



Metabolomik unterstützt die Strukturaufklärung eines Sexualpheromons von Kieselalgen**

Jeroen Gillard, Johannes Frenkel, Valerie Devos, Koen Sabbe, Carsten Paul, Martin Rempt, Dirk Inzé, Georg Pohnert,* Marnik Vuylsteke* und Wim Vyverman*

Kieselalgen (Diatomeen) sind photosynthetisierende einzelne Organismen, die oft als dominante Primärproduzenten in pelagischen und benthischen aquatischen Ökosystemen vorkommen.^[1,2] Obwohl diese Algen in der Biosphäre damit eine zentrale Rolle einnehmen, ist wenig über ihren Lebenszyklus und insbesondere ihre Pheromonchemie bekannt. Diatomeen vermehren sich durch asexuelle Zellteilung, die durch kurze Episoden sexueller Reproduktion unterbrochen wird.^[3,4] Unter den Mikroalgen nehmen Diatomeen eine Sonderstellung ein, da sexuelle Fortpflanzung nur dann erfolgt, wenn eine für jede Art spezifische kritische Zellgröße (sexual size threshold, SST) unterschritten wird.^[5] Durch die starre biomineralisierte Zellwand bedingt, nimmt während der asexuellen mitotischen Zellteilung die mittlere Zellgröße der Population ab (Abbildung 1).^[6] Die Wiederherstellung der ursprünglichen Größe wird bei den meisten Arten durch sexuelle Reproduktion gewährleistet. Nach der Paarung wird eine große Initialzelle gebildet, die dann wieder den Startpunkt für einen neuen Zyklus der vegetativen Vermehrung darstellt.^[6,7] In der evolutionär alten Gruppe der zentrischen Diatomeen wird die mitotische Zellteilung, die zur Bildung der Gameten führt, durch Umweltsignale ausgelöst. Diese Signale führen dann, falls die SST unterschritten ist, zur Bildung von Eizellen und begeißelten Spermien.^[8] In den jüngeren und artenreicheren pennaten Diatomeen ist es die Paarung von diploiden Zellen, die die Produktion von so genannten Isogameten und damit die sexuelle Reproduktion auslöst.^[6,9] Auch in diesen vorwiegend benthisch in Biofilmen lebenden Algen kontrolliert die SST die Paarungsbereitschaft. Es gibt aber erste indirekte Hinweise darauf, dass auch Pheromone als Regulatoren bei der Differenzierung und Paarung der Zellen betei-

ligt sind. Die chemische Struktur dieser Signalmoleküle war aber bisher noch nicht bekannt.^[6,10]

Wir wählten die pennate Diatomee *Seminavis robusta*, die sich in den letzten Jahren als Modellorganismus etabliert hat,^[7,11] um physiologische und metabolische Prozesse während der sexuellen Fortpflanzung zu untersuchen. Die Paarungsbereitschaft ist strengstens von der Zellgröße abhängig, und wir konnten eine genau definierbare SST von $(51.6 \pm 0.5) \mu\text{m}$ ermitteln (Abbildung 2a). Wie die meisten pennaten Diatomeen ist auch *S. robusta* heterothallisch – also eine Art, bei der morphologisch identische aber physiologisch unterschiedliche Zelltypen vorliegen. Eine Unterscheidung der beiden sexuell unterschiedlichen Zelltypen kann nach der Mischung von G1-Phasen-synchronisierten^[12] Kulturen gemacht werden (Abbildung 2b). Abhängig von der Zelldichte der Kulturen bilden sich Paare oder Cluster eines mobilen Paarungstypes (hier als „mating type +“ (MT⁺) bezeichnet) um eine anlockende Zelle (MT⁻) aus. Die Motilität der MT⁺-Zellen ist dabei schon in Gegenwart von Medium einer sich paarenden Kultur stark erhöht, was die Beteiligung von regulativen Pheromonen nahelegt. Wir entwickelten einen Bioassay, der die Pheromonwirkung beweist und auch eine Quantifizierung der Aktivität der involvierten Pheromone möglich macht. Dazu nutzten wir hydrophil-lipophil ausgewogene Festphasenextraktionskartuschen (HLB-SPE), die mit *S. robusta*-Kulturmedium beladen wurden. Die SPE-Absorberkörner wurden dann aus den Kartuschen entnommen und dienten als Pheromonquelle. Mit Lichtmikroskopie konnte die Verhaltensantwort der Zellen nach Gabe der pheromonbeladenen Körner verfolgt werden. Wurden diese Körner mit Medium einer sich paarenden Kultur beladen,

[*] Dr. J. Gillard,^[§] V. Devos,^[‡] Prof. Dr. K. Sabbe, Prof. Dr. W. Vyverman
Laboratory of Protistology and Aquatic Ecology
Department of Biology, Ghent University, 9000 Gent (Belgien)
E-Mail: wim.vyverman@ugent.be
Homepage: <http://www.pae.ugent.be/academic.html>
J. Frenkel,^[‡] C. Paul, Dr. M. Rempt, Prof. Dr. G. Pohnert
Institut für Anorganische und Analytische Chemie
Bioorganische Analytik, Friedrich-Schiller-Universität
07743 Jena (Deutschland)
E-Mail: georg.pohnert@uni-jena.de
Homepage: http://www.uni-jena.de/prof_pohnert.html
Prof. Dr. D. Inzé, Prof. Dr. M. Vuylsteke
Department of Plant Systems Biology, VIB
9052 Gent (Belgien)
und
Department of Plant Biotechnology and Bioinformatics
Ghent University, 9052 Gent (Belgien)

E-Mail: mavuy@psb.vib-ugent.be
Homepage: <http://www.psb.ugent.be/marnik-vuylsteke>

[§] Derzeitige Adresse:
J. Craig Venter Institute, San Diego, CA 92121 (USA)

[‡] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.

[**] G.P., J.F. und C.P. wurden durch die VolkswagenStiftung, die IMPRS „Exploration of Ecological Interactions with Molecular and Chemical techniques“ und die Jena School for Microbial Communication finanziell unterstützt. J.G. und V.D. wurden durch das „Institute for the Promotion of Innovation by Science and Technology (IWT) – Flanders“ gefördert. J.G. erhielt ein EMBO short term fellowship (ASTF 410.00-2008). W.V., K.S., D.I. und M.V. danken der Belspo für finanzielle Unterstützung der „Culture Collections of Microorganisms (BCCM)“ und dem Ghent University Research Funding (BOFGO 01G01911).



Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201208175> zu finden.

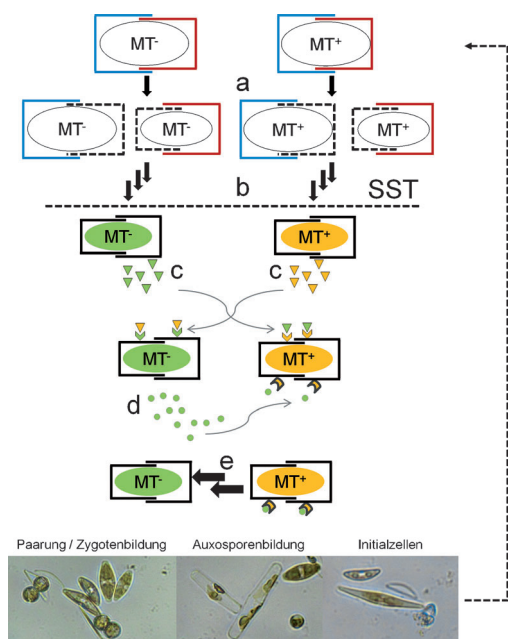


Abbildung 1. Größenabnahme während der asexuellen Zellteilung und Wiederherstellung der ursprünglichen Zellgröße durch Differenzierung der Paarungstypen und Zellpaarung in der Diatomee *Seminavis robusta*. Die biomineralisierte Diatomeenzellwand wird durch zwei ungleiche Hälften aufgebaut, die im Querschnitt als blaue und rote offene Kästen dargestellt sind. a) Während der Mitose werden neue Hälften (gestrichelt) innerhalb der bestehenden Strukturen gebildet, was zu einer b) Verringerung der mittleren Zellgröße der Population führt. c) Wenn die artspezifische kritische Zellgröße (SST) erreicht wird, differenzieren sich sexuelle Paarungstypen (MT^+ und MT^-). Beide Paarungstypen produzieren chemische Signale (Dreiecke), die das Paarungsverhalten des jeweiligen Partners aktivieren. d) MT^- entlässt das Lockpheromon L-Diprolin (grüne Punkte). e) MT^+ wird durch die Pheromonquelle angelockt. Nach der Zellpaarung erfolgen Meiose, Gametogenese und die Bildung von Zygoten, die schlussendlich zur Bildung von Zellen der ursprünglichen Größe führt.

zogen sie MT^+ -Zellen ($< SST$) an, was die Bildung eines extrahierbaren Pheromons beweist (Abbildung 2b, Film in den Hintergrundinformationen). Ebenso aktiv war das Medium von MT^- -Zellen, die zuvor mit zellfreiem Kulturüberstand von MT^+ -Zellen ($< SST$) konditioniert wurden (Abbildung 2c). Extrakte von MT^- -Zellen die größer als die SST waren, zeigten keine Aktivität, selbst wenn sie mit MT^+ Medium ($< SST$) konditioniert wurden (Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen). Aber nicht nur die Lockwirkung von MT^- ist von der Anwesenheit chemischer Signale des Paarungspartners abhängig. Auch die MT^+ -Motilität wird durch Signale vom Partner MT^- induziert. Eine Lockwirkung pheromonbeladener Körner wurde nur beobachtet, wenn die MT^+ -Zellen zuvor mit zellfreiem MT^- -Medium ($< SST$) behandelt wurden (Abbildung 2c). Beide Paarungstypen verlassen sich demnach auf chemische Signalstoffe, um sich der Anwesenheit eines reifen ($< SST$) Sexualpartners zu versichern, bevor sie selbst in die sexuelle Antwortreaktion investieren. Diese synchronisierte Aktivität von gleich mehreren Paarungssignalen ist konzentrationsabhängig und erhöht damit nochmals die Chancen einer erfolgreichen sexuellen Vermehrung (Abbildung S2). In Einklang mit diesen Ergeb-

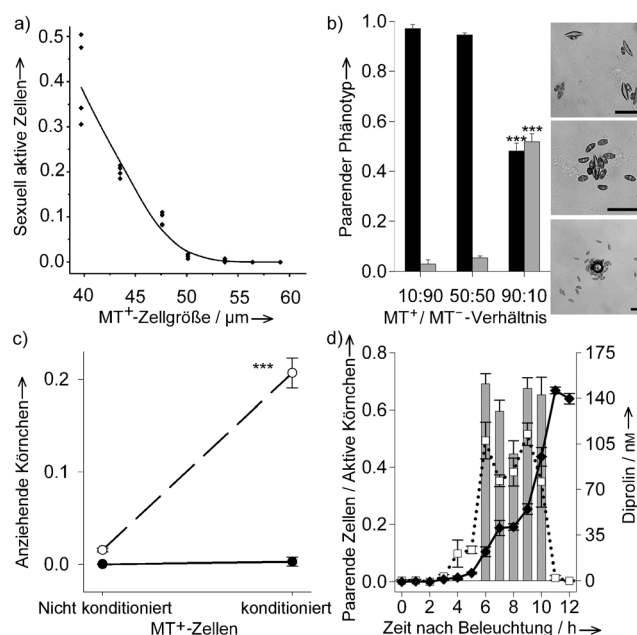


Abbildung 2. Regulation der Pheromonproduktion. a) Bestimmung der Sexualität von *S. robusta* in Abhängigkeit der Zellgröße. Aufgetragen ist der Anteil der sexuell aktiven MT^+ -Zellen in Kulturen kleiner MT^- -Zellen ($< SST$), die mit gleichen Anteilen von MT^+ -Zellen unterschiedlicher Größe gemischt wurden. b) Anteile an Zellpaaren (schwarze Balken, obere mikroskopische Aufnahme) und Clustern (graue Balken, mittlere Aufnahme) in Mischungen von Kulturen unterschiedlicher Paarungstypen (Mittelwerte \pm Standardfehler, $n = 3$; ***: $p < 0.001$). Größere MT^- - und kleinere MT^+ -Zellen (beide $< SST$) wurden zur Unterscheidbarkeit genutzt. Die untere mikroskopische Aufnahme zeigt ein aktives, von MT^+ umgebenes pheromonbeladenes SPE-Korn im Bioassay. Die Größe des Maßstabalkens ist 50 μm . c) Attraktivität von SPE Körnern, die mit konditioniertem (gestrichelte Linie) und nichtkonditioniertem (durchgezogene Linie) Medium von MT^- -Zellen beladen wurden. Getestet wurden auf konditionierte und nichtkonditionierte MT^+ -Zellen (Mittelwerte \pm Standardfehler, $n = 5$; ***: $p < 0.001$). d) Anteil der paarenden Zellen in einer Kultur, die beide Paarungstypen enthält (—•—). Anteil der für MT^+ attraktiven SPE Körner, die mit Extrakten des Mediums derselben sich paarenden Kultur beladen wurden (•••••). Die grauen Balken zeigen die Diprolin-Konzentration im Medium (Mittelwerte \pm Standardfehler, $n = 3$).

nissen sind auch Freilandbeobachtungen, bei denen nur in ausreichend dichten sexuell reifen ($< SST$) Populationen eine sexuelle Vermehrung beobachtet wurde.^[13,14]

Die Fähigkeit, die Pheromonchemie von *S. robusta* in Kulturen zu kontrollieren, ermöglichte es uns, eine vergleichende Exometabolom-Analyse durchzuführen, um einen ersten Signalstoff zu identifizieren. Dazu nahmen wir die metabolischen Profile von Metaboliten auf, die aus MT^- -Kulturen nach verschiedenen Vorbehandlungen ins Medium abgegeben wurden. In Verbindung mit einer auf multivariater Statistik basierenden Datenauswertung konnten wir Signale des Lockpheromons identifizieren, die dann zur Strukturauflösung herangezogen wurden. Diese Herangehensweise reduzierte den Arbeitsaufwand im Vergleich zur herkömmlichen Bioassay-geleiteten Fraktionierung erheblich.^[15] Dazu wurden HLB-SPE-Extrakte von Medien aus konditionierten und nichtkonditionierten MT^- -Kulturen mit „Ultra-Performance“-Flüssigchromatographie/Massenspektrometrie

(UPLC/MS) untersucht. So konnte das Exometabolom der Kulturen mit einer hohen Abdeckung erfasst werden (Abbildung 3a).^[16] Metaboliten, die in konditionierten Kulturen hochreguliert zu finden sind, wurden unterstützt durch

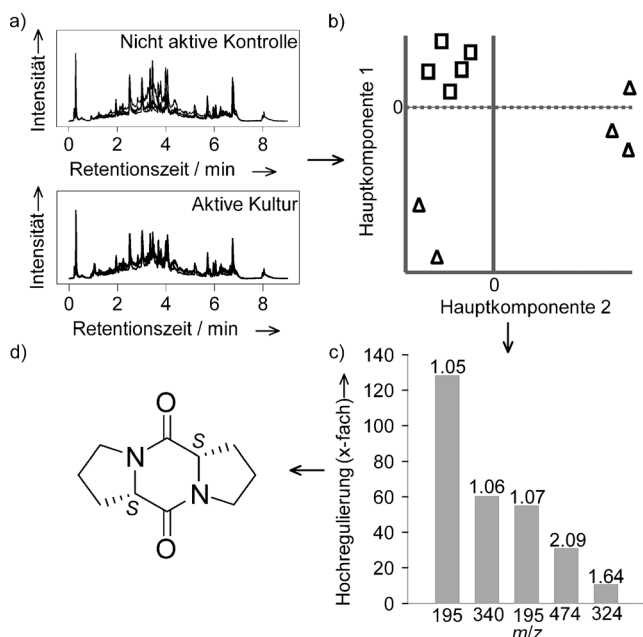


Abbildung 3. Arbeitsablauf während der durch vergleichende Metabolomik unterstützten Pheromonidentifizierung. a) Mediumextrakte von nichtkonditionierten (oben) und konditionierten (unten) MT⁺-Kulturen werden mit UPLC/MS untersucht. b) Nach Erfassung von Masse-Retentionszeit-Paaren werden die komplexen Daten mit Hauptkomponentenanalyse ausgewertet. Die MT⁺-Extrakte der Kontrollen (Dreiecke) und aktiven Extrakte (Quadrate) gruppieren. c) Die fünf am signifikantesten hochregulierten Masse-Retentionszeit-Paare in konditionierten MT⁺-Kulturen (Zahlen über den Balken geben die Retentionszeit in min). d) Pheromonstruktur.

Hauptkomponentenanalyse identifiziert. Eine Verbindung mit dem Pseudo-Molekülion $[M+H]^+$ (m/z 195) stellte sich dabei als am signifikantesten hochreguliert heraus und wurde für weitere Untersuchungen ausgewählt. Nach gezielter Aufreinigung mit präparativer HPLC konnte die Kandidatenverbindung zunächst auf ihre Aktivität als Lockpheromon überprüft werden (Abbildung 3). Die dabei beobachtete starke Aktivität motivierte dann zur Strukturaufklärung. Die Analyse des Fragmentierungsmusters in Tandem- und EI-MS legte ein 2,5-Diketopiperazin (Di-L-prolyldiketopiperazin, im Folgenden kurz als „Diprolin“ bezeichnet) als Pheromonkandidaten nahe (Abbildung 3d und Abbildung S3). Die Tatsache, dass das Molekül nur während des Paarungsvorgangs produziert wurde, erhärtet die Pheromonvermutung. Außerdem war der Bioassay zur anziehenden Wirkung nur positiv, wenn Diprolin im Medium detektiert werden konnte (Abbildung 2d). Enantioselektive Synthese, ausgehend von L- oder D-Prolin, und Coelution in der UPLC/MS bestätigte die Struktur (Abbildung 4).^[17] Die Absolute Konfiguration des von L-Prolin abgeleiteten Pheromons konnte mit Messungen des Zirkulardichroismus aufgeklärt werden. Untersuchungen an axenischen Kulturen zeigten, dass die Algenzellen selbst

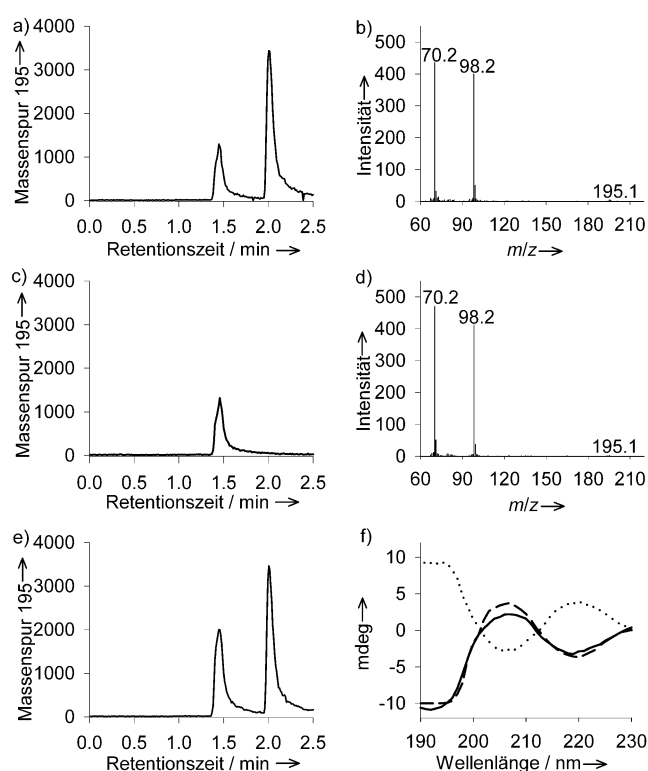


Abbildung 4. Charakterisierung des Pheromons. a) LC-MS-Profil des pheromonhaltigen Extrakts (Massenspur m/z 195; das Signal des internen Standards Koffein erscheint bei 2.1 min) und b) das entsprechende MS/MS-Spektrum. c, d) synthetisches L-Diprolin und e) Coinjektion des Extrakts mit synthetischem Standard. f) Zirkulardichroismus-Spektren von synthetischem L- (durchgezogene Linie) und D-Diprolin (gepunktet). Die gestrichelte Linie zeigt das Spektrum des natürlichen Pheromons.

und nicht assoziierte Bakterien das Pheromon produzieren (Abbildung S4).

Zur Quantifizierung der Aktivität wurde synthetisches Diprolin auf SPE-Körner beladen und zu konditionierten MT⁺-Kulturen gegeben. L-Diprolin beladene Körner lockten MT⁺-Zellen bis hinunter zu Konzentrationen von ca. 2 pmol mg⁻¹ SPE-Material an. Die Lockwirkung war konzentrationsabhängig mit einer potenziellen Sättigung der Rezeptoren bei 200 nmol mg⁻¹ SPE-Material (ca. 715 nm, Abbildung S5). Obwohl die Methode gewisse Unsicherheiten bei der Quantifizierung lokaler Pheromonkonzentrationen aufweist, kann abgeschätzt werden, dass die Lockwirkung von synthetischem L- und D-Diprolin aus sich paarenden Kulturen vergleichbar sind (1.5 nm bis 165 nm, Abbildung 2d). In natürlichen Biofilmen liegen oft noch höhere Zelldichten als in unseren Experimenten vor und somit werden auch im Lebensraum der Algen Pheromonkonzentrationen erreicht, die hinreichend für eine zuverlässige Anlockung sind. Sowohl in synchronisierten Kulturen konditionierter MT⁺-Zellen als auch in Mischungen beider Paarungstypen, wird L-Diprolin erst fünf Stunden nach Beginn der Beleuchtung detektiert (Abbildung 2d und Abbildung S6). Diese lichtabhängige Pheromonproduktion ist auch mit früheren Beobachtungen von lichtabhängiger Paarung der pennaten Diatomee *Haslea ostrearia* in Einklang.^[18] Eine lichtabhängige Synchronisie-

rung könnte dazu dienen, die Wahrscheinlichkeit einer Begegnung sexuell aktiver Zellen nochmals zu erhöhen. L-Diprolin wird nur bis zehn Stunden nach Beleuchtungsbeginn nachgewiesen. Der darauffolgende Abfall der Pheromonkonzentration fällt mit dem Verlust der Attraktivität des Mediums zusammen (Abbildung 2d). Da L-Diprolin unter den Versuchsbedingungen stabil ist, könnte ein aktiver Abbau oder die Wiederaufnahme durch die Zellen für die beobachtete Konzentrationsverringerung verantwortlich sein. Da der Abfall der L-Diprolin-Konzentration auch in konditionierten MT⁻-Kulturen beobachtet wurde, in denen sich keine MT⁺-Zellen befanden (Abbildung S6), liegt die Vermutung nahe, dass der Pheromonproduzent selbst für den Abbau verantwortlich ist und damit aktiv eine Irreführung des Sexualpartners durch gealterte Pheromonsignale vermeidet. Alternativ könnten assoziierte Bakterien für die Metabolisierung des Pheromons verantwortlich sein. Überraschenderweise zeigt auch D-Diprolin in den Bioassays eine zum enantiomeren L-Diprolin vergleichbare Aktivität. Diese ungewöhnliche Beobachtung könnte mit einem „swipe card“-Mechanismus erklärt werden, bei dem vorwiegend elektronische und weniger geometrische Eigenschaften des Signals erkannt werden.^[19] Alternativ könnte man diese Beobachtung damit erklären, dass während des beobachteten schnellen Diprolin-Abbaus Racemisierung oder eine andere Umsetzung erfolgt, die ein aktives D-Diprolin-Folgeprodukt erzeugt.

Diprolin ist bisher noch nicht als Pheromon beschrieben, aber die Verbindung wurde bereits in zahlreichen Organismen, wie höheren Pflanzen und Pilzen nachgewiesen, wo ihre antibakterielle Aktivität zugeschrieben wird.^[20] Die Pheromonchemie von *S. robusta* ist gänzlich unterschiedlich zu der von verwandten, ebenfalls heterokontophytischen Braunalgen. Diese nutzen keine Peptide sondern vielmehr unpolare, von Fettsäuren abgeleitete Kohlenwasserstoffe, um Gameten anzulocken.^[21]

Zusammengefasst verfügt die pennate Diatomee *S. robusta* über eine ausgeklügelte mehrstufige Kontrolle der sexuellen Fortpflanzung. Dazu werden mehrere Pheromone genutzt, von denen Diprolin das erste Signalmolekül aus Diatomeen darstellt, dessen Struktur aufgeklärt werden konnte. Der beschriebene Mechanismus ermöglicht es den Zellen, die Investition in sexuelle Fortpflanzung zu kontrollieren und erst nach Wahrnehmung von Signalen des sexuell reifen Paarungspartners physiologische Antworten zu synchronisieren (Abbildung 1). Unsere Arbeiten liefern eine mechanistische Erklärung für bereits früher berichtete indirekte Beobachtungen pheromonvermittelter Sexualisierung

und Anlockung.^[10] Angesichts der grundlegenden Neuartigkeit der Pheromonchemie von *S. robusta* erwarten wir, dass diese und zukünftige Arbeiten über Pheromonproduktion und -rezeption in Diatomeen zum Verständnis des großen evolutionären und ökologischen Erfolgs dieser Algen beitragen werden.

Eingegangen am 11. Oktober 2012

Online veröffentlicht am 13. Dezember 2012

Stichwörter: Algen · Zellzyklus · Massenspektrometrie · Metabolomik · Pheromone

- [1] D. G. Mann, *Phycologia* **1999**, 38, 437–495.
- [2] C. B. Field, M. J. Behrenfeld, J. T. Randerson, P. Falkowski, *Science* **1998**, 281, 237–240.
- [3] P. von Dassow, M. Montresor, *J. Plankton Res.* **2011**, 33, 3–12.
- [4] C. Bowler, A. De Martino, A. Falciatore, *Curr. Opin. Plant Biol.* **2010**, 13, 623–630.
- [5] L. Geitler, *Bot. Rev.* **1935**, 1, 149–161.
- [6] V. A. Chepurinov, D. G. Mann, K. Sabbe, W. Vyverman in *International Review of Cytology*, Vol. 237 (Hrsg.: K. W. Jeon), Elsevier Academic Press, San Diego, **2004**, S. 91–154.
- [7] V. A. Chepurinov, D. G. Mann, P. von Dassow, P. Vanormelingen, J. Gillard, D. Inze, K. Sabbe, W. Vyverman, *BioEssays* **2008**, 30, 692–702.
- [8] E. V. Armbrust, *Nature* **2009**, 459, 185–192.
- [9] C. Bowler et al., *Nature* **2008**, 456, 239–244.
- [10] S. Sato, G. Beakes, M. Idei, T. Nagumo, D. G. Mann, *PLoS ONE* **2011**, 6, e26923.
- [11] V. A. Chepurinov, D. G. Mann, W. Vyverman, K. Sabbe, D. B. Danielidis, *J. Phycol.* **2002**, 38, 1004–1019.
- [12] J. Gillard et al., *Plant Phys.* **2008**, 148, 1394–1411.
- [13] D. d'Alélio, M. R. d'Alcala, L. Dubroca, D. Sarno, A. Zingone, M. Montresor, *Limnol. Oceanogr.* **2010**, 55, 106–114.
- [14] K. E. Holtermann, S. S. Bates, V. L. Trainer, A. Odell, E. Virginia Armbrust, *J. Phycol.* **2010**, 46, 41–52.
- [15] E. K. Prince, G. Pohnert, *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, 396, 193–197.
- [16] A. Barofsky, C. Vidoudez, G. Pohnert, *Limnol. Oceanogr. Methods* **2009**, 7, 382–390.
- [17] D. Nakamura, K. Kakiuchi, K. Koga, R. Shirai, *Org. Lett.* **2006**, 8, 6139–6142.
- [18] J.-L. Mouget, R. Gastineau, O. Davidovich, P. Gaudin, N. A. Davidovich, *FEMS Microbiol. Ecol.* **2009**, 69, 194–201.
- [19] J. C. Brookes, A. P. Horsfield, A. M. Stoneham, *J. R. Soc. Interface* **2009**, 6, 75–86.
- [20] L. Huberman, N. Gollop, K. Y. Mumcuoglu, E. Breuter, S. R. Bhusare, Y. Shai, R. Galun, *Med. Vet. Entomol.* **2007**, 21, 127–131.
- [21] G. Pohnert, W. Boland, *Nat. Prod. Rep.* **2002**, 19, 108–122.