

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Angeli Cserne

Kaposvár

2023



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

Kaposvári Campus

**A fumonizin B1 toxin *N*- és *O*-palmitoil
származékainak előállítása és toxicitásuk
in vitro és *in vivo* vizsgálata**

DOI: 10.54598/004400

Angeli Cserne

Kaposvár

2023

A doktori iskola

Megnevezése: Állattenyésztési Tudományok Doktori Iskola

Tudományága: Állattenyésztés-tudományok

Vezetője: Prof. Dr. Szabó András

az MTA doktora, egyetemi tanár,
tanszékvezető

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

Élettani és Takarmányozástani Intézet, Élettani
és Állategészségügyi Tanszék

Témavezető(k): Prof. Dr. Bartók Tibor

az MTA doktora, ügyvezető igazgató

Fumizol Kft., Szeged

Prof. Dr. Kovács Melinda

akadémikus, egyetemi tanár, intézetigazgató

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

Élettani és Takarmányozástani Intézet

.....

Az iskolavezető jóváhagyása

.....

A témavezető(k) jóváhagyása

1. A kutatás előzményei, célkitűzés

A kutatás előzményei

Az értekezésem tárgyát képező *N*- és *O*-acil-FB1 toxin származékok a mikotoxinok csoportjába tartoznak, melyeket egyes penészgomba-fajok termelhetnek. A fumonizin B1 toxin a humán- és állategészségügyi szempontból legveszélyesebbnek számító mikotoxinok közé tartozik.

A mikotoxinok a világon mindenütt jelentős gazdasági károkat és élelmiszerbiztonsági problémákat okoznak, a termesztés, betakarítás és tárolás szinte minden fázisában szennyezhetik a gabonamagvakat, illetve más agráripari alapanyagokat, számos élelmiszeripari alapanyagban, félkész- és késztermékben előfordulhatnak. Felmérések szerint a világon, valamint az Európában betakarított termények 25, illetve 20%-a szennyezett mikotoxinokkal. Az újabb, nagy pontosságú multi-mikotoxin analitikai módszerekkel (HPLC/MSMS) végzett felmérések szerint a szennyezettség mértéke akár 80% is lehet, ha figyelembe vesszük a különböző mikotoxin metabolitokat is.

A legveszélyesebbnek számító mikotoxinokra szigorú élelmezés-egészségügyi határértékek, a takarmányok esetén pedig – az aflatoxin B1 kivételével, melyre már létezik határérték – ajánlások vonatkoznak. A mikotoxinok különböző élelmiszerekben és takarmányokban történő mennyiségi és minőségi meghatározásához, a műszerek kalibrálásához tiszta referenciaanyagokra (standard) van szükség. A referenciaanyagokat kémiai szintézissel állítják elő vagy különböző fonalas gombákkal *in vitro* termeltetik meg, folyadék vagy szilárdfázisú fermentációs körülmények között. A kémiai szintézis vagy a termeltetés után a referenciaanyagok megfelelő tisztaságban

történő kinyerése különböző extrakciós és kromatográfias módszerek felhasználásával történik.

Célkitűzések

1. Munkám során megfelelő eljárást kívántam kidolgozni az FB1 toxin szilárdfázisú fermentációjának optimalizálására *Fusarium verticillioides* izolátumok felhasználásával.
2. Célom volt a szilárdfázisú fermentáció során termeltetett FB1 toxin tisztán történő kinyerése a tenyészetekből preparatív flash- és folyadékkromatográfias eljárások alkalmazásával.
3. Kísérleteket kívántam végezni a megfelelő tisztaságú FB1 toxin palmitoil-kloriddal történő szintetikus acilezésére, valamint az acilezett FB1-származékok tisztítására.
4. Az FB1 toxin szintetikus acilezése során kapott származékok tisztaságát HPLC/MS eljárással kívántam meghatározni.
5. A szilárdfázisú fermentáció után előállított gombakivonatban található acilezett fumonizinek azonosítása céljából adalékolási kísérletet kívántam végrehajtani az FB1 toxin acilezésével előállított származékok felhasználásával.
6. Az előállított acilezett FB1 toxin származékok ellenőrzését nagyfelbontású tömegspektrometriával (HRMS) és magmágneses rezonancia spektroszkópiával (NMR) terveztem végrehajtani.
7. A témám egyik legfontosabb részét képező állatkísérlet során célom volt az izolált/szintetizált acilezett fumonizinek toxicitásának vizsgálata, szintén az FB1 toxint használva kontrollként.

2. Anyag és módszer

Az FB1 toxint ún. szilárdfázisú fermentációval, *Fusarium verticillioides* izolátum és rizs tápközeg felhasználásával termeltettük. A liofilizált rizstenyészet-örlemények extraktumát membránszűrtük, és erős anioncserélő (SAX), majd C18-as oszlopokon, ún. „flash” kromatográfias eljárással tisztítottuk meg. A frakciók FB1 toxin tartalmát HPLC/MS készülék segítségével „off-line”, vagyis közvetett detektálási módszerrel határoztuk meg. A C18-as HPLC oszlopról eluálódó komponenseket ESI-ionforrással ellátott tömegspektrométerrel detektáltuk pozitív ion módban.

Az FB1 toxin *N*-acilezése vízmentes tetrahydrofuranban (THF) történt palmitoil-klorid és trietil-amin (TEA) reagens eleggyel. Az FB1 toxin *O*-acilezését szintén palmitoil-klorid/TEA reagenssel végeztük, azonban a reagensek esetében magasabb koncentrációt alkalmaztunk, és a THF 2% (v/v) vizet is tartalmazott.

A reakcióelegyekből vett mintákat egy elektroporlasztásos ionforrással (ESI) felszerelt Agilent 1946D típusú tömegspektrométerhez csatlakoztatott HPLC készülék (Agilent 1100) segítségével gradiens elúciót alkalmazva elemeztük, pozitív ion módban.

Az acilezett FB1-származékok kinyeréséhez a reakciótermékeket preparatív HPLC-vel (Hanbon NS421) tisztítottuk meg. A gradiens elválasztást szobahőmérsékleten C18-as preparatív oszlopon hajtottuk végre. A frakciókat „off-line” HPLC/MS-sel elemeztük.

A tisztított komponensek szerkezet-azonosítására irányuló NMR-kísérleteket egy Prodigy TCI cryoprobe mérőfejjel felszerelt 700 MHz-es Bruker gyártmányú NMR spektrométeren végeztük.

A HPLC/HRMS méréseket UHPLC rendszerrel végeztük, egy fűtött elektroporlasztásos ionforrással (HESI) felszerelt Q Exactive Plus hibrid kvadrupól-orbitrap tömegspektrométerhez (Thermo Fisher Scientific) csatlakoztatva. A tisztított komponensek elválasztását C18-as HPLC oszlopon, bináris gradiens alkalmazásával végeztük. A komponensek elválasztásához izokratikus, majd lineáris gradiens elválasztást alkalmaztunk. A mintákat pozitív és negatív ion üzemmódban is mértük.

A fermentáció során a fonalagomba által termelt acilezett FB1-származékok azonosítása céljából adalékolási kísérleteket hajtottunk végre. Az adalékolás során a rizstenyészet kivonatához a HPLC készülék mintaadagolójával egyenként adagoltattuk a tisztított és NMR-rel azonosított acilezett FB1-származékokat (3-*O*-, 5-*O*- és *N*-palmitoil-FB1). Minden egyes adalékolás után a mintákat egy elektroporlasztásos ionforrással (ESI) felszerelt tömegspektrométerhez csatlakoztatott HPLC készülék segítségével, pozitív ion módban elemeztük.

A spektroszkópiai kísérlet során a spektrumokat F-4500 fluoriméterrel és UV-Vis fotométerrel, 25 °C-on gyűjtöttük. A mikotoxinok és a palmitinsav humán szérumalbumin (HSA) emissziós spektrumára gyakorolt hatását foszfátpufferben (PBS, pH 7,4) teszteltük, az emissziós jel változását 340 nm-en vizsgáltuk. A ligandum molekulák belső-szűrő hatását az ultraibolya-látható spektrum (UV/Vis) alapján korrigáltuk.

Az albumin és a vizsgált fumonizinek HSA-hoz kötött frakcióját ultracentrifugálással üleptítettük, majd HPLC/MS műszerrel mennyiségileg meghatároztuk a ligandum molekulák szabad frakcióját. A komponensek elválasztására gradiens elúciót alkalmaztunk. Az analízisek során a mintaadagoló minden mintához belső standard keveréket (1 ng FB1-¹³C₃₄ és 1 ng *N*-C_{17:0}-FB1 ACN-vízben (1:1 v/v%)) adott. Az MS adatokat pozitív ion szelektív ion figyelés (SIM) módban gyűjtöttük.

A kötőhelyek vizsgálatához, valamint a fumonizinek kötőhely-HSA kölcsönhatásra gyakorolt hatásának tesztelésére ultraszűrési kísérleteket végeztünk. Az FB1, *N*-pal-FB1, 5-*O*-pal-FB1 és FB4 toxin hatását Site I (warfarin), Site II (naproxen) és az FA1 (S-kamptotecin) ligandumokkal vizsgáltuk, ultraszűrési módszerekkel. A felülűzők warfarin, naproxen és S-kamptotecin koncentrációját HPLC-vel határoztuk meg. A statisztikai különbségek kiértékelése egytényezős („one-way”) ANOVA és Tukey post-hoc tesztekkel történt, SPSS Statistics szoftverrel.

Az *N*-pal-FB1 és 5-*O*-pal-FB1 szerkezetét Maestro programmal rajzoltuk meg. A ligandumok energia-minimalizálását az OpenBabel segítségével végeztük, melyet a legmeredekebb süllyedés és a konjugált gradiens minimalizálása követett. A kapott struktúrákat PM7 paraméterkészlet segítségével, kvantumkémiai programcsomaggal (MOPAC) energia-minimalizáltuk. A ligandum atomokat AutoDock Tools program segítségével Gasteiger–Marsili parciális töltésekkel láttuk el. A ligandumok humán szérumalbuminhoz történő dokkolásához az AutoDock 4.2.6 programot használtuk.

A fumonizin-származékok *in vivo* toxicitásának tanulmányozásához laboratóriumi nevelésű AB típusú zebradánió (*Danio rerio*) vonalat használtunk. A toxicitás vizsgálatához Zebradánió Embrió Toxicitás Próbát (ZETA) végeztünk. A 96 hpf („hours post fertilization”) korú embriók 24 órán keresztül mindegyik vegyület meghatározott koncentrációinak voltak kitéve. A mortalitást és a fejlődési rendellenességeket sztereomikroszkóp alatt ellenőriztük. A letális és nem letális hatások statisztikai elemzésére kéttényezős variancianalízist („two-way” ANOVA) alkalmaztunk, a többszörös összehasonlítást Tukey-féle post hoc tesztekkel végeztük el. Az elemzést GraphPad Prism 9 szoftver segítségével hajtottuk végre.

3. Eredmények

Az FB1 toxin acilezése palmitoil-klorid/trietil-amin reagenssel

Az *N*-palmitoil-FB1 képződése gyorsan lezajlott (30 perc alatt) szobahőmérsékleten, 90% feletti konverzió mellett. Az FB1 toxin *O*-acilezése jóval lassabban ment végbe. Először a 3-*O*-palmitoil-FB1 képződött, majd lassan megjelent az 5-*O*-palmitoil-FB1 is. A 3-*O*-palmitoil-FB1 koncentrációja 48 óra alatt érte el maximális értékét. Ekkor a területszázalékos kiértékelés alapján 38,9% 3-*O*-palmitoil-FB1, 33,7% 5-*O*-palmitoil-FB1 és összesen 27,4% intermedier volt jelen a reakcióelegyben. Az idő előrehaladtával az összetétel az 5-*O*-palmitoil-FB1 képződése felé tolódott el. Öt nappal a reakció elindítását követően a 2% vizet tartalmazó reakcióelegyben 80% 5-*O*-palmitoil-FB1 toxint figyeltünk meg, 20% 3-*O*-palmitoil-FB1 mellett, azaz a 3-*O*-palmitoil-FB1 is jelen volt a rendszerben, mely ez esetben intermediernek tekintendő. A 3-*O*-palmitoil-FB1 még preparatív HPLC-vel végzett tisztítás után sem volt stabil. A preparatív HPLC oszlopról eluálódó frakciókban a bepárlás és a liofilizálás során *O*→*N*-acil-vándorlás volt megfigyelhető, ami körülbelül 10% *N*-palmitoil-FB1 képződését eredményezte a 3-*O*-palmitoil-FB1-ből.

Az *N*- és *O*- acilezett FB1 komponensek NMR vizsgálata

A 3-*O*-, 5-*O*- és *N*-palmitoil-FB1 vegyületek szerkezetét nagyfelbontású ¹H és ¹³C NMR spektroszkópiával 700 MHz-es NMR spektrométerrel határoztuk meg. Az *N*-palmitoil-FB1 toxinról korábban csak ¹H spektrális adatokat közöltek gyengébb mágneses mezőt (400 MHz) alkalmazó NMR készüléken (Harrer et al., 2013).

A rezonanciák hozzárendelése egy (1D) és kétdimenziós (2D) NMR kísérletek alapján történt. A ^{13}C -multiplicitással szerkesztett 2D ^1H - ^{13}C HSQC-CLIP-COSY spektrum különbséget tesz a CH/CH₃ és CH₂ rezonanciák között, így a különböző spinrendszereken belüli kapcsolódási pontok azonosítása megvalósítható és egyszerű.

Minden fő láncrezonancia hozzárendelésre került, azonban a palmitoil CH₂ és a trikarballil-acil (TCA) CH, CH₂ kémiai eltolódások többsége kétértelmű maradt a jelentős spektrális átfedések miatt. A palmitoil szubsztitúciók helyzetét azonban az FB1 főlánc palmitoil-karbonil és H3, H5, NH protonjai közötti háromkötéses heteronukleáris korrelációk alapján igazolni lehetett. Ahogy az várható volt, a TCA csoportok mindhárom vegyületben a C14 és C15 pozícióban helyezkedtek el, amit a H14-H15 protonok és a TCA karbonilok közötti HMBC kapcsolatok bizonyítanak. Továbbá az ^1H és ^{13}C főlánc kémiai eltolódási értékei a 2-5 pozíciókban mutatják a komponensek eltérő palmitoil-szubsztitúciós mintázatait. A palmitoil-karbonilok közelében lévő protonok jelentősen lefelé tolódtak el, és ez a perturbáció a szomszédos rezonanciákban is megfigyelhető volt. A 3-*O*-palmitoil-FB1 minta stabilitása oldószerfüggést mutatott: DMSO-*d*₆-ban 3-*O*- és *N*-palmitoil-FB1 keverékét mutattuk ki NMR-rel. A többi vegyülettől eltérően ezt a mintát CD₃CN/D₂O oldószerben oldottuk és analizáltuk, hogy megakadályozzuk a gyors *O*→*N*-acil-migrációt. Ennek eredményeként az *N*-származék spektrális nyomai minden 3-*O*-palmitoil-FB1 mérésből eltűntek.

A reakciótermékek jellemzése HPLC/ESI-HRMS módszerrel

A 3-*O*- és 5-*O*-palmitoil-FB1 toxin pozitív ion ún. „full-scan” ESI-HRMS spektrumában csak a protonált molekula $[M+H]^+$ volt megfigyelhető 960,623 m/z értéknél, míg az *N*-palmitoil-FB1 esetén a Na-addukción $[M+Na]^+$ szintén jelentős intenzitással jelent meg a spektrumban 982,60 m/z értéknél. A negatív ion ESI-HRMS spektrumban a deprotonált molekulát (958,611 m/z értéknél) a $[M-2H+Na]^-$ ion kísérette 980,592 m/z értékkel.

A molekulaionok pozitív ion ESI-HRMS/MS spektrumában ugyanazok a fragmensionok voltak megfigyelhetők, mint korábban a 3D ioncsapda tömeganalizátor esetében (Bartók et al., 2010; Bartók et al., 2013). A negatív ion HRMS/MS spektrumban a trikarballilsavból (TCA) vízkilépéssel ($[TCA-H_2O-H]^-$) képződött fragmension volt a legnagyobb mennyiségben megfigyelhető 157 m/z érték mellett. Ezek a fragmensionok a TCA anhidrid (TCAD) és/vagy ketén (TCAK) formájában jelentek meg. Ezen ionok (m/z 157) nem jelentek meg a 3D ioncsapda tömeganalizátorral korábban felvett spektrumokban, mert m/z értékük a fragmentálandó molekulaion m/z értékének 1/3-a alatt volt (a 3D ioncsapda tömeganalizátorok 1/3 szabálya). A TCAD/TCAK csoportok molekuláról történő kihaladása azonban több fragmensionban is látható volt a 3D ioncsapda tömeganalizátorral kapott tömegspektrumban (Bartók et al., 2010; Bartók et al., 2013).

A gombakivonat adalékolása a szintetikus előállított acilezett FB1-származékokkal

Az 5-*O*-palmitoil-FB1 vagy *N*-palmitoil-FB1 eredeti kivonathoz való hozzáadásával megnőtt a korábban feltételezett

csúcsok (Bartók et al., 2013) területe. Az eredeti gombakivonat 3-*O*-palmitoil-FB1 toxinnal történő adalékolása azonban nem eredményezte a korábban 3-*O*-palmitoil-FB1-nek vélt csúcs növekedését, hanem alacsonyabb retenciós időn belül jelent meg, ahol a gombakivonat nem tartalmazott mérhető komponenset. Következésképpen kijelenthető, hogy a gomba nem termelt 3-*O*-palmitoil-FB1 toxint. Meglepő volt, hogy a 3-*O*-palmitoil-FB1 toxinnal történő adalékolás az *N*-palmitoil-FB1 csúcsmagasságának növekedését is eredményezte, ami a 3-*O*-palmitoil-FB1 instabilitásával magyarázható. A tiszta 3-*O*-palmitoil-FB1 frakciók centrifugális bepárlása és liofilizálása során az *O*→*N* acil migráció a kristályos végtermékben körülbelül 10% *N*-palmitoil-FB1 toxin képződését eredményezte. A gombakivonatban korábban 3-*O*-palmitoil-FB1-származéknak vélt komponens feltehetően a 10-*O*-palmitoil-FB1-származék, mivel tömegspektrumai egyértelműen az FB1 palmitoilezését jelzik (Bartók et al., 2013). Az egyetlen szabad csoport, ahol az acilezés még megtörténhet, a 10-es szénatomon elhelyezkedő OH-csoport.

A fumonizinek és a palmitinsav hatása a HSA emissziós spektrumára

Az FB1 és FB4 toxin nem változtatta meg jelentős mértékben az albumin emissziós spektrumát. Csak a legmagasabb palmitinsav-koncentráció (10 μ M) növelte a HSA fluoreszcenciáját. Azonban mind az *N*-pal-FB1, mind az 5-*O*-pal-FB1 fokozatosan növelte a HSA fluoreszcencia intenzitását, kékeltolódásokkal kísérve (*N*-pal-FB1: 340 nm → 330 nm; 5-*O*-pal-FB1: 340 nm → 329 nm) a fehérje emissziós maximumában. A mikotoxinok és a palmitinsav nem

mutatott fluoreszcenciát albumin hiányában, valamint az alkalmazott hullámhossz-tartományban nem volt abszorpciójuk.

A fumonizinek kölcsönhatása a humán szérumalbuminnal ultracentrifugálási vizsgálatok alapján

Az albumin a LOD („limit of detection”, kimutatási határ) alá csökkentette az *N*-pal-FB1 és 5-*O*-pal-FB1 mennyiségét, emellett az FB1 és FB4 szintjének nagyjából 50, illetve 75%-os csökkenése volt megfigyelhető. Ezen adatok alapján az FB1–HSA ($K = 1,6 \times 10^3$ l/mol) és az FB4–HSA ($K = 6,6 \times 10^3$ l/mol) kötési állandóit 1:1 sztöchiometriájú mikotoxin-albumin komplexek képződését feltételezve határoztuk meg (Fliszár-Nyúl et al., 2022). Figyelembe véve a palmitoil-FB1-származékok HSA általi erőteljes eltávolítását, a kísérleteket 2, 5 és 10 μ M koncentrációjú HSA-val is elvégeztük. Érdekes módon még 2 μ M koncentrációjú HSA is jelentős mértékben csökkentette az *N*-pal-FB1 és 5-*O*-pal-FB1 koncentrációját a felülúszóban.

A fumonizinek és a palmitinsav hatása a „site markerek” és a humán szérumalbumin kölcsönhatására

A vizsgált „site markerek” (kötőhely markerek) szűrt frakcióit nem befolyásolta az FB1 toxin. Továbbá a warfarin és a naproxen albumin-kötődését nem befolyásolta az FB4, azonban az S-kamptotecin szintjét még alacsonyabb koncentrációban (5 és 10 μ M) is mérsékelten növelte a szűrletben. A palmitinsav csökkentette a warfarin koncentrációját a szűrletben. Azonban az *N*-pal-FB1 és az 5-*O*-pal-FB1 ellenkező hatást mutatott: magasabb koncentrációjuk (20 μ M) jelentősen megemelkedett warfarinszintet eredményezett a szűrletekben. A palmitinsav és az *N*-pal-FB1 mérsékelte, illetve

nagymértékű naproxen koncentráció emelkedést okozott a szűrletben. Ezzel szemben az 5-*O*-pal-FB1 nem befolyásolta a naproxen-HSA kölcsönhatást. Ezenkívül a palmitinsav és az 5-*O*-pal-FB1 nem változtatta meg az S-kamptotecin albumin-kötődését, míg az *N*-pal-FB1 az FA1 „site marker” koncentrációfüggő emelkedését indukálta a szűrt frakcióban.

Molekulamodellőzés

Az egyes 100 vonalas dokkoló-futtatások alapján eredményeink arra utalnak, hogy a két palmitoil-FB1-származék kötőhelyei a Site II bejáratánál találhatóak: az első helyen az 5-*O*-pal-FB1, illetve a harmadik helyen az *N*-pal-FB1 esetén. Továbbá az *N*-pal-FB1 két legmagasabb rangú kötési móddal is rendelkezik a Site I közelében.

A Site II bejáratánál az *N*-pal-FB1 kölcsönhatást alakít ki az R410, K413, K414, E492, K541 és K545 aminosavakkal. A vakdokkolási vizsgálatok során az 5-*O*-pal-FB1 első rangsorolt kötési módját 6,2 Å-re találtuk a diazepam kísérleti kötési módjától (a Site II ismert liganduma), ahol a komplexet hidrofíl (R410, E542), hidrofób (L387, L394) és ionos (K541, K545) kölcsönhatások stabilizálják.

A fumonizinek toxikus hatásának vizsgálata zebraadánió embrió modellen

A zebraadánió embriók 24 órás kezelése alatt (96 és 120 hpf között) sem az E3 médiumban, sem az oldószeres kontrollokban nem volt megfigyelhető elhullás. Az FB1 és az FB4 toxin még 200 µM koncentrációnál sem okozott elhullást, ezzel szemben a 100, valamint 200 µM koncentrációjú 5-*O*-pal-FB1 toxinnal történő kezelés 10,

illetve 30%-os mortalitást eredményezett. Az *N*-pal-FB1 toxin pedig még 6,25 μM koncentrációnál is 100%-os mortalitást okozott.

Az FB1, FB4 és 5-*O*-pal-FB1 szubletális hatásai 3,12 μM és 200 μM koncentrációban kerültek bemutatásra. Mivel a szubletális hatásokat csak élő zebraadánió embriókon lehet tesztelni, és az *N*-pal-FB1 még 6,25 μM koncentrációnál is 100%-os mortalitást okozott, az *N*-pal-FB1 által kiváltott rendellenességeket csak 3,12 μM -on értékeltük. A lapos úszóhólyag volt az egyetlen, a tesztelt fumonizinek által kiváltott szubletális hatás, amelyet a 3,12 μM koncentráció esetén megfigyeltünk. Ezen hatást leggyakrabban az *N*-pal-FB1 okozta (80%), melyet az 5-*O*-pal-FB1 (50%), az FB4 (30%) és az FB1 (25%) toxin követett.

200 μM koncentrációnál az FB1, FB4 és 5-*O*-pal-FB1 lapos úszóhólyagot okozott az embriók többségében, ahol az 5-*O*-pal-FB1 indukálta (100%) ennek a fenotípusnak a legnagyobb abundanciáját. A szik abnormális elszíneződését figyeltük meg 200 μM FB1-gyel (15%; statisztikailag nem szignifikáns), FB4-gyel (40%) és 5-*O*-pal-FB1-gyel (100%) történő kezelést követően. Az FB1 nem okozott fejhíbat (az alsó állkapocs és a szaglórégió deformációját), ezzel szemben ezek a deformítások azokban az embriókban fordultak elő, melyek 200 μM FB4 (40%) és 5-*O*-pal-FB1 (100%) hatásának voltak kitéve. A test tengelyének görbületét (71%), illetve ödémákat (15%, statisztikailag nem szignifikáns) csak az 5-*O*-pal-FB1-gyel történt kezelés (200 μM) váltott ki.

4. Következtetések és javaslatok

Már említésre került, hogy a *F. verticillioides* törzsek képesek acilezett FB1-származékok bioszintézisére is. A részben hidrolizált FB1 (PHFB1) (Sydenham et al., 1995) és hidrolizált FB1 (HFB1) (Poling et al., 1999) korábban publikált elnevezése alapján ezeket a komponenseket Bartók és munkatársai (2010) észterezett FB1 toxinoknak (EFB1, *izo*-EFB1) nevezték el, az észterezésben részt vevő zsírsavat (linolsav-, olajsav- vagy palmitinsav) a név utolsó két karakterében feltüntetve (EFB1LA, *izo*-FB1LA, EFB1OA, *izo*-EFB1OA, EFB1PA, *izo*-EFB1PA). Néhány évvel később észrevették, hogy bizonyos törzsek *N*-acil-FB1-származékok bioszintézisére is képesek (Bartók et al., 2013). Összesen hat *O*-acil- és három *N*-acil-FB1 komponenst tudtak detektálni, és 3D ioncsapdás tömegspektrométerrel rögzítették ezek MS2 spektrumát, valamint repülési idő tömegspektrométerrel meghatározták pontos tömegüket. Három különböző acilcsoportot (palmitoil-, linoleoil- és oleoil) figyeltek meg. Norred és munkatársai (2001) leírták az FA1 toxin *N*-acetyl-csoportjának (ami valójában *N*-acetyl-FB1) savas közegben történő *N*→*O*-acil migrációját a szénlánc 3-as és 5-ös szénatomjának OH csoportjára. Ez alapján Bartók és munkatársai úgy vélték, hogy kromatogramjaik a 3-*O*-, 5-*O*- és *N*-acil-FB1-származékokat is ebben az elúciós sorrendben mutatják. Emellett az *N*-palmitoil-FB1 toxin előállításával korábban kimutatták, hogy a *F. verticillioides* gombakivonat reakcióelegyének adagolása során az *N*-acil-FB1-származékok az *O*-acil-FB1-származékok után eluálódnak. A minták pozitív és negatív ion módban történő HPLC/ESI-MS analízisével könnyen meghatározható, hogy az elválasztott acilezett FB1-származékok *O*- vagy *N*-acilezett vegyületek-e, ugyanis az *O*-acil-

származékok pozitív ion módban magasabb jel/zaj arányt adnak (a primer aminocsoportok savas környezetben könnyen protonálhatóak), míg az *N*-acil-származékok negatív ion módban adnak magasabb jel/zaj arányt (amikor a primer aminocsoport az acileződés következtében már nem képes protonálódni).

Az adalékolási kísérlet során igazoltuk, hogy a gomba 5-*O*-pal-FB1 és *N*-pal-FB1 toxint is termelt, mivel a szintetikusan előállított palmitoil-származékok eredeti gombakivonathoz történő hozzáadása a korábban feltételezett csúcsok (Bartók et al., 2013) területének növekedését eredményezte. Ezzel szemben a kivonat 3-*O*-palmitoil-FB1-gyel való kiegészítése nem eredményezte a korábban 3-*O*-palmitoil-FB1-nek tulajdonított csúcs növekedését, hanem rövidebb retenciós idővel jelent meg a kromatogramokon ott, ahol a gombakivonat nem tartalmazott mérhető komponenst, vagyis a gomba nem termelt 3-*O*-palmitoil-FB1 toxint. Emellett a 3-*O*-palmitoil-FB1 adalékolási kísérlete során megnőtt az *N*-palmitoil-FB1 csúcsmagassága. Ez annak volt köszönhető, hogy a 3-*O*-palmitoil-FB1 rendkívül instabil. Korábban említésre került, hogy a tiszta 3-*O*-palmitoil-FB1 frakciók centrifugális bepárlása és liofilizálása során az *O*→*N* acil migráció következtében körülbelül 10% *N*-palmitoil-FB1 toxin volt kimutatható a kristályos végtermékben. Mivel bebizonyosodott, hogy a gomba nem termelt 3-*O*-palmitoil-FB1-et, valamint az egyetlen csoport, ahol az acilezés még megtörténhet, a 10-es szénatomon elhelyezkedő OH-csoport, a korábban 3-*O*-pal-FB1-származéknak vélt komponens feltehetően a 10-*O*-pal-FB1. Bartók és munkatársai (2010; 2013) leírták, hogy az általuk vizsgált *F. verticillioides* törzs nemcsak palmitoil-, hanem linoleoil- és oleoil-FB1-származékokat is termel. Feltételezhető, hogy a korábban 3-*O*-linoleoil-FB1-nek és 3-*O*-oleoil-FB1-nek vélt

származékok is valójában 10-*O*-acil-származékok. E vegyületek azonosításához szilárdfázisú fermentációs mintákból kellene izolálni őket, majd szerkezetüket NMR-rel és tömegspektroszkópiával ellenőrizni, mivel a 10-es szénatomon elhelyezkedő OH-csoport a szintetikus acilezés során nem preferált.

A palmitinsav-albumin komplexek nagyfokú stabilitásából (Ashbrook et al, 1975; Rose et al., 1994) kiindulva feltételeztük, hogy az FB1 toxin palmitoil-származékai is kölcsönhatásba lépnek majd a fehérjével. Így az FB1, *N*-pal-FB1, 5-*O*-pal-FB1 és FB4 toxinok HSA-val történő kölcsönhatásait fluoreszcencia spektroszkópiai, ultracentrifugálási, ultraszűrési és modellező vizsgálatok segítségével vizsgáltuk, illetve feltételeztük, hogy az *N*-pal-FB1 és az 5-*O*-pal-FB1 az FB1 és FB4 toxinnál magasabb akut toxicitást okoz. Ezenkívül az FB1, *N*-pal-FB1, 5-*O*-pal-FB1 és FB4 toxikus hatásának vizsgálata céljából zebradánió embriókon teszteltük a mikotoxinok okozta mortalitást és szubletális toxikus hatást. Kutatásunk során arra az eredményre jutottunk, hogy az FB1–HSA és FB4–HSA komplexek kötési állandói alacsonyak, ezzel szemben a palmitoil-FB1-származékok nagy affinitással kötődnek a fehérjéhez. Továbbá, az *N*-pal-FB1 és az 5-*O*-pal-FB1 valószínűleg több nagy affinitású kötőhelyet foglal el az albuminon. Az *N*-pal-FB1 6,25 μM koncentrációnál 100%-os mortalitást okozott, míg a többi vizsgált mikotoxin nagyon magas szintje (100 μM és 200 μM) vagy egyáltalán nem okozott mortalitást (FB1 és FB4) vagy csak alacsonyabb mértékűt (5-*O*-pal-FB1). Figyelembe véve ezen mikotoxinok zebradánió embriókra gyakorolt szubletális hatásait, a következő toxicitási sorrendet állapítottuk meg: *N*-pal-FB1 > 5-*O*-pal-FB1 > FB4 > FB1. Eredményeink alátámasztják, hogy az *N*-pal-FB1 és 5-*O*-pal-FB1 sokkal nagyobb affinitással kötődik a szérum albuminhoz,

mint az FB1, ezért a palmitoil-származékok toxikokinetikai tulajdonságai nagy eltéréseket mutathatnak az FB1 toxinhoz képest. Vizsgálataink szolgáltatják az első *in vivo* toxicitási adatokat az *N*-pal-FB1, 5-*O*-pal-FB1 és FB4 vonatkozásában. Eredményeink rávilágítanak az acilezett FB1-származékok toxikológiai jelentőségére.

Tekintettel arra, hogy jelenleg az Európai Unióban élelmiszerek esetén a határérték, takarmányok esetén pedig az ajánlás csak az FB1 és FB2 toxin együttes mennyiségére létezik, a jövőben feltétlenül fontos lenne az acilezett fumonizinek előfordulásának vizsgálata különböző élelmiszeripari alapanyagokban, félkész- és késztermékekben, szükség esetén pedig határértékek megállapítása az acilezett FB1-származékokra is.

5. Új kutatási eredmények

A célkitűzésim mentén elvégzett vizsgálataim alapján az alábbi eredményekre jutottunk:

1. A tisztán kinyert FB1 toxint sikeresen acileztük palmitoil-klorid/trietilamin reagenssel, mely eredményeképpen *N*-pal-FB1, 3-*O*-pal-FB1 és 5-*O*-pal-FB1 toxint állítottunk elő. Igazoltuk, hogy vízmentes THF jelenlétében *N*-acilezés, míg 2% (v/v) víz THF-hez történő hozzáadásával *O*-acilezés ment végbe.
2. A gombakivonatban lévő acilezett FB1-származékokat sikeresen azonosítottuk adalékolási kísérlet segítségével.
3. Az előállított acilezett FB1-származékokat nagyfelbontású tömegspektrometriával (HRMS) és mágneses magrezonancia spektroszkópiával (NMR) azonosítottuk.
4. Fluoreszcencia spektroszkópiai, ultracentrifugálási, ultraszűrési és modellező vizsgálataink eredménye alapján bizonyítottuk, hogy az *N*-pal-FB1 és 5-*O*-pal-FB1 toxin nagyobb affinitással kötődik a humán szérumalbuminhoz, mint az FB1 toxin.
5. Az általunk előállított és azonosított acilezett FB1-származékok toxicitásának vizsgálata céljából zebradánió embriókon teszteltük ezen mikotoxinok okozta mortalitást és szubletális toxikus hatást. Kísérletünkben bizonyítottuk, hogy az általunk vizsgált acilezett FB1-származékok (*N*-pal-FB1 és 5-*O*-pal-FB1) toxikusabbak nemcsak az FB1, hanem az FB4 toxinnál is.

6. Az értekezés témaköréből írt tudományos közlemények

- Csenki, Z., Bartók, T., Bock, I., Horváth, L., Lemli, B., Zsidó, B.Z., Angeli, C., Hetényi, C., Szabó, I., Urbányi, B., Kovács, M., Poór, M. (2023): Interaction of Fumonisin B1, *N*-Palmitoyl-Fumonisin B1, 5-*O*-Palmitoyl-Fumonisin B1, and Fumonisin B4 Mycotoxins with Human Serum Albumin and Their Toxic Impacts on Zebrafish Embryos. *Biomolecules* 13, 755.
- Iqbal, N., Czékus, Z., Angeli, C., Bartók, T., Poór, P., Ördögh, A. (2023): Fumonisin B1-Induced Oxidative Burst Perturbed Photosynthetic Activity and Affected Antioxidant Enzymatic Response in Tomato Plants in Ethylene-Dependent Manner. *Journal of Plant Growth Regulation* 42, 1865-1878.
- Angeli, C., Nagy, T.M., Horváth, L., Varga, M., Szekeres, A., Tóth, G.K., Janáky, T., Szolomájer, J., Kovács, M., E. Kövér, K., Bartók, T. (2022): Preparation of 3-*O*-, 5-*O*- and *N*-Palmitoyl Derivatives of Fumonisin B1 Toxin and their Characterisation by HPLC-HRMS and NMR. *Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment* 39, 1759-1771.
- Miklós, G., Angeli, C., Ambrus, Á., Nagy, A., Kardos, V., Zentai, A., Kerekes, K., Farkas, Z., Józwiak, Á., Bartók, T. (2020): Detection of Aflatoxins in Different Matrices and Food-Chain Positions. *Frontiers in Microbiology* 11, 21.