

Biosyntéza monensinů a regulační mutanty *Streptomyces cinnamonensis*

Ing. STANISLAV POSPÍŠIL, RNDr. PhMr. ZDENKO VANĚK, DrSc. a člen korespondent ČSAV VLADIMÍR KRUMP-HANZL, Mikrobiologický ústav ČSAV

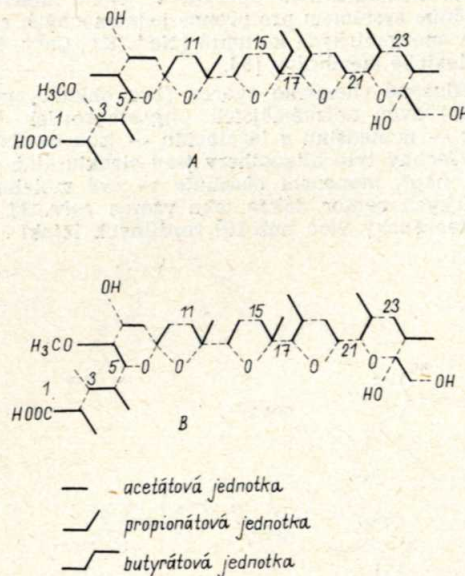
Klíčová slova: *Streptomyces cinnamonensis*, monensin A, monensin B, oligoketidy, biosyntéza, prekurzory, valin, isoleucin, regulační mutanty, antikocidikum

Monensiny jsou metabolity aktinomycety *Streptomyces cinnamonensis* [1]. Hlavními produkty jsou monensin A a monensin B. Monensin A je významným antikocidikem a prostředkem zvyšujícím účinnost zažívání přežvýkavců. Důležitou vlastností monensinů je jejich schopnost transportu jednomocných anorganických kationtů přes lipidové membrány. Pro tuto vlastnost jsou zařazeny do skupiny ionoforů. Chemickou strukturu se monensiny řadí do polyetherových antibiotik.

Z biosyntetického hlediska patří monensiny do skupiny oligoketidových látek. V sedmdesátých letech bylo zjištěno, že molekula monensinu A vzniká kondenzací pěti acetátových, sedmi propionátových a jedné butyrátové biosyntetické jednotky [2]. V monensinu B je při biosyntéze butyrátová jednotka nahrazena osmou propionátovou jednotkou (obr. 1).

Zjistili jsme, že biosyntéza monensinů je u standardních kmenů *S. cinnamonensis* výrazně ovlivněna větvenými aminokyselinami [3]. V přítomnosti valinu se tvořil převážně monensin A, isoleucin naopak posouval produkci ve prospěch monensinu B. Toto zjištění bylo zásadního významu, neboť naznačovalo možnost řešení otázek původu jednotlivých prekurzorů (především butyrátu), regulace biosyntézy monensinů a racionálně zaměřených genetických prací.

Základní poznatek o mechanismu účinku valinu a isoleucinu byl zjištěn měřením specifické radioaktivity izolovaných produktů po inkorporaci [$U-^{14}C$]-valinu, [$U-^{14}C$]-isoleucinu a metabolitu valinu [$1-^{14}C$]-isobutyřátu. Spe-



Obr. 1. Biosyntetické jednotky monensinu A a monensinu B

cifická radioaktivita monensinu A po zabudování značeného valinu i isobutyátu byla 4krát vyšší než specifická radioaktivita monensinu B. Tento výsledek naznačoval, že valin a isobutyát jsou prekurzory butyrátové jednotky monensinu A. Monensiny A a B izolované po aplikaci [^{14}C]-isoleucinu vykazovaly stejnou specifickou radioaktivitu, což svědčí o tom, že tato aminokyselina není specifickým prekurzorem monensinu B. Důkaz o lokalizaci inkorporovaných substrátů v molekule monensinu byl uskutečněn pomocí specifického značení isotopem ^{13}C . Vzorky monensinu A a B získané po inkorporaci [^{13}C]-butyrátu a [^{13}C]-isobutyátu byly analyzovány metodou jaderné magnetické rezonance (^{13}C -NMR). V obou případech bylo dosaženo jednoznačného obohacení (17krát vyšší než přirozené) uhlíku C_{15} monensinu A, který biogeneticky pochází z karboxylu butyrátu. Sekundární obohacení (1,2—3krát vyšší) bylo zjištěno u uhlíků majících původ v karboxylovém uhlíku propionátu. Tyto výsledky ukázaly, že valin, resp. isobutyát, jsou prekurzory butyrátové jednotky monensinu A. Současně byla prokázána nová metabolická dráha: isomerisace isobutyátu na butyrát [4]. Doposud bylo známo, že isobutyát je β -oxidací metabolizován na propionát.

Použitím [$^{1,2-13}\text{C}_2$]-acetátu bylo zjištěno, že butyrátová jednotka monensinu A může vznikat také kondenzací acetátu. Analýzou spekter NMR monensinu A a B po inkorporaci [^{13}C]-2-methylbutyrátu, metabolitu isoleucinu, bylo prokázáno rovnocenné obohacení uhlíků monensinu, pocházejících z $\text{C}_{(1)}$ -propionátu. Tímto byly potvrzeny výsledky získané po inkorporaci [^{14}C]-isoleucinu. Tato aminokyselina má především regulační účinky, pravděpodobně inhibuje biosyntézu valinu [5].

Byl sledován rovněž vliv přímých prekurzorů (acetátu, propionátu, butyrátu a isobutyátu) na syntézu monensinu u standardního kmene *S. cinnamomensis*, produkujícího stejné množství monensinu A a B. Acetát neměnil poměr produkovaných monensinů, propionát zvyšoval zastoupení monensinu B. Butyrát a isobutyát vyvolaly vyšší tvorbu monensinu A. Celkově však byl účinek nízký vzhledem k toxicitě těchto substrátů [6].

Cílem genetické práce, založené na biosyntetických studiích, byla příprava mutantů *S. cinnamomensis* se změněnou regulací biosyntézy aminokyselin (nadprodukující valin), která by se projevila také v sekundárním metabolismu při syntéze monensinů. Po nalezení vhodných podmínek selekce byly získány nové kmeny *S. cinnamomensis*, rezistentní k analogům aminokyselin: DL-norvalinu (kmeny NVR), L-norleucinu (NLR), DL-ethioninu (ER), L-2-aminobutyátu (ABR) a L-threo-2-amino-3-chlorbutyrátu (ACBR). U těchto kmenů byla sledována celková produkce a vzájemné zastoupení monensinů, které se u izolátů NVR a ER neměnilo. U některých kmenů typu ABR a NLR bylo zjištěno zvýšení relativní produkce monensinu A z 50 na 80 %. Maximálního zvýšení podílu monensinu A (85—90 %) bylo dosaženo u kmenů ACBR.

Z kmene ACBR-2 byly získány mutanty dvojnásobně rezistentní k DL-norvalinu (ACB-NVR), L-2-aminobutyátu (ACB-ABR) a L-norleucinu (ACB-NLR). U kmenů ACB-NLR bylo prokázáno další zvýšení obsahu monensinu A na 93 % [7].

Analýzy složení mastných kyselin lipidů nových rezistentních kmenů *S. cinnamomensis* ukázaly značné zvýšení obsahu sudých iso-větvených mastných kyselin pocházejících z valinu a isobutyátu. Toto zjištění potvrzuje

je změněnou regulací biosyntézy větvených aminokyselin a současně naznačuje, že enzym, katalyzující isomerizaci isobutyátu není v buňkách *S. cinnamomensis* obecně rozšířen, ale je pravděpodobně těsně spjat s biosyntézou monensinů [8].

Získané výsledky nejen přispěly k dalšímu poznání biosyntézy polyetherových antibiotik, ale umožnily také připravit a předat do praxe nové kmeny *S. cinnamomensis* s vhodnými vlastnostmi a vysokým zastoupením produkovaného monensinu A. Byly rovněž vytvořeny předpoklady pro další výzkum regulace syntézy polyetherových antibiotik na nové úrovni [9].

Literatura

- [1] AGTARAP A., CHAMBERLIN J. W., PINKERTON M., STEINRAUF L. K.: J. Am. Chem. Soc. **89**, 1967, s. 5737.
- [2] DAY L. E., CHAMBERLIN J. W., GORDEE E. Z., CHEN S., GORMAN M., HAMILL R. L., NESS T., WEEKS R. E., STROSHANE R.: Antimicrob. Agents Chemother. **4**, 1973, s. 410.
- [3] POSPIŠIL S., KRÁLOVCOVÁ E., STAJNER K., TAX J., KRUMPHANZL V., VANĚK Z.: Folia Microbiol. **27**, 1982, s. 275.
- [4] POSPIŠIL S., SEDMERA P., HAVRÁNEK M., KRUMPHANZL V., VANĚK Z.: J. Antibiot. **36**, 1983, s. 617.
- [5] POSPIŠIL S., SEDMERA P., KRUMPHANZL V., VANĚK Z.: Folia Microbiol. **30**, 1985 — v tisku.
- [6] POSPIŠIL S., CIMBURKOVÁ E., KRUMPHANZL V., VANĚK Z.: Folia Microbiol. **30**, 1985, s. 30.
- [7] POSPIŠIL S., PETERKOVÁ M., KRUMPHANZL V., VANĚK Z.: FEMS Microbiol. Lett. **24**, 1984, s. 209.
- [8] POSPIŠIL S., ŘEZANKA T., VÍDEN T., KRUMPHANZL V., VANĚK Z.: FEMS Microbiol. Lett. **26**, 1985 — v tisku.
- [9] POSPIŠIL S.: Kandidátská disertační práce, MěÚ ČSAV 1985.

Pospišil, S. - Vaněk, Z. - Krumphanzl, V.: Biosyntéza monensinů a regulační mutanty *Streptomyces cinnamomensis*. Kvas. prům. **31**, 1985, č. 7—8, s. 162—163.

Práce shrnuje výsledky dosažené při studiu biosyntézy polyetherových antibiotik monensinů A a B. Na základě poznání účinku větvených aminokyselin při syntéze těchto metabolitů byly připraveny regulační mutanty *S. cinnamomensis* produkující převážně monensin A. Toto antibiotikum je významné antikoagikum.

Поспишил, С. — Ванек, З. — Крүмпганзл, В.: Биосинтез моненсинов и регуляторные штаммы *Streptomyces cinnamomensis*. Квас. прум. **31**, 1985, № 7—8, стр. 162—163.

Работа посвящена результатам изучения биосинтеза полиэфирных антибиотиков моненсинов А и В. На основе определенной роли ветвящихся аминокислот при синтезе этих метаболитов, были подготовлены регуляторные штаммы *S. cinnamomensis* образовавшие прежде всего моненсины А. Этот антибиотик является важным препаратом для лечения кокцидиозов.

Pospišil, S. - Vaněk, Z. - Krumphanzl, V.: Biosynthesis of monensins and regulatory mutants of *Streptomyces cinnamomensis*. Kvas. prům. **31**, 1985, No. 7—8, pp. 162—163.

The paper concentrates the results achieved during biosynthetic studies of the polyether antibiotics monensins A and B. On the basis of the recognized role of branched amino acids within the synthesis of these metabolites, there have been prepared regulatory mutants of *S. cinnamomensis* producing monensin A predominantly. This antibiotic is a potent coccidiostatic agent.

Pospišil S., Vaněk Z., Krumphanzl V.: Biosynthese von Monensin und Regulationsmutante des *Streptomyces cinnamomensis*. Kvas. prům. **31**, 1985, Nr. 7—8, S. 162—163.

Die Ergebnisse des Studiums der Biosynthese von Polyether Antibiotik Monensin A und B sind berichtet. Auf Grunde der erkannten Rolle der verzweigten Aminosäure bei der Biosynthese von diesen Metaboliten wurden die Regulationsmutante *S. cinnamomensis* vorbereitet die überwiegend nur Monensin A produzieren. Dieses Antibiotikum ist als wirksame Kokcidostatikum benützt.