

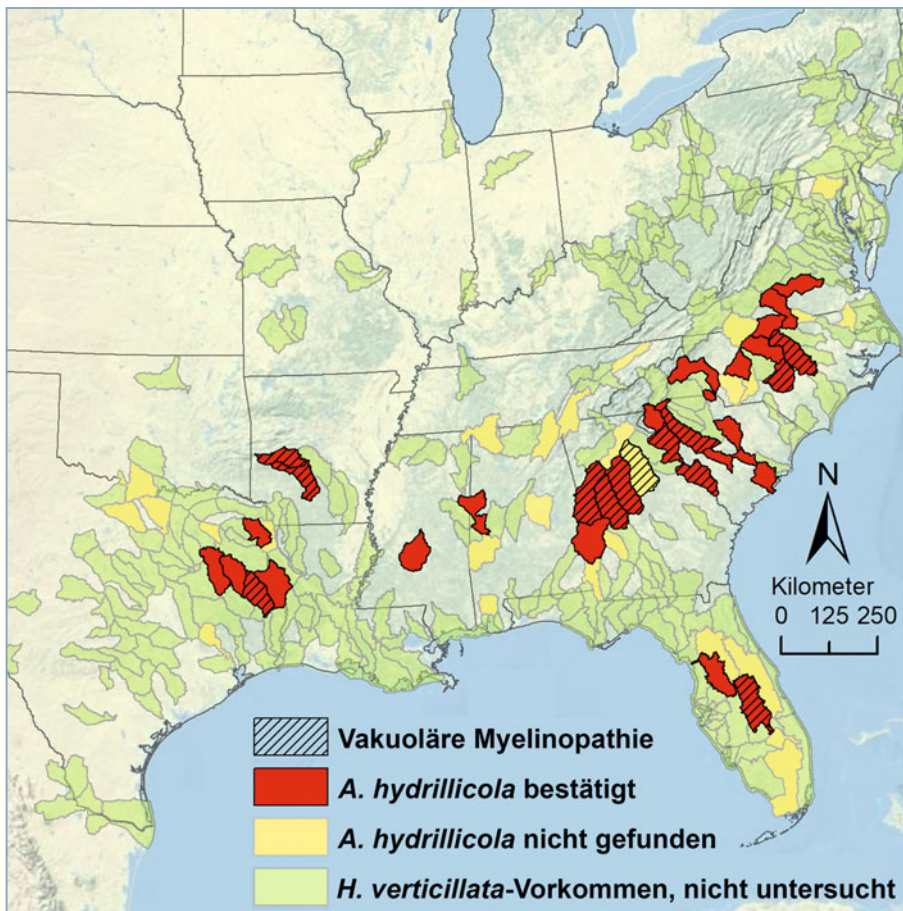
Naturstoffforschung

Jagd auf den Adlermörder – Entdeckung eines neuen Cyanotoxins

STEFFEN BREINLINGER, TIMO H. J. NIEDERMEYER
INSTITUT FÜR PHARMAZIE, UNIVERSITÄT HALLE-WITTENBERG, HALLE (SAALE)

Hunting down the eagle killer: Vacuolar myelinopathy is a neurological disease affecting wildlife – including the iconic bald eagle – in the United States. Its cause has been elusive for decades, but its occurrence has been linked to the cyanobacterium *Aetokthonos hydrillicola* colonizing the invasive aquatic plant *Hydrilla verticillata*. In a recent study, we found that *A. hydrillicola* produces a novel highly toxic biindole alkaloid (aetokthonotoxin), and proved that it is causing the disease.

DOI: 10.1007/s12268-021-1640-2
© Die Autoren 2021



▲ **Abb. 1:** Auftreten von Vakuolärer Myelinopathie (VM) in Wasserscheiden, in denen Grundnesseln (*Hydrilla verticillata*) von Cyanobakterien (*Aetokthonos hydrillicola*) bewachsen sind. Schraffiert: Wasserscheiden, in denen VM diagnostiziert wurde; grün: Vorkommen von *H. verticillata*, noch nicht auf Vorhandensein von *A. hydrillicola* untersucht; gelb: *A. hydrillicola* bisher nicht gefunden; rot: Funde von mit *A. hydrillicola* bewachsene *H. verticillata*. Abb. nach [7].

■ In den Wintern 1994/95 und 1995/96 wurden am DeGray Lake, Arkansas, USA, mehr als 70 Weißkopfseeadler tot aufgefunden – fast die gesamte Population der dort überwinternden Tiere [1]. Die verendeten Tiere zeigten weder äußerliche Verletzungen noch Anzeichen für Infektionskrankheiten. Auch bekannte Umweltgifte konnten als Ursache ausgeschlossen werden, jedoch wiesen alle Tiere eine schwammartige Veränderung in der Weißen Substanz in Gehirn und Rückenmark auf. Die Myelinscheiden hatten sich von den Axonen gelöst und es bildeten sich Vakuolen, insbesondere in Sehzentrum, Kleinhirn und Hirnstamm. Deshalb wurde diese neuartige neurodegenerative Erkrankung vakuoläre Myelinopathie (VM) genannt.

Vakuoläre Myelinopathie – eine mysteriöse Erkrankung

In Herbst und Winter der darauffolgenden Jahre fanden Forscher:innen mehr und mehr betroffene Vögel, auch Wasservögel wie Blässhühner. 1998 hatte sich die Krankheit bereits auf zehn Gewässer in sechs Bundesstaaten im Südosten der USA ausgebreitet. Nicht nur Vögel entwickeln VM: Auch bei Amphibien, Reptilien und Fischen wurde die Krankheit inzwischen diagnostiziert [2]. Betroffene Tiere zeigen neurologische Beeinträchtigungen, verlieren die Orientierung, ihre motorischen Fähigkeiten sind eingeschränkt, sie werden lethargisch und sterben.

Die Ursache für VM stellte Wissenschaftler:innen vor ein Rätsel. Frühe Studien legten die Vermutung nahe, dass ein saisonal auftretendes Neurotoxin der Auslöser für VM sein könnte. Epidemiologische Untersuchungen in Gebieten, in denen VM vorkommt (VM-positiv), lieferten erste Anhaltspunkte: Erkrankte und verendete Vögel wurden ausschließlich in der Umgebung künstlich angelegter Gewässer gefunden, die dicht mit Unterwasserpflanzen (hauptsächlich *Hydrilla verticillata*, Grundnessel) bewachsen waren. Diese invasive Pflanze, die in den 1950er-Jahren als Aquariumpflanze aus Asien nach

Florida eingeschleppt wurde, ist in den südöstlichen US-Bundesstaaten weit verbreitet [3]. Allerdings gibt es auch *Hydrilla*-bewachsene Gewässer, an denen VM nicht auftritt. Weitergehende Untersuchungen führten zur Entdeckung eines bislang unbekanntes, auf Pflanzen lebenden Cyanobakteriums (*Aetokthonos hydrillicola*), das nur in VM-positiven Gewässern *Hydrilla*-Blätter besiedelt (**Abb. 1**, [4]).

Versuche bestätigten, dass pflanzenfressende Wasservögel, die sich von mit *A. hydrillicola* kolonisierten *H. verticillata*-Pflanzen ernähren, VM entwickeln [5]. Erkrankte Tiere stellen leichte Beute für Raubvögel dar, die nach dem Verzehr ihrer Beute ebenfalls an VM erkranken – das Neurotoxin wird über die Nahrungskette weitergegeben [6].

Cyanobakterien sind berüchtigt für die Produktion von Toxinen, in der breiten Öffentlichkeit im Zusammenhang mit giftigen Algenblüten bekannt. Deshalb legte diese Entdeckung die Vermutung nahe, dass VM

durch ein cyanobakterielles Toxin ausgelöst wird.

Dem „Adlermörder“ auf der Spur

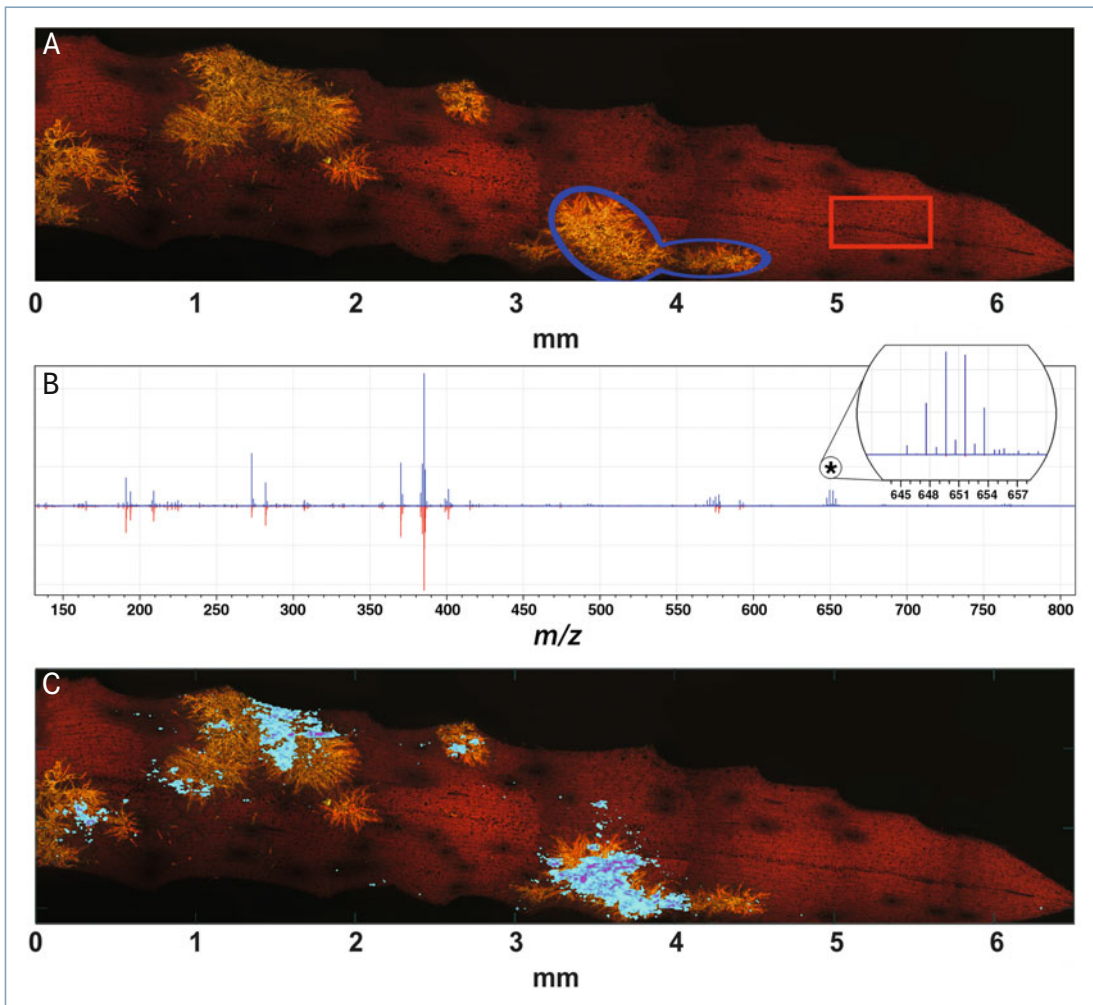
2011 sammelten unsere Kooperationspartner um Susan Wilde (University of Athens, Georgia, USA) mit *A. hydrillicola* kolonisierte Grundnesseln aus dem VM-positiven J. Strom Thurmond Reservoir in Georgia/South Carolina. Wir isolierten anschließend das darauf wachsende Cyanobakterium, um es im Labor zu kultivieren und das vermutlich gebildete Cyanotoxin zu isolieren. Damit sollte unsere Hypothese, dass VM durch ein Cyanotoxin ausgelöst wird, bestätigt werden. Aufgrund des extrem langsamen Wachstums der Cyanobakterien benötigte es umfangreiche Versuche zu geeigneten Kultivierungsbedingungen und viel Geduld, bis nach etwa zwei Jahren ausreichend Biomasse der Cyanobakterien für erste Fütterungsversuche zur Verfügung stand. Unsere Kooperationspartner fanden jedoch, dass unsere Cyanobakterien-Biomasse in

den Versuchstieren keine VM auslöste – ein Rückschlag, denn es schien, als ob unsere Hypothese nicht zuträfe.

Bakterien können bei unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen unterschiedliche Naturstoffe produzieren [8]. Produziert *A. hydrillicola* das postulierte Toxin eventuell nur, wenn es auf *H. verticillata* wächst? Mit dieser neuen Hypothese im Hinterkopf wollten wir cyanobakterielle Metabolite *in situ* auf kolonisierten Blättern von *H. verticillata* nachweisen. Dafür setzten wir die Methode *atmospheric-pressure matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging* (AP-MALDI-MSI) ein. Dabei wird eine Probe mit einem Laser systematisch abgescannt und massenspektrometrisch untersucht. Pixel für Pixel können so räumlich aufgelöst Informationen über die chemische Zusammensetzung der Probenoberfläche gewonnen werden. Mithilfe spezialisierter Software werden die einzelnen Pixel dann zu Bildern zusammengesetzt. Wir untersuchten die Oberfläche eines koloni-

Hier steht eine Anzeige.

 Springer



▲ **Abb. 2:** AP-MALDI-MSI-Untersuchung eines mit *Aetokthonos hydrillicola* kolonisierten Blatts von *Hydrilla verticillata* offenbart einen Cyanobakterium-spezifischen Metaboliten. **A,** Mikroskopisches Bild von *A. hydrillicola*-Kolonien auf einem Blatt von *H. verticillata*. **B,** Vergleich der gemittelten Massenspektren der beiden Regionen rot (Blatt ohne Cyanobakterium) und blau (Kolonie) in A. Vergrößert das für eine fünfmal bromierte Verbindung charakteristische Isotopenmuster bei m/z 645. Diese Verbindung ist ausschließlich in der Cyanobakterienkolonie detektierbar. **C,** Übereinanderlegen von A und dem MSI-Bild zeigt den räumlichen Zusammenhang zwischen diesem Metaboliten und den Kolonien. Abb. nach [7].

sierten Blatts und konnten tatsächlich einen Metaboliten detektieren, dessen Verteilung sich mit den *A. hydrillicola*-Kolonien auf dem Blatt deckt (**Abb. 2**), der in unseren Laborkulturen jedoch nicht nachweisbar war.

Die durch die massenspektrometrische Analyse ermittelte Summenformel $C_{17}H_6Br_5N_3$ ließ vermuten, dass es sich bei dieser Substanz um einen bisher nicht beschriebenen Naturstoff handelt. Und – Heureka! – wir wussten augenblicklich, warum diese Substanz in unseren Laborkulturen nicht gebildet wurde: Für die Biosynthese dieses Stoffs wird – wie aus der Summenformel ersichtlich – Bromid benötigt, das in den Standard-Kultivierungsmedien für Cyanobakterien nicht enthalten ist. In der Tat, nach Zugabe von Kaliumbromid

zum Medium konnten wir diese Substanz auch in unseren Laborkulturen nachweisen, insbesondere unter Stressbedingungen: Eine Reduktion der Temperatur oder Scheerstress (starkes Rühren/Schütteln der Kulturen) steigerten die Produktion der Substanz auf das Hundertfache. Wir konnten nachweisen, dass *Hydrilla* in der Lage ist, Bromid zu akkumulieren – dadurch könnte dem Cyanobakterium ein natürliches bromidreiches Umfeld zur Verfügung stehen.

Ein anschließendes Screening von *H. verticillata*/*A. hydrillicola*-Biomassen von VM-positiven und VM-negativen Gebieten bestätigte unsere heiße Spur: Die bromierte Substanz konnte ausschließlich in Biomasse aus VM-positiven Gebieten nachgewiesen werden. Gewebeprobe von erkrankter Bläss-

hühner aus demselben Gebiet gaben weitere Gewissheit: Die Substanz fand sich in den Proben, was die Aufnahme des möglichen Toxins über den Magen-Darm-Trakt bestätigte.

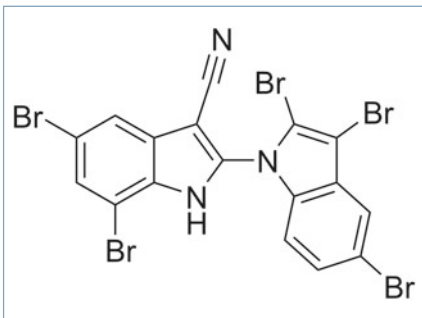
Identifizierung und Charakterisierung von Aetokthonotoxin

Nach der Isolierung der Substanz konnten wir ihre Struktur aufklären und stellten fest, dass es sich tatsächlich um einen neuen und strukturell sehr ungewöhnlichen Naturstoff handelte, den wir Aetokthonotoxin nannten (AETX, **Abb. 3**).

Die Sequenzierung des Genoms von *A. hydrillicola* erlaubte uns die Identifizierung des Biosynthese-Genclusters von AETX. Wir bestätigten experimentell, dass eine der beiden Halogenasen in dem Cluster in der Lage ist, Tryptophan mit dem beobachteten Substitutionsmuster zu bromieren. Abschließend charakterisierten wir die biologische Aktivität von AETX in *in vivo*-Assays. AETX ist sehr toxisch für den

Nematoden *Caenorhabditis elegans* (LC_{50} 40 nM) und Zebrafische (*Danio rerio*; LC_{50} 275 nM). Hühner (*Gallus gallus*), die AETX verabreicht bekamen, entwickelten die für VM charakteristischen neurologischen Läsionen – der Beleg dafür, dass AETX das lange gesuchte VM-auslösende Toxin ist!

Eine wichtige offene Frage ist, woher in der freien Wildbahn das für die Biosynthese benötigte Bromid stammt. Wahrscheinlicher als eine natürliche geologische Herkunft ist ironischerweise ein anthropogener Ursprung: Zur Kontrolle der invasiven Pflanze *H. verticillata* wird ein bromidhaltiges Herbizid eingesetzt (Diquat-Dibromid). Auch ein Eintrag aus Kohlekraftwerken, Kraftstoffzusätzen oder der Flammschutzmittelindustrie ist wahrscheinlich.



▲ **Abb. 3:** Struktur von Aetokthonotoxin (AETX).

Wechselwirkungen in Ökosystemen sind oft komplexer, als sie uns oberflächlich betrachtet erscheinen. Die Auswirkungen von *A. hydrillicola* und seinem Neurotoxin auf aquatische Ökosysteme ist ungeklärt: AETX ist lipophil und reichert sich über die Nahrungskette an. Das Gefahrenpotenzial für Säugetiere einschließlich des Menschen (z. B. durch den Konsum von Fischen und Wasservögeln aus VM-positiven Gewässern) ist noch ungewiss. Die Schaffung eines öffentlichen Bewusstseins für das Problem und ein verstärktes Monitoring von *A. hydrillicola* und AETX sind daher unbedingt erforderlich. *H. verticillata* ist in Europa nicht invasiv, und *A. hydrillicola* wurde bisher noch nicht in Europa gefunden – ob sich beide mit fortschreitendem Klimawandel auch hier ausbreiten werden, bleibt spekulativ.

Danksagung

Wir danken der DFG für finanzielle Unterstützung (NI 1152/3-1; INST 271/388-1) und allen zum Projekterfolg beitragenden Studierenden, Mitarbeiter:innen und Kollaborationspartner:innen, insbesondere Dan Enke, Tabitha Phillips und Susan Wilde. ■

Literatur

- [1] Thomas NJ, Meteyer CU, Sileo L (1998) Epizootic vacuolar myelinopathy of the central nervous system of bald eagles (*Haliaeetus leucocephalus*) and American coots (*Fulica americana*). *Vet Pathol* 35: 479–487
- [2] Maerz JC, Wilde SB, Terrell VK et al. (2019) Seasonal and plant specific vulnerability of amphibian tadpoles to the invasion of a novel cyanobacteria. *Biol Invasions* 21: 821–831
- [3] Madeira PT, Van TK, Steward KK et al. (1997) Random amplified polymorphic DNA analysis of the phenetic relationships among world-wide accessions of *Hydrilla verticillata*. *Aquatic Botany* 59: 217–236
- [4] Wilde SB, Johansen JR, Wilde HD et al. (2014) *Aetokthonos hydrillicola* gen. et sp. nov.: epiphytic cyanobacteria on invasive aquatic plants implicated in avian vacuolar myelinopathy. *Phytotaxa* 181: 243–260
- [5] Wiley FE, Twiner MJ, Leighfield TA et al. (2009) An extract of *Hydrilla verticillata* and associated epiphytes induces avian vacuolar myelinopathy in laboratory mallards. *Environ Toxicol* 24: 362–368
- [6] Birrenkott AH, Wilde SB, Hains JJ et al. (2004) Establishing a food-chain link between aquatic plant material and avian vacuolar myelinopathy in mallards (*Anas platyrhynchos*). *J Wildl Dis* 40: 485–492
- [7] Breinlinger S, Phillips TJ, Haram BN et al. (2021) Hunting the eagle killer: a cyanobacterial neurotoxin causes vacuolar myelinopathy. *Science* 371: eaax9050
- [8] Scherlach K, Hertweck C (2009) Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganisms. *Org Biomol Chem* 7: 1753–1760

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Timo Niedermeyer
 Institut für Pharmazie, AG Biogene Arzneistoffe
 Universität Halle-Wittenberg
 Hoher Weg 8
 D-06120 Halle/Saale
 timo.niedermeyer@pharmazie.uni-halle.de
<https://ag-bioarznei.pharmazie.uni-halle.de>

AUTOREN



Steffen Breinlinger

2008–2013 Pharmaziestudium an der Universität Freiburg. 2014 Diplomarbeit an der Universität Heidelberg. 2015–2016 freiberuflicher Vertretungsapotheker. 2016–2021 Promotionsstudium an den Universitäten Tübingen und Halle-Wittenberg.



Timo Niedermeyer

1996–2001 Pharmaziestudium an der FU Berlin. 2006 Promotion an der Universität Greifswald. Nach Tätigkeiten in der pharmazeutischen und biotechnologischen Industrie (Riemser Arzneimittel AG und Cyano Biotech GmbH) zunächst Juniorprofessor im Deutschen Zentrum für Infektionsforschung an der Universität Tübingen. Seit 2017 Professor für Biogene Arzneistoffe im Institut für Pharmazie der Universität Halle-Wittenberg.

Hier steht
eine Anzeige.

 Springer