

Eine Desulfatierungs-Oxidations-Kaskade aktiviert auf Cumarin basierende Vernetzer in der Wundverschlussreaktion der einzelligen Makroalge *Dasycladus vermicularis***

Matthew Welling, Cliff Ross und Georg Pohnert*

Der Schutz vor schädlichen Umwelteinflüssen wird bei Pflanzen und Algen oft durch verwundungsaktivierte Prozesse vermittelt, bei denen im Gewebe vorliegende Metabolite schnell enzymatisch umgewandelt werden.^[1] So wurde zum Beispiel schon früh erkannt, dass bei Pflanzen und Algen durch Verwundung induzierte Lipasen und Lipoxygenasen eine Vielzahl an Oxylipinen freisetzen, die eine wichtige Rolle bei der chemischen Verteidigung spielen können.^[2] Verwundungsaktivierte enzymatische Reaktionen dienen aber nicht nur zur chemischen Verteidigung gegen Herbivore oder Pathogene. Sie können auch einen mechanischen Schutz für das Gewebe oder die Zelle darstellen.^[3] Vor allem für einzellige grüne Makroalgen ist aufgrund ihres bemerkenswerten Aufbaus ein Wundverschluss von herausragender Bedeutung. Die Algen bestehen aus einer einzigen riesigen Zelle, die eine Länge von mehreren Metern erreichen kann. Ein beeindruckendes Beispiel ist die Wundverschlussreaktion der einzelligen Grünalge *Caulerpa taxifolia*. Bei einer Verwundung der Zelle überführt die Alge das acetylierte Sesquiterpen Caulerpenin in Oxytoxin 2. Diese Verbindung ist ein hochwirksamer Proteinvernetzer, der eine zentrale Rolle bei der Bildung eines schützenden Polymers zum Verschließen der Wunde spielt.^[4] Die schnelle Umwandlung von Zellinhaltsstoffen in einen unlöslichen Wundverschluss verhindert einerseits einen schädlichen Verlust des Cytoplasmas und reduziert andererseits das Eindringen extrazellulärer Verbindungen, die sich als schädigend erweisen könnten. Eine Reihe weiterer mariner einzelliger Algen nutzt aktivierte Zellmetabolite zur Bildung eines Biopolymers, aber bislang ist nur wenig über die zugrundeliegenden Mechanismen bekannt.^[5] In der hier vorgestellten Arbeit wurden die chemischen Grundlagen der Wundverschlussbildung bei

einem Vertreter der Ordnung Dasycladales, *Dasycladus vermicularis* (Scropoli) Krasser, untersucht. Diese evolutiv alte Alge weist keine mit Caulerpenin verwandten Moleküle auf; sie ist aber dennoch in der Lage, einen Wundverschluss zu bilden. Der zeitliche Ablauf des Wundheilungsprozesses in dieser Alge wurde bereits detailliert beschrieben.^[6,7] Nach einer anfänglich schnellen Gelbildung folgt eine verzögerte Verhärtung und Braunfärbung. Dieser Ablauf führt insgesamt zur Bildung eines starren Biopolymers (Abbildung 1). Wir zeigen hier die chemischen und biochemischen Grundlagen dieser Biopolymerisation.

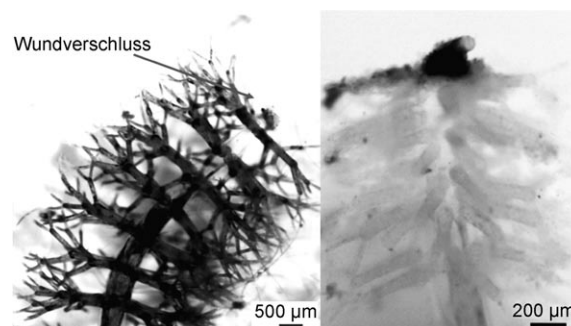


Abbildung 1. Braunfärbung des Wundverschlusses am apikalen Thallus der einzelligen Grünalge *D. vermicularis* (links 2 h und rechts 24 h nach der Verwundung).

Mithilfe von UPLC-MS (Ultra Performance Liquid Chromatography) wurde zunächst das chromatographische Profil der Metabolite von intakten und verwundeten Algen aufgenommen. Hierdurch können Veränderungen von Sekundärmetaboliten erfasst werden, die potenziell an der Biopolymerisation beteiligt sind. Überraschenderweise wurde in Methanolextrakten der intakten Alge kein 3,6,7-Trihydroxycumarin (THyC) detektiert, obwohl diese Verbindung in vorherigen Studien als der Hauptsekundärmetabolit in *D. vermicularis* beschrieben worden war.^[8] Mit NMR, HR/MS und MS/MS konnte 6,7-Dihydroxycumarin-3-sulfat (DHyS) als wichtigster Metabolit im Algenextrakt identifiziert werden. Die Struktur wurde über die Synthese der Reinsubstanz bestätigt (siehe die Hintergrundinformationen). Somit wurde in vorherigen Untersuchungen der Sekundärmetabolite von *D. vermicularis* sehr wahrscheinlich die Konzentration von DHyCS und nicht von THyC ermittelt, da beide Verbindungen ein UV-Absorptionsmaximum bei 345 nm aufweisen.^[9,10] Unter Verwendung der UPLC-MS/MS-Technik wurde das Vorliegen weiterer sulfatierter Cu-

[*] Dr. M. Welling, Prof. Dr. G. Pohnert
Institut für Anorganische und Analytische Chemie
Friedrich-Schiller-Universität Jena
Lessingstraße 8, 07743 Jena (Deutschland)
E-Mail: Georg.Pohnert@uni-jena.de

Prof. Dr. C. Ross
Department of Biology, University of North Florida
Jacksonville, FL 32224 (USA)

[**] Wir danken der VolkswagenStiftung für die finanzielle Unterstützung im Rahmen der Lichtenberg-Professur sowie Dr. Astrid Spielmeier für die Übersetzung des Manuskripts ins Deutsche.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag (detaillierte Beschreibung der Probenahme, der Extraktionsvorschriften und der durchgeführten Experimente sowie die spektroskopischen Daten von DHyCS) sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201100908> zu finden.

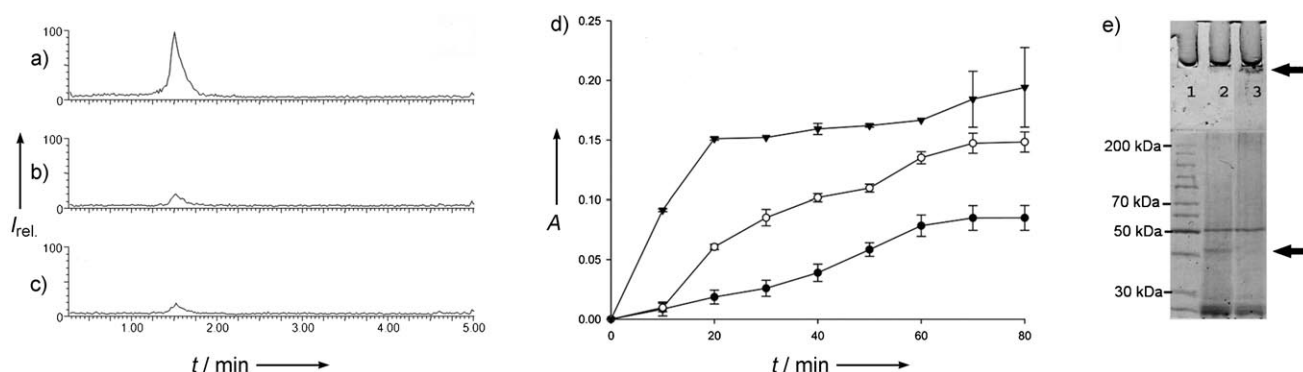


Abbildung 2. a–c) UPLC-ESI-MS-Ionenspur von DHyCS (m/z 273) in Algenextrakten 0, 2 bzw. 20 Minuten nach der Verwundung. d) Durch THyC unter oxidativen Bedingungen vermittelte Aggregation von α -Lactalbumin, aufgenommen mit einer Lichtstreuanalyse (\bullet 20 μM THyC, \circ 40 μM THyC, \blacktriangledown 80 μM THyC). e) SDS-PAGE (10%), Spur 1: Protein-Standard, Spur 2: Proteingehalt der intakten Zellen von *D. vermicularis* (gekocht), Spur 3: *D.-vermicularis*-Zellen, die erst 4 h nach der Verwundung gekocht wurden. Die Pfeile zeigen auf Polymer in der Ladetasche (oben) und Proteine in der intakten Alge.

marine oder höhersubstituierter THyC-Derivate überprüft. Außer DHyCS konnten allerdings keine Verbindungen mit der für sulfatierte Arene charakteristischen Fragment $\Delta m/z = 80$ (SO_3) nachgewiesen werden. Obwohl DHyCS bei Raumtemperatur stabil ist, nahm die Konzentration dieser Verbindung in verwundeten Algenproben mit der Zeit ab (Abbildung 2 a–c). Wir nahmen deswegen an, dass eine mechanische Verwundung der Zelle zu einer Dekompartimentierung von zellulären Sulfatasen führt, die DHyCS zu THyC abbauen können.

Durch die Hydrolyse von Sulfateestern durch Sulfatasen wird die Aktivität zahlreicher Biomoleküle reguliert. Somit können wichtige Funktionen wie Hormonregulation oder Signalwege kontrolliert werden.^[11] In der Tat konnte in einem In-vitro-Assay mit 4-Methylumbelliferonsulfat eine Sulfatase-Aktivität nachgewiesen werden, da diese Modellschubstanz schnell durch die verwundete Alge hydrolysiert wurde (siehe die Hintergrundinformationen). Während das Produkt 4-Methylumbelliferon problemlos detektiert werden konnte, wurde THyC während und nach der Wundreaktion nur in Spuren gefunden. Da Hydroxycumarine leicht oxidiert werden können,^[12] haben wir die Hypothese überprüft, dass THyC in der verwundeten Alge direkt weiter umgewandelt wird. Reaktive Sauerstoffspezies, die bereits in verwundeter *D. vermicularis* nachgewiesen wurden,^[7] könnten als Oxidationsmittel für THyC dienen. Wenn man die Kinetiken der H_2O_2 -Produktion^[7] und der DHyCS-Umwandlung vergleicht, fällt auf, dass erst nach der vollständigen Umwandlung von DHyCS das Oxidationsmittel detektiert werden kann (siehe die Hintergrundinformationen). In

Modellreaktionen konnte gezeigt werden, dass H_2O_2 THyC nur langsam oxidiert. Diese Oxidation wurde durch Meerrettich-Peroxidase (HRP) deutlich beschleunigt und verlief innerhalb von 4 min quantitativ. Der Zusatz von HRP diente dabei der Simulation einer Oxidase-Aktivität in verwundeten Algen (siehe die Hintergrundinformationen).^[7] Die Beobachtungen sind in Einklang mit einem Mechanismus, bei dem H_2O_2 nach einer Verwundung kontinuierlich produziert wird und als Substrat für die enzymatische Oxidation von THyC dient. Das Oxidationsmittel könnte somit erst detektiert werden, sobald das Substrat THyC quantitativ umgewandelt wurde.

In einer weiteren Modellreaktion sollte abgeschätzt werden, ob THyC unter oxidativen Bedingungen als Proteinvernetzer fungieren kann. Hierfür wurden THyC, H_2O_2 und HRP mit ausgewählten Amino- und Sulfhydrylgruppen tragenden Modellverbindungen umgesetzt. Unter diesen Bedingungen wird THyC schnell oxidiert, und das Produkt kann durch Glutathion (GSH), Cystein und Dithiothreitol abgefangen werden. Metabolite, die aus der Umwandlung mit einem oder zwei GSH oder mit den anderen thiolgruppenhaltigen Nukleophilen hervorgehen, können mit UV-, HR/MS- und MS/MS-Analysen detektiert und charakterisiert

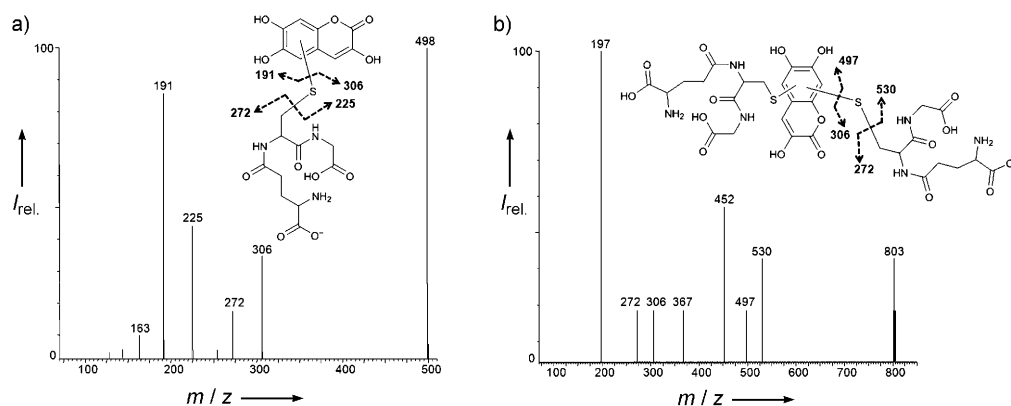


Abbildung 3. ESI-MS/MS von a) einem THyC-Glutathion-Addukt und b) einem THyC-(Glutathion)₂-Addukt. Die indukativen MS-Fragmente sind eingezeichnet.

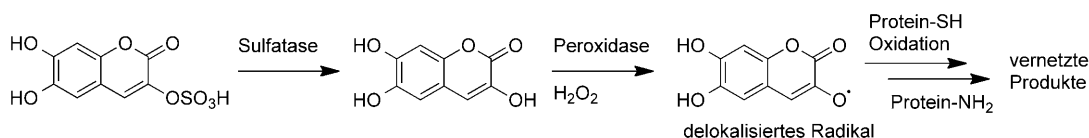
werden (Abbildung 3, siehe auch die Hintergrundinformationen). Die Fähigkeit von oxidiertem THyC, mit Amino- gruppen kovalente Bindungen zu bilden, wurde mithilfe einer Bodipy-FL-STP-Ester-Markierung überprüft, die eine reaktive Aminfunktion zur Verfügung stellt. Unter oxidativen Bedingungen nahm der Anteil freier reaktiver Aminogruppen mit steigender THyC-Konzentration ab (siehe die Hintergrundinformationen). Diese Ergebnisse zeigen, dass in der verletzten Alge Metabolite und Biomakromoleküle, die Thiol- und Aminogruppen tragen, direkt mit oxidiertem THyC reagieren können.

Wenn *D. vermicularis*-Zellen in der Gegenwart von GSH verletzt werden, können ebenfalls THyC/GSH-Addukte detektiert werden. Diese Beobachtung zeigt, dass die Voraussetzungen für die in den Modellreaktionen gezeigte Chinonchemie auch in vivo erfüllt sind. Die dabei ablaufenden Umwandlungen folgen wahrscheinlich einem Radikalmechanismus. Diese Annahme wird durch die Tatsache gestützt, dass reaktive Sauerstoffspezies, die in Gegenwart von Lipoxxygenasen und ihren Substraten gebildet werden, auch zu einer THyC-Oxidation führen (siehe die Hintergrundinformationen). Da das sulfatierte DHyCS nicht durch H_2O_2 und Peroxidasen umgewandelt wird, kann davon ausgegangen werden, dass der radikalische Angriff bevorzugt an der C3-OH-Gruppe geschieht. Dabei entsteht ein mesomeres Radikal, das an ein Nukleophil unter Bildung erster Additionsprodukte bindet (Abbildung 3, siehe die Hintergrundinformationen). Diese können dann weitere Umwandlungen durchlaufen, die zu höher funktionalisierten THyC-Derivaten führen (Abbildung 3, Schema 1). Alternativ könnten die Reaktionen entlang eines Oxidations-Additions-Wegs verlaufen, wobei Chinone beteiligt sind. Dies wurde bereits für die Thioladdition an Dopamin und die durch Chinone vermittelte Proteinvernetzung in *Liguster* beschrieben.^[13,14]

Um weitere Beweise für eine Beteiligung von THyC an der oxidativen Biopolymerisation zu liefern, wurde der Metabolit zusammen mit HRP und H_2O_2 in Gegenwart des Modellproteins α -Lactalbumin inkubiert. Innerhalb von 30–40 min nach Beginn der Inkubation wurde die Mischung braun, und die Fällung eines Feststoffs war deutlich erkennbar. Nach saurer Hydrolyse zeigte eine automatisierte Aminosäurenanalyse, dass das Fällungsprodukt reich an α -Lactalbumin war. Diese Reaktion konnte auch mit anderen, zufällig ausgewählten Testproteinen beobachtet werden, was für eine unspezifische Aktivität spricht. Während die Lösung auch ohne Testprotein eine Braunfärbung zeigte, konnte das Ausfällen nur bei Zusatz von Proteinen beobachtet werden.

Mithilfe einer Lichtstreuanalyse wurde der Polymerisationsgrad quantitativ untersucht.^[15] Drei unterschiedliche THyC-Konzentrationen wurden mit α -Lactalbumin, HRP und H_2O_2 inkubiert, und die Polymerisation wurde über 80 min hinweg beobachtet (Abbildung 2d). Bereits 20 μ M THyC reichten aus, um eine Proteinpolymerisation zu erreichen. Der Anteil der Aggregation stieg mit 40 μ M und 80 μ M THyC weiter an. Kontrollversuche ohne Zusatz von THyC zu der Reaktionsmischung zeigten keinerlei Trübung, was die wesentliche Beteiligung von THyC an der Aggregation unterstreicht. Basierend auf photometrischer Quantifizierung wurden intrazelluläre DHyCS-Konzentrationen im Bereich über 100 μ M bestimmt.^[10] Ausgehend von unseren Daten würde diese Konzentration für eine Proteinpolymerisation eindeutig ausreichen. Um zu überprüfen, ob diese Proteinaggregation auch in *Dasycladus*-Zellen erfolgt, haben wir mit SDS-PAGE die Proteine der Alge vor und nach der Verwundung bestimmt. Die Proteinanalyse von zerriebenen Zellen ergab eine Bande in der Ladetasche, was auf ein vernetztes proteinreiches Polymer hinweist.^[4] Offensichtlich wird dieses Polymer aus Algenproteinen gebildet, da die repräsentativen Banden der Algenproteine im Vergleich zur nichtvernetzten Kontrolle deutlich schwächer waren (Abbildung 2e).

Zusammenfassend legen die hier aufgeführten Beobachtungen nahe, dass nach der Verwundung der einzelligen grünen Makroalge eine komplexe Kaskade von Desulfatierung, Oxidation und Vernetzung stattfindet, die zur Bildung eines verhärteten Wundverschlusses führt und damit das Überleben der Alge nach Verwundung sichert (Schema 1). In UV- und Fluoreszenz-Untersuchungen des Wundverschlusses können die THyC-Fluoreszenz und die charakteristische UV-Absorption immer noch beobachtet werden (siehe die Hintergrundinformationen). Die empfindlichere MS-Analyse zeigt jedoch kein THyC oder niedermolekulare Derivate dieser Verbindung. Dieses Resultat ist in Einklang mit einem auf Cumarin basierenden Polymer im Wundverschluss. Eine auf der Oxidation von hydroxylierten aromatischen Metaboliten basierende Vernetzung ist ein verbreiteter Prozess in verwundetem Pflanzengewebe und bildet auch die Grundlage für die Verhärtung der Cuticula bei Insekten. In diesen Fällen werden Substrate und Aminosäuren für gewöhnlich in verschiedenen Kompartimenten gelagert, um unkontrollierten Reaktionen vorzubeugen.^[16] Der in *D. vermicularis* beobachtete Prozess folgt einem neuen Regulationsprinzip der Biopolymerisation und beruht auf einer Desulfatierung stabiler Speichermetabolite. Eine Sulfatierung kann in der Natur häufig als Schutz für reaktive Metaboliten beobachtet



Schema 1. Überführung von THyCS in einen wirksamen Proteinvernetzer. Stufe 1: Hydrolyse des Sulfatesters durch Sulfatasen nach Dekompartimentierung. Stufe 2: Radikale, die durch die Oxidation von THyC gebildet werden, reagieren mit Seitenketten von Aminosäuren. Stufe 3: Weitere Oxidation und Reaktion mit Aminosäureseitenketten führen zu vernetzten Produkten, die die Stabilität des Wundverschlusses verbessern.

werden. Sulfatierungs- und Desulfatierungsprozesse sind somit an der Regulierung wichtiger Zellaktivitäten beteiligt.^[11] Die Sulfatierung von THyC an C3 könnte der Oxidation der Verbindung vorbeugen und die Autotoxizität während des regulären Wachstums minimieren. Es ist faszinierend, dass die Bildung eines Wundverschlusses über eine Proteinvernetzung in verschiedenen einzelligen Grünalgen offensichtlich durch fundamental unterschiedliche Prozesse vermittelt wird. Die einzelligen Caulerpas nutzen ein terpenoides Acetat, das durch Esterasen zu einem hochaktiven Proteinvernetzer umgewandelt wird, der an der Wundverschlussreaktionen beteiligt ist.^[4] Die beschriebene Proteinvernetzung von *D. vermicularis* erfolgt hingegen auf eine grundlegend andere Art. Ein weiteres Screening von einzelligen Algen ist notwendig, um tiefergehende Rückschlüsse über die Entwicklung von Wundreparaturmechanismen in diesen Organismen ziehen zu können.

Eingegangen am 4. Februar 2011,
veränderte Fassung am 23. Mai 2011
Online veröffentlicht am 30. Juni 2011

Stichwörter: Cumarin · Einzellige Algen · Enzymkatalyse · Polymer · Proteinvernetzung

- [1] a) G. Pohnert, *Top. Curr. Chem.* **2004**, 239, 179; b) U. Wittstock, J. Gershenzon, *Curr. Opin. Plant Biol.* **2002**, 5, 300.
- [2] a) K. Matsui, *Curr. Opin. Plant Biol.* **2006**, 9, 274; b) G. Pohnert, *ChemBioChem* **2005**, 6, 946.
- [3] D. Arrieta-Baez, R. E. Stark, *Phytochemistry* **2006**, 67, 743.
- [4] S. Adolph, V. Jung, J. Rattke, G. Pohnert, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 2866; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 2806.
- [5] M. Welling, G. Pohnert, F. C. Kupper, C. Ross, *J. Adhes.* **2009**, 85, 825.
- [6] C. Ross, F. C. Kupper, V. Vreeland, J. H. Waite, R. S. Jacobs, *J. Phycol.* **2005**, 41, 531.
- [7] C. Ross, V. Vreeland, J. H. Waite, R. S. Jacobs, *J. Phycol.* **2005**, 41, 46.
- [8] D. Menzel, R. Kazlauskas, J. Reichelt, *Bot. Mar.* **1983**, 26, 23.
- [9] E. Perez-Rodriguez, J. Aguilera, I. Gomez, F. L. Figueroa, *Mar. Biol.* **2001**, 139, 633.
- [10] E. Perez-Rodriguez, J. Aguilera, F. L. Figueroa, *J. Exp. Bot.* **2003**, 54, 1093.
- [11] S. R. Hanson, M. D. Best, C. H. Wong, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 5858; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 5736.
- [12] F. Sollai, P. Zucca, E. Sanjust, D. Steri, A. Rescigno, *Biol. Pharm. Bull.* **2008**, 31, 2187.
- [13] K. Konno, C. Hirayama, H. Yasui, M. Nakamura, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 9159.
- [14] R. Xu, X. Huang, K. J. Kramer, M. D. Hawley, *Bioorg. Chem.* **1996**, 24, 110.
- [15] H. Madari, D. Panda, L. Wilson, R. S. Jacobs, *Cancer Res.* **2003**, 63, 1214.
- [16] S. Bittner, *Amino Acids* **2006**, 30, 205.