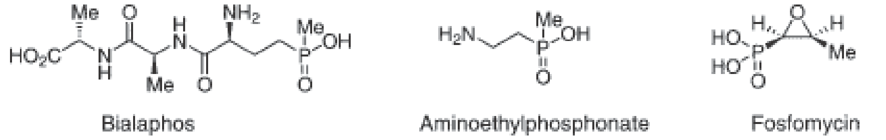
الفصل الرابع عشر

البناء الحيوي لأصناف المضادّات الحيوية الأخرى
BIOSYNTHESIS OF OTHER CLASSES OF ANTIBIOTIC

يناقش هذا الفصل المنطق الإنزيمي لتكوين الأصناف الأخرى من المنتجات الطبيعية التي استخدمت في الطب البشري كمضادّات حيوية. اختيار الموضوعات المحددة المكملة لبوليكيتيد ومضادّات البِبْتيد غير الريبوسومية في الفصلين الثاني عشر والثالث عشر. وأصناف المنتجات الطبيعية الأخرى ذات نشاط المضاد الحيوي لم تشرح بالتفصيل، ويرجع ذلك جزئياً لعدم المعرفة بالمنطق الإنزيمي للبناء الحيوي أو بسبب محدودية الاستخدام في علاج البشر. ولسياق أوسع من أصناف المنتجات لطبيعية تتجاوز تلك التي وُصفت هنا، بالإمكان الرجوع إلى سلسلة التسع *مجلدات كيمياء المنتجات الطبيعية الشاملة (Comprehensive Natural Products Chemistry)* (بارتون وآخرون Barton *et al.*,1999).

فوسفوميسين (Fosfomycin)

السمة الأبرز حول المضاد الحيوي فوسفوميسين (الشكل ١٤،١)، الذي يثبط MurA، الإنزيم الأول في البناء الحيوي لببتيدوغليكان (الفصل الثالث)، هي وجود رابط C-C مباشر في رابطة حمض فوسفونيك (phosphonic acid). وفوسفوميسين هو واحد من مجموعة صغيرة من المنتجات الطبيعية التي تحتوي على -C-P المعروفة، ويظهر أن جميعها تثبت رابط C-C بواسطة نفس المسار الإنزيمي. وأمينو إيثيل فوسفونيت (aminoethylphosphonate) هو عنصر من الأغشية الدهنية تتراهيمينا *(Tetrahymena)*، بينما يعدُّ فوسفينوثريسيل–الآنين–الآنين (phosphinothricy-Ala-Ala) (بيالافوس Bialaphos) مبيدات أعشاب C-P ثلاثي البِبْتيديل (C-P tripeptidyl herbicide).

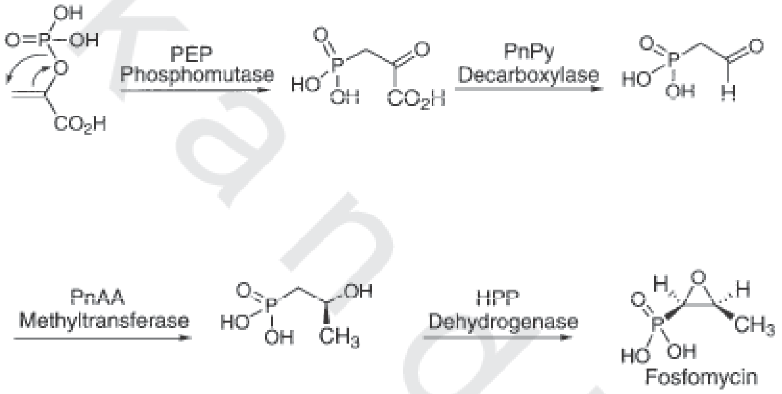


Bialaphos Aminoethylphosphonate Fosfomycin

الشكل (١٤،١). ممثل المنتجات المحتوية على C-P – الطبيعية: بيلافوس، أمينو إيثيل فوسفونيت، و فوسفوميسين.

obeikandl.com

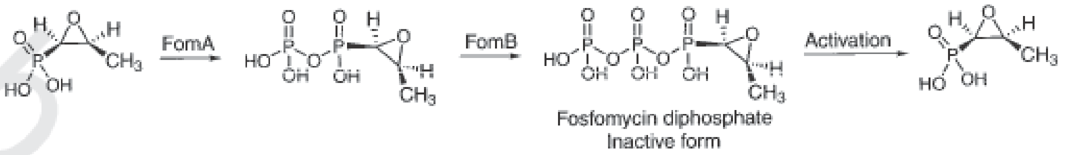
ينتج فوسفوميسين بواسطة المسار الإنزيمي ذا الخطوات – الأربع الفعال، المرمَّز بالجين *fom-1-4* في المنتج المتسلسلة ويدمورينسيس *(Streptomyces wedmorensis)*، من المستقلب الأولي فوسفواينولبيروفيت ((phosphoenolpyruvate (PEP)) (سيتو Seto, 1999) (الشكل ١٤,٢). الإنزيم الأول، فوسفونوبيروفيت ميوتيز (phosphonopyruvate mutase) (Fom1)، يثبت رابط C-P بواسطة الأسر البين الجزيئي من قبل أنيون C_3 إينوليت (anion C_3 enolate) كرابطة C_2-OPO_3 في كسور PEP في الموقع النشط ميوتيز (mutase). ومن ثم فوظيفة حمض ألفا–كيتو دي كاربوكسيلاتيد (ينزع الكربوكسيل) إلى ألديهايد (aldehyde) (Fom2) وتؤمثل بواسطة الإنزيم الذي يستخدم – ميثيل كوبالامين (methylcobalamin) (Fom3). والخطوة الأخيرة، الحفَّازة بواسطة Fom4، وهو التحليق غير المسبوق لمجموعة C_2-OH فوق C_1- CH_2 لتكوين حلقة إيبوكسيد وإنتاج فوسوفوميسين.



الشكل (١٤,٢). مسار البناء الحيوي من PEP إلى فوسفوميسين.

وبالإضافة إلى الجينات التركيبية الأربعة، عدة جينات مجاورة مشتركة في الحماية — الذاتية لمنتج المضاد الحيوي. وثلاثة جينات *orfI,orfJ* و *orfK*، يبدو أنها عناصر لبروتين مضخة التصدير لفوسفوميسين. كذلك، يضفي OrfA وOrfB مقاومة بواسطة فسفرة المضاد الحيوي الداخل الخلية، ويفترض قبل تصديره، إلى فوسفوميسين أحادي الفوسفيت (fosphomycin monophosphate) وفوسفوميسين ثنائي الفوسفيت (fosphomycin dipphosphate)، بالترتيب (الشكل ١٤,٣). ويملك فوسفوميسين ثنائي الفوسفيت سلسلة جانبية مشابهة لنيوكليوسيد ثلاثي الفوسفيت (nucleoside triphosphates). وكل من فوسفوميسين أحادي الفوسفيت وفوسفوميسين ثنائي الوسفيت غير فعالة ولكن بالإمكان تحللها إنزيمياً مرة أخرى لفوسفوميسين النشط بواسطة فوسفتازات (phosphatases) في الوسط الخارجي. وهذه الحماية – الذاتية العكوسة تحفظ رأس حرب إيبوكسيد الكيميائي (epoxide chemical warhead)، على النقيض من فتحة إيبوكسيد المتواسطة – بغلوتاثيون (glutathione-mediated epoxide) في البكتيريا المقاومة التي لا تعدُّ منتجة

لفوسفوميسين (الفصل العشر). وتعدُّ فسفرة الشكل البين الخلوي للمضاد الحيوي لنوع نشاطه قبل التصدير إستراتيجية متبعة كذلك من قبل منتجي ستربتوميسين، كما لوحظ في القسم التالي.



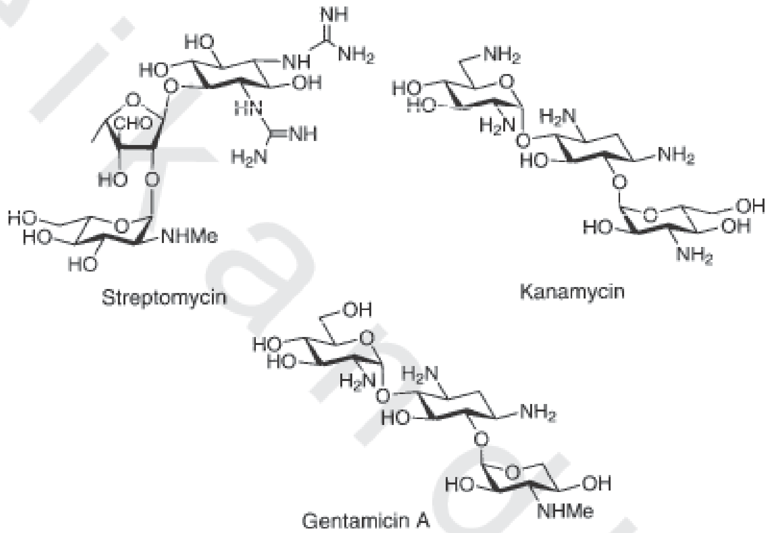
الشكل (١٤،٣). فسفرة الترادف التسلسلي لشطر فوسفونيت في فوسفوميسين كآلية حماية – ذاتية في الشعية ويدمورينسيات.

المسارات البنائية الحيوية لمضادّات أمينوغليكوسيد الحيوية

مضادّات أمينوغليكوسيد، أو أمينوسيكليتول الحيوية، تمثل منتجات أيض الكربوهيدرات الثانوية وهي منتشرة بين الشعيات (actinomycetes). بُدئ بعزل ستربتوميسين في ١٩٤٤م، تم اكتشاف مختلف أعضاء من العائلة خلال السنوات الخمس والعشرين التالية (بيبرسبيرج Piepersberg, 1997)، ويشمل توبراميسين (tobramycin) في ١٩٧٠م. ويستمر ورود تقارير عن أمينوسيكليتولات (aminocyclitols) الجديدة إلى التسعينيات. واثنين من الفئات الرئيسة لمضادّات الكربوهيدرات الحيوية مُمَثَّلة بصنف ستربتوميسين (الشكل ١٤،٤) وبالمضادّات الحيوية المحتوية على ٢–ديوكسي ستربتامين (2-deoxystreptamine) التي تشمل نيوميسينات (neomycins)، كانامیسینات (kanamycins)، وجنتاميسينات (gentamicins) (الشكل ١٤،٤). ولستربتوميسين ٣ ثلاثة مكونات سكر: سيلو–إنسيتول– (-scyllo inositol-derived aminocyclitol (streptidine)) المشتق من أمينوسيكليتول (ستربتيدين) الموصل بعنصر ٦–ديوكسي هيكسوز (6-deoxyhexose) (ستربتوز streptose) الموصل مع إن–ميثيل–إل–جلوكوسامين (*N*-methyl-L-glucosamine). في المضادّات الحيوية من صنف ٢–ديوكسي ستربتامين مثال كانامیسین وجنتاميسين A، أمينوسيكليتول هو الحلقة المركزية. التعديلات الجزئية التصنيعية (semisynthetic modification) لهذه المنتجات الطبيعية قد تمت ممارستها على نطاق واسع.

فعلى سبيل المثال، إضافة السلسلة الجانبية α-OH-γ- أمينوبيتيريل (α-OH-γ-aminobutyryl) إلى 1-NH من كانامیسین ينتج الدواء السريري المعاصر أميكاسين (amikacin). وتحويل غليكوسيد – إلى – سيكليتول (-glycoside to-cyclitol)، مركزياً لمنطق مسار البناء الحيوي للمضاد الحيوي هذا، يوجد في الأيض الأولي لتوليد إينوسيتول–فوسفيت (inositol-phosphate) من غلوكوز–٦–فوسفيت (glucose-6-phosphate) (glucose-6-P) في الطريق إلى البناء الحيوي لدهن الغشاء فوسفوإينوسيتيد (phosphoinositide) (والش Walsh, 1979).

هناك بعض ٣٠ جينات مجتمعة سوياً ومنظمة في وقت واحد والتي تُشغَل عندما تصنع المتسلسلة جريسيس ستربتوميسين (انظر بيبرسبيرج Piepersberg, 1997). وهذه مشاركة في ترميز إنزيمات أيض السكر الثانوي الذي يصنع موحودات السكر الثلاثة، ستربتيدين-P-6 (streptidine-6-P)، TDP — داي هيدروستربتوز (TDP-dihydrostreptose)، و nucleoside diphospho-*N*-Me-L-glucosamine، وربطهم موضعياً و- تجسمياً نوعياً (regio-and-sterospecifically). ويأتي streptidine-6-P من المستقلب الأولي D-glucose-6-P بواسطة تفاعل الدول البين الجزيئي (intramolecular aldol) الإنزيمي لصنع cyclitol-inositol-3-P، في التفاعل المعروف جيداً (انظر والش Walsh, 1979).



الشكل (١٤،٤). صنفان تركيبيان رئيسان من مضادّات أمينوغليكوسيد (أمينوسيكليتول) الحيوية: ستربتوميسين ومثالين من كاناميسين وجنتاميسين A التي تحتوي على -٢-ديوكسي ستربتامين (2′-deoxystreptamine).

ومن ثم سلاسل من التوليد الإنزيمي لمجموعات كيتو، عمليات نقل الأمين الاختزالية (reductive transaminations)، وتحويلات جوانيدينو (guanidine transfers) تنتج بيسجوانيدينو-سيكليتول- P (bisguanidino-cyclitol-P)، ستربتيدين- P-6 (streptidine-6-P) (الشكل ١٤،٥A). وينتج TDP — داي هيدروستربتوز (TDP-dihydrostreptose) من الوسيط المشترك في البناء الحيوي لديوكسي هكسوس (deoxyhexose)، TDP -4- كيتو -٦ - ديوكسي غلوكوز (-TDP-4-keto 6-deoxyglucose) (انظر الفصل الثاني عشر) بواسطة التقسيم الفوقي عند C_5 لتوليد رامنوس (TDP-4-keto-L-rhamnose)، يتبعه التحويل إلى تركيب فيورانوس (furanose) ذا الخمس-حلقات في TDP -ثنائي هيدروستربتوز، حيث ثنائي هيدرو يشير إلى حالة أكسدة الكحول لوحدة -كربون C_2OH واحدة عند C_3 (الشكل ١٤،٥، الوسط). -NDP-L glucosamine منوَق بالمثل من NDP-D-glucose عن طريق ٤-كيتو، ٥- التقسيم الفوقي، يتبعه أمْيَنَة (amination)

obeikandi.com

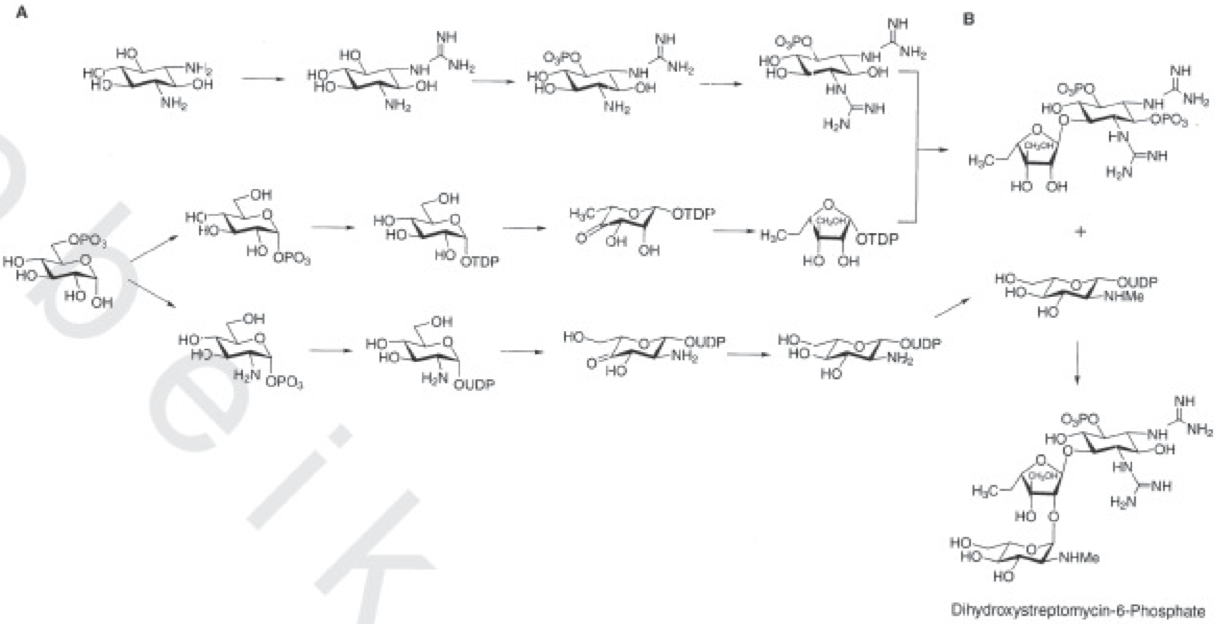
وN – أمثلة عند C_3 (الشكل ١٤,٥ ، الأسفل). ويهاجم 4-OH من C_1 streptidine-6-P من TDP-dihydrostretose في التكثيف الأول لغليكوزيل ترانسفيراز ، وبعد ذلك يزيح OH-′ 2 من هذا السكريد الثنائي الـ NDP من NDP-N-methyl-L-glucosamine لينتج داي هيدروستربتوميسين- P-6 (dihyrostreptomycin-6-P). وهذه نهاية المرحلة السيتوبلازمية للبناء الحيوي لستربتوميسين في المتسلسلة جريسيس وينتج عن ذلك طلائع نشطة. وهذه تُصدَر تحديداً عن طريق مضخة معتمدة على- ATP وتُؤكسد من المرحلة ثنائي هيدروC_2OH إلى CHO في streptomycin-6-P أثناء المرور عبر الغشاء بواسطة الإنزيم المؤكسد أوكسيديز. والآن يملك streptomycin-6-P في الفضاء الخارج الخلية مجموعة $6\text{-}OPO_3$ التي أُزيلت بالتحلل المائي بواسطة إنزيم فوسفتاز وكذلك رُمِّزت في الكتلة وصُدِرت (الشكل ١٤,٦). وهكذا فالستربتوميسين الحر هو المضاد الحيوي النشط.

يشمل البناء الحيوي بعض ٢٧ خطوة إنزيمية. وتزود الكائنات المنتجة مقازمة – ذاتية بواسطة تراكم الطلائع غير النشطة فقط في داخل الخلية ، كل من ثنائي هيدرو والمفسفرة ، وتُنفذ خطوتين كيميائيتين أثناء وبعد الإفراز. وهذا مماثل للارتباط بالغليكوزيل لأولياندوميسين بينما في الخلية المنتجة لتُبقي ذلك الماكروليد غير نشط إلى أن يتم إفرازه وينزع منه السكر (deglycosylated) نوعياً (الفصل السابع). وبالإضافة إلى آليات الحماية – الذاتية هذه ، بإمكان منتجي ستربتوميسين إعادة فسفرة (rephosphorylate) أي ستربتوميسين يعود مرة ثانية ، عند C_6 مع فوسفوترانسفيريز (phosphotransferase). وبالمثل يفرز منتجي كاناميسين ′٦–أسيتيل ترانسفيراز (6′ acetyltransferase). وكلا الإستراتيجيتين تنذر بالآليات المكتسبة في المُمْرِضات السريرية التي تصبح مقاومة لمضادّات أمينوغليكوسيد الحيوية (الفصل العاشر). أخيراً، في منتجي جنتاميسين، تزود طبقة إضافية من الحماية–الذاتية بواسطة أمثلة –N الإنزيمية للموقع عالي – الانجذاب في 16S Rrna (بيبرسبيرج Piepersberg, 1997) لخفض الانجذاب للأمينوغليكوسيدات عند الريبوسومات.

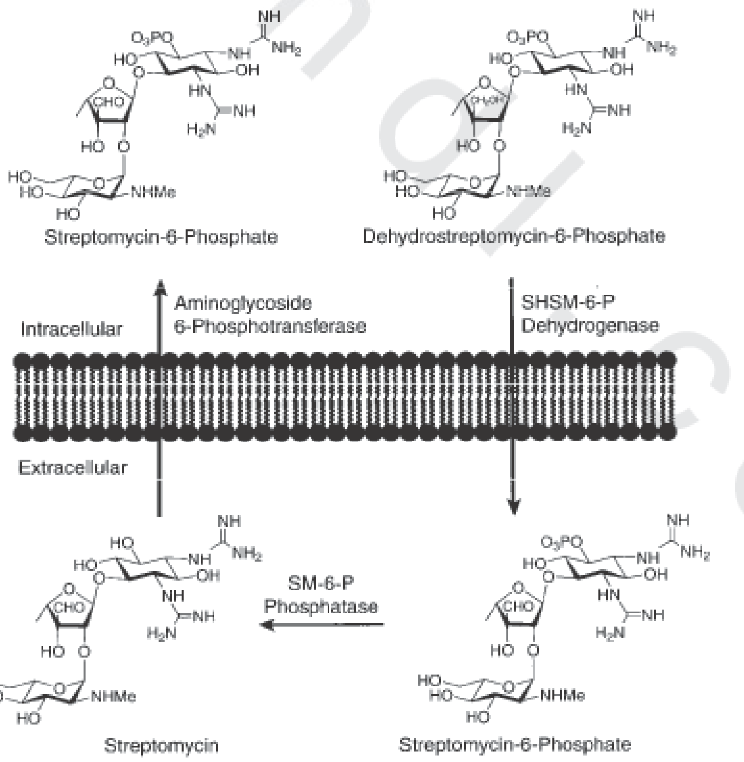
تُنظم مشغلات (operons) البناء الحيوي لستربتوميسين (الشكل ١٤,٧) بواسطة جزيئات استشعار–النصاب ، كما شُرِح في الفصل الحادي عشر. ففي المتسلسلة جيريسس هذا هو العنصر A بيوتانيوليد (butaneolide A factor) (الشكل ١١,٦)، التسلسل الهرمي للتنظيم العالمي والمسار المحدد، خلال مستقبل العنصر A وبعد ذلك إلى قامع strR ، ينطبق على ٢٣ جينات في المُشغِلات الثمانية للشكل (١٤,٧).

منطق صنف B أمينوغليكوسيدات مشابه من حيث التعديلات الإنزيمية لسكريات –NDP لنزع الأكسجين (deoxygenation) والأمنة الاختزالية ولتوليد أمينوسيكليتول واقتران غليكوزيل ترانسفيراز. آفاق البناء الحيوي الاندماجية لصنع أمينوسيكليتولات جديدة، مثال، مع مزيد من الحلقات وتوصيلات جديدة، ربما تكون جيدة، لإقامة نظم لجولات جديدة من اللاألكلاَّت والأسلاَّت (alkylations and acylations) الشبه–اصطناعية ، على الرغم من أنه يبقى أن نرى إن كانت ستنتج أنشطة جديدة. وفك رموز مواقع الربط لصنف A و B أمينوسيكليتولات على 16S rRNA (الفصل الرابع) قد يساعد في تصميم مضادّات أمينوسيكليتول أفضل.

obeikandi.com

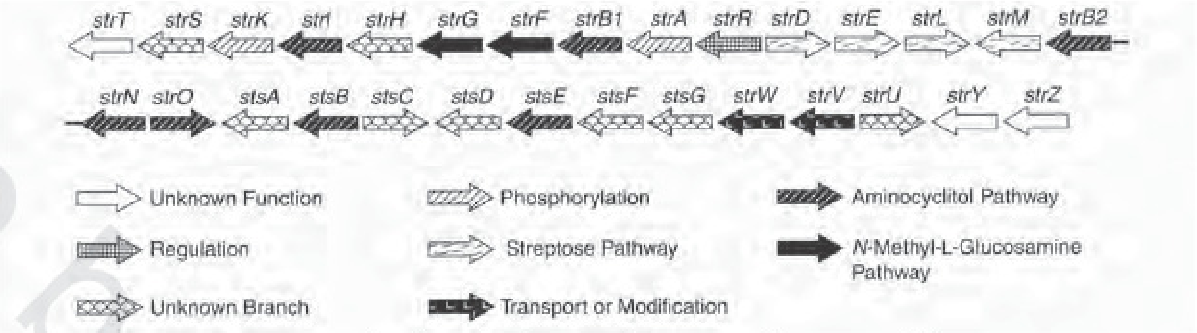


الشكل (١٤,٥). مسار البناء الحيوي إلى dihydrostreptomycin-6-P. (A) الخط العلوي: الفرع streptidine-6-P: الخط الأوسط: الفرع TDP-dihydrostreptose، الفرع NDP-*N*-methyl-L-glucosamine، (B) عمل غليكوزيل ترانسفيراز لينتج dihydrostreptomycin-6-P.



الشكل (١٤,٦). تصدير وتنشيط dihydrostreptomycin-6-P: تحويل dihydro CH_2OH إلى CHO في ستربتوميسين ونزع الفوسفور الإنزيمي الخارج الخلية.

obeikandi.com



الشكل (١٤,٧). كتلة ٢٢ جينات لثمانية مشغلات للبناء الحيوي لستربتوميسين.

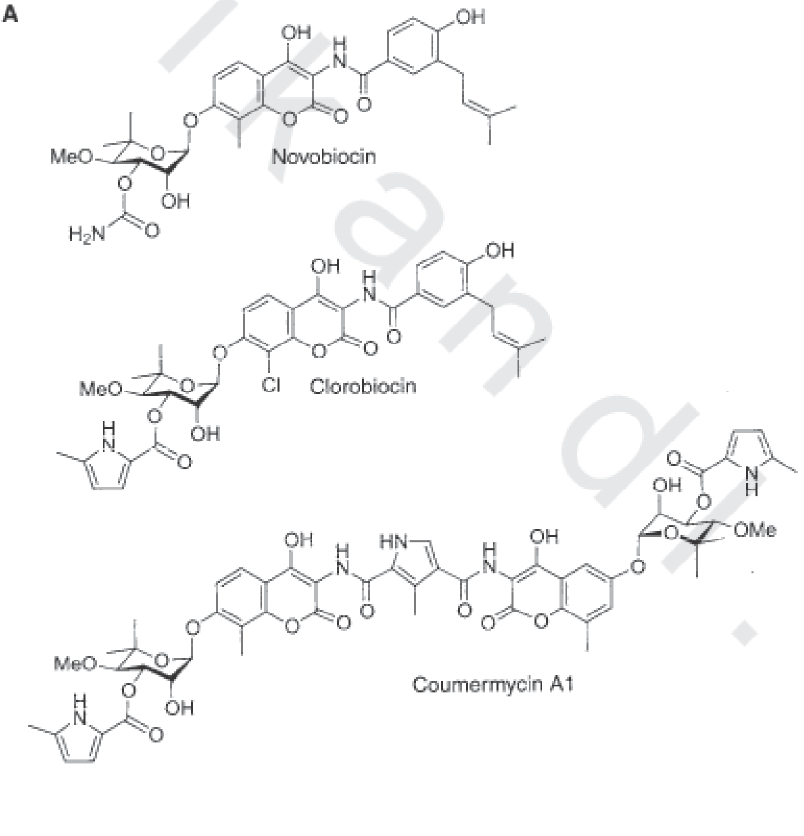
البناء الحيوي للمضادّات الحيوية المشتقة من – كوريسميت (chorismate): الأمينوكيومارينات و كلورامفينيكول

مثبطات الـ دنا غيرازكلوروبيوسين (chlorobiocin)، نوفوبيوسين (novobiocin)، والمثنوي كوميرميسين (coumermycin) جميعها تشترك في أمينوكيومارين المركز (اللب) و سكر نوفيوس (noviose sugar) التي تعد مهمة للربط مع الوحدة الفرعية GyrB من دنا غيراز (الفصل الخامس) وتعرقل تكرار الـ دنا. وحلقة أمينوكيومارين الثنائية الحلقية، شيدت من تيروسين، والتي بدورها مشتقة من كوريسميت، الوسيط المهم في البناء الحيوي للحمض الأميني العطري (الشكل ١٤,٨ A).

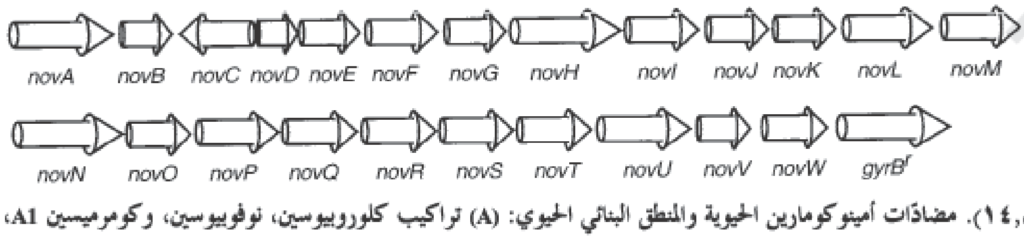
ولقد تم تسلسل كتلة جين البناء الحيوي لكل من نوفوبيوسين وكتلة كومرميسين من المتسلسلات وسمحت بالتنبؤ بالمسار الذي فيه كل من النصفين من نوفوبيوسين يُشتق من تيروسين (الشكل ١٤,٨ B). ينشأ الجانب على اليد–اليمنى من (prenylation) للتيروسين وبعد ذلك نزع الكربوكسيل المؤكسد (oxidative decarboxylation). وينشأ الجانب على اليد–اليسرى من تيروسين -*β*-OH (*β*-OH-tyrpsine)، والذي بعد ذلك يؤكسد إلى بيتا–كيتو ويحلَق إلى كومارين. ميثلات - C ومن ثم ارتباط بالغليكوزيل (إضافة السكر) والتكثيف بواسطة برينيل بنزويت (prenyl benzoate) على اليد اليمنى، ينشئ رابطة البِبْتيد في حامض نوفوبيوسيك (novobiocic acid). يتم الربط بالغليكوزيل (glycosylated) أجليكون بواسطة TDP-noviose ليكمل مسار نوفوبيوسين (الشكل ١٤,٨ جـ). يحتوي كلوروبيوسين (chlorobiocin) وكومرميسين على مستبدلات بيرول (pyrrole) في مكان مجموعة O —كاربامويل (O-carbamoyl group) فوق سكر نوفيوس وتلك تنشأ من برولين (proline). وكل من بيتا–إدخال عنصر الهيدروجين لتريوسين وأكسدة بيتا لبرولين إلى بيرول يحدث على بركة الحمض الأميني المحتجزة، ينشط ويقيد على حقلين أمينو أسيل- بِبْتيديل لحامل بروتين سنثيتاز (aminoacyl-peptidyl carrier protein synthetase) مع تشابه مع وحدة التحميل لبيبي سنثيتاز غيرالريبوسومي (الفصل الثالث عشر) (الشكل ١٤,٩). إدخال عنصر بيتا – الهيدروجين لـ Tyr-*S*-PCP (NovH) يجري بواسطة الشريك هيميبروتين هيدروكسيلاز (NovI) (تشين ووالش Chen and Walsh, 2001)، بعد ذلك يؤكسد إلى -*β*-keto

Tyr-*S*-PCP بواسطة NovJ و NovK. وهذا ربما ينشئ ليتم تحليقه إلى كومارين وليطلق من NovH. الزوج من أطر القراءة المفتوحة المقارن (١٩ و٢٠) في كتلة كلوروإرمومميسين (الشكل ١٣,١٠) يصنع β-OH-Tyr للمواقع ٢ و٦ في هيكل البِبْتيد السباعي من مضادّات غليكوببتيد الحيوية (هوبارد ووالشHubbard and Walsh, 2002). ويؤكسد Pro-*S*-PCP بواسطة فلافوبروتين النازع التشبع (flvoprotein desaturase)، أقرب إلى تفاعل fatty acyl-*S*-PCP desaturase (ثوماس وآخرون Thomas *et al.*, 2002). ويستعمل هذا المنطق كذلم بواسطة المتسلسلة كوليكولر لتصنع أنديسيلبروديجيوسين (undecylprodigiosin) (ثوماس وآخرون Thomas *et al.*, 2002). وهذه الإستراتيجية ربما تحصل أيضاً مع البناء الحيوي لكلورامفينيكول، كما هو مبين لاحقاً.

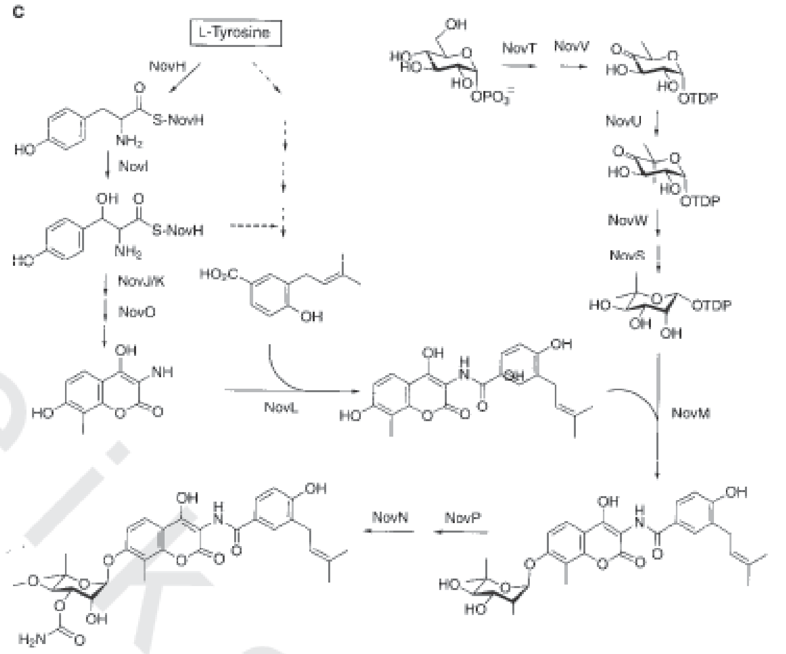
A



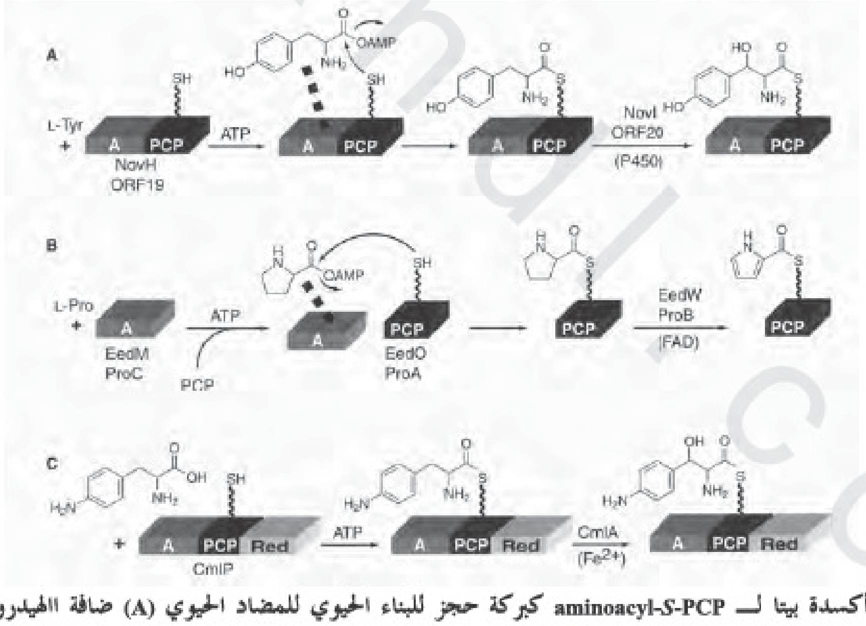
B



الشكل (١٤,٨). مضادّات أمينوكومارين الحيوية والمنطق البنائي الحيوي: (A) تراكيب كلوروبيوسين، نوفوبيوسين، وكومرميسين A1، (B) جينات مسار نوفوبيوسين.



تابع الشكل (١٤,٨). (C) خلاصة الخطوات الرئيسة في تجميع نوفوبيوسين.

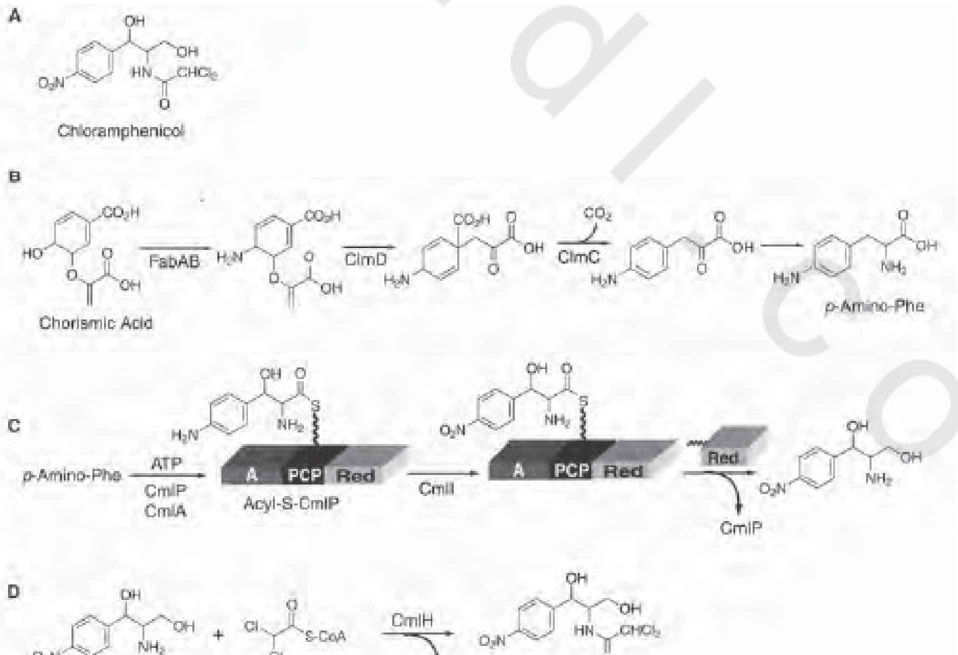


الشكل (١٤,٩). أكسدة بيتا لـ aminoacyl-*S*-PCP كبركة حجز للبناء الحيوي للمضاد الحيوي (A) ضافة االهيدروكسيل لنوفوبيوسين وفانكوميسين، (B) أكسدة برولين كومرميسين و انديسيل بروديجيوسين، (C) بارا–امينو فينيل الآنين لكلورامفينيكول.

تم عزل مضاد كلورامفينيكول من المتسلسلة فينزويلي *(Streptomyces venzuelae)* في ١٩٤٨م (انظر مالك Malik, 1972، فيننج سنوتارد Vining and Stuttard, 1995) واستخدم على نطاق واسع لبعض العقود كعامل مضاد بكتيري واسع – المدى، نشط ضد كل من العداوى البكتيرية السالبة لغرام والموجبة – لغرام بواسطة عرقلة بناء البروتين

obeikandl.com

البكتيري كمضاد لمستقلب الحمض الأميني. ويحدث الربط في مركز ببتيديل ترانسفيراز (ناقلة الببتيديل) للوحدة الفرعية لريبوسوم 50S (الفصل الرابع). ويمكن أن يحدث تأثيرات جانبية خطيرة في الدم، وتشمل الأنيميا الآتنسجية القاتلة (fatal aplastic anemias)، التي تحد من استعماله الحالي. الكلورامفينيكول (الشكل ١٤,١٠ A) هو جزيء بسيط ذو هيكل نيتروفينيل سير-إينول (nitrophenylser-inol) الذي فيه يتم تأسيل مجموعة أمينو مع مجموعة داي كلورو أسيتيل (dichloroacetyl group). ويأتي العمود الفقري بوضوح عبر مسار كوريسميت، عن طريق أمْيَنَة، لإنتاج 4-amino-4-deoxychorismate، التي على إعادة ترتيب مسار 3-3-sigmatropic (الموجه لسيجما) والتعطير النازع للهيدروجين (dehydrogenative aromatization) يعطي بارا-امينوفينيل الآنين (*para*-aminophenylalanine) (الشكل ١٤,١٠ B). وتحويل β-CH_2 إلى CHOH لأمينوفينيل سيرين (aminophenylserine) ربما يحدث أيضاً بينما يثبت الحمض الأميني على A-PCP reductase للوحدة الفرعية للثلاثة حقول (الشكل ١٤,١٠ C). وaminophenylseryl-*S*-PCP عندئذ ينفلق اختزالياً بواسطة الحقل الثالث في البروتين ليطلق أمينوفينيل سيرينول (aminophenylserinol). وهذا الطريق من خطوتين من المضاد الحيوي. واحد هو داي كلورأسيتيليشن (dichloracetylation)، المفترض بأن يحدث من dichloroacetyl-CoA (فيننج وستوتارد Vining and Stuttard, 1995)، والآخر هو أكسدة- N (N-oxidation) من مستبدل بارا-أمينو إلى بارا- نيترو (*para*-amino to *para*-nitro) (الشكل ١٤,١٠ D). يستخدم بعض المنطق والآلية لانتقاء ببتيد سنثيتاز غير الريبوسومي، تنشيط، وتعديل موجودات الحمض الأميني في هذه المضادّات الحيوية المستندة على الحمض الأميني.



الشكل (١٤,١٠). الخطة الإستراتيجية لبناء الكلورامفينيكول: (A) تركيب كلورامفينيكول، (B) كوريسميت إلى بارا – أمينوفينيل الآنين، (C) بيتا–ضافة الهيدروكسيل واختزال كربوكسي، (D) داي كلوروأسيتيليشن و أكسدة – N.

الخصائص الوراثية للانتبيوتيك (lantibiotic) والبناء الحيوي لميكروسين B17 (microcin B17)

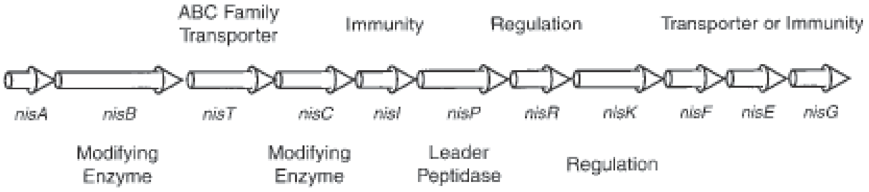
لاحظنا آليات عمل الصنف A (مثال، نيسين nicin) والصنف B (مثال، ميراسيدينmeracidin) من مضادّات البِبْتيد الجرثومية – المحتوية على لانثيونين (lanthionine)، اللاّنتيبيوتيكس، في الفصل السادس. تتجمع الجينات لإنتاج الآنتيبيوتك الريبوسومي المتولد (الشكل ١٤،١١) ويشمل الجين التركيبي الذي يرمز البِبْتيد الطليعة، جينات نزع الهيديريد هيدرتاز (dehydratase) التي تحول فضالات Ser and Thr إلى دي هيدروالآنين وديهيدروبيوتيرين (dehydroalanine and dehydrobutyrine)، الجين القائد ببتيداز (peptidase)، والجينات لمضخات التصدير لإفراز مضادّات البِبْتيد الناضجة. وعلى سبيل المثال. نيسين، مضاد ببتيد جرثومي من لاكتوكوكس لاكتيس (*Lactococcus lactis*) الواسع الاستعمال كحافظ للأغذية، يصنع من كتلة ١١-جين، *nisABTCIPRKFEG* التي تمتد 14kbp على عنصر قابل للنقل وهو نموذج لكتل جين البناء الحيوي للانتيبيوتك (انظر هانسين Hansen, 1997، للمراجعة). ويرمَز جين *nisA* شكل الطليعة لمضاد ببتيد الحيوي: وفي حالة نيسين، فله ٥٧ فضالات. وفي أثناء النضوج الإنزيمي، يحدث نوعان من التعديلات. الأول، يعدل ١٣ فضالة. ثمانية فضالات من سلاسل بيتا-هيدروكسي الجانبية من Ser، وThr، تجفف (dehydrated)، ربما بواسطة إنزيم NisB، لتنتج فضالات دي هيدرياالآنين (dehydrialanine) و دي هيدرو بيوتايرين (dehydrobutyrine) (الشكل ١٤،١٢ A). خمسة من سلاسل حمض أوليفينيك (olefinic acid) الجانبية تؤسر بواسطة سلاسل خمس سلاسل سيستسن ثيوليت (cystein thiolate) الجانبية لتنتج خمس روابط ثيوإيثر (thioether linkages)، فضالات الآنثيونين وبيتا-ميثيل لانثيونين (lanthionine and β-methyl lanthionine) (الشكل ١٤،١٢ B)، التي تربط – تبادلياً نيسين الناضج وتنشئ البناء الثلاثي – الأبعاد المقيد، وثيق الصلة بالنشاط البيولوجي. وهذه تبدو الوظيفة الحفّازة لبروتين NisC.

عند هذا الالتحام يحدث النوع الثاني من التعديلات، الانفلاق الحال للبروتين لفضالات نهاية –N (N-terminal 23)، لينتج لانتيبيوتيك نيسين ذا فضالة-٣٤ الناضج (الشكل ١٤،١٢ C) . وفضالات نهاية – إن ٢٣ تعمل كطليعة ببتيد (propeptide) ضرورية للتجفاف وتفاعلات ثيوإيثر المحفزة بواسطة إنزيمات NisB وNisC وربما تساند الطية (الثنية) التي تسمح بمثل هذا التمييز. ويحدث التشذيب الحال للبروتين (proteolytic trimming) نوعياً بواسطة بروتييز NisP protease المرمز في الكتلة. ومن بين الجينات السبعة الأخرى في الكتلة، واحد، NisI، الذي يرمز وظيفة مناعية في حين أربعة (NisT,NisE,NisF, and NisG) مرتبطة في وظائف النقل أو الضخ. وNisT هو مضخة-حالة لـATP (ATP-hydrolyzing pump) للنوع الذي تم شرحه في الفصل التاسع ويعتقد بأن تكون مضخة التدفق الرئيسة (الأولية) لنيسين الناضج ولانتيبيوتيكس الأخرى في كتل Lan ذات العلاقة. ويعتقد بأن تكون بروتينات NisE, NisF وNisG

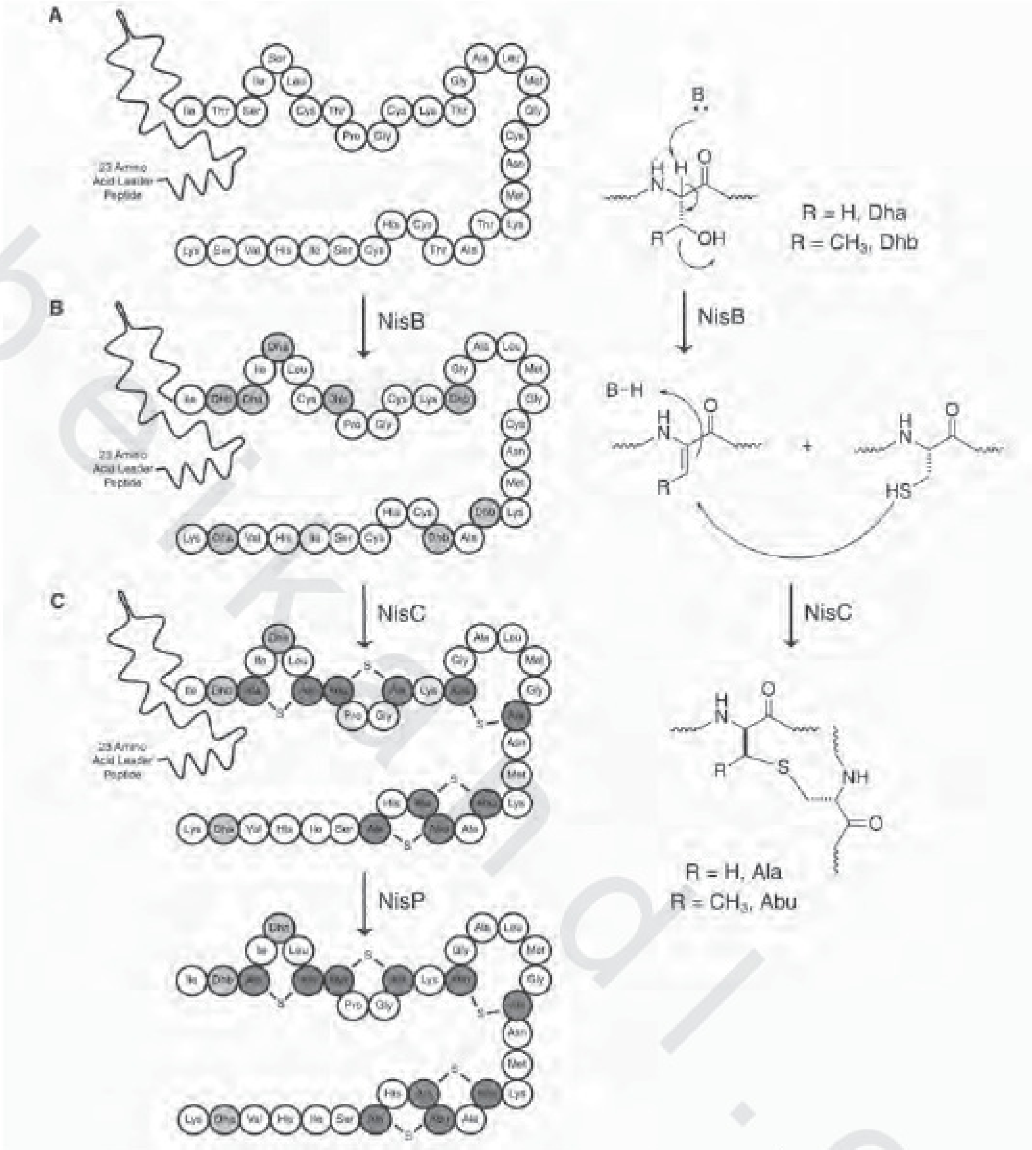
مضخة أمان — فشل (fail-safe pump) إضافية ، لإزالة أي لانتيبيوتيك الذي يجعل طريقها للرجوع فوق الخلية المنتجة وبذلك يشكل مناعة أو وظيفة مقاومة–ذاتية. وأخيراً ، ترمز جينات *nisR* و*nisK* المنظم —ذا الشقين (R) وبروتينات كيناز الحسية (sensor kinase) (K) التي تتحكم في انتساخ جينات لانتيبيوتي بواسطة منطق مسار الشقين (two-component pathway logic) الذي شرح عدة مرات في هذا الكتاب. ويشير تحليل تنظيم اللاانتيبيوتيك ذا العلاقة سبتيلين (subtilin) إلى التحكم المزدوج بتنشيط جين البناء الحيوي ، بواسطة كيناز الاستشعاري / منظم الاستجابة ذو – المركبين (two-component sensor kinase / response regulator) وأيضاً بواسطة إزالة الكبح (derepression) من عنصر سيجما (sigma factor) البديل لبوليميراز دنا الذي يتحكم بانتساخ جينات منظم الاستشعار / الاستجابة (ستين وآخرون Stein *et al.*, 2002).

وبوجود حوالي اثنين درزينة من كتل لانتيبيوتيك المعروفة حالياً ، البتيدات القائدة ونوعين من تعديلات السلاسل ، تجفاف سلاسل β-OH الجانبية ومن ثم الأسر لصنع الروابط–التبادلية ثيوإيثر ، فالاحتمالات لهندسة البِبْتيد الهجين عالية. وليس من الواضح كم من فضالات دي هيدروالآنين (dehydroalanine) ودي هيدروبيوتيرين (dehydrobutyrine) متبقية (ثلاثة في نيسين) ، بواسطة تأثيراتهم المصلّبة على روابط البِبْتيد ، يضع التشكيلات الموضعية التي تساهم في نشاط المضاد الحيوي. ولصنف B من لانتيبيوتيكات ، والتي لا تعدُّ أصلاً مكونات لمسام الغشاء ولكن لديها أهداف معينة مثل الدهن II في البناء الحيوي لببتيدوغليكان ، الطرق الهندسية والتوافقية للمكتبات ربما يكوِّن النشاط الأمثل. وتقترح دراسات التركيب/الوظيفة الحديثة بأن النوع A وB من لانتيبيوتيك لهما انتقائية مختلفة في تفاعل الدهن I والدهن II ويقترح بأن هذه لا تعمل كبِبْتيدات من كلا الجانبين (أمفيفيليك) (amphiphilic) كتيونية غيرنوعية (بروتز وساهل Brotz and Sahl, 2000).

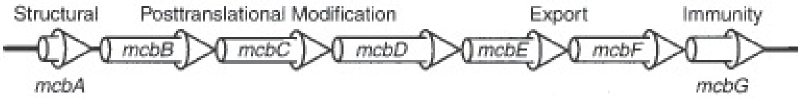
يوجد المتغير الثاني لنضوج مضاد البِبْتيد الريبوسومي الحيوي مع المنطق المشابه لنضوجات لانتيبيوتك في مُشغّل مضاد الإشريكية القولونية ميكروسين B17 (microcin B17) (الشكل ١٤،١٣) ، مثبط دنا غيراز (الفصل الخامس عشر) (انظر سينها روي وآخرون Sinha Roy *et al.*, 1999 ، للمراجعة). ومثل لانتيبيوتكس ، ينتج ميكروسين B17 من طلليعة بروتين صغيرريبوسومي مرمَز ، البروتين McbA فضالة–٦٩ (69-residue McbA protein) ، والإنزيمي المعدل على سلاسل سيرين وسيستين الجانبية ، في هذه الحالة أربعة لكل واحد ، بواسطة البروتينات McbB,McbC و McbD.



الشكل (١٤،١١). كتلة البناء الحيوي لنيسين.



الشكل (١٤,١٢). التعديل الإنزيمي للشكل prepro للانتيبيوتك نيسين: (A) تجفاف السلاسل الجانبية Ser وThr بواسطة NisB، (B) تكوين ثيوإيثر بواسطة مهاجمة سلاسل Cys الجانبية المحفزة بواسطة NisC، (C) الإنفلاق الحال للبروتين من التسلسل القائد لفضالة–٢٣ للنهاية –N بواسطة NisP.



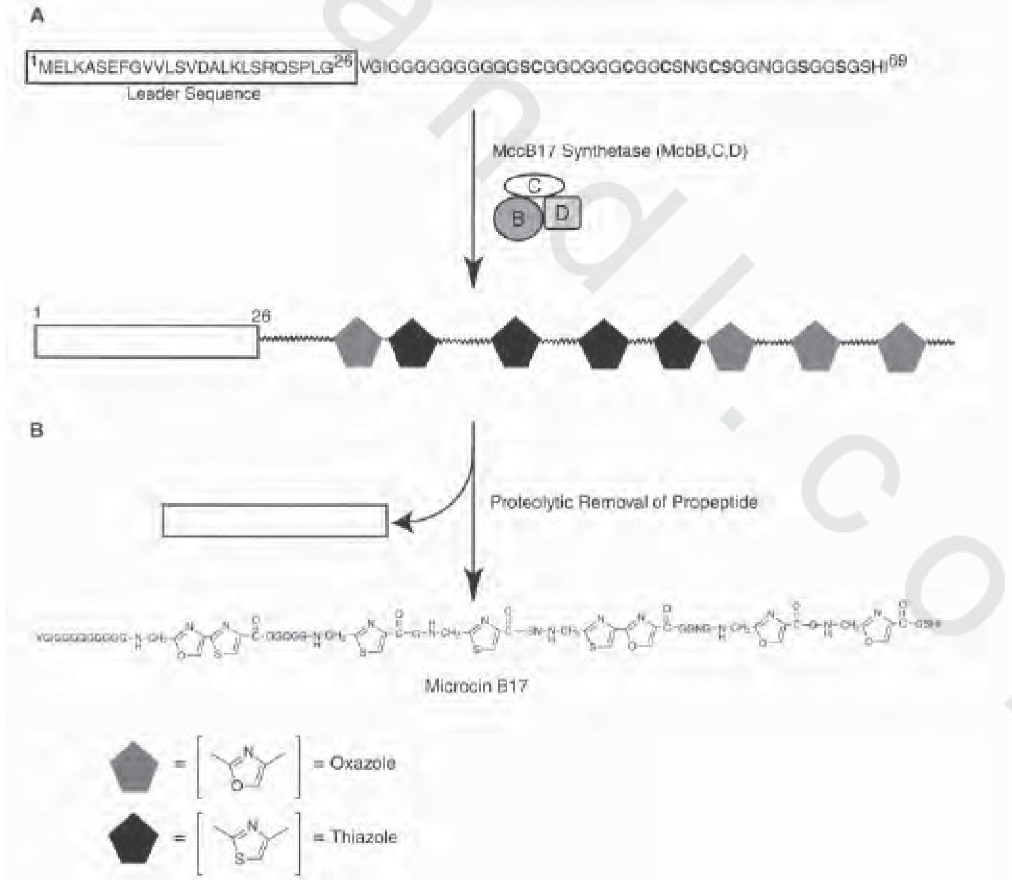
الشكل (١٤,١٣). الجين لإنتاج ميكروسين B17 (microcin B17) والنضوج الإنزيمي للمضاد الحيوي النشط.

النتيجة الكيميائية ليست روابط – تبادلية ثيوإستر ولكن بدلاً عن ذلك التحليق المتغاير (heterocyclization) لـ Ser إلى اوكسازولز (oxazoles) و Cys إلى حلقات ثيازول (thiazole rings) (الشكل ١٤,١٤ A).

obeikandl.com

وهذه خمس الحلقات – الأعضاء، التي تنشأ من مبحث إنزيمات التجفاف التدويري (cyclodehydration enzymology) على شطور البِبْتيد الثنائي Gly-Ser, Gly-Cys ، أو Ser-Cys,Cys-Ser في McbA ، يصلِّب هيكل البِبْتيد ويحمي ميكروسين B17 من الذوبان (التحلل) البروتيني (proteolysis). وبالتحديد، الترادف bis المتغاير الحلقي (tandem bis heterocycles)، المتولد من Ser-Cys المجاور وفضالات Cys-Ser ، ربما تكون المحددات الرئيسة للتفاعل مع دنا–دنا–غيراز DNA-DNA-gyrase لتفلق دنا المزدوج – الخيط (هيدل وآخرون Heddle *et al.*, 2001).

التناظر الإضافي لنضوج لانتيبيوتك هو الانفلاق الحال للبروتين للفضالات ٢٦ الأولى للميكروسين بعد أن يتم إدخال الحلقات المتغايرة الإنزيمية، فإزالة البِبْتيد الطليعة (propeptide) (الشكل ١٤،١٤ B). ومرة ثانية يعدُّ البِبْتيد الطليعة أساسي لحدوث أي تصنيع بواسطة McbB, McbC وMcbD. ومضاد ميكروسين B17 الحيوي الناضج، مع فضالات ١٤ من٤٣ والمعدلة إلى ثمانية حلقات متغايرة، يفرز بعد ذلك بواسطة ماكنة مضخة التصديرMcbE وMcbF، في تناظر (تشابه) واضح لماكنة تصدير بروتين NisEFG. والجين السابع في مشغَل Mcb، *mcbG*، يرمَز الوظيفة المناعية التي لم تحدد بعد التي تحمي الإشريكية القولونية المنتجة من أن تحرم من DNA غيراز الخاص بها.



الشكل (١٤،١٤). النضوج الإنزيمي لميكروسين prepro B17، (A) تكوين حلقة ثيازول واوكسازول المحفزة بواسطة McbB McbC, and McbD ، (B) الإزالة الحالة للبروتين لفضالة–٢٦ لنهاية –N لطليعة البِبْتيد (propeptide).

obeikandl.com

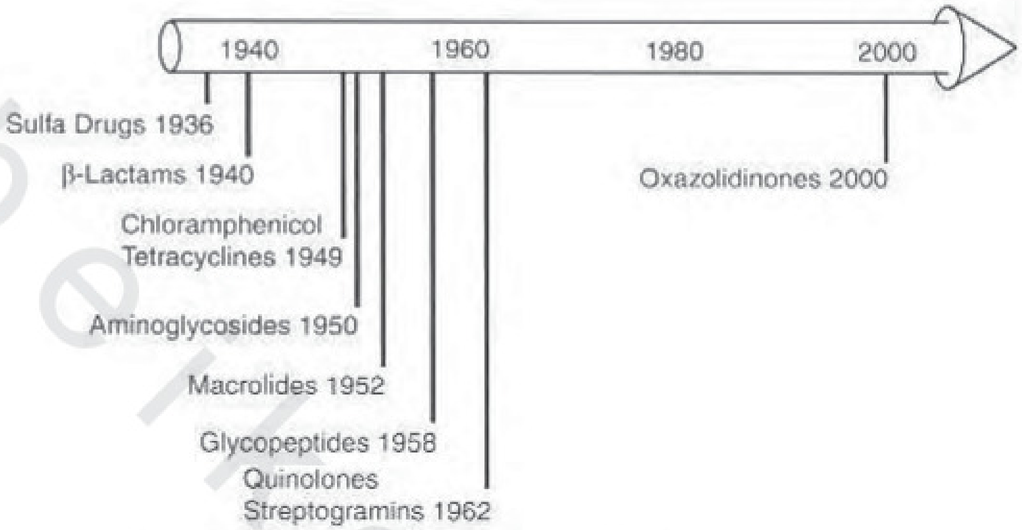
الباب الخامس

الإستراتيجيات الجديدة لإيجاد مضادّات حيوية جديدة وإطالة عمرها الزمني

NEW STRATEGIES FOR FINDING NOVEL ANTIBIOTICS AND EXTENDING THEIR LIFETIMES

عدة إستراتيجيات مطلوبة من أجل التوصل إلى مضادّات حيوية جديدة، وتشمل أصناف تركيبية ووظيفية جديدة للتعامل مع الجمهرة البكتيرية المُمْرضة والمتعدِّدة المقاومة للدواء ولتمديد فترة بقاء المضادّات الحيوية الفعالة في معالجة الإنسان إلى أقصى حد ممكن. وتتناول الفصول الثلاثة الأخيرة من هذه القسم الأخير عديداً من المسائل المعاصرة. من أين تأتي المضادّات الحيوية الجديدة؟ هل بإمكاننا تسريع عملية الاكتشاف؟ وهل بإمكاننا أن نبطئ ظهور سلالات الممرضات السريرية متعدِّدة – المقاومة من البكتيريا المُمْرضة؟ لقد وفرت ثروة المعلومات الجينية الأخيرة فرصة واضحة لتحديد وإثبات صحة الأهداف المضادة البكتيرية الجديدة وتفحص في طرق – إنتاجية عالية في المختبر، في المقايسات المستندة على الخلية، وفي الحيوانات – للجينات التي تعدُّ ضرورية للنمو أو حيوية للفوعية. والبعض من هذه الطرق تم تحليلها في الفصل الخامس عشر.

من الواضح وجود حاجة ملحة لجزيئات جديدة. وأحد المؤشرات هو أن ننظر إلى الوقت لإدخال أصناف جديدة من العوامل المضادة البكتيرية منذ إدخال أدوية السلفا في ١٩٣٦. ولقد كان هناك صنف رئيس جديد واحد فقط الذي أدخل في الأربعين سنة الماضية، أوكسازوليدينون المصطنع، في عام ٢٠٠٠م. والعديد من الطرائق لاكتشاف جزيئات جديدة تمت مناقشتها في الفصل السادس عشر. وأخيراً، هناك اندماج للمخاوف حول المقاومة الفردية وأسلوب الصحة العمومية للمشكلات العالمية بشان انتشار المرض المعدي ومخازن المقاومة. وهذا يسلط الضوء على الحاجة لأساليب مختلفة لحماية ترسانة المضاد الحيوي وتحسين صحة السكان لأقصى حد ضد الأمراض البكتيرية التي تم تناولها في الفصل الختامي.



الجدول الزمني لإدخال أصناف جديدة من المضادّات الحيوية في الممارسة السريرية

obeikandl.com