الفصل السادس عشر

الجزيئات الجديدة
NEW MOLECULES

مع الأهداف الجديدة التي سيتم تحديدها والمصادقة عليها من قبل الجينات البكتيرية، مجموعات الفحوصات التي تسمح بالإنتاجية العالية والتشغيل الآلي، والتعقيد المتزايد لتحليل أصناف منتجات الجين مثل تلك التي تعتبر ضرورية للفوعية والبقاء في الحيوان ولكن ليس للنمو على أطباق التزريع، هناك أدلة على أن درازن (عشرات) إلى مئات الأهداف الجديدة، والعديد من غير المعروف وظيفتها حالياً، سوف تكون متاحة في المستقبل القريب. الفحوصات الآلية العالية الإنتاجية لها القدرة على فحص ما يصل إلى ١٠٠،٠٠٠ مركب في الأسبوع، وهذا جرد نموذجي لملايين المركبات التي يمكن تشغيلها في أقل من ثلاثة أشهر.

الموارد المحدودة لاكتشاف دواء مضاد جرثومي والتطوُّر في هذا السياق ربما تكون المصادر لجزيئات جديدة التي تخدم كضربات أولية كريبطات و/أو مثبطات أهداف بروتين جديدة أو تسلسلات رنا. تاريخياً، لقد كانت المنتجات الطبيعية مصدراً غنياً للمركبات الحيوية النشطة، وبالأخص المضادّات الحيوية، وربما تبقى نقطة الانطلاق، على الرغم من وجود سؤال عما إذا كانت الأصناف الجديدة القيمة من المنتجات الطبيعية، مثل، المضادّات الحيوية الجديدة، لا تزال غير مكتشفة بعد ٥٠ عاماً من جهود عزل المنتج الطبيعي الحصرية . النهج الثاني المهم على مدى العقد الماضي قد كان لصنع مكتبات من المركبات الاصطناعية. وسوف نقوم بتناول موضوع مكتبات المركبات الاصطناعية، ومن ثم نتحول إلى النُهج الجديدة مع المنتجات الطبيعية كمُرشحات للمضادّات الحيوية.

المكتبات الكيميائية والنهج الكيميائي الوراثي

لقد لاحظنا في الفصول السابقة بأن المركبات الاصطناعية كانت مصدر لثلاثة أصناف من المضادّات الحيوية في الاستخدام العلاجي المعاصر: أدوية السلفا، الكوينولونات، و أوكسازوليدينونات. وهناك ما يدعو إلى الاعتقاد بأن الجزيئات الجديدة يمكن أن تصنع لتكون مفيدة ضد أهداف جديدة، التي يكون فيها احتمال المقاومة المستندة

على – الجين السابقة الوجود منخفضة، وبالأخص إذا كانت التراكيب الاصطناعية الجديدة لم تشاهد في الطبيعة. وعلى سبيل المثال، تثبيط الصنف B – لكتامازات – المعدنية بواسطة بايفينيل تترازولات (biphenyltetrazoles) تناسب هذا النموذج.

وأحد النهج لاكتشاف وتطوير المركب الاصطناعي هو باستعمال المعرفة الآلية والهيكلية، مثال، من برامج التراكيب المجينية، لبناء الهندسة المعمارية التي صممت لترسو فوق موضع الربط المتوقع أو المعروف على البروتين المستهدف. والبديل هو اتباع هذه الإستراتيجية في شكل مكتبة، التي تصنع فيها مئات من الجزيئات في مكتبة مُركّزة. وعلى سبيل المثال، لقد اتبع هذا النهج مع مكتبات حلقية غير متجانسة (انظر تشانج وآخرون Chang *et al.*, 1999) التي تهدف إلى الربط مع مواقع أدينين ATP- التي تستخدم الإنزيمات (ATP-utilizing enzymes)، ولاسيما ضد بروتين كينازات، ولكن قابلة للانتساخ إلى أي إنزيم حال لـ ATP مثل دنا غيرازأو Hsp90 البكتيري (الذي شُرح في الفصلين السادس والخامس عشر).

الهدف الأكثر طموحاً هو أن نفترض بأن الصيادلة يمكن أن ينتجوا ما يكفي من المجموعة المعمارية والوظيفية المتنوعة في المكتبات الكبيرة من المركبات الاصطناعية حيث هناك أرجحية معقولة بأن لإيجاد ربيطة لأي بروتين. وإذا كان من الممكن بأن تكون هذه الربيطة الأمثل للخصوصية والفعاليّة بحيث إن واحدة من الممكن أن تقترب من الحد الذي فيه بروتين واحد فقط يمكن أن يثبط في السياق الخلوي، ومن ثم واحدة ستكون قد وصلت إلى إدراك علم الوراثة الكيميائية (chemical genetics). ولقد استخدم تشريبر (Schreiber) المصطلح علم الوراثة الكيميائية لوصف هذا السياق، حيث إن المثبط الكيميائي سيكون له النوعية والقوة لتقييم النظام البيولوجي المعقد لتقييم وظيفة البروتين المستهدف مع القوة المعادلة للطرد الجيني الكلاسيكي للجين المُرمِز. وقد لاحظ تشريبر (Schreiber) لك بأن هذا النوع من الأهداف يقلب مفاهيم الكيمياء الاصطناعية رأساً على عقب ويعيد التركيز من التصنيع المنحى–بالهدف، حيث يتم صنع منتج اصطناعي محدد في سلسلة من الخطوات مصممة للتحكم في المنتج بالتجسمية–والموضعية الكيميائية، على الاصطناع–المنحى المتنوع، حيث أهداف المخطط الاصطناعي هي إنتاج أكبر عدد ممكن من المركبات مع أقصى حد من التنوع.

تمثل الكيمياء الاتحادية هذا النهج وقد أحدثت ثورة في الممارسات في الكيمياء الطبية، وتشمل كيمياء المضاد الحيوي الاصطناعي مع إنتاجية–عالية موازية أو تكنولوجيات "الخلط والتقسيم" (mix and split) لإحداث زيادة هائلة في عدد المركبات العضوية التي يمكن الوصول إليها في فترات زمنية قصيرة .ونوعية المكتبات الكيميائية الاتحادية تعتمد على العديد من الخواص، تشمل إعداد الجزيئات، النقاء والتنوع. والمعلمات الرئيسة بالنسبة لتطبيقات الكيمياء الطبية هي للتوصل إلى منتج بنفس تعقيد – الطبيعي في مكتبة الجزيئات. ويشمل ذلك كل من التحكم في الهندسة المعمارية، الأبعاد الثلاثة، وكثافة المجموعات الوظيفية وبالأخص تلك التي تشبه ربيطات لتفاعلات

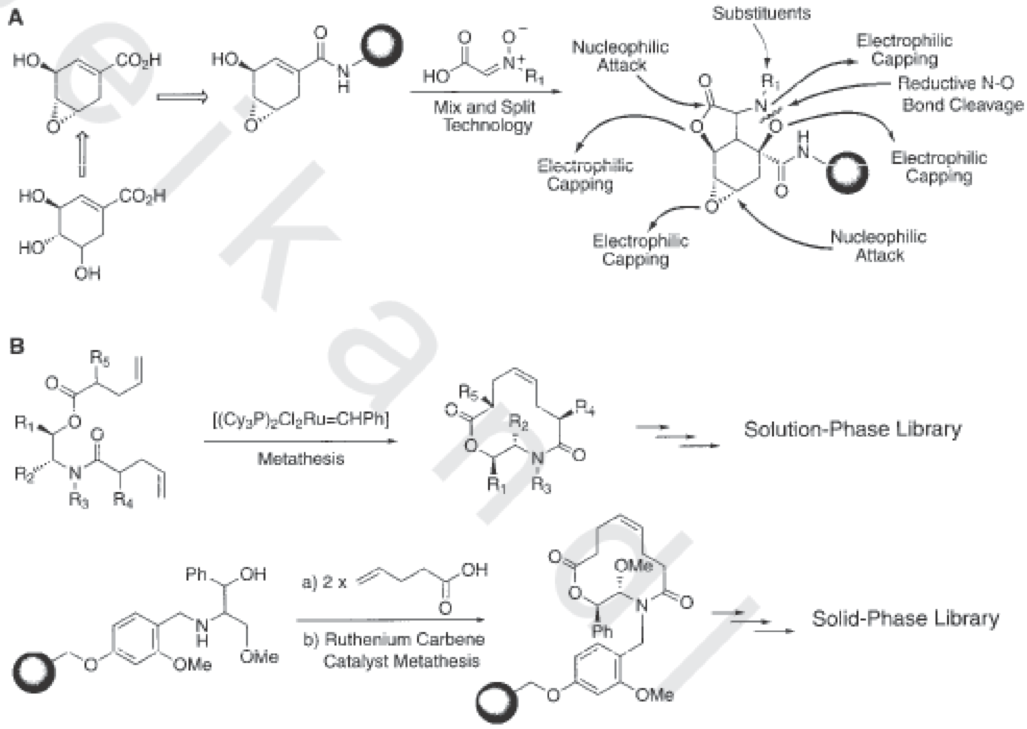
obeikandl.com

أهداف المنتج الطبيعي للبروتين والحمض النووي. في بعض السياقات ربما يرغب أحدهم في صلابة محكمة، تراكيب ثلاثية الأبعاد، بينما لعرقلة تفاعلات البروتين - البروتين أحدهم ربما يرغب في جزيئات مسطحة مع وظائف موزعة. وفي جميع الحالات كلما كان العدد أكبر في عدد الجزيئات المتنوعة في المكتبة كلما كانت احتمالية الضربة الموجبة التي سوف يحصل عليها في أي مقايسة.

تلخص الاستعراضات المؤخرة بواسطة أريا وآخرون (Arya *et al.*, 2001, 2001) بعض النهج المستخدمة لبناء مكتبات متنوعة حول قوالب مختلفة التي تثبت العمارة. وعلى سبيل المثال، أنتجت مجموعة تشريير قالب التراسيكلين لتصنيع المكتبة، بدأً من المنتج الطبيعي حمض شيكميك (shikimic acid) وانتهاءً بمكتبة تقدر بحوالي مليوني عضو (تان وآخرون Tan *et al.*, 1998، تان وآخرون Tan *et al.*, 1999) (الشكل ١٦،١A). والنهج الثاني، أيضاً من مجموعة تشريير (ليي وآخرون Lee *et al.*, 1999)، استعمل إستراتيجيات غلق - حلقة الاستبدال والإحلال (ring-closing metathesis strategies) لإيجاد قوالب حلقية كبيرة (macrocyclic templates) مع تعقيد وتنوع محكم (الشكل ١٦،١B). وفي كل من هذه النهج، قدمت مجموعة وظيفية عالية التنوع في هياكل العمارات والتعقيدات المتميزة . وهذه نذر لأنواع النهج التي من المحتمل أن تولد منتجات بخواص - تشبه الطبيعية في المكتبات الاتحادية الاصطناعية. وبإمكان هذه النهج أن يستخدم التفاعلات المحاكية الحيوية للحصول على منتجات نهائية تقريبية التي تشبه المنتجات الطبيعية ولكن بتنوع كبير في المستبدلات التي لا توجد في الطبيعة. وعلى سبيل المثال، شاير وزملاؤه (Shair and colleagues) (ليندسلي وآخرون Lindsley *et al.*, 2000) وصفوا نهج لسقالات (هياكل) بينزوذانثينون (benzoxanthenone) مثل تلك التي توجد في المنتج الطبيعي كاربانون (carpanone)، ولقد جمَع نيكولو وآخرون (Nicolaou *et al.*, 2000a, 2000b, 2000c) المكتبات الاتحادية للمنتجات التي تشبع - الطبيعية المشتقة من بينزوبيرانات (benzopyrans).

قوائم المكتبات التي بنيت من السقالات الخاصة، مثال، تلك المعروفة بأنها تثبط بروتيازات، كينازات، فوسفتازات، وغيرها من الإنزيمات متوفرة (مثال، دوللي Dolle, 2000)، وبالإمكان اختبار هؤلاء ضد الأمثلة البكتيرية الجديدة. وقد لاحظ دوللي (Dolle) كذلك مكتبات ذات أهمية خاصة للجهود المضادة البكتيرية، وتشمل بعض التي صُممت ضد إرم ر- رنا ميثيل ترانسفيراز Erm rRNA methyltransferases (الفصل العاشر) وضد المضخات المتعدِّدة المقاومة للدواء (الفصل التاسع). ولقد لخص هال وآخرون (Hall *et al.*,2001) الأدبيات عن المكتبات الكيميائية التي بنيت مؤخراً لتحاكي قوالب وهياكل (سقالات) المنتج الطبيعي، وتشمل سيكلوسيرين (cycloserine)، تشالكونات (chalcones)، إيبوثيولون (epothiolone)، وفانكوميسين. جميع المؤشرات تدل على أن مكتبات الكيمياء الاتحادية المركزة ستظل مستعدة. ولقد وصف ترياس (Trias,2001) نهج الكيمياء الاتحادية لتعظيم الاستفادة من النشاط في مرشحات المضاد الحيوي الممتد - المدى أوكساسوليدينون، وكذلك لتحويل فحص المركبات المكتشفة إلى الموجهة لتثبيط ببتيد ديفورميلاز (peptide deformylase) (الفصل الخامس عشر).

ولقد لاحظ ويس وآخرون (Wess *et al.*, 2001) بأن أجيال الموجهات هي فقط نقطة بداية للكيمياء الطبية وحددت عديد من المهام والاختناقات في جهود الكيمياء الطبية في تطوير الدواء التي يمكن تطبيقها لتطوير عوامل مضادة جرثومية جديدة. وعليه، فاكتشاف أهداف جديدة ومركبات مكتشفة للفحص الأولي ضد هذه الأهداف، التي وصفت في هذا الفصل والفصل السابق، بحد ذاتها لن ينتج عنها أدوية جديدة أو تقصير الوقت للموافقة ما لم يؤدي التحسين الأمثل ودورات التطوير القبل السريري والسريري أن يكون كذلك عاجلاً في الوقت والكفاءة.



الشكل (١٦,١). أمثلة على النهج نحو المكتبات المقولبة (A) المكتبات الرباعية االدورية المقولبة، (B) المكتبات الدورية الكبيرة المقولبة. (بالإذن من أريا وآخرون Arya *et al.*,2001).

مكتبات المنتجات الطبيعية عن طريق إستراتيجيات البناء الحيوي الاندماجية

توافر تسلسلات المجينات للعديد من المكروبات التي تنتج منتجات طبيعية بدأت تسمح بالتنبؤ واختبار الجينات التي ترمز إنزيمات المسارات الأيضية للمنتج الطبيعي الثانوي، وبالأخص تلك التي تفيد المعالجة. في الفصلين الثاني عشر والثالث عشر رسمنا الخطوط العريضة للمبادئ العامة لخطوط تجميع البناء الحيوي لبوليكيتيدز (PKs) والببْتيدات غير الريبوسومية (NRPs)، وهذه هي حيث البناء الحيوي الاتحادي قد مورس على نطاق واسع بالفعل في الطبيعة. وسوف نلخص فيما يلي بعض الجهود التي بذلت لإعادة برمجة خطوط التجميع هذه ولتفاعلات الحياكة الإنزيمية لما -بعد خط- التجميع لإيجاد متغيرات جديدة للمنتجات الطبيعية "المنتجات الطبيعية غير طبيعية"

obeikandl.com

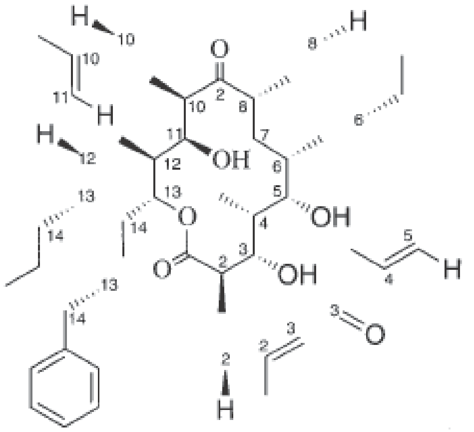
"unnatural natural products". إجراء إعادة البرمجة الاتحادية على نطاق واسع سوف يتطلب أعداداً كبيرة من كتل جين (PKS) polyketide synthase و(NRPS) peptide synthetase غير اليربوسومي، وفهم القواعد للقص واللصق لتحقيق أقصى قدر من الوحدات المنطوية ذاتياً، والطرق السريعة لخلط الجين. ويجري إحراز تقدم في كل من هذه الجبهات الثلاث. وأفاد ستروهل (Strohl., 2001) بأن ١١٥ كتل جينات للبناء الحيوي للمنتج الطبيعي معروفة، وبحوالي النصف تمثل كتل النوع I والنوع PKS II. ومن الكتل الـ ١١٥، ٧٠ كانوا من المتسلسلات. وقد بذلت الجهود لإيجاد تسلسلات مسبار أحادي النيوكليوتيد (oligonucleotide probe sequences) الذي له استفادة عالية لانتساخ كل من كتل جين PKS البكتيري والفطري (نيكولسون وآخرون Nicholson *et al.*, 2001) لزيادة عدد كتل البداية. فقد قُدر ما بين ١٪ من المكروبات في التربة والبيئات المائية ربما تكون قابلة للتزريع في المختبر. ولتجنب فقدان ٩٩٪ من التنوع المكروبي لجينات البناء الحيوي للمضادّات الحيوية، فانتساخ ٥٠- إلى ١٥٠ -kb مدرج من عينات الكائن غير القابل للتزريع قد أحرز تقدماً. تقنيات خلط- دنا (DNA-shffling techniques) لتسريع النشوء الاندماجي بين الكتل قد تم تخفيضها للممارسة، على سبيل المثال، بواسطة الفريق العلمي عند ماكسيجين (Maxygen) (زانج وآخرون Zhang *et al.*, 2002).

البناء الحيوي الاندماجي في البوليكيتيدات

مع توفر كتلة البناء الحيوي لإريثروميسين خلال العقد الماضي، هذا النظام كان العمود الفقري لتطوير وتكرير إعادة البرمجة الجينية للماكينة الإنزيمية، مع التركيز الأولي على خط تجميع الوحدات الفرعية الثلاث ديوكسيإريثرونوليد بي سينثاز (deoxyerythronolide B synthase (DEBS)) (الشكل ١٢,١٦) لإنتاج العضو-١٤ ماكروليد 6-DEB. الطفرات في كل وحدة حفّازة تقريباً (ketosynthase (KS), acyltransferase, ketoreductase, dehydratase, enoylreductase) من الوحدات الفرعية DEBS1,2 و٣ قد تمت هندستها وتحليل تشكيلات المنتج المتغير. (الشكل ١٦,٢) يلخص التغييرات التي نفذت عند المواضع ٢-١٣ من هيكل ماكرولاكتون لـ 6-DEB (كاتز Katz, 1997 : ستروهل Strohl, 2001).

بالإمكان التحكم في حالة الأكسدة لأي بيتا-كربون (*β*-carbon) في أي من دورات الاستطالة، كما يمكن استخدام مالونيل أو ميثيل مالونيل عند أي موقع إمتداد (extender site). ووحدة التحميل قد تم تجاوزها خلال الطفرة لإبطال نشاط حقل KS في حقل التحميل والمغذية الخارجية أسيل داي كيتيد ثيوإسترز (acyl diketide thioesters). ويمكن للمرء أيضاً دمج حقول تجميل مختلفة لتغيير وحدات البداية التي تم إدراجها.

لجعل البداية نحو إعادة البرمجة الاندماجية (الاتحادية)، فقد استعملت مجموعة كوسان للعلوم البيولوجية (Kosan Biosciences) نظام-الثلاث بلازميدات (three-plasmid system) لخلط طفرة واحدة فوق كل من وحدات DEBS الفرعية الثلاث وأفادت عن مكتبة من بعض ٥٠ متغيراً ماكرولاكتون (ملك دانييل وآخرون McDaniel *et al.*, 1999).

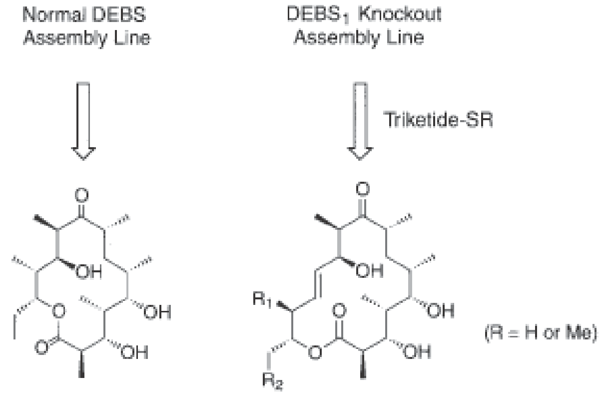


الشكل (١٦,٢). التغييرات التي تمت هندستها في هيكل 6-DEB macrolide. (بالإذن من ستروهل Strohl, 2001).

في حين أن حجم حلقة إريثرونوليد الطبيعي هو ١٤ ذرة، فخط - تجميع تيلوسين لديه وحدة إضافية وينتج ١٦- العضو لاكتون. وقدتم الكشف عن إصدارات العضو — الستة عشرة من هيكل إريثرونوليد في الطفرة المتأتأة (tuttering mutant) من سكارابوليسبورا إريثري *(Saccharapolyspora erythrae)* (ويلكينسون وآخرون Wilkinson *et al.*, 2000) وكذلك بواسطة تغذية كيتيد الثلاثي (ترايكيتيد) (triketide) في مكان دايكيتيد (كيتيد الثنائي) (diketide) إلى وحدة التحميل المعطلة لخط تجميع DEBS (الشكل ١٦,٣) (كينوشيتا وآخرون Kinoshita *et al.*, 2001)، مما يشير إلى تحقيق حجم الحلقة الكبيرة (macro ring size) المتغير عن طريق تحليق حقل ثيوإستر عند نهاية-C للوحدة الفرعية DEBS3 . وبينما نفذت التقنيات بشكل مكثف فقط في نظام DEBS حتى الآن، هناك سبب يدعو إلى الاعتقاد بأن هذه النهج سوف تكون عمومية لإعادة هندسة خطوط تجميع PKS الأخرى، في نماذج اندماجية.

تشمل تفاعلات الحياكة الآحقة على الإريثرونوليد ماكرولاكتون إثنين سيتوكروم النوع- P450 هيدروكسيلازات (P450-type hydroxylases,EryF and EryK) لإدخال هيدروكسيلز عند C_6 و C_{12} و bis glycosylation عند C_3 (مع TDP-L-mycarose) وC_5 (مع TDP-D-desosamine) (انظر الشكل ١٢,١٩). وعديد من سيتوكروم P450 hydroxylases باقية، وربما أن البعض سوف يُضيف عنصر الهيدروجين (hydroxylate) للعضو-١٤ لاكتون مع التغيير الموضعي النوعي. الاحتمالات الاندماجية لارتباط بالغليكوزيل يمكن أن تعمل على مستويين: البناء الحيوي للسكر منزوع الأكسجين TDP-deoxysugar ومن ثم عمل الغليكوزيل ترانسفيرازات (Gtfs). والمسارات من النيوكليوتيد سكر داي فوسفو TDP-glucose إلى TDP-D-desosamine وإلى TDP-L-mycarose معروفة وحددت الإنزيمات المفردة التي تعمل على نزع الأكسجين (deoxygenations) الصافي عند C_6,C_4 و C_2 كما هي التي تقسم (epimerizing) C_5 وتؤمن اختزالياً (reductively aminating) C_3 (انظر الشكل ١٢,٢٠).

obeikandi.com



الشكل (١٦,٣). الطرق لحجم حلقة ماكرولاكتون المتغيرة في خط تجميع DEBS.

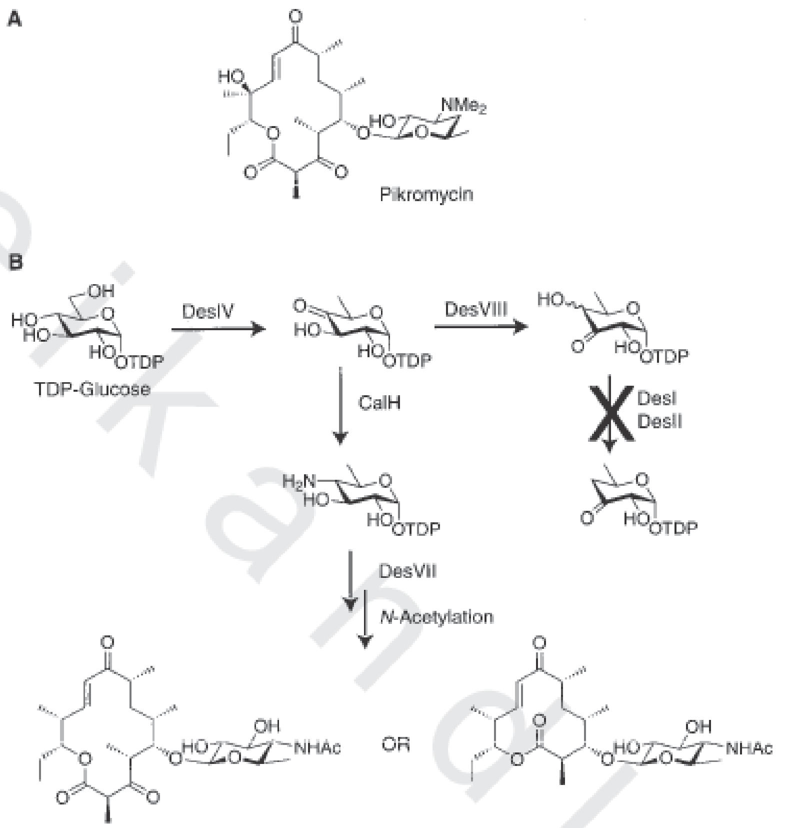
من المحتمل طرد واحد أو أكثر من هذه الجينات واستبدالها بإنزيمات أخرى ومعالجة مسارات TDP-deoxyhexose في المختبر وفي الجسم الحي. وعلى سبيل المثال، في المتسلسلة فينزويلي في مسارات البناء الحيوي لبيكروميسين (pikromycin)، ٣-كيتو ماكروليد المفتقر لمستبدل 3-α-mycarosyl (الشكل A١٦,٤) (انظر إكسو وشيرمان Xue and Sherman, 2001، للمراجعة)، توجد جينات البناء الحيوي لديسوسامين في كتلة PKS.

ولإثبات بأن مسار TDP-desosamine يمكن إعادة برمجته، طرد جين *des I واستبدل بجين calH* من مسار البناء الحيوي كالكياميسين (calicheamycin) (الشكل B١٦,٤) .وهذا تم تمييزه بواسطة إنزيمات المصب، مجموعة أمينو N-acetylated الجديدة (للحماية – الذاتية ؟)، والسكر الجديد المنقول إما إلى C_3 من ماكرروليد الحلقة–١٢ أو إلى C_5 من 3-keto-14-membered macrolide لينتج مضادين حيويين جديدين (زهاو وآخرونZhao *et al*., 1999). وإذا حذف CaIH، بعدها يثبت سكر د–كوينوفوس (D-quinovose sugar) عند C_5 (بوريسوفا وآخرون Borisova *et al*., 1999). وهذه النتائج تمهد الطريق للمعالجة الاندماجية لتراكيب وسيط TDP-deoxysugar. كما أنها أشارت إلى أن DesVII، بيكروميسين غليكوزيل ترانسفيراز (pikromycin glycosyltransferase)، يظهر ما يكفي من الاختلاط الذي سينقل مناظرات سكر ديوكسي من الركائز الطبيعية TDP-hexose. ولقد قام مك دانييل وزملاؤه (تانج ومك دانييل Tang, and McDaniel, 2001، رودريجوز ومك دانييل Rodriguez and McDaniel, 2001) بإعادة بناء مسار البناء الحيوي لـ DTP-desosamine في المضيف غيرا لمتجانس وثبت أن عديداً من المركبات في المكتبة والمبينة في الشكل (١٦,١٢) يمكن بذلك أن تكوَن غليكوزيليتيد لتكتسب نشاط المضاد الحيوي. وكثير من Gtfs من كتل PKS يمكن انتساخها واختبارها للتشويش والتساهل تجاه كل من تراكيب أجليكون ماكروليد، كالمكتبة في الشكل (١٦,٣)، وتجاه المتغير TDP-deoxyhexoses و- aminohexoses.

وباختصار يمكن لأحد في الوقت الحاضر تغيير حجم حلقة ماكروليد، الوحدات المبتدئة لماكروليد، الهوية المستبدلة وحالة الأكسدة تقريباً في كل موقع كربون على الماكروليد، هوية ديوكسي–أمينوهيكسوس، وموضع

obeikandi.com

ارتباط بالغليكوزيل. ومن قبيل هذه الإستراتيجيات الاندماجية من الواجب أن تكون مُتاحة في وقت ما لتوليد مكتبات البناء الحيوي من بضع عشرة من الآلآف من ماكروليدات الجديدة.



الشكل (١٦,٤). المعالجة لمسارات TDP-deoxyhexoses في المتسلسلة فيزويلي، (A) الافتقار إلى شطر ديسوسامين عندما يبقى الموضع–٣ ككيتون في بيكروميسين، (B) استبدال *desI* بواسطة *calH* لتغيير السكريات على هيكل ماكروليد.

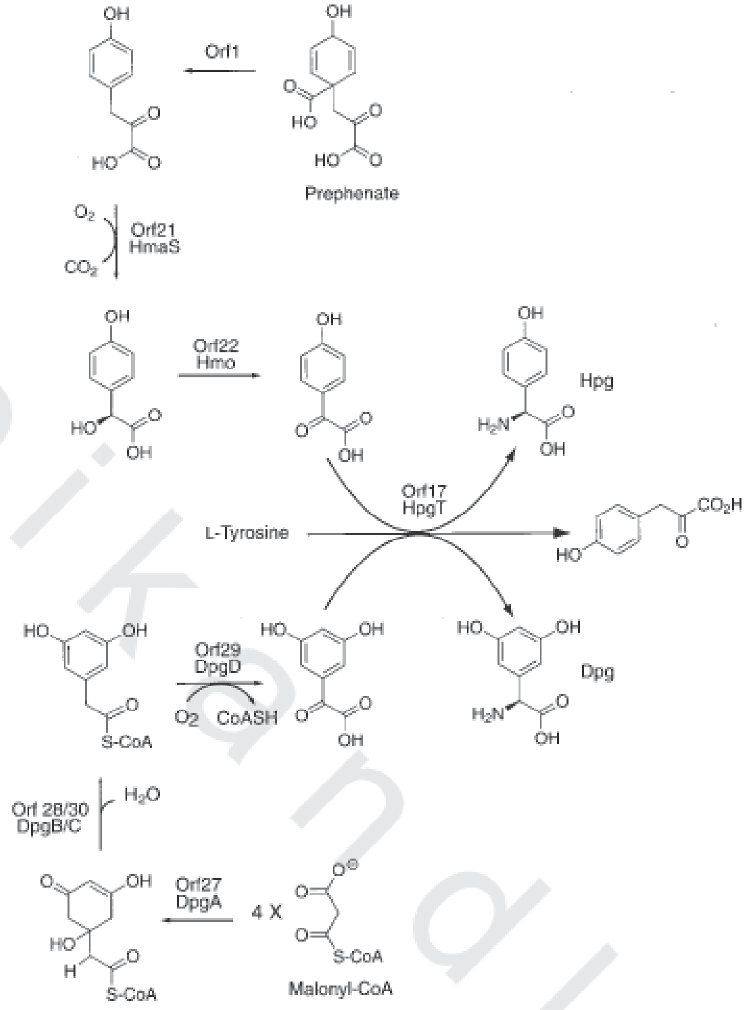
أحد القيود العملية هو الطول الخطي لخطو – تجميع PKS الكبيرة. وحصل أن وُزعت على وحدات فرعية متعدِّدة (مثال، DEBS1,2, and 3). ومن ثم يتوجب على الوحدات الفرعية العثور على بعضها بعضاً والتوجيه للنقل الموجه للسلسلة النامية اتجاهياً بين الوحدات الفرعية. وهذا يمكن أن يكون ذا قيمة في إعادة البرمجة الاندماجية، شريطة أن أحد بإمكانه حل المنطق الذي بواسطته أن تجد الوحدات الفرعية بعضها بعضاً وتصطف. خوسلا وزملاؤه Khosla and colleagues (جوخلي وآخرون Gokhale *et al.*, 1999) قد صنعوا البداية بواسطة اكتشاف وجود المناطق الرابطة للنهاية -C والنهاية -N في الوحدات الفرعية DEBS وإظهار قابليتها للتنقل. وفي حالة تعميم هذه الإستراتيجية، سيكون بالإمكان تشييد مكتبات لوحدات PKS مع روابط مناسبة لتوجيه تفاعل الوحدة–الوحدة وزيادة احتمالية نقل السلسلة الكفؤ والنمو عبر الواجهات للوحدة والوحدة الفرعية في مكتبات الوحدات التي تمت هندستها.

البناء الحيوي الاندماجي في NRPs وفي هجينات NRP-PK

توجد كتل جين NRPS في كل من البكتيريا والفطريات. ولقد تم وصف عشرات التسلسلات ومئات الكتل يرجَح أن تكون متسلسلة في المستقبل القريب، منتجة قوائم الأجزاء لتبادل الوحدات ولاختبار نهج البناء الحيوي الاندماجية لمضادّات البِبْتيد الحيوية الجديدة. واحدة من السمات الجذابة لمنتجات البِبْتيد الطبيعية NRPS هي التنوع الكبير في موحودات الحمض الأميني (وحمض هيدروكسي) التي دُمجت، >100، مقارنة مع الحد ٢٠ للأحماض الأمينية المولدة للبروتين (proteinogenic) في الببتيدات الريبوسومية.

تم العثور على الجينات البنائية الحيوية لموحودات الحمض الأميني غير المولد للبروتين مدفونة (مضمنة) في كتل NRPS، مثل أربعة إنزيمات ٤-OH-فينيل- جليسين (4- OH-phenyl-glycine) وأربعة أطر قراءة مفتوحة أخرى للبناء الحيوي لـ 3,5-$(OH)_2$-phenylglycine (الشكل ١٦،٥) في صنف الفانكوميسين وتيكوبلانين من منتجي غليكوببتيد (هوبارد وآخرون Hubbard *et al*., 2000، هوبارد ووالش Hubbard and Walsh, 2002، فان واجينينجين وآخرون Van Wageningen *et al*., 1998). ويبدو بأن هذه الجينات تحركت ككاسيت (cassette) للكائنات الأخرى التي تصنع هذه الأحماض الأمينية غير العادية، وهذا يقترح إستراتيجية لتصدير قدرة البناء الحيوي هذه إلى أي كتلة. وإذا كانت كاسيتات ترادف الجينات هي القاعدة لبناء الحمض الأميني غير المُولِد للبروتين، فالقابلية لتحريك مثل هذه الكاسيتات سوف تساعد في جهود إعادة البرمجة لخطوط تجميع NRPS.

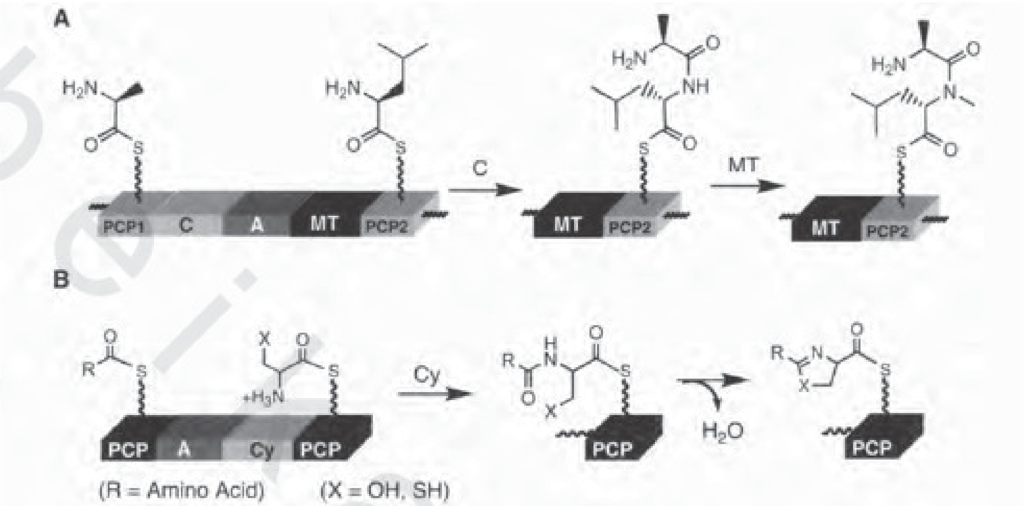
ولقد بدأ ماراهيل وزملاؤه (Marahiel and colleagues) (للمراجعة، انظر دويكيل Doekel وماراهيل ٢٠٠١، كونز Konz وماراهيل Marahie ١٩٩٩) للعمل من خلال القواعد العملية لدمج حقول ووحدات NRPS الحفازة وقد أعادوا إنشاء هجين الأنظمة الثنائية – والثلاثية النموذجية (di-and trimodular systems)، مع مجالات فلق سلسلة ثيوإستيراز (chain-cleaving thioesterase domains) الموضوعة عند خطوط التجميع هذه المعاد إنشاؤها. وهذا النجاح يزيد احتمالية النهج الاندماجي لمبادلة الوحدة، الإدراجات والحذف لزيادة أو التقليل من عدد الأحماض المينية التي تم دمجها في داخل السلسلة النامية وتغيير هويتها عند مواضع محددة. وقد تم فم شفرة منطق الترميز لتميز الحمض الأميني بواسطة أدنلة (adenylation) (A) الحقول لخطوط تجميع NRPS (ستاكيلهوس وآخرون Stachelhaus *et al*., 1999)، سامحاً بإجراء إعادة البرمجة في الموضع. ولخطوط التجميع التي تولد فضالات D-amino acid residues عن طريق حقول فوق التقسيم (epimerization domains)، مثال التكوين (الشكل) D,D,L,D,D,L,L-configuration لفانكوميسين البِبْتيد السباعي أجليكون (vancomycin heptapeptide aglycone)، ومن الممكن تعطيل نشاط حقول إيبيميراز (epimerase) لإدماج التكوين L-or D- configuration عند أي موضع. ومن المفترض بأن حقول التكثيف (C) في مثل خطوط التجميع هذه التي تعتبر مصبات للحقول E أن تكون نوعية (انظر هوبارد ووالش Hubbard and Walsh, 2002). وبالإمكان استخدام هذه في التجميع النموذجي ككواشف عامة لصنع روابط ببتيد D,L-,L,D-,and D,D في إطالات السلسلة.



الشكل (١٦،٥). أربعة كاسيتات – إنزيم للجيل الجديد من موحودات 4-OH-PheGly و3,5-(OH)2-PheGly للبناء الحيوي لفانكوميسين وتيكوبلانين.

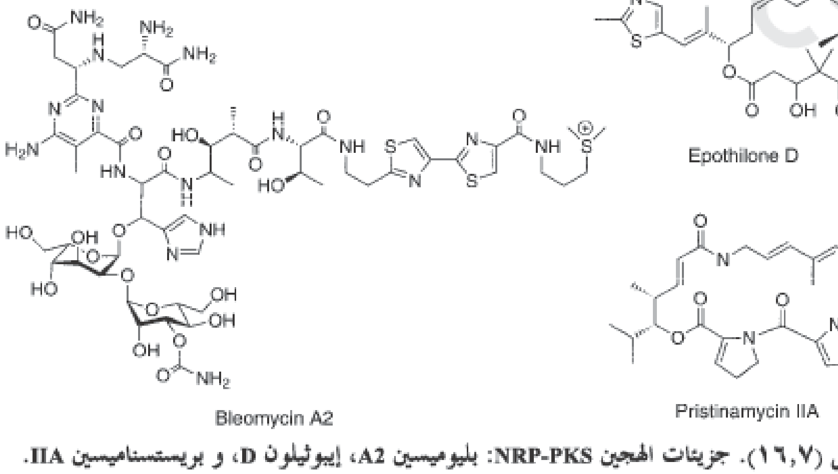
وكما هو الحال في خطوط تجميع PKS، هناك إنزيمات حياكة في خطوط تجميع NRPS، بعضها مدفون في *cis* والبعض يعمل في *trans*. وعلى سبيل المثال، N–ميثيل ترانسفيرازات (N– methyltransferases) (حقول MT) التي تنتج السبعة أحماض الأمينية (N-methyl amino acids) في أنديكابِبْتيد سيكلوسبورين أ الحلقي (cyclic undecapeptide cyclosporine A) توجد في أربعة – حقول (C-A-MT-PCP) (البروتين الحامل لبِبْتيديل) لوحدات الإطالة (الشكل A١٦،٦) مما يشير إلى قابلية نقل تكوين رابط البِبْتيد ونشاط ميثلة —ن N-methylation عند أي موضع NRPS. وبعض من أكثر المنتجات الطبيعية فضول لها خمس – حلقات كبريت وحلقات أكسجين غير المتجانسة، ثيازولات، وأوكسازولات، التي تنشأ من تحليق السلاسل الجانبية لسيستينيل –SH (cysteinyl-SH) و سيريل –OH (seryl-OH) على رابط ببتيد السابق كاربونيل (الشكل B١٦،٦)، الحفَاز عن طريق تحليق حقول (Cy) والتي تعدُّ متغيرات حقول

التكثيف المكونة – لرابط ببتيد (Cy-A-PCP modules). وهذه قد تكون عناصر محمولة في النهج الاندماجي لخطوط تجميع NRPS. إنزيمات الحياكة لجزيئات NRP يمكن أن تكون oxidoreductases ، hydroxylases ، وglycosyltransferases.



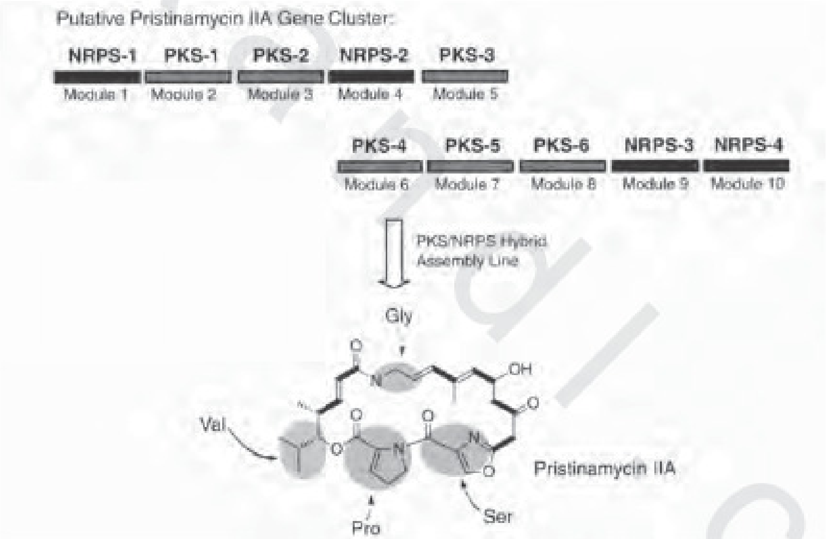
الشكل (١٦,٦). إنزيمات الحياكة المدفونة في *cis* في خطوط تجميع NRPS: (A) N-methyl-transferases، (B) حقول التحليق لصنع حلقات اوكسازولين و ثيازولين.

من بين المنتجات الطبيعية الأكثر فائدة هي هجينات PKs وNRPs وتشمل بليوميسين (bleomycin)، إيبوثيلون (epothilone)، وبريستسناميسين II (الشكل ١٦,٧). حوالي درزينة من خطوط تجميع هجين PKS-NRPS التي قد تم مؤخراً تسلسلها (انظر دويكيل Doekel، وماراهيل Marahiel ٢٠٠١ ، دو وآخرون Du *et al.*, 2001 ، هوبارد ووالش Hubbard and Walsh, 2002)، تظهر المنطق عن كيفية تمازج هذه الوحدات والحقول.



الشكل (١٦,٧). جزيئات الهجين NRP-PKS: بليوميسين A2، إيبوثيلون D، و بريستسناميسين IIA.

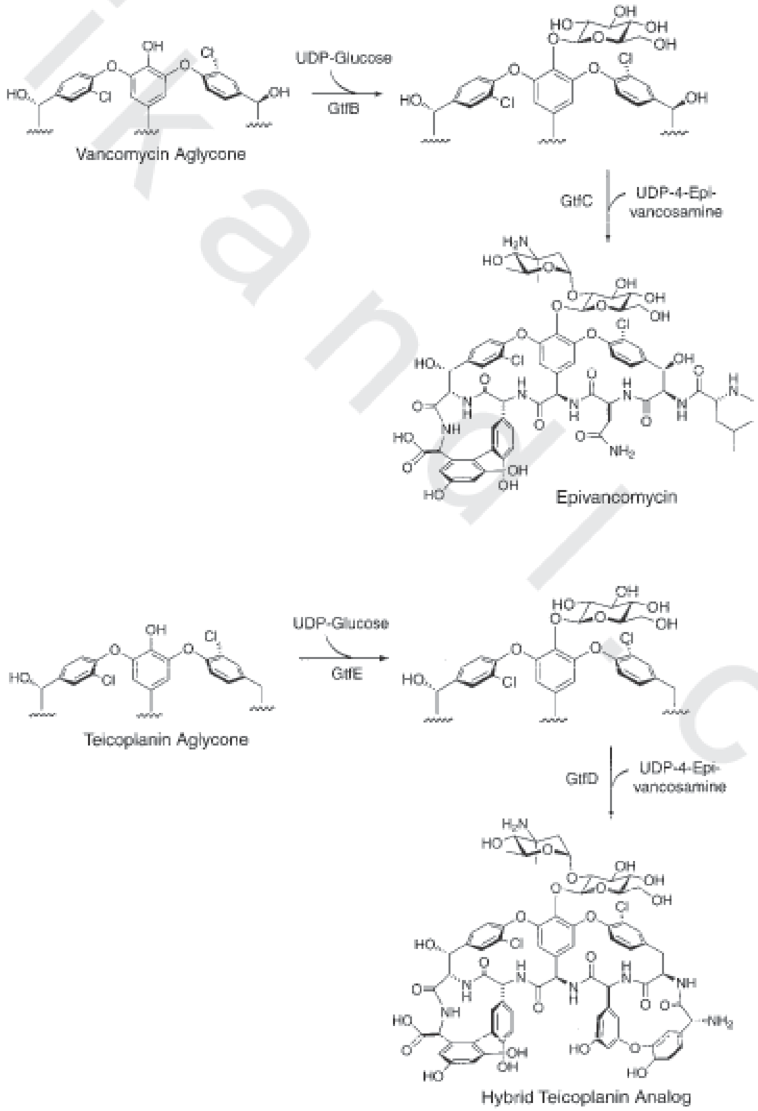
إعادة تكوين السطوح البينية لـ PKS-NRPS قد تم إنجازها بواسطة المركبات النقية في المختبر لتأسيس أنماط التمييز لحقول إطالة – السلسلة KS,C وCy المحفزة (ميللر وآخرون Miller *et al.*, 2002، باتيل ووالش Patel and Walsh, 2001)، كتأسيس للإستراتيجيات الاندماجية التي سوف تصنع تراكيب هجينات PK-NRP-PK جديدة. وعلى سبيل المثال، يعدُّ مركب بريستيناميسين II (الشكل ١٦،٨) من المضاد الحيوي هجين سينيرسيد NRP-PK- NRP-PK hybrid. ويفترض بأن خط التجميع يمتلك ١٠ وحدات لانتقاء الأربعة أحماض الأمينية (Gly,Ser,Pro,Val) وستة (ميثيل) موجودات مالونيل–CoA (الشكل ١٦،٨). وفي ترتيب الوحدة المفترض، سوف ينشط Gly بواسطة الوحدة ٤ والبِبْتيد الثلاثي Ser-Pro-Val tripeptide المتنوق بواسطة الوحدات ٩، ١٠ و١. والقسم الأول PK سوف ينشأ من الوحدات ٢ و ٣. وبعد إدخال جليسين، المط (المد) لأربع وحدات PKS، الوحدات ٥ – ٨، سوف يُجمَع جزء سلسلة PK ذات التسعة – كربون المتقدمة لوحدة البِبْتيد الثلاثي Ser-Pro-Val. وجميع الأربعة وحدات PK- NRP-PK-NRP سوف تستطيع في الأصل أن تُعالج على حدة واندماجياً.



الشكل (١٦،٨). بريستسناميسين II هو منتج لخط التجميع الهجين المفترض من الوحدات NRP-PKS-NRPS-PKS.

وبالتناظر مع مضادّات ماكرولاكتون الحيوية التي ذكرت أعلاه، بعض NRPs كذلك مرتبطة بالهيدروكسيل (hydroxylated) مرتبطة بالغليكوزيل (glycosylated) في خطوات النضوج الإنزيمي في ما بعد – خط – التجميع. وبالإمكان كذلك إجراء النهج نفسه لاختبار النوعية المبدّلة لسيتوكروم P450 hydroxylases والمرحلتين لتغيير مجموعة غليكوزيل، معالجة مسار TDP-deoxyhexose واستبدال غليكوزيل ترانسفيراز و/أو إرخاء النوعية. وعلى سبيل المثال، الإنزيمات في المسار الذي يحول TDP-glucose إلى TDP-L-epivancosamine قد وصفها جميعاً (تشين وآخرون Chen *et al.*, 2000)، وإستراتيجيات الاستبدال أو الحذف كما شرحت أعلاه في نظام بيكروميسين بالإمكان محاولتها

لتغيير هوية السكر. ومن المحتمل بان أحدهم يستطيع أن يستعمل مكتبة TDP-deoxyhexoses وaminohexoses-ومجموعة من إنزيم ناقلة الغليكوزيل (غليكوزيل ترانسفيرازات) (لوسي وآخرون Losey *et al*., 2001، سولينبيرج وآخرون Solenberg *et al*., 1997) لزخرفة مكتبة ببتيد أغليكونات وإيجاد تواليف جديدة. وكمثال، أغليكون من الفانكوميسين قد تم إضافة الغلوكوز له (glycosylated) مع TDP-glucose وبعد ذلك epivancosamine عن طريق اثنين GtfS، واحدة من كتلة فانكوميسين (GtfB) وواحدة من كتلة كلوروإرموميسين (GtfC) (الشكل ١٦،٩) لإنتاج غليكوببتيد إيبيفانكوساميسين غير الطبيعي-L (epivancosamycin). وتعمل نفس Gtfs الاثنين على أجليكون من تيكوبلانين لتنتج نظير تيكوبلانين جديد.



الشكل (١٦،٩). البناء الحيوي الإنزيمي لهجين الغليكوببتيدات في صنف فانكوميسين بواسطة تواليف TDP-sugars ومبادلات غليكوزيل ترانسفيرازات.

obeikandl.com

المُرضات المسبِّبة للمشكلات

- المكورة العنقودية المقاومة للمشسيلين (MRSA).
- المكورة العنقودية الذهبية المقاومة للفانكوميسين (VRSA).
- المكورة البرازية المقاومة للفانكوميسين (VRE).
- المكورة العقدية الرئوية المتعدِّدة المقاومة – للدواء.
- المتفطرة السلبية المتعدِّدة المقاومة – للدواء.
- السالمونيلا المتعدِّدة المقاومة – للدواء (مثال، السالمونيلا من نوع السلالة DT104 المقاومة للأمبيسيلين، كلورامفينيكول ، ستربتوميسين ، سلفوناميدات ، ترايميثوبريم، تتراسيكلين، كاناميسين ، سبروفلوكساسين).

المُمْرضات المسبِّبة للمشكلات. الفحص بالمجهر الإلكتروني للمكورات المعوية المقاومة – للفانكوميسين التي تعرضت للفانكوميسين ، مع إدراج خلية كونترول تامة النمو في مرق تريبتيكيز فول الصويا وحيدة. وحدة بار = 1μm (بالإذن من لوريان وفيرنانديز Lorian and Fernandes, 1997).

obeikandl.com