

## Molekularne podstawy biosyntezy fumonizyn\*

Agnieszka Gałązka<sup>1</sup>, Marcin Wit<sup>2</sup>, Emilia Jabłońska<sup>2</sup>, Wojciech Wakuliński<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin SGGW,

ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa

<sup>2</sup> Katedra Fitopatologii SGGW,

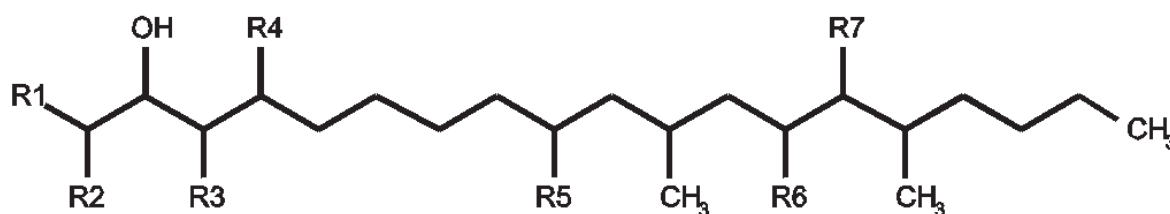
Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa

e-mail: wojciech\_wakulinski@sggw.pl

**Słowa kluczowe:** *Fusarium*, fumonizyny, geny FUM

### Wstęp

Fumonizyny pod względem chemicznym stanowią rodzinę pochodnych diestru kwasu propano-1,2,3-trikarboksylowego i 2-amino-12,16-dimetylo-3,5,10,14,15-pentahydroksy-eikozanu (rys.1). W zależności od występujących podstawników przy 1, 2, 4, 5, 10, 14 oraz 15 atomie węgla związki te dzieli się na fumonizyny serii A, B, C i P (tab. 1). Zwyczajowa nazwa tej grupy metabolitów pochodzi od gatunku grzyba - *Fusarium moniliforme* SHELDON (obecnie *Fusarium verticillioides* (SACCARDO) NIRENBERG, teleomorfa *Gibberella moniliformis* WINELAND), w pleśze którego po raz pierwszy stwierdzono występowanie fumonizyny FB<sub>1</sub>. Zdolność do biosyntezy metabolitów z grupy fumonizyn opisano jak dotąd u dość wąskiej grupy grzybów, obejmującej głównie gatunki *Fusarium* [19]. Z uwagi na powszechne porażanie roślin z rodziny *Gramineae*, w tym zbóż, podkreślane jest znaczenie zwłaszcza: *Fusarium verticillioides* [13, 20, 38] oraz *Fusarium proliferatum* [15, 16], które charakteryzuje



Rysunek. 1. Struktura szkieletu fumonizyn

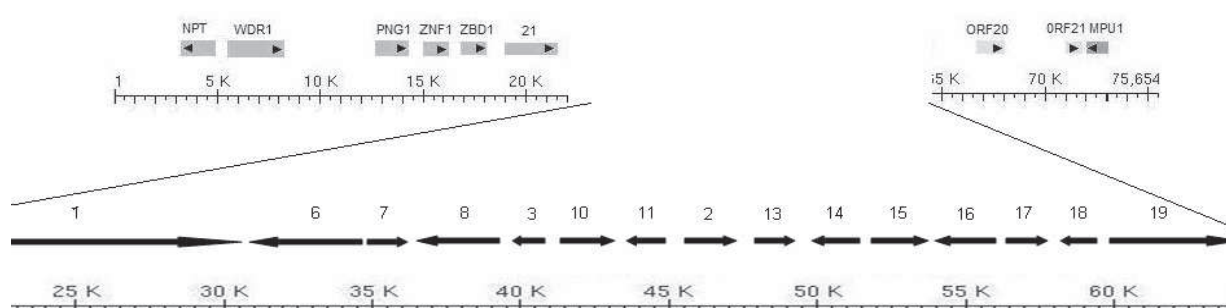
\* Praca realizowana w ramach projektu MNiSW Nr NN 310 3769 33.

Tabela 1. Analogi fumonizyny ([29] zmienione)

Fumonizyna	Seria	Występujące rodniki						
		R7	R6	R5	R4	R3	R2	R1
FA1	A	TCA	TCA	OH	OH	H	NHCOCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
FA2	A	TCA	TCA	H	OH	H	NHCOCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
FA3	A	TCA	TCA	OH	H	H	NHCOCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
PHFA3A	A	TCA	OH	OH	H	H	NHCOCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
PHFA3B	A	OH	TCA	OH	H	H	NHCOCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
HFA3	A	OH	OH	OH	H	H	NHCOCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
FAK1	A	OH	TCA	OH	OH	H	NHCOCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
FBK1	B	OH	TCA	OH	OH	H	NH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>
FB1	B	TCA	TCA	OH	OH	H	NH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>
ISO-FB1	B	TCA	TCA	OH	H	OH	NH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>
PHFB1A	B	TCA	OH	OH	OH	H	NH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>
PHFB1B	B	OH	TCA	OH	OH	H	NH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>
HFB1	B	OH	OH	OH	OH	H	NH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>
FB2	B	TCA	TCA	H	OH	H	NH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>
FB3	B	TCA	TCA	OH	H	H	NH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>
FB4	B	TCA	TCA	OH	H	H	NH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>
FC1	C	TCA	TCA	OH	OH	H	NH <sub>2</sub>	H
N-ACETYL-FC1	C	TCA	TCA	OH	OH	H	NHCOCH <sub>3</sub>	H
ISO-FC1	C	TCA	TCA	OH	H	OH	NH <sub>2</sub>	H
N-ACETYL-ISO-FC1	C	TCA	TCA	OH	H	OH	NHCOCH <sub>3</sub>	H
OH-FC1	C	TCA	TCA	OH	OH	OH	NH <sub>2</sub>	H
N-ACETYL-OHFC1	C	TCA	TCA	OH	OH	OH	NHCOCH <sub>3</sub>	H
FC3	C	TCA	TCA	OH	H	H	NH <sub>2</sub>	H
FC4	C	TCA	TCA	H	H	H	NH <sub>2</sub>	H
FP1	P	TCA	TCA	OH	OH	H	3HP	CH <sub>3</sub>
FP2	P	TCA	TCA	H	OH	H	3HP	CH <sub>3</sub>
FP3	P	TCA	TCA	OH	H	H	3HP	CH <sub>3</sub>

TCA – kwas trójkarboksylowy.

wyjątkowo wysoki poziom syntetyzowanych mykotoksyn z omawianej grupy [29]. Zdolność do syntezy fumonizyn rozpoznano także u *Alternaria alternata* f.sp. *lycopersici* [29] oraz *Aspergillus niger* [11]. Powodem, dla którego fumonizynom poświęca się tak dużo uwagi, jest ich toksyczność. Metabolity te inhibują biosyntezę ceramidów, będących prekursorem sfingolipidów oraz sfingoglikolipidów, powstających w procesie acylacji sfinganiny przy udziale syntazy dihydroceramidu [40]. Fumonizyny jako strukturalne analogi sfinganiny łączą się z wspomnianym enzymem (syntazą dihydroceramidu) blokując tym samym acylację właściwego substratu (sfinganiny), a w konsekwencji powstanie dihydroceramidu [25, 34, 39]. Pochodne ceramidu powszechnie występują w tkankach układu nerwowego. Sfingofosfolipidy stanowią



**Rysunek 2.** Klaster genów biosyntezy fumonizyn *Fusarium verticillioides*. Grot strzałki wskazuje kierunek transkrypcji, a jej długość wielkość genu. Numery nad strzałkami oznaczają kolejne geny *FUM* ([9] zmienione)

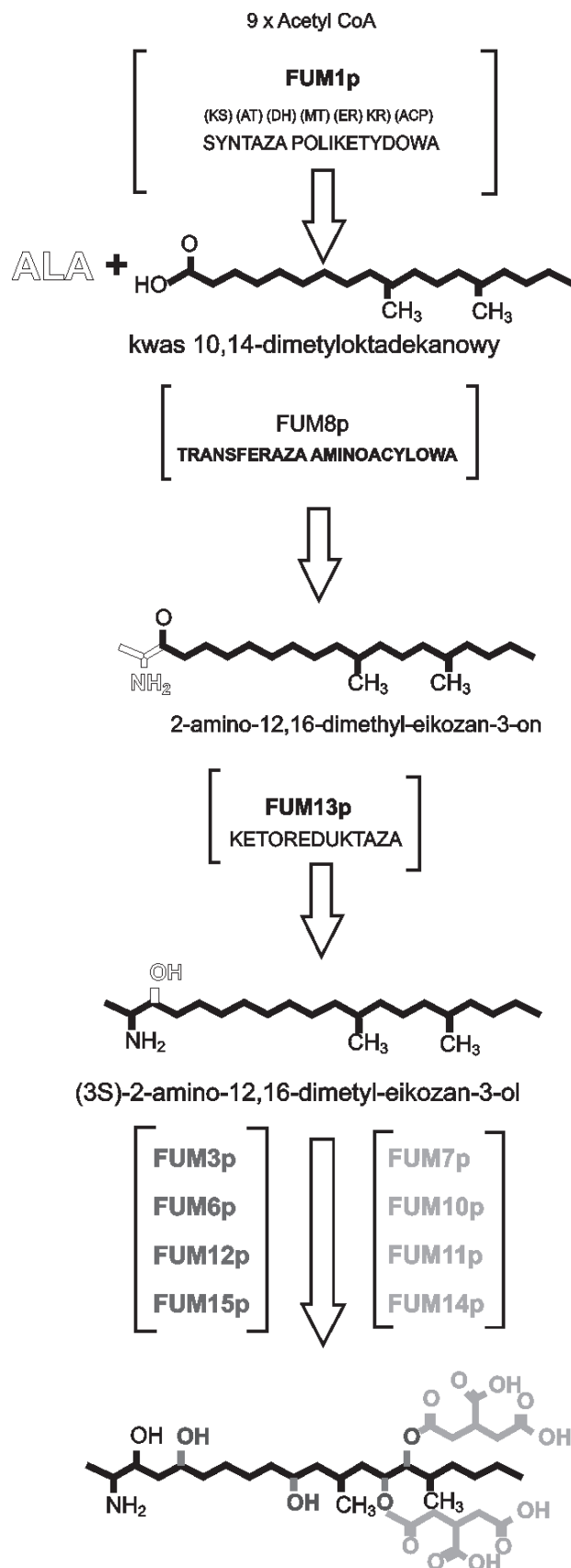
główny komponent osłonki mielinowej, natomiast sfingoglikolipidy wchodzą w skład błon komórkowych substancji szarej mózgu [18]. Następstwem destabilizacji szlaku biosyntezy tych związków u ssaków są między innymi zaburzenia neurologiczne włącznie z uszkodzeniem mózgu przy dużych dawkach fumonizyny B<sub>1</sub> [22, 24, 34]. Fumonizyny wykazują ponadto właściwości hepatotoksyczne [14, 30] i nefrotoksyczne [32]. W wymiarze ekologicznym sens biosyntezy fumonizyn przez *Fusarium* spp. jako fitopatogenów związany jest z powszechnym występowaniem sfingolipidów w błonach komórkowych roślin [7, 17, 35]. U *Arabidopsis thaliana* zdecydowaną większość stanowią dwie pochodne: glikolizowa forma inozytolfosforylceramidu (64%) oraz glukozylceramid (34%), które wraz z pozostałymi lipidami tworzą czuły układ sensoryczny komórek roślinnych [21]. Jak stwierdzono ceramidy hamują proliferację komórek oraz uczestniczą w procesie ich zaprogramowanej śmierci [31, 44].

Biosynteza fumonizyn warunkowana jest klastrem złożonym z 15 genów (rys. 2). Poszczególne geny kodują odpowiednio: syntazę poliketydu (*FUM1*, wcześniej opisywany jako *FUM5*), trzy monooksygenazy cytochromu P450 (*FUM6*, *FUM12*, *FUM15*), dwie dehydrogenazy (*FUM7*, *FUM13*), aminotransferazę (*FUM8*), dioksygenazę (*FUM3*, początkowo nazywany *FUM9*), syntetazę acylo-CoA (*FUM14*), czynniki długowieczności (*FUM17*, *FUM18*) i transpoter ABC (*FUM19*) [2, 26].

## Przebieg syntezy podstawowego szkieletu fumonizyn

Pierwszym etapem biosyntezy fumonizyn (rys. 3) jest synteza 18 węglowego fragmentu szkieletu C<sub>3</sub>-C<sub>20</sub> z octanu, który jest katalizowany przez syntazę poliketydową (PKS) kodowaną przez gen *FUM1* [9, 27]. Syntazy poliketydowe grzybów należą do tak zwanych PKS typu I. Są one enzymami modularnymi składającymi się z pojedynczego zestawu domen [36]. Domeny te działają iteracyjnie, czyli wielokrotnie podczas montowania łańcucha poliketydu.

Do iteracyjnych PKS typu I należy także syntaza fumonizyn, która składa się z bardzo dużego wielofunkcyjnego białka z 7 domenami katalitycznymi [8]. Są nimi w kolejności od N-końca: syntaza ketydowa (KS), acylotransferaza (AT), dehydrataza



### Fumonizyna B1

Rysunek 3. Szlak biosyntezy fumonizyny ([4] zmienione)

(DH), metylotransferaza (MT), reduktaza enoilowa (ER), ketoreduktaza (KR) i białkowy nośnik reszt acylowych (ACP). Przedstawiony układ domen jest charakterystyczny dla PKS klasy HR (**highly reducing**), które biorą udział w syntezie poliketydów wysoce zredukowanych o dużym stopniu złożoności. W porównaniu z innymi PKS nie występują domeny szablonu produktów (PT, ang. **product template**) i transacylazy białkowego przenośnika reszt acylowych (SAT, ang. **starter unit ACP transacylase**) charakterystyczne dla NR PKS (ang. **non-reducing PKS**) oraz domeny rdzenia obecne w PR PKS (ang. **partially reducing PKS**) [8]. Z uwagi na funkcje, które pełnią domeny syntazy fumonizyn można podzielić na 3 grupy:

- **Domeny biorące udział w reakcjach kondensacji**, do których zalicza się: acylotransferazę, białkowy przenośnik reszt acylowych oraz syntazę ketydową. Acylotransferaza odpowiada za ładowanie startera, acylowych jednostek wydłużających i metabolitów pośrednich. Białkowy nośnik reszt acylowych (ACP) utrzymuje rosnący łańcuch poliketydowy w postaci estru tiolowego (kompleks KS-S-poliketyd). Syntaza ketydowa jest domeną odpowiedzialną za katalizę tworzenia wiązań C-C podczas elongacji łańcucha poliketydu między starterem/metabolitami pośrednimi a jednostkami wydłużającymi. Wszystkie syntazy kwasów tłuszczowych (FASs) oraz syntazy poliketydowe (PKSs) muszą mieć aktywność KS [8] aczkolwiek sama domena KS nie wystarcza do kontroli długości produktu [46].
- **Domeny uczestniczące w redukcji grup  $\beta$ -ketonowych** obejmują ketoreduktazę, dehydratazę oraz reduktazę enoilową. Ketoreduktaza redukuje grupy  $\beta$ -ketonowe do grup hydroksylowych. Dehydrataza odpowiada za redukcję grup hydroksylowych do grup enolowych, a reduktaza enoilowa za redukcję grup enolowych do grup alkilowych.
- **Domeny modyfikujące łańcuch po kondensacji**. Rozpoznaną jak dotychczas jest jedynie metylotransferaza, która warunkuje dodawanie grup metylowych do produktów pośrednich. Jak wynika z badań Yu i in. [42] punktowa mutacja miejsca aktywnego domeny MT FUM prowadziła do inaktywacji Fum1p, a w wypadku zachowania aktywności metabolit pośredni wytwarzany przez zmutowany punktowo Fum1p nie był rozpoznawany przez pozostałe enzymy szlaku biosyntezy fumonizyn, takie jak Fum8p i Fum6p lub stawał się substratem w szlakach metabolicznych kwasów tłuszczowych, np.  $\beta$ -oksydacji.

Syntazy poliketydowe są strukturalnie i funkcjonalnie związane z syntazami kwasów tłuszczowych, obie klasy enzymów katalizują kondensację aktywowanych metabolitów pierwotnych (acetylo-CoA i malonylo-CoA) do formy polimerów  $\beta$ -ketoacylowych połączonych z enzymem poprzez wiązanie tioestrowe [1]. PKSs używają tych samych szlaków reakcji chemicznych co FAS. Zarówno FASs jak i PKSs kontrolują długość łańcucha, ale PKSs mają także wpływ na starter i jednostkę wydłużającą, stopień redukcji podczas każdego cyklu kondensacji oraz zakres metylacji łańcucha.

Przebieg syntezy podstawowego szkieletu fumonizyn przy udziale PKS wygląda następująco: Aktywowany acylowy starter jest przenoszony na AT. Podczas tego etapu wiązanie tioestrowe pomiędzy CoA a octanem jest rozrywane, a nowe jest tworzone pomiędzy octanem (grupą acetylową) a domeną AT. Z domeny AT starter jest następnie przenoszony na KS. Transport startera zachodzi przy udziale domeny ACP posiadającej grupę prostetyczną i wymaga utworzenia wiązania tioestrowego pomiędzy grupą acetylową a białkiem [23]. Acetylowy starter obecny na domenie KS reaguje z malonylową jednostką wydłużającą znajdującą się na domenie ACP poprzez atak nukleofilowy. Wskutek tej reakcji następuje utrata CO<sub>2</sub> dodanego do acylo-CoA podczas aktywacji i powstaje wiązanie C-C pomiędzy starterem a jednostką wydłużającą [27]. Kluczowym etapem tworzenia wiązania C-C w biosyntezie poliketydów i kwasów tłuszczowych jest reakcja dekarboksylacji zachodząca pomiędzy tioestrem octanu i tioestrem malonylu [36]. Reakcja ta jest katalizowana przez KS. Utworzony diketyd może być substratem dla KR, która katalizuje reakcję redukcji grupy β-ketonowej (-C(=O)-C) do grupy hydroksylowej (-C(-OH)-C); powstaje alkohol drugorzędowy. Grupa hydroksylowa może podlegać dalszej redukcji przez DH do grupy enolowej (-C=C-), co daje formę nienasyconego tioestru. Po redukcji grupy enolowej do grupy alkilowej (-C-C-) w reakcji katalizowanej przez ER powstaje całkowicie nasycony tioester. Na tym etapie syntezy metabolit pośredni może podlegać metylacji prowadzonej przez MT, co ma miejsce podczas biosyntezy fumonizyn. Grupa metylowa pochodzi z S-adenozylometioniny (SAM). Po zakończeniu reakcji redukcji i modyfikacji diketyd jest przenoszony z domeny ACP z powrotem na domenę KS, ponownie jednostka wydłużająca jest załadowywana na domenę ACP. Proces ten powtarza się określoną ilość razy (determinowaną przez PKS) [8]. Ze względu na iteracyjne i selektywne użycie poszczególnych domen w iteracyjnych PKS typu I obecnie nie jest możliwe przewidywanie liczby podjednostek ketydowych lub ich stanu redukcji jedynie na podstawie wiedzy o białkach PKSs lub sekwencji DNA, aczkolwiek podejmowane są próby analiz *in silico* w celu lepszego poznania mechanizmów biosyntezy poliketydów.

### Kondensacja poliketydu C<sub>3</sub>-C<sub>20</sub> z alaniną

Ponieważ HR PKSs grzybów nie mają domeny tioesterazy/cyklazy zatem uwolnienie kowalentnie związanego poliketydu z PKS musi polegać na mechanizmie innym niż hydroliza zależna od tioesterazy/cyklazy. W biosyntezie fumonizyn funkcję tę pełni syntaza α-oksoaminy, przy udziale którego to enzymu dochodzi do ataku nukleofilowego Cα alaniny na C grupy karbonylowej kompleksu poliketyd acyl-S-PKS. Reakcja ta nie tylko uwalnia łańcuch poliketydu, ale także dodaje dwa końcowe węgle i grupę aminową fumonizyn [3, 45, 46].

Syntaza  $\alpha$ -oksoaminy kodowana jest przez *FUM8* i zbudowana z ok. 839 aminokwasów. Białko to wykazuje znaczne podobieństwo sekwencji do grupy aminotransferaz zależnych od pirofosforanu, katalizujących reakcję kondensacji aminokwasu i acylo-CoA. Składa się ono z dwóch domen (domeny A i B). Domena A Fum8p przypomina podjednostkę 2 palmitylotransferazy serynowej, a domena B – podjednostkę 1 tego enzymu [12, 33]. Wiadomo, że białko Fum8p jest prawdopodobnie homologiem palmitylotransferazy serynowej, pierwszego enzymu szlaku biosyntezy sfingolipidów, zaangażowanej w proces syntezy 3-ketosfinganiny z seryny i palmityno-CoA. Przyjęto zatem, że białko Fum8p bierze udział w reakcji kondensacji alaniny i formy pośredniej 10,14-dimetylo-oktadecyltioestru z grupą ketonową C-3 [33]. W wyniku tej reakcji powstawałby substrat dla enzymu kodowanego przez *FUM13* [41].

## Udział oksygenaz w procesie syntezy fumonizyn

Procesy hydroksylacji zachodzą na różnych etapach syntezy fumonizyn. Na podstawie badań przeprowadzonych przez Caldas i in. [6] z użyciem  $^{18}\text{O}_2$  i  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  określono, że atomy tlenu przy C-5, C-10, C-14 i C-15 poliketydu pochodzą z tlenu cząsteczkowego włączanego do łańcucha z udziałem monooksygenaz (*FUM6*, *FUM12* i *FUM15*) i dioksygenazy (*FUM3*). Oksygenazy te zużywają tlen cząsteczkowy do katalizy tworzenia grup hydroksylowych [5, 26]. Fumonizyny  $\text{FB}_3$  i  $\text{FB}_4$  nie mają tlenu przy C-5, dlatego jest on najprawdopodobniej dodawany po ich syntezie.

*FUM6* koduje monooksygenazę cytochromu P450, ale niewiele wiadomo na temat roli genu *FUM6* w biosyntezie fumonizyn, ponieważ jego inaktywacja prowadzi do zablokowania produkcji mykotoksyn bez akumulacji jakichkolwiek metabolitów pośrednich [9]. Jak podają Seo i in. [33] w Fum6p nastąpiło połączenie funkcji monooksygenazy i reduktazy w jednym białku. Jest to zjawisko bardzo rzadkie i występuje jeszcze tylko w trzech przypadkach, tj. P450 foxy u *Fusarium oxysporum*, P450 u *Bacillus megaterium* i YrhJ u *B. subtilis*. Sztuczna fuzja tych dwóch domen zwiększała aktywność enzymów, prawdopodobnie poprzez wytworzenie pomiędzy nimi wiązania kowalencyjnego [37]. Wyniki badań hodowli mutantów *FUM1*, *FUM6* i *FUM8* w kokulturze wskazują, że *FUM6p* jest najprawdopodobniej odpowiedzialny za utlenianie produktu reakcji kondensacji katalizowanej przez Fum8p po stereospecyficznym redukcji grupy ketonowej C-3 powstałego związku pośredniego do grupy hydroksylowej przy udziale reduktazy Fum13p [3]. Hydroksylacji ma ulegać C-14 i C-15 szkieletu fumonizyn. Butchko i in. [4] sugerują, że przed procesem tym ma miejsce redukcja grupy ketonowej C-3.

Innymi genami kodującymi enzymy należące do rodziny monooksygenaz cytochromu P450 i odpowiedzialnymi za reakcje utleniania szkieletu fumonizyn są *FUM12* i *FUM15* [26]. Wiadomo już, że gen *FUM12* odpowiada za reakcję hydroksylacji C-10, a mutanty *FUM12* wytwarzają  $\text{FB}_2$  i  $\text{FB}_4$  nie mające grupy hydroksylowej przy C-10 [28].

Gen *FUM3* o długości 903 pz koduje dioksygenazę C-5 (ang. fumonisin 5-oxygenase), białko o masie 33 kDa zbudowane z 300 aminokwasów. Enzym ten należy do rodziny dioksygenaz biorących udział w szerokim zakresie przemian substratów, m.in. hydroksylacji, desaturacji i epoksydacji, przy użyciu tlenu cząsteczkowego i 2-ketoglutaranu jako kosubstratów oraz jonów żelaza (II) jako kofaktorów [10]. Enzym ten ma wysoce zakonserwowane wśród rodziny dioksygenaz motywy histydynowe HIS-1 i HIS-2. Reszty aminokwasowe H<sub>146</sub>, D<sub>148</sub> i H<sub>221</sub> białka Fum3p mogą stanowić miejsce aktywne enzymu wiążące ligand w postaci Fe<sup>2+</sup>. Inaktywacja tego genu prowadzi do spadku ilości wytwarzanych fumonizyn FB<sub>1</sub> i FB<sub>2</sub> oraz akumulacji FB<sub>3</sub> i FB<sub>4</sub> pozbawionych grupy hydroksylowej przy C-5 [5, 9]. Z badań przeprowadzonych przez Ding i in. [10] wynika, że produkt ekspresji genu *FUM3*, jest dioksygenazą zależną od 2-ketoglutaranu odpowiedzialną za hydroksylację C-5 fumonizyn. Enzym Fum3p był zdolny do konwersji FB<sub>3</sub> do FB<sub>1</sub>, ale nie FB<sub>4</sub> do FB<sub>2</sub>. Wydaje się, że czynnikiem niezbędnym dla aktywności tej dioksygenazy jest obecność grupy hydroksylowej przy C-10. Enzym odpowiedzialny za dodanie grupy hydroksylowej C-5 FB<sub>2</sub> nie został zidentyfikowany. Ostatnim etapem biosyntezy fumonizyn, jak się przypuszcza jest hydroksylacja C-5 katalizowana przez białko Fum3p, prowadząca do przekształcenia FB<sub>3</sub> do FB<sub>1</sub>, a FB<sub>4</sub> do FB<sub>2</sub> [4, 5, 10, 43].

## Redukcja grupy ketonowej

Gen *FUM13* koduje reduktazę karbonylową przy C-3 (ang. C3- carbonyl reductase) należąca do rodziny dehydrogenaz/reduktaz łańcuchów krótkich (SDR, ang. short chain dehydrogenases/reductases). Jest to enzym o długości 369 aminokwasów katalizujący reakcję redukcji grupy ketonowej C-3 do grupy hydroksylowej. Proces ten musi mieć miejsce we wczesnym etapie biosyntezy, ponieważ inaktywacja *FUM13* prowadzi do znacznego spadku produkcji fumonizyn oraz akumulacji homologów fumonizyny FB<sub>3</sub> i FB<sub>4</sub> mających grupę ketonową przy C-3, stanowiących w mutantach 60–80% ogólnej liczby fumonizyn FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub> i FB<sub>3</sub> [5]. Ponadto metabolity pośrednie z grupą ketonową C-3 (2-amino-3-okso-12,16-dimetyloeikozan) i z grupą hydroksylową C-3 (2-amino-3-hydroksy-12,16-dimetyloeikozan) były obecne w kokulturach mutantów *FUM1-FUM6* oraz *FUM8-FUM6* [3]. Za występowaniem reakcji ketoredukcji C-3 na wczesnym etapie biosyntezy mykotoksyn przemawia także fakt komplementacji genu *TSC10* drożdży, kodującego reduktazę 3-ketosfinganiny w biosyntezie sfingolipidów, przez *FUM13* [5, 41].

Akumulacja 3-keto FB<sub>3</sub> i 3-keto FB<sub>4</sub>, a nie FB<sub>1</sub> ani FB<sub>2</sub>, wskazuje, że podczas biosyntezy fumonizyn redukcja grupy ketonowej/karbonylowej C-3 występuje przed hydroksylacją C-5. Grupa hydroksylowa C-5 nie występuje w FB<sub>3</sub>, FB<sub>4</sub> i ich 3-keto homologach, ale jest obecna w FB<sub>1</sub> i FB<sub>2</sub>. Węgiel 10 szkieletu fumonizyn może być hydroksylowany niezależnie od redukcji grupy hydroksylowej C-3 [5].



## Estryfikacja poliketydu

Genami kodującymi białka biorące udział w reakcjach estryfikacji poliketydu są geny *FUM7*, *FUM10*, *FUM11* i *FUM14*. Estry powstają pomiędzy dwoma cząsteczkami kwasu propano-1,2,3-trikarboksylowego a grupami hydroksylowymi C-14 i C-15 poliketydu [43]. Inaktywacja *FUM10*, *FUM11* i *FUM14* powoduje powstawanie homologów fumonizyn FB<sub>3</sub> i FB<sub>4</sub> nie mających jednej lub obu grup trikarboksylowych, co świadczy o roli tych genów w estryfikacji C-14 i C-15 szkieletu fumonizyn [9].

*FUM7* koduje białko złożone z 424 aminokwasów o sekwencji zbliżonej do dehydrogenaz alkoholowych. Jego inaktywacja prowadzi do wytwarzania produktów pośrednich szlaku z podwójnymi wiązaniami pomiędzy dwoma atomami węgla w estrach kwasów trikarboksylowych [9]. Butchko i in. [4] zakładają, że jeśli prekursorem grupy estrowej jest cytrynian, dehydrogenaza *FUM7* mogłaby usuwać grupę hydroksylową C-3 cytrynianu i tworzyć w ten sposób formę kwasu trikarboksylowego.

*FUM10* koduje białko zbudowane z 493 aminokwasów o sekwencji podobnej do syntetaz acylo-CoA, tak jak gen *FUM16*. Prawdopodobnie katalizują one aktywację albo poliketydu fumonizyn albo prekursora estru trikarboksylowego za pomocą CoA [26].

Gen *FUM11* koduje białko długości 511 aminokwasów pełniące prawdopodobnie funkcję transportera kwasów trikarboksylowych, prekursorów grup estrowych fumonizyn, z wnętrza mitochondriów, gdzie byłyby produkowane w cyklu Krebsa, do cytoplazmy, w której ma miejsce szlak biosyntezy mykotoksyn [4, 9, 26].

Białkiem kodowanym przez *FUM14* jest nierybosomalna syntetaza peptydu (NRPS, ang. **n**onribosomal **p**eptide **s**ynthetase) mająca dwie domeny, domenę PCP (ang. **p**eptidyl **c**arrier **p**rotein) i domenę C (ang. **c**ondensation **d**omain). Produkt genu *FUM14*, białko Fum14p, jest bezpośrednio zaangażowany w reakcję estryfikacji fumonizyn, o czym świadczy fakt występowania u mutantów metabolitów pośrednich HFB<sub>3</sub> i HFB<sub>4</sub> charakteryzujących się brakiem grup estrowych. Ponadto Fum14p stanowi pierwszy przykład białka z rodziny NRPS, którego domena kondensacyjna katalizuje tworzenie wiązania estrowego C-O, zamiast wiązania amidowego C-N peptydów. Zaleta-Rivera i in. [43] sugerują, że geny *FUM7*, *FUM10* i *FUM14* mogą kodować czterodomenowy kompleks NRPS, A-PCP-C-R. Sekwencja aminokwasowa *FUM10* przypomina domenę adenylacji NRPS (A), *FUM14* ma domeny PCP i C, a *FUM7* należy do rodziny dehydrogenaz/reduktaz i może stanowić domenę reduktazy (R). Zaproponowali oni również następujący mechanizm estryfikacji fumonizyn. Białko Fum10p katalizuje reakcję aktywacji zależnej od ATP trikarboksylowego substratu do formy acylo-AMP. Substratem dla Fum10p jest metabolit cyklu Krebsa, najprawdopodobniej kwas cytrynowy. W tej formie grupa acylowa TCA jest przenoszona na domenę PCP białka Fum14p. Następnie domena C łączyłaby acylo-S-PCP i szkielet poliketydowy HFB<sub>3</sub> i HFB<sub>4</sub>. Produktem tej kondensacji byłyby didehydro-FB<sub>3</sub> i didehydro-FB<sub>4</sub>. Białko Fum7p redukowałoby podwójne

wiązanie w pochodnych didehydro, wytwarzając tym samym FB<sub>3</sub> i FB<sub>4</sub> [43]. Badania *in vitro* Butchko i in. [4] z tetrahydro-FB<sub>1</sub> wskazują jednak, że produkt *FUM7* musi działać przed estryfikacją zachodzącą przy udziale *FUM14p*.

## Aktywność pozostałych genów klastra FUM

Geny *FUM1*, *FUM3*, *FUM6*, *FUM7*, *FUM8*, *FUM10*, *FUM13* i *FUM14* są niezbędne w biosyntezie fumonizyn a ich inaktywacja prowadzi albo do całkowitego zahamowania syntezy albo do znacznej redukcji zawartości metabolitu.

Geny *FUM17*, *FUM18* i *FUM19* pełnią prawdopodobnie funkcje ochronne przed niekorzystnym działaniem wytwarzanych toksyn na struktury grzyba. Z analizy sekwencji genu *FUM19* wynika, że jest to transpoter ABC (ang. ATP-binding cassette). Białko to może działać jako pompa usuwająca fumonizyny z cytoplazmy na zewnątrz komórki [9, 26].

Geny *FUM17* i *FUM18* kodują podobne do siebie białka złożone z 388 aminokwasów i 427 aminokwasów, które swoją sekwencją przypominają gen *ASC-1* pomidora (tomato longevity assurance factor) [9].

Funkcja inaktywowanych genów *FUM17*, *FUM18* i *FUM19* może być przynajmniej częściowo kompensowana przez białka o podobnej funkcji wytwarzane przez *Fusarium verticillioides* [9].

Często klastry genów biosyntezy metabolitów wtórnych grzybów zawierają specyficzne dla szlaku geny regulujące, zwykle są to czynniki transkrypcyjne wiążące DNA. U *F. verticillioides* scharakteryzowano dotychczas dwa geny regulujące transkrypcję, ale znajdują się one poza klastrem. Należą do nich *FCCI* (*Fusarium cyclin C1*) oraz *ZFR1* (Zinc binuclear cluster transcription factor). *FCCI* koduje cyklinę typu C. Inaktywacja genu *FCCI* blokuje wytwarzanie FB<sub>1</sub>, ale wpływa również na rozwój grzyba i jego metabolizm wtórny. Gen odpowiada zatem za regulację ekspresji wielu genów, m.in. genów *FUM*, u *F. verticillioides*. Gen *ZFR1* jest za to specyficzny dla szlaku biosyntezy fumonizyn, o czym świadczy 10-krotna redukcja ilości FB<sub>1</sub> w mutantach [2].

## Podsumowanie

Fumonizyny to grupa mikotoksyn wytwarzana głównie przez dwa gatunki *Fusarium*: *F. verticillioides* oraz *F. proliferatum*. Pod względem chemicznym są to pochodne diestru kwasu propanotrikarboksylowego oraz ikozanu. Tworzą one rodzinę ponad 25 związków różniących się podstawnikami, przy czym najpowszechniej stwierdza się występowanie fumonizyn z grupy B (FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub> i FB<sub>3</sub>). Strukturalne podobieństwo fumonizyn do sfinganiny, będącej składnikiem błon komórkowych, decyduje o ich toksyczności w stosunku do różnych grup organizmów. Biosynteza

tych związków jest warunkowana zespołem funkcjonalnie powiązanych genów tworzących tak zwany klaster FUM. Kompleks ten tworzy 15 genów, przy czym jedynie cztery z nich (*Fum1*, *Fum8*, *Fum10* oraz *Fum16*) odpowiadają za syntezę podstawowego szkieletu fumonizyn. Jego struktura jest następnie enzymatycznie modyfikowana przy udziale monooksygenaz (*Fum6p*, *Fum12p* i *Fum15p*), dioksygenaz (*Fum3p*) oraz reduktaz (*Fum13p*). Ekspresja genów klastra FUM jest warunkowana wspólnym lokalnym czynnikiem transkrypcyjnym aktywowanym poprzez regulatory globalne, aktywność których jest uzależniona od podaży azotu, węgla oraz stężenia jonów wodorowych.

## Literatura

- [1] Bingle L.E.H., Simpson T.J., Lazarus C.M. 1999. Ketosynthase domain probes identify two subclasses of fungal polyketide synthase genes. *Fungal Genet. Biol.* 26: 209–223.
- [2] Bluhm B.H., Woloshuk C.P. 2005. Amylopectin induces fumonisin B1 production by *Fusarium verticillioides* during colonization of maize kernels. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 18: 1333–1339.
- [3] Bojja R.S., Cerny R.L., Proctor R.H., Du L. 2004. Determining the biosynthetic sequence in the early steps of the fumonisin pathway by use of three gene-disruption mutants of *Fusarium verticillioides*. *J. Agric. Food Chem.* 52: 2855–2860.
- [4] Butchko R.A.E., Plattner R.D., Proctor R.H. 2006. Deletion analysis of FUM genes involved in tricarballic ester formation during fumonisin biosynthesis. *J. Agric. Food Chem.* 54: 9398–9404.
- [5] Butchko R.A.E., Plattner R.D., Proctor R.H. 2003. *FUM13* encodes a short chain dehydrogenase/reductase required for C-3 carbonyl reduction during fumonisin biosynthesis in *Gibberella moniliformis*. *J. Agric. Food Chem.* 51: 3000–3006.
- [6] Caldas E.D., Sadilcova K., Ward B.L., Jones A.D., Winter C.K., Gilchrist D.G. 1998. Biosynthetic studies of fumonisin B1 and AAL toxins. *J. Agric. Food Chem.* 46: 4734–4743.
- [7] Chen M., Han G., Dietrich C.R., Dunn T.M., Cahoone E.B. 2006. The essential nature of sphingolipids in plants as revealed by the functional identification and characterization of the arabidopsis *lcb1* subunit of serine palmitoyltransferase. *Plant Cell* 18: 3576–3593.
- [8] Cox R.J. 2007. Polyketides, proteins and genes in fungi: programmed nano-machines begin to reveal their secrets. *Org. Biomol. Chem.* 5: 2010–2026.
- [9] Desjardins A.E. 2006. *Fusarium* mycotoxins. Chemistry, genetics, and biology. The American Phytopathological Society (APS Press), St. Paul, Minnesota USA: 260 ss.
- [10] Ding Y., Bojja R.S., Du L. 2004. *Fum3p*, a 2-ketoglutarate-dependent dioxygenase required for C-5 hydroxylation of fumonisins in *Fusarium verticillioides*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 1931–1934.
- [11] Frisvad J.C., Smedsgaard J., Samson R.A., Larsen T.O., Thrane U. 2007. Fumonisin B2 Production by *Aspergillus niger*. *J. Agric. Food Chem.* 55: 9727–9732.
- [12] Gerber R., Lou L., Du L. 2009. A PLP-dependent polyketide chain releasing mechanism in the biosynthesis of mycotoxin fumonisins in *Fusarium verticillioides*. *J. Am. Chem. Soc.* 131: 3148–3149.
- [13] Ghiasian S.A., Maghsood A.H., Yazdanpanah H., Shephard G.S., Westhuizen Z., Vismer H.F., Rheeder J.P., Marasas W.F.O. 2006. Incidence of *Fusarium verticillioides* and levels of fumonisins in corn from main production areas in Iran. *J. Agric. Food Chem.* 54: 6118–6122.
- [14] He Q., Suzuki H., Sharma N., Sharma R.P. 2006. Ceramide synthase inhibition by Fumonisin B1 treatment activates sphingolipid-metabolizing systems in mouse liver. *Toxicol. Sci.* 94: 388–397.
- [15] Jurado M., Marín P., Callejas C., Moretti A., Vázquez C., González-Jaén M.T. 2010. Genetic variability and fumonisin production by *Fusarium proliferatum*. *Food Microbiol.* 27: 50–57.
- [16] Kohut G., Ádám A.L., Fazekas B., Hornok L. 2009. N-starvation stress induced FUM gene expression and fumonisin production is mediated via the HOG-type MAPK pathway in *Fusarium proliferatum*. *Int. J. Food Microbiol.* 130: 65–69.
- [17] Lynch D.V., Dunn T.M. 2004. An introduction to plant sphingolipids and a review of recent advances in understanding their metabolism and function. *New Phytologist* 161: 677–702.

- [18] Lahiri S., Futerman A.H. 2007. The metabolism and function of sphingolipids and glycosphingolipids. *Cell. Mol. Life Sci.* 64: 2270–2284.
- [19] Logrieco A., Bottalico A., Mulé G., Moretti A., Perrone G. 2003. Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. *Eur. J. Plant Pathol.* 109: 645–667.
- [20] Maheshwar P.K., Moharram S.A., Janardhana G.R. 2009. Detection of fumonisin producing *Fusarium verticillioides* in paddy (*Oryza sativa* L.) using polymerase chain reaction (PCR). *Braz. J. Microbiol.* 40: 134–138.
- [21] Markham J.E., Li J., Cahoon E.B., Jaworski J.G. 2006. Separation and identification of major plant sphingolipid classes from leaves. *J. Biol. Chem.* 281: 22684–22694.
- [22] Missmer S.A., Suarez L., Felkner M., Wang E., Merrill A.H.Jr., Rothman K.J., Hendricks K.A. 2006. Exposure to fumonisins and the occurrence of neural tube defects along the Texas-Mexico border. *Environ. Health Perspect.* 114: 237–241.
- [23] Nelson D.L., Cox M.M. 2005. Lehninger Principles of biochemistry, fourth edition. W H Freeman & Co, USA: 1100 ss.
- [24] Osuchowski M.F., Gaylen L.E., Sharma R.P. 2005. Fumonisin B1-induced neurodegeneration in mice after intracerebroventricular infusion is concurrent with disruption of sphingolipid metabolism and activation of proinflammatory signaling. *Neurotoxicology* 26: 211–221.
- [25] Pankova-Kholmyansky I., Futerman A.H. 2006. Ceramide Synthase. W: Hirabayashi Y., Igarashi Y., Merrill A.H.Jr. (red.) Sphingolipid biology. Tokyo, Springer-Verlag: 49–56.
- [26] Proctor R.H., Brown D.W., Plattner R.D., Desjardins A.E. 2003. Co-expression of 15 contiguous genes delineates a fumonisin biosynthetic gene cluster in *Gibberella moniliformis*. *Fungal Genet. Biol.* 38: 237–249.
- [27] Proctor R.H., Desjardins A.E., Plattner R.D., Hohn T.M. 1999. A polyketide synthase gene required for biosynthesis of fumonisin mycotoxins in *Gibberella fujikuroi* mating population A. *Fungal Genet. Biol.* 27: 100–112.
- [28] Proctor R.H., Plattner R.D., Desjardins A.E., Busman M., Butchko R.A.E. 2006. Fumonisin production in the maize pathogen *Fusarium verticillioides*: genetic basis of naturally occurring chemical variation. *J. Agric. Food Chem.* 54: 2424–2430.
- [29] Rheeder J.P., Marasas W.F.O., Vismer H.F. 2002. Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2101–2105.
- [30] Riley R.T., Voss K.A. 2006. Differential sensitivity of rat kidney and liver to fumonisin toxicity: organ-specific differences in toxin accumulation and sphingoid base metabolism. *Toxicol. Sci.* 92: 335–345.
- [31] Savolainen K., Stockmann-Juvala H., Naarala J., Loikkanen J., Vähäkangas K. 2006. Apoptosis in neurotoxicity of fumonisin B1. *Abstracts. Toxicol. Lett.* 164S: S1–S324.
- [32] Segvić Klarić M., Rumora L., Ljubanović D., Pepeljnjak S. 2008. Cytotoxicity and apoptosis induced by fumonisin B1, beauvericin and ochratoxin A in porcine kidney PK15 cells: effects of individual and combined treatment. *Arch. Toxicol.* 82: 247–255.
- [33] Seo J.-A., Proctor R.H., Plattner R.D. 2001. Characterization of four clustered and coregulated genes associated with fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genet. Biol.* 34: 155–165.
- [34] Soriano J.M., Gonzalez L., Catala A.I. 2005. Mechanism of action of sphingolipids and their metabolites in the toxicity of fumonisin B1. *Prog. Lipid. Res.* 44: 345–356.
- [35] Sperling P., Franke S., Lühje S., Heinz E. 2005. Are glucocerebrosides the predominant sphingolipids in plant plasma membranes? *Plant Physiol. Biochem.* 43: 1031–1038.
- [36] Staunton J., Weissman K.J. 2001. Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Nat. Prod. Rep.* 18: 380–416.
- [37] van den Brink H.M., van Gorcom R.F., van den Holden C.A., Punt P.J. 1998. Cytochrome P450 enzyme systems in fungi. *Fungal Genet. Biol.* 23: 1–17.
- [38] Vismer H., Snijman P., Marasas W., Schalkwyk D. 2004. Production of fumonisins by *Fusarium verticillioides* strains on solid and in a defined liquid medium – effects of L-methionine and inoculum. *Mycopathologia* 158: 99–106.
- [39] Voss K.A., Smith G.W., Haschek W.M. 2007. Fumonisin: Toxicokinetics, mechanism of action and toxicity. *Anim. Feed Sci. Technol.* 137: 299–325.
- [40] Williams L.D., Glenn A.E., Zimeri A.M., Bacon C.W., Smith M.A., Riley R.T. 2007. Fumonisin disruption of ceramide biosynthesis in maize roots and the effects on plant development and *Fusarium verticillioides*-induced seedling disease. *J. Agric. Food Chem.* 55: 2937–2946.
- [41] Yi H., Bojja R.S., Fu J., Du L. 2005. Direct evidence for the function of FUM13 in 3-ketoreduction of mycotoxin fumonisins in *Fusarium verticillioides*. *J. Agric. Food Chem.* 53: 5456–5460.

- [42] Yu F., Zhu X., Du L. 2005. Developing a genetic system for functional manipulations of FUM1, a polyketide synthase gene for the biosynthesis of fumonisins in *Fusarium verticillioides*. *FEMS Microbiol. Lett.* 248: 257–264.
- [43] Zaleta-Rivera K., Xu C.H., Yu F., Butchko R.A.E., Proctor R.H., Hidalgo-Lara M.E., Raza A., Dussault P.H., Du L. 2006. A bidomain nonribosomal peptide synthetase encoded by FUM14 catalyzes the formation of tricarballic esters in the biosynthesis of fumonisins. *Biochemistry* 45: 2561–2569.
- [44] Zheng W., Kollmeyer J., Symolon H., Momin A., Munter E., Wang E., Kelly S., Allegood J.C., Liu Y., Peng Q., Ramaraju H., Sullards M.C., Cabot M., Merrill A.H.Jr. 2006. Ceramides and other bioactive sphingolipid backbones in health and disease: lipidomic analysis, metabolism and roles in membrane structure, dynamics, signaling and autophagy. *Biochim. Biophys. Acta* 1758: 1864–1884.
- [45] Zhu X., Yu F., Li X.C., Du L. 2007. Production of dihydroisocoumarins in *Fusarium verticillioides* by swapping ketosynthase domain of the fungal iterative polyketide synthase Fum1p with that of lovastatin diketide synthase. *J. Am. Chem. Soc.* 129: 36–37.
- [46] Zhu X., Yu R., Bojja R.S., Zaleta-Rivera K., Du L. 2006. Functional replacement of the ketosynthase domain of FUM1 for the biosynthesis of fumonisins, a group of fungal reduced polyketides. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33: 859–868.

## Molecular basis of fumonisin biosynthesis

**Key words:** *Fusarium*, fumonisins, FUM genes

### Summary

Fumonisin is a group of fungal secondary metabolites biosynthesized primarily by two *Fusarium* species of liseola section i.e. *F. verticillioides* and *F. proliferatum*. Chemically, these are diester derivatives of propan tricarboxylic acid with icosane and constitute structural analogs of sphinganine. Structural similarity of fumonisins to sphinganine is a direct reason of metabolite toxicity, which react with dihydroceramide synthase and in consequences inhibits ceramide production. Fumonisin biosynthesis is determined by cluster of FUM genes and main steps of this metabolites pathway include: synthesis of polyketide chain, its condensation with alanine, hydroxylation of carbonyl backbone and polyketide esterification.

