

Biopolymere

Wundverschluss der invasiven Grünalge *Caulerpa taxifolia* durch enzymatische Aktivierung eines Proteininvernetzers^{**}

Sven Adolph, Verena Jung, Janine Rattke und
Georg Pohnert*

Die Verwundung eines mehrzelligen Organismus ist in der Regel für diesen nicht tödlich, da regeneratives Gewebe rund um die verletzten Zellen gebildet werden kann. Die Reparatur der verwundeten Zellen selbst ist deshalb nicht zwingend erforderlich. Im Unterschied dazu müssen Einzeller über Mechanismen zur Zellreparatur verfügen, um physikalische Beschädigungen zu überleben. Dies gilt insbesondere für siphonale Grünalgen wie *Caulerpa taxifolia*, die aus einer einzelnen polyploiden Zelle (mit mehreren Zellkernen) bestehen, deren Länge mehrere Meter erreichen kann. Bei

[*] Dipl.-Chem. S. Adolph, Dr. V. Jung,[†] J. Rattke,
Priv.-Doz. Dr. G. Pohnert
Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie
Hans-Knöll-Straße 8, 07745 Jena (Deutschland)
Fax: (+49) 3641-571-256
E-mail: pohnert@ice.mpg.de

[†] Derzeitige Adresse:
Lonza AG
Walliser Werke
3930 Visp (Schweiz)

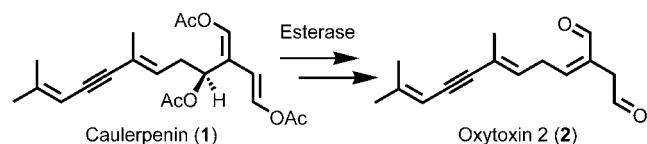
[**] Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Förderung und Prof. W. Boland für seine Unterstützung. Des Weiteren danken wir Dr. B. Schneider für seine Hilfe bei den NMR-Messungen und A. Perner für die Aufnahme der hochauflösten Massenspektren.

C. taxifolia handelt es sich um eine invasive Alge, die sich nach ihrer Einschleppung aus tropischen Gewässern im Mittelmeer und im nordamerikanischen Pazifik schnell verbreitet. Durch die Verdrängung der heimischen Arten richtet sie großen ökologischen Schaden in den betroffenen Gebieten an.^[1,2]

Der Erfolg von *C. taxifolia* beruht auf hoher Temperatur- und Substrattoleranz, einer effizienten chemischen Verteidigung und einer außergewöhnlichen asexuellen Vermehrungsstrategie:^[3–5] Nach mechanischer Verwundung der Alge werden die entstehenden Fragmente innerhalb von Sekunden durch einen gelatinösen externen Wundverschluss versiegelt, der verhindert, dass das Cytoplasma in Kontakt mit dem umgebenden Seewasser kommt (Abbildung 1a).^[6] Unmittelbar nach dieser ersten Wundreaktion entsteht durch die Einlagerung von unlöslichem Material unterhalb des externen Wundverschlusses ein mechanisch stabilerer interner Wundpfropf.^[6–8] Die versiegelten Zellfragmente enthalten die volle genetische Information und können eigenständig den Grundstock für neue Kolonien bilden.^[7,9] Aufgrund dieser Verbreitungsstrategie gehören die meisten *C.-taxifolia*-Individuen in den von der Einschleppung betroffenen Gebieten zu einem einzigen Klon.^[10,11]

Bei der Untersuchung der Reaktion von *C. taxifolia* auf Gewebeverletzung konnten wir zeigen, dass direkt nach der Verwundung Caulerpenin (**1**), der Hauptsekundärmetabolit der Alge, in einer schnellen enzymatischen Reaktion durch Esterasen umgewandelt wird. Der dabei entstehende reaktive 1,4-Dialdehyd weist eine zu einer Carbonylfunktion in Konjugation stehende Doppelbindung auf (Schema 1).^[12] Dieser Metabolit wurde zuerst in einer auf *Caulerpa prolifera* fressenden Schnecke identifiziert und als Oxytoxin 2 (**2**) bezeichnet.^[13]

HPLC/APCI-MS-Untersuchungen zeigen, dass die Konzentration von desacetyliertem Caulerpenin in den ersten Minuten nach Verwundung von *C. taxifolia* ein Maximum durchläuft. Nach vier Minuten ist dieser Metabolit nicht mehr detektierbar (Abbildung 2). Mit HPLC/MS-, GC/MS- oder NMR-Experimenten sind auch keine niedermolekularen Folgeprodukte nachweisbar, was entweder für die schnelle Zersetzung von Oxytoxin 2 (**2**) oder für die Beteiligung des Metabolits an einer Polymerbildung spricht. Auffälligerweise



Schema 1. Bildung von Oxytoxin 2 (**2**) durch enzymatische Abspaltung der Acetatgruppen von Caulerpenin (**1**) und anschließende Abspaltung von H_2O .

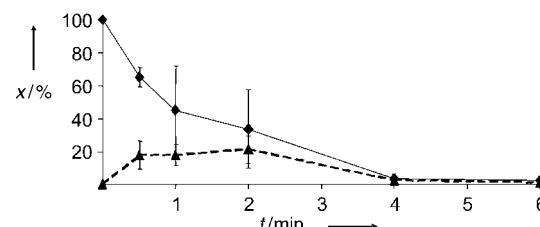


Abbildung 2. Die Umwandlung von Caulerpenin (**1**; Rauten) und der Konzentrationsverlauf des desacetylierten Produkts (Dreiecke) in der verwundeten Alge. In definierten Zeitabständen wurden Proben von verwundeter *C. taxifolia* mit Hexan extrahiert und direkt mit NP-HPLC/APCI-MS analysiert.^[16] (APCI = chemische Ionisierung bei Atmosphärendruck.) Die relativen Mengen x sind auf den internen Standard Stilben bezogen. Das desacetylierte Produkt wurde anhand des Moleküliums $[\text{M}+\text{H}^+]$ ($m/z=231$) quantifiziert, die Fehlerbalken basieren auf der Standardabweichung ($n=3$).

korreliert der Abbau von **2** zeitlich mit der Bildung des externen Wundverschlusses der Alge.^[8] Im Allgemeinen reagieren 1,4-Dicarbonylverbindungen mit nucleophilen Gruppen von Proteinen und können deshalb als Vernetzungsreagentien eingesetzt werden.^[14] Aus diesem Grund untersuchten wir, ob **2** eine solche Rolle in der Polymerisation zur Bildung des Wundverschlusses spielt.

Zur Überprüfung, ob nach der Verwundung von *C. taxifolia* eine Vernetzung stattfindet, verglichen wir den Proteingehalt von intaktem und verwundetem *C.-taxifolia*-Gewebe mit gelektrophoretischen Methoden (SDS-PAGE). Wie zu erwarten, sind dabei für die intakte Alge klar definierte Proteinbanden zu erkennen. Dagegen ist fünf Minuten nach Verwundung ein deutlich geringerer Anteil an auftrennbaren Proteinen nachzuweisen, und unlösliches Ma-

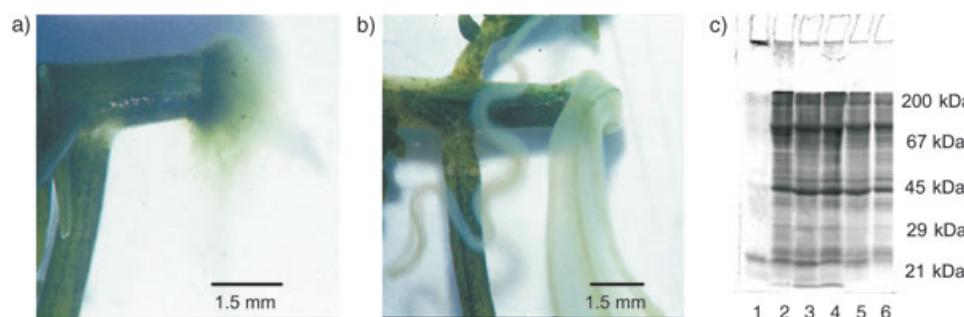


Abbildung 1. a) Externer Wundverschluss, 60 s nach Verletzung von *C. taxifolia* mit einer Rasierklinge; b) Die Wundreaktion ist in Gegenwart von 100 mg Lysin pro ml Seewasser unterdrückt c) SDS-PAGE-Auf trennung von Proteinen aus *C. taxifolia*: Bahn 1: Proteingehalt 5 min nach Verwundung; Bahn 2: intakte Alge, die Esterase wurde durch Kochen der Alge vor der Aufarbeitung inaktiviert; Bahnen 3 und 4: verwundete/intakte Alge mit 0.2 mmol Lysin pro mg Alge; Bahnen 5 und 6: verwundete/intakte Alge mit 0.2 mmol Cystein pro mg Alge. Alle Proben wurden vor dem Laden auf ein 12%-iges SDS-Gel in SDS/DTT gekocht.

terial wird in den Ladetaschen des Gels zurückgehalten (Abbildung 1c). Diese Bildung eines stabilen Polymers, das nicht durch Kochen mit Dithiothreitol (DTT) und Natrium-dodecylsulfat (SDS) in Lösung gebracht wird, spricht für eine kovalente Vernetzung der Proteine. Vergleichbare Reaktionen sind auch zu beobachten, wenn käuflische Vernetzer oder enzymatisch entschützte Dialdehyde höherer Pflanzen zu Proteinmischungen gegeben werden.^[14,15]

Sollte Oxytoxin 2 (**2**) tatsächlich an einer Proteinvernetzung beteiligt sein, so würden extern zugeführte nucleophile Aminosäuren mit den Algenproteinen um die reaktiven Zentren des Dialdehyds **2** konkurrieren. Tatsächlich wird von verwundeten Algen in Gegenwart eines Überschusses an Lysin kein Wundverschluss gebildet, obwohl die Esterase(n) der Alge GC/MS-Messungen zufolge unter diesen Bedingungen Caulerpenin (**1**) umsetzen. Innerhalb weniger Minuten tritt der Zellinhalt in das umgebende Medium aus (Abbildung 1b). Mit Gelektrophorese ließ sich die Konkurrenzreaktion der freien Aminosäuren mit den Proteinen der Algen dokumentieren. Bei Verwundung in Gegenwart von Lysin oder Cystein wird die Vernetzungsreaktion unterdrückt und dasselbe Proteinmuster, wie es auch bei der intakten Alge zu beobachten ist, wird nachgewiesen (Abbildung 1c).

Um einen genaueren Einblick in den Ablauf der Polymerbildung zu bekommen, wurden die nach Verwundung von *C. taxifolia* in Cystein-haltiger Lösung gebildeten Produkte mit HPLC/APCI-MS untersucht. Hier konnten einige von Caulerpenin (**1**) abgeleitete Produkte durch die charakteristische UV-Absorption des Dienin-Gerüsts identifiziert werden. Molekül- und Fragment-Ionen dieser Verbindungen zeigten, dass es sich um Kondensations- und Additionsprodukte von Cystein und Oxytoxin 2 (**2**) handelt (Abbildung 3). Im verwundeten Algengewebe hingegen reagiert der Dialdehyd **2** mit nucleophilen Proteinseitenketten, was zur schnellen Bildung des externen Wundverschlusses führt.

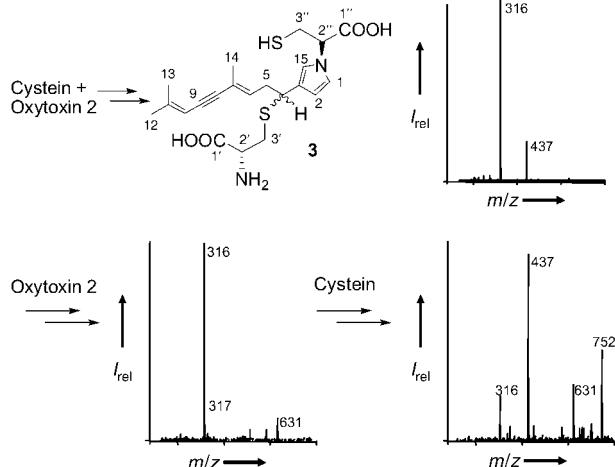


Abbildung 3. Produkte aus der Reaktion von desacetyliertem Caulerpenin und Cystein. Die APCI-Massenspektren von Verbindungen, die aus in Gegenwart von Cystein verwundeter *C. taxifolia* extrahiert wurden, sind gezeigt. Die Struktur des ersten identifizierten Vernetzungsprodukts (**3**) wurde durch NMR-Spektroskopie und HR-MS aufgeklärt. Die Massen- und UV-Spektren der höhermolekularen Verbindungen legen die Reaktion mit einer weiteren Oxytoxin-2- und zwei oder drei Cystein-Einheiten nahe.

Aufgrund der komplexen Zusammensetzung der Algenmatrix lässt sich mit den vorhergehenden Experimenten nicht eindeutig klären, ob außer Caulerpenin, Esterase(n) und Proteinen noch weitere Faktoren für die Proteinvernetzung erforderlich sind. Zur näheren Untersuchung der Polymerbildung entwickelten wir deshalb eine Modellreaktion, bei der reines Caulerpenin (**1**) mit einer immobilisierten Esterase desacyliert wurde. In Gegenwart von Cystein konnten bei dieser Reaktion dieselben Addukte und Vernetzungsprodukte identifiziert werden, die auch aus der Verwundung der Alge in Cystein-haltiger Lösung hervorgehen (Abbildung 3). Dieser Ansatz lieferte das erste Vernetzungsprodukt (**3**) in hinreichenden Mengen für 2D-NMR-Analysen. So konnte die in Abbildung 3 vorgeschlagene Struktur bewiesen werden, die durch Michael-Addition eines S-Nucleophils an die konjugierte Doppelbindung und die Kondensation eines N-Nucleophils mit der 1,4-Dialdehyd-Einheit entstehen kann.

Dieser vereinfachte Versuch zeigt, dass lediglich Caulerpenin (**1**) und eine Esterase benötigt werden, um die Reaktion des Sesquiterpens mit nucleophilen Aminosäuren zu initiieren. Durch diese Modellreaktion konnte ebenfalls das Kondensationsprodukt aus Oxytoxin 2 (**2**) und einem Modellpeptid, das nur eine nucleophile Gruppe enthält, erhalten werden (Abbildung 4). Desacetyliertes Caulerpenin ist also in der Lage, auch mit peptidischem gebundenen N-Nucleophilen zu reagieren. Demzufolge ist es möglich, das System aus Caulerpenin (**1**) und Esterase gezielt zur Vernetzung von Proteinen einzusetzen.

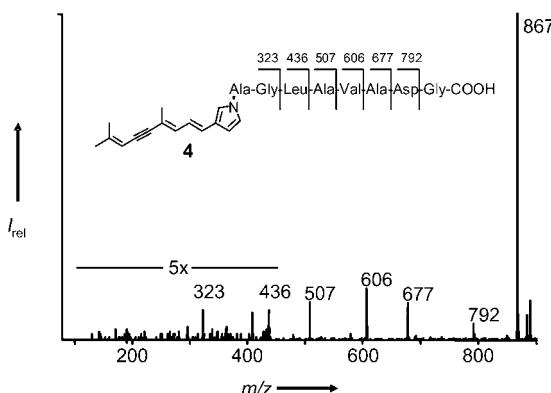


Abbildung 4. Enzymatische Desacylierung von Caulerpenin (**1**) in Gegenwart des synthetischen Oligopeptids H-AGLAVADG-OH führt zur Bildung des Addukts **4**. Die ESI-MS-Fragmentierungen der Peptidbindungen sind angegeben. Hochauflöste ESI-MS von **4** (Natriumaddukt): 889.4398 (berechnet für $C_{43}H_{62}N_8O_{11}Na$: 889.4430).

Unsere Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit Resultaten früherer Untersuchungen des externen Wundverschlusses bei verschiedenen *Caulerpa*-Spezies. Bei der Bestimmung des Kohlenhydrat- und Proteingehalts des gelatinösen Polymers durch Dreher et al. zeigte sich, dass 50 bis 75 % des unlöslichen Materials aus Proteinen mit sehr hohem Molekulargewicht bestehen.^[6] Unsere Ergebnisse führen zu der Annahme, dass es sich hierbei um durch Oxytoxin 2 (**2**) vernetzte Proteine handelt. Diese Reaktion läuft nach der schnellen enzymatischen Freisetzung des reaktiven Dialdehyds.

hyds **2** aus dem durch Enoylacetatgruppen stabilisierten Sekundärmetaboliten Caulerpenin (**1**) ab. So führt ein kontrollierter enzymatischer Prozess, der möglicherweise durch die Dekompartimentierung der Zelle in Gang gesetzt wird, zu der schnellen Bildung eines neuartigen Biopolymers. Dank dieser Strategie kann *C. taxifolia* mechanische Fragmentierungen nutzen, um ihre Verbreitung voranzutreiben.

Es ist außergewöhnlich, dass eine überlebenswichtige Zellfunktion auf Sekundärmetaboliten beruht. Hohe Esteraseaktivität und die hohe Caulerpenin-Konzentration (über 1.3 % des Feuchtgewichts^[3,16]) machen diese Reaktion allerdings zuverlässig. Interessanterweise erfüllt Caulerpenin (**1**) darüber hinaus auch noch eine Funktion als Verteidigungsmetabolit gegen Fressfeinde.^[3]

Nicht nur *Caulerpa*-Spezies, sondern auch zahlreiche weitere siphonale Grünalgen enthalten Terpene mit einer 1,4-Bis(enoylacetat)-Einheit, wie sie in Caulerpenin (**1**) gefunden wird.^[17] Mechanismen zur verwundungsaktivierten enzymatischen Desacetylierung von Halimedatetraacetat, einem Sesquiterpen aus *Halimeda*-Spezies^[18] und von Caulerpenin (**1**) durch andere *Caulerpa*-Arten wurden bereits gezeigt.^[16] Das legt die Vermutung nahe, dass das hier beschriebene Prinzip der Wundverschlussbildung bei siphonalen Makroalgen weit verbreitet sein könnte.

Experimentelles

Für die Modellreaktionen mit immobilisierter Esterase wurden 28 mg **1** (10 mg mL⁻¹ in MeOH) mit 2.8 g Schweineleberesterase (immobilisiert auf Eupergit C, ~500 U g⁻¹, Sigma) in 100 mM Tris/Trifluoresigsäure-Puffer (pH 7.5) in Gegenwart von 60.6 mg Cystein desacytyliert. Im kleineren Maßstab wurde diese Reaktion auch mit 710 µg des synthetischen Oligopeptids H-AGLAVADG-OH durchgeführt. Die Suspensionen wurden 1 h heftig geschüttelt. Anschließend wurde die Esterase durch Filtration abgetrennt, und das Filtrat direkt mit RP-HPLC/APCI-MS analysiert oder durch präparative RP-HPLC aufgetrennt.

Spektroskopische Daten für das überwiegende Diastereomer des ersten Vernetzungsprodukts **3**: ¹H-NMR (500 MHz, [D₄]MeOH): δ = 1.28 (s, 3H, 14-H), 1.79 (s, 3H, 12-H), 1.84 (s, 3H, 13-H), 2.66 (2H, 5-H, Überlagerung mit dem in geringeren Mengen auftretenden Diastereomer (ÜD)), 2.85 (dd, *J* = 15.0 Hz und 4.1 Hz, 1H, 3'-H_b), 3.15 (2H, 3''-H ÜD), 3.24 (dd, *J* = 15.0 Hz und 5.6 Hz, 1H, 3'-H_a), 3.60 (dd, *J* = 5.6 Hz und 4.1 Hz, 1H, 2'-H), 3.85 (pseudo t, *J* = 7.4 Hz, 1H, 4-H), 4.57 (1H, 2''-H ÜD), 5.31 (s, 1H, C10), 5.74 (1H, 6-H ÜD), 6.17

(1H, 2-H ÜD), 6.82 (1H, 1-H ÜD), 6.87 ppm (1H, 15-H ÜD); ¹³C-NMR (125 MHz, [D₄]MeOH): δ = 18.3 (C14), 21.3 (C13), 25.1 (C12), 28.0 (C3''), 32.8 (C3'), 36.0 (C5), 45.3 (C4), 55.2 (C2'), 68.2 (C2''), 85.7 (C9), 95.8 (C8), 106.5 (C2), 106.9 (C10), 120.4 (C15), 121.3 (C7), 125.1 (C1), 127.1 (C3), 134.7 (C6), 148.8 (C11), 172.5 (C1'), 175.4 ppm (C1''). Die chemischen Verschiebungen wurden mithilfe von HMBC und HMQC zugeordnet, die Spinsysteme (1-H)-(2-H), (4-H)-(6-H), (2'-H)-(3'-H) und (2''-H)-(3''-H) konnten in H-H-COSY-Experimenten nachvollzogen werden. Hochauflöstes ESI-MS: *m/z*: 437.1583 [M+H⁺] (berechnet für C₂₁H₂₉N₂O₄S₂: 437.1569).

Eingegangen am 12. Oktober 2004
Online veröffentlicht am 24. März 2005

Stichwörter: Aldehyde · Biopolymere · Biosynthese · Chemische Ökologie · Proteine

- [1] A. Occhipinti-Ambrogi, D. Savini, *Mar. Pollut. Bull.* **2003**, *46*, 542–551.
- [2] J. Kaiser, *Science* **2000**, *289*, 222–223.
- [3] P. Amade, R. Lemee, *Aquat. Toxicol.* **1998**, *43*, 287–300.
- [4] A. Meinesz, L. Benichou, J. Blachier, T. Komatsu, R. Lemee, H. Molenaar, X. Mari, *Bot. Mar.* **1995**, *38*, 499–508.
- [5] A. Meinesz, B. Hesse, *Oceanol. Acta* **1991**, *14*, 415–426.
- [6] T. W. Dreher, D. B. Hawthorne, B. R. Grant, *Protoplasma* **1982**, *110*, 129–137.
- [7] D. Menzel, *Protoplasma* **1988**, *144*, 73–91.
- [8] T. W. Dreher, B. R. Grant, R. Wetherbee, *Protoplasma* **1978**, *96*, 189–203.
- [9] C. M. Smith, L. J. Walters, *Mar. Ecol.* **1999**, *20*, 307–319.
- [10] O. Jousson, J. Pawłowski, L. Zaninetti, F. W. Zechman, F. Din, G. Di Giuseppe, R. Woodfield, A. Millar, A. Meinesz, *Nature* **2000**, *408*, 157–158.
- [11] O. Jousson, J. Pawłowski, L. Zaninetti, A. Meinesz, C. F. Boudouresque, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **1998**, *172*, 275–280.
- [12] V. Jung, G. Pohnert, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 7169–7172.
- [13] G. Cimino, A. Crispino, V. Dimarzo, M. Gavagnin, J. D. Ros, *Experientia* **1990**, *46*, 767–770.
- [14] S. J. Meade, A. G. Miller, J. A. Gerrard, *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 853–862.
- [15] K. Konno, C. Hirayama, H. Yasui, M. Nakamura, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 9159–9164.
- [16] V. Jung, T. Thibaut, A. Meinesz, G. Pohnert, *J. Chem. Ecol.* **2002**, *28*, 2091–2105.
- [17] V. J. Paul, W. Fenical, *Bioorg. Mar. Chem.* **1987**, *1*, 1–29.
- [18] V. J. Paul, K. L. van Alstyne, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **1992**, *160*, 191–203.