

المضادات الحيوية التي تعرقل تكرار وترميم الحمض

النويي دنا: الكوينولونات

ANTIBIOTICS THAT BLOCK DNA REPLICATION AND REPAIR: THE QUINOLONES

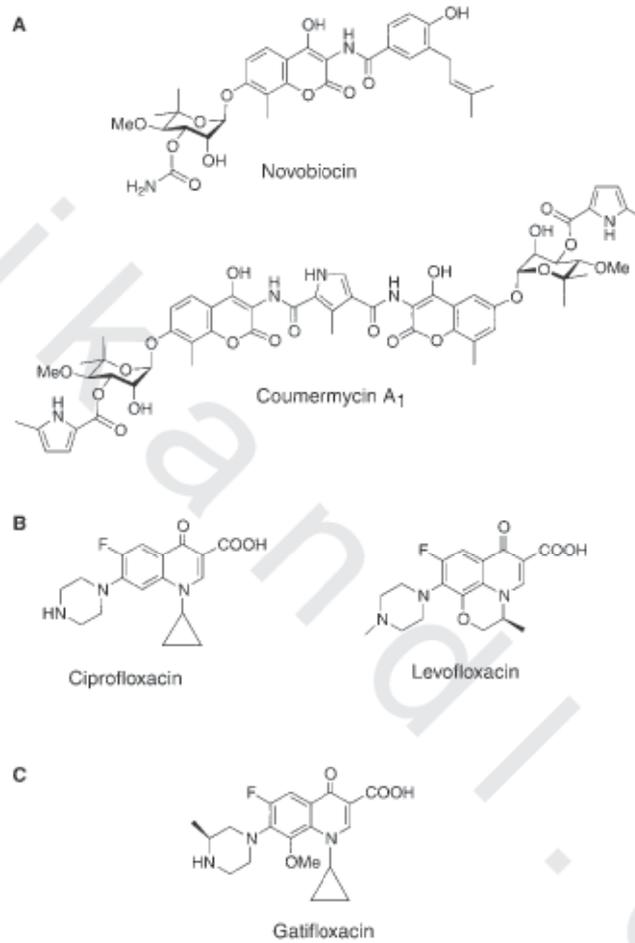
المجموعة الوظيفية الثالثة الكبرى للمضادات الحيوية هي تلك التي تعرقل تكرار (replication) وترميم (repair) الحمض النووي دنا DNA. يسلط الشكل على الصفحة المقابلة الضوء على القسم الفرعي الموافق للشكل (٢.٢) وعلى تثبيط تكوين دنا DNA و RNA بواسطة الأدوية المضادة البكتيرية من صنف الكوينولون (quinolone) وريفاميسين (rifamycin). كما أن صنف الريفاميسين من مضادات عديد الببتيد / وعديد الكيتيد (polyketide) الحيوية تم تناولها في الفصل القادم.

إنزيم دنا غيراز (DNA gyrase) كهدف للكوينولونات (quinolones)

والكومارينات (coumarins)

إن تثبيط تكرار دنا (DNA) وإنزيمات الترميم يبدو هدف منطقي لعمل المضاد البكتيري بواسطة منتجات طبيعية تصنع بواسطة ميكروبات لتقتل جيرانها. وأحد هذه أصناف هذه الجزينات، هو الكومارينات، مُمثلة بواسطة مستقلبات (أيضات) المتسلسلة (streptomycete) مثل نوفوبوسين (novobiocin) و كوميرميسين (coumermycin) (الشكل ٥.١A)، والتي قد تمت دراستها لعدة سنوات وخدمت لتحديد الإنزيمات المسماة دنا النوع II توبوايزوميرازات أو إنزيمات توبوايزوميرازات (موضع التزامر) (DNA type II topoisomerases) وبالأخص دنا غيراز (الجدول ٥.١) كهدف قاتل (ماكسويل 1997 Maxwell). ولكن الصنف من الجزينات المصنعة، وهي فلوروكوينولونات (fluoroquinolones) مُمثلة بليفوفلوكساسين وسبروفلوكساسين (levofloxacin and ciprofloxacin) (الشكل ٥.١B)، والتي قد أصبحت تستعمل بشكل واسع؛ بسبب فعاليتها ضد كل من البكتيريا السالبة والموجبة - لغرام في عداوى الجهاز البولي، التهاب العظام، الالتهاب الرئوي المكتسب من المجتمع والتهاب المعدة والأمعاء (جرينوود 2000 Greenwood، شولار وبرات 2000 Scholar and Pratt). وعلى العموم فإن الجيل الأحدث من

الكوينولونات ، مثال جاتيفلوكساسين (gatifloxacin) (الشكل ٥،١ C)، لها فعالية متزايدة ضد الممرضات الموجبة - لغرام (برونسون وباريت 2001a Bronson and Barrett). ولقد اكتسب السبروفلوكساسين شهرة حديثة أكثر كدواء مصادق عليه من قبل هيئة الغذاء والدواء لقتل العصية الجحمرية (*Bacillus anthracis*) في عداوى الجمرة.



الشكل (٥،١). المضادات الحيوية التي تثبط دنا غيراز وتوبوأيزوميراز IV: (A) مضادات أمينوكومارين الحيوية (aminocoumarin antibiotics)، (B) الكوينولونات (سبروفلوكساسين وليفوفلوكساسين)، و (C) الكوينولونات الجديدة (جاتيفلوكساسين).

تغير إنزيمات دنا توبوأيزوميراز العدد الارتباطي في دنا زائد اللفة (supercoiled) بواسطة عمل قطع مؤقت في ركيزة دنا ومن ثم تمرير ليرتاح وضعياً (بوضع جنيني) من خلال كسر مؤقت، إما خيط واحد في المرة (النوع I) وإما كلا الخيطين في الوقت نفسه (النوع II) (الجدول ٥،١). (للمراجعة انظر ماكسويل 1997 Maxwell، ووانج 1996 Wang). وتعتبر إنزيمات توبوأيزوميرازات أساسية لحياة الخلية في كل من خلايا بدائيات النواة وخلايا سويات النواة، وتعتبر مثبطات الكوينولون من نوع II أيزوميرازات في الخلايا البكتيرية، مضادات بكتيرية قوية ذات انتقائية كافية لتكون

نافعة، بينما مثبطات أيزوميرازات في الإنسان تشمل كامبتوتيسين (camptothecin) وإيتوبوسيد (etoposide)، اللذين يستعملان في المعالجة الكيميائية للسرطان لتقتل خلايا الورم سريعة النمو.

يعتقد أن يكون الإنزيم اللفانفي دنا غيراز مهماً للتحكم في وضعية دنا (topology) في تكرار دنا، التأسيس (recombination)، والانتساخ (transcription)، بينما توبوأيزوميراز (توبو) (topo) IV هو كذلك مشتمل في تكرار دنا ونزع التسلسل (decatenation) من إينة الكروموسومات المرتبطة عند نهاية تكرار دنا البكتيري (بان وفيشر 1997). (Pan and Fisher, 1997).

الجدول (١، ٥). خواص توبوأيزوميرازات للإشريكية القولونية.

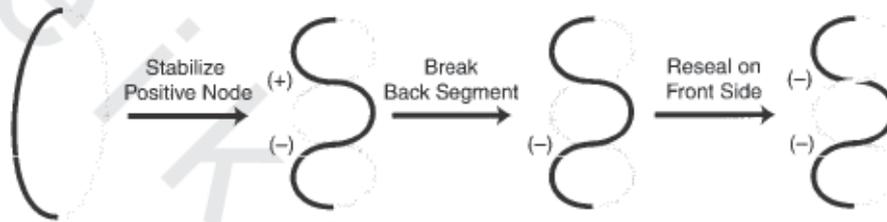
الإنزيم	النوع	جين (جينات)	الوظيفة الأساسية للإنزيم
توبوأيزوميراز I	I	توب أ (<i>top A</i>)	يريح اللفات الزائدة السالبة
توبوأيزوميراز II (دنا غيراز)	II	غير أ (<i>gyr A</i>) غير ب (<i>gyr B</i>)	يدخل لفات زائدة سالبة، ويريح اللفات الزائدة الموجبة
توبوأيزوميراز III	I	توب ب (<i>top B</i>)	ينزع تسلسل وسائط التكرار ومركبات دنا مزدوجة الصيغة الجزئية (dimers) بين الروابط
توبوأيزوميراز IV	II	بار س (<i>par C</i>) بار إي (<i>par E</i>)	ينزع تسلسل دنا، يزيل اللفات الزائدة الموجبة والسالبة

وقد وُجد أن لبعض الكوينولونات انتقائية لتوبو II (دنا غيراز) أكثر من توبو IV في حين أن الكوينولونات الأخرى تظهر عكس السلوك. ومن ناحية أخرى تم اقتراح أن يكون توبو IV الهدف الأولي في سلالات المكورة الذهبية العنقودية، بينما في سلالات المكورة العقديّة الرئوية، يختلف الهدف الأولي بين توبو II وتوبو IV (نج وآخرون 1996). (Ng et al., 1996). وقد قيم تاكي وآخرون (Takei et al., 2001) حديثاً ١٥ من الكوينولونات ضد المكورة العنقودية الذهبية MS5935 وقسم الدواء إلى ثلاثة أصناف. أحد المجموعات (نورفلوكساسين (norfloxacin)، سبروفلوكساسين (ciprofloxacin)، ليفوفلوكساسين (levofloxacin) وغيرها) يبدو أنها تهدف توبو IV تفضيلاً بينما صنف آخر (سبارفلوكساسين (sparfloxacin)، ناديفلوكساسين (nadifloxacin) كان أكثر انتقائية لـ دنا غيراز (توبو II). والمجموعة الثالثة من الكوينولونات (جاتيفلوكساسين (gatifloxacin)، موكسيفلوكساسين (moxifloxacin)، وغيرهم) تهدف توبو II وتوبو IV بالتساوي في السلالات الأبوية والطفرة للمكورة العنقودية الذهبية.

الدورة الحفازة للإنزيم اللفانفي دنا غيراز

إن إنزيم دنا غيراز الذي يوجد في جميع الخلايا البكتيرية هو إنزيم A_2B_2 رباعي الأقسام متغاير (heterotetrameric)، ومشفر (مُرْمَز) بواسطة الوحدات الفرعية جيراً وجير ب (*gyr A* and *gyr B*)، وتوبو IV أيزوميراز

(topo IV isomerase) المشابه المرمز بواسطة جينات بار س وبار إي (*par C and par E*) تتبع نفس الآلية. يُدخل دنا غيراز لفات زائدة سالبة في ركيزة دنا الحلقي ذا الخيط - المزدوج. لاحظ كوزاريللي (Cozzarelli, 1980) المتطلبات الأزمة لهذا الغرس الموضوعي أولاً كالتواء ل دنا لإنتاج قالب ذي عقدة موجبة (الشكل ٥,٢)، وانفلاق الخيط - المزدوج للقطعة الخلفية، مرور الخيط - المزدوج خلال الكسر، ثم إعادة التحام للخيط - المزدوج على الجانب الأمامي. ويعتبر النوع II من الدورة المحفزة ملاحظ ألياً، وأن التركيب الهندسي للتوبوأيزوميرازات معقد بشكل لائق، كما يظهر بواسطة تركيب أشعة - إكس لجزء كبير من خميرة توبو II (بيرجر وآخرون Berger *et al.*, 1996) (الشكل ٥,٣).



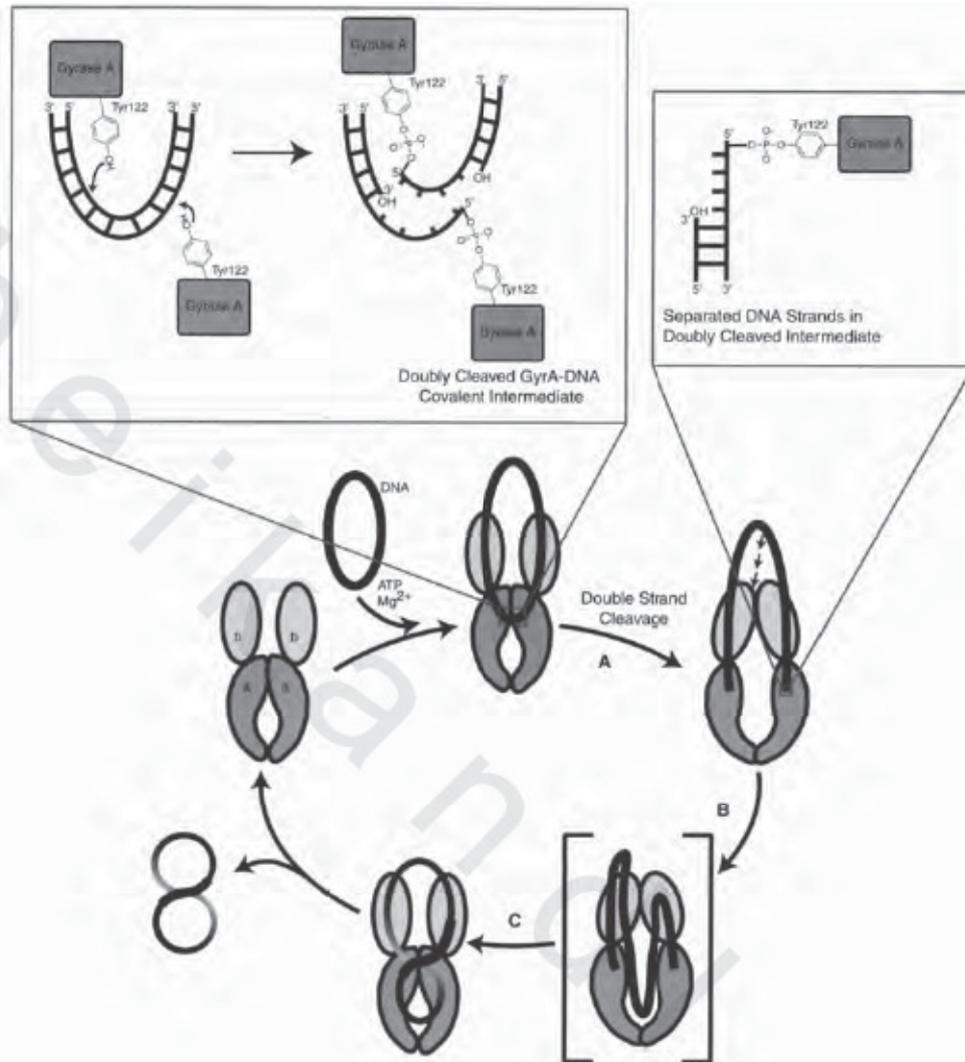
الشكل (٥,٢). نموذج لتكوين اللفة الزائدة بواسطة دنا غيراز البكتيري. (بواسطة كوزاريللي ١٩٨٠).



الشكل (٥,٣). تركيب أشعة إكس للمركب مزدوج الصيغة الجزيئية (الثنوي) الجزء - 92 kDa لحميرة توبوأيزوميراز II (من بيرجر وآخرون Berger *et al.*, 1996).

وبعد ربط دنا مزدوج- الخيط في معقد الإنزيم- الركيزة الأولي (enzyme-substrate (ES))، يهاجم فينوليك هيدروكسيل أليف النواة (nucleophilic phenolic hydroxyl) لتير ٢٢ (Tyr₂₂) (ترقيم الإشريكية القولونية) على واحد من اثنين من الوحدات الفرعية GyrA ويهاجم الرابط داخل رابطة إنترنيوكليوتيد ثنائي إستر الفوسفات (internucleotide phosphodiester bond) على أحد خيوط دنا، ليفلق ذلك الخيط لينتج نهاية النهاية OH-3' الحرة، ويمسك نهاية 5' كوسيط دنا- فوسفوتيروسيل وسيط تساهمي (DNA-phosphotyrosyl covalent intermediate) (الشكل ٥.٤ A). وفي هذه الأثناء، يهاجم Tyr المكافئ في الوحدة الفرعية الثانية GyrA، رابطة إنترنيوكليوتيد ثنائي إستر الفوسفات على أربعة نيوكليوتيدات من الخيط الآخر لدنا في أسفل التيار ليكمل كسر الخيط-المزدوج ويصنع الإنزيم الوسيط الثاني DNA-5'-P-tyrosyl على الخيط المكمل. وذلك يكمل خطوة انفلاق دنا وينتج نهايتان دنا 3' حرة، ما تزالا تقترن قاعدياً في مكان آخر في اللفة المزدوجة، ونهايتان DNA 5'-GyrA متشكلة تساهمياً. ولفجوة الخيط-المزدوج ٤ قواعد بارزة، ولكن من المحتمل وجود عد لف موضعي وتوسيع للفقوة، ربما يتم بواسطة التغيير البنوي في الإنزيم - كسر دنا الوسيط التساهمي لتعريض الفقوة بحيث إن الإنزيم يستطيع الآن أن يوافق مرور اللفة المزدوجة ذات العرض 20-Å (الشكل ٥.٤ B) خلال الفقوة ليؤثر على الاسترخاء الموضعي (topological relaxation).

توجد منطقة بوابة لدنا في خميرة إنزيم توبو II التي أيدت النموذج المشار إليه في مرور الخيط-المزدوج. ومن الواضح أنه يجب أن يكون هناك تغييرات كبيرة في بنية كل من الإنزيمين وتميرير دنا عند عدة مراحل في الدورة المحفزة. وعند هذه النقطة يجب على الإنزيم أن يرمم ذاتياً كسور الخيط-المزدوج، ويعيد تربيط كسر دنا. وبالإمكان إنجاز ذلك بنشاط متشابه بواسطة جعل كل من النهايات 3'-OH لخيوط دنا تهاجم إنزيم 5'-P-Tyr₁₂₂ على كل وحدة GyrA فرعية، وتوليد فوسفورين الخموس المساهم المقرب (pentacovalent phosphorane adduct) ومن ثم إخراج تير_{١٢٢}-فينوليت (Tyr₁₂₂-phenolate) تاركاً المجموعة لإعادة تربيط كل خيط. وهذا هو معقد ناتج-الإنزيم (E.P)، والخيط-المزدوج- دنا السليم، المسترخي يستطيع التفكك أو الدخول في دورة محفزة أخرى من إنقاص رقم الربط الوضعي: كسور الخيط-المزدوج، مرور دنا خلال الفقوة وسيط الركيزة- الإنزيم التساهمي، يتبعها تربيط الخيط-المزدوج. يتميز دنا غيراز عن توبو IV والأنواع الأخرى من II توبوأيروميرازات بأن له القدرة على دفع التكافؤ في الاتجاه الآخر، ليس للاسترخاء ولكن للالتفاف الشديد، بواسطة استعمال انفلاق دنا إلى ADP و P_i كقوة حرارية حركية دافعة (ماكسويل، ١٩٩٧).



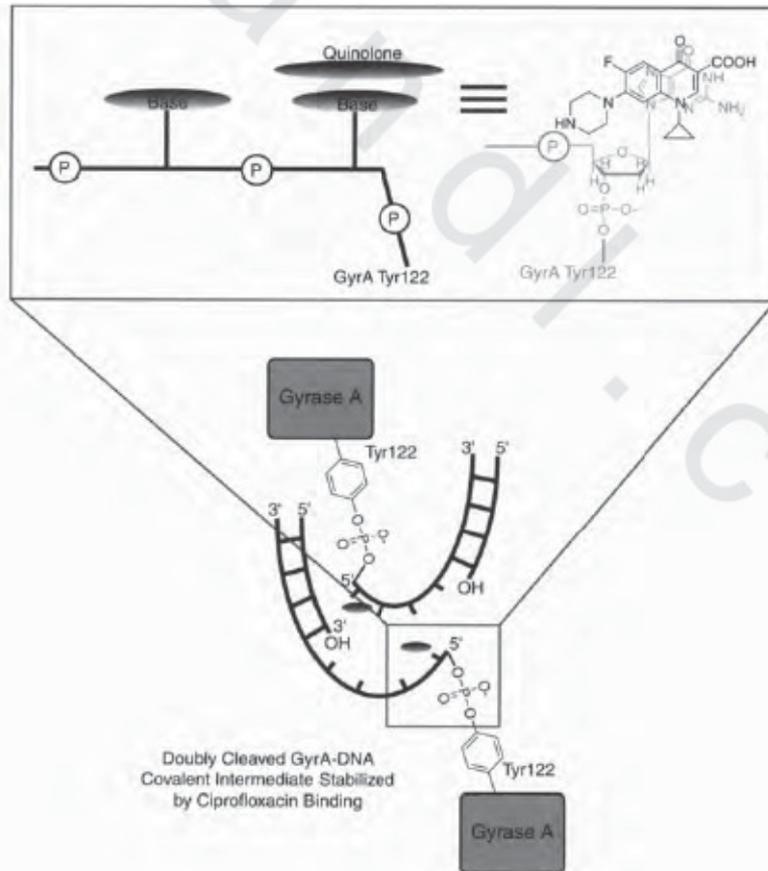
الشكل (٤، ٥). رسم لآلية دنا غيراز: (A) إنفلاق الخيط - المزدوج دنا وتكوين الإنزيم المزدوج التساهمي، (B) مرور الخيط - المزدوج لعدد ربط أقل، و (C) إعادة تريبط للـ دنا المزدوج الكسر.

آلية عمل مضادات الكوينولون المضادة البكتيرية

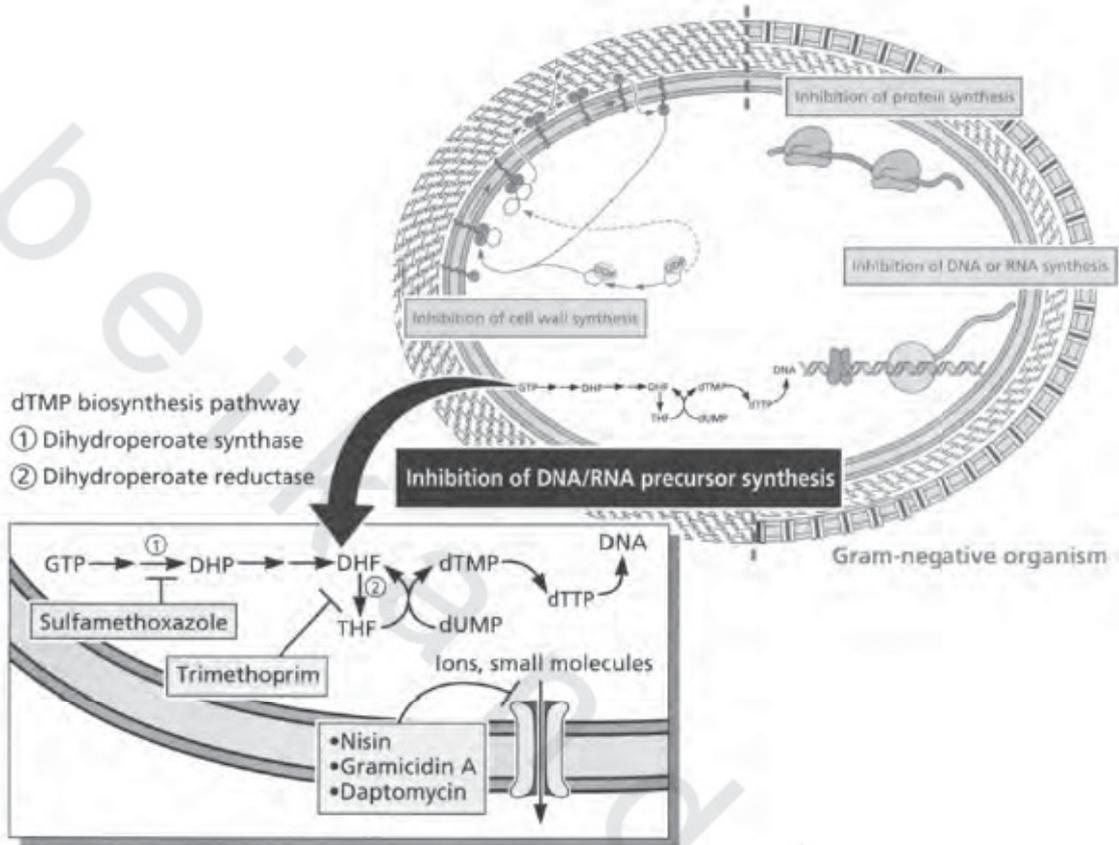
لقد تم صنع الآلاف من مضادات الفلوروكوينولونات حول لب النواة المستوى الحلقي المتغاير (planar heterocyclic nucleus) الذي يكسب العائلة اسمها (ولفسون وهوبر 1989, Wolfson and Hooper). وقد بينت التحاليل المكثفة أن الكوينولونات يؤثر على توازن انفلاق/وتريبط الخيط - المزدوج في الدورات الحفّازة للغيراز وتوبو IV، حيث يتراكم المعقد المنفلق. يُمنع الوسيط المكافئ DNA-5'-P-Tyr₁₂₂ الموجود على كل وحدة فرعية Gyra من إعادة التريبط القابل للعكس في وجود الكوينولونات. كما توجد توقعات حول هل يُسرّع الكوينولونات خطوة الانفلاق - المزدوج للـ دنا المرتبط أو أنه يبطئ انتقائياً خطوة إعادة التريبط - المزدوج، بدون دليل واضح ومحدد لأي من التفسيرات. إن الآلية عن

كيفية تحفيز الكوينولونات لتراكم وسيط الإنزيم دنا التساهمي - مزدوج الكسر ما تزال غامضة. وتوجد نقاط ساخنة على كل من الوحدات الفرعية *GyrA*, *GyrB* التي المقاومة للكوينولونات، مما يفترض تفاعل إنزيم كلا الوحدات الفرعية مع الدواء المرتبط، ومن المحتمل أن الكوينولونات تتفاعل كذلك مع دنا المنفلق. كما أن التوقعات متقدمة حول كل من تكديس -القاعدة للحلقة المتغايرة للكوينولون المستوي والتعقيد المتواسط بالمغنيسيوم (Mg^{2+}) مع واحد أو أكثر من مجموعات فوسفات دنا، إضافة إلى فكرة أن حلقة الكوينولون تُقحم عند نهاية 3' end في كسر دنا في المكان الذي تم إخلاؤه بواسطة الجزء 5' المستبدل لكسر دنا (الشكل ٥,٥). وقد يكون تحليل أشعة -إكس للكوينولون- الإنزيم - وسيط - دنا المنفلق الطريقة الوحيدة لحل هذا الغموض وتغيير تصميم دواء الكوينولون لمستوى جديد.

وبمجرد تراكم كوينولون - غيراز التساهمي - وسيط كسر دنا - المزدوج، يعتقد بأن فعل القتل يكون من التأثير أسفل التيار لهذه العرقلة على تقدم تكرار تفرعات دنا التي أوقفت بذلك (ماكسويل، ١٩٩٧). وربما أن آلية ترميم دنا قد جُهزت، والمحاولات للوصول للإنقاذ- تفشل باستمرار كوينولون المعاند - غيراز المثبت - وسيط دنا. وقد يكون ذلك الإشارة المحفزة بالكوينولونات التي تأذن بالعملية التي تؤدي إلى القتل السريع للبكتيريا.



الشكل (٥,٥). الآلية المحتملة لتكوين قاعدة الكوينولون لتثبيت وسيط الإنزيم المكافئ مع كسور دنا المزدوج - الخيط.



أهداف أخرى مصادقة للأدوية المضادة البكتيرية