهذه المركبات هي مثبطة للبكتيريا بدلاً من قاتلة (مبيدة) للبكتيريا وتظهر الطفرات في تكرارات عالية، على الرغم من أن هؤلاء يميلون إلى التقليل من ملاءمة الطفرات. ويبقى أن نرى على أي مدى ستكون فعاليّة مثبطات بيتيد فورميلاز.



الشكل (١٥,١٣). عمل بيتيد ديفورميلاز ومثيونين أمينوبيتيداز لتشذيب فضالات fMet عند نهاية N من البروتينات البكتيرية.



Actinonin

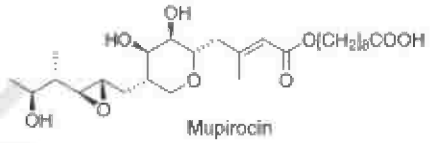
الشكل (١٥,١٤). المنتج الطبيعي أكتينونين هو مثبط مستغلب – معدني لبيتيد ديفورميلاز.

ميوبيروسين (mupirocin) وغيره من مثبطات أمينو أسيل–tRNA سنثيتاز (aminoacyl-tRNA synthetase)

يعدُّ ميوبيروسين المنتج الطبيعي (الشكل ١٥,١٥) الذي يمنع دمج أيزوليوسين (isoleucine) في البروتينات بواسطة عرقلة Il-e-tRNA synthetase. ويسوَّق بوصفه عاملاً مضاداً جرثومياً موضعياً باكتروبان (Bactroban). وقد تم تحديد التركيب للمعقد ميوبيروسين مع المكورة العنقودية الذهبية Ile-tRNA synthetase (سيلفيان وآخرون Silvian *et al.*, 1999)، مما يصادق على ربطه عند الموقع النشط، منافساً ضد ربط Ile-AMP.

ولقد أجريت برامج الفحص ضد tRNA synthetases الأخرى، لكل من البكتيرية وسويات النواة لأغراض التحكم، ولكن لا يوجد نظيرات متقدمة للتقييم السريري. وهذا ليس لعدم وجود نشاط ضد tRNA synthetases المعزولة. وعلى سبيل المثال نظيرات كربوكسيليك من تيروسين تثبط تيروسيل tRNA سينثيتازات (tyrosyl-tRNA synthetases) مع فعاليّة تبلغ جزءاً من ألف مليون جزيء غرامي (جارفيست وآخرون Jarvest *et al.*, 2001)، ويشمل المنتج الطبيعي SB-219383، ويبلغ التركيز المثبط٥٠٪ 1nM (كيو وآخرون Qiu *et al.*, 2001)، والبعض ١٢,٠٠٠–أضعاف أقل من 12μM K_m لـ L-Tyr. ولقد تم حل تركيب أشعة – إكس لمعقد المثبط – الإنزيم ليسلط الأضواء على تصميم المثبط الآحق (كيو وآخرون Qiu *et al.*, 2001). ولقد تم تحضير نظيرات إيستر من وسائط أمينو

أسيل-AMP، وتشمل Ill-esters من هيدروكساماتات مع استبدال حلقة الأدينين بواسطة أيزوفانيلين (isovanillin) ليعطي نظير Ile-AMP مع تراكيز مثبطة ٥٠٪ جزيئية غرامية دقيقة (micromolar) قليلة ضد Ile-tRNA synthetase (لي وآخرون Lee *et al*., 2001) . يثبط جلوتاميل -γ- بوروناتات (glutamy-γ-boronates) Glu-tRNA[Gln] amidotransferase بفعاليات جزيئية غرامية دقيقة - منخفضة (ديسيكو وآخرون Decicco *et al*., 2001). ومع ذلك، فكلا هذين النوعين من المثبطات لم تُظهر أي فعاليّة مضادة للبكتيريا ؛ لعدم الإمتصاص إلى داخل الخلايا البكتيرية. ومشكلة إيصال مثل المثبطات الأليفة للماء ما تزال دون حل.



الشكل (١٥,١٥). ميوبيروسين: مثبط Ile-tRNA synthetase.

تكرار دنا ومثبطات الترميم (الإصلاح)

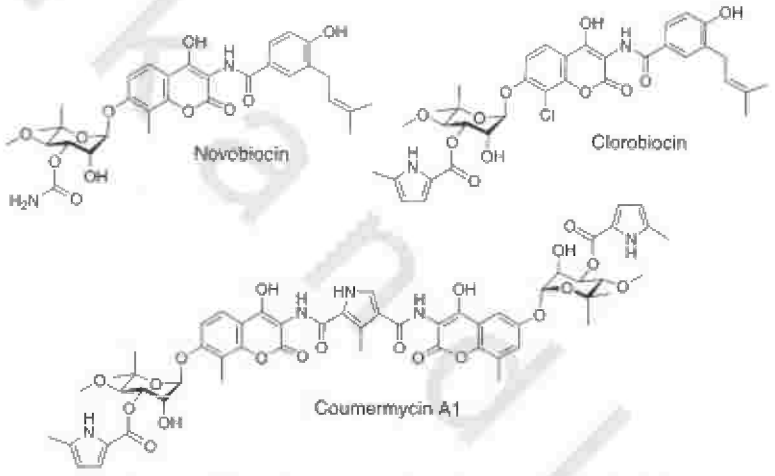
دنا غيراز: كوينولون الجديد ومثبطات غير الكوينولون (nonquinolone inhibitors)

يعدُّ دنا غيرازالهدف الكلاسيكي لمضادّات كوينولون البكتيرية، كما ذُكر في الفصل الخامس، ويستمر الكوينولون الجديد قيد التطوير (انظر بوش وماسيلاج Bush and Macielag, 2000)، ويشمل ليفوفلوكساسين (levofloxacin) للمكورة العقدية الرئوية المقاومة - للبنسيلّين في الإلتهابات الرئوية المكتسبة من - المجتمع. وقد تمت الموافقة عل تروفافلوكساسين (trovafloxacin) في ١٩٩٨م ولكنه قيد في الاستخدام في ١٩٩٩م؛ بسبب سمية الكبد (liver toxicity).

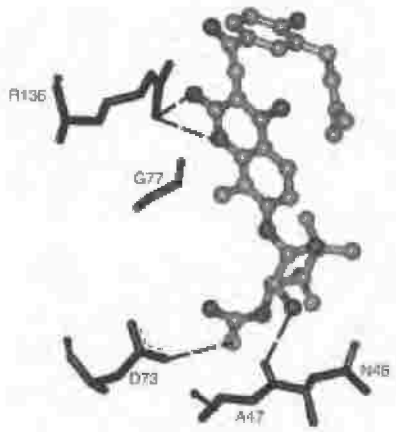
وتمت الموافقة على ٨-ميثوكسيكوينولونز موكسيفلوكساسين (8-methoxyquinolone moxifloxacin) في ١٩٩٩م، ويهدف إلى تقديم النشاط المعزز ضد المكورات العنقودية لمعالجة الالتهاب الرئوي المكتسب من - المجتمع، التهاب القصبات (bronchitis)، والتهاب الجيوب الأنفية (sinusitis) (برونسون وبرات Bronson and Barrett, 2001 b، كوبون وماسترتون Cubbon and Masterton, 2000). وتحتوي متغيرات كوينولونات على رأس الجسر النيتروجين، منتجاً نظم حلقة ٢-بيريدون (2-pyridon ring systems) التي تحافظ على الفعاليّة ضد بعض من أكثر طفرات غيراز شيوعاً ذات المقاومة للكوينولون (تشو Chu, 1999). ولقد وُجد أن كلينافلوكساسين (clinafloxacin) وسيتافولكساسين (sitafloxacin) يكونا فعالين ضد كل من طفرات GyrA (الوحدة الفرعية غيراز) وParC (الوحدة الفرعية توبوأيزوميراز IV) (أوتوديرا وآخرون Onodera *et al*., 1999، شميتز وآخرون Schmitz *et al*., 2000). وهناك أنواع أخرى من الجزيئات التي تقدم المرشدين للربيطات المثبطة لـ دنا غيراز و/ أو المشابه توبوأيزوميراز النوع II، توبوأيزوميرازIV.

المنتجات الطبيعية كومارين (coumarin) (الفصل الرابع عشر) المُصنّعة بواسطة المتسلسلات–نوفوبيوسين، كلوروبيوسين (chlorobiocin)، والمركب المثنوي كومرميسين (الشكل ١٥,١٦) في الواقع يربط واحد إلى ثلاثة رتب من الحجم الأكثر إحكاماً (K_i= 10^{-7} to 10^{-9} M) إلى غيرازبدلاً من الكوينولونات النموذجي (10^{-6} M)، مع كومرميسين ربما يمتد فوق الوحداتين الفرعيتين GyrB في الرباعي A_2B_2 tetramer ليعطي التثبيط الأقصى فعاليّة.

ولقد تم تبلور نوفوبيوسين وكلوروبيوسين معاً مع كسر 24-kDa –N-terminal من الوحدة الفرعية GyrB من الإشريكية القولونية (الشكل ١٥,١٧) التي تتداخل مع موقع حلقة ادينين لـ ATP، متناسقة مع التثبيط التنافسي الملاحظ لربط ATP (انظر هولدجيت وآخرون Holdgate *et al.*, 1997، لويس وآخرون Lewis *et al.*, 1996، تساي وآخرون Tsai *et al.*, 1997).



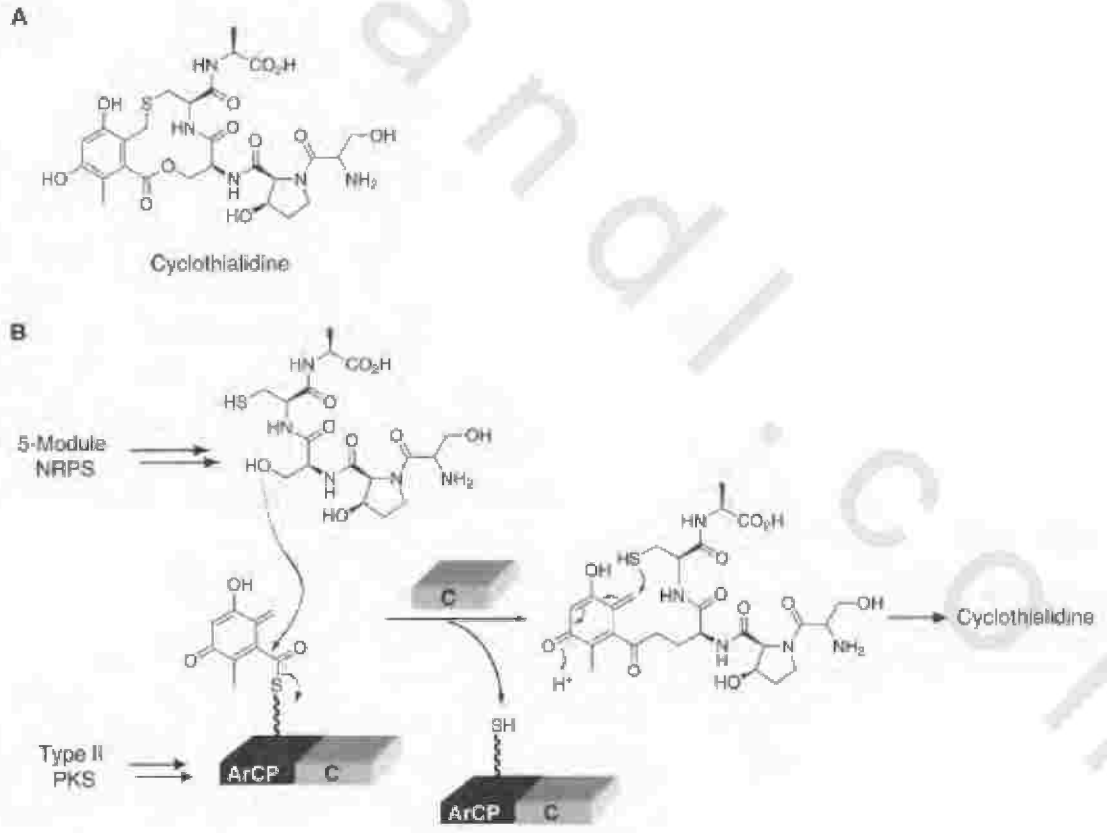
الشكل (١٥,١٦). مثبطات أمينوكومارين الطبيعية لـ دنا غيراز.



الشكل (١٥,١٧). ربط نوفوبيوسين مع موقع ATP على الوحدة الفرعية GyrB مع عرض التفاعلات الرئيسة المختارة. (بالإذن من لويس وآخرون Lewis *et al.*,1996).

في حين أن كومارينات كانت ذات قيمة كبيرة في فرز وظائف حقل غيراز، لكنها لم تنجح سريرياً، ربما بسبب مزيج من الذوبان الضئيل، الفعاليّة الضعيفة ضد البكتيريا السالبة – لغرام (الإختراق الضعيف خلال حاجز الغشاء الخارجي) وسمية الفقاريات. وربما تكون مسارات المنتج الطبيعي هذه (الفصل الرابع عشر) قابلة للمعالجات البنائية الحيوية الإندماجية لزيادة التنوع الهيكلي لفصل الأنشطة المضادة البكتيرية المطلوبة من الآثار الجانبية غير المرغوب فيها.

منتج طبيعي آخر، مرة اخرى من المتسلسلات دائمة الإنتاج، التي تُظهر نشاط قوي ضد دنا غيراز النقي في المختبر هو البِنْتيد الخماسي ثياليدين الحلقي غير الريبوسومي (pentapeptide cyclothialidine) (الشكل ١٨,١٥A). ولقد تم أسر السلاسل الجانبية CH_2OH من Ser و CH_2SH من Cys_4 في رابط إستر ورابط ثيوإيثر، بالترتيب، بواسطة شطر 2,6-dimethyl-3,5-dihydroxybenzoyl moiety لإيجاد ماكرولاكتون العضو-١٢ الذي يوفر القيد المنظم الفراغي لملء مطابق لمثبط – غيراز من سيكلوثياليدين (الشكل ١٨,١٥ B).



الشكل (١٨,١٥). (A) بيتيد ماكرولاكتون سيكلوثياليدين هو مثبط دنا غيراز، (B) الطريق المفترض لتحليق طليعة البِنْتيد الخماسي غير الرايبوسومي الخيطي.

وما يدعو للإستغراب أن البلور المشارك (cocrystal) من سيكلوثياليدين مع شدفة ر نهاية-N من GyrB كذلك لها تداخل في موقع ATP، يبين ذلك أن كومارينات وديبسي ببتيد الحلقي (cyclic depsipeptide) لها طرق مماثلة لشغل ذلك حيز الربط في حلقة بيورين من ATP (لويس وآخرون Lewis *et al.*, 1996). وسيكلوثياليدين ليس فعالاً ضد البكتيريا السليمة بسبب الإختراق الضعيف، ربما بسبب مكونات الببْتيد القطبية (polar peptide constituents). وكما وصف في الفصل السادس عشر، فببْتيد ثيوإيثر ماكرولاكتون الغيرريبوسومي هذا قد يكون مسارهام لمعالجة البناء الحيوي الاندماجي.

المنتج الطبيعي الثالث الذي يثبط دنا غيراز، مثل أدوية كوينولون، يؤدي إلى التراكم غير العكوس لوسيط دنا-غيراز المضاعف الإنفلاق التساهمي وهو ٤٣- فضالة ببتيد ميكروسين B17 (43-residue peptide microcin B17) (الشكل ٥,٥ C و ١٤,١٤) المنتج بواسطة سلالات مُعيَنة من الإشريكية القولونية كمضاد ببتيد حيوي. وكما في الفصل الرابع عشر، يرمز ميكروسين B17 ريبوسومياً كطليعة ٦٩- حمض أميني من حيث فضالات ٢٦ للنهاية – إن تفلق بعد ان قد تم تعديل ١٤ من ٤٣ (ستة Gly، أربعة Ser، أربعة Cys) بعد الإنتساخ إلى أربعة أوكسازول وأربعة حلقات ثيازول. ويوجد إثنين (ترادف بيس الحلقات المتغايرة (4,2 tandem bis heterocycles) شيدت في عملية النضوج هذه ويبدو بأن هذه محددات هامة لنشاط المضاد الحيوي (سينها روي وآخرون Sinha Roy *et al.*, 1999). توجد الإشريكية القولونية المقاومة – لميكروسين مع طفرات عند النهاية –C من GyrB، وجيريز أظهر في الاونة الخيرة بأن يكون هدف القتل (هيديل وآخرون Heddle *et al.*, 2001). وهناك تشابه ميكانيكي لعمل كوينولونات عل غيراز، ولكن يظهر ميكروسين إعتماد مطلق على ATP أو نظير ATP غير القابل للإنفلاق ليحث على تراكم وسيط إنزيم – دنا المنفلق. والتفتيش عن تسلسل ميكروسين B17 يشير إلى وجود لفائف بوليجليسين عشوائية (polyglycin random coil) متخللة بواسطة حلقات متغايرة، من المرجح بأن تكون أشطار ربط دنا وبرويتن. ومن غير المعروف ما هو الحد الأدنى لشطر ميكروسين الذي يمنح إهماد غيراز أوما إذا كانت أشطار bis الحلقية المتغايرة الصغيرة ستكون عقاقيرياً وطبياً قابلة للطرق (قابلة للحل).

السم البروتيني البكتيري الصغير، CcdB (11.7 kDa) كذلك يوقع دنا غيرازفي الفخ في معقد مع كسرات خيط دنا –المزدوج. ويُرمز CcdB (11.7 kDa) و CcdA (7.8kDa)، بروتينه الشريك المضاد للسم (antidote)، في بلازميد F في الإشريكية القولونية. ويرمز بلازميد F برنامج موت الخلية (cell death program) الذي يُشغَل في الخلايا البكتيرية الإبنة التي لم ترث نسخة من بلازميد F أثناء إنقسام الخلية (انظر كوتورير وآخرون Couturier *et al.*, 1998، للمراجعة). وإذا فُقد بلازميد F يُحل CcdA أولاً، بواسطة فعل لون بروتييز (Lon protease)، ومن ثم بإمكان الوحدة الفرعية CcdB التي تم إطلاقها ان تهاجم غيراز وتؤدي إلى موت الخلية. تحليل آلية تثبيط CcdB لجيريز،

مقارنة بكوينولونات، كومارينات، وميكروسين B17، قد يسفر عن تبصرات تصميم جديد إلى مثبطات غيراز جديدة.

وقد أشارت التقدمات التركيبية البيولوجية الحديثة بأن موقع ربط ATP من الوحدة الفرعية GyrB لها نظيرات ثنيات (طيات) مع العائلة الضخمة من البروتينات الرابطة لـ دنا الأخرى المعروفة بعائلة GHL family (من غيراز B، chaperone HsP90، وإنزيم ترميم دنا، MutL (بان ويانج Ban and Yang, 1998)). وقد تم العثور على مجموعة متنوعة من كل من المنتجات الطبيعية والربيطات الإصطناعية (انظر ملك ماهون وآخرون McMahon *et al.*, 1998، للمراجعة) التي تعتبر مثبطات قوية وإنتقائية لربط ATP مع البروتينات (وبالتحديد بروتين كينازات)، ومثل هذه المكتبات ربما تكون المصادر للربيطات القوية التي بالإمكان أن تكون المثلى للنوعية والفعاليّة ضد توبوإيزميرازات النوع II البكتير.

البروتينات التي تتفاعل مع رنا

في ديناميكيات أيض رنا، تتشكل معقدات عابرة بين رنا و دنا والبروتينات (انظر تانير وليندير Tanner and Linder, 2001، للمراجعة) ويجب أن يفعل ذلك بنوعية وكفاءة حركية. وتحتاج جزيئات رنا بأن تكون مطوية، غير مطوية، ويعاد طيها في بعض أو كل طولها للوظيفة البيولوجية. الإنزيمات التي تحل (تفك) جزيئات رنا (وربما تعيد لفهم) هي رنا هليكاز RNA helicases (تانير وليندير Tanner and Linder, 2001)، مستعملاً طاقة التحلل المائي لـ NTP لدفع الفك (unwinding)، مثال، رنا المزدوج - الخيط. وتحدد هيليكازات RNA helicases بواسطة سبعة إلى ثمانية تسلسل زخارف (رسوم) محفوظة، وتُظهر تراكيب رنا و هليكازات دنا DNA heicases تشابه ثلاثي - الأبعاد قريب. تحدث بعض وظائف RNA helicase في بدائيات النواة، وتشمل الإنتساخ، النشوء الأحيائي للريبوسوم (ribosome biogenesis)، بدء الترجمة، وتحلل (نكوص) رنا (RNA degradation). وتحدث وظائف أخرى في سويات النواة وتشمل تحرير (تصحيح) Mrna (mRNA editing)، وصل (splicing)، ونقل رنا (RNA transit) إلى السيتوبلازم. وبالنظر بأن رنا هليكاز RNA helicases هي محركات إنتقال لـ رنا، فلقد تم إعتبارها كإنزيمات رنا شايونز و رنا ماتيوراز و رنا انوايندان RNA chapeones, maturases and unwindases " مشابك مؤقتة " temporary clamps " التي تسمح بإعادة ترتيب تفاعلات RNA بطريقة يمكن السيطرة عليها" (تانير وليندير Tanner and Linder, 2001). وهذه التحليلات أدت إلى الإقتراح بأنه منذ أن كان رنا هليكاز (RNA helicases) مطلوب للوظيفة البكتيرية، فمن الممكن أن تكون أهداف إنزيم المضاد البكتيري مناسبة للتثبيط شريطة تحقيق الإنتقائية مقابل متجانسات سويات النواة.

نظرات جديدة في بعض الأهداف الجديدة

بالإضافة إلى الأهداف التقليدية المصادقة، هناك دلائل على أن العديد من الجوانب الأخرى للأيض البكتيري والفسيولوجيا يجب أن تكون عرضة للمضادّات الحيوية (ألين Allen, 1985، سوتكليف Sutcliffe, 1988). بالإضافة إلى الأهداف التي نشأت والتي سوف تنشأ من نهج الجينوميات التي لوحظت في بداية هذا الفصل، هناك بعض الإنزيمات والعمليات الأخرى التي يوجد لها بالفعل مبررات معقولة إلى قوية للدراسة كأهداف مضادة بكتيرية جديدة.

تصنيع الحمض الدهني البكتيري

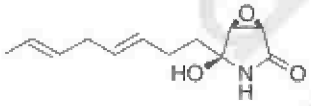
يعتبر البناء الحيوي للحمض الدهني ضروري للنمو البكتيري والبقاء على قيد الحياة. ولقد لاحظنا في الفصل الثاني عشر التشابه في المنطق الإنزيمي لخط – التجميع لكل من الأحماض الدهنية ومنتجات بوليكيتيد الطبيعية، في كل من تكوينات (صور) النوع I والنوع II للمحفزات النموذجية أو الوحدات الفرعية المنفصلة، بالترتيب. في سويات النواة، يتم تنظيم إنزيمات fatty acid synthetases (FAS) في الوحدات الفرعية المتعدِّدة النموذجية، كما تم شرحه في لنظم النوع I، في حين أنه في معظم البكتيريا ينظم FASs كنظم النوع II مع وحدات فرعية منفصلة، مما يثير إحتمال التثبيط الإنتقائي. ومن المعروف بأن المنتجات الطبيعية لها عمل مضاد حيوي بواسطة تثبيط البناء الحيوي للحمض الدهني، مثل سيريولينين (cerulenin) (الشكل ١٥,١٩)، الذي يقلول (alkylates) ويثبط نشاط الموقع – النشط سيستين أليف النواة (nucleophilic cysteine) لإنزيم كيتوسينثاز (ketosynthase) في FASs بواسطة فتح حلقة إيبوكسيد (epoxide ring). والمثبط الأكثر إنتقائية لحفَازات كيتوسينثازات البكتيرية يمكن أن تكون فعالة.

ومؤخراً، لقد وجد بأن المظهرات المضادة البكتيرية من صنف ترايكلوسان (الشكل ١٥,٢٠) تعرقل خطوة تشبّع أولفين (olfen) في البناء الحيوي للحمض الدهني المحفَز بواسطة إنزيم enoyl-ACP reductase enzyme FabI في الإشريكية القولونية (مك موري وآخرون McMurry *et al.*, 1998)، مؤكداً أن هذه أهداف جيدة. الطفرات – المقاومة لترايكلوسان في الزائفة الزنجارية لضخ العوامل المظهرة التي تستعمل على نطاق واسع خلال مضخة تدفق MexC-MexD-OprJ (تشوانتشوين وآخرون Chuanchuen *et al.*, 2001). وأُفيد كذلك بأن ١,٤-ديسيوبستيتيوتيد إميدازولات (1,4-disubstituted imidazoles) هي مثبطات لـ FabI ذات حجم مولي (جزء من ألف بليون) دقيق – منخفض (هيردينج وآخرون Heerding *et al.*, 2001). نظيرات المتفطرة السلية لجين enoyl-ACP reductase من الإشريكية القولونية *(fabI in E.coli)* هي *inhA* مع تطابق ٣٦٪. وإنزيم InhA أقل حساسية لترايكلوسان ولكن حساس بالأخص لأيزونيازيد (isoniazid)، أحد المكونات الأساسية للمعالجة الكيميائية االتوليفية للدرن. ويتطلب أيزونيازيد (الشكل ١٥,٢٠ B) تنشيط مؤكسد بواسطة الإنزيم المتفطري كتاليز (KatG catalase) ومن ثم يؤسل NAD المربوط في الموقع النشط لـ InhA ليثبط الإنزيم (روزوارسكي وآخرون Rozwarski *et al.*, 1998). دراسات التركيب –

الوظيفة لكل من FabI و InhA بدأً من ترايكلوسان – والمكتبات المستندة – على أيزونيازيد ربما تؤدي مضادّات حيوية ومطهرات جديدة.

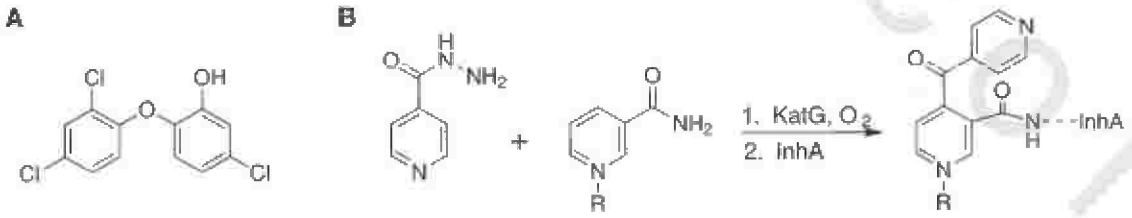
تتطلب الوظيفة في تحفيز FASs لكلا النوع I والنوع II إعداد بعد – الإنتساخ (post-translational priming) لأشكال apo من ACPs بواسطة فوسفوبانتيثينيل ترانسفيرازات ((phosphopantheinyl tranferases (PPTases)، التي تركّب الحبل فوسفوبانتيثين (phosphopantetheinyl (Ppant) tether)، المشتق من المادة المشاركة CoASH (لامبالوت وآخرون ١٩٩٦)، في holo ACP (الشكل ١٥,٢١). والآن أشكال holo من ACP تملك مجموعة– SH من مجموعة Ppant الترقيعية، التي تعتبر موقع نمو سلسلة أسيَل. ولقد تم تحديد تراكيب كل من أشكال apo وholo لـ ACPللعصية الرقيقة (إكسو وآخرون Xu *et al.*, 2001)، كما أن للإشريكية القولونية ACP والوحدة الفرعية ACP لأكتينورودين النوع II بوليكيتيد سينثاز (actinorhodin type II polyketide synthase) (كرمب وآخرون Crump *et al.*, 1997).

يستعمل FASs من الخلايا الحيوانية أيضاً Ppant priming of FAS مشابه ، ولذلك فمن غير الواضح إذا كان بالإمكان تحقيق التثبيط النوعي لـ PPTases لبدائيات النواة، ويشمل معقد ACP-PPTase (شيرجادز وآخرون Chirgadze *et al.*, 2000، باريس وآخرون Parris *et al.*, 2000، روتير وآخرون Reuter *et al.*, 1999)، ويسمح بالنهج – المستند على التركيب لتصميم المثبط من أجل إختبار هذه الفرضية. ويعتبر كل من ACPs و PPTases اللذين يعدلاهما أهداف محتملة للمضادّات الحيوية.



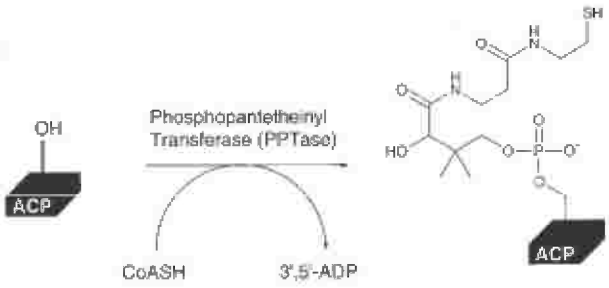
Cerulenin

الشكل (١٥,١٩). تركيب المنتج الطبيعي سيريولينين: مثبط النشاط القلوي لسينثازات الحمض الدهني.



Triclosan Isoniazid NADH Acylated NAD in InhA Active Site

الشكل (١٥,٢٠). (A) ترايكلوسان، مطهر مضاد بكتيري، يثبط enoyl-ACP reductase، (B) يتطلب الدواء المضاد للدرن أيزونيازيد الأكسدة الأيضية ليولد NAD المؤسل في الموقع النشط للهدف enoylreductase.



الشكل (١٥,٢١). التفاعل المحفز بواسطة فوسفوبانتيثينيل ترانسفيراز في إعداد حقول apo ACP.

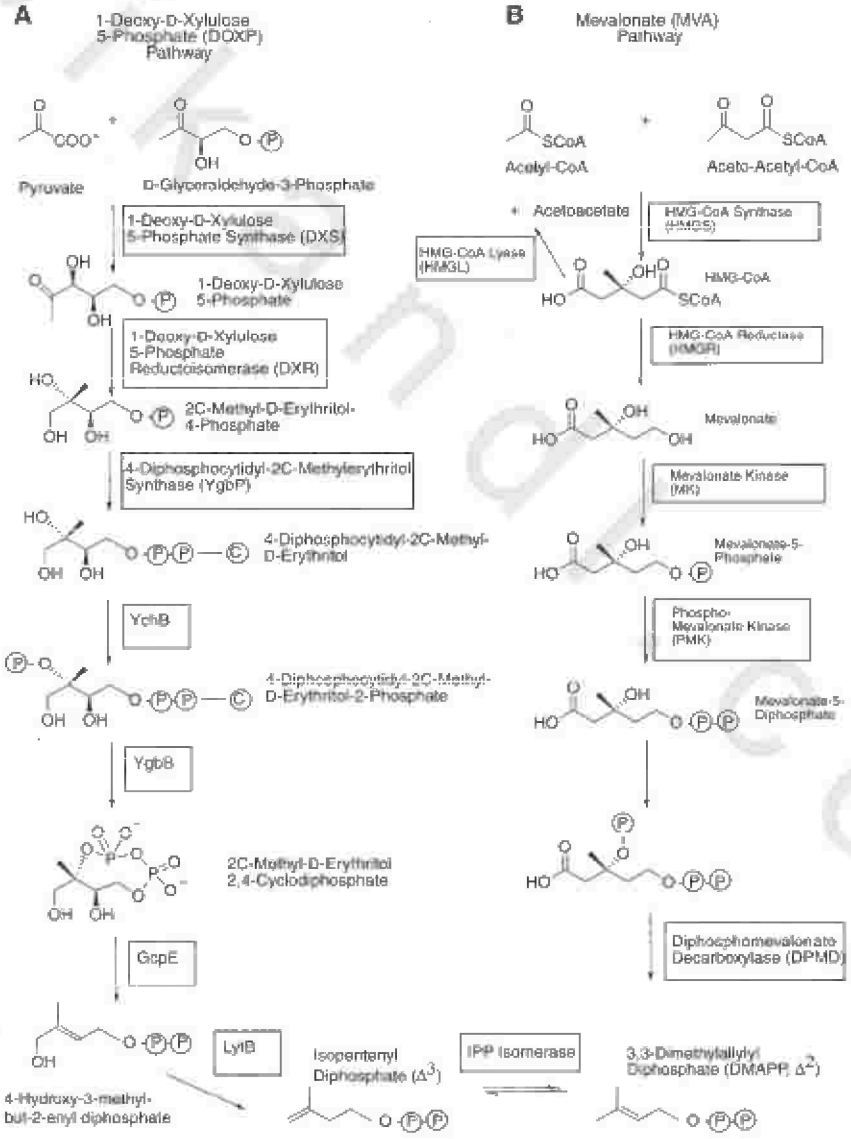
البناء الحيوي لأيزوبريتويد (isoprenoid) البكتيري

إنزيمات المسار غير الكلاسيكي

لخمسين عاماً عرف مسار ميفالونيت (mevalonate pathway) إلى المنتج الطبيعي أيزوبرينويد ودرس جيداً. والجوهر لهذا المسار (الشكل ١٥,٢٢) هو بناء هيكل ميفالونيت ذا سلسلة – متفرعة – ستة – كربون من ثلاثة جزيئات من acetyl-CoA المكثفة تسلسلياً بواسطة إنزيمات ثيوليزوهيدروكسي ميثيل جلوتاريل– CoA سينثاز (thiolase and hydroxymethylglutaryl-CoA synthase). وبعد ذلك يخضع ثيواستر إلى اختزال أربعة– كربون ليحول ثيواستر كربونيل (thioester carbonyl) إلى الكحول الأولي لميفالونيت. عملية بيروفوسفوريليشن (pyophosphorylation) عند الكحول الأولي وفوسفوريليشن عند الكحول الثالث (tertiary alcohol) بواسطة اثنين من كينازات (kinases) لإنشاء تفاعل أولفين – المكون لنزع الكربوكسيل/ والتخلص من P_i (olfen-forming decarboxylation / P_i elimination reaction) للحصول على أيزومرثومي داي ميثيليل – بيروفوسفات (دايميثيليل -PP allylic isomer dimethyllyl-pyrophosphate) (Δ^3) (dimethylallyl-PP). وأخيراً، يُحرك أيزوبينتينيل –PP أيزوميراز (isopentenyl-PP isomerase) الرابط المزدوج إلى مصوغ (أيزومر) Δ^2، أيزوبينتينيل –PP، وبذلك تكون كلا المصاوغات (الأيزومرات) متوفرة لتفاعلات الإطالة (والش Walsh, 1979).

وفي السنوات الأخيرة أصبح واضحاً، بدايةً من دراسات العلامات ومؤخراً من العمل مع الإنزيمات المنقاة (الصافية) (انظر روديش وآخرون Rohdich *et al.*, 2001، للمراجعة)، بأن acetyl-CoA لم يكن المصدر لأي من مصاوغات (أيزومرات) Δ^2 أو Δ^3 أيزوبرينيل -PP، المطلوبة للبناء الحيوي لأيزوبرينويد كوينينات (isoprenoid quinines) البكتيري الأساسي (الإنزيم المشارك Q) وC55undecaprenyl phosphates التي تعمل كحوامل في تجميع الببتيدوغليكان في البكتيريا السالبة – لغرام. وبدلاً من ذلك، فالمسار البكتيري هو غير كلاسيكي (الشكل ١٥,٢٢)، يكثف بيروفيت وجليسيرالديهيد–٣–P (glyceraldehydes-3-P) ليصنع ديوكسيزيلوز–٥–P (deoxyxylulose-5-P(DX-5-P))، وأيضاً كوسيط في البناء الحيوي لثيامين وبيردوكسال (thiamine and pyridoxal). ومن الواضح بأن مثبط الإنزيم الأول DX-5-P synthase هذا سيكون مضاد بكتيري واعد، يُعرقل الخطوة الرئيسة في الأيضات الأساسية الثلاثة. وبعد

ذلك يتحول DX-5-P من السلسلة – المستقيمة إلى هيكل السلسلة – المتشعبة بواسطة ريدكتوأيزوميريز المعتمد على NADPH (NADPH-dependent reductoisomerase) معطياً الوسيط 2-C-methyl-D-erythritol-4P (ME). وتثبط هذه العملية الإنزيمية بواسطة المنتجة الطبيعي فوسفونيت فوسميدوميسين (phosphonate fosmidomycin) (K_i=10 Nm) (كوبسش وآخرون Koppisch *et al.*, 2002)، ويُفترض بأن يقوم بدور مناظر للوسيط ألديهيد وكنقطة بداية معقولة لتصميم مثبط عملي. والإنزيمان التاليان هما CMP- نيوكليوتيديل ترانسفيراز (CMP-nucleotidyltransferase) ليولّد ME-CDP، وبعد ذلك كيناز، ليطلق CMP وينتج ME cyclic PP. ولقد تم مؤخراً وصف تركيب ME cyclic PP synthase (كيمب وآخرون Kemp *et al.*, 2002).



الشكل (١٥,٢٢). مقارنة (A) المسارات غير الكلاسيكية و(B) الكلاسيكية للبناء الحيوي لأيزوبرينويد في البكتيريا: أهداف جديدة للإنزيم.

والخطوات الإنزيمية التالية لكسر رابط C-OPP (رباط كربون – أكسجين من رابط الكحول –PP) وفقدان كلا المجموعتين OH- ليعطي Δ^2 isopentenyl-PP مازالت غامضة، على الرغم من أنه قد تم اقتراح الآليات (هيشت وآخرون Hecht *et al.*, 2001).

من المرجح أن أي من الإنزيمات المتعدِّدة في مسار غيرمسار ميفالونيت (nonmevalonate pathway) ستكون أهداف مضادة بكتيرية جيدة؛ لأنه مسار ميفالونيت الذي يستعمل في النباتات والحيوانات. ولقد لاحظ هيدل وآخرون (٢٠٠٢) بأن المعلوماتية الحيوية البكتيرية التي توحي بجينات ترمز إلى مسار ميفالونيت هي أساسية في المكورة العنقودية الذهبية وغيرها من المكورات الموجبة – لغرام. على سبيل المثال، وتستعمل المكورة العقدية المعوية البرازية والمكورة العقدية المعوية فيسيم (*Enterococcus faecalis* and *E.faecium*) المسار الكلاسيكي، حيث يدمج الثيوليت وهيدروكسي ميثيل جلوتاريل–CoA ريدكتازات في بروتين واحد، بحيث إن مثبطات المسار الكلاسيكي يجب أنه تعمل ضد هذه المُمْرضات الموجبة – لغرام.

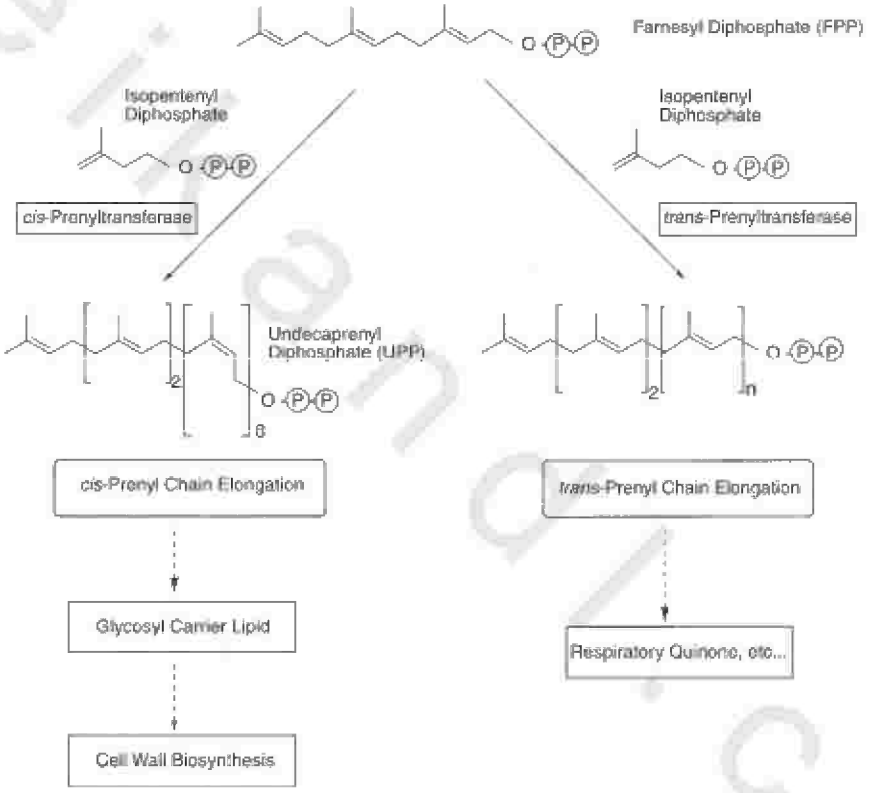
C_{55} أنديكابرينيل –PP سينثاز (C_{55} undecaprenyl-PP synthase)

C_{55} أيزوبرينويد حامل الدهن في مرحلة الغشاء للبناء الحيوي للببتيدوغليكان، أنديكابرينيل-PP، يُجمَع بواسطة *cis* – برينيلترانسفيريز (*cis*-prenyltransferase)، أنديكابرينيل -PP سينثيتاز (فوجيهاشي وآخرون Fujihashi *et al.*, 2001). ويختلف هذا الإنزيم عن *ترانس* – برينيل ترانسفيرازات (*trans* prenyltransferases) التي تطيل C_5 إلى C_{15} وحدات أيزوبرينيل وتحافظ على روابط *ترانس* المزدوجة في صفائف– ١,٥ المميزة لأيزوبرينويدات الطبيعية. وترانسفيرازات التي تطيل أيزوبرينويدات بواسطة الزيادات C_5 لتصنع الروابط المزدوجة لترانس *trans* (E) تزيل الهيدروجين البروتشيري ProR C_5 hydrogen من موحود C_5 allylic، بينما ترانسفيرازات التي تطيل إلى الربطة المزدوجة *cis* (Z) تزيل الـ ProsS C_1-H للموحود Δ^3 allylic monomer. والسلاسل الجانبية C_{30-40} ubiqinone isoprenoid كلها مصاوغات (أيزومرات) E.

يستعمل أنديكابرينيل-PP سينثيتاز بدلاً عن ذلك وحدات فارنيسيل-PP (farnesyl-PP) (C_{15}) مع ثلاثة روابط مزدوجة ترانس) كبريمر ويقوم بثمانية إطالات *cis* متتالية مع أيزوبرينيل –PP (الوحدة C_5) كمادة مانحة لتبني سلسلة C_{55} undecaprenyl (الشكل ١٥,٢٣)، مولدة ثمانية وحدات *cis*-prenyl (Z) والوحدات الثلاثة *trans*-prenyl (E) عند النهاية البعيدة لسلسلة C_{55}. ومن غير المعروف كيف أن تركيب أيزومر E_9/Z_8 للروابط المزدوجة يقيد وظيفة الدهن C_{55} كحامل للببتيدوغليكان في بناء جدار الخلية.

ويشارك نفس نوع *cis* – prenytransferase في سويات النواة لينتج السلسلة – الطويلة أيزوبرينويد دوليكول–PP (isoprenoid dolichol-PP) المشتملة في تجميع سلسلة السكريد الأحادي لتسكير البروتين (glycosylation) (بج وبراندبش Bugg and Brandish, 1994). ولذا فإنه من غير المعروف ما إذا يمكن لأحد الحصول على التثبيط الانتقائي

لـ cis- prenyltransferase لبدائيات النواة، ولكن إذا كان من الممكن تحقيقه الذي من شأنه عرقلة تكوين الدهن I والدهن II في البناء الحيوي للبيتيدوغليكان. تركيب أشعة - إكس لأنديكابرينيل - PP للمكورة الدقيقة ليوتيس (*Micrococcus luteus*) (فوجيهاشي وآخرون Fujihashi *et al.*, 2001) يشير إلى وجود توجه رابط لقالب / مستقبل فارنيسيل- PP (farnesyl-PP acceptor/ template) ومانح أيزوبينتينيل –PP في الخطوة الأولى (من ثمانية) لتكوين رابط -CC ويشير إلى السلسلة النامية، مطيلاً خمسة - كربونات في الوقت نفسه، يستطيع أن يملأ الشق (cleft) الراهب للماء . وربما تكون الانشقاقات مستهدفة بواسطة المثبطات.

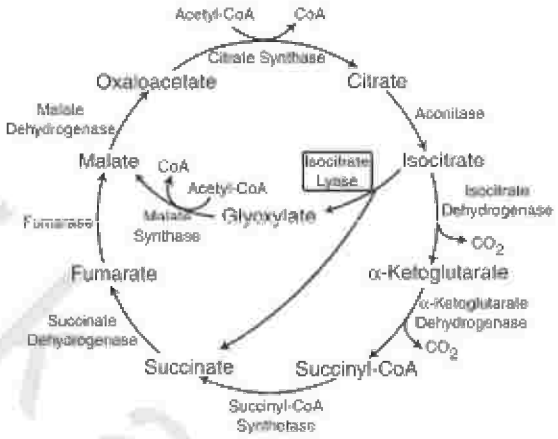


الشكل (١٥,٢٣). إنحرافات مسارات برينيل ترانسفيراز بين تحويلات *cis* و trans-prenyl.

أيزوستريت لياز (Isocitrate lyase)

البديل لأيض الحمض الدهني الذي يبدو أنه هدف جديد في المتفطرة السلية هو تحويل الكربونات من الحماض الدهنية خلال تحويلة جليوكسايليت (glyoxylate shunt) إلى غلوكوز. وعلى الرغم من أن إنزيمات انتقال جلوكسايليت، مثل أيزوستريت لياز (الشكل ١٥,٢٤)، تعدُّ غير أساسية للبقاء للمتفطرة السلية في أطباق التزريع، تعدُّ أساسية للفوعية في الحيوانات (مك كيننى وآخرون McKinney *et al.*, 2000)، مما يدل على أن البكتيريا

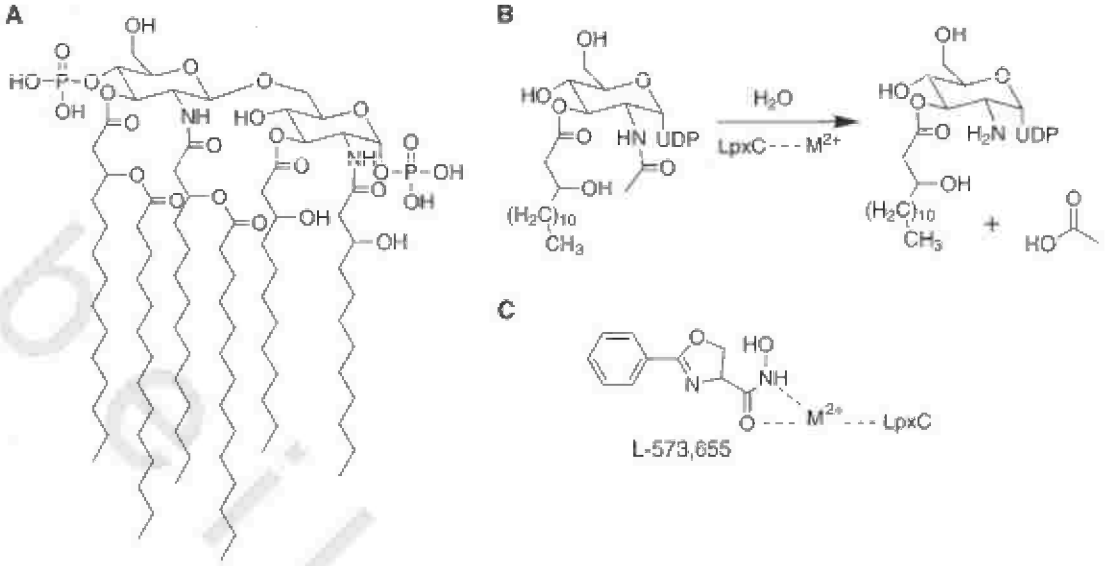
الإمراضية تعتمد على الحماض الدهنية للحصول على الطاقة أثناء العداوى في الجسم الحي. وهذا مثال حيث إن فحص الفوعية بدلاً عن فحص المبيد البكتيري يكشف عن هدف جديد محتمل. والدورة جليوكسيليت قد تورطت بالمثل كمتطلب للفوعية الفطرية (لورينز و فينك Lorenz and Fink, 2001).



الشكل (١٥,٢٤). تحويلة جليوكسليت ودور أيزوسترات لياز.

البناء الحيوي للدهن A في البكتيريا السالبة – لغرام

الإستراتيجية التي يمكن أن تستهدف العداوى البكتيرية السالبة – لغرام، ولكم ليس الموجبة – لغرام، هي لعرقلة البناء الحيوي للب الدهن A من مُرَكَب عديد السكريد الدهني للغشاء الخارجي البكتيري (الشكل A١٥,٢٥). ويسبب لب عديد السكريد الدهني العديد من الآثار الجانبية السامة المصاحبة للعداوى السالبة – لغرام (رايتز Raetz, 1987). ولب الدهن A هو جلوكوسامين ثنائي السكريد (glucosamine disaccharide)، هيكسا–أسيليتيد (hexa-acylated) ويحتوي على فوسفيت إسترات عند ١ و ٤'. وطليعة أشطار غلوكوسامين هي الطلائع الشائعة نيوكليوسيد سكرفوسفو الثنائي (diphosphosugar UDP-GlcNAc) المؤستر (esterified) عند 3-OH مع مجموعة 3-R-3-OH-myristoyl المنوحة بواسطة 3-R-3-OH-myristoyl-*S*-ACP المناظرة. وهذا المستقلب بعد ذلك ينوع منه الأسيل على شطر N-acetyl (الشكل ١٥,٢٥ B) بواسطة الإنزيم LpxC قبل ميريستوليشن ((N-3-OH-myristoylation (LpxD). وإنزيم LpxC deacetylase هو إنزيم زنك معدني الذي قد تم تثبيطه بواسطة إنزيم المستخلب المعدني metal-chelating phenyl-oxazolyl hydroxamates (الشكل ١٥,٢٥ C) (جاكمان وآخرون Jackman *et al.*, 1999، أونيشي وآخرون Onishi *et al.*, 1996). وهذه المثبطات لم تحرز تقدماً؛ بسبب الاختراق الضعيف إلى داخل البكتيريا، ولكن تحقق بأن LpxC هو هدف قتل في البكتيريا السالبة – لغرام. كما أن فحص مكتبة مثبط الإنزيم المعدني قد قلب الأدوار الرئيسة التي تستهدف LpxC (كليمينتس وآخرون Clements *et al.*, 2002).



الشكل (١٥,٢٥). (A) تركيب لب الدهن A، (B) نزع أسيتيل UDP-GlcNAc بواسطة LpxC، (C) مثبطات phenyl-oxazolyl hydroxamate لإنزيم الزنك LpxC . M^{+2} هو المعدن المرتبط بالإنزيم المطلوب للتحفيز.

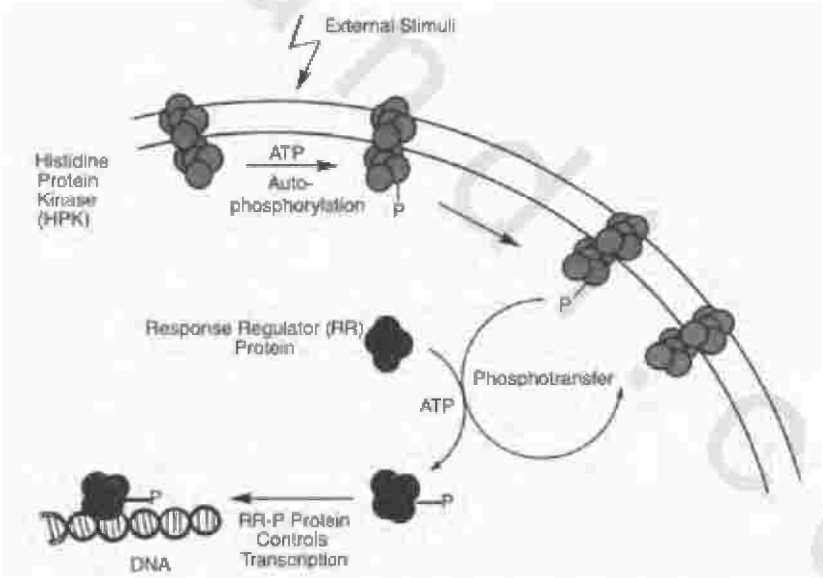
أنظمة الشقّين التنظيمية

الآليات العامة التي تستخدمها البكتيريا لاستشعار بعض التغيير الكيميائي في بيئتها الدقيقة الخارجية المباشرة في معظم الأحيان تستخدم نظم إشارة التنبيغ ذات – الشقّين (two-component signal transduction systems)، مع منظمات مجسات واستجابة كعنصرين من البروتين (باريت وهوتش Barret and Hoch, 1998). والمجس عادة هو هيستيدين كيناز (histidine kinase) عبر الغشاء ومنظم الاستجابة هو منشط (مفعل) انتساخي لـ دنا (الشكل ١٥,٢٦) (انظر ماتسوشيتا وجاندا Matsushita and Janda, 2002). استشعار الربيطة عن طريق حلقات (عُرى) حول الجبلّة والحقل المجس عبرالغشاء يؤدي إلى الفسفرة الذاتية (autophosphorylation) للموقع – النشط هيستيدين في حقل هيستيدين كيناز السيتوبلازمي للمجس وما يليه من نقل مجموعة فوسفوريل (phosphoryl group) من P-His إلى Asp-β-carboxylate المحفوظة في النصف الأميني لمنظم الاستجابة. ويحث الشكل P-Asp لمنظم الاستجابة تغيير تجسمي (allosteric change) في تشكّل حقل ربط دنا، ويستطيع المنشط إبطال قمع (derepress) الإنتساخ للجينات المستهدفة (إذا كان قامعاً في حالته القاعدية) ويبدأ الاستجابة المبرمجة.

لقد لاحظنا بأن نظام – الشقين VanS-VanR هو عنصر استشعار/ محول مهم للأنماط الظاهرية VanA وVanB في المكورة المعوية البرازية المقاومة للفانكوميسين (VRE) السريرية المهمة (الفصل العاشر). كما كانت هناك مؤشرات بأن نظم الشقّين تعدُّ محددات للفوعية البكتيرية. ولقد استعمل النهج القائم – على الجينات لوصف النظم المنظمة ذات – الشقّين في المكورة العقدية الرئوية (ثروب وآخرون Throup *et al.*, 2000)، الذي تم فيه اكتشاف ١٤ زوج

جينات ذات – الشِقّين. وعلى الرغم من أن الوظائف الفسيولوجية للأزواج الـ ١٤ لم يمكن تحديدها بسهولة من التسلسل، فمن الممكن إخراج كل زوج وتقييم إمراضية طفرات المكورة العقدية الرئوية في نموذج (موديل) عدوى الجهاز التنفسي في الفئران. وأحد منظمي الاستجابة، في العائلة الفرعية OmpR، كان أساسياً للنمو، وكان لهذا مناظرات أساسية في المكورة العنقودية الذهبية والعصية الرقيقة. سبعة أزواج جينات أخرى ذات – الشقّين، عندما تتحور (تتطفر)، تُظهر بعض التوهين (attenuation) في نمو المكورة العقدية الرئوية في نموذج عدوى الجهاز التنفسي في الفأر.

في المكورة العنقودية الذهبية، تعطل زوج الشقّين *srhS-srhR* أدى إلى ٣- لوغاريتم التوهين (3-log attenuation) لنمو سلالة المكورة العنقودية الذهبية هذه في نموذج الكلية التهاب الكلية والحُويضة (pyelonephritis model) في الفئران (ثروب وآخرون Throup *et al.*, 2001) وأشار تحليل صفوف Mrna بأن زوج الشقين هذا مهم لقابلية المُمْرض على النمو عند ضغط الأكسجين المنخفض (low oxygen tension) عند التبديل للطرق اللاهوائية لتوليد الطاقة. والآهوائية الاختيارية (facultative anaerobiosis) للمكورة العنقودية الذهبية هو واحد من السمات الرئيسة التي تتيح له بإنتاج عداوى النسجة – العميقة، المستمرة.



الشكل (١٥,٢٦). منطق منظم الإستشعار / الإستجابة ذات–الشِقّين.

وهذه النتائج مهدت الطريق لتحليل الدور الخاص لأزواج الإستشعار / المُحولة ذات الشِقّين الثمانية هذه في الإمراضية ، وتشمل العمليات مثل الالتصاق والتحلل الذاتي (adhesion and autolysis)، وربما تساعد في تحديد الأولوية لأي زوج من الشِقّين يفضل كأهداف مضادة بكتيرية. وكشف تحليل مجين الزائفة الزنجارية ٦٣ أو ٦٤ نظم ذات – شِقّين، مما يوحي إلى إستراتيجيات تحكم متطوّرة ومعقدة لإدماج الإشارات الخارجية بواسطة هذا المُمْرض

المتنوع (رودريجو وآخرون2000 ,.Rodrigue *et al*). وقد تم تحديد واحد من هؤلاء من منظمي الاستجابة للزائفة الزنجارية، PvrR كمغير للتحول النمطي الظاهري من أشكال المقاومة – للمضاد الحيوي إلى الحساسة للمضاد الحيوي وكذلك تسهم في تشكيل الفلم الحيوي (biofilm) (درينكارد واوسوبيل Drenkard and Ausubel, 2002).

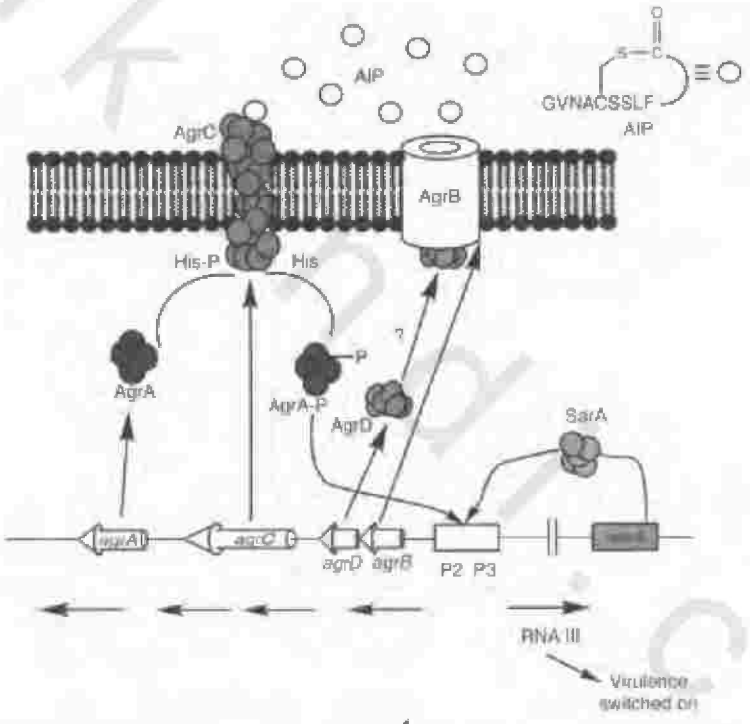
لقد ارتبطت نظم الشقين مع الفوعية. ففي سلالات المكورة العنقودية الذهبية، تعدُّ دائرة الشقيْن *agr* signaling circuit عنصراً أساسياً في التحكم الجيني لإظهار محددات الفوعية، وتشمل إفراز الإنزيمات الخارجية، السميات البروتينية، الاصقات (adhesions) (ليون وآخرون Lyon *et al*., 2000). وزوج الشقين *agr*، AgrC و AgrA، تحت تحكم نصاب – الاستشعار (انظر اسفل). في المُمْرض السالب– لغرام السالمونيلا إنتيريكا ضرب تيفيميوريم (*Salmonell enteric* serovar Typhimurium) يشغَل زوج الاستشعار / المحول PhoP-PhoQ بواسطة تقييد (تحديد) Mg^{2+} أو Ca^{2+} بعد ابتلاع البكتيريا بواسطة الخلايا البلعمة الكبيرة (macrophages) أو الخلايا الظهارية. ينشط PhoP-PhoQ جينات الانتساح التي تعيد قولبة (بناء) الغشاء الخارجي، ويشمل التعديلات على الدهن A (جيو وآخرون Guo *et al*.,1998). وتشمل هذه إضافة أمينوأرابينوز (aminoarabinose) إلى مجموعات فوسفيت للدهن A وإضافة مجموعة أسيل سابعة، سلسلة بالميتويل (palmitoyl chain)، إلى الدهن A، الحفَازة بواسطة PagP. ومن ضمن التأثيرات. ومن بين الآثار إحداث التعديلات في شحنة السطح للغشاء الخارجي التي تنتج المقاومة للبيْتيدات المضادة الجرثومية الكتيونية، وتشمل تلك من الخلايا البلعمية الكبيرة وكذلك من المضاد الحيوي الكتيوني بوليميكسين B (الفصل السادس) (جيو وآخرون Guo *et al*., 1997). المركبات التي من شأنها عرقلة كل من زوج الاستشعار / المحول Agr في المكورة العنقودية الذهبية أو زوج PhoP-PhoQ في السالمونيلا ضرب تيفيميوريم سوف توعد بعوامل مضادة بكتيرية جديدة، كما هو في مثبطات السلامونيلا PagP أسيل ترانسفيراز.

وصلت سبل الفحص عن KinA بروتين هيستيدين كيناز من العصية الرقيقة إلى عديد من المثبطات، وتشمل كلوسانتيل تتراكلوروساليسيلانيليد (closantel tetrachlorosalicylanilide) وأتريتيل أميدين (atrityl amidine) (RWJ-49815)، ولكن كل هذه ربما تكون تمسخات غير نوعية، مشوشات للتركيب (perturbants)، ومكدسات بروتين بدلاً من موجهات محددة (هيليارد وآخرون Hilliard *et al*., 1999، ستيفينسون وآخرون Stephenson *et al*., 2000). وتحليل الصف الدقيق (microarray analysis) قد تم تطبيقه على نظم الشقين للعصية الرقيقة (كوباياشي وآخرون Kobayashi *et al*., 2001).

وتم تحديد تركيب أشعة – إكس للعديد من منظمات الاستجابة والحقول الحفَازة لكينازات الاستشعار (روبينسون و ستوك Robisnon and Stock, 1999)، مما أدى إلى إدراجها في العائلة الفرعية GHL للبروتينات الحالة لـATP المذكورة أعلاه لـ DNA غيراز. ومرة أخرى، المجموعة الكبيرة من مثبطات موقع–ATP من بحث بروتين كينازينبغي أن تكون نقاط انطلاق جيدة للكشف عن الموجهات التي ستكون انتقائية للربط مع جيب أدينين (adenine pocket) لمواقع ATP لهستيدين مستشعر كينازات (histidine sensor kinases).

البناء الحيوي استشعار النصاب: التثبيط لتوهين الفوعية

لاحظنا في الفصل الحادي عشر استخدام نظم استشعار النصاب الذي بواسطته تستشعر البكتيريا الكثافة السكانية وتصنع استجابات متواسطة وراثياً لتنتج عناصر الفوعية، وتشمل المضادّات الحيوية. وكما ذُكر أعلاه، أن موضع Agr في المكورة العنقودية الذهبية يعد جزءاً من الاستجابة العالمية للفوعية. وكما هو مبين في الشكل (١٥,٢٧)، بروتينات AgrC و AgrA من مُشغّل الخمس جينات five-gene *agr* operon هي مجس كيناز عبر الغشاء ومنظم الاستجابة (ليون وآخرون Lyon *et al.*, 2000). يعد Agr B ببتيد مضخة التدفق المكرّسة للمعالجة الإنحلالية للبروتين وإفراز منتج الجين AgrD، شكل قبل (بدء) البِبْتيد (propeptide form) من البِبْتيد المُحث الذاتي الناضج (AIP) (autoinducing mature peptide).



الشكل (١٥,٢٧). موضع البِبْتيد الحفّاز الذاتي، مشغل agr للمكورة العنقودية الذهبية.

وبمجرد معالجة AIP بالانحلال البروتيني وإفرازه، فالربيطة الخارجية لـ AgrC هي التي تُشغّل المزيد من الانتساخ للموضع Agr في الخلية المنتجة والخلايا المجاورة. يُقدم استشعار – النصاب المعتمد على الكثافة من قبل تركيز AIP المركز، الانتشاري واستقباله المحدد بواسطة AgrC. ويعد تركيب AIP شاذ. وهو ثيولاكتون (thiolactone) من ثنائية إلى تسعة فضالات، تنشأ من أسر فضالة نهاية–سي فينيل الآنين (C-terminal phenylalanine) بواسطة السلسلة الجانبية لـ (Cys_5). الأكتامز الحلقي أو لاكتونز الحلقي المقابل، الذي يستبدل N أو O لـ S من ثيولاكتون،

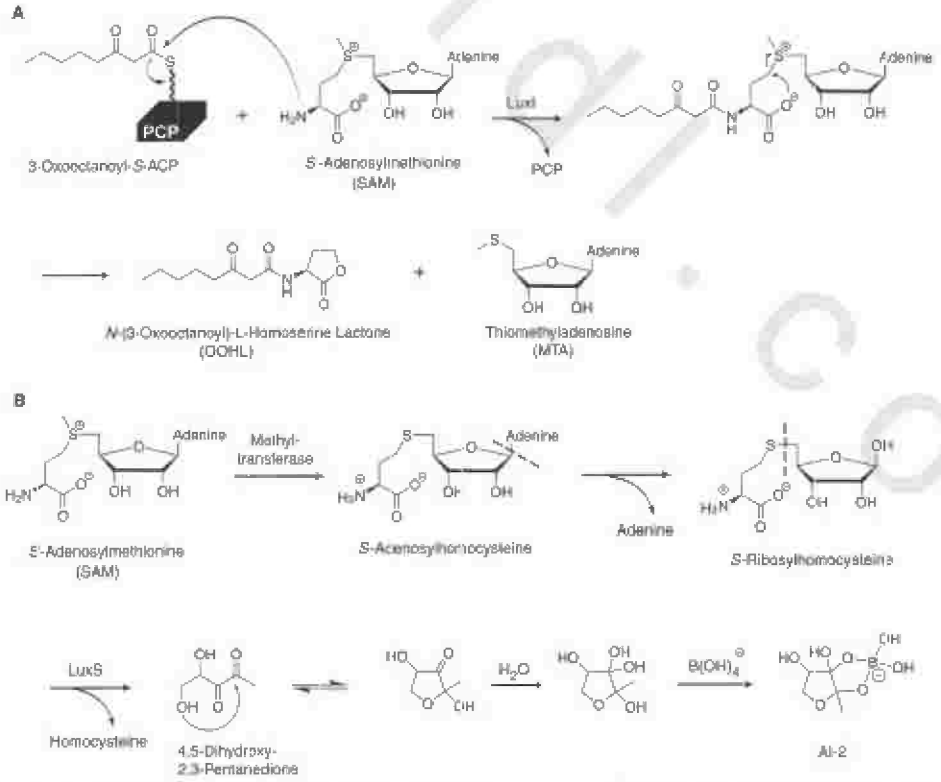
هي مثبطات، ترتبط مع الحقل الخارجي لـ AgrC ولكن لا تحول الإشارة عبرياً (ليون وآخرون Lyon *et al.*, 2000). وهذا يشير إلى نهج لتضاد (استعداء) مسار إشارة Agr، ويولد مثبطات عالمية لمسار استجابة الفوعية هذا. ولقد شوهد أربعة متغيرات من AIP، مما أدى إلى تصنيف المجموعات الأربعة من فيرمونات AIP من المكورة العنقودية الذهبية (ملك دويل وآخرون McDowell, *et al.*, 2001). ويبدو كذلك بأن نظم نصاب الاستشعار في البكتيريا الأخرى الموجبة – لغرام تتواسط بواسطة ببْتيدات صغيرة تعمل على الفيرمونات (للمراجعة، انظر كليريبيزيم وآخرون Kleerebezem *et al.*, 1997). وتشمل هذه تطوير التنافس الوراثي في العصية الرقيقة والمكورة العقدية الرئوية وتنظيم المُشغَلات لإنتاج صنف لانتيبيوتيك من مضادّات الببتيدات الجرثومية (الفصل الرابع عشر).

يبدو كذلك بأن نظم استشعار – النصاب هي محددات مهمة لعلم التشكل (المورفولوجيا) والاتصال عندما تنمو البكتيريا في تكدسات (aggregates) في الأفلام الحيوية، التي تحدث، على سبيل المثال، على القثاطرالمستقرة (indwelling catheters) في المرضى المنومين. وتحت هذه الظروف غالباً ما تكون البكتيريا مقاومة للمضادّات الحيوية؛ بسبب الاختراق الضعيف خلال أغطية عديد السكريد المصطنعة في هذه الأنماط الظاهرية (ميللير وباسلير Miller and Bassler, 2001). والنهج الأكثر مباشرة للتثبيط سيكون لعرقلة البناء الحيوي لمشيرات (ملوحات) النصاب التي تستهل تطوير الفلم الحيوي . وفي سياق Agr المحدد أعلاه، حيث الببْتيد هو جزيء الإشارة، هذا من شأنه أن يكون إما إنزيم AgrD الذي يصنع شكل قبل الببْتيد (propeptide form) للببْتيد الحفّاز وإما نشاط البروتياز لمضخة تصدير AgrB.

وفي الحالة العامة للكائنات السالبة – لغرام التي فيها لاكتونات أسيل هوموسيرين (acylhomoserine lactones) هي جزيئات نصاب – الاستشعار البين الخلوي، سوف تكون عائلة LuxI synthases هي الهدف. ينتج أسيل هوموسيرين من إس – ادينوسيل ميثونين ((S-adenosylmethionine (SAM)) والمادة المشاركة acyl-S-ACP (هانزيلكا وآخرون Hanzelka *et al.*, 1999). وعلى الرغم من أن القليل من تفاصيل الآلية معروفة ولكن العائلة الكبرى لإنزيم LuxI يعتقد بانها تعمل أولاً كأميد سينثازات (الشكل ١٥,٢٨) لتولد N-acyl-SAM وACP الحر، يتبعه تحليق كاربوكسيلات أكسيجين (cyclization of the carboxylate oxygen) على بيتا–كربون من شطر (SAM-methionyl)، مع انفلاق الربط C_β-S. وهذه خطوة تكوين لاكتون وتطلق المنتج المشارك ثيوميثيل أدينوسين (thiomethyladenosine). ينبغي أن يكون من الممكن العثور على أو صنع مثبطات نوعية (محددة) وفعالة من العائلة الكبرى لهذا الإنزيم وعرقلة إنتاج نصاب – الإشارات. ولقد تم مؤخراً حل تركيب شعة – إكس للاكتون سينثيتاز EsaI من الزائفة ستيوارتيي *(Pseudomonas stewartii)* وسوف يكون نقطة انطلاق للتصميم المستند – على التركيب للأدوية (واتسون وآخرون Watson *et al.*, 2002).

لقد تم مؤخراً الكشف عن عائلة ثانية من المستحثات الذاتية للنصاب، AI-2 لتسير على مضي AI-1 لاكتونات هوموسيرين، في البكتيريا السالبة – لغرام وتشمل الإشريكية القولونية النزفية المعوية (enterohemorrhagic

(*E.coli* O157:H7) والفرضية المتقدمة القائلة بأن AI-1 المشاركة في الاتصال بين الأنواع (intraspecies) في حين أن AI-2 هو للاستشعار بين الأنواع. وكل من لاكتونات أسيل هوموسيرين وAI-2 -نصاب الاستشعار مشتقة من SAM . بينما يفلق SAM LuxI إلى مثيوثيوأدينوسين (methiothioadenosine) وتستعمل سلسلة هوموسيرين كجزء من جزيء إشارة AI-1، في المسار SAM AI-2 ويحول إلى S-adenosylhomocysteine بواسطة مختلف مثيل ترانسفيرازات. وبعد ذلك يعمل هيكل S-adenosylhomocyteine بواسطة إنزيمين، Pfs ليطلق أدينين وينتج S-ribosylhomocystein، يتبعه LuxS الذي ينتج 4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione (DPD). وDPD في شكل معقدات هيدريت الحلقي (cyclic hydrate (complexes (1,2-diol) مع $B(OH)_3$ في الوسط (البيئة) لينتج شكل بوريت إستر الحلقي النشط (active bicyclic borate ester, AI-2)، الذي يربط نوعياً بالرياضيات الكيميائية (stoichiometrically)، مع هدفه البروتين، LuxP، بروتين حول الجيلّة ذواب وذا صلة مع البروتينات المرتبطة بريبوز (ribose) (تشين وآخرون Chen *et al.*, 2002) (الشكل B١٥,٢٨). دور الإشارة هذا يعد وظيفة حيوية جديدة للمستقلب المحتوي على-بورون (boron-containing metabolite). ومعقد AI-2-LuxP هو الربيطة للفسفرة الذاتية مستشعر كيناز LuxQ ذا- الشقين (تشودير وباسلير Schauder and Bassler, 2001، تشودير وآخرون Schauder *et al.*, 2001). الإنزيم المحتوي-على الزنك LuxS (ليويس وآخرون Lewis *et al.*, 2001) يمكن أن يكون هدفاً للعوامل التي تخفض الفوعية.



الشكل (١٥,٢٨). (A) آلية التفاعل المفترضة لأسيل هوموسيرين لاكتون سينثازات (AHL). (B) التوليد الإنزيمي لنصاب إشارات AHL.

الأهداف الأخرى لتوهين الفوعية

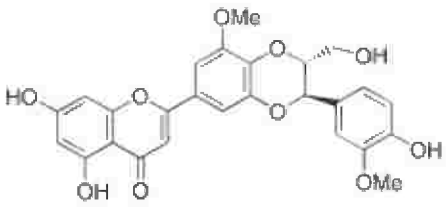
مجموعة متنوعة من المُمْرضات البكتيرية الناجحة، مثل، يرسينيا *(Yersinia)*، ليستيريا *(Listeria)* والسالمونيلا قد اكتسبت القدرة على تعديل الأنشطة بين الخلايا للمضيفين الفقاريين لفظ (لتبلد) الدمار. ولهذا أهمية خاصة لهذه المُمْرضات، حيث إنها تحث التذوّت (الدمج بالداخل) إلى داخل خلايا المضيف، مثل خلايا البلعمة الكبيرة، وبعد ذلك تعادل (تحييد) (neutralize) آلية قتل خلايا المضيف البلعمية (جرويسمان Groisman, 2001). ولقد لاحظ ستيبينز وجالان (Stebbins and Galan, 2001)، جالان وكولمير (Galan and Collmer, 1999)، وليي وتشينويند (Lee and Schneewind, 2001)، أمثلة على التشابه التركيبي بواسطة البروتينات البكتيرية لنظيرات خلية المضيف التي تتحكم في استجابات خلية المضيف. تُفرز كل من أنواع اليرسينيا والسالمونيلا بروتينات عبر أغشية جدار المضيف عن طريق النوع III لماكينة الإفراز (جالان وكولمير Galan and Collmer, 1999، ليي وتشينويند Lee and Schneewind, 2001)، كما ذُكر في الفصل التاسع. ومن بين البروتينات المحقونة هي تيروسين فوسفتازات (tyrosine phosphatases, YopH) من أنواع اليرسينيا، وSptP من أنواع السالمونيلا (جوان وديكسون Guan and Dixon, 1990، ستيبينزوجالان Stebbins and Galan, 2000)، التي تنزع فوسفوريل (dephosphorylate) بروتينات خلايا البلعمة الكبيرة وتشمل التيروسين كيناز FAK (كيناز الإلتصاق البؤري focal adhesion kinase) مما يؤدي إلى شلل هجوم البلعمة على البكتيريا (بيرسوون وآخرون Persoon *et al.*, 1997). وعندما تحقن السالمونيلا بروتين SopE إلى داخل خلايا المضيف، فيقوم بدور تبادل عنصر جوانين نيوكليوتيد (guanine nucelotide factor (GEF)) لتسريع تبادل GDP بواسطة GTP عند الموقع النشط لـ Rac1 و cdc42 GTPases (انظر جالان وكولمير Galan and Collmer, 1999، ليي وتشينويند Lee and Schneewind, 2001، والمراجع فيهم). وبدورها، تقوم هذه بإعادة ترتيب الهيكل الخلوي لأكتين (actin cytoskeleton) وتُعزز امتصاص السامونيلا إلى داخل خلية المضيف، حيث يمكن استعادة الوظيفة الطبيعية للهيكل الخلوي لخلية المضيف عن طريق تسليم البروتين البكتيري SptP الذي يكون بمثابة GAP (GTPase accelerating protein)، لتعزيز تراكم Rac1 و cdc42 في حالات GDP الأصلية، الهاجعة، غير النشطة. وهذا يحد من إضطراب GTPases المضيف والهيكل الخلوي وماكينة الدمج الداخلي، ويسمح لخلية المضيف المصابة بالبقاء والسالمونيلا بالإختفاء "hide out" في البيئة الدقيقة المفصولة. وأي من بروتينات SopE GEF أو SptP GAP من السالمونيلا سوف تكون أهداف محتملة لخفض الفوعية والإمراضية لمثل إستعمارات السالمونيلا هذه. وكذلك هو شأن العوامل التي تعرقل تجميع أو وظيفة ماكينة الإفراز النوع II عن طريق مكونات كل من الغشاء الداخلي والغشاء الخارجي (الفصل التاسع).

معرقلات التدفق

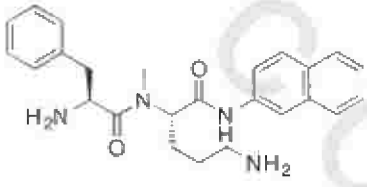
لقد تم إجراء الفحوصات لمعرقلات مضخة التدفق ضد نظم MexA-MexB-OprM، MexC-MexD-OprJ، وMexE-MexF-OprN للزائفة الزنجارية، فضلاً عن مضخات الثلاث – عناصر AcrA-AcrB-TolC للإشريكية القولونية،

في محاولة للحجّ من تدفق فلوروكوينولون. والمركبات الموجهة ثبطت المضخات، خفضت كل من المقاومة الداخلية والمقاومة المكتسبة، وخفضت تواتر ظهور الطفرات المقاومة – لغيراز (لوموفسكايا وآخرون Lomovskaya *et al.*, 2001).

المنتج النباتي الطبيعي ٥–ميثوكسيهيدنوكاربين– د (5'-methoxyhydnocarpin D) (الشكل ١٥,٢٩) هو واحد من معرقلي المضخة النشط لتدفق فلوروكوينولون (ستيرميتز وآخرون Stermitz *et al.*, 2000)، مما يشير بأن هيكل – عمل النشاط سوف يكون ممكناً. وبالمثل، فتعديل تراكيب تتراسيكلين قد أنتج مشتقات كلوروبوفيلثيو (chloroprophylthio derivatives) التي تعرقل تدفق بروتينات التدفق Tet (شوبرا وروبرتز Chopra and Roberts, 2001). وكما ذكر في الفصل الرابع، كذلك تُعد غليسيكلينات (glycylclines) الجديدة (الشكل ٤,٥) معرقلات مضخة تدفق Tet إضافة إلى أنها تكون نشطة في السلالات مع عوامل الحماية الريبوسومية TetM وTetO (ليي وهيكر Lee and Hecker,1999، ميتسشير وآخرون Mitscher *et al.*, 1999). كان قد ألمح للمقاومة الداخلية للزائفة الزنجارية للمضادّات الحيوية في الفصل التاسع، مما يعكس كلاً من الحواجز لدخول المضاد الحيوي بواسطة المسامات وتدفق المضاد الحيوى بواسطة أنظمة المضخة المذكورة أعلاه. تسلسل مجين الزائفة الزنجارية (ستوفر وآخرون Stover *et al.*, 2000) مهد المرحلة للسبل المستندة – على المجينات. وللوهلة الأولى، فقدرة البكتيريا لترميز بروتينات الغشاء الخارجي (١٥٠ جين) تبدو كبيرة بشكل غير متناسب، مع ١٩ جين من عائلة مسام OprD، ٣٤ عضو من عائلة مسام بوابات TonB، و١٨ جين من عائلة مضخة التدفق OprM. وهذا يشير إلى الطرق المتعدِّدة للزائفة الزنجارية لتحقيق التوازن وتنظيم تدفق الجزيئات عبر الغشاء الخارجي كلاً للداخل والخارج. ويمكن أن تحدد سبل الطرد للخارج المجموعة الفرعية الأساسية في كل فئة، وتسمح بمقايسات التصميم المستهدفة ضد هذه المجموعات الفرعية لكل من امتصاص المضاد الحيوي، مثال، ليعطي "الجيل الخامس" من الكيفالوسبورينات، ولمعرقلات تدفق المضاد الحيوي.

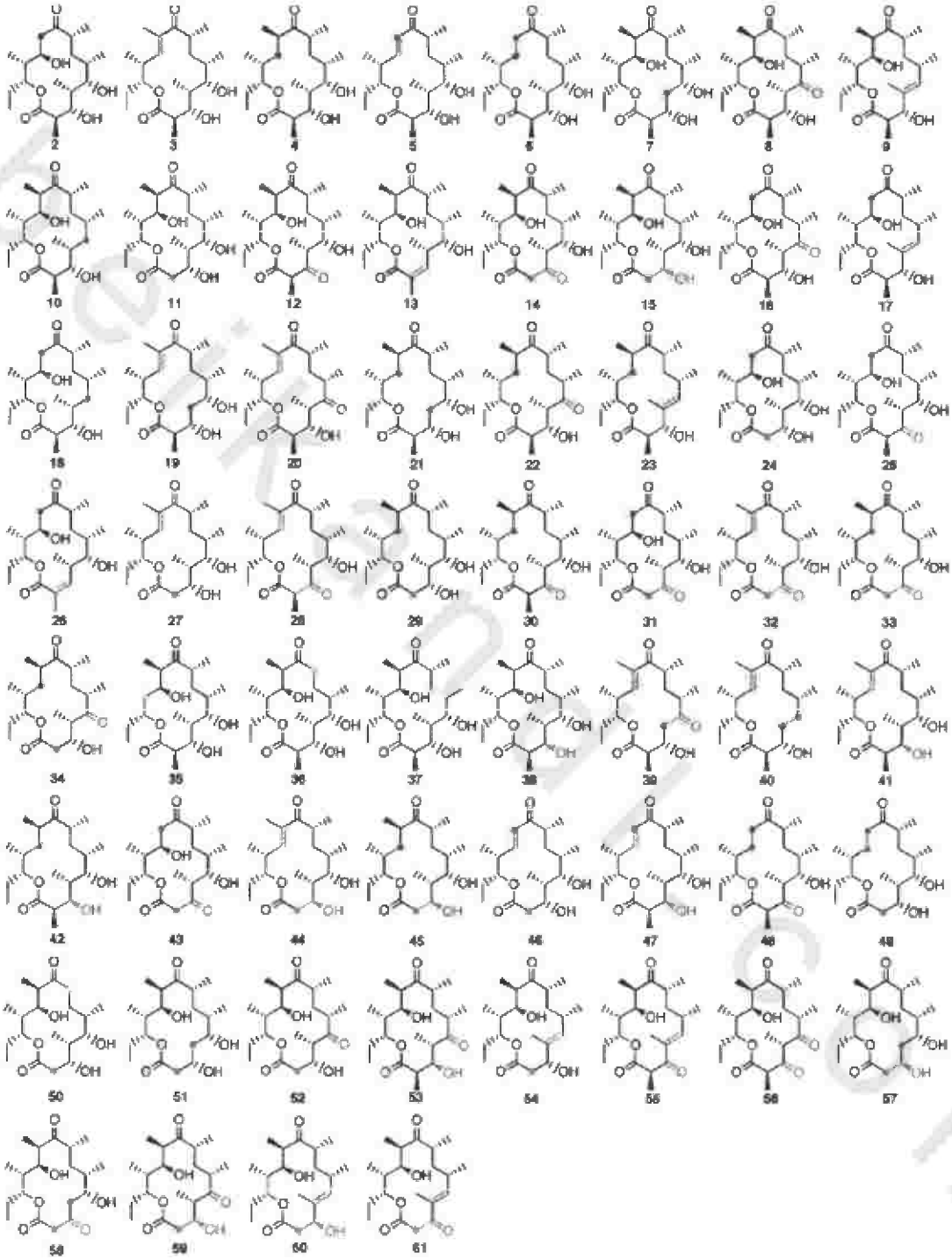


5'-Methoxyhydnocarpin D



Naphthyl Dipeptide

الشكل (١٥,٢٩). معرقلات مضخات التدفق المبلَغ عنها.



مكتبة من متغيرات إريثرونوليد ماكروليد (erythronolide macrolide) عن طريق إعادة برمجة حقول DEBS synthase (بالإذن من مك دانييل وآخرون McDaniel *et al.*, 1999).