

Mikrosistin biyosentez yollarının düzenlenmesi ve genetik mekanizmalar

The regulation of microcystin biosynthesis pathways and genetic mechanisms

Serap YALÇIN¹

ÖZET

Oksijenik fotosentetik bakteriler grubunda yer alan, sucul ve karasal çevrede çok yaygın bir yaşam alanı bulunan siyanobakteriler (Mavi-yeşil alg) farklı morfolojik yapıya sahiptirler. Siyanobakteriler, bir kısmı oldukça etkili toksin olan ribozomal olmayan peptidler, poliketidler ve alkaloidleri içeren biyoaktif sekonder metabolit üretebilmektedirler. Toksik siyanobakterilerin yaygın bir şekilde bulunması insan ve hayvan sağlığı için risk oluşturmaktadır. Siyanobakterial toksinler veya siyanotoksinler insanlarda karaciğer kanseri, dermal kontakt irritasyonlar, gastroenterit gibi hastalıklara sebep olmaktadır. Siyanotoksinler nörotoksinler, hepatotoksinler, sitotoksinler ve dermatotoksinler olmak üzere dört ana sınıfa ayrılırlar. Fakat yapısal olarak birbirlerinden oldukça farklıdır. Geçtiğimiz on yıl içerisinde dört temel siyanotoksinin: mikrosistin, nodularin, saksitoksin ve silindrospermopsin biyosentez yollarını biyokimyasal ve genetik olarak tanımlanmıştır. Mikrosistinlerin, insan ve hayvan intoksikasyonlarını içeren birçok vakadan sorumlu olduğu gösterilmiştir. Bu derleme ile mikrosistin biyosentez yollarını, kimyasal, genetik ve toksikolojik özelliklerin açıklanmaya çalışılmıştır.

Anahtar Sözcükler: Siyanobakteri, mikrosistin, toksin

ABSTRACT

The cyanobacteria (blue-green algae), as they are commonly named, comprise a diverse group of oxygenic photosynthetic bacteria that inhabit a wide range of aquatic and terrestrial environments, and display incredible morphological diversity. Cyanobacteria produce bioactive secondary metabolites, including alkaloids, polyketides and non-ribosomal peptides, some of which are potent toxins. The common occurrence of toxic cyanobacteria causes problems for health of animals and human. Cyanobacterial toxins or cyanotoxins are responsible diseases such as liver cancer, dermal contact irritations and gastroenteritis in humans. The cyanotoxins divide four major classes: the neurotoxins, hepatotoxins, cytotoxins, and dermatotoxins. However, this toxins are quite variety. The biosynthesis pathways of the four major cyanotoxins: microcystin, saxitoxin, nodularin and cylindrospermopsin, have been interpreted as biochemical and genetical in the past decade. Microcystins have been implicated in several cases of animal and human intoxications. This review summarizes biosynthesis pathways of microcystin, chemistry, genetic and toxicology.

Key Words: Cyanobacteria, microcystin, toxin

¹ Ahi Evran Üniversitesi, Mühendislik-Mimarlık Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, KIRŞEHİR

İletişim / Corresponding Author: Serap YALÇIN

Ahi Evran Üniversitesi, Mühendislik-Mimarlık Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, KIRŞEHİR

Tel : +90 386 712 41 69

E-posta / E-mail : ankaraserap@yahoo.com

Geliş Tarihi / Received : 16.03.2011

Kabul Tarihi / Accepted : 24.08.2012

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2012.48343

Yalçın S. Mikrosistin biyosentez yollarının düzenlenmesi ve genetik mekanizmalar. Turk Hij Den Biyol Derg, 2012; 69(3): 169-78.

GİRİŞ

Siyanobakteriler fotosentetik bakterilerin büyük çoğunluğunu oluştururlar. Siyanobakterilerin ilk olarak yaklaşık 3.5 milyar yıl öncesinde var oldukları bilinmektedir. Morfolojik olarak siyanobakterilerin farklı türleri bulunabilmektedir. Siyanobakteriler ekoloji, insan sağlığı ve endüstri alanlarında önemli mikroorganizmalardır (1). Siyanobakterilerin tahminen 150 cinsi, zararlı toksin üretebilme özelliğine sahiptir. Siyanobakteriler tarafından üretilen bu toksinler dört kategoride sınıflandırılmaktadır: 1. nörotoksinler, 2. hepatotoksinler, 3. sitotoksinler ve 4. dermatotoksinler (irritan toksinler) (2, 3). Bu derleme kapsamında, insan sağlığı üzerinde son derece önemli bir hepatotoksin olan mikrosistin üzerine odaklanılmış olup ve son on yıl içinde mikrosistin tanımlanan biyosentez yolları ayrıntılı bir şekilde açıklanmaya çalışılmıştır.

MİKROSİSTİN

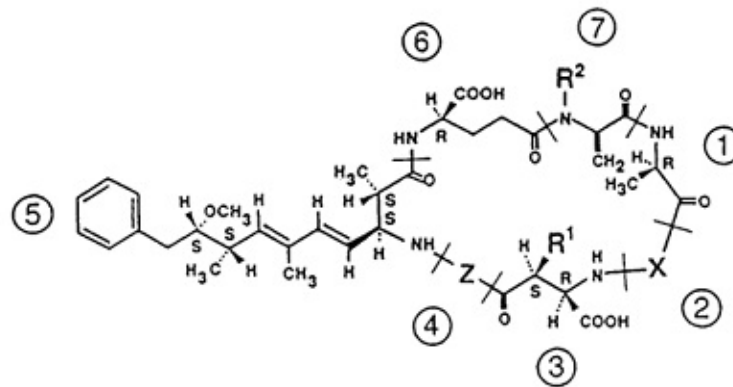
Siyanobakterilerden *Microcystis*, *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Planktothrix*, *Chroococcus* ve *Nostoc* cinsleri heptapeptid yapısında bir hepatotoksin olan mikrosistin içermektedir. *Microcystis aeruginosa* gibi mikrosistin üreten türler yaygın dağılıma sahiptir ve insan sağlığı için önemli tehdit oluşturmaktadır (4).

MİKROSİSTİNİN KİMYASAL YAPISI

Mikrosistinler, siyanobakterilerde bulunan toksinlerin yapısal olarak farklı ve en büyük grubunu oluştururlar. Yaklaşık 90 mikrosistin izoformunun, metilasyon, hidroksilasyon, epimerizasyon derecesi, peptid sekansı ve toksisitesi tanımlanmıştır (5, 6). Siklik peptid olan mikrosistinler tip 1 ve tip2A ökaryotik protein fosfatazların etkili inhibitörleridir. Mikrosistinler siklo yapısına sahiptir (-Adda-D-Glu-Mdha-D-Ala-L-X-D-MeAsp-L-Z) (5, 7). Genel yapıda X ve Z çeşitli L formunda bulunan aminoasitlerdir. Adda, 3-amino-9-metoksi-2,6,8,-trimetil-10-fenil-4,6,-dekadienoik asit, D-MeAsp, 3-metilaspartik asit ve Mdha ise N-metil-dehidroalanin'dir (5,7). Mikrosistinlerin genel yapısı Şekil 1' de gösterilmektedir.

MİKROSİSTİNİN TOKSİKOLOJİK ETKİSİ

İnsanlarda mikrosistin zehirlenmesi sonucu görülen en önemli işaret karaciğer hasarıdır. 1996 yılında Brezilya'da 131 hastanın 116'sında kusma, kaslarda zayıflık gibi rutin zehirlenme belirtileri fark edilmiş, bu hastaların 100'ünde akut karaciğer hasarı gelişirken, 52'sinde "Caruaru Sendromu" olarak tanımlanan semptomlar belirlenmiştir. Bun semptomun sebebi klorlama ve filtreleme işlemi uygulanmamış sulara



Siklo-(D-Ala¹-X²-D-MeAsp³-Z⁴-Adda⁵-D-Glu⁶-Mdha⁷)

Şekil 1. Mikrosistin yapısı. Mikrosistin siklik heptapeptittir. Mikrosistinde iki değişken amino asit X ve Z olarak gösterilmektedir. En yaygın izoformu mikrosistin-LR (MA: 995. 17) dir.

karışan siyanotoksinlerin tüketilmesi sonucu meydana gelmiştir. Yapılan analizler sonucunda sulara tespit edilen mikrosistinler, aynı zamanda hastaların kanında ve karaciğerinde de bulunmuştur (8 - 10).

Gürbüz ve ark. (11), Türkiye’de Kovada gölünde yaptıkları çalışmada mikrosistin seviyesinin aylara göre değişiklik göstermesinden dolayı, insan sağlığı açısından sürekli bu suların kontrol altında tutulması gerektiğini rapor etmişlerdir. Uluslararası Kanser Araştırma Merkezi (IARC) ve Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre farelerde kilogram başına ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$) 0,04 μg karaciğer toksisitesi meydana getirmektedir. İçme sularında tolere edilebilir günlük doz mikrosistin-LR için 1,5 $\mu\text{g}/\text{L}$ dir. Siyanotoksin zehirlenmeleri içme sularına karışan toksinler nedeniyle evcil hayvanlarda da rapor edilmiştir. Amerikanın farklı eyaletlerinde [(California (12), Colorado (13), Georgia (14), Michigan (15), Mississippi (16), Oklahoma (17), Wisconsin (18), Saskatchewan] ve Kanada (19, 20)’da mikrosistinler nedeniyle evcil hayvanlarda zehirlenmeler belirlenmiştir. Mikrosistinler litrede ($\mu\text{g}/\text{L}$) birkaç mikrogram gibi küçük dozlarda dahi balıklar üzerinde toksik etki meydana getirmektedir. Tablo 1’de çeşitli balık türlerine uygulanan mikrosistin farklı dozlarının karaciğer ve böbrekler üzerine subletal etkisi görülmektedir (21-25).

Mikrosistin besinlerle alındığında organik anyon transport proteinleri ile karaciğere taşınır ve protein

fosfataz 1 ve 2A’nın inhibisyonu ile toksisitesini göstermektedir (26 - 28). Protein fosfatazın inhibisyonu yapısal filamentlerin aşırı fosforilasyonuna, hücre iskeleti degradasyonuna ve hepatik yapının bozulmasına yol açmaktadır (29 - 32). Hepatositlerde meydana gelen büzülme ve küçülmeler karaciğer dokularında hasara neden olmaktadır. Bu bölgesel doku hasarı, organ yıkımı ve hemorajik şok ile sonuçlanmaktadır (30).

Mikrosistin bütün isoformları için, toksisite dereceleri tespit edilmiştir. Örneğin en yaygın form olan mikrosistin-LR’nin, farelerde LD 50 değeri 50 μg iken, nadir görülen mikrosistin-RR için öldürücü doz 600 μg ’dan daha fazladır (33, 34). Aynı zamanda bu toksinlerin öldürücü olmayan dozlarına bile maruziyetin kanser oluşumuna neden olduğu gözlemlenmiştir (33, 34). Çeşitli çalışmalarda mikrosistin kronik maruziyeti sonucu farelerde ve ratlarda deri ve akciğer kanseri oluşumu gözlenmiştir (35, 36). Epidemiyolojik veriler insanlarda hepatosellüler karsinom gibi uzun dönemli etkilerin varlığını desteklemektedirler (37, 38).

MİKROSİSTİN BİYOSENTEZİ VE GENETİK YAPISI

Mikrosistin, ribozomal olmayan peptid sentetaz (NRPS) ve poliketid sentaz (PKS) içeren çok işlevli enzim kompleksi tarafından sentezlenmektedir. McyS gen bölgesi tarafından kodlanan biyosentez

Tablo 1. Balıklarda subletal oral mikrosistin dozlarının etkisi

Balık	Doz ($\mu\text{g MC}/\text{kg}$)	Doz sayısı	Maruziyet zamanı (Gün)	Toplam Doz ($\mu\text{g MC}/\text{kg}$)	Subletal Etki	Ref.
Sazan (Yetişkin)	2.5	16	16	40	Yaygın karaciğer hasarı	(21)
Sazan (Yetişkin)	50	28	28	1,400	Ağır karaciğer hasarı	(22)
Sazan (Genç)	400	1	1	400	Ağır karaciğer ve böbrek hasarı	(23)
Alabalık	550	8	4	4,400	Ağır karaciğer hasarı	(24)
Levrek	1,150	8	4	9,200	Ağır karaciğer hasarı	(25)

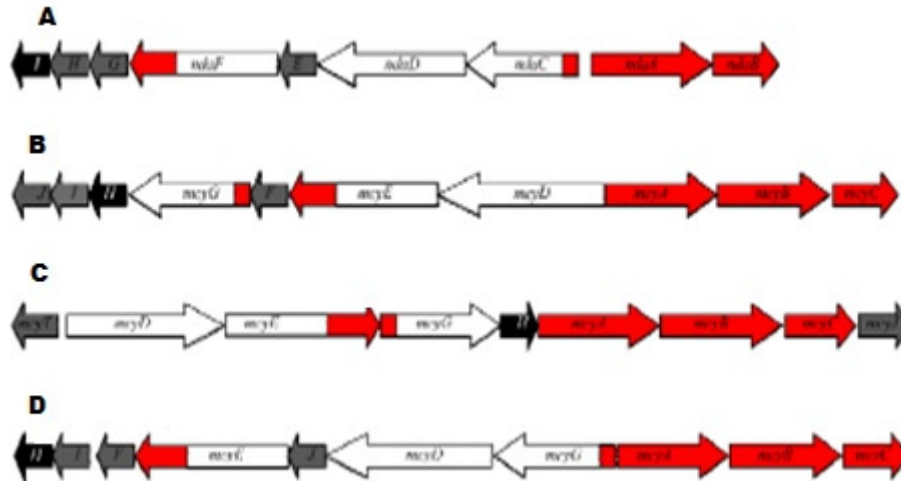
enzimleri *Microcystis*, *Anabaena*, ve *Planktothrix* gibi çeşitli siyanobakteri türlerinde karakterizedir (39-41) (Şekil 2). *Microcystis aeruginosa* PCC7806' da, *mcyS* gen kümesi 55kb'dır ve *mcyA-C* and *mcyD-J* olmak üzere sentezlenen iki operonda 10 gen içermektedir. Bu iki operondan en geniş olan gen bölgesi *mcyD-J*, PKS enzimi (*McyD*), NRPS ve PKS enzimleri (hibrit enzim) (*McyE* and *McyG*), toksinlerin taşınmasında rol alan enzimleri (*McyH*), daha küçük bir operon olan *mcyA-C* ise NRPS enzimlerini kodlanmaktadır (*McyA-C*) (39) (Şekil 3).

Homolog enzimler ve biyoinformatik analizlere bağlı Adda'nın oluşumu, *mcyD-G* ve *J* genleri tarafından kodlanan enzimler ile meydana gelmektedir. Hibrit NRPS/PKS enzimi (*McyG*) Adda biyosentezinin ilk basamağında rol almaktadır. NRPS enziminin, fenilasetatı aktive etmesi başlangıç hipotezi olarak belirlenmesine rağmen, A-PCP'nin biyokimyasal karakterizasyonu, sınıflandırılmış fenilpropanoidlerin aktive edilmesi ve PCP yüklenmesi ile meydana gelmektedir (42). Aktivasyonun ardından fenilpropanoidlerin başlatıcı ünitesi çeşitli malonil-CoA uzama basamakları ve C-metilasyon, redüksiyon, dehidrasyon ile devam eder ve *McyD*, E ve *G*' nin PKS modülleri ile katalizlenir. Aminotransferaz enzimi,

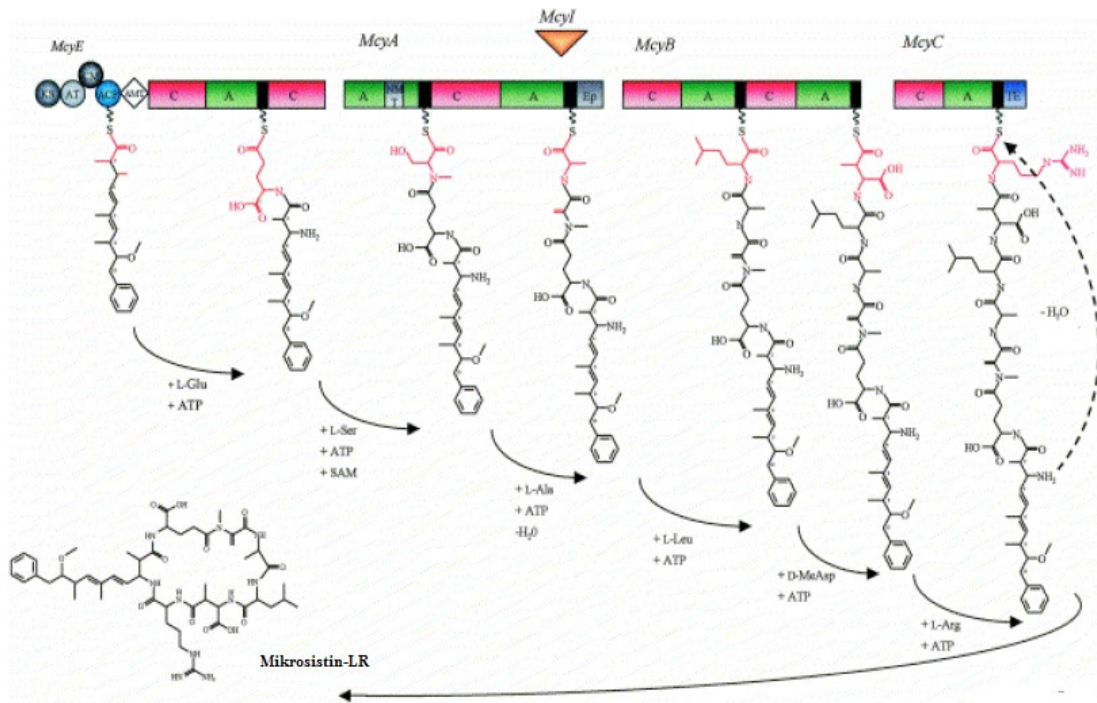
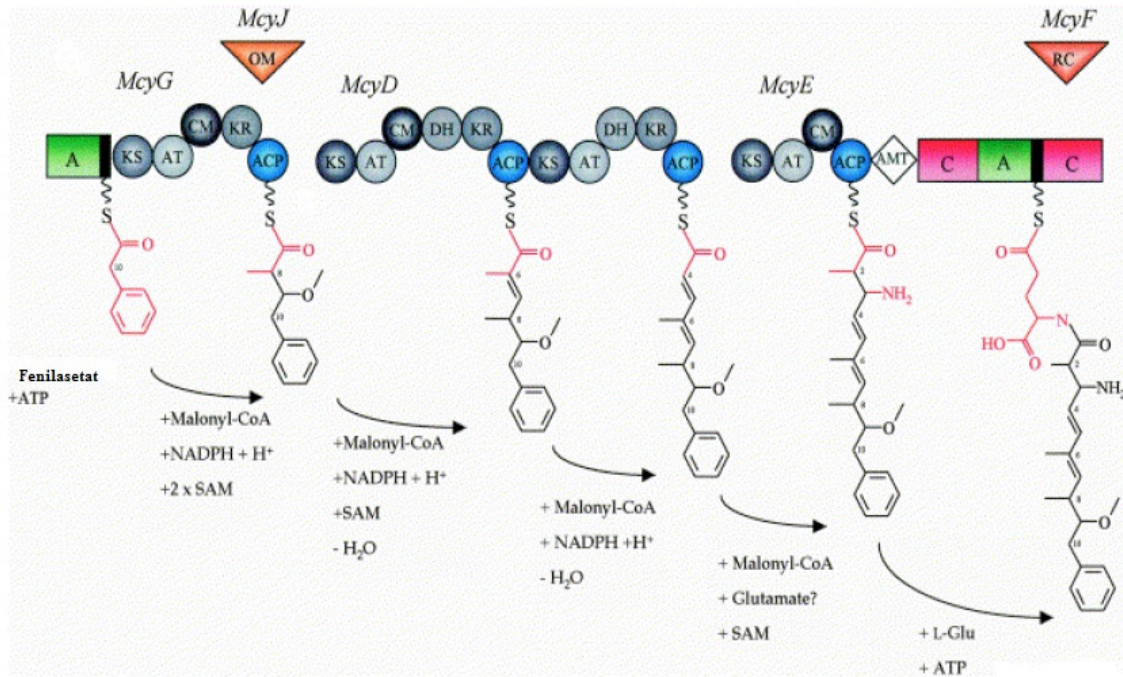
Adda biyosentezinin son aşamasında poliketid'i β -amino aside dönüştürür. İkinci hibrit PKS/NRPS enziminin ise NRPS modülünün aktivasyonda ve Adda ile D-Glu kondensasyonunda rol aldığı düşünülmektedir (4).

Mcy F ORF geninin, mikrosistin L-Glu kalıntılarının epimerizasyonundan sorumlu glutamat rasemaz enzimini kodladığı tahmin edilmektedir (39, 43). Yapılan çalışmalar *McyF*'nin Asp rasemaz olarak rol oynadığını ileri sürmektedir (44). *Planktothrix agardhii*' deki mutagenез çalışmaları, Adda üretimin monofonksiyonal enzim (*McyJ*) tarafından O-metilasyon basamağının katalizlendiği bildirmektedir (40).

Mikrosistin biyosentez yolağında kalan diğer biyosentetik enzimler spesifik aktivasyonda, modifikasyonda ve lineer peptid zincirinde aminoasit substratlarının kondensasyonunda görev almaktadır. İlk olarak *McyA*, D-ala'nın eklenmesinin ardından zincire L-Ser'ni eklemektedir. Bu basamak L-Leu ve D-MeAsp kalıntılarının (*McyB*), L-Arg (*McyC*) eklenmesi ile son peptid ürünün salınımını takip etmektedir. Kalan tek enzim 2-hidroksi-asit dehidrojenaz (*McyI*), 3-metilmalat'ın 3-metiloksalasetat'a dönüşümü ile mikrosistin siklik yapısı içinde, D-metilaspertat üretimini gerçekleştirmektedir (45).



Şekil 2. Çeşitli siyanobakterilerde hepatotoksin gen kümeleri. (A) *N. spumigena*, (B) *M. aeruginosa*, (C) *P. agardhii*, ve (D) *Anabaena* sp. 90'da mikrosistin ve nodularin gen kümeleri poliketid sentaz (beyaz), non-ribosomal peptid sentetaz (kırmızı), özel enzimler (gri) ve ABC taşıyıcılarını (siyah) kodlamaktadır (4).



Şekil 3. Mikrosistin model formasyonu (McyA-E,G). Beyaz dikdörtgen PKS veya NRPS'yi göstermektedir. Aminotransferaz kare şeklinde gösterilmektedir. ORF, McyJ, F ve I, aktivitesi üçgen ile belirtilmektedir. Kısaltmalar: A, aminoasil adenilasyon; ACP, açil taşıyıcı protein; AMT, aminotransferaz; AT, açiltransferaz; C, kondenzasyon; CM, C-metiltransferaz; DH, dehidratasyon; Ep, epimerizasyon; KR, ketoasil redüktaz; KS, β-ketoasil sentaz; NM, N-metiltransferaz; OM, O-metiltransferaz; RC, rasemaz; TE, tiyoesteraz. NRPS tiyolasyon motifi siyah ile gösterilmektedir (4, 22).

ABC taşıyıcı genin ise (*mcyH*), mikrosistinlerin taşınmasında görev aldığı bilinmektedir (46). Bu toksinler tilakoid lokalizasyonundan (47, 48) ya da yüksek ve kırmızı ışığa maruziyet ile büyüme durumunda toksinin dışarı atılmasından sorumlu olabilmektedir (49).

M. aeruginosa, *P. agardhii* (40) ve *Anabaena* sp. (41)'nin *mcyS* gen kümeleri üzerine yapılan çalışmalar toksin biyosentez prosesinin benzer olduğunu ancak, siyanobakterilerin farklı türleri arasındaki *mcyS* genlerinin diziliminde değişiklikleri göstermişlerdir (39). *M. aeruginosa* ve *Anabaena* sp. *mcyS* kümeleri iki operon arasında dizilmiştir ancak bu iki tür arasında bu operonlar içinde genlerin diziliş sırası farklılık göstermektedir. *P. agardhii*'de *mcyS* kümeleri *mcyF* ve *mcyI* içermeyen kendine özgü düzene sahiptir. Aynı zamanda *P. agardhii*'de *mcyS* gen kümeleri *mcyT* adı verilen gen içermektedir. Bu gen promotör bölgede yer almakta ve tip II tiösteraz enzimini kodladığı düşünülmektedir. *M. aeruginosa*, *P. agardhii* ve *Anabaena* sp.'de *mcyS*' in özelliği siyanobakterilerde hepatotoksin biyosentezini ve orijinini anlamak için önemlidir. Transpozaz enzimlerinin tanımlanması ile ilişkili, *mcyS* ve *ndaS* (nodularin) gen kümeleri ve yapılan filogenetik analizler çeşitli mikrosistin izoformlarının ve *mcyS* gen kümelerinin sporadik dağılımından sorumlu rekombinasyon olayları ve gen transferi teorisine izin vermektedir (39, 50, 51).

Nitrojen, fosfor, iz elementler, büyüme sıcaklığı, ışık ve pH gibi çevresel ve fiziksel faktörlerin siyanobakterilerde hepatotoksin üretimini etkilediği düşünülmektedir (52 - 58). Ancak bazı çalışmalarda bu konu tam olarak standardize edilmemiştir. Toksin düzenleme çalışmalarının çoğu direk olarak hücrel toksin ölçümü üzerine odaklanırken, Tillett ve ark. moleküler seviyede *mcy* gen kümelerinin tanımlanmasının daha yakından incelenmesine imkan vermektedir (49). Kaebnick ve ark., farklı ışık dereceleri altında *mcyB* ve *mcyD*'nin transkripsiyonu ölçmek için "RNase protection assay" kullanmışlardır. Yüksek ışık yoğunluğunda ve kırmızı ışık yoğunluğunda artan transkripsiyon seviyesini birbiri ile ilişkili

bulurken, mavi ışıkta ise transkripsiyon seviyesi azalmaktadır. İlginç olarak, koyu- hafif ışıkta (0 ve 16 μmol foton m^{-2} s^{-1}), ve orta-yüksek ışık (31 ve 68 μmol foton m^{-2} s^{-1}) aralığında meydana gelen transkripsiyonun arttığını göstermişlerdir (59). Alternatif transkripsiyon başlama bölgeleri farklı ışık yoğunlukları altında kültürlenmiş hücrelerde her iki operon için tanımlanmıştır. Örneğin düşük ışık yoğunluğu altında poliketid ve *mcyD*-J, merkez promotör (*mcyD*)'den polisistronik mesaj (*mcyDEFGHIJ*)'ın bir parçası olarak transkribe edilirken, yüksek ışık yoğunluğu altında genler alternatif promotör bölgesinden sentezlenmektedir. Yüksek ışık yoğunluğu altında alternatif promotör transkripsiyonun artmasına izin vermektedir (*mcyB* ve *mcyD*). Diğer özel enzimlerin (*mcyF*, G, H, I ve J) çoğu ise kendine özgü promotörlere sahiptir.

Beslenme içeriği ve sıcaklık gibi diğer faktörler *mcyS* ekspresyonunu ve toksin biyosentezini etkilediği gösterilmiştir. Örneğin, Sevilla ve ark., (58) *M. aeruginosa* PCC7806'de *mcyS* ekspresyonu ve toksin biyosentezi üzerine demir (Fe) nin etkisini araştırmışlardır (58). Real time PCR restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP), southern ve dot blot hibridizasyon, sekans ve yüksek basınçlı sıvı kromatografi (HPLC) analizleri, mikrosistin biyosentez genlerinin tanımlanması, mikrosistin-LR'nin sentezinin ölçümü için kullanılmaktadır (60-64). Bu çalışmanın sonucu demirden eksik beslenmenin, *mcyD* transkripsiyonda artışa neden olduğunu desteklemektedir (58).

Xu ve ark. (65), insan WRL-68 hücre hatlarına uyguladıkları Mikrosistin-LR'nin (10 μg /L) karaciğer miRNA ekspresyonunda değişikliklere neden olduğunu rapor etmişlerdir.

Mikrosistin-LR etkisinin karaciğer metalloproteinase -2/-9 gen ifadesini değiştirdiği ve kanser hücre göçünü de uyardığı yine son zamanlarda yapılan çalışmalar arasındadır (66).

Proteomiks çalışmalarında Zebrafish'lerde intraperitoneal olarak Mikrosistin (0,5 LD₅₀) (2.000 μg /kg) verilmesinden sonra 24 protein

üzerine yapılan analizleri sonucu iskelet yapısı, oksidatif stres, glikolizis metabolizması, kalsiyum iyon bağlanamsı ve diğer biyolojik fonksiyonlarda değişiklikler gözlemlenmiştir. Aynı zamanda testislerde hasar ve dişi zebrafish'lerin üreme sisteminde oksidatif stresten dolayı hasar meydana gelmiştir (67).

SONUÇ

Mikrosistinler, biyosentezi açıklanan ilk siyanobakteri toksinleridir. Mikrosistinin yaklaşık

90 izoformunun toksisite seviyeleri literatürlerde açıklanmıştır (52, 68, 69). Günümüzde özellikle karaciğer kanseri başta olmak üzere birçok kanser türünde mikrosistinlerin rolü olduğu düşünülmektedir. Hücre kültürü ve deney hayvanlarındaki çalışmalar sonucunda mikrosistinlerin genetik mekanizmalarının-yolaklarının belirlenmesi ve sistemik etkilerinin araştırılmasına devam edilmektedir. Bu tür çalışmalar sonucunda elde edilen veriler zehirlenmelerin, çeşitli organ ve doku hasarlarının ve kanser tedavilerinin başarılı bir şekilde ilerlemesinde önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

1. Bull AT, Ward AC, Goodfellow M. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2000; 64(3): 573-606.
2. Pilotto L, Hobson P, Burch MD, Ranmuthugala G, Attewell R, Weightman W. Acute skin irritant effects of cyanobacteria (blue-green algae) in healthy volunteers. *Aust N Z J Public Health*, 2004; 28(3): 220-4.
3. Botes D, Wessels P, Kruger H, Runnegar M, Santikarn S, Smith R, Barna J, Williams D. Structural studies on cyanoginosins-LR, -YR, -YA, and -YM, peptide toxins from *Microcystis aeruginosa*. *J Chem Soc*, 1985; 1: 2747-2748.
4. Pearson L, Mihali T, Moffitt M, Kellmann R, Neilan B. On the chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindrospermopsin. *Mar Drugs*, 2010; 8(5):1650-80.
5. Moore RE, Chen JL, Moore BS, Patterson GML, Carmichael WW. Biosynthesis of microcystin-LR. Origin of carbons in the Adda and Masp units. *J Am Chem Soc*, 1991; 113: 5083-4.
6. Welker M, Von Dohren H. Cyanobacterial peptides nature's own combinatorial biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev*, 2006; 30: 530-63.
7. Ziegler K, Diener A, Herpin C, Richter R, Deutzmann R, Lockau W. Molecular characterization of cyanophycin synthetase, the enzyme catalyzing the biosynthesis of the cyanobacterial reserve material multi-L-arginyl-poly-L-aspartate (cyanophycin). *Eur J Biochem*, 1998; 254: 154-9.
8. Jochimsen EM, Carmichael WW, An JS, Cardo DM, Cookson ST, Holmes CE, Antunes MB, de Melo Filho DA, Lyra TM, Barreto VS, Azevedo SM, Jarvis WR. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *N Engl J Med*, 1998; 338: 873-8.
9. Grosse Y, Baan R, Straif K, Secretan B, El Ghissassi F, Coglianò V. Carcinogenicity of nitrate, nitrite, and cyanobacterial peptide toxins. *Lancet Oncol*, 2006; 7(8): 628-9.
10. Azevedo SM, Carmichael WW, Jochimsen EM, Rinehart KL, Lau S, Shaw GR, Eaglesham GK. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. *Toxicol*, 2002; 27:181-182: 441-6.
11. Gürbüz F, Metcalf JS, Karahan AG, Codd GA. Analysis of dissolved microcystins in surface water samples from Kovada Lake, Turkey. *Sci Total Environ*, 2009; 15: 407(13): 4038-46.
12. DeVries SE, Galey FD, Namikoshi M, Woo JC. Clinical and pathologic findings of blue-green algae (*Microcystis aeruginosa*) intoxication in a dog. *J Vet Diagn Invest*, 1993; 5(3): 403-8.

13. Puschner B, Galey FD, Johnson B, Dickie CW, Vondy M, Francis T, Holstege DM. Blue-green algae toxicosis in cattle. *J Am Vet Med Assoc*, 1998; 1;213(11): 1605-7.
14. Frazier K, Colvin B, Styer E, Hullinger G, Garcia R. Microcystin toxicosis in cattle due to overgrowth of blue-green algae. *Vet Hum Toxicol*, 1998; 40(1): 23-4.
15. Fitzgerald SD, Poppenga RH. Toxicosis dueto microcystin hepatotoxins in three Holstein heifers. *J Vet Diagn Invest*, 1993; 5(4): 651-3.
16. Kerr LA, McCoy CP, Eaves D. Blue-green algae toxicosis in five dairy cows. *J Am Vet Med Assoc*, 1987; 1;191(7): 829-30.
17. Short SB, Edwards WC. Blue-green algae toxicoses in Oklahoma. *Vet Hum Toxicol*, 1990; 32(6): 558-60.
18. Galey FD, Beasley VR, Carmichael WW, Kleppe G, Hooser SB, Haschek WM. Blue-green algae (*Microcystis aeruginosa*) hepatotoxicosis in dairy cows. *Am J Vet Res*, 1987; 48(9): 1415-20.
19. Dillenberg HO, Dehnel MK. Toxic waterbloom in Saskatchewan, 1959. *Can Med Assoc J*, 1960; 83(22): 1151-4.
20. Senior VE. Algal poisoning in Saskatchewan. *Can J Comp Med Vet Sci*, 1960; 24(1): 26-31.
21. Carbis CR, Mitchell GF, Anderson JW, McCauley I. The effects of microcystins on the serum biochemistry of carp, *Cyprinus carpio* L., when the toxins are administered by gavage, immersion and intraperitoneal routes. *J Fish Diseases*, 1996; 19(2): 151-9.
22. Li XY, Chung IK, Kim JI, Lee JA. Subchronic oral toxicity of microcystin in common carp (*Cyprinus carpio* L.) exposed to *Microcystis* under laboratory conditions. *Toxicol*, 2004; 15: 44(8): 821-7.
23. Fischer WJ, Dietrich DR. Pathological and biochemical characterization of microcystin-induced hepatopancreas and kidney damage in carp (*Cyprinus carpio*). *Toxicol Appl Pharmacol*, 2000; 164(1): 73-81.
24. Tencalla FG, Dietrich DR, Schlatter C. Toxicity of *Microcystis aeruginosa* peptide toxin to yearling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat Toxicol*, 1994; 30(3): 215-24.
25. Ibelings BW, Bruning K, de Jonge J, Wolfstein K, Pires LM, Postma J, Burger T. Distribution of microcystins in a lake foodweb: No evidence for biomagnification. *Microb Ecol*, 2005; 49(4): 487-500.
26. Runnegar MT, Gerdes RG, Falconer IR. The uptake of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by isolated rat hepatocytes. *Toxicol*, 1991; 29: 43-51.
27. Runnegar M, Berndt N, Kaplowitz N. Microcystin uptake and inhibition of protein phosphatases: effects of chemoprotectants and self-inhibition in relation to known hepatic transporters. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1995; 134: 264-72.
28. Dawson RM. The toxicology of microcystins. *Toxicol*, 1998; 36: 953-62.
29. Eriksson JE, Toivola D, Meriluoto JA, Karaki H, Han YG, Hartshorne D. Hepatocyte deformation induced by cyanobacterial toxins reflects inhibition of protein phosphatases. *Biochem Biophys Res Commun*, 1990; 173: 1347-53.
30. Sahin A, Tencalla FG, Dietrich DR, Mez K, Naegeli H. Enzymatic analysis of liver samples from rainbow trout for diagnosis of blue-green algae-induced toxicosis. *Am J Vet Res*, 1995; 56: 1110-5.
31. Krishnamurthy T, Carmichael WW, Sarver EW. Toxic peptides from freshwater cyanobacteria (blue-green algae). I. Isolation, purification and characterization of peptides from *Microcystis aeruginosa* and *Anabaena flos-aquae*. *Toxicol*, 1986; 24: 865-73.
32. Dittmann E, Börner T. Genetic contributions to the risk assessment of microcystin in the environment. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2005; 203(3):192-200.
33. Yoshizawa S, Matsushima R, Watanabe MF, Harada K, Ichihara A, Carmichael WW, Fujiki H. Inhibition of protein phosphatases by microcystins and nodularin associated with hepatotoxicity. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1990; 116: 609-14.
34. Nishiwaki S, Fujiki H, Suganuma M, Nishiwaki-Matsushima R, Sugimura T. Rapid purification of protein phosphatase 2A from mouse brain by microcystin-affinity chromatography. *FEBS Lett*, 1991; 279: 115-8.
35. Falconer IR. Tumor promotion and liver injury caused by oral consumption of cyanobacteria. *Environ Toxicol Water Qual*, 1991; 6: 177-84.
36. Nishiwaki-Matsushima R, Ohta T, Nishiwaki S, Suganuma M, Kohyama K, Ishikawa T, Carmichael WW, Fujiki H. Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1992; 118: 420-4.

37. Yu S. Primary prevention of hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*, 1995; 10: 674-82.
38. Tanabe Y, Sano T, Kasai F, Watanabe MM. Recombination, cryptic clades and neutral molecular divergence of the microcystin synthetase (mcy) genes of toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *BMC Evol Biol*, 2009; 9:115.
39. Tillett D, Dittmann E, Erhard M, von Dohren H, Borner T, Neilan BA. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. *Chem Biol*, 2000; 7: 753-64.
40. Christiansen G, Fastner J, Erhard M, Borner T, Dittmann E. Microcystin biosynthesis in planktothrix: genes, evolution, and manipulation. *J Bacteriol*, 2003; 185: 564-72.
41. Rouhiainen L, Vakkilainen T, Siemer BL, Buikema W, Haselkorn R, Sivonen K. Genes coding for hepatotoxic heptapeptides (microcystins) in the cyanobacterium *Anabaena* strain 90. *Appl Environ Microbiol*, 2004; 70: 686-92.
42. Hicks LM, Moffitt MC, Beer LL, Moore B, Kelleher NL. Structural characterisation of in vitro and in vivo intermediates on the loading module of microcystin synthetase. *ACS Chem Biol*, 2006; 1: 93-102.
43. Nishizawa T, Asayama M, Shirai M. Cyclic heptapeptide microcystin biosynthesis requires the glutamate racemase gene. *Microbiology*, 2001; 147: 1235-41.
44. Sielaff H, Dittmann E, Tandeau De Marsac N, Bouchier C, Von Dohren H, Borner T, Schwecke T. The mcyF gene of the microcystin biosynthetic gene cluster from *Microcystis aeruginosa* encodes an aspartate racemase. *Biochem J*, 2003; 373: 909-16.
45. Pearson LA, Barrow KD, Neilan BA. Characterization of the 2-hydroxy-acid dehydrogenase Mcyl, encoded within the microcystin biosynthesis gene cluster of *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *J Biol Chem*, 2007; 282: 4681-92.
46. Pearson LA, Hisbergues M, Borner T, Dittmann E, Neilan BA. Inactivation of an ABC transporter gene, mcyH, results in loss of microcystin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Appl Environ Microbiol*, 2004; 70: 6370-8.
47. Shi L, Carmichael WW, Miller I. Immuno-gold localization of hepatotoxins in cyanobacterial cells. *Arch Microbiol*, 1995; 16: 7-15.
48. Young FM, Thomson C, Metcalf JS, Lucocq JM, Codd GA. Immunogold localisation of microcystins in cryosectioned cells of *Microcystis*. *J Struct Biol*, 2005; 151: 208-14.
49. Kaebnick M, Neilan BA, Borner T, Dittmann E. Light and the transcriptional response of the microcystin biosynthesis gene cluster. *Appl Environ Microbiol*, 2000; 66: 3387-92.
50. Mikalsen B, Boison G, Skulberg OM, Fastner J, Davies W, Gabrielsen TM, Rudi K, Jakobsen KS. Natural variation in the microcystin synthetase operon mcyABC and impact on microcystin production in *Microcystis* strains. *J Bacteriol*, 2003; 185: 2774-85.
51. Tooming-Klunderud A, Mikalsen B, Kristensen T, Jakobsen KS. The mosaic structure of the mcyABC operon in *Microcystis*. *Microbiology*, 2008; 154: 1886-99.
52. Sivonen K. Effects of light, temperature, nitrate, orthophosphate, and bacteria on growth of and hepatotoxin production by *Oscillatoria agardhii* strains. *Appl Environ Microbiol*, 1990; 56: 2658-66.
53. Lukac M, Aegerter R. Influence of trace metals on growth and toxin production of *Microcystis aeruginosa*. *Toxicon*, 1993; 31: 293-305.
54. Van der Westhuizen AJ, Eloff JN. Effect of temperature and light on the toxicity and growth of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* (UV-006). *Planta*, 1985; 163: 55-9.
55. Song L, Sano T, Li R, Watanabe M, Liu Y, Kaya K. Microcystin production of *Microcystis viridis* (cyanobacteria) under different culture conditions. *Phycol Res*, 1998; 42: 19.
56. Davis TW, Berry DL, Boyer GL, Gobler CJ. The effects of temperature and nutrients on the growth and dynamics of toxic and non-toxic strains of *Microcystis* during cyanobacteria blooms. *Harmful Algae*, 2009; 8 : 715-25.
57. Tonk L, Visser PM, Christiansen G, Dittmann E, Snelder EO, Wiedner C, Mur LR, Huisman J. The microcystin composition of the cyanobacterium *Planktothrix agardhii* changes toward a more toxic variant with increasing light intensity. *Appl Environ Microbiol*, 2005; 71: 5177-81.

58. Sevilla E, Martin-Luna B, Vela L, Bes MT, Fillat MF, Peleato ML. Iron availability affects mcyD expression and microcystin-LR synthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *Environ Microbiol*, 2008; 10: 2476-83.
59. Kaebernick M, Dittmann E, Borner T, Neilan BA. Multiple alternate transcripts direct the biosynthesis of microcystin, a cyanobacterial nonribosomal peptide. *Appl Environ Microbiol*, 2002; 68: 449-55.
60. Meissner K, Dittmann E, Borner T. Toxic and non-toxic strains of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* contain sequences homologous to peptide synthetase genes. *FEMS Microbiol Lett*, 1996;135: 295-303.
61. Dittmann E, Meissner K, Borner T. Conserved sequences of peptide synthetase genes in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Phycologia*, 1996; 35: 62-7.
62. Neilan BA, Dittmann E, Rouhiainen L, Bass RA, Schaub V, Sivonen K, Borner T. Nonribosomal peptide synthesis and toxigenicity of cyanobacteria. *J Bacteriol*, 1999; 181: 4089-97.
63. Kurmayer R, Kutzenberger T. Application of real-time PCR for quantification of microcystin genotypes in a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* sp. *Appl Environ Microbiol*, 2003; 69: 6723-30.
64. Kurmayer R, Dittmann E, Fastner J, Chorus I. Diversity of microcystin genes within a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* spp. in Lake Wannsee (Berlin, Germany). *Microb Ecol*, 2002; 43: 107-8.
65. Zhang Z, Zhang XX, Qin W, Xu L, Wang T, Cheng S, Yang L. Effects of microcystin-LR exposure on matrix metalloproteinase-2/-9 expression and cancer cell migration. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2012; 77: 88-93.
66. Xu L, Qin W, Zhang H, Wang Y, Dou H, Yu D, Ding Y, Yang L, Wang Y. Alterations in microRNA expression linked to microcystin-LR-induced tumorigenicity in human WRL-68 Cells. *Mutat Res*, 2012; 18: 743(1-2): 75-82.
67. Zhao S, Xie P, Li G, Jun C, Cai Y, Xiong Q, Zhao Y. The proteomic study on cellular responses of the testes of zebrafish (*Danio rerio*) exposed to microcystin-RR. *Proteomics*, 2012; 12(2): 300-12.
68. Srivastava A, Choi GG, Ahn CY, Oh HM, Ravi AK, Asthana RK. Dynamics of microcystin production and quantification of potentially toxigenic *Microcystis* sp. using real-time PCR. *Water Res*, 2012; 1: 46(3): 817-27.
69. Cantor GH, Beckonert O, Bollard ME, Keun HC, Ebbels TM, Antti H, Wijsman JA, Bible RH, Breaux AP, Cockerell GL, Holmes E, Lindon JC, Nicholson JK. Integrated histopathological and urinary metabolomic investigation of the pathogenesis of Microcystin-LR toxicosis. *Vet Pathol*, 2012; in press.