

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ ПО ИЗЫСКАНИЮ НОВЫХ АНТИБИОТИКОВ
имени Г.Ф. Гаузе»
(ФГБНУ «НИИНА»)

Лаборатория химического изучения
биологически активных соединений микробного происхождения

Реферат

по дисциплине:

«Биотехнология с основами биофармацевтики»

на тему:

«Нерибосомальные пептиды»

Выполнил(а): Баранова А.А.

Аспирант: 1 год обучения

Руководитель: в.н.с., д.б.н.

 Садыкова В.С.

Москва 2016г.

Содержание

Введение	2
Механизм биосинтеза нерибосомальных пептидов	3
<i>Пример линии сборки нерибосомального пептида</i>	<i>5</i>
Биологическая активность нерибосомальных пептидов	6
<i>Механизм действия антимикробных пептидов</i>	<i>6</i>
<i>Примеры антимикробных пептидов</i>	<i>7</i>
<i>Биосинтез пенициллина</i>	<i>11</i>
Заключение.....	13
Список литературы	14

Введение

Широкое и в некоторых случаях неконтролируемое применение антибиотиков в последние десятилетия привело к развитию у патогенных микроорганизмов устойчивости практически к любому антибиотику. Тем самым, стремительный рост числа вводимых в клиническую практику структурно новых антибиотиков, который наблюдался в середине прошлого столетия, сменился длительным инновационным кризисом, который продолжается и сегодня. Новым классом природных антибиотиков, которые могут прийти на смену традиционным препаратам, являются так называемые нерибосомальные антимикробные пептиды.

Способность синтезировать нерибосомальные биологически активные пептиды, широко распространена среди микроорганизмов. Они находят применение и в современной медицине. Как спектр биологических активностей широким является так же структурное разнообразие этих пептидов. Которые в основном представляют собой циклические или разветвленные циклические соединения, содержащие непротеиногенные аминокислоты, малые гетероциклические кольца и другие необычные структуры в пептидной цепи.

Они синтезируются мультимодульными ферментами, так называемыми нерибосомными пептидными синтетазами (НРПС).

Механизм биосинтеза нерибосомальных пептидов

Известно, что антимикробные пептиды образуются в организме путем как рибосомального, так и нерибосомального синтеза, а также установлено, что биоконтролирующие грибы и бактерии, реализуют оба этих пути и продуцируют широкий спектр линейных и циклических пептидов.

Нерибосомальный пептидный синтез осуществляют так называемые нерибосомные пептид синтетазы (НРПС), являющиеся гигантскими многодоменными ферментами, которые катализируют биосинтез многих коммерчески важных пептидов, бактериями и грибами. Они организованы по модульному принципу мульти-ферментных комплексов, которые представляют собой одновременно и шаблон и машину для биосинтеза.

Пептид синтетазы проявляют модульную организацию, представляющую серию функциональных единиц, которые могут связывать «голые» аминокислоты и присоединять их к растущей пептидной цепочке. Другими словами, модуль представляет собой секцию полипептидной цепи НРПС, который отвечает за включение одной аминокислоты в конечный продукт. Модули могут быть разделены на домены, которые представляют собой ферментативные единицы, катализирующие отдельные стадии синтеза нерибосомных пептидов

Важное значение для синтеза пептидной цепи имеют три домена:

- Домен для распознавания субстрата и активации (аденилирующий домен по всей видимости, является главным фактором, определяющим селективность субстрата в НРПС [5])
- Домен транспортировки в соответствующие каталитические центры (пептидил переносающий белок)
- Домен формирования пептидной связи (конденсирующий домен)

Четвертый существенный НРПС каталитический блок, связанный с выпуском продукта является домен тиюэстеразы. Домен тиюэстеразы находится в модуле терминации и катализирует высвобождения пептида либо гидролизом, либо макроциклизацией. В дополнение к вспомогательным относятся домены эпимеризации, N-метилования, гетероциклизации, формилирования и окисления.

Домены могут быть идентифицированы на уровне белка по характерным, высоко консервативным последовательностям. В некоторых случаях можно было бы проверить причастность высоко консервативных остатков к функциям домена по биохимическим и структурным данным.

Таким образом, соответствующие домены являются неотъемлемой частью каждого модуля НРПС [4].

При линейных НРПС, последовательности модулей действуют как матрицы, которые и определяют конечные последовательности пептидов. Но существуют также повторяющиеся и нелинейные конфигурации НРПС, которые генерируют более сложные структуры.

Большинство НРПС модификаций являются переформированными во время синтеза или за счет сборки линейных компонентов, или внешними белками. Другие модификации могут быть добавлены после синтеза. Некоторые синтетазы являются мультимерными комплексами, тогда как другие являются одиночными, массивными белками. Каждый модуль состоит примерно из 1,000-1,200 аминокислот, это делает энзимы «ненормальными»: одиночный в 15,281-остатков (1.7 MDa) белок, например синтезирует циклоспорин, иммуносупрессант в 11-остатков длиной [2].

Идентичность и порядок модуля в сборочном конвейере определяют:

- 1) последовательность мономерных звеньев, активированных и включенных;
- 2) химия, которая происходит в сборочном конвейере;
- 3) длина и функциональность продукта выпущены от дистального конца сборочного конвейера.

Пример линии сборки нерибосомального пептида

Аминокислоты активируются аденилирующим (A) доменом и переносятся пептидил-переносящим домен (PCP). Пептидная связь образуется благодаря домену конденсации (C). Аминокислоты могут быть модифицированы, например, путем эпимеризации (E) домена. Выпуск конечного продукта обычно катализируется доменом тиюэстеразы (TE) гидролизом или макроциклизацией. Число модулей и модификации доменов могут быть самыми разными.

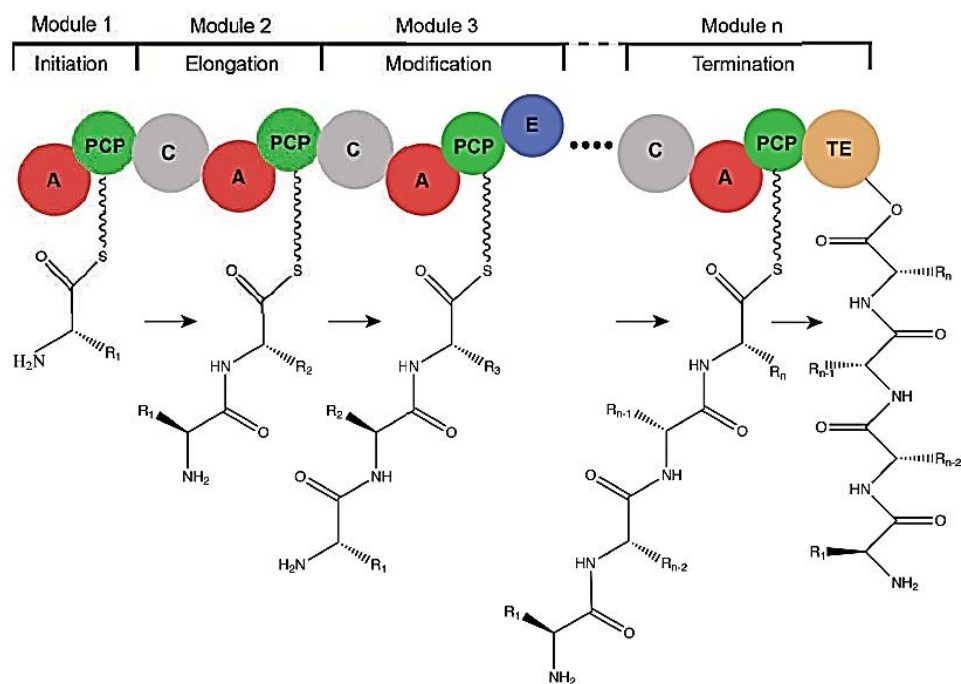


Рисунок 5. – Пример линии сборки нерибосомального пептида.

Биологическая активность нерибосомальных пептидов

Нерибосомальные пептиды как вторичные метаболиты проявляют широкий спектр биологической активности, начиная от антимикробной и заканчивая противоопухолевой.

В зависимости от структурных особенностей, антимикробные пептиды микроорганизмов (АМПО) подразделяют на пептаболы, бактериоцины, дефензины грибов, циклопептиды и псевдопептиды [1,3]

Механизм действия антимикробных пептидов

Антимикробные пептиды действуют как на грам-отрицательные так и на грам-положительные бактерии, а также на грибы, вирусы, простейшие. Кроме того они проявляют антимикробную активность в отношении штаммов бактерий, устойчивых к антибиотикам.

Антимикробные пептиды действуют на заряженную отрицательно внешнюю мембрану грам-отрицательных бактерий. На поверхности этой мембраны находятся Mg^{2+} , которые нейтрализуют отрицательный заряд на поверхности мембраны. Антимикробные пептиды вытесняют эти ионы и либо прочно связываются с отрицательно заряженным липополисахаридом, либо нейтрализуют отрицательный заряд на поверхности мембраны, нарушая её структуру проникают внутрь периплазматического пространства.

Цитоплазматическая мембрана бактерий также заряжена отрицательно. Антимикробные пептиды могут встраиваться в цитоплазматическую мембрану и менять свою конформацию образуя такие структуры, как каналы, нарушающие целостность клетки. Кроме того, проникая в цитоплазму бактерии или другого паразита антимикробные пептиды, будучи заряжены положительно, связываются с клеточными полианионами (такими как ДНК и

РНК) что также приводит к гибели бактериальной клетки. Кроме того среди существующих моделей действия на микробную клетку антибактериальных пептидов есть и так называемая ковровая модель. Положительно заряженные молекулы пептидов как бы выстилают отрицательно заряженную мембрану бактерии образуя молекулярный ковёр. Когда вся поверхность бактерии занята пептидами, её мембрана начинает разрываться на куски [6].

Примеры антимикробных пептидов

- Антибиотики
 - Актиномицин
 - Бацитрацин
 - Ванкомицин
 - Грамицидин
- Цитостатики
 - Эпотилон
 - Блеомицин
- Иммуносупрессоры
 - Циклоспорин
- Сидефоры
 - Энтеробактин
 - Миксочелин
- Красители
 - Индигодин
- Токсины
 - Микроцистины
 - Нодуларины, цианотоксины цианобактерий
- Фитотоксины

Отдельные структуры некоторых полученных нерибосомально пептидов показаны на рисунках 1-3. Их структуры разнообразны и сфера деятельности огромна.

Ванкомицин — антибиотик из группы трициклических гликопептидов, выделенный из *Amycolatopsis orientalis*.

Механизм бактерицидного действия обусловлен ингибированием биосинтеза клеточной стенки. Кроме того, ванкомицин может изменять проницаемость клеточной мембраны бактерий и изменять синтез РНК. Перекрёстная устойчивость между ванкомицином и антибиотиками других классов отсутствует. *In vitro* ванкомицин активен в отношении грамположительных микроорганизмов, включая *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus epidermidis* (включая гетерогенные метициллин-устойчивые штаммы), *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* (включая пенициллин-устойчивые штаммы), *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus viridans*, *Streptococcus bovis* и *Enterococcus spp.* (*Enterococcus faecalis*); *Clostridium difficile* (в том числе штаммы, вызывающие псевдомембранозный энтероколит), *Corynebacterium diphtheriae*. К другим микроорганизмам, которые чувствительны к ванкомицину *in vitro* относятся *Listeria monocytogenes*, роды бактерий *Lactobacillus*, *Actinomyces*, *Clostridium spp.* и *Bacillus spp.* *In vitro* некоторые изолированные штаммы энтерококков и стафилококков проявляют устойчивость к ванкомицину.

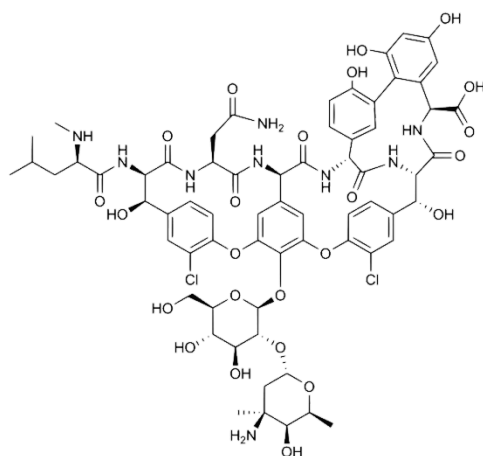


Рисунок 1. – Структурная формула антибиотического препарата Ванкомицина.

Блеомицин — цитостатический препарат, гликопептидный антибиотик, синтезируемый бактериями *Streptomyces verticillus*.

Механизм действия связан со способностью вызывать фрагментацию молекул ДНК. Обладает слабо выраженной миелодепрессивной и иммунодепрессивной активностью.

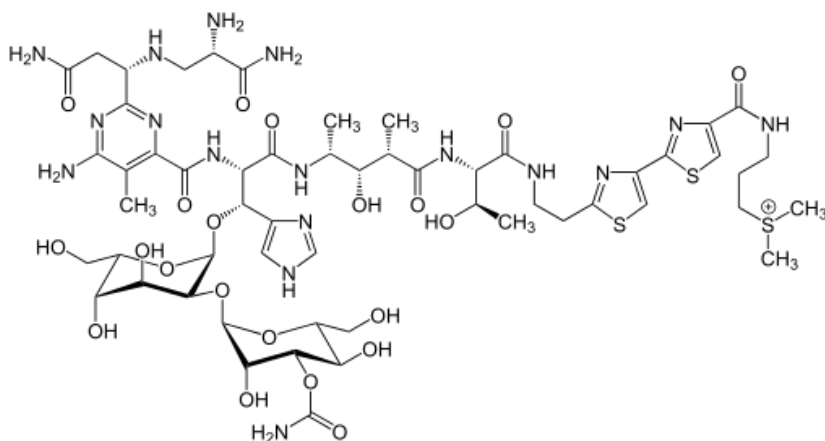


Рисунок 2. – Структурная формула антибиотического препарата Блеомицина.

Циклоспорин — лекарственное средство, мощный иммунодепрессант, селективно действующий на Т-лимфоциты. Представляет собой циклический нерибосомный полипептид, состоящий из 11 аминокислот, продуцируется почвенными грибами вида *Beauveria nivea*

Циклоспорин является сильнодействующим иммуносупрессивным препаратом, который у животных увеличивает время жизни аллогенных трансплантатов кожи, сердца, почек, поджелудочной железы, костного мозга, тонкой кишки, лёгких. Циклоспорин подавляет развитие клеточных реакций в отношении аллотрансплантата, реакции гиперчувствительности замедленного типа, экспериментального аллергического энцефаломиелита, артрита, обусловленного адьювантом Фройнда, болезнь «трансплантат против хозяина» (БТПХ) и зависимое от Т-лимфоцитов образование антител. На клеточном уровне он подавляет образование и высвобождение лимфокинов, включая интерлейкин 2 (фактор роста Т-лимфоцитов).

Циклоспорин блокирует лимфоциты в состоянии покоя в фазе G0 или G1 клеточного цикла и подавляет антиген-зависимое высвобождение лимфокинов активированными Т-лимфоцитами. Все полученные данные свидетельствуют, что циклоспорин действует на лимфоциты специфично и обратимо. В отличие от цитостатиков, он не подавляет гемопоэз и не влияет на функцию фагоцитов [7].

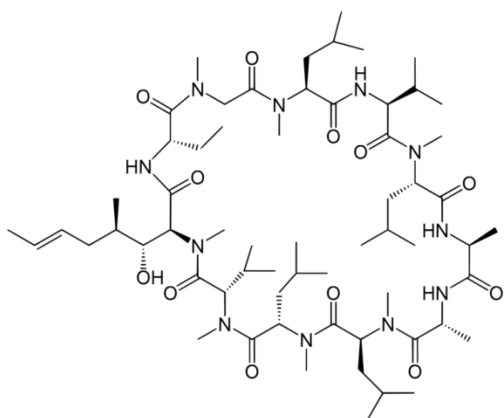


Рисунок 3. – Структурная формула антибиотического препарата Циклоспорина.

Также примером нерибосомально образующихся пептидов могут быть пептаиболы.

Пептаиболы (пептаибиотики) – нерибосомально синтезирующиеся 5–20-звенные полипептиды с единичными аминокислотными заменами, богатые остатками α -аминоизомасляной кислоты (Aib), содержащие N-концевой ацетилированный аминокислотный остаток и восстановленный до спирта С-терминальный фенилаланин. Публичные сведения о пептаиболах довольно скудны, но при этом они активно изучаются во всём мире. Эти пептиды обладают ценным спектром фармакологического значения: активны в отношении условно-патогенных и патогенных бактерий, фитопатогенных и патогенных грибов, опухолевых клеток и характеризуются низкой токсичностью. Для некоторых из этих соединений показана противовирусная активность: они препятствуют синтезу капсида вирусов таких как грипп А, везикулярный вирус стоматита, ВИЧ.

Механизм антимикробных пептидов поясняется посредством действий, таких как мембранного канала и образования пор, что позволяет прохождение ионов и другие растворенные вещества, ингибирование синтеза белка, повреждения ДНК и вмешательства в синтезе клеточной стенки.

Биосинтез пенициллина

В клетках грибов пенициллин синтезируется из трипептида:

1. На первой стадии происходит конденсация трех аминокислот: L-аминоадиповой кислоты, L-цистеина, L-валина в трипептид. Перед конденсацией в трипептид аминокислота L-валин превращается D-валин. Указанный трипептид называют -(L--аминоадипил)-L-цистеин-D-валин (англ. ACV). Реакции конденсации и эпитеризации катализируются ферментов -(L--аминоадипил)-L-цистеин-D-валин синтетазой (англ. ACVS), синтетазой нерибосомных пептидов (англ. NRPS).
2. Вторая стадия биосинтеза пенициллина это окисление линейной молекулы ACV в двуциклический интермедиат изопенициллин N ферментов изопенициллин N синтетазой (англ. IPNS), продуктом гена pcbC. Изопенициллин N — очень слабый интермедиат, поскольку он не обладает противомикробной активностью.
3. На заключительной стадии происходит трансаминирование ферментом изопенициллин N N-ацилтрансферазой, помимо этого -аминоадипиловая боковая цепь изопенициллина N удаляется и заменяется на фенилуксусную кислоту. Фермент, катализирующий эту реакцию является продуктом гена penDE [8]

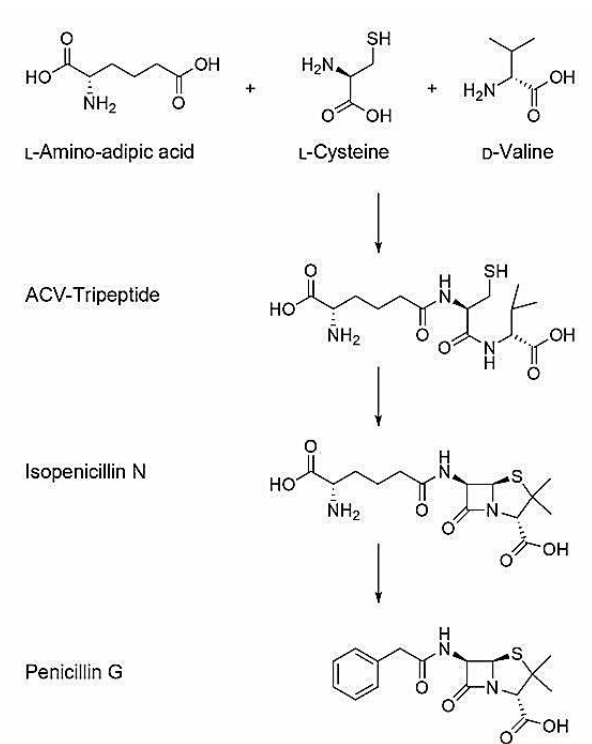


Рисунок 4. – Механизм биосинтеза антибиотического препарата пенициллина.

Заключение

Инфекционные заболевания по прежнему остаются основной причиной смертности в развивающихся странах и серьезной проблемой для передовых стран. Одной из основных проблем, с которой столкнулись в XXI веке, является появление резистентности, а также множественной резистентности патогенных микроорганизмов к обычно используемым антибиотикам. В последние два десятилетия проблема обострилась в связи с развитием множественной лекарственной устойчивости у многих бактериальных и грибных патогенов.

Несмотря на значительное снижение количества природных антибиотиков, внедряемых в клиническую практику, поиск новых соединений из природных источников все еще не утратил своей актуальности.

Перспективность исследования нерибосомальных антимикробных пептидов обусловлена тем, что к ним практически не возникает резистентность у клеток-мишеней.

Биохимические и генетические исследования представили основные принципы нерибосомных пептидных синтезов, а также реализации многих структурных особенностей этих пептидов.

Список литературы

1. Finking R., Biosynthesis of nonribosomal peptides / Finking R., Marahiel M.A. Ann. Rev. Microbiol. 2004. V. 58. P. 453-488.
2. H.D. Mootz et al., "Ways of assembling complex natural products on modular nonribosomal peptide synthetases," Chembiochem, (2002) 3:490-504,
3. Montesinos E. Antimicrobial peptides and plant disease control / FEMS Microbiol. Letters. (2007). V. 270. P. 1-11.
4. Schwarzer D., Nonribosomal Peptides: From Genes to Products/ Schwarzer, D., Finkin, R., Marahiel, M. A.; Nat. Prod. Rep. 20 (2003) 3, 275-287
5. Sylvie Lautru, Challis Substrate recognition by nonribosomal peptide synthetase multi-enzymes/ S.Lautru, Gregory L., Microbiology (2004), 150, 1629–1636
6. <http://biomolecula.ru/> - Энциклопедия лекарств и товаров аптечного ассортимента
7. <http://www.rlsnet.ru/> - Биомолекула - взгляд изнутри
8. <http://polyguanidines.ru/> - Полиалкиленгуанидины - полигексаметиленгуанидин