

Tomasz BORUTA, Marcin BIZUKOJĆ

e-mail: tomaszboruta85@gmail.com

Katedra Inżynierii Bioprocusowej, Wydział Inżynierii Procesowej i Ochrony Środowiska, Politechnika Łódzka, Łódź

Biosynteza statyn przez *Aspergillus terreus* i *Penicillium solitum*

Wstęp

Statyny są inhibitorami reduktazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-CoA (3-HMG-CoA), enzymu pełniącego kluczową rolę w szlaku metabolicznym biosyntezy cholesterolu. Znajdują zastosowanie w medycynie jako leki obniżające poziom cholesterolu. Inhibicja reduktazy jest efektem podobieństwa strukturalnego między 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-CoA, czyli naturalnym substratem enzymu, a łańcuchem β -hydroksykwasu występującym w aktywnej formie leku statynowego. Pierwszą odkrytą statyną pochodzenia naturalnego była kompaktyna (znana również jako mewastatyna i ML-236B), poliketydowy metabolit wtórny wyizolowany z hodowli grzyba strzępkowego *Penicillium citrinum* [Endo i in., 1976].

Cząsteczka ta nigdy nie została wprowadzona na rynek farmaceutyczny z uwagi na wątpliwości związane z jej potencjalną toksycznością [Endo, 2010]. Mimo to, kompaktyna nie przestaje być obiektem zainteresowań badaczy, gdyż jest substratem poddawany biotransformacji w przemysłowym procesie wytwarzania prawastatyny, szeroko stosowanego leku przeciw hipercholesterolemii [McLean i in., 2015].

Pierwszą substancją hamującą reduktazę 3-HMG-CoA dostępną na rynku leków była lowastatyna, czyli laktonowa forma kwasu mewinolinowego, produkowanego przez grzyba *Aspergillus terreus*. Lowastatyna po przyjęciu jest przekształcana w organizmie do aktywnej biologicznie formy β -hydroksykwasowej na drodze hydrolizy. Lowastatyna i kompaktyna są substancjami pochodzenia naturalnego produkowanymi przez grzyby, natomiast ich pochodne, simwastatyna i prawastatyna – to produkty półsyntetyczne wytwarzane poprzez chemiczne modyfikacje naturalnie występujących cząsteczek. Firmy farmaceutyczne oferują również statyny syntetyczne, produkowane metodami syntezy chemicznej, takie jak: fluwastatyna, atorwastatyna i rozuwastatyna [Tobert, 2003].

Celem niniejszej pracy było zbadanie możliwości biosyntezy różnych statyn przez dwa szczepy grzybów strzępkowych: *Aspergillus terreus* ATCC 20542 i *Penicillium solitum* CBS 288.36. Pierwszy z nich jest podstawowym szczepem produkującym kwas mewinolinowy, natomiast drugi znany jest głównie jako patogen jabłek i gruszek [Sanderson i Spotts, 1995]. Analiza hodowli prowadzonych na płytkach z podłożem stałym wykazały zdolność gatunku *P. solitum* do tworzenia kompaktyny i solistatyny [Frisvad i in., 2004], ale potencjalne zastosowanie *P. solitum* CBS 288.36 w procesach produkcji statyn w podłożach płynnych nie zostało poddane ocenie.

Materiały i metody

Szczepy i warunki hodowli

Eksperyment wykonano z użyciem szczepów *Aspergillus terreus* ATCC 20542 oraz *Penicillium solitum* CBS 288.36.

Hodowla prowadzona była przez 7 dni w kolbach wstrząsanych przy objętości podłoża wynoszącej 150 ml i stałej prędkości obrotowej wstrząsarki równej 110 obr min^{-1} . Temperatura wynosiła 30 °C dla hodowli *A. terreus* i 25 °C dla hodowli *P. solitum*. Zastosowano podłoże o następującym składzie: sacharoza: 150 g l^{-1} ; ekstrakt drożdżowy 20 g l^{-1} ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.5 g l^{-1} ; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.01 g l^{-1} ; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 0.005 g l^{-1} (pH 6.5). Do zaszczepienia podłoża użyto spor uzyskanych na skosach agarowych [Bizukojć i in., 2012].

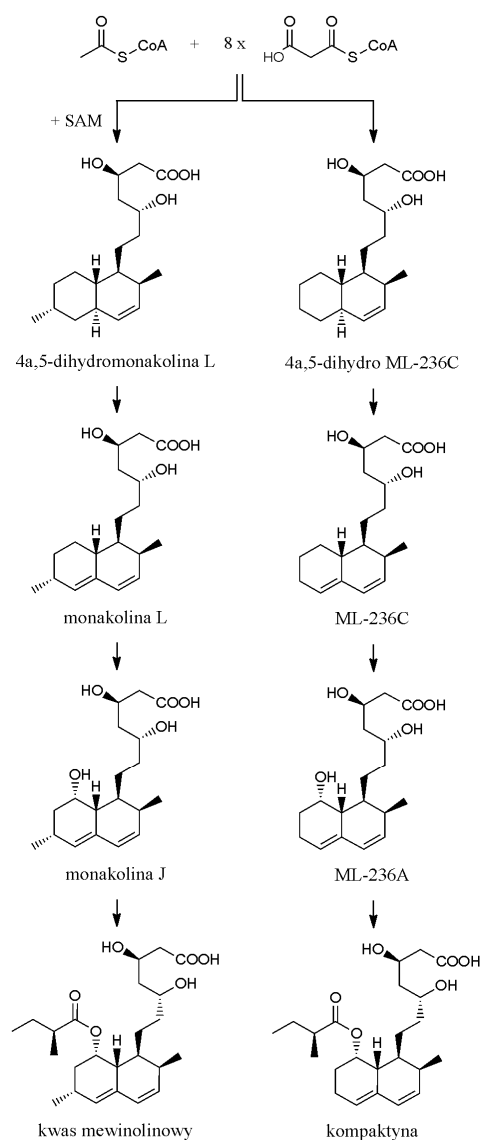
Metoda analityczna

Analizę metabolitów przeprowadzono z zastosowaniem spektrometru *Synapt G2* firmy *Waters* sprzężonego z ultrasprawnym chromatografem cieczowym *Waters Acquity* wg przedstawionej wcześniej

procedury [Boruta i Bizukojć, 2014]. Baza metabolitów wtórnych *AntiBase 2014: The Natural Compound Identifier* (Wiley) używana była w procesie identyfikacji cząsteczek.

Wyniki i dyskusja

W cieczy hodowlanej *A. terreus* wykryto kwas mewinolinowy i monakolinę L (na podstawie uzyskanych widm masowych). Szlak metaboliczny prowadzący od acetylo-CoA i malonylo-CoA do kwasu mewinolinowego obejmuje szereg reakcji enzymatycznych (Rys. 1). Jednym z produktów pośrednich jest monakolina L, której utlenienie prowadzi następnie do powstania monakoliny J. Zwieńczeniem kolejnych etapów szlaku jest powstanie cząsteczki kwasu mewinolinowego, czyli β -hydroksykwasowej formy lowastatyny [Cochrane i Vederas, 2014].



Rys. 1. Szlaki biosyntezy kwasu mewinolinowego u *Aspergillus terreus* [Cochrane i Vederas, 2014] i kompaktyny u *Penicillium citrinum* [Abe i in., 2002]. Produkty szlaku biosyntezy kwasu mewinolinowego posiadają dodatkową grupę metylową. SAM – S-adenozylometionina

W przypadku analizy metabolitów *P. solitum* spodziewano się obecności kompaktyny i solistatyny, które zostały wcześniej wykryte w hodowlach tego grzyba na podłożach agarowych [Frisvad *in in.*, 2004]. Nie stwierdzono jednak obecności tych cząsteczek w badanych próbkach.

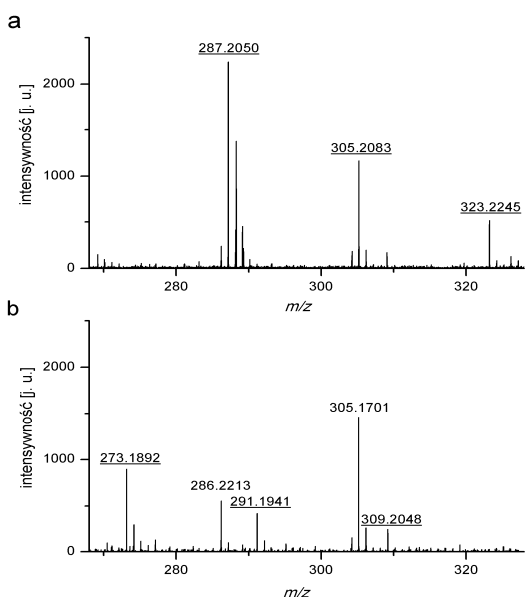
Wykryto natomiast dwa inne poliketydowe metabolity o zbliżonej strukturze, ML-236A i ML-236C, czyli związki prekursorowe kompaktyny. Szlak biosyntezy kompaktyny (Rys. 1) został wcześniej zaproponowany w odniesieniu do odkrytego klastra genów odpowiedzialnych za produkcję tego związku u *Penicillium citrinum* [Abe *in in.*, 2002]. *P. solitum* i *P. citrinum* są grzybami o relatywnie bliskim pokrewieństwie i zbliżonej morfologii, co często skutkuje błędną identyfikacją taksonomiczną [Frisvad *in in.*, 2004]. Szlak biosyntezy kompaktyny jest prawdopodobnie ewolucyjnie zachowany u tych dwóch gatunków.

Uzyskane wartości m/z porównano z wartościami teoretycznymi (Tab. 1), a schemat fragmentacji uznano za zgodny z danymi literaturowymi [Wang *in in.*, 2001].

Tab. 1. Porównanie teoretycznych i eksperymentalnych wartości m/z

Nazwa metabolitu	Wartość m/z		$\Delta (m/z)$
	teoretyczna	eksperymentalna	
kwas mewinolinowy	423,2741	423,2716	-0,0025
monakolina L	323,2217	323,2245	+0,0028
ML-236C	309,2060	309,2048	-0,0012
ML-236A	325,2010	325,1987	-0,0023

Należy zauważyć, że kwas mewinolinowy i β -hydroksykwasowa forma kompaktyny różnią się jedynie obecnością dodatkowej grupy metylowej. Każdy z produktów należących do szlaku biosyntezy kwasu mewinolinowego ma odpowiednika w szlaku tworzenia kompaktyny posiadającego w pozycji C-6 atom wodoru zamiast grupy metylowej. W efekcie, monakolina L posiada w swojej strukturze dodatkowe atomy „CH₂” w porównaniu do ML-236C (Rys. 1) i różnica wartości m/z między tymi cząsteczkami na widmie masowym powinna wynosić $\Delta (m/z) = 14,0157$. Eksperymentalna różnica wartości m/z dla monakoliny L i ML-236C wynosiła $\Delta (m/z) = 323,2245 - 309,2048 = 14,0197$. Podobny schemat powtórzył się również dla produktów fragmentacji tych metabolitów. Fragmenty pochodzące od monakoliny L różniły się od swoich odpowiedników pochodzących od ML-236C o masę dodatkowych atomów „CH₂” (Rys. 2).



Rys. 2. Fragmenty widm masowych zawierających piki pochodzące od monakoliny L (a) i ML-236C (b) oraz produktów ich fragmentacji. Wartości m/z będące efektem obecności monakoliny L i ML-236C zostały podkreślone

Hodowlę przeprowadzono z wykorzystaniem podłoża YES (*Yeast Extract Sucrose*), w którym źródłami węgla i azotu są, odpowiednio, sacharoza i ekstrakt drożdżowy. Pożywka ta jest rutynowo stosowana w badaniach dotyczących metabolizmu wtórnego grzybów strzępkowych z rodzajów *Aspergillus* i *Penicillium* [Frisvad, 2013]. Zaobserwowany w tych warunkach brak kompaktyny u *P. solitum*, przy jednoczesnej obecności sygnałów pochodzących od ML-236C i ML-236B, świadczył o braku aktywności ostatniej reakcji enzymatycznej odpowiedzialnej za konwersję ML-236A do kompaktyny (Rys. 1). Biosynteza kompaktyny i solistatyny u *P. solitum* została opisana wcześniej dla hodowli na podłożu stałym, ale nie wykryto tych związków w niniejszym eksperymencie, prowadzonym w kolbach wstrząsanych. Wzbudzenie produkcji w hodowli płynnej będzie wymagało wyznaczenia czynników odpowiedzialnych za aktywację odpowiednich reakcji biosyntezy. Należy ustalić, czy hamowanie produkcji statyn jest w tym przypadku związane ze składem podłoża, czy z warunkami prowadzenia procesu.

Wnioski

A. terreus ATCC 20542 w pożywce YES w warunkach hodowli w kolbach wstrząsanych wydziela do podłoża monakolinę L i kwas mewinolinowy.

W tych samych warunkach *P. solitum* CBS 288.36 produkuje metabolity ML-236C i ML-236A, nie wytwarza natomiast kompaktyny i solistatyny. Profil metaboliczny *P. solitum* w płynnej hodowli nie pokrywa się z profilem z hodowli na podłożu agarowym.

LITERATURA

- Abe Y., Suzuki T., Ono C., Iwamoto K., Hosobuchi M., Yoshikawa H., 2002. Molecular cloning and characterization of an ML-236B (compactin) biosynthetic gene cluster in *Penicillium citrinum*. *Mol. Gen. Genomics*, **267**, 636-646. DOI: 10.1007/s00438-002-0697-y
- Bizukojć M., Pawlak M., Boruta T., Gonciarz J., 2012. Effect of pH on biosynthesis of lovastatin and other secondary metabolites by *Aspergillus terreus* ATCC 20542. *J. Biotechnol.*, **162**, 253-261. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2012.09.007
- Boruta T., Bizukojć M., 2014. Culture-based and sequence-based insights into biosynthesis of secondary metabolites by *Aspergillus terreus* ATCC 20542. *J. Biotechnol.*, **175**, 53-62. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2014.01.038
- Cochrane R.V., Vederas J.C., 2014. Highly selective but multifunctional oxygenases in secondary metabolism. *Acc. Chem. Res.*, **47**, 3148-3161. DOI: 10.1021/ar500242c
- Endo A., Kuroda M., Tsujita Y., 1976. ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinum*. *J. Antibiot.*, **29**, 1346-1348. DOI: 10.7164/antibiotics.29.1346
- Endo A., 2010. A historical perspective on the discovery of statins. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* **86**, 484-493. DOI: 10.2183/pjab.86.484
- Frisvad J.C., 2013. Media and growth conditions for induction of secondary metabolite production. *Methods Mol. Biol.*, **944**, 47-58. DOI: 10.1007/978-1-62703-122-6_3
- Frisvad J.C., Smedsgaard J., Larsen T.O., Samson R.A., 2004. Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. *Stud. Mycol.*, **49**, 201-241
- McLean K.J., Hans M., Meijrink B., van Scheppingen W.B., Vollebregt A., Tee K.L., van der Laan J.M., Leys D., Munro A.W., van den Berg M.A., 2015. Single-step fermentative production of the cholesterol-lowering drug pravastatin via reprogramming of *Penicillium chrysogenum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **112**, 2847-2852. DOI: 10.1073/pnas.1419028112
- Sanderson P.G., Spotts R.A., 1995. Postharvest decay of winter pear and apple fruit caused by species of *Penicillium*. *Phytopathology*, **85**, 103-110. DOI: 10.1094/Phyto-85-103
- Tobert J.A., 2003. Lovastatin and beyond: the history of the HMG-CoA reductase inhibitors. *Nat. Rev. Drug. Discov.*, **2**, 517-526. DOI: 10.1038/nrd1112
- Wang H., Wu Y., Zhao Z., 2001. Fragmentation study of simvastatin and lovastatin using electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, **36**, 58-70. DOI: 10.1002/jms.104

Praca została częściowo sfinansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych na podstawie decyzji DEC-2013/11N/ST8/00212.