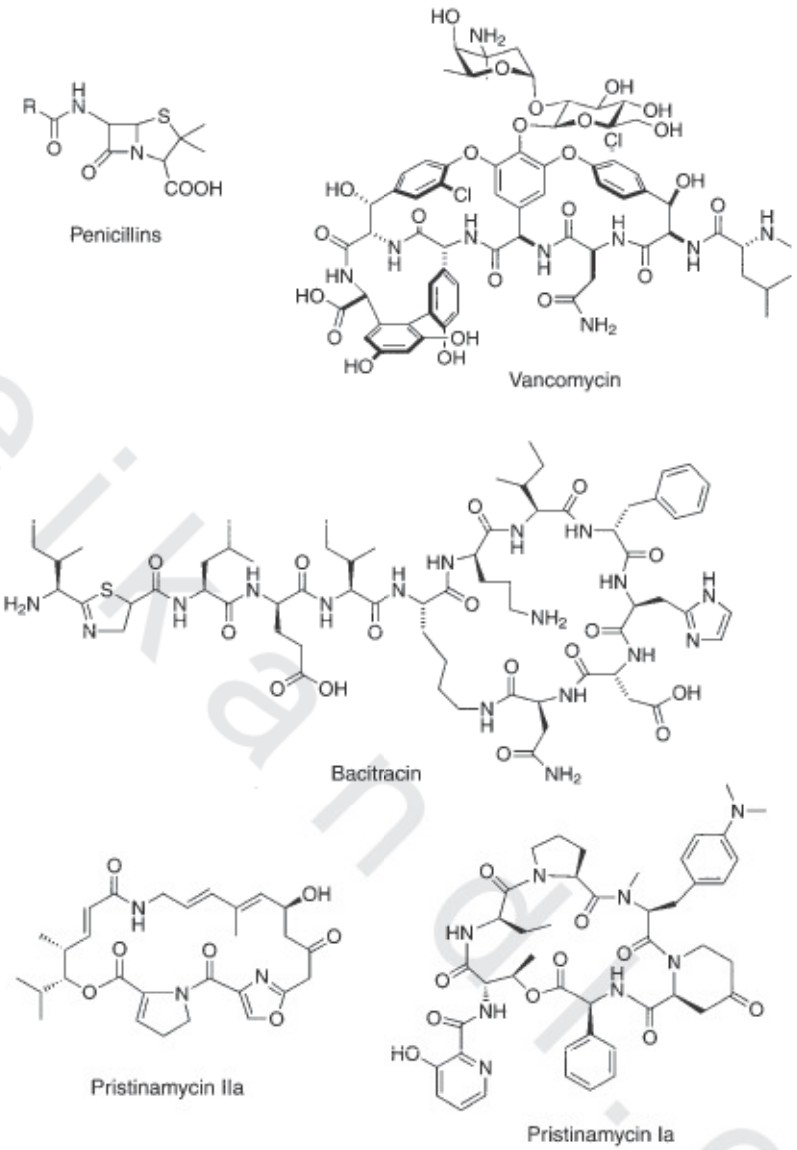
الفصل الثالث عشر

خطوط التجميع الإنزيمية لمضادّات البِبْتيد الحيوية غير الريبوسومية
ENZYMATIC ASSEMBLY LINES FOR NONRIBOSOMAL PEPTIDE ANTIBIOTICS

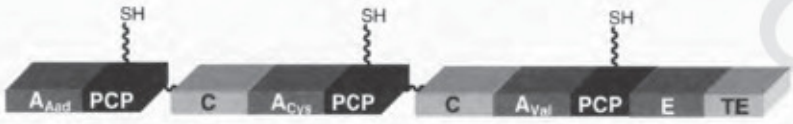
كما لوحظ في الفصول السابقة (الفصول الثالث والسادس والعاشر)، تنتج نسبة كبيرة من منتجات البِبْتيديك (peptidic) الطبيعية التي لها نشاط المضاد الحيوي بواسطة ببتيد سينثاز غير الريبوسومية (NRPSs) (peptide synthases) (الشكل ١٣,١) (للمراجعة، انظر كونز وماراهيل Konz and Marahiel, 1999، ماراهيل وآخرون Marahiel *et al.*,1997، وفون دورين وآخرون von Dohren *et al.*, 1997). وتشمل هذه ACV (إل-أمينوأدبيل-إل-سيستينيل-دي- فالين) ACV (L-aminoadipyl-L-cysteinyl-D-valine)، طليعة البِبْتيد الثلاثي لعائلة مضادّات بيتا لكتام الحيوية، تيروسيدين وجراميسيدين S (tyrocidine and gramicidin S) والمضاد الحيوي الموضعي باستراسين. وبالإضافة إلى أن الغليكوببتيدات من مجموعة فانكوميسين تنشأ على خطوط تجميع NRPS، ومن ثم تعدل بشكل كبير، كما لوحظ لاحقاً في هذا الفصل. وبالمثل، مضادّات البِبْتيد الدهنية (ليبوبِبْتيد) الحيوية مثل راموبلانين ودابتوميسين (ramoplanin and daptomycin) تصنع بهذه الطريقة. وأخيراً، بريستسناميسينات-ذو-الشقين من معقد سينيرسيد هما هجين للبِبْتيد غير الريبوسومي وخطوط-تجميع بوليكيتيد سينثاز.

وحدات الاستهلال، الإطالة والإنهاء: الحقول الأساسية والحقول الإضافية

تمتلك حفّازات NRPS متشابهات تنظيمية مع النوع I بوليكيتيد سينثاز (PKSs) كمحفزات متعدِّدة الحقول منظمة إلى وحدات، مع وحدات متعدِّدة تم تجميعها في وحدة بروتين فرعية واحدة أو أكثر. والمثال الأقصى هو الإنزيم الفطري سيكلوسبورين سنثيتاز (cyclosporine synthetase) الذي يجمَع دواء أنديكابِبْتيد الحلقي المثبط لمناعة سيكلوسبورين أ (cyclic undecapeptide immunosuppressant drug cyclosporine A) على عديد البِبْتيد 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 البِبْتيد ذا 450 kDa (الشكل ١٣,٢)، في حين أن سقالة البِبْتيد السباعي للفانكوميسين أو كلوروإرموميسين (chloroermomycin) (الشكل ١٣,٢) تجمع بواسطة ثلاث وحدات فرعية مع ثلاثة، ثلاثة، ووحدة واحدة، بالترتيب.



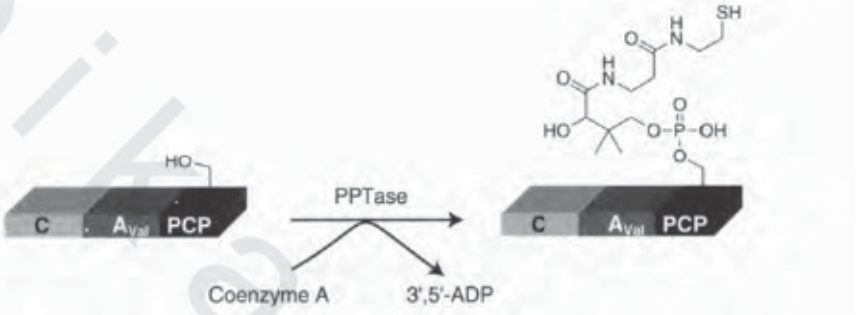
الشكل (١٣,١). أمثلة على المضادّات الحيوية التي تُصنع على خطوط – تجميع ببتيد سنثيتاز غير الريبوسومية.



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 البروتين. الحقول الأساسية لوحدات الإطالة متشابهة مع تلك خطوط – تجميع في النوع PKS I (انظر الفصل الثاني عشر) ولكن تسمى في

وحدات NRPS تكثيف (C)، أدنلة (A)، وحقول البروتين حامل بِبْتيديل ((peptidyl carrier protein (PCP)). وكل حقل 8-to-10-kDa PCP مماثل تركيبياً ووظيفياً لحقول ACP (الفصل الثاني عشر)، وتمر بنفس التعديلات بعد- الانتساخ للسلسلة الجانبية سيرين على HS- pant holo PCP apo PCP to HS-pantetheinylated بواسطة الإنزيمات الشريكة المكرَسة فوسفوبانتيثينيل ترانسفيراز (phosphopantetheinyltransferase (PPTase) (لامبالوت وآخرون Lambalot *et al.*, 1996). ويخدم حقل HS-pant-PCP في كل وحدة كموضع إرساء للربط التساهمي للحامض الأميني الموحود الذي سوف يندمج في داخل السلسلة النامية (الشكل ١٣,٣).

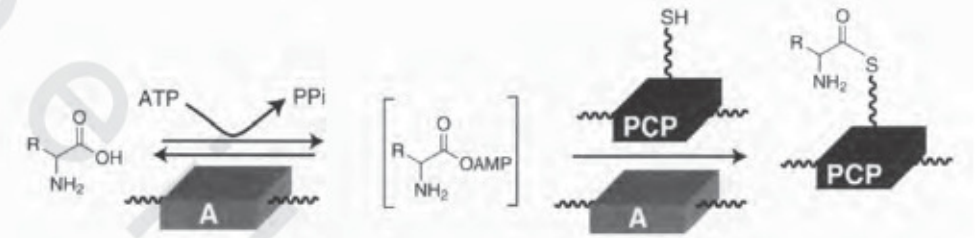


الشكل (١٣,٣). الحقول الأساسية لوحدة إطالة NRPS: C-A-PCP وتحويل Apo PCP إلى حقول PCP الكاملة بواسطة عملية فوسفوبانتيثينيليشن بعد – الإنتساخية.

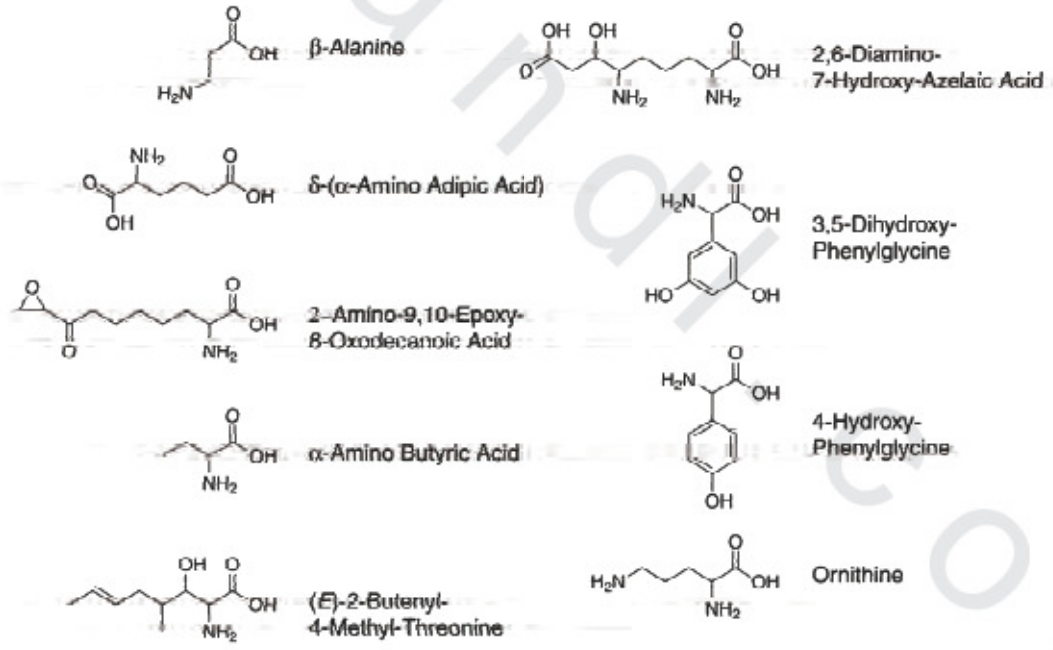
كل حقل A في الوحدة C-A-PCP ينتقي وينشط الحامض الأميني ليّربط على HS-PCP المجاور. ويحدث انتقاء الحامض الأميني بواسطة ربط الحقل A في الموقع النشط، والرمز للتمييز قد فُكت شفرته بواسطة توليفة تحليل أشعة –إكس على phe- المنشطة لحقل A من جراماسيدين إس سنثيتاز (gramicidin S synthetase)، تحليل المعلوماتية الحيوية لأكثر من ١٥٠ حقل، نشوء الطفرات (mutagenesis) لتغيير الانتقاء (ستاكيلهوس وآخرون Stachelhaus *et al.*, 1999). يحول الحامض الأميني المرتبط إلى أمينو أسيل- AMP بمجرد انفلاق ATP (الشكل ١٣,٤) وإطلاق PP_i. ويعد تفاعل النصف الأول لحقول A هذه مماثل لتلك لأمينو أسيل- tRNA سينثيتازات التي تنشط الأحماض الأمينية لتكوين رابطة الببْتيد المعتمدة على – الريبوسوم، يقترح تحليل أشعة – إكس التطُّور المتقارب لحقول A وأمينو أسيل – رنا سينثيتازات. وبينما ينقل أمينو أسيل tRNA سينثيتيسز مجموعة أمينو أسيل النشطة ديناميكياً وحركياً للربط مع tRNAs المشابهة، تنقل حقول A مجموعة أمينو أسيل إلى حقل *cis* HS-pant-PCP لتوليد aminoacyl-*S*-PCP في كل وحدة (الشكل ١٣,٤).

الخصوصية (النوعية) لحقول A وترتيبها واستبدالها في وحدات خط التجميع NRPS تزود الإرشادات لبناء الببْتيد في القالب ثيو (thiotemplated). وعلى النقيض من ببتيد سنثيتاز 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 الببْتيد الطبيعية غير الريبوسومية، مشيراً إلى التنوع الكبير في تمييز موحود الحمض الأميني، ويشمل تنشيط الحماض الأمينية -β-,γ- و-δ، مثل بيتا-الآنين (β-alanine)، -γ امينوبيوتايريت (γ-aminobutyrate) و-δ أمينوأديبيت (δ-aminoadipate) (كونز وماراهيل Konz and Marahiel ، ١٩٩٩) (الشكل ١٣,٥).



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



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

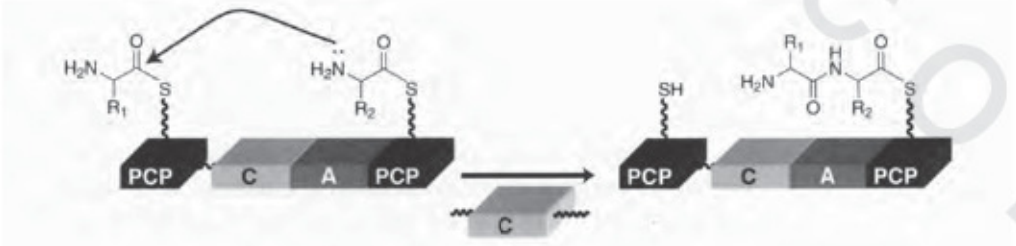
والثالثة من الحقول الأساسية في وحدة إطالة NRPS، الحقول C، هي حفَازات تكثيف لتكوين رابطة- الببْتيد، التي تستعمل المنبع الفوري ببْتيديل — -*S*- PCP بين الوحدة (intermodular peptidyl-*S*-PCP) كمانح لسلسلة أسيل

obeikandi.com

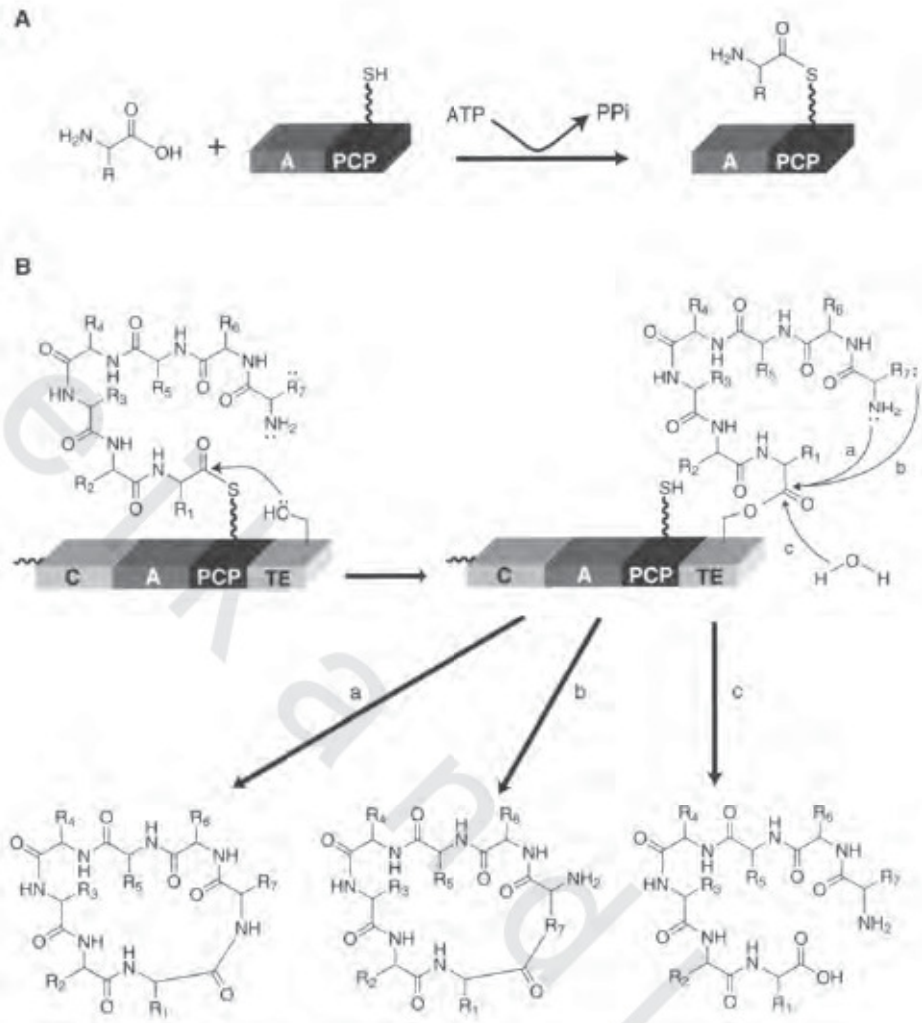
وأمينو أسيل– PCP-*S* داخل الوحدة (intramodular aminoacyl-*S*-PCP) كقابل أليف النواة (الشكل ١٣,٦) من خلال مجموعة أمينو الحرة. وتشكيل رابطة ببتيد أحادي الاتجاه وتتحرك سلسلة بِبْتيديل النامية من المنبع إلى حقل المصب HS-PCP. الحقل C مشابه وظيفياً لحقل كيتوسينثاز (ketosynthase) في خطوط تجميع النوع PKS I، ولكن، بدلاً من صنع الروابط– C-C، يصنع اتصال C-N في تكوين رابطة البِبْتيد.

تميل وحدات إطالة السلسلة لأن تفتقر لحقل C وبدلاً من ذلك تمتلك تركيب حقل —اثنين A-PCP لتنشط وتُحمل الحمض الأميني الأول فوق حقل HS-PCP الأول (الشكل ١٣,٧ A)، كما مُثل في ACV synthetase المشروحة أدناه. وتملك وحدات إنهاء السلسلة التركيب العام C-A-PCP-TE، حيث النهاية– C لحقل ثيوإستيراز (thioesterase domain) (TE) لها نفس الدور كما في خطوط – تجميع النوع I PKS، لفصل رابطة ثيوإستر التساهمية بين سلسلة بِبْتيديل – كاملة الطول وحقل PCP أقصى المنبع. ومثل خطوط – تجميع PKS، بإمكان حقل NRPS TE كحفَازات حالة مائية أو حفَازات تحليق ضخمة (macrocyclization) (الشكل ١٣,٧ B) (تروجر وآخرون 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 انديكابِبْتيد (undecapeptide) الحلقي سيكلوسبورين A المثبط للمناعة مجموعات N-methyl فوق سبعة من روابط البِبْتيد، وتوجد سبعة حقول S- ادينوسيل ميثيونين (S-adenosylmethionine)- تستعمل — N- ميثيل ترانسفيراز (*N*-methyltransferase) المطمورة في الوحدات السبعة لخط – تجميع سيكلوسبورين سنثيتاز (فون دورين وآخرون von Dohren *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 وُضعت في *cis* في خطوط – التجميع.



الشكل (١٣,٦). عمل حقل C في تحفيز NRPS: تكثيف رابطة البِبْتيد والإطالة عن طريق نقل سلسلة بِبْتيديل إلى مصب الحقل PCP.



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

خطوط – التجميع لـ ACV، بِنْتيدات الفانكوميسين السباعية، تيروسيدين، وباستراسين: التزامر، التحليق الضخم، والتحليق المتغاير

الإنزيم الذي يجمَع طليعة البِنْتيد الثلاثي الآحلقي (الآدوري) لأنواع البنسيلّين والكيفالوسبورين في أكريمونيم كريسوجينم *(Acremonium chrysogenum)*، الكائن المنتج للبيتالكتام، هو عديد البِنْتيد–المفرد NRPS (single-polypeptide NRPS). 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، بـ Aad، Acyc، Aval، رتبت بهذا النظام في وحدات الإنزيم الثلاث. كما

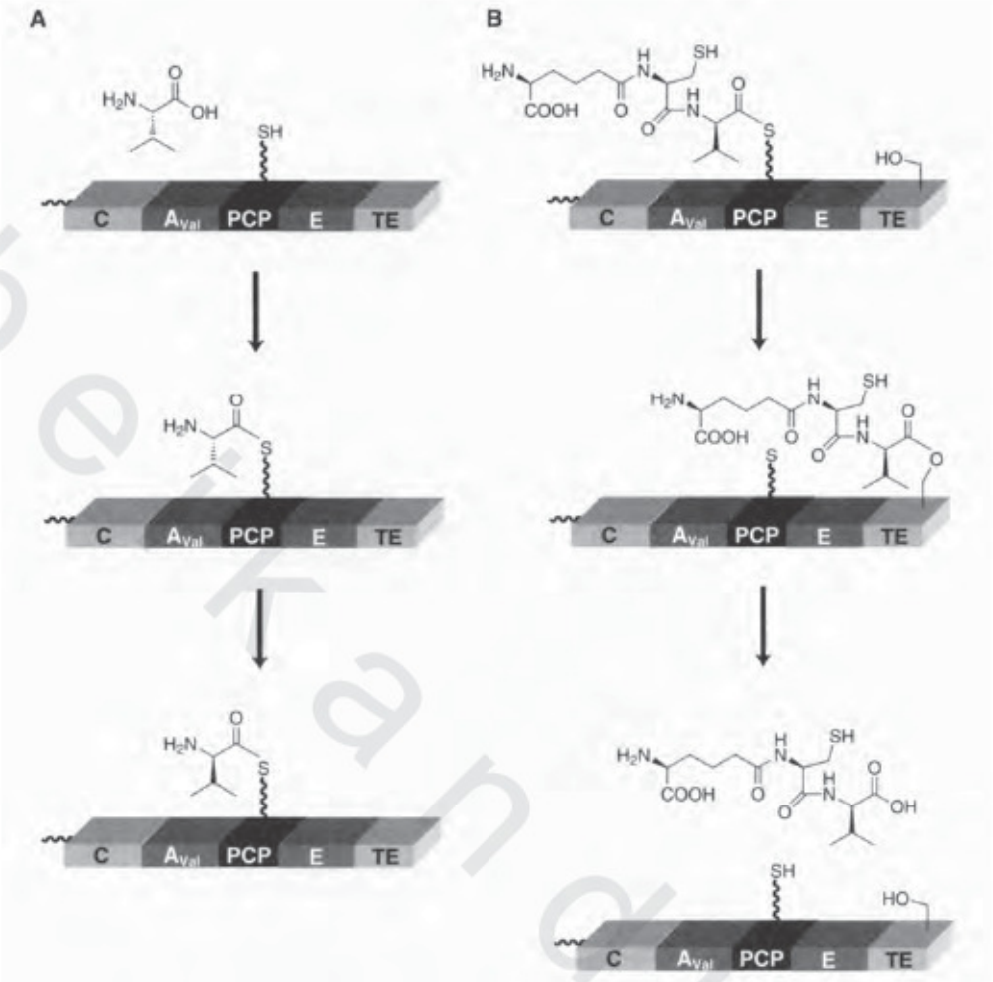
يوجد ثلاثة حقول holo HS-PCP، أنشات بواسطة فوسفوبانتيثينيليشن بعد الانتساخي من apo PCPs، للربط التساهمي كأمينوأديبيل- S-PCP_1 (aminoadeipyl-S-PCP_1)، سيستينيل- S-PCP_2 (cysteinyl-S-PCP_2) وفاليل- S-PCP_3 (valyl-S-PCP_3). وتتشكل ٢ رابطة ببتيد، الأولى بين أمينو أديبيت وسيستين والحفّازة بواسطة الحقل C في الوحدة ٢، والثانية بين Aad-Cys-S-PCP_2 كمانح و Val-S-PCP_3 كمستقبل، بواسطة الحقل C في الوحدة ٣، مولداً إنزيم-إس-بيبتديل الثلاثي (tripeptidyl-S-enzyme) المُرسَى عند PCP. وهذا مسئول عن ثمانية من ١٠ حقول.

والحقل التاسع هو حقل التزامر (E) في الوحدة ٣، حيث يستطيع تزامر L-Val-S-PCP_3 نحو D-Val-S-PCP_3. ويمر لتزامر خلال Cα- كاربانيون (Cα-carbanion) الخطي المرسَخ -بالرنين ويسمح بدخول هذه بسهولة أكثر في فاليل-ثيوإستر (valyl-thioester)، Val-S-PCP_3، ومن ثم في فالين الحر. وهو من غير الواضح إلى الآن إذا ما كانت فضالة فاليل تتزامر نحو خليط – D,L قبل أو بعد التكثيف (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-PCP_3. وإذا أثر التزامر على tripeptidyl-S-PCP_3 بعد التكثيف، 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 مذوّب (hydrolase) بسيط. وحقل TE هو عضو من عائلة ضخمة من الإنزيمات المذوّبة -ألفا-بيتا (α-β-hydrolases) ذات الموقع النشط سيرين. وتستعمل الموقع النشط للسلسلة الجانبية Ser كأليف النواة ليهاجم ترايبْتيديل 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 ويبين (التغيير) التطبَع في عملية تجميع سلسلة قالب ثيو بِبْتيديل.

وتجدر الإشارة إلى خاصيتين من انتقاء الحمض الأميني في استعمال ACV سينثيتيسزلأمينو اديبيت. فهو ليس فقط حامض أميني غير مولد للبروتين وكذلك فإن حقل A في الوحدة ١ والخاصة بـ Aad، تنشط C_6-COOH، وليس C_1-COOH. في أمينوأديبيت في هيئة أسيل – AMP.

وهكذا فوسيط رابطة أميد في Aad-Cys-S-PCP_2 المتشكل بواسطة الحقل C للوحدة ٢ هو رابطة ببتيد متساوية (isopeptide bond) تُحمل إلى الأمام للببْتيد الثلاثي المحرر. في القسم التالي من هذا الفصل سوف ننعطف إلى الحياكة الإنزيمية بعد-خط-التجميع لتحويل acyclic ACV نحو نظام الأربع/الخمس حلقات بنسيلّينات المندمجة.



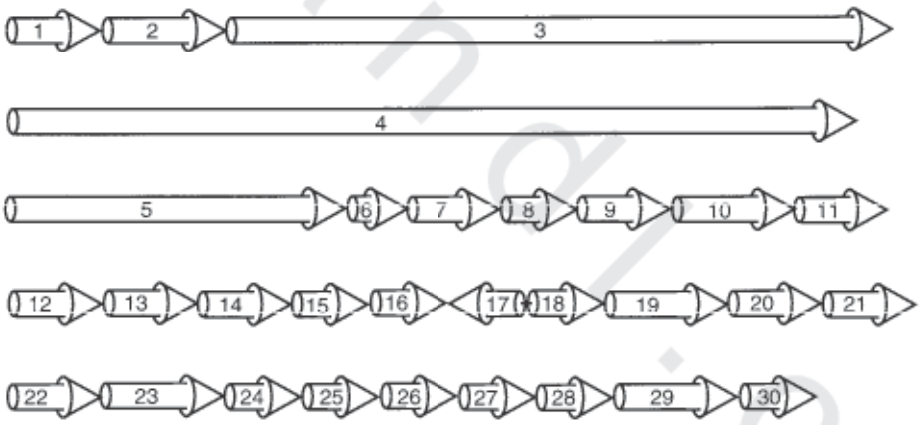
الشكل (١٣,٨). وظيفة الحقل في خط – تجميع ACV synthetase: (A) عمل الحقل E لصنع D-Val-*S*-PCP$_3$، (B) إنهاء السلسلة بواسطة الحقل TE من خلال وسيط إنزيم tripeptidyl-*O*-Ser-TE acyl.

التجميع الإنزيمي للببْتيد السباعي للفانكوميسين وكلوروإرموميسين (chloroermomycin)

للفانكوميسين وكلوروإرموميسين هيكل ببتيد سباعي ذا ربط-تبادلي مشابه. وكتلة جين البناء الحيوي لكلوروإرموميسين، ولكن ليست بعد للفانكوميسين، قد وُجِد 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، ORFs 4 to 6، التي ترمَز الوحدات الفرعية الثلاث CepA, CepB، وCepC من NRPS hepapeptide synthetase. ومعاينة ترتيب الحقل المفترض من التحليل المعاوماتية 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 ترايبْتيد سنثيتاز هو قابل للانتقال لخط –تجميع NRPS هذا. وسبعة

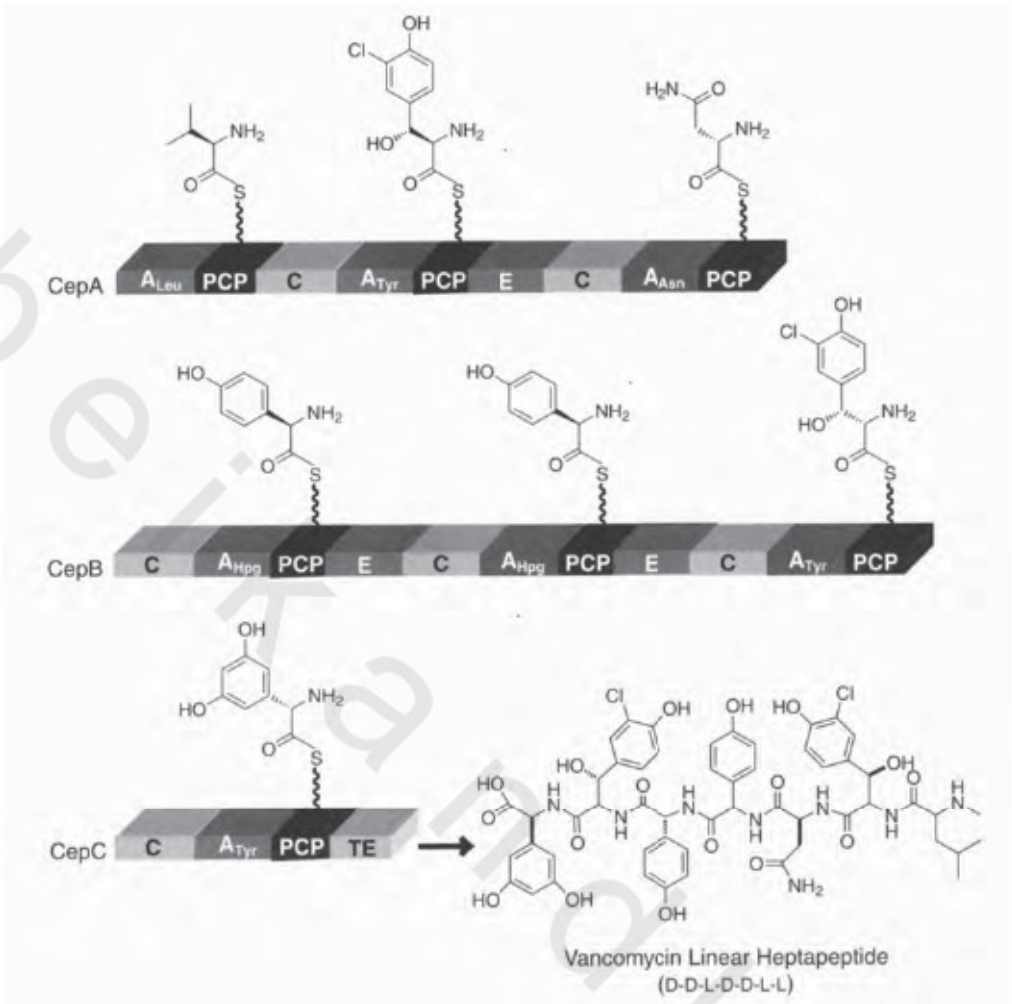
أحماض أمينية في البِبْتيد السباعي تلزم حقول سبعة A وسبعة حقول PCP مقترنة بالشكل HS-pantetheinyl holo لتكون وظيفية. وتوجد ستة روابط ببتيد لتصنع و ٦ حقول. كما توجد أربعة أحماض امينية–دي (D-amino acids) في الآحلقي السباعي (D,D,L,D,D,L,L-acyclic heptamer). وتوجد حقول التزامر في الوحدات ٢ ، ٤ و ٥ ولكن ليس في الوحدة ١. وأخيراً، هيكل البِبْتيد السباعي في المنتج الطبيعي هو الحامض الحر وحقل TE يفترض بأن يكون الإنزيم المُذوب لبِبْتيديل السباعي– S-PCP_7 (heptpeptidyl-S-PCP_7 hydrolase). ومصدر D-Leu عند الفضالة الولى 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 Trauger and Walsh, 2000).

وإذا كان الحقل C للوحدة ٢ هو D-specific خاص للمانح Leu_1، بعد ذلك يمكن حل المسألة. وافتراضياً الحقل C في الوحدة ٣ هو خاص للمانح D-D-dipeptidyl ولكنه مستقبل L-Asn-S-PCP_3، 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 (١٣,٩). ثلاثون جينات مجتمعة للبناء الحيوي لكلورواِرموميسين.



الشكل (١٣,١٠). ٢٤ حقل، سبعة خطوط تجميع الوحدة للعمود الفقري للبِيْتيد السباعي لكلوروإرموميسين أو فانكوميسين سنثيتاز.

والخاصية الأخيرة الجديرة بالذكر في خط تجميع البِيْتيد 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 أريل الجانبية – الغنية بالإلكترون تشارك في تفاعلات الربط – التصالبي لما – بعد – خط – تجميع NRPS، سيتم شرحها أدناه. يُصْنع 4-OH-pheGly وموحودات 3,5-$(OH)_2$- pheGly كـ L-isomers 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–هيدروكسيماندليلت (*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) الضخمة (ORFs 27 to 30 في الشكل ١٣,٩)،

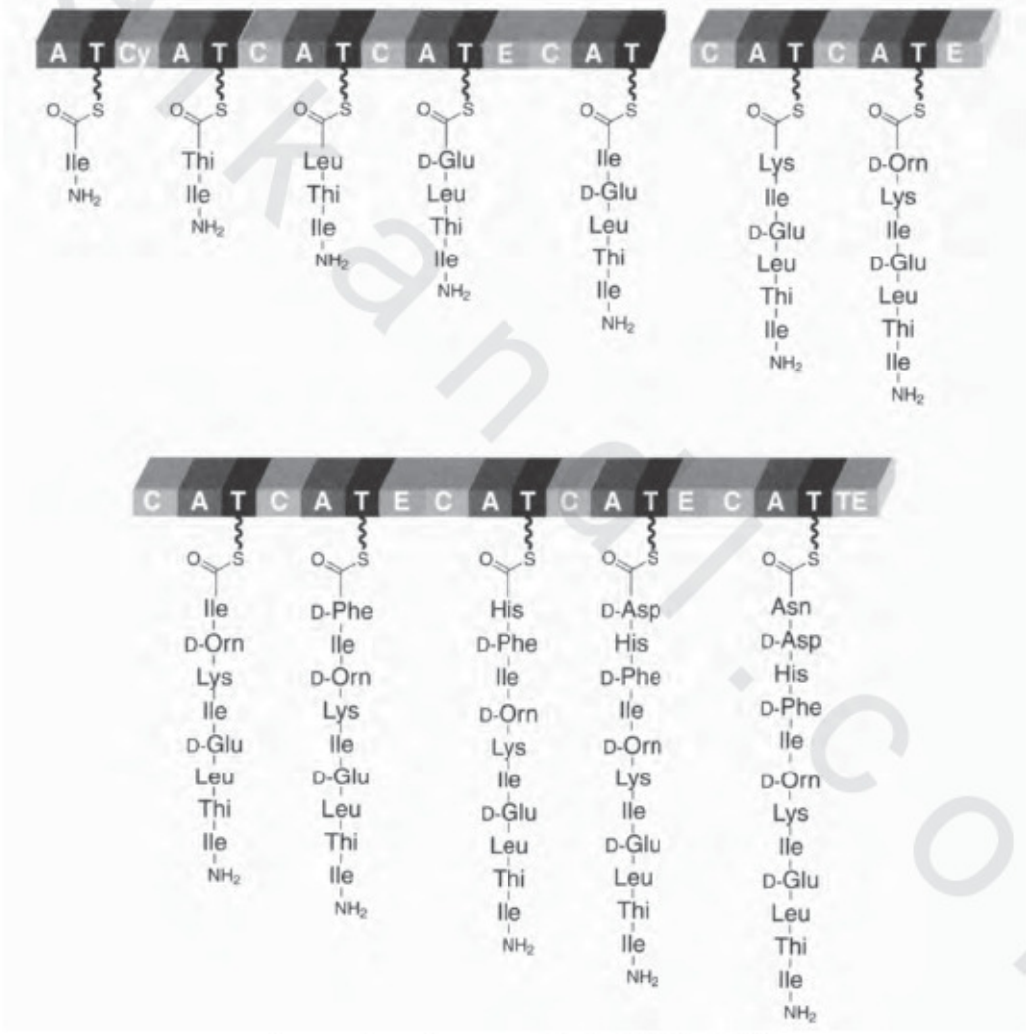
مستعملةً أسيل– CoAs في تكثيفات كلايزين التكرارية (iterative Claisen condensations) لبناء الحمض الأميني– ذي الثمانية كربون المندمج عند الفضالة ٧ (تشين وآخرون Chen *et al.*,2002). وهذه الثمانية ORFs تؤكد على تنسيق التنظيم والالتزام لإنتاج موحودات الحمض الأميني غير المولدة للبروتين في قاعدة في – الوقت المحدد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

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

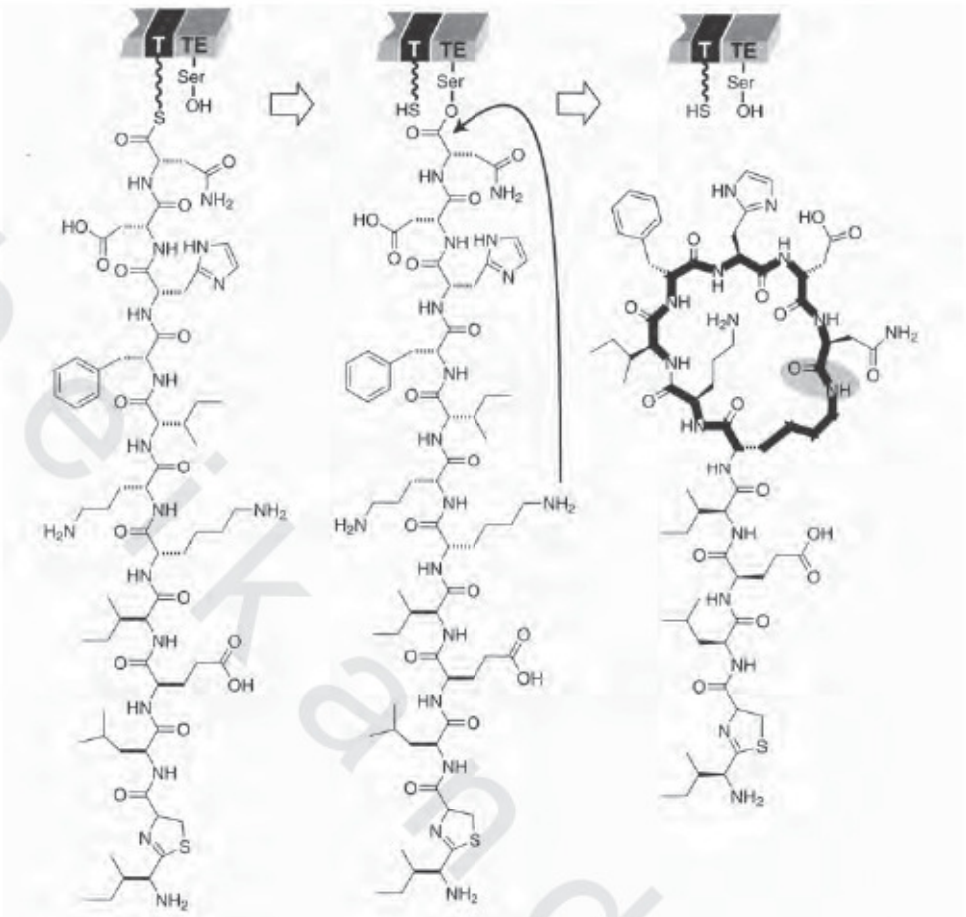
تتألف خطوط تجميع تيروسيدين سينثاز وباستراسين سينثازمن العصية بريفيس *(Bacillus brevis)* والعصية ليكينيفورميس *(Bacillus licheniformis)* ، بالترتيب (الشكل ١٣,١١)، من ثلاث وحدات فرعية التي تحتوي على ١٠ و١٢ وحدة، بالترتيب، لمضادّات ديكا – ودوديكا ببتيد الحيوية (deca-and dodecapeptide antibiotics). وكلاهما ببْتيدات حلقية متصلة بتحليق الناحية الكيميائية (regiochemistry) المختلف. وتيروسيدين حلقي من الرأس إلى الذيل، ومجموعة أمينومن $D\text{-phe}_1$ تهاجم كربونيل– Leu_{10} (Leu_{10} carbonyl) لتصنع الأميد الحلقي (انظر تروجر وآخرون Trauger *et al.*, 2000)، ولكن باستراسين قد تم تحليقه ليعطي تركيب أولي طويل مع سلسلة جانبية مجموعة أمينو من Lys_7 التي تهاجم كربونيل من فضالة النهاية Asn_{12} (الشكل ١٣,١٢). التحليقات المتميزة تحفز بواسطة حقول TE عند نهاية خطوط –تجميع NRPS هذه، تعمل كإنزيمات مُحلِقة ماكرولكتاميزنج سيكلازات (macrolactamizing cyclases) بدلاً من الإنزيمات الحالة (hydrolases). يجب ـن تُحجز (تفصل) وسائط acyl-*O*-TE حركياً من الماء وتُطوى في داخل هيئة – نشطة – الموقع بحيث إن روابط إستر Leu_{10}-COO-TE و Asn_{12}-COO-TE يمكن أسرها بين الجزيئات بواسطة أمين أليفات النواة في سلاسل ببْتيديل. وفي حالة تيروسيدين سنثيتاز، فقد ثبت بأن حقل TE يملك جميع المعلومات الضرورية لتحريض ثني (طي) السلسلة والتحليق بما أن حقل TE المستأصل يحتفظ تلقائياً بالكفاءة المحفزة لتحليق ديكاببْتيديل – ثيوإستر وعندما يعرض مع استبدال دي– فينيل أكتيل (D-phenylactyl) عند $D\text{-phe}_1$، سوف تُنتج الماكرولاكتون. الفرق بين التحليل بالماء (hydrolyzing) والتحليق (cyclizing) لحقول TE في النوع I PKS وفي خطوط – تجميع NRPS ليس واضحاً بعد ولكن ستكون ذات أهمية في الأساليب التوافقية نحو التحليقات الضخمة.

إضافة إلى نوع تركيب ماكرولكتام الوهق الخاص به، يملك باستراسين خاصية تركيبية إضافية جديرة بالذكر: الفضالات ١ و٢، Ile_1-Cys_2، 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 سنثيتاز يكشف أن بديل (متغير) وعضو من العائلة الفرعية لحقل التحليق (Cy) (كياتنج ووالش Keating and Walsh, 2001). وبالإضافة إلى التصرف كحقل C نموذجي ومحفزاً لتكوين رابطة اميد، فحقول Cy هذه، توجد

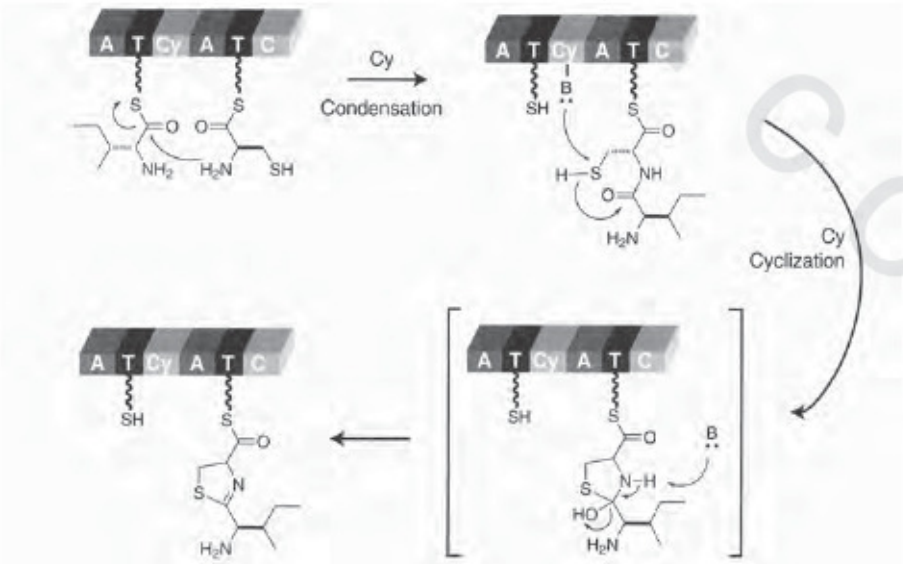
كذلك في بليوميسين سنثيتاز (bleomycin synthetase) (انظر دو وآخرون Du *et al.*, 2001)، وتحفز أولاً تحليق السلسلة الجانبية ثيوليت (thiolate side chain) من سيستين فوق رابطة الببْتيد كاربونيل التي فقط الانتهاء من تشكيلها ومن ثم التجفاف لتوليد رابطة أيمين الحلقية المزدوجة (cyclic imine double bond) ويستمد 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 لتيروسيدين سنثيتاز.



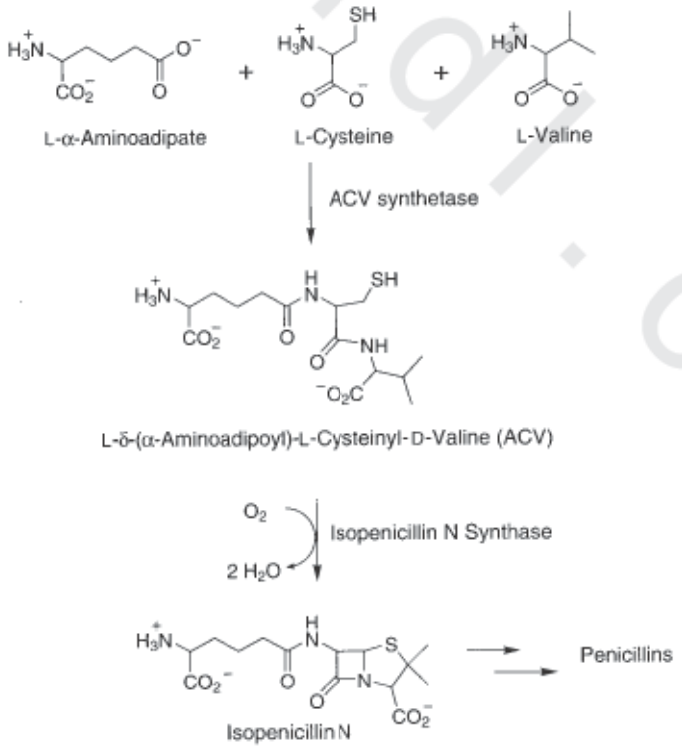
الشكل (١٣,١٢). إطلاق سلسلة باستراسين بواسطة ماكرولكتاميزيشن البين الجزيئ بواسطة حقل TE لباستراسين سينثيتاز: لصنع رابطة ببتيد المتساوية لـــ Lys_7-Asn_{12}.



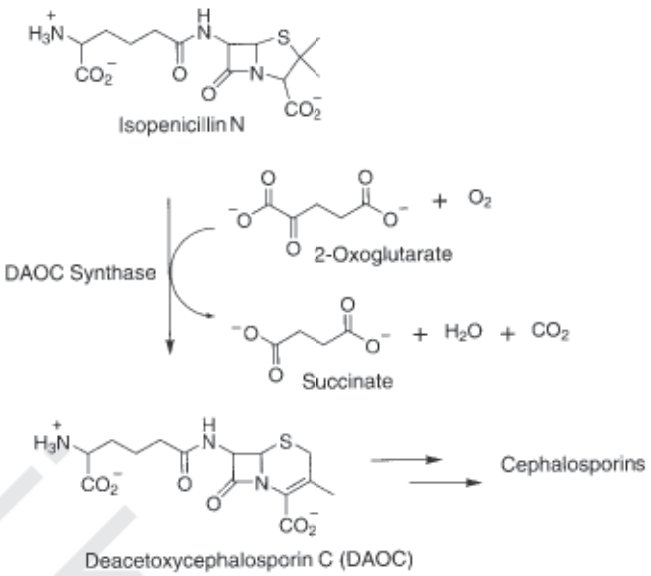
الشكل (١٣,١٣). عمل حقل التحليق لباستراسين سنثيتاز لإنشاء حلقة ثيازوليدين من Cys_1-Leu_2.

علم إنزيمات بعد – خط تجميع ACV: ACV إلى بنسيلّينات إلى كيفالوسبورينات – مقارنة مع البناء الحيوي لكاربابينيم و كلافولينيت.

يحفز التحويل الإنزيمي للبِبْتيد الثلاثي ACV الآحلقي إلى تركيب بيتا لكتام ثنائي الحلقة من البسيلينات بواسطة إنزيم Fe^{11} واحد غير محتوٍ على الهيم (nonheme)، أيزوبنسيلّين N سينثاز (isopenicillin N synthase) (IPNS) الذي يختزل المادة المشاركة O_2 بواسطة أربعة إلكترونات إلى جزيئين من الماء (الشكل ١٣,١٤). وبدوره فحلقة بيتا لكتام تمتد من ثيازوليدين ذي الخمس – حلقات (five-ring thiazolidine) إلى حلقة ثنائي هيدروثيازين ذات الست – حلقات (six-ring dihydrothiazine ring) لمضادّات كيفالوسبورين الحيوية، مرة أخرى بواسطة إنزيم غير المحتوي على الهيم Fe^{11} دياوكسيجينيز (Fe^{11} dioxygenase) (الشكل ١٣,١٥) التي تعمل بعد أن يُحول إيبيميراز (epimerase) أيزوبنسيلّين N (isopencillin N) إلى pencillin N بواسطة توازن مركز C_2 L- aminoadipyl مع الخليط – D-L. ويعرف إنزيم إكسبانداز كذلك بديكيتوكسي كيفالوسبورين سي سينثاز (deacetoxycephalosporin C synthase) (DAOCS)، يعمل فقط على د–أمينو اديبيل–بنسيلّين (D-aminoadipyl-pencillin)، ويتطلب جزيء من ألفا–كيتوغلوتاريت (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 لـــ ACV إلى هيكل بيتا لكتام البنسيلّينات بواسطة أيزوبنسيلّين إن سينثيتاز.



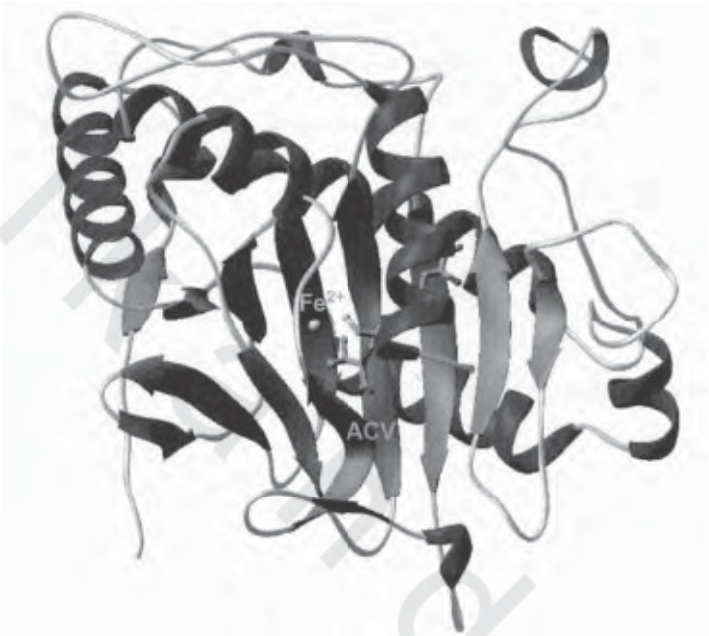
الشكل (١٣,١٥). تمديد حلقات البنسيلّينات الخمس إلى ست حلقات للكيفالوسبورينات بواسطة إكسباندار (expandase) (deacetoxycephalosporin C synthase).

ولقد تم حل تراكيب أشعة-إكس لكل من IPNS، من الرشاشية نيديولانس *(Aspergillus nidullans)* (روتش وآخرون Roach *et al.*, 1997) (الشكل ١٣,١٦)، وdaocs من المتسلسلة كلافوجيريس (فاليجارد 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) كربيطات للهيكل (انظر كيو Que, 2000) لـ Fe^{II}، كما يعمل الإنزيم الثالث في استقلاب بيتالكتا المؤكسد، كلافامينيت سينثاز (clavaminate synthase) (CAS) (زانج وآخرون Zang *et al.*, 2000)، المذكور لاحقاً.

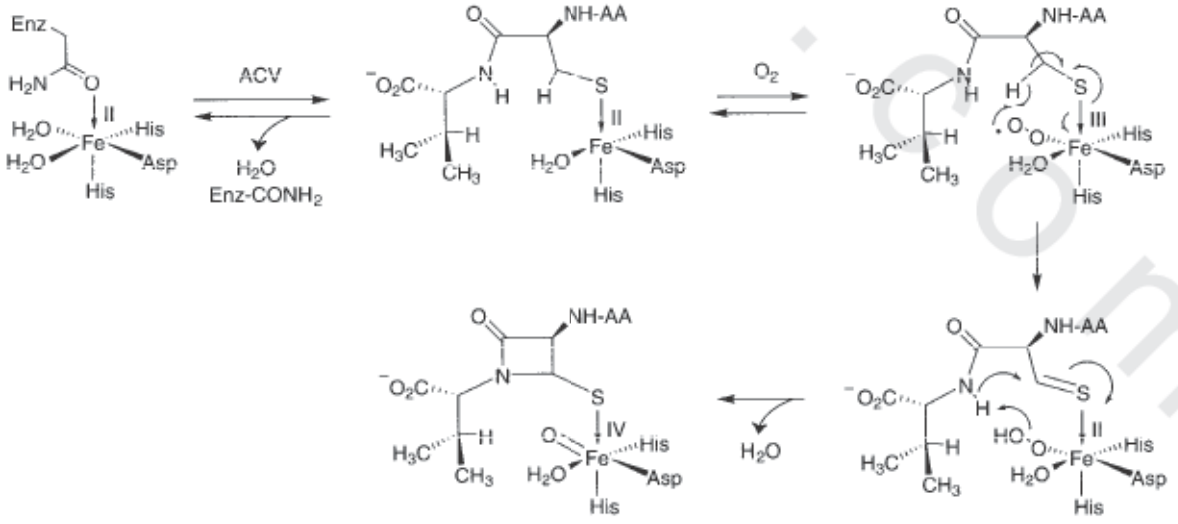
بينما يظهر DAOCS وCAS ألفا-كيتو ديوكسيجيناز نازع كربوكسيل-الحمض (α-keto acid –decarboxylating dioxygenase) النموذجي قياس العناصر (stoichiometry) من هيكل الموقع - النشط لحديد الفروز الشائع هذا، يتشعب (يحيد) IPNS بحيث لا يتطلب المادة المشاركة ألفا-كيتو الحامضية وبواسطة عدد الإلكترونات التي تمت إزالتها من المادة. يؤكسد IPNS، ACV بواسطة أربعة إلكترونات كلما أنشأ نظام الأربع/الخمس حلقات المندمج لهيكل البنسيلّين، بعمل كل الإلكترونات الأربعة في شكل قمع (funneling) نحو O_2 عندما يختزل إلى جزيئين من H_2O. 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

obeikandl.com

وCAS مؤكسد فريل 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 Roach *et al.*, 1997).

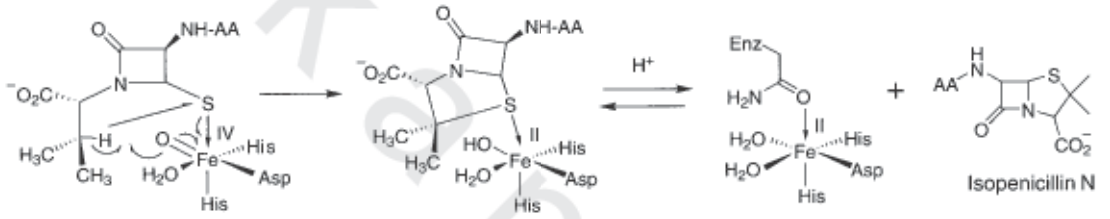


الشكل (١٣,١٦). تركيب أشعة – إكس لـــ IPNS مع الحديد الموقع – النشط والمادة المرتبطة ACV.

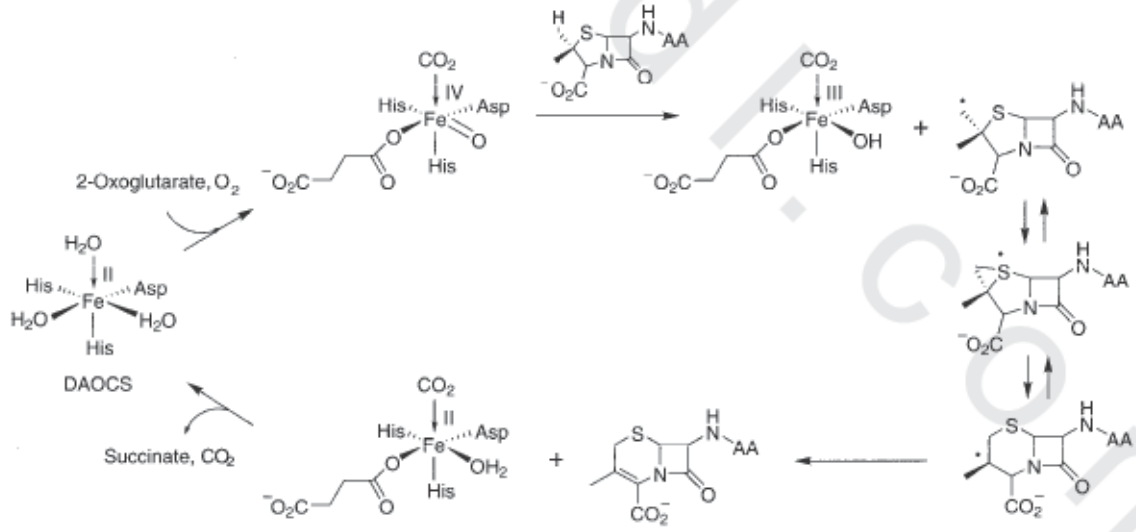


الشكل (١٣,١٧). الآليات المقترحة لتكوين الحلقة الأولى (بيتا لكتام) بواسطة IPNS.

النصف الثاني من تفاعل IPNS هو أكسدة – اثنين إلكترون جي/تحليق (two-electron oxidation G/cyclization) للاكتام الأحادي المنسق – بثيول نحو حلقة ثيازوليدين مع تكوين رابطة S_{Cys} إلى $C\beta_{Val}$ 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 إكسباندين DAOCS expandase يستخدم Fe^{IV}= O لكسر رابطة S-Cβ 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 (يوسّع) الحلقة من خمسة إلى ستة ويولد أولفين الداخلي الحلقة (endocyclic olefin) (الشكل ١٣,١٩) بمجرد إعادة توليد القاعدة الأساسية Fe^{II}. ويحتمل بأن فعاليّة أنواع حديد Fe^{II} oxo عدلت بواسطة نهج مادة القيود الهندسية في كل موقع نشط وربما كذلك بواسطة التغييرات المحكَمة في مجال تنسيق الحديد عند نقاط مختلفة في هذه الدورات الحفّازة المعقدة.



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

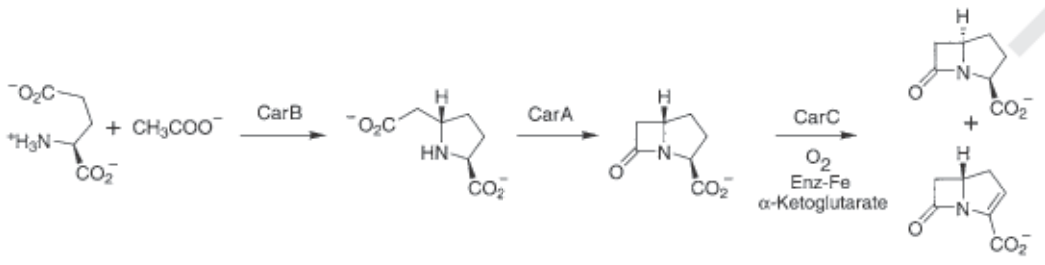


الشكل (١٣,١٩). تمديد الحلقة بواسطة DAOCS مع إختزال وسيط فيريل.

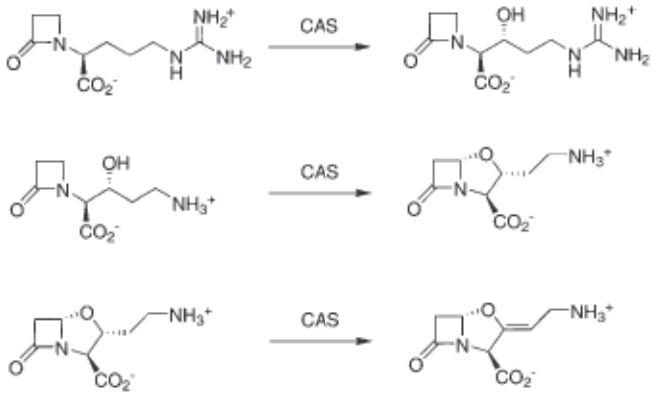
الكاربابينيمات وهيكل أوكسوبينام (oxopenam) من الكلافولينيت يُحضرا بواسطة إستراتيجية إنزيمية مختلفة. ولا يشتقا من منتجات البِنْتيد غير الريبوسومية. وفي الواقع، ينتج 2-em-3-carboxylate 5R-carba- البسيط بواسطة

إروينيا كاروتوفورا و سيريشيا مارسيسينز *(Serratia marcescens)* المجمّعة من acetyl-CoA والحمض الميني غلوتامات بواسطة كتلة ثلاثة- إنزيمات للبناء الحيوي، CarA-C (الشكل ١٣,٢٠) (لي وآخرون Li *et al.*, 2000). والحلقة الخامسة تُصطنع أولاً، بواسطة CarB إلى ٢-كربوكسيميثيل برولين (2-carboxymethyl proline). وينشط الكاربوكسيلات بواسطة CarA، البيتالاكتام سينثيتاز (*β*-lactam synthetase) في التفاعل الذي يصنع وسيط acyl-AMP على السلسلة الجانبية CH_2-COOH ومن ثم يستعمل الأمين للإزاحة البين الجزيئية لـ AMP بمجرد تكوين لاكتام ذا- الأربع أعضاء (باكمان وآخرون Bachmann *et al.*, 1998). ووسيط كاربابينيم هذا غير مشبع بطريقة مؤكسدة بواسطة CarC والرسم البياني ٤/٥ رأس الجسر المُتزامر 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-glyceraldhyde-3phosphate) الطلائع. والخطوة الأولى هي ثيامين-بيروفوسفيت المعتمد على التولي الإنزيمي (thiamine-pyrophosphate dependent enzymatic generation) لكاربوكسيثيل أرجنين (carboxythylarginine)، التحويل غير العادي للغاية، الذي يشمل التحكم الداخلي للأكسدة والتخلص (من P_i) وإضافة مجموعة أرجنين ألفا- NH_2 (arginine α-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 سنثتاز (asparagines synthetase) (خليليي وآخرون Khaleeli *et al.*, 2001). ويقترح تركيب أشعة - إكس للكتام سنثيتاز مع كاربوكسيثيل أرجنين المرتبط ومشابه ATP هندسة مطابقة مسبقة التنظيم موافقة لتكوين بيتالاكتام البين الجزيئ (ميلر وآخرون Miller *et al.*, 2001).

ومن ثم يعمل CAS Fe^{II} داي أكسيجينيز (CAS Fe^{II} dioxygenase) في ثلاث خطوات منفصلة (الشكل ١٣,٢١)، أولاً كهيدروكسيلاز ليركب OH بالقرب من الكاربوكسيلات وينتج بروكلافوأمينيت (proclavuaminate). ثم يعمل CAS كسيكليز مؤكسد مضيفاً أكسجين الكحول إلى C_4 من بيتا لكتام، مولدا ٤/٥ وصل الحلقة في دايهيدروكلاف أمينيت (dihydroclavaminate) (زانج وآخرون Zhang *et al.*, 2000). والتفاعل الثالث المتتالي لـ CAS هو نزع التشبع المؤكسد، إدخال الرابطة المزدوجة الخارجية الحلقية التي تنتج إينول إيثر (enol ether) في كلاف أمينيت. وتظهر الثلاث تفاعلات لـ CAS معالجة متقنة للتفاعلات الكيميائية لمنصتي (برنامجي) two-His/ Asp platform لـ Fe^{II} في الموقع النشط.



الشكل (١٣,٢٠). عمل الترادف لـ CarA-C لتوليد نواة الكاربابينيم.

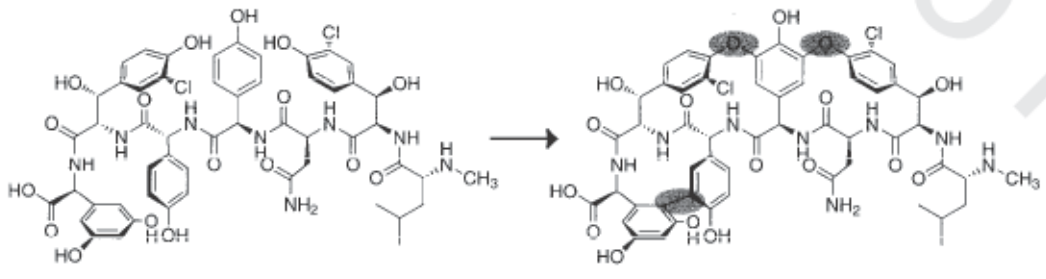


الشكل (١٣,٢١). ثلاث تحولات مؤكسدة بواسطة CAS أثناء بناء كلاف أمينيت.

تفاعل إنزيمات بعد – خط – التجميع: الأكسجة وارتباط بالغليكوزيل لأجليكونات (aglycones) للفانكوميسين وتيكوبلانين وأسَلة تيكوبلانين

تحوّل ثلاثة إلى أربعة أنواع من تفاعلات النضوج الإنزيمية ببتيد أجليكونات السباعي (هيبتابِبْتيد) الآحلقي (acyclic heptapeptide aglycones) من الفانكوميسين وتيكوبلانين إلى مضادّات الغليكوببتيد وغليكوبِبْتيد الدهنية الحيوية النشطة، بالترتيب (انظر هوبارد ووالش Hubbard and Walsh, 2002). أولاً: مجموعة أمينو الحرة من $D\text{-}Leu_1$ للفانكوميسين هيبتابِبْتيد يُؤمثل (*N*-methylated)، باستعمال S–أدينوسيل مثيونين (*S*-adenosylmethionine) كمادة مشاركة، تنفذ بواسطة إن – ميثيل ترانسفيراز الذي هو ORF 17 في مجموعة البناء الحيوي كلوروإرموميسين (الشكل ١٣,٩).

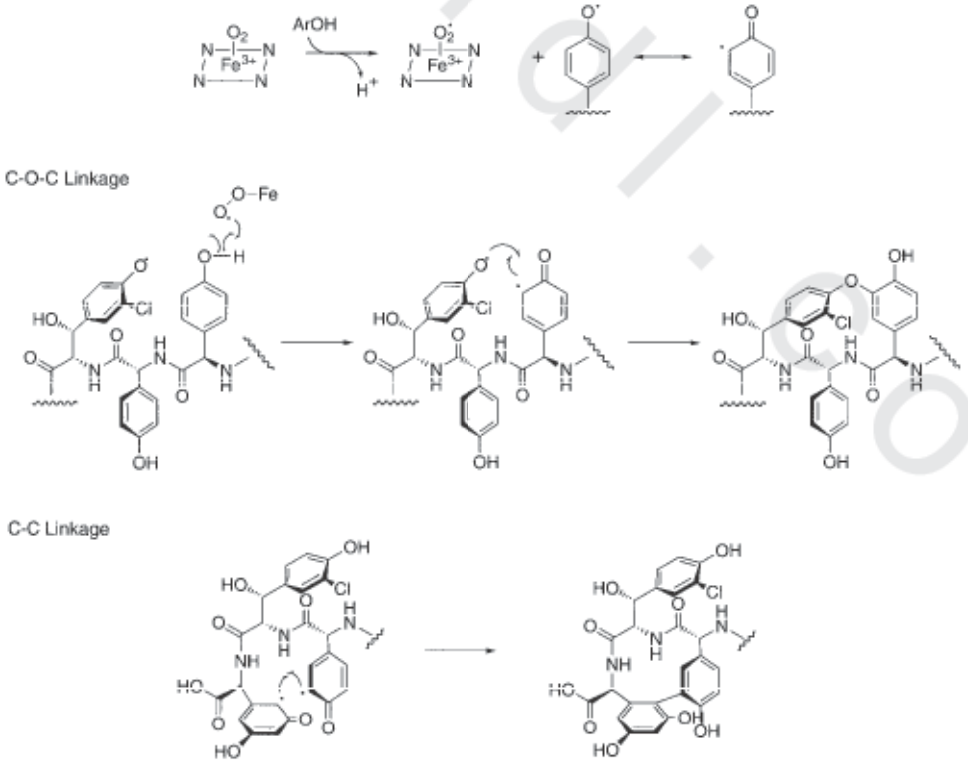
ثانياً: الربط – التصالبي المُصلَب الذي يحدث في سلسلة أريل الجانبية. ففي هيكل كلوروإرموميسين/ فانكوميسين، يوصل الربط–التصالبي سلاسل أريل الجانبية للفضالة ٢ و٤، ٤ و ٦، و٥ و٧ (الشكل ١٣,٢٢)، بينما في هيكل تيكوبلانين، ترتبط فضالات ١–٣و٢–٤و٤–٦و٥–٧ تصالبياً. ويحول الربط–التصالبي البِبْتيد الآحلقي المرن إلى شكل بناء هندسي على شكل –كوب شديد التقييد الذي يعطي السطح المتمم ليتفاعل مع الهدف ن–أسيل– د–الآنين–د–الآنين *N*-acyl-D-Ala-D-Ala في نهاية ببتيدوغليكان لجدار الخلية البكتيري.



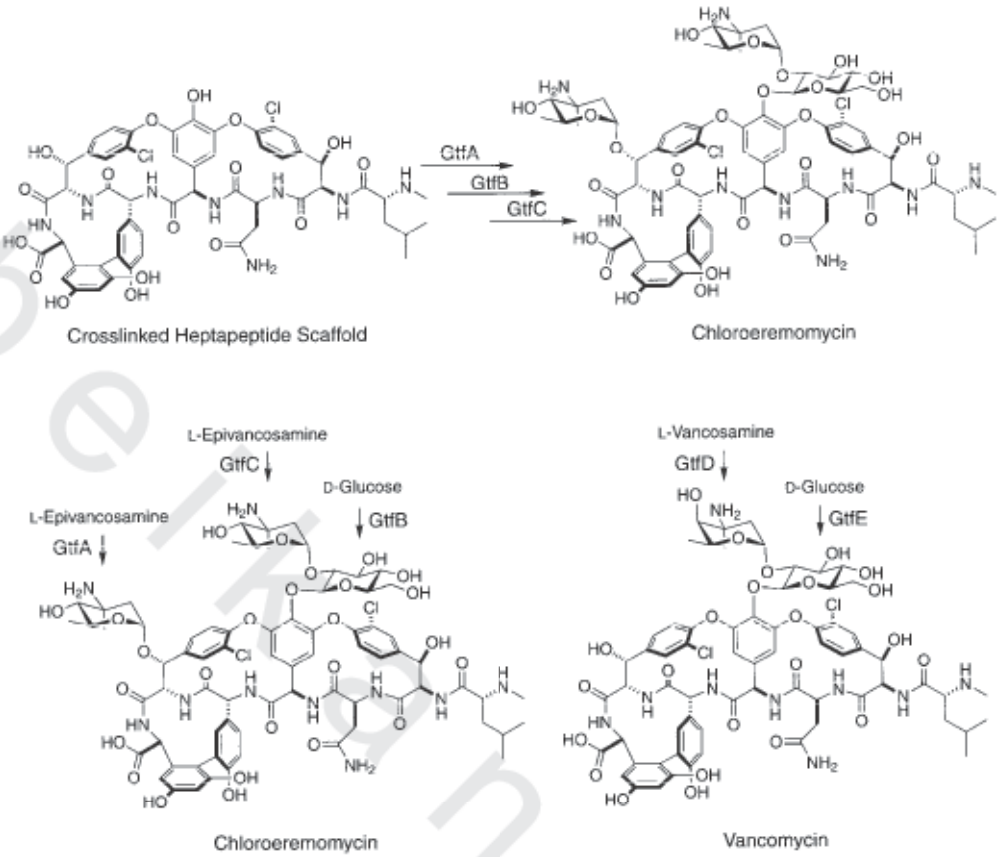
الشكل (١٣,٢٢). الروابط – التصالبية المصلَبة التي توصل سلاسل أريل في عائلة الفانكوميسين.

والربط–التبادلي ٤–٢ و ٦–٤ هما روابط أريل إيثر (aryl ether bonds)، في حين أن الربط–التبادلي ٧–٥ هو رابط C-C مباشر، ولكن بالإمكان صياغة كليهما كازدواج جذري لبيتا–OH كلورو–تيروسينات β- electron-rich (OH-chloro-tyrosines) الغني بالإلكترونات (الفضالات ٢ و ٦)، ٤–OH –فينيل جليسين (4-OH-phenyglycine) (الفضالات ٤ و ٥)، و ٣,٥ –داي هيدروكسي فينيل جليسين (3,5-dihydroxy phenylglycine) عند الفضالة ٧ (الشكل ١٣,٢٣). في مجموعة كلوروإرموميسين، يوجد ثلاثة أنصاف بروتينات ORFs 7 to 9، وتوجد مشابهتان في مجموعة باهليميسين (bahlimycin) المتورطة في عمليات الطرد الجيني (بيسكوف وآخرون Bischoff *et al.*, 2001) كحفَازات الربط–التصالبي. وهذه السيتوكرومات P450 المفترضة، تستطيع توليد جذور فينوليكس في السلاسل الجانبية لمواد الببْتيد السباعي لتبدأ الروابط–التبادلية. وإذا كانت أنصاف البروتين (hemiproteins) الفردية حفَازات لانتقائية موضع (regioselective) الربط–التصالبي لم يحدد بعد.

والمجموعة الثالثة من إنزيمات النضوج هي غليكوزيلترانسفيرازات (glycosyltransferases)، ثلاثة (GtfA,GtfB, and GtfC) للثلاثة سكريات المراد إضافتها إلى كلوروإرموميسين واثنين (GtfD و GtfE) في مجموعة فانكوميسين للسكريات الاثنين هناك (لوسي وآخرون Losey *et al.*, 2001، سولينبيرج وآخرون Solenberg *et al.*, 1997). يضاف السكر الأول لفينوليك–OH (phenolic-OH) من فضالة $PheGly_4$، ويدفن في الربط–التصالبي ٦–٤–٢ (الشكل ١٣,٢٤) ويستعمل TDP-glucose كمادة مانحة مع GtfB كحفَّاز.



الشكل (١٣,٢٣). آليات تحليق فينوكسي الجذري للربط – التصالبي المتواسط – بانصاف البروتين المقترحة في عائلة فانكوميسين.



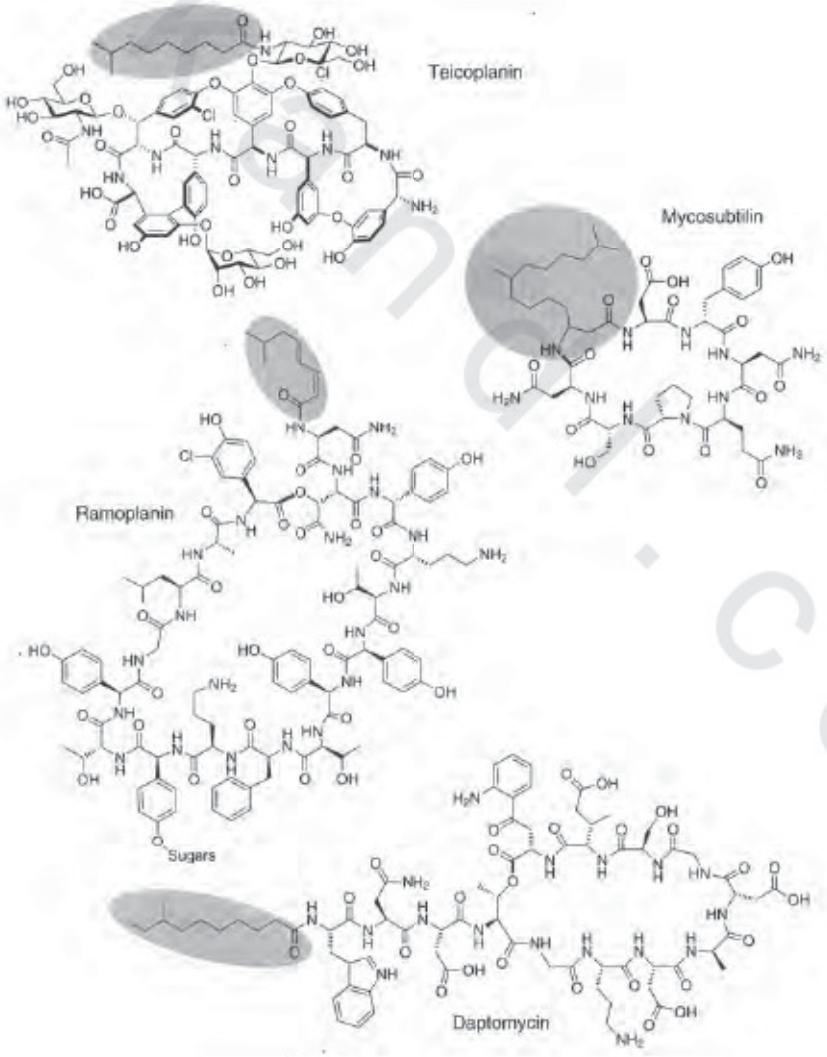
الشكل (١٣,٢٤). ثلاثة غليكوزيل ترانسفيرازات نوعية الموضع لحياكة أجليكون في نضوج كلوروإرموميسين.

وهذا الببْتيد السباعي المرتبط تصالبياً من غلوكوزيل (glucosyl-cross-linked heptapeptide) هو الآن المادة الثانية لـ Gtf(GtfC for chloroermomycin)hglh]m hglahv;m). المادة المشاركة لمسار كلوروإرموميسين هي L-TDP بيتا – إيبيفانكوسامين (TDP-L-β-epivancosamine)، بينما في مسار فانكوميسين هي شطر TDP-L-β-vancosamine مع اختلاف فقط في تكوين C_4-OH في السكر. وشطر إيبيفانكوميسين/فانكوميسين ينقل إلى C_2-OH في مجموعة غليكوزيل، مكوناً رابطة ٢,١ داي سكريد (1,2-disacchride linkage). وهذا يكمل البناء الحيوي للفانكوميسين، بينما يستعمل Gtf(GtfA) الثالث في مسار كلوروإرموميسين جزيء آخر من TDP-L-β-epivancosamine لعملية (β-OH (epivancosaminylate للفضالة السادسة في هيكل ببتيد وينتج مضاد كلوروإرموميسين الحيوي.

والنوع الرابع من التعديلات في هذه العائلة من المضادّات الحيوية تحدث فقط في الصنف الفرعي للتيكوبلانين ويتضمن أسَلة (acylation) مجموعة أمينو لسكر واحد، جلوكوسامين. وسوف يتم شرحه في سياق عمليات أسلة أخرى لمضادّات الببْتيد غيرالريبوسومية أدناه. وفي تيكوبلانين تختلف الهوية ووضع السكريات، مع إن–أسيل أمينوجلوكوسيزات (*N*-acylaminoglucoses) على أكسجين فينوليك من $PhGly_4$ و β-OH-Tyr_6 ومجموعة مانوسيل (mannosyl group) على الفضالة ٧.

مضادّات الببْتيد الدهنية وغليكوببْتيد الدهنية الحيوية

عدد من الببتيدات غير الريبوسومية هي ببْتيدات 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). وبإمكان سلسلة أسيل أن تكون مستقيمة مشبعة (ميكوسوبتيلين)، مشعبة طرفياً (سورفاكتين surfactin)، وغير مشبعة (راموبلانين)، يعكس تكملة الأحماض الدهنية المصنوعة من هذه الكائنات المنتجة. ولقد تم نشر البناء الكامل لراموبلانين، مما يفتح الباب أمام دراسات النشاط-التركيبي (جيانج وآخرون Jiang *et al.*, 2002). ودابتوميسين في المرحلة ٣ للتجارب السريرية للعداوى المزجبة-لغرام (انظر برونسون وباريت Brosnson and Barrett, 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). البتيدات الدهنية المصنوعة بواسطة خطوط - تجميع ببتيد سنثيتاز غير الريبوسومية.

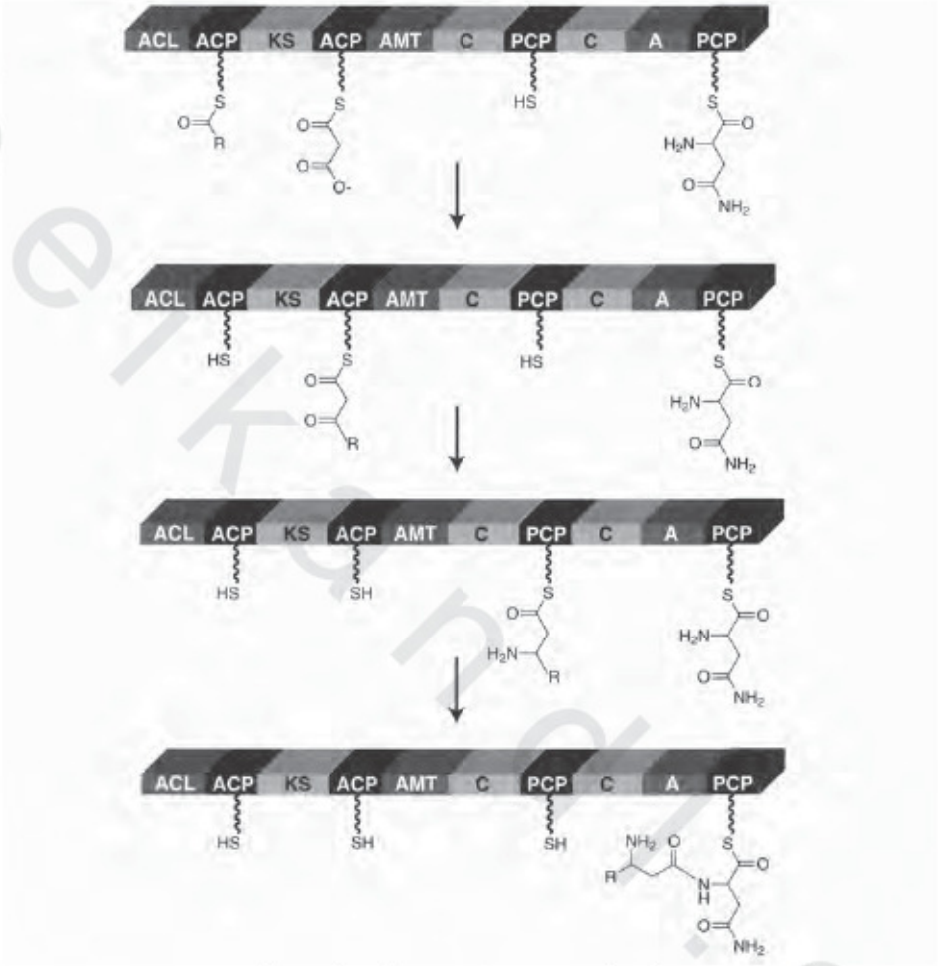
في معظم مجموعات البِبْتيد الدهني NRPS التي تم تسلسلها إلى اليوم، أسيل ترانسفيراز المسئول عن أسلة –غير منتهية – إن للحمض الأميني لا تتعين مع مجموعة (كتلة) البناء الحيوي ويعرف القليل عن نوعيتها (خصوصيتها). وفي حالة ميكوسوبتيلين، الحقول الخمس الأولى للوحدة الفرعية MycA (الشكل ١٣،٢٦) تكون مكرّسة لبناء مجموعة C_{16}-β-NH_2-acyl group (دوتمان وآخرون Duitman *et al.*, 1999). ويعتقد بأن حقل ليغاز أسيل أ م ب acyl-AMP ligase ينشط بالميتيت (palmitate) ويغرسه عل الحقل ٢، الواقع مباشرة عند مصب ACP_1. وحقل ٣ هو كيتوسيثيز، حقل ٤ هو ACP_2 الذي يُحمَل افتراضياً مع مجموعة مالونيل. التكثيف بواسطة كيتوسيثيتيز (ketosynthetase) سينقل سلسلة أسيل C_{16} ويصنع سلسلة β-keto-acyl-C_{18} على ACP_2. والحقل الخامس له تشابه مع أمينوترانسفيرازات (aminotransferases) ومن المحتمل أنه ينقل ينقل عبر الأمين (transaminate) β-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-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–ن N-formylation لنهاية N مثيونين في بناء البروتين الريبوسومي في البكتيريا، مما يفرض اتجاهية بما أن فورميلمثيونيل (formylmethionyl) يستطيع أن يعمل فقط كمانح، وليس مستقبل، في خطوة تكوين رابط–البِبْتيد. ومن المحتمل كذلك بأن البِبْتيد غير الرايبوسومي N-acylations توفر مراسي للغشاء لتحدد موقع المنتجات عند واجهات الغشاء. الهدف لراموبلانين 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 β-OH و β-NH_2 fatty acyl chains، مثال، سورفاكتين وفي مضادّات البِبْتيد الدهنية الحيوية أيتورين (iturin)، هي أنها توفر أليفات النواة البين الجزيئية في التحليق المتواسط بـ TE كخطوات إنهاء في خطوط–تجميع NRPS. حلقة ماكرولاكتون من بيتا هيدروكسي أسيل البِبْتيد السباعي سورفاكتين هو من β-O fatty acyl إلى الكربونيل من Leu_7.

تعدُّ أسلة تيكوبلانين التي تكمل تكوين مضادّات غليكوببتيد الحيوية مميزة عن الأمثلة أعلاه . سلسلة أسيل ليست على نهاية N من هيكل البِبْتيد . 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. وتزجد مشابهات 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 مضادّات البِبْتيد الدهنية الحيوية ربما تكون أحد الطرق لتفاوت التركيب وتحسين الخواص ضد الكائنات المقاومة.



الشكل (١٣,٢٦). آلية الأسلة-N عند النهاية N لخط – تجميع ميكوسوبتيلين سنثيتاز.

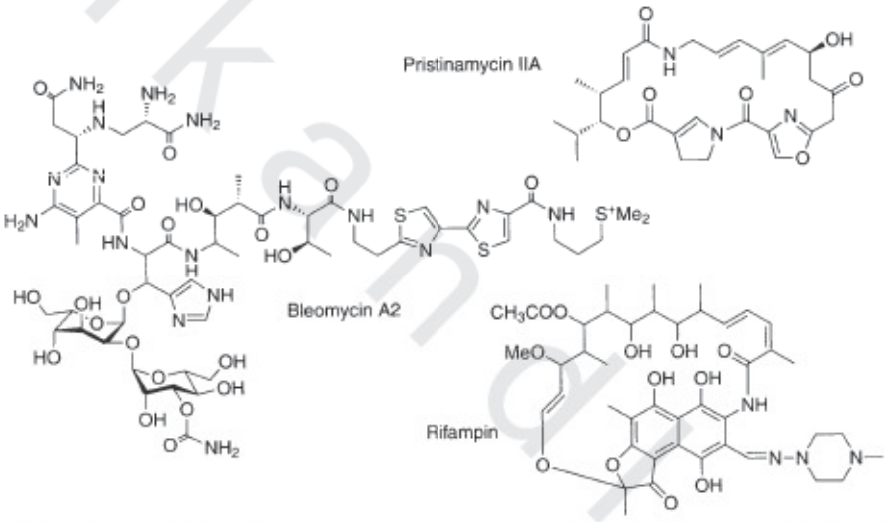
خطوط – تجميع مهجن NRPS-PKS: بريستيناميسينات (pristinamycins)، ريفاميسين (rifamycin)، وبليوميسين (bleomycin)

تعدُّ بعض المضادّات الحيوية هجين للبِبْتيدات غير الريبوسومية وبوليكيتيدات (انظر دو وآخرون Du *et al.*, 2001)، وتشمل بريستيناميسين IIB، المضاد الحيوي المضاد للورم بليوميسين وريفاميسين (الشكل ١٣,٢٧).

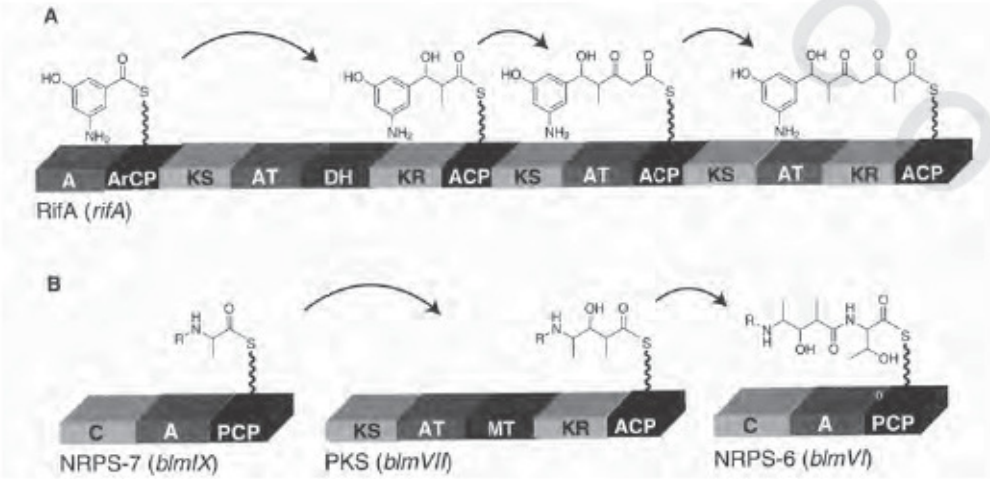
المركبان الأوليان يظهران بوضوح جزء تراكيب من كل نوع من خط التجميع. ولبريستيناميسين IIB ثلاثة أحماض أمينية، Gly,Ser وPro ومدفونة فيما بين امتدادات بوليكيتيد. وبليوميسين له امتداد بوليكيتيد قصير، مرمز بواسطة الوحدة الفرعية BLM VIII، المدفونة في تركيب البِبْتيد غير الريبوسومي. وريفاميسن، وإن كان يبدو أنه

مضاد بوليكيتيد حيوي بواسطة المسح الضوئي لتركيبه، له وحدة بادئة ٣-امينو-٥-هيدروكسي بنزويت (3-amino-5-hydroxybenzoate) (الشكل ١٣,٢٨) التي تنشط بواسطة بادئ-السلسلة ديدومين (didomain) الذي يعدُّ أدنلة (adenylation) وبروتين حامل أريل، مذكراً ببداية البِتيد غير الرايبوسومي سيدروفور سينثيتازات (siderophore synthetases) (أدميرال وآخرون Admiraal *et al.*, 2001).

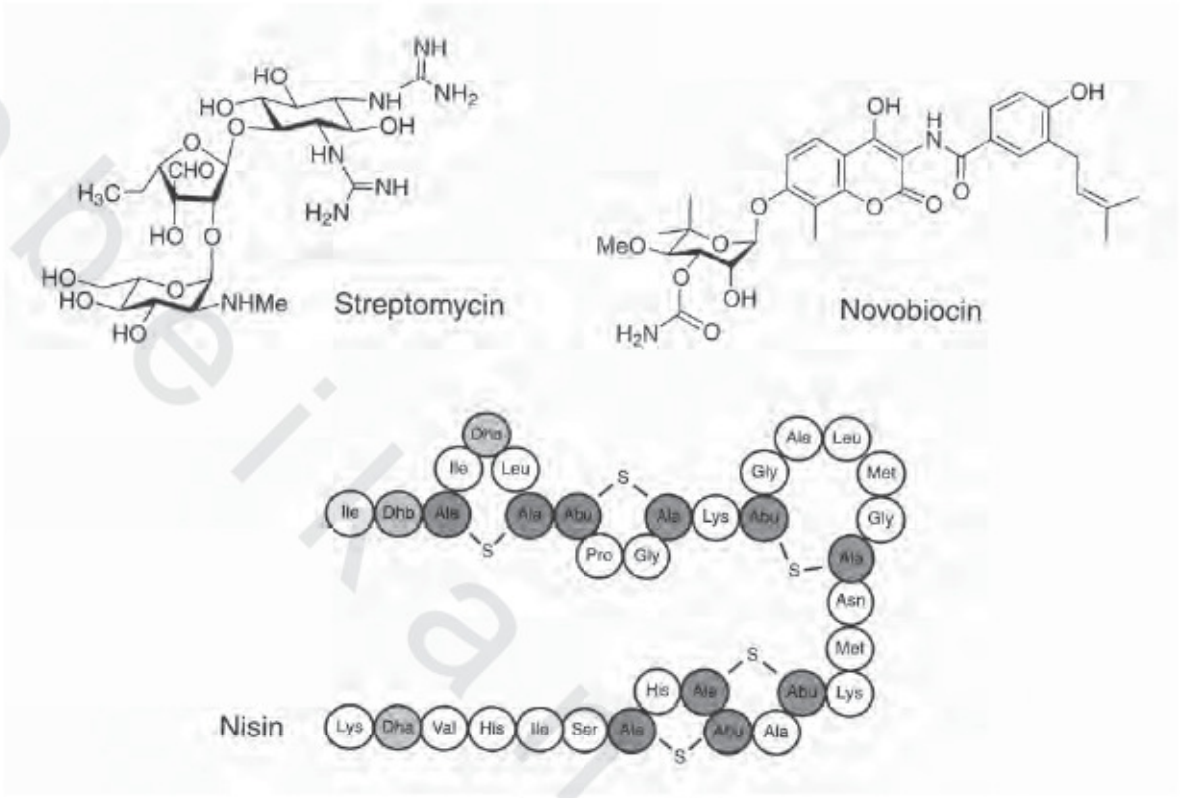
وفي هذه الحالات حيث جينات البناء الحيوي قد تم استنساخها وتسلسلها، فخطوط-التجميع تمثل بالفعل فسيفساء (mosaic) لوحدات PKS وNRPD. وترتيب ووضع الوحدات يتنبأ بالبوليكيتيد أو موحودات البِتيد غير الريبوسومية التي حصل وثم إختيارها ودمجها في سلاسل أسيل الهجينة بمجرد نموها ونقلها كسلسلة من وسائط إطالة acyl-*S*-(ACP/PCP) التساهمية.



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



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



المضادّات الحيوية المصنَعة بتنوع

openkandil.com