

WPROWADZENIE

Cyanobakterie stanowią cenne źródło metabolitów wtórnych charakteryzujących się bogactwem struktur oraz szerokim przekrojem funkcji i aktywności biologicznych. Ze względu na potencjalne biotechnologiczne zastosowanie, coraz większe zainteresowanie naukowców skupia się na cyjanopeptydach syntezowanych w sposób nierybosomalny. Przykładem takich związków są nostocyclopeptydy (Ncps) produkowane wyłącznie przez cyjanobakterie z rodzaju *Nostoc*.

Peptydy te stanowią niewielką grupę metabolitów wtórnych - jak dotąd, znane były tylko trzy naturalnie produkowane Ncps oraz ich formy liniowe. Z jednym wyjątkiem, związki te są zbudowane z siedmiu reszt aminokwasowych, które w cyklicznej formie są połączone unikalnym wiązaniem iminowym pomiędzy C-końcowym aldehydem a N-kończącą grupą aminową tyrozyny.

Celem niniejszej pracy było poznanie różnorodności strukturalnej nostocyclopeptydów produkowanych przez bałtycki szczep *Nostoc edaphicum* CCNP1411. Analizy struktur przeprowadzono z zastosowaniem tandemowej spektrometrii mas (LC-MS/MS).

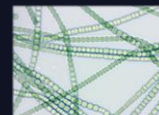
MATERIAŁY I METODY

Hodowla biomasy
N. edaphicum CCNP1411
(Z8+NaCl; 22±1 °C,
5-10 μM fotonów m⁻²s⁻¹)

Ekstrakcja

Liofilizat
10 mg w 1 mL:
H₂O; 20% MeOH (pH 3.5; 6; 8); 50% MeOH
Świeża biomasa
500 mg w 10 mL 20% MeOH

Analiza LC-MS/MS



Rys. 1 Bałtycki szczep *Nostoc edaphicum* CCNP1411

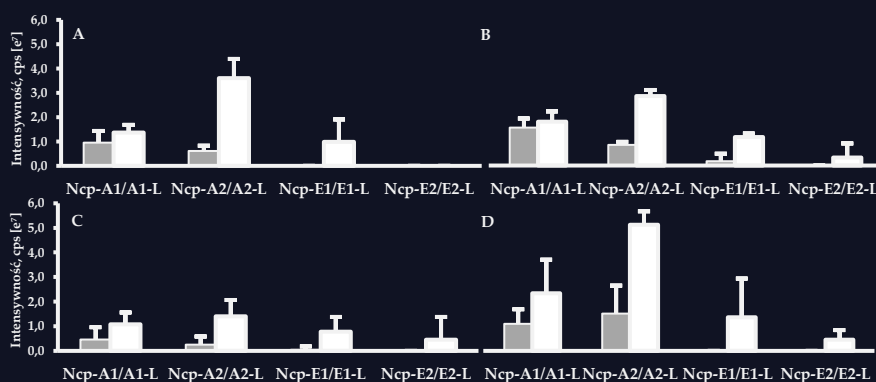
WYNIKI I DISKUSJA

- W niniejszej pracy wykazano, że *Nostoc edaphicum* szczep CCNP1411 (Rys. 1) wyizolowany z Morza Bałtyckiego produkuje **dziesięć** wariantów Ncps, w tym **sześć** jak dotąd nieznaną struktur (Tab. 1, Rys. 3-4). Oprócz CCNP1411, produkcję Ncps potwierdzono tylko u kilku innych szczepów *Nostoc* sp.: szczep ASN_M wyizolowany z pól ryżowych (Iran) [1], szczep ATCC53789 żyjący w symbiozie z porostami (Szkocja) [2], szczep XSPORK 13A żyjący w symbiozie ze ślimakami (Finlandia) [3] oraz kilka szczepów będących symbiontami wątrobowców (Norwegia) [4].
- Wykazano, że znaczna część aminokwasów (5 pozycji) w łańcuchu peptydowym jest **konserwatywna** (z jednym wyjątkiem – Ncp-E3). Różnice dotyczą dwóch reszt aminokwasowych: w pozycji szóstej występuje **prolina (Pro)** lub jej **metylowana forma (MePro)**, z kolei w pozycji siódmej potwierdzono występowanie **leucyny (Leu)** i **fenyloalaniny (Phe)** (Tab. 1).
- Wbrew wcześniej opublikowanym danym, formy cykliczne Ncps nie są formami dominującymi.** W wyniku analiz ekstraktów zliofilizowanej i świeżej biomasy, z zastosowaniem różnych rozpuszczalników (Rys. 2) oraz roztworów o różnej wartości pH, w niniejszej pracy potwierdzono, że zawartość liniowych nostocyclopeptydów (aldehidowych) w komórkach *Nostoc* jest zdecydowanie wyższa niż form cyklicznych.
- Ncp-E4-L** występuje pod postacią liniowego peptydu składającego się tylko z sześciu reszt aminokwasowych. Ponieważ identyczna sekwencja jest obecna w Ncp-A1 i -A2 oraz w ich liniowych analogach, zakłada się, że Ncp-E4-L może być ich **prekursorem** (Tab. 1).
- Autorzy innych prac [3, 5] wskazują, że Ncps mają potencjał antytoksyczny, ponieważ **hamują transport cyjanotoksyn** (nodularyna, mikrocystyna-LR) do szczyrzych komórek wątrobowych oraz ludzkich embrionalnych komórek nerkowych. Identyfikacja nowych form Ncp u bałtyckiego szczepu *Nostoc* stwarza możliwości dalszych badań nad możliwością **biotechnologicznego** zastosowania oraz **środowiskowego** znaczeniem tych związków

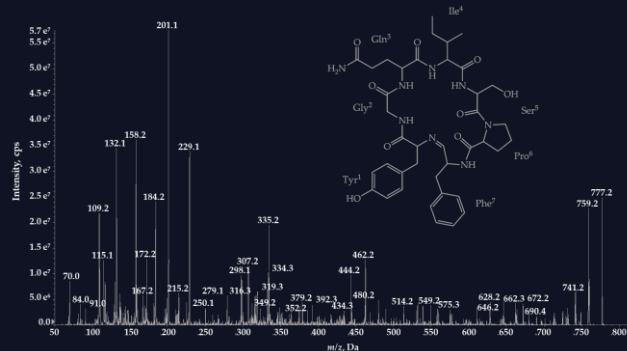
Tabela 1 Nostocyclopeptydy (Ncps) zidentyfikowane w surowym ekstrakcie *N. edaphicum* CCNP1411. Kolorem niebieskim i zielonym oznaczono pozycje reszt aminokwasowych w których zachodzą różnice strukturalne pomiędzy poszczególnymi wariantami Ncps.

Ncp	Struktura	m/z [M+H] ⁺	
		Forma cykliczna	Forma liniowa [-COH]
Ncp-A1	Tyr+Gly+Gln+Ile+Ser+MePro+Leu	757	
Ncp-A1-L	Tyr+Gly+Gln+Ile+Ser+MePro+Leu		775
Ncp-A2	Tyr+Gly+Gln+Ile+Ser+MePro+Phe	791	
Ncp-A2-L	Tyr+Gly+Gln+Ile+Ser+MePro+Phe		809
Ncp-E1	Tyr+Gly+Gln+Ile+Ser+Pro+Phe	777	
Ncp-E1-L	Tyr+Gly+Gln+Ile+Ser+Pro+Phe		795
Ncp-E2	Tyr+Gly+Gln+Ile+Ser+Pro+Leu	743	
Ncp-E2-L	Tyr+Gly+Gln+Ile+Ser+Pro+Leu		761
Ncp-E3	Tyr+Gly+Gln+Val+Ser+MePro+Leu	743	
Ncp-E4-L*	Tyr+Gly+Gln+Ile+Ser+MePro		677

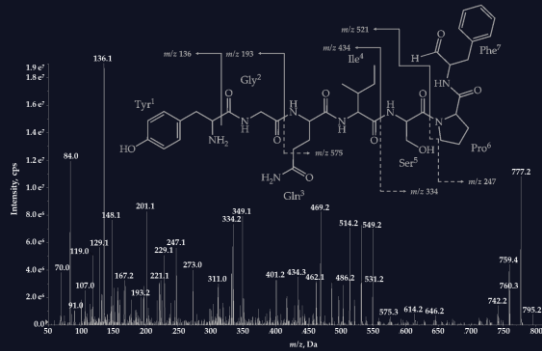
* jedyny zidentyfikowany liniowy Ncp zawierający w strukturze grupę -COOH zamiast -COH



Rys. 2 Komórkowa zawartość Ncps wyekstrahowanych z biomasy komórek *N. edaphicum* CCNP1411. Ekstrakcje wykonano z 10 mg materiału zliofilizowanego z zastosowaniem A) wody MilliQ, B) 50% MeOH i D) 20% MeOH, oraz z 500 mg świeżej biomasy ekstrahowanej 20% MeOH (C).



Rys. 3 Struktura oraz widmo fragmentacyjne cyklicznego peptydu Ncp-E1 (m/z 777).



Rys. 4 Struktura, widmo fragmentacyjne oraz droga fragmentacji liniowego peptydu Ncp-E1-L (m/z 795).

BIBLIOGRAFIA

- Nowruzi i in., 2012, *Algae*, 27, 303-313.
- Golakoti i in., 2001, *J. Nat. Prod.*, 64, 54-59.
- Jokela i in., 2010, *ChemBioChem*, 11, 1594-1599.
- Liaimer i in., 2016, *Front. Microbiol.*, 7, 1963.
- Herfindal i in., 2011, *Mol. Pharm.*, 8, 360-367.