POPIS OBJEVU

K DIPLOMU ČÍS.

Přihlášeno: 27.10.83 (PO 58-83)

Právo přednosti od 31.05.83

Zveřejněno: J.Antibiotics 36,1983:
617 - 619

Uděleno: 04.12.89

Vydáno:

MDT
577.15.

Autoři objevu: Pospíšil Stanislav ing.CSc., Praha
Vaněk Zdenko RNDr. DrSc., Praha
Sedmera Petr ing., Praha
Krumphanzl Vladimír ~~prof.ing.DrSc.,člen korespond.~~ akademik
~~ČSAV~~, Praha

Název objevu: Metabolická dráha přeměny isobutyrylu na butyrát při biosyntéze monensinu A

Předmět objevu:

Jev spočívající v přeměně isobutyrylu na butyrát při biosyntéze monensinu A mikroorganismem Streptomyces cinnamonensis.

- - - - -

Monensiny jsou metabolity aktinomycety Streptomyces cinnamonensis (Agtarap a kol., J.Am.Chem.Soc. 89, 5737, 1967). Hlavními produkty jsou monensin A a monensin B. Monensin A je významným antikokcidikem (Shumard a Callender; Antimicrob.Agents Chemother. 1967, 369, 1968) používaným ve velkochovech drůbeže. Monensin A také zvyšuje účinnost zažívání přežvýkavců (Nevel a Demeyer; Appl. Environ.Microbiol. 34, 251, 1977). Chemickou strukturou se monensiny řadí do polyetherových antibiotik (Westley; Adv.Appl.Microbiol. 22, 177, 1977).

Z biosynthetického hlediska monensiny patří do skupiny látek oligoketidového typu, které vznikají kondensací acetyl-CoA, propionyl-CoA a případně butyryl-CoA (tzv. acetátové, propionátové a butyrátové stavební jednotky) na multienzymovém systému podobnému synthase mastných kyselin. Day a kol. (Antimicrob.Agents Chemother. 4, 410, 1973) zjistili, že molekula monensinu A je tvořena z pěti acetátových, sedmi propionátových a jedné butyrátové jednotky. V monensinu B je butyrátová jednotka nahrazena osmou propionátovou jednotkou (obr.1).

Při studiu biosynthesy oligoketidů, které jsou tvořeny látkami odlišných chemických struktur, je závažná také otázka původu jednotlivých stavebních jednotek. Acetyl-CoA je ústředním intermediátem vznikajícím především při metabolismu cukrů, mastných kyselin a některých aminokyselin.

Methylmalonyl-CoA, z něhož dekarboxylací vzniká propionyl-CoA, je reakčním produktem isomerisace sukcinyl-CoA, který je jedním z metabolitů Krebsova cyklu. Odbourání lineárních mastných kyselin s lichým počtem uhlíkových atomů vede rovněž ke tvorbě propionyl-CoA. Také určité aminokyseliny byly zjištěny jako zdroj tříuhlíkaté stavební jednotky, především ve vztahu k biosynthese makrolidových antibiotik. Corcoran (Antibiotics, Vol.4. Biosynthesis, 1981) uvádí jako zdroj propionátových jednotek při biosynthese erythromycinu aminokyseliny threonin, methionin, valin a isoleucin.

Nejméně prozkoumaná byla otázka původu butyrátové jednotky. Achenbach a Grisebach (Z.Naturforsch. 198, 561, 1964) se domnívali, že u magnamycinu vzniká tato jednotka z kyseliny jantarové. Podobný názor zastávali také Woodward a kol. (J.Amer.Chem.Soc. 87, 4662, 1965). O několik let později Grisebach a Weber-Schilling (Z.Naturforsch. 238, 655, 1968) tvrzení o inkorporaci kyseliny jantarové do laktonu molekuly magnamycinu odvolali. Na základě inkorporačních pokusů s ^{14}C-substráty předpokládali Srinivasan a Srinivasan (Biochemistry 6, 3111, 1967) vznik této jednotky z acetátu. Rovněž Westley a kol. (J.Antibiot. 27, 288, 1974) předpokládají vznik butyryl-CoA redukcí 3-oxobutyryl-CoA, který vznikne kondensací dvou molekul acetyl-CoA. Při studiu biosynthesy polyetherového antibiotika narasinu

bylo zjištěno, že Streptomyces aureofaciens je schopen vyvolávat konversi propionátu na butyrát (Dorman a kol., Helv.Chim.Acta 59, 2625, 1976). Westley (Antibiotics, Vol.4. Biosynthesis, 1981) vysvětluje tento fakt domněnkou, že butyrát vzniká kondensací dvou acetátů, které pocházejí z propionátu po α-oxidaci. Reuter a Hüttner (Biochem. Physiol.Pflanzen 169, 1, 1976) uvádějí, že teoretické úvahy i experimentální nálezy svědčí proti přímé synthese kyseliny máselné z valinu. Podle těchto autorů je valin prekursorem kyseliny isomáselné acylované mykarosy - cukerné části molekuly turimycinu.

Monensin A a monensin B jsou vhodným modelem pro řešení původu butyrátové jednotky, neboť tato je obsažena pouze v monensinu A. Základní závažné zjištění bylo, že Streptomyces cinnamonensis kultivovaný za přídavku valinu tvořil převážně monensin A, naopak isoleucin posouval produkci monensinů ve prospěch monensinu B (Pospíšil a kol., Folia Microbiol. 27, 275, 1982). Tyto pokusy byly provedeny se standardními kmeny S.cinnamonensis, které produkovaly přibližně stejná množství monensinu A a monensinu B. Aminokyseliny přidané do kultivačního media mohou buď působit regulačně na biosynthesu prekursorů monensinů, nebo mohou být samy speciálními prekursory jednotlivých monensinů, jejichž tvorbu ovlivňují.

Zásadní rozhodnutí o funkci těchto aminokyselin bylo provedeno na základě inkorporačních pokusů s radioaktivními substráty. Liší-li se monensin A od monensinu B pouze

v jedné biosynthetické stavební jednotce - butyrátové - potom po inkorporaci nebylo třeba studované produkty náročně chemicky degradovat pro určení rozložení radioaktivity na jednotlivých uhlících, ale naměřené rozdíly ve specifické radioaktivitě mezi monensinem A a monensinem B (isolované ze stejné kultivace S.cinnamonensis) bylo možno přímo vztahovat k butyrátové jednotce monensinu A. Po inkorporaci /U-^{14}C/-L-valinu byla specifická radioaktivita monensinu A čtyřikrát vyšší než specifická radioaktivita monensinu B. Stejný výsledek byl získán po aplikaci /1-^{14}C/-isobutyrátu. Isobutyrát je metabolitem valinu, neboť po deaminaci a dekarboxylaci valinu vzniká isobutyryl-CoA (Thiele; Lipide, Isoprenoide mit Steroiden, 74, 1979 - obr.2). Získané výsledky nepřímo naznačily, že valin a kyselina isomáselná jsou transformovány na kyselinu n-máselnou, která je přímým prekursorem monensinu A (Vaněk a kol., Biogenesis of oligoketides. Trends in Antibiotic Research, 213, 1982). Monensiny A a B, isolované po inkorporaci /U-^{14}C/-L-isoleucinu, vykazovaly stejnou specifickou radioaktivitu, což naznačuje, že tato aminokyselina není specifickým prekursorem monensinu B.

Přímé důkazy o lokalizaci inkorporovaných prekursorů v molekule monensinů byly uskutečněny pomocí substrátů značených specificky stabilním isotopem ^{13}C. Vzorky

monensinů A a B, získané po inkorporaci /1-^{13}C/-butyrátu a /1-^{13}C/-isobutyrátu, byly analyzovány metodou jaderné magnetické resonance (NMR). V obou případech bylo dosaženo jednoznačného obohacení (17 - 18 x vyšší než přirozené) uhlíku $C_{(15)}$ monensinu A, který biogeneticky pochází z karboxylu butyrátu. Sekundární obohacení (1,2 - 4 x vyšší než přirozené) bylo zjištěno u uhlíků majících původ v karboxylovém uhlíku propionátu (tj. $C_{(1)}$, (3), (5), (11), (17), (21), (23) monensinu A a $C_{(1)}$, (3), (5), (11), (15), (17), (21), (23) monensinu B - tab. 1).

Získané výsledky jednoznačně prokázaly, že isobutyrát při biosynthese monensinu A je isomerisován na n-butyrát, který je pak následně inkorporován do molekuly tohoto antibiotika (obr.3 - zabudování butyrátu a isobutyrátu v molekule monensinu A je naznačeno zesílením vazeb ve strukturním vzorci). Tím byl stanoven jev při biosynthese monensinu A mikroorganismem Streptomyces cinnamonensis spočívající v inkorporaci isobutyrylu do butyrátové jednotky monensinu A.

Byla také prokázána nová metabolická dráhy, neboť dosud bylo známo, že isobutyrát je β-oxidací metabolisován na methylmalonyl-CoA, který po isomerisaci poskytuje sukcinyl-CoA, nebo po dekarboxylaci vzniká propionyl-CoA (Thiele; Lipide, Isoprenoide mit Steroiden, 74, 1979 - obr.4).

Tab. 1 Inkorporace /1-^{13}C/-butyrátu a /1-^{13}C/-isobutyrátu do monensinů A a B

Uhlíkový atom č.	Monensin A			Monensin B		
	Chemický posun[a] (ppm)	Obohacovací faktor[b]		Chemický posun[a] (ppm)	Obohacovací faktor[b]	
		butyrát	isobutyrát		butyrát	isobutyrát
1	181,2	2,2	1,4	181,3	2,3	1,5
3	82,9	3,7	2,2	82,9	2,7	1,5
5	68,2	3,0	2,4	68,2	2,0	1,4
11	33,1	2,4	1,6	33,1	2,4	1,6
15	29,8	17,3	17,9	30,4	2,1	1,4
17	84,6	3,0	2,4	86,4	2,2	1,5
21	74,5	3,8	2,6	74,6	2,0	1,2
23	35,6	3,2	1,6	35,6	1,6	1,4

[a] $\pm$ 0,06 ppm

[b] Poměr výšky píků ve spektrech NMR po inkorporaci ^{13}C-obohacených prekursorů a po přirozeném obohacení. Měřeno za stejných podmínek (JEOL FX-60; 15,036 MHz; $CDCl_3$; 25 °C).

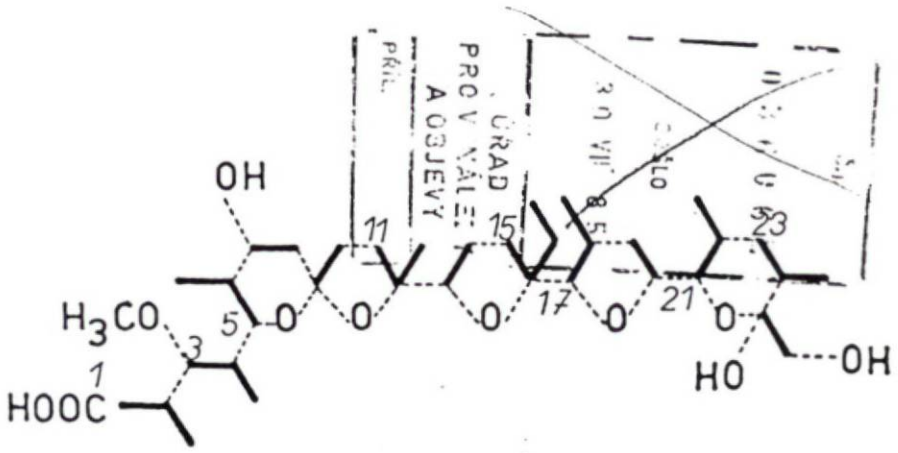
Současně s prací zveřejňující podstatu objevu, inkorporaci isobutyrylu do butyrátové jednotky monensinu A (Pospíšil a kol., J.Antibiot. 36, 617, 1983) byly ve stejném čísle tohoto časopisu publikovány výsledky se stejnými závěry, ale získanými při studiu biosynthesy makrolidových antibiotik leukomycinu A_5 a protylonolidu (Ōmura a kol., J.Antibiot. 36, 614, 1983). Tímto byla prokázána obecná existence této nové metabolické dráhy.

Standardní kmeny S.cinnamonensis produkují monensin A a monensin B přibližně ve stejném poměru. Přitom žádaným produktem je monensin A, který má vyšší biologickou aktivitu. Poznatek, že isobutyrát je specifickým prekursorem butyrátové jednotky monensinu A, umožnil cílenou přípravu mutantů S.cinnamonensis se zvýšenou produkcí tohoto prekursoru, která by se projevila také při biosynthese monensinů vyšším zastoupením monensinu A. Protože přirozeným prekursorem isobutyrátu je valin (Thiele; Lipide, Isoprenoide mit Steroiden, 74, 1979) a současně také naše experimenty prokázaly positivní úlohu této aminokyseliny při biosynthese monensinu A (Pospíšil a kol., Folia Microbiol. 27, 275, 1982), byly pomocí analogů větvených aminokyselin isolovány mutantní kmeny S.cinnamonensis se změněnou regulací biosynthesy těchto aminokyselin. V důsledku nadprodukce specifických prekursorů monensinu A (valinu a isobutyrátu) bylo u těchto kmenů S. cinnamonensis dosaženo zvýšení zastoupení monensinu A z původních 50 % na více než 90 % (Pospíšil a kol., FEMS Microbiol.Lett.

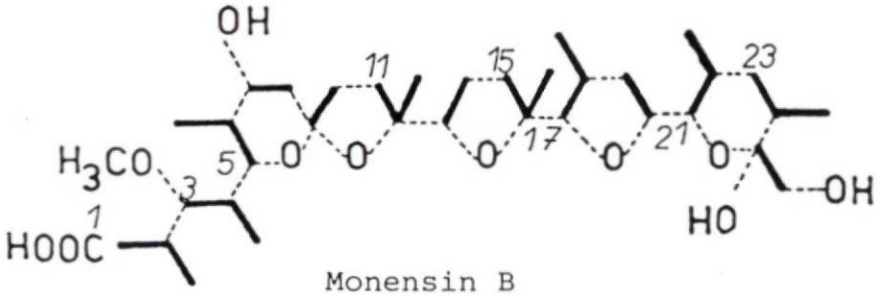
24, 209, 1984).

Na jeden takto získaný kmen bylo již uděleno čs.autorské osvědčení na vynález č. 233 853.

Předmět objevu představuje významný poznatek o biosynthese monensinů. Aplikací tohoto objevu byly připraveny produkční kmeny pro biotechnologickou praxi.



Monensin A



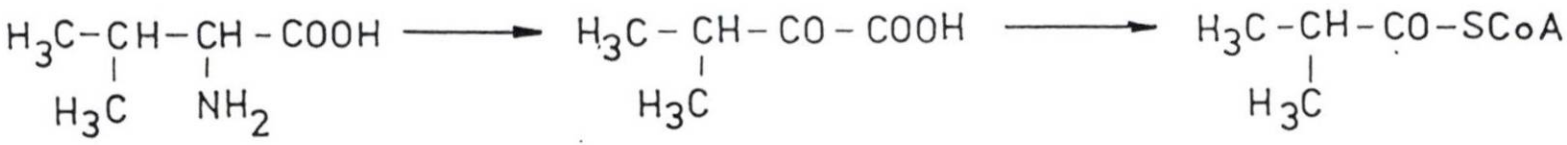
Monensin B

— acetátová jednotka

propionátová jednotka

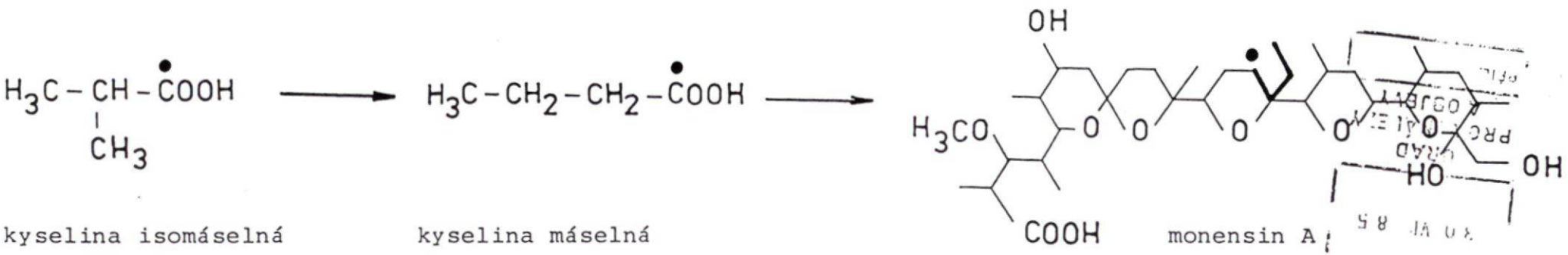
butyrátová jednotka

Obr.1 Biosynthetické jednotky monensinu A a monensinu B



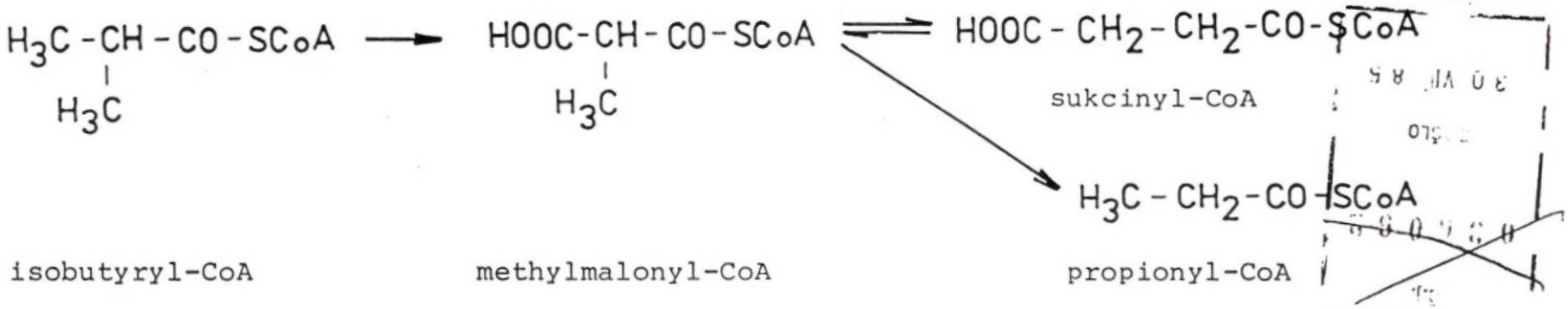
valin kyselina 2-oxoisovalerová isobutyryl-CoA

Obr.2 Vznik isobutyryl-CoA z valinu



kyselina isomáselná kyselina máselná monensin A

Obr.3 Inkorporace isobutyrylu do butyrátové jednotky monensinu A



Obr.4 Metabolismus isobutyryl-CoA